

Monitoring der Eliminationskinetik von Aktivierungsmarkern der Blutgerinnung nach autologer Serumtransfusion

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Anna Katharina Wernecke, geb. Winterhagen

aus Solingen

2021

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Bernd Pötzsch
2. Gutachterin: Prof. Dr. med. Birgit Stoffel-Wagner

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.10.2021

Aus dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin
Direktor: Prof. Dr. Johannes Oldenburg

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	11
1.1 Venöse Thromboembolie	11
1.1.1 Epidemiologie	11
1.1.2 Pathomechanismus und Risikofaktoren.....	12
1.1.3 Physiologie der Hämostase und Fibrinolyse.....	15
1.1.4 Klinik	21
1.1.5 Diagnostik	22
1.2 Angeborene thrombophile Risikofaktoren	28
1.2.1 Mutationen von Gerinnungsinhibitoren	28
1.2.2 Faktor-V-Leiden-Mutation und APC-Resistenz.....	29
1.2.3 Prothrombin-G20210A-Mutation	30
1.3 Labordiagnostik der Thrombophilie (Thrombophilie-Screening).....	30
1.4 Aktivierungsmarker der Gerinnung und Fibrinolyse	32
1.4.1 Eliminationskinetik von Aktivierungsmarkern.....	34
1.5 Ziel der Arbeit	34
2. Material und Methoden	36
2.1. Materialien	36
2.1.1 Verwendete Chemikalien	36
2.1.2 Verwendete Reagenzien.....	36
2.1.3 Verwendete Pufferlösungen	37
2.1.4 Verwendete Materialien	38
2.1.5 Verwendete Geräte.....	39
2.1.6 Verwendete Test-Kits	40
2.1.7 Probandenkollektiv	40
2.2 Methoden	41
2.2.1 Allgemeines Versuchsprinzip	41
2.2.2 Zeitlicher Ablauf des Vorhabens.....	42
2.2.3 Herstellung der Serumpräparation aus den Eigenblutproben	45
2.2.4 Autologe Serumtransfusion und Probengewinnung	46
2.2.5 Messung der Gerinnungs- und Aktivierungsmarker	47

2.2.5.1	Messung mit Hilfe des Gerinnungsanalysers.....	47
2.2.5.2	STACLOT® VIIa-rTF.....	50
2.2.5.3	Enzyme-linked Immunosorbent-Assay (ELISA).....	51
2.2.5.4	Messung der freien Thrombinkonzentration mittels Oligonucleotide-based EnzymeCapture Assay (OECA).....	54
2.2.6	Pharmakokinetik.....	57
2.2.7	Datenanalyse.....	61
2.2.8	Statistische Methoden.....	61
3.	Ergebnisse.....	62
3.1	Herstellung einer Serumpräparation mit Biomarkern der Gerinnselbildung und Fibrinolyse.....	62
3.2	Patientenkollektiv.....	64
3.3	Hämostaseparameter in der Serumpräparation der Probanden.....	64
3.4	Einfluss der autologen Serumtransfusion auf die Plasmaspiegel verschiedener Hämostaseparameter.....	66
3.5	Pharmakokinetik ausgewählter Aktivierungsmarker nach autologer Serumtransfusion.....	68
3.6	Eliminationskinetik ausgewählter Aktivierungsmarker.....	80
4.	Diskussion.....	84
4.1	Problematik der bisher etablierten Gerinnungsuntersuchungen zur Feststellung von thrombophilen Risikofaktoren.....	84
4.2	Aktivierung der Hämostase in vitro.....	85
4.3	Einfluss der Serumtransfusion auf die Gerinnung in vivo.....	85
4.4	Eliminationskinetik der Biomarker D-Dimere, F1+2, TAT und PAP.....	88
4.4.1	D-Dimere und ihre Abbaukinetik.....	88
4.4.2	F1+2 und seine Abbaukinetik.....	91
4.4.3	TAT und seine Abbaukinetik.....	92
4.4.4	Eliminationskinetik von PAP.....	94
4.5	Fazit und Ausblick.....	95
5.	Zusammenfassung.....	97
6.	Tabellenverzeichnis.....	99
7.	Abbildungsverzeichnis.....	100

8. Literaturverzeichnis	102
9. Danksagung	119

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
α ₂ AP	α ₂ -Antiplasmin
γGT	γ-Glutamyltransferase
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMC	7-amino-4-methylcoumarin
APC	Aktiviertes Protein C
aPTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AST	Aspartat-Aminotransferase
AUC	<i>Area under the curve</i>
AUMC	<i>Area under the first moment curve</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
AT	Antithrombin
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
CL	Clearance
DIC	Disseminierte intravasale Koagulopathie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOAK	direkte orale Antikoagulanzen
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EPCR	Endothelialer Protein C-Rezeptor
F1+2	Prothrombinfragment 1+ 2
FII	Prothrombin
FVL	Faktor-V-Leiden-Mutation
FV	Gerinnungsfaktor V
FVII	Gerinnungsfaktor VII
FVIII	Gerinnungsfaktor VIII

FIX	Gerinnungsfaktor IX
FX	Gerinnungsfaktor X
FXIII	Gerinnungsfaktor XIII
FG	Fibrinogen
g	Gramm
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
KUS	Kompressionsultraschall
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HbsAG	Hepatitis B Virus surface-Antigen
HBV	Humanes Hepatitis-B-Virus
HCV	Humanes Hepatitis-C-Virus
HWZ	Halbwertszeit
L	Liter
log	Logarithmus
M	Molar
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	<i>Mean resident time</i>
NaCl	Natriumchlorid
nM	Nanomolar
NMH	Niedermolekulares Heparin
nmol	Nanomol
OECA	<i>Oligonucleotide-based Enzyme Capture Assay</i>
PA	Plasminogenaktivator
PAP	Plasmin- α_2 -Antiplasmin Komplex
PAI	Plasminogenaktivator-Inhibitor
PC	Protein C
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

PLG	Plasminogen
PS	Protein S
rsTF	rekombinanter löslicher Tissue Factor
sec	Sekunde
ssDNA	Single-stranded Desoxyribonukleinsäure
TAT	Thrombin-Antithrombin Komplex
TF	Tissue Factor
TM	Thrombomodulin
tPA	Tissue-type Plasminogenaktivator
TVT	Tiefe Venenthrombose
UFH	Unfraktioniertes Heparin
VTE	Venöse Thromboembolie

1. Einleitung

Als Hintergrund der vorliegenden Arbeit soll in der Einleitung zunächst das Krankheitsbild der venösen Thromboembolie vorgestellt und seine pathophysiologischen Grundlagen in den Prozessen von Hämostase und Fibrinolyse erläutert werden. Im Laufe dieser Prozesse entstehen sogenannte Aktivierungsmarker, die Gegenstand der durchgeführten experimentellen Untersuchungen waren. Des Weiteren soll der Stellenwert der Bestimmung von Aktivierungsmarkern in Diagnostik und Therapie der venösen Thromboembolie verdeutlicht werden.

1.1 Venöse Thromboembolie

Eine Störung der Gerinnung mit erhöhter Gerinnbarkeit des Blutes kann zu einer Venösen Thromboembolie (VTE) führen. Unter diesem Begriff werden die Krankheitsbilder der tiefen Venenthrombose (TVT), die Lungenembolie oder deren gemeinsames Auftreten zusammengefasst. Thrombosen des tiefen Venensystems entwickeln sich in über 80 % der Fälle im Bereich der unteren Extremitäten als sogenannte tiefe Bein- oder Beckenvenenthrombose (zu 50 % in der V. femoralis, zu 20 % in der V. poplitea, zu 10 % in der V. iliaca) (Herold, 2017). Zugrunde liegt ihnen eine intravasale Blutgerinnselbildung, die zu einem partiellen oder einem kompletten Verschluss des Venenlumens führt. Die wichtigste und gefährlichste Komplikation der TVT ist die Lungenembolie, die durch Verschleppung eines Thrombus in das pulmonalarterielle Gefäßsystem entsteht und zu einer lebensbedrohlichen Verlegung der Lungenarterien führen kann (Douketis et al., 1998).

1.1.1 Epidemiologie

Die Inzidenz der VTE ist in den letzten Jahren deutlich angestiegen (Heit, 2006). Maßgeblich daran beteiligt sind die Zunahme von Risikofaktoren aufgrund eines veränderten Lebensstils, sowie die Verbesserung diagnostischer Techniken zur Erkennung der VTE. Mit einer Inzidenz von 2 -3/1.000 ist die VTE die dritthäufigste Gefäßerkrankung nach Myokardinfarkt und Schlaganfall und nimmt mit steigendem Lebensalter zu (Naess et al., 2007). Dies ist in dem Umstand begründet, dass die Gerinnung des Blutes, auch als Hämostase bezeichnet, altersabhängigen Veränderungen unterliegt. Die Inzidenz einer Thrombose in jungem Alter liegt bei 1:10.000, während sie

bei > 85-jährigen in 8:1.000 Fällen auftritt (Silverstein et al., 1998). Bis zu 20 % der betroffenen Patienten erleiden innerhalb von fünf Jahren ein Rezidiv (Baglin, 2005; Hansson et al., 2000).

1.1.2 Pathomechanismus und Risikofaktoren

Der Entstehung einer VTE liegt ein multifaktorielles Geschehen zugrunde, welches sowohl dispositionelle Risiken, wie beispielsweise genetisch bedingte Erkrankungen, als auch expositionelle Risiken, wie die Einnahme von östrogen-haltigen Kontrazeptiva oder Nikotinabusus umfasst (Gomes und Deitcher, 2004; Pomp et al., 2008). Die Grundlagen der pathologischen Vorgänge bei der Entstehung von Thrombosen wurden bereits 1856 in der Trias von Rudolf Virchow beschrieben, deren Gültigkeit bis heute in abgewandelter Form Bestand hat (Virchow, 1856). Die Virchow'sche Trias beschreibt ein Zusammenspiel verschiedener Bedingungen im venösen Gefäßsystem, die das Risiko für die Entstehung einer Thrombose erhöhen. Ihre Grundlagen sollen nachfolgend genauer erläutert werden. Diese Trias besteht aus:

- I. Veränderungen der Viskosität bzw. Zusammensetzung des Blutes („dickes Blut“, entspricht dem heutigen Verständnis nach der Hyperkoagulabilität)
- II. Veränderungen des Blutflusses (venöse Stase)
- III. Veränderungen der Gefäßwand (endotheliale Dysfunktion)

1.1.2.1 Hyperkoagulabilität

Die im ursprünglichen Sinne als Viskositätsveränderung verstandene Veränderung der Blutzusammensetzung kann auf den heutigen Begriff der Hyperkoagulabilität übertragen werden. Der Begriff beschreibt eine erhöhte Gerinnbarkeit des Blutes und basiert auf einer veränderten Zusammensetzung der im Blut vorhandenen pro- und antikoagulatorischen Gerinnungsfaktoren. Jedoch stellen nach heutigem Verständnis unter anderem auch Veränderungen des Flüssigkeitsanteils des Blutes, etwa bei zu geringer Flüssigkeitszufuhr oder entwässernder Therapie, einen Risikofaktor für Thrombosen dar. Außerdem können Veränderungen des Gleichgewichts zwischen Gerinnungsfaktoren und -inhibitoren zugunsten einer erhöhten Gerinnbarkeit des Blutes, wie beispielsweise im Rahmen hormoneller Veränderungen während der Schwangerschaft oder durch

Adipositas, zu einem erhöhten Thromboserisiko führen (Pötzsch und Madlener, 2010). Ein BMI > 30 kg/m² geht mit einer Erhöhung des Thromboserisikos um das Zweifache einher (Ageno et al., 2008). Ein Ungleichgewicht zwischen Gerinnungsfaktoren oder -inhibitoren kann jedoch hereditärer Genese sein, etwa bei Mutationen von Gerinnungsinhibitoren oder einem erhöhten Plasmaspiegel eines Gerinnungsfaktors, zum Beispiel im Rahmen der Prothrombin-G20210A-Mutation. Sind solche Mutationen mit einem erhöhten Auftreten von Thrombosen vergesellschaftet, spricht man von einer angeborenen Thrombophilie (Reitsma et al., 2012). Schließlich kann eine Hyperkoagulabilität auch im Rahmen maligner Erkrankungen entstehen, bei denen sich die Zusammensetzung des Blutes ändert, wie etwa bei der Polyzythämia vera oder der Essentiellen Thrombozythämie (Stricker, 2014). Patienten mit einer malignen Erkrankung haben ein um den Faktor 4 – 7 erhöhtes Risiko, eine VTE zu erleiden, wobei das Auftreten erheblich mit der Tumorhistologie und der Tumorentität variiert (Heit et al., 2000; Blom et al., 2005).

1.1.2.2 Venöse Stase

Veränderungen des Blutflusses resultieren oftmals aus einem gestörten Rücktransport des venösen Blutes zum Herzen. Dies wird auch als Strömungsinsuffizienz bezeichnet und kann durch funktionelle oder strukturelle Veränderungen im Gefäßsystem bedingt sein. Solche Veränderungen beruhen unter anderem auf pathologischen Dysfunktionen von Venenklappen, die im physiologischen Zustand sicherstellen, dass der Blutfluss unterstützt durch die Muskelpumpen der Waden ausschließlich zum Herzen hin erfolgt. Ist die Funktion dieser Venenklappen gestört, kommt es zu einer Strömungsumkehr und zum sogenannten „venösen Pooling“ mit eingeschränkter Geschwindigkeit des Blutflusses in den Gefäßen der unteren Extremitäten (Pötzsch und Madlener, 2010). Hieraus können neben der Gefahr der Thrombose auch weitere Komplikationen, wie beispielsweise ein post-thrombotisches Syndrom entstehen (Kahn, 2009).

Eine eingeschränkte Flussgeschwindigkeit oder gar eine vollständige Behinderung des Abflusses bezeichnet man auch als venöse Stase. In diesem unphysiologischen Zustand kommt es aufgrund des Blutstaus in dem betroffenen Gefäß nach einiger Zeit durch einen Mangel an Sauerstoff zur Hypoxämie und im weiteren Verlauf zur lokalen Azidose. Der Organismus reagiert auf diesen Prozess mit einer Hochregulation von

Adhäsionsrezeptoren und einer Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren (López et al., 2004). Das Zusammenspiel dieser Prozesse bewirkt eine erhöhte Durchlässigkeit des Endothels und eine lokale Einwanderung von Blutzellen wie Thrombozyten, Monozyten und Leukozyten. Es kommt zur lokalen Freilegung des Gewebefaktors (engl. *Tissue factor*, TF), der durch Komplexbildung mit weiteren Gerinnungsfaktoren die Aktivierung des extrinsischen Wegs der Gerinnungskaskade induziert, die schließlich zur Gerinnelbildung führt (Manly et al., 2011). Darüber hinaus wird durch venöse Stase die natürliche Transportfunktion des Gefäßsystems unterbunden. Prothrombogene Substanzen können durch die Behinderung des Abflusses nicht abtransportiert werden und antikoagulatorische Proteine können nicht mehr in ausreichender Menge zugeführt werden (Yan et al., 1999).

Der Zusammenhang zwischen venöser Stase und Thromboseentstehung nach chirurgisch-orthopädischen Operationen ist lange bekannt (Kakkar et al., 1969). Postoperative längere Immobilisierung, u. a. durch Ruhigstellung der Extremitäten mittels Gipsverband geht mit einem Ausfall der Muskelpumpe einher und hat eine zeitweilige Unterbrechung des Blutflusses zur Folge, sodass eine venöse Stase im Gefäßsystem entsteht (Bergqvist und Lowe, 2002). Auch eine längere Verweildauer in sitzender Position, wie etwa bei einem Langstreckenflug, führt zur Kompression der venösen Gefäße mit anschließender Stauung des Blutes und damit zum vermehrten Auftreten von Thrombosen (Schreijer et al., 2006).

1.1.2.3 Endotheliale Dysfunktion

Als dritter Faktor der Virchow'schen Trias tragen Veränderungen des Venenendothels, ausgelöst durch metabolische und exogene Einflüsse zur Entstehung von Thrombosen bei. Traumata, Nikotinabusus oder Erkrankungen wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus oder Hyperlipidämie verursachen Mikroläsionen im Endothel, sodass das Gleichgewicht zwischen pro- und antikoagulatorischen (Pro-)Enzymen gestört ist (Pomp et al., 2008, Allman-Farinelli, 2011). Ein Defekt der Gefäßwand führt zum Überwiegen der prothrombogen wirkenden Faktoren, die eine Gerinnungsaktivierung auslösen und die Manifestation einer Thrombose bewirken können. Systemische Entzündungsreaktionen wie chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, rheumatoide Arthritis und Psoriasisarthritis können ebenfalls eine Veränderung des Gefäßendothels verursachen

und eine lokale Aktivierung des Gerinnungssystems mit Gerinnselbildung initiieren (Reitsma et al., 2012).

1.1.3 Physiologie der Hämostase und Fibrinolyse

1.1.3.1 Übersicht über die primäre und sekundäre Hämostase

Der zentrale Aspekt der Entstehung einer VTE ist die Ausbildung eines Gerinnsels, wie sie auch im Rahmen der physiologischen Hämostase stattfindet. Die Hämostase besitzt zwei Aufgaben: einerseits die Blutstillung durch Koagulation des Blutes, andererseits die Hemmung der Blutstillung, auch als Antikoagulation bezeichnet. Gewährleistet werden diese Aufgaben durch ein enges Zusammenspiel aus Endothel, Thrombozyten und plasmatischer Gerinnung mit Regulations- und Rückkopplungsmechanismen, die das System der Gerinnselbildung dynamisch beeinflussen (Pötzsch und Madlener, 2010). Die primäre Hämostase ist durch Thrombozytenadhäsion und -aktivierung gekennzeichnet, während die gleichzeitig ablaufende sekundäre Hämostase die plasmatischen Vorgänge des Gerinnungsprozesses darstellt. Die sekundäre Hämostase führt zur Stabilisierung des im Rahmen der primären Hämostase entstandenen sogenannten weißen Thrombus und kann in einen extrinsischen und einen intrinsischen Weg unterteilt werden. Diese beiden Wege sind im Modell der Gerinnungskaskade repräsentiert (s. Abb. 1), das die gegenseitige Aktivierung von proteolytischen Enzymen unter Beteiligung von Kofaktoren und Gerinnungsfaktoren beschreibt und die Grundlage der Gerinnselbildung darstellt (Macfarlane, 1964). Physiologisch laufen beide Prozesse aber nicht nacheinander, sondern zeitgleich ab.

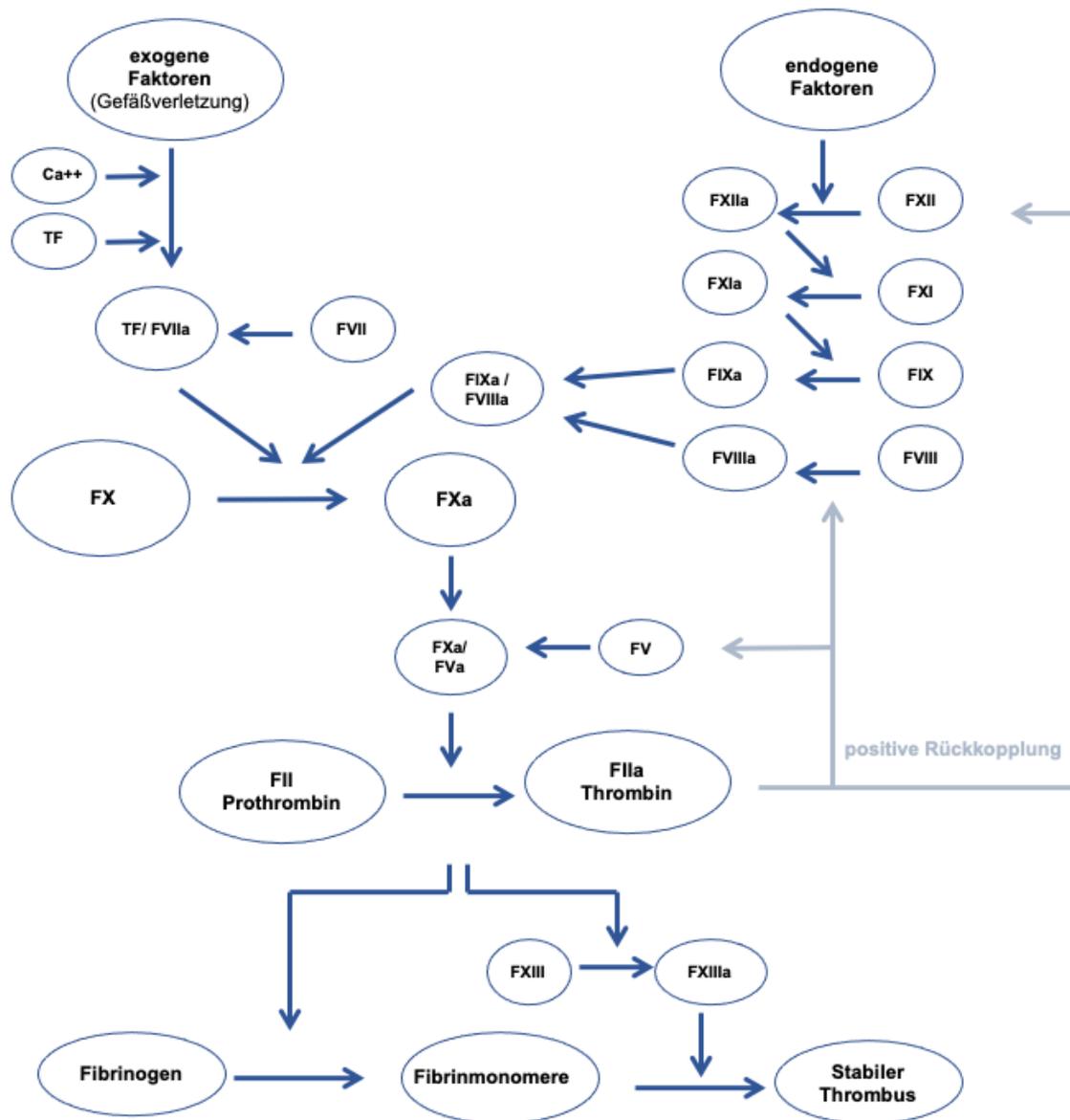


Abb. 1: Übersicht über den extrinsischen und intrinsischen Weg der plasmatischen Gerinnung

In der schematischen Darstellung sind die Gerinnungsfaktoren mit einem F und einer römischen Ziffer bezeichnet, die aktiven Formen der Gerinnungsfaktoren jeweils mit einem nachgestellten a. Modifiziert übernommen aus Pötzsch und Madlener, 2010.

Eine Gefäßverletzung führt zur Freilegung des von subendothelialen Fibroblasten gebildeten TF und initiiert den extrinsischen Weg der sekundären Hämostase (Engelmann et al, 2003; Colman, 2006). Nach Kontakt mit dem Blut verbindet sich der selbst nicht-enzymatisch aktive TF mit dem bereits in aktivierter Form im Blut zirkulierenden

Gerinnungsfaktor VII (FVIIa). Zusammen mit Phospholipiden und Calcium als weiteren Kofaktoren entsteht anschließend ein Multienzym-Komplex, der auch als extrinsische Tenase bezeichnet wird. Der intrinsische Weg der Gerinnungskaskade wird durch Kontaktaktivierung an Oberflächen der Gefäßwand initiiert und mündet ebenfalls in der Formation eines Multienzym-Komplexes unter Beteiligung der aktivierten Gerinnungsfaktoren IX (FIXa) und VIII (FVIIIa), sowie Phospholipiden und Calcium. Er wird als intrinsische Tenase bezeichnet (Lawson et al., 1994). Beide Wege münden in eine gemeinsame Endstrecke, die als Schlüsselreaktion der Hämostase die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin beinhaltet. Dabei wird zunächst unter Beteiligung der intrinsischen und extrinsischen Tenase der Gerinnungsfaktor X (FX) zu FXa aktiviert. FXa ist an Phospholipide gebunden und bildet zusammen mit dem aktivierten Kofaktor V (FVa), Phospholipiden und Calcium den Prothrombinase-Komplex. Dieser Komplex besitzt die Fähigkeit, Thrombin, das Schlüsselenzym der Hämostase zu aktivieren. Sein Vorläufer Prothrombin zirkuliert als inaktive Form in der Blutbahn. Durch Bindung an den Prothrombinase-Komplex, bestehend aus FXa, FVa, Calciumionen und Phospholipiden wird Prothrombin in die aktive Form umgewandelt (Preissner, 2008; Rosing et al., 1980). Bei der Aktivierung des Thrombins entsteht das Prothrombinfragment F1+2 (s. Abb. 2), indem das N-terminale Ende des Prothrombinmoleküls abgespalten und in die Blutzirkulation freigesetzt wird (Esmon und Jackson, 1974).

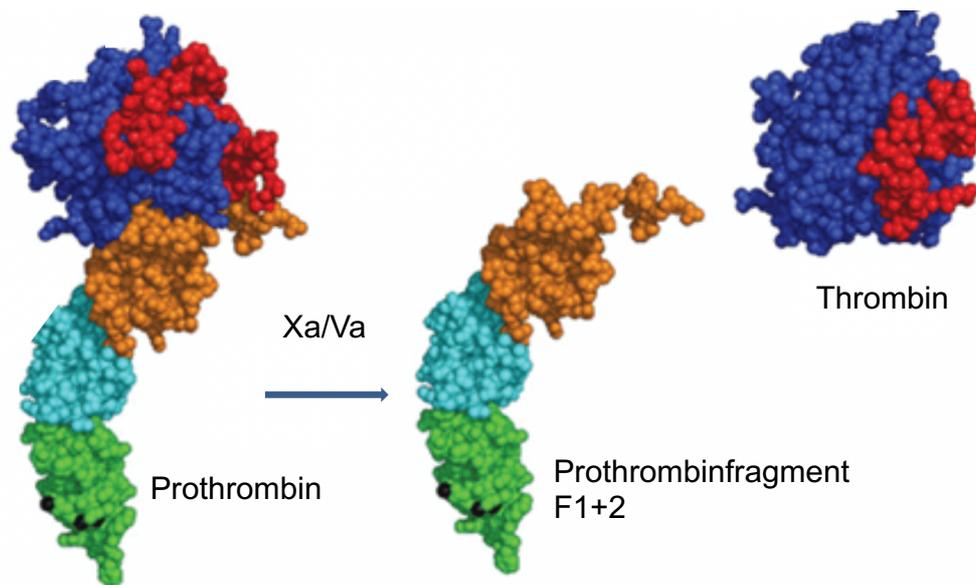


Abb. 2: Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin unter Bildung des Prothrombinfragments F1+2
 Im Rahmen der Spaltung von Prothrombin zu Thrombin durch FXa/FVa entsteht das Prothrombinfragment F1+2. Modifiziert übernommen aus Kaushansky und Levi, 2018.

Über den positiven Verstärkungsmechanismus des Thrombins werden unter Aktivierung von Thrombozyten und einer Vielzahl anderer Gerinnungsfaktoren große Mengen an Thrombin gebildet (Pötzsch und Madlener, 2010). Thrombin spaltet anschließend proteolytisch das im Blut in löslicher Form zirkulierende Fibrinogen in Fibrinmonomere. Diese Fibrinmonomere werden durch den aktivierten Gerinnungsfaktor XIII (FXIIIa) vernetzt, wodurch ein Fibrinthrombus entsteht, der sogenannte weiße Thrombus. Nach Anheftung von Erythrozyten wird er auch als roter Thrombus bezeichnet. Intravasal gebildetes Thrombin kommt im Gefäßsystem im freien Zustand praktisch nicht vor, da es entweder an seinen Inhibitor Antithrombin (AT) oder an Fibrin gebunden ist. Unmittelbar nach Aktivierung des Thrombins erfolgt die Bildung des Thrombin-Antithrombin-Komplexes (TAT), hierbei wird freies Thrombin inaktiviert. TAT und F1+2 können laborchemisch gemessen werden und sind Marker einer basalen Thrombinbildung, die im gesunden Körper auch außerhalb einer Gefäßverletzung stattfindet (Mari et al., 1995).

1.3.1.2 Fibrinolyse

Die körpereigene Auflösung des Blutgerinnsels wird als Fibrinolyse bezeichnet. Dieser Mechanismus begrenzt die intravasale Gerinnselbildung und führt nach abgeschlossener

Wundheilung zur Rekanalisierung des betroffenen Gefäßes. Eingeleitet wird die Fibrinolyse durch den gewebspezifischen Tissue-Plasminogenaktivator tPA, der vom Endothel nach Stimuli wie beispielweise venöse Stase oder Stress als aktives Enzym in die Blutbahn abgegeben wird (Geiger, 2010). tPA besitzt zwei Bindungsstellen, eine für das Proenzym der Fibrinolyse, das Plasminogen (PLG) und eine weitere für Fibrin (Cesarman-Maus und Hajjar, 2005). Die Aktivität des tPAs wird in Gegenwart von Fibrin erheblich beschleunigt, mit der Folge, dass insbesondere fibrin gebundenes PLG aktiviert wird und die Fibrinolyse lokal auf die Oberfläche des Gerinnsels begrenzt bleibt. Nach Bildung eines hochaktiven Plasminogen-Fibrin-Komplexes erfolgt die Umwandlung des PLG zu Plasmin. Das Gerinnsel zerfällt anschließend, indem Plasmin die durch FXIIIa vernetzten Fibrinmonomere aus dem Polymerkomplex enzymatisch in kleine Einheiten spaltet, wodurch das Gefäß wieder rekanalisiert wird (Rijken und Lijnen, 2009). Diese Fibrinfragmente werden als D-Dimere bezeichnet (Gaffney, 1975).

Die engmaschige Regulation der Fibrinolyse wird durch eine Reihe von Kofaktoren gesteuert. Die Konzentration an freiem tPA im Blutplasma ist sehr gering, da es zur Vermeidung einer übermäßigen Fibrinolyse von dem Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI) gebunden wird. (Sprengers und Kluft, 1987). Auch Plasmin wird im Blutplasma streng reguliert, indem es in freier Form innerhalb von Sekunden durch α_2 -Antiplasmin gebunden und inaktiviert wird. Dieser Komplex wird als Plasmin- α_2 -Antiplasmin-Komplex (PAP) bezeichnet und kann als sensibler Indikator für eine kurz zuvor stattgefundenene *in vivo* Fibrinolyse charakterisiert werden (Holvoet et al., 1986).

1.3.1.3 Regulationsmechanismen der Hämostase

Eine entscheidende Rolle in der Hämostase spielen nicht nur die prokoagulatorischen, sondern auch die antikoagulatorischen Mechanismen, die eine überschießende Thrombinbildung verhindern. Der wichtigste Gerinnungsinhibitor ist AT, der die aktivierten Gerinnungsfaktoren Thrombin und den FXa durch Komplexbildung in Anwesenheit von Heparin inaktiviert (Jackson et al, 2010). Die antikoagulatorische Wirkung von Heparin basiert darauf, dass es durch seine Bindung an AT dessen Affinität für Thrombin und FXa um ein Vielfaches steigert und so dessen Wirkung verstärkt wird (s. Abb. 3; Petitou, 2003).

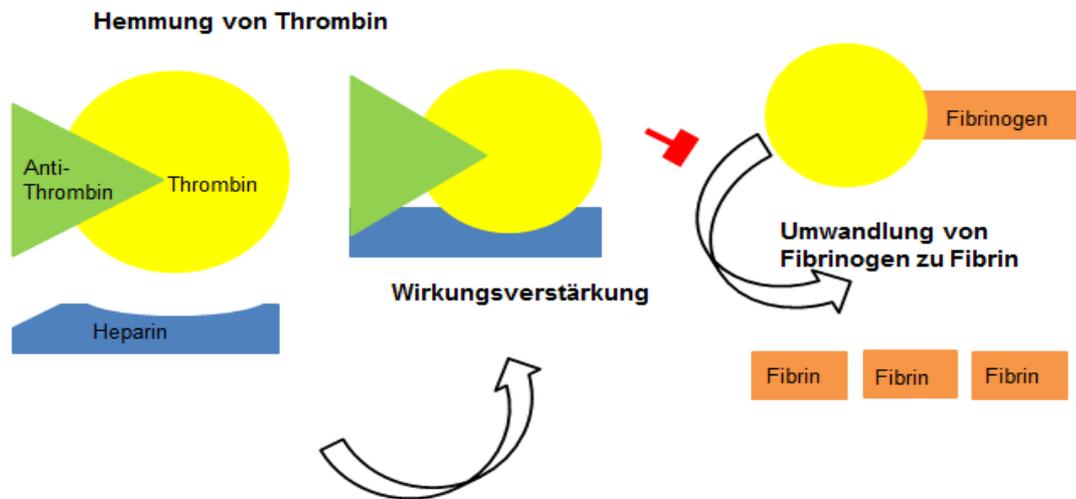


Abb. 3: Antithrombin-Heparin-Mechanismus

Antithrombin AT ist der wichtigste Inhibitor von Thrombin und aktiviertem Gerinnungsfaktor X (FXa). Der antikoagulatorische Effekt von Heparin beruht auf der Verstärkung der Komplexbildung von AT mit Thrombin. Die Bindung führt zur Konformationsänderung des AT, die eine Steigerung der Affinität gegenüber Thrombin und FXa bewirkt. Nach der Komplexbildung kann Thrombin nicht mehr in Fibrinmonomere umwandeln. Modifiziert übernommen aus Weitz, 1997.

Ein weiterer wichtiger Mechanismus bei der Hemmung der Gerinnungsaktivierung ist der Protein-C (PC)-Mechanismus (s. Abb. 4; Jackson, 2010). An diesem Mechanismus sind die membranständigen Proteine Thrombomodulin und Endothelialer Protein-C-Rezeptor (EPCR) beteiligt, die sich auf der Oberfläche von Endothelzellen befinden. Thrombomodulin bindet Thrombin und induziert eine Konformationsänderung des Thrombins, sodass dessen Substratspezifität modifiziert wird. Die Funktion des Thrombins, Fibrinogen in Fibrin zu überführen, wird dadurch deutlich herabgesetzt (Witt, 1994). Stattdessen aktiviert Thrombin durch enzymatische Spaltung den an EPCR gebundenen Gerinnungsinhibitor PC. Es entsteht aktiviertes Protein C (APC), welches durch Spaltung von FVa und FVIIIa die Thrombingenerierung verlangsamt und damit zu einer effektiven Hemmung der Gerinnungsaktivierung beiträgt (Esmon et al., 1982).

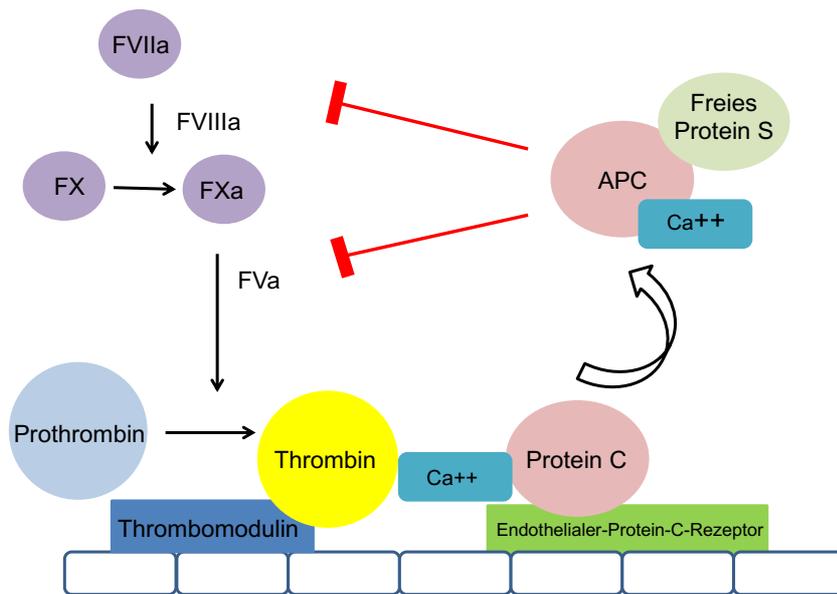


Abb. 4: Protein C-Mechanismus

Protein C (PC) wird durch Thrombin-vermittelte Spaltung in seine aktive Form APC überführt. Thrombomodulin ist ein an der Oberfläche der Endothelzelle exprimiertes Glykoprotein, das als Kofaktor an Thrombin bindet und damit die Substratspezifität des Thrombins verändert. Eine weitere Effektivitätssteigerung der Aktivierung von PC wird durch dessen Bindung an den Endothelialen Protein-C-Rezeptor (EPCR) bewirkt. Freies Protein S wirkt als Kofaktor bei der Aktivierung von PC. Gerinnungsfaktoren sind mit einem F und einer römischen Ziffer bezeichnet, die aktiven Formen jeweils mit einem nachgestellten a. Modifiziert übernommen aus Martinelli et al., 2014.

Jegliche Störungen des Gleichgewichts zwischen pro- und antikoagulatorisch wirkenden Prozessen stellen Risikofaktoren entweder für eine Blutungsneigung oder eine erhöhte Blutgerinnung dar.

1.1.4 Klinik

Die TVT tritt klinisch in vielen Variationen in Erscheinung. Venöse Thromben können grundsätzlich in allen Gefäßen entstehen, allerdings nimmt die Häufigkeit der Thrombosen von proximal nach distal erheblich zu, sodass 50 – 80 % aller TVT in den Unterschenkelvenen entstehen (Nicolaidis et al., 1970). Die Klinik der TVT verläuft in einigen Fällen asymptomatisch, kann aber auch durch das Auftreten einer Lungenembolie als Erstmanifestation bemerkt werden. In selteneren Fällen kommt es bei einer TVT zu den klassischen Symptomen wie Schwellung, Überwärmung, Wadenschmerz oder

zyanotischer Verfärbung der betroffenen Hautareale (Bauersachs, 2012). Die Lungenembolie stellt die gefährlichste Komplikation einer TVT dar und kann tödlich verlaufen. Bei symptomatischer Verlaufsform der Lungenembolie kann der pulmonale Druck durch komplette Verlegung eines Lungengefäßes so stark ansteigen, dass es zu einer pulmonal-arteriellen Hypertonie mit akuter Rechtsherzbelastung kommen kann (Lualdi und Goldhaber, 1995). Zu den häufigsten Symptomen der Lungenembolie zählen akut einsetzende Dyspnoe, Thoraxschmerz, Tachykardie und Husten. Des Weiteren kann es zu Schweißausbrüchen, Synkopen und Blutdruckentgleisung kommen (Herold, 2013). Durch die unspezifischen Symptome oder asymptomatische Verlaufsformen wird eine Lungenembolie häufig nicht erkannt und zählt zu den wichtigsten kardiovaskulären Notfällen mit hoher Mortalität (Carson et al., 1992; Cassidy et al., 2014).

1.1.5 Diagnostik

Zentrales Element der Laboranalytik im Rahmen der Akutdiagnostik der VTE ist die D-Dimer-Bestimmung (Dempfle, 2005). Wie bereits beschrieben, entstehen sie im Rahmen des Abbaus eines intravasalen Fibringerinnsel durch Plasmin und sind damit Indikatoren für eine gesteigerte Gerinnungs- und Fibrinolyseaktivität (vgl. Abschnitt 1.3.3). Durch deren laboranalytische Bestimmung kann auf das Ausmaß der Gerinnungsaktivierung rückgeschlossen werden.

Trotz der zusätzlich zu den laboranalytischen Messmethoden etablierten diagnostischen Verfahren, vor allem im Bereich der bildgebenden Verfahren, bleibt die Diagnose der TVT und insbesondere die der Lungenembolie im klinischen Alltag eine große Herausforderung. Liegen situative Risikofaktoren und ein klassisches klinisches Bild vor, ermöglicht bereits die klinische Untersuchung mit ausreichender Sensitivität eine Verdachtsdiagnose, die eine weiterführende laboranalytische und bildgebende Diagnostik rechtfertigt. Da die VTE aber in vielen Fällen klinisch weitgehend asymptomatisch bleibt oder eine eher unspezifische Präsentation bietet, hat sich die Verwendung diagnostischer Scores und Algorithmen etabliert (Wells et al., 1998; Wells et al., 2003; Kline und Wells, 2003). Der derzeit gebräuchlichste diagnostische Score ist der Score nach Wells (Wells et al., 2003). Dieser Score wird anhand klinischer Parameter und anamnestischer Daten errechnet und ermittelt eine hohe oder niedrige Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer VTE (s. Tab. 1). Die Kalkulation des Wells-Scores umfasst sowohl das anamnestische

Erfragen von u. a. einer aktiven Krebserkrankung oder länger andauernder Immobilisation als auch klinische Zeichen einer TVT wie eine Schwellung des Beins oder das Vorhandensein eines wegdrückbaren Ödems.

Tab. 1: Vortestwahrscheinlichkeit nach Wells für das Vorhandensein einer TVT
 Anhand der Parameter ergibt sich eine hohe oder niedrige Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein einer TVT. Ein Score ≥ 2 bedeutet eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer TVT, < 2 eine geringe Wahrscheinlichkeit. Modifiziert übernommen aus Wells et al., 2003.

Parameter	Punkte
aktive Krebserkrankung	1
Lähmung oder Immobilisation des Beines	1
Bettruhe (> 3 Tage), größere Operation (< 12 Wochen)	1
Schmerzen und/oder Verhärtungen entlang tiefer Beinvenen	1
Schwellung des ganzen Beins	1
Unterschenkelschwellung > 3 cm im Vergleich zur Gegenseite	1
eindrückbares Ödem am symptomatischen Bein	1
Kollateralvenen	1
Frühere, dokumentierte TVT	1
Existenz einer alternativen Diagnose, die mindestens ebenso wahrscheinlich ist, wie eine TVT	-2

Basierend auf dem errechneten Score wird ein standardisierter diagnostischer Algorithmus empfohlen, der schließlich zum Ausschluss oder zur Bestätigung einer TVT führen soll (s. Abb. 5).

Verdacht auf Venenthrombose (TVT)

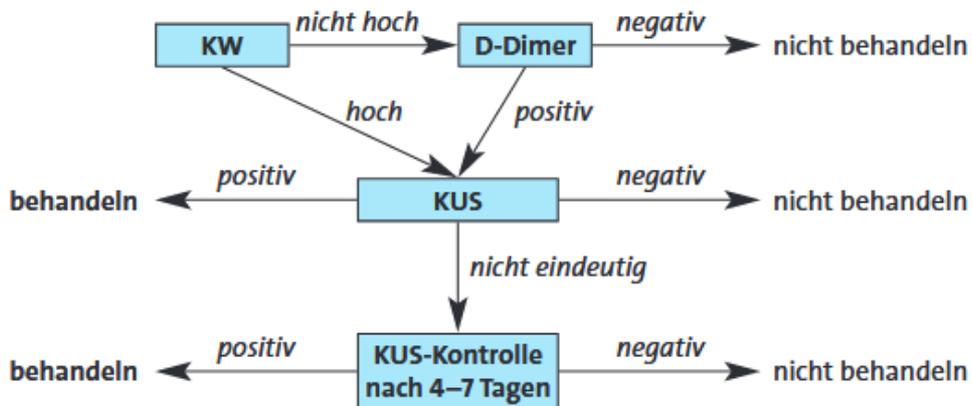


Abb. 5: Diagnostischer Algorithmus bei Verdacht auf TVT

Bei einer niedrigen klinischen Wahrscheinlichkeit (KW) für das Vorliegen einer TVT wird zum Ausschluss einer TVT die Bestimmung der D-Dimer-Konzentration im Plasma bestimmt. Ist diese erhöht, wird ein Kompressionsultraschall (KUS) durchgeführt. Liegt klinisch eine hohe Wahrscheinlichkeit vor, erfolgt direkt ein KUS. Modifiziert übernommen aus Wells et al., 1995.

Ergibt sich anhand des Scores eine niedrige klinische Wahrscheinlichkeit, wird der D-Dimer-Spiegel bestimmt. Die heute verfügbaren Testverfahren können einen erhöhten D-Dimer-Spiegel mit hoher Sensitivität nachweisen. Die Spezifität der D-Dimere für die Diagnostik einer VTE liegt allerdings nur bei 30 – 50 %, da sie auch im Rahmen anderer Prozesse wie bei Entzündungen, nach Traumata, Sepsis oder in der Schwangerschaft erhöht sind (Adam et al., 2009). Aus diesem Grund findet die D-Dimer-Bestimmung am Häufigsten Anwendung in der Ausschlussdiagnostik der VTE. Unterhalb des Grenzwertes weisen die D-Dimere einen negativen prädiktiven Wert von > 90 % auf, sodass bei einer geringen klinischen Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer VTE auf eine weitere Diagnostik verzichtet werden kann (Di Nisio et al., 2007). Eine Möglichkeit, die Spezifität der D-Dimere im Rahmen der Diagnostik der VTE zu erhöhen, ist die Bestimmung weiterer Parameter der Hämostase wie F1+2 als Marker der Thrombinbildung oder TAT als Marker für thrombinspezifische Gerinnungsprozesse im Gefäßsystem (Božič et al., 2002).

Liegt nach dem diagnostischen Algorithmus eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer TVT vor, sollte direkt eine bildgebende Diagnostik durchgeführt werden (Righini et al., 2008). Hierbei handelt es sich primär um die farbkodierte

Kompressionssonographie, bei der Zeichen einer TVT eine fehlende oder eingeschränkte Komprimierbarkeit des Venenlumens sind. Mit Hilfe der Dopplersonographie lässt sich auch das Flussprofil einer Vene darstellen, die im Falle eines kompletten Venenverschlusses einen fehlenden Blutfluss nachweist. Bei unzureichender sonographischer Beurteilbarkeit kann in Ausnahmefällen eine computer- oder kernspintomographische Bildgebung durchgeführt werden, in der sich ein Thrombus als fehlende Kontrastmittelanreicherung im Gefäß darstellt (Cogo et al., 1998).

1.1.6 Therapie und Prophylaxe

Therapie und Prophylaxe der VTE gründen sich im Wesentlichen auf die medikamentöse Antikoagulation (Wells et al., 2014). Trotz unterschiedlicher Wirkmechanismen sind alle derzeit eingesetzten Antikoagulanzen mit einem erhöhten Blutungsrisiko verbunden. In der Langzeittherapie muss daher bei ihrem Einsatz der Nutzen als VTE-Rezidivprophylaxe gegenüber dem Risiko von Blutungskomplikationen abgewogen und patientenindividuell entschieden werden (Kearon et al., 2008). Die Bestimmung von Aktivierungsmarkern wie beispielsweise die D-Dimere oder F1+2 während einer Antikoagulation kann dabei helfen, ihre Effektivität zu beurteilen (Legnani et al., 2019). Eine Auswahl der derzeit eingesetzten Medikamente zur Antikoagulation ist in Tab. 2 dargestellt. Im Folgenden sollen die Wirkungsmechanismen näher erläutert werden.

Tab. 2: Antikoagulanzen zur Therapie und Prophylaxe einer Thrombose
 Erläutert ist der Wirkmechanismus der zur Verfügung stehenden Wirkstoffe und deren Applikationsform zur Hemmung der Blutgerinnung.

Wirkstoff / Arzneimittel	Wirkmechanismus	Applikationsform
Niedermolekulare Heparine		
Certoparin (Mono Embolex®) Enoxaparin (Clexane®)	Hemmung des FXa durch Komplexbildung mit AT	subcutan
Unfraktionierte Heparine		
Heparin	Hemmung des FXa durch Komplexbildung mit AT	intravenös oder subcutan
Heparinanaloga		
Fondaparinux	Hemmung des FXa durch Komplexbildung mit AT	subcutan
Vitamin-K-Antagonisten		
Phenprocoumon (Marcumar®)	Synthesehemmung von Gerinnungsfaktoren	oral
direkte orale Antikoagulanzen		
Dabigatran (Pradaxa®)	selektiver Thrombininhibitor	oral
Argatroban (Argatra®)	selektiver Thrombininhibitor	oral
Rivaroxaban (Xarelto®)	selektiver FXa-Inhibitor	oral

Wie bereits im Kapitel 1.3.1.3 erläutert und in Abb. 3 dargestellt, beruht der Wirkungsmechanismus der Heparine im Rahmen der Inaktivierung von Thrombin und FXa auf einer Wirkungsverstärkung des AT (Jackson et al., 2010). Der entscheidende Unterschied zwischen niedermolekularem (NMH) und unfraktioniertem Heparin (UFH) ist deren Größe bzw. deren Molekulargewicht, wodurch die gerinnungshemmende Wirkung stark beeinflusst wird. Durch die Bindung von AT und Thrombin verstärken UFH neben der Hemmung von FXa zusätzlich die Hemmung von Thrombin. NMH können hingegen aufgrund ihrer kleineren Molekülgröße nur AT binden und deshalb nur FXa hemmen (Alban, 2010). Ein Vorteil der NMH ist, dass eine kontinuierliche Laborkontrolle zur Therapiesteuerung nicht erforderlich ist, was ihren Einsatz auch in der ambulanten Therapie ermöglicht. Sollte eine Therapiekontrolle dennoch erforderlich sein, kann laborchemisch der Anti-FXa Spiegel bestimmt werden. Außerdem ist das Risiko einer Heparin-induzierten-Thrombozytopenie Typ II für NMH im Vergleich zu UFH reduziert (Mahlfeld et al., 2001). Hierbei kommt es ca. 5 Tage nach Therapiebeginn mit Heparinen

durch die Bildung von Autoantikörpern gegen einen Komplex aus Heparin und dem von Thrombozyten sezernierten Plättchenfaktor 4 zu einem massiven Abfall von Thrombozyten mit der gleichzeitigen Gefahr des Auftretens von thromboembolischen Ereignissen. UFH werden zur Therapie von Thrombosen daher heute nur noch in Ausnahmefällen, wie etwa im Rahmen intensivmedizinischer Behandlung, eingesetzt. Gesteuert wird eine Therapie mit UFH über die laborchemische Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) im Blutplasma (Chandler et al., 2009). Bei Unverträglichkeiten auf UFH oder NMH kann das synthetisch hergestellte Heparinanalogen Fondaparinux verwendet werden. Weitere zur Initialtherapie zugelassene Medikamente sind die direkten oralen Antikoagulantien (DOAK), die selektiv und direkt entweder Thrombin (Dabigatran®) oder FXa (z. B. Rivaroxaban®, Apixaban®) hemmen.

Als Initialtherapie dient die Antikoagulation der Vermeidung einer Ausbreitung des Thrombus, sowie der Rekanalisierung des betroffenen Gefäßes. Ferner sollen Komplikationen wie die Lungenembolie oder das Auftreten des Postthrombotischen Syndroms vermieden werden. Zur Sekundärprophylaxe von Rezidiven einer TVT oder einer Lungenembolie wird an die Initialtherapie häufig eine Erhaltungstherapie angeschlossen. Diese sollte je nach Risikoprofil des Patienten für mindestens 3 - 6 Monate durchgeführt werden (Schulman et al., 2008). Neben den bereits genannten DOAK werden hierfür auch Vitamin K-Antagonisten (Cumarine) wie Phenprocoumon eingesetzt. Deren Wirkung beruht auf einer Synthesehemmung Vitamin K-abhängiger Gerinnungsfaktoren. Nachteile von Cumarinen gegenüber DOAK sind ihre schlechte Steuerbarkeit, sowie die regelmäßig erforderlichen Laborkontrollen. In einigen Fällen kann eine Verlängerung der Erhaltungstherapie indiziert sein.

Zusätzlich zu den pharmakologischen Maßnahmen kommt zur Rekanalisierung des Gefäßes derzeit noch die operative Entfernung des thrombotischen Materials (Thrombektomie), ggf. verbunden mit einer Stenteinlage, in Frage (Mumme, 2013). Durch Kombination pharmakologischer lokaler und mechanischer Interventionen kann beispielsweise das Risiko der Entstehung eines Postthrombotischen Syndroms weitgehend vermindert werden (Sharifi et al., 2010).

1.2 Angeborene thrombophile Risikofaktoren

Aufgrund des erhöhten Blutungsrisikos beim Einsatz von Antikoagulanzen ist ein Prinzip ihres Einsatzes, diesen auf solche Patienten zu beschränken, deren Thrombosierisiko im Verhältnis zur Normalbevölkerung erhöht ist. Erbliche Störungen des Gerinnungssystems, die zu einer solchen Risikoerhöhung führen, bezeichnet man als angeborene thrombophile Risikofaktoren. In etwa 60 % aller Fälle einer VTE spielen hereditäre Risikofaktoren eine Rolle (Souto et al., 2000). Klinische Hinweise auf das Vorliegen genetischer Risikofaktoren sind das spontane oder rezidivierende Auftreten von Thrombosen, Thrombosen bei jüngeren Menschen oder Thrombosen an atypischen Lokalisationen, zum Beispiel an der oberen Extremität (Leebeek et al., 2001). Die häufigsten hereditären Risikofaktoren umfassen heterozygote Mutationen der Blutgerinnungsinhibitoren AT, PC und PS, sowie das homozygote Vorliegen der Faktor-V-Leiden-Mutation (FVL) oder der Prothrombin-G20210A-Mutation (Rosendaal und Reitsma, 2009). Die Prävalenz der genetisch bedingten Thrombophilien liegt in der Gesamtbevölkerung bei 0,2 - 0,4 % (Ali et al., 2014).

1.2.1 Mutationen von Gerinnungsinhibitoren

Ein quantitativer Mangel der Gerinnungsinhibitoren AT, PC und PS oder deren Dysfunktion können durch eine Vielzahl verschiedener Mutationen verursacht werden (Kyrle und Eichinger, 2010). Diese werden autosomal dominant vererbt und liegen in der Regel in heterozygoter Ausprägung vor, da ihr homozygotes Vorliegen letal ist (Merriman und Greaves, 2006). Ein Mangel hat eine verminderte Plasmakonzentration des jeweiligen Proteins zur Folge, wohingegen bei einer Dysfunktion das Protein zwar in physiologischen Konzentrationen vorliegt, seine Funktion jedoch eingeschränkt ist. In beiden Fällen kann der Phänotyp einer Aktivitätsverminderung des betroffenen Gerinnungsinhibitors laboranalytisch nachgewiesen werden. Eine Diagnosesicherung erfolgt im Anschluss durch den Nachweis einer Mutation mit Hilfe molekulargenetischer Methoden (Studdt, 2003).

Durch seine direkte Hemmung des prokoagulatorischen Schlüsselenzyms Thrombin ist AT einer der wichtigsten Gerinnungsinhibitoren. AT hemmt außerdem auch eine Reihe weiterer Gerinnungsfaktoren, wie etwa den FIXa und FXa. Ein AT-Mangel oder eine Dysfunktion ist mit einer Thromboseneigung assoziiert, da insbesondere Thrombin nur

noch unzureichend inaktiviert werden kann (Thaler und Lechner, 1981). Die Prävalenz des hereditären AT-Mangels in der Gesamtbevölkerung ist mit 0,07 - 0,16 % gering, während sie unter Patienten mit VTE zwischen 0,5 – 5 % liegt (Sanson et al., 1999; Mateo et al., 1997). Unter den genetisch bedingten Thrombophilien stellt der AT-Mangel das höchste Risiko für das Auftreten einer VTE dar (Vossen et al., 2005).

Der hereditäre PC-Mangel ist ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für ein thromboembolisches Ereignis assoziiert. Er tritt in der Regel in heterozygoter Form auf, da die sehr seltene homozygote Form bereits im Kindesalter zu folgenschweren thrombotischen Ereignissen führt. Die Prävalenz des hereditären PC-Mangels liegt in der Gesamtbevölkerung bei 0,2 - 0,5 % (Merriman und Greaves, 2006). Die heterozygote Form geht mit einem 3 - 7-fach erhöhten Risiko für das Auftreten einer VTE einher (Koster et al., 1995; Martinelli et al., 1998).

PS wirkt als Kofaktor von PC beschleunigend auf die PC-vermittelte Proteolyse von FVa und FVIIIa. Mutationen im PS-Gen, die eine verminderte Plasmakonzentration an PS oder eine Dysfunktion zur Folge haben, können ebenso wie Mutationen im PC-Gen zu einem erhöhten Risiko für VTE führen. Die Prävalenz des PS-Mangels in der Gesamtbevölkerung wird auf 0,003 - 0,13 % geschätzt (Dykes et al., 2001). Unter Patienten mit VTE lässt sich in etwa bei 4 % der Fälle ein Protein S-Mangel nachweisen (Koster et al., 1995; Mateo et al., 1997).

1.2.2 Faktor-V-Leiden-Mutation und APC-Resistenz

Die FVL ist die häufigste angeborene thrombophile Gerinnungsstörung. Hierbei handelt es sich um eine Punktmutation, die zum Austausch der Aminosäure Arginin durch Glutamin an Position 506 des Gens führt. Diese Punktmutation liegt im Bereich der Spaltstelle des FVa durch PC (Greengard et al., 1994). Die FVL-Mutation führt zu einer Beeinträchtigung des antikoagulatorisch wirkenden PC-Systems, da die Mutation zu einer Verlangsamung der proteolytischen Spaltung von FVa führt. In der Folge trägt dies zu einer gesteigerten Thrombingenerierung bei (Dahlbäck und Villoutreix, 2005). Der mit der FVL-Mutation assoziierte Phänotyp wird als APC-Resistenz bezeichnet. Diesem liegt das laborchemische Ereignis zugrunde, das die auch bei Gesunden zu beobachtende Verlängerung der Gerinnungszeit nach Zugabe von APC zu Plasma bei Mutationsträgern reduziert ist (Bertina, 1994). Die FVL-Mutation wird bei 20 – 25 % der Patienten mit einer

VTE und bis zu 50 % in Familien mit thrombophilen Ereignissen nachgewiesen (Ridker et al., 1995; Rosendaal et al., 1995). Die Prävalenz in der Gesamtbevölkerung variiert deutlich: in Europa und den USA liegt mit 3 – 8 % die höchste Prävalenz vor, während in Asien, Afrika und Australien nur sehr selten Fälle auftreten. Innerhalb Europas variiert die Prävalenz zwischen 10 – 15 % in Schweden und 2 - 3% in Spanien und Italien (Rees et al., 1995). Das Risiko für das Auftreten eines thromboembolischen Ereignisses unter Patienten mit der FVL- Mutation in heterozygoter Ausprägung ist im Vergleich zur Normalbevölkerung um das 5 - 7-fache erhöht (Koster et al., 1993).

1.2.3 Prothrombin-G20210A-Mutation

Nach der FVL-Mutation ist die Prothrombin-G20210A-Mutation der zweithäufigste thrombophile Risikofaktor. Die Mutation ist im nicht-kodierenden Anteil des Prothrombin-Gens lokalisiert und führt zur Bildung einer messenger Ribonukleinsäure (mRNA) mit einem Adenosinmolekül anstatt des nativen Guanins an Position 20210. Aufgrund einer Beeinträchtigung der Regulation der Proteinexpression resultiert diese Veränderung in einer Erhöhung des Prothrombin-Plasmaspiegels (Poort et al., 1996). Die Prävalenz der Prothrombin-G20210A-Mutation variiert innerhalb verschiedener Bevölkerungsgruppen und wird bei ca. 2 % der kaukasischen Normalbevölkerung, sowie in etwa 6 % bei Patienten mit einer VTE gefunden (Ridker et al., 1999). Die heterozygote Form führt im Vergleich zu Gesunden zu einem dreifach erhöhten Thromboserisiko, während die homozygote Form ein höheres Risiko birgt (Gohil et al., 2009, Segal et al., 2009).

1.3 Labordiagnostik der Thrombophilie (Thrombophilie-Screening)

Das labordiagnostische Thrombophilie-Screening, d. h. die Untersuchung auf die vorgenannten thrombophilen Risikofaktoren, dient als eine Entscheidungsgrundlage für eine Beendigung oder Fortsetzung einer Antikoagulation.

Der übliche Umfang des Thrombophilie-Screenings ist in Tab. 3 aufgelisteten. Indikationen für ein solches Screening sind die klinische Manifestation einer VTE insbesondere bei jungen Patienten (< 40 Jahren), sowie das Auftreten einer VTE in ungewöhnlichen Gefäßen, wie etwa den oberen Extremitäten. Ebenso sollten sich Personen, deren Familienmitglieder mit bekannten hereditären Risikofaktoren belastet sind einer solchen Diagnostik unterziehen. Da keine Evidenz vorliegt, dass die

grundsätzliche Suche nach einem genetisch bedingten thrombophilen Risikofaktor zu einem verminderten Auftreten von thrombophilen Ereignissen führt, wird ein generelles Screening nicht empfohlen (Coppens et al., 2008).

Tab. 3: Laboranalytische Untersuchungen im Rahmen eines Thrombophilie-Screenings
 Nach Manifestation einer VTE an ungewöhnlichen Gefäßen oder bei sehr jungen Patienten sollte nach spezifischen Risikofaktoren gesucht werden. Ein Screening beinhaltet die Suche nach plasmatischen Gerinnungsstörungen, sowie genetische Verfahren wie die Bestimmung der Faktor-V-Leiden Mutation. Modifiziert übernommen aus Favaloro et al., 2009.

Plasmatische Untersuchungsverfahren	Genetische Untersuchungsverfahren
AT PC PS Lupus-Antikoagulans Antiphospholipidantikörper APC-Resistenz FVIII (optional)	Faktor-V-Leiden-Mutation (alternativ: plasmatische Untersuchung auf APC-Resistenz) Prothrombin-G20210A-Mutation

In Genom-weiten Assoziationsstudien können bei nur etwa 50 % aller Patienten mit einer VTE zugrundeliegende genetische Ursachen festgestellt werden (Cunha et al., 2015). Umgekehrt erleidet die Mehrheit der Träger der klassischen hereditären Risikofaktoren nie eine Thrombose. Darüber hinaus kann ein angeborener genetischer Defekt innerhalb einer Familie in unterschiedlicher klinischer Penetranz auftreten. Daraus lässt sich schließen, dass die klinische Manifestation einer VTE in vielen Fällen durch das Vorhandensein weitere Risikofaktoren beeinflusst wird, was die Vorhersage eines erhöhten Risikos schwierig macht. Zwar kann mit Hilfe der verschiedenen Tests ein spezifischer Defekt identifiziert werden, ein unauffälliges Ergebnis schließt eine hereditäre Thrombophilie aber nicht aus. Eine zuverlässige Einschätzung des Aktivierungsniveaus der Hämostase und darüber hinaus die Vorhersage eines akut erhöhten Risikos für die Entstehung einer VTE kann mit der heute zur Verfügung stehenden Diagnostik nicht getroffen werden.

1.4 Aktivierungsmarker der Gerinnung und Fibrinolyse

Ein anderer labordiagnostischer Ansatz, ein erhöhtes Thromboserisiko festzustellen, ist die Bestimmung von Aktivierungsmarkern des Hämostasesystems. Sie werden auch als Biomarker bezeichnet. Hierunter versteht man spezifische Produkte wie Enzyme, Peptide oder Komplexe, die im Rahmen der Aktivierung des Gerinnungsprozesses entstehen und in die Blutbahn abgegeben werden. Im weiteren Sinne können auch Stoffwechselprodukte aus den regulatorischen Prozessen der Hämostase, wie der Fibrinolyse hinzugezählt werden (Bergmann und Czwalińska, 2003). Diese Produkte können mit Hilfe verschiedener labordiagnostischer Methoden im Plasma gemessen werden und erlauben eine Aussage über den Aktivierungszustand der Hämostase. Teilweise finden diese Produkte seit vielen Jahren Anwendung in der Routinediagnostik, sind aber bisher häufig nur eingeschränkt beurteilbar, da deren *in vivo* Verhalten in der Blutbahn unter anderem von gleichzeitig ablaufenden Prozessen beeinflusst wird.

Der Zusammenhang und die Einordnung solcher Parameter in den Gerinnungs- und Fibrinolyseprozess ist in Abb. 6 schematisch dargestellt. Deren Bildung und Funktion sind in vorherigen Abschnitten erläutert worden.

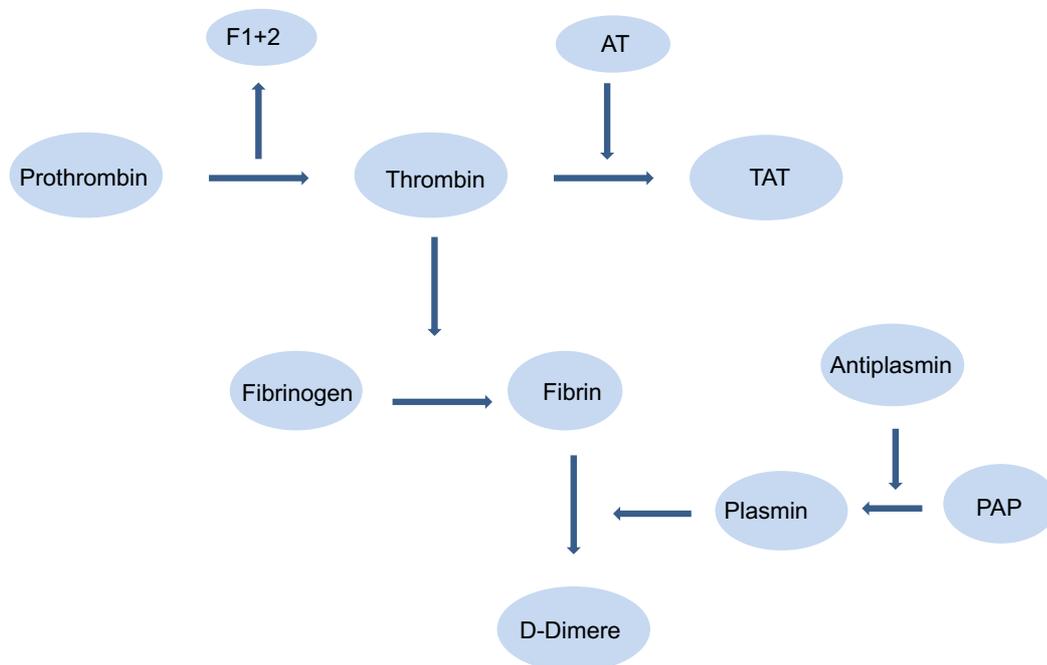


Abb. 6: Indirekte Biomarker der Gerinnungsaktivierung und Fibrinolyse

Die schematische Darstellung verdeutlicht den Zusammenhang zwischen verschiedenen Biomarkern, die am Prozess der Hämostase beteiligt sind. Prothrombinfragment 1+2 (F1+2), Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT), Plasmin- α 2-Antiplasmin-Komplex (PAP). Modifiziert übernommen aus Rühl et al., 2015.

Werden die Aktivierungsmarker der Hämostase in Zusammenschau betrachtet, können der Grad der Gerinnungsaktivierung und damit ein akut erhöhtes Thrombosorisiko zuverlässiger eingeschätzt werden. Ein erhöhtes Risiko für ein Thromboserezidiv wurde bereits 2003 in Zusammenhang mit einem erhöhten Konzentrationsspiegel der D-Dimere gebracht (Cushman et al., 2003). Ihre laboranalytische Bestimmung wird in den heutigen Leitlinien zur Risikoeinschätzung für das erneute Auftreten einer VTE empfohlen (Kearon et al., 2016). Zudem kann der Konzentrationsspiegel der D-Dimere als Entscheidungskriterium für die Dauer einer Antikoagulation herangezogen werden (Palareti et al., 2006). Insbesondere aufgrund ihres hohen negativen prädiktiven Werts und der laborchemisch schnell verfügbaren Bestimmung ist die Überwachung nach Absetzen einer Antikoagulation ein einfacher und geeigneter Parameter. Allerdings muss beachtet werden, dass der D-Dimer Spiegel abhängig von der Anwendung des

medikamentösen Präparats ist: bei Patienten, die nach Manifestation einer VTE mit DOAKs behandelt wurden, konnte ein höhere Konzentrationsspiegel nachgewiesen werden, als bei Patienten, die mit Vitamin-K-Antagonisten behandelt wurden (Legnani et al., 2019). Deshalb sollten zur Beurteilung über die Fortführung einer Antikoagulation weitere Aktivierungsmarker der Hämostase herangezogen werden.

1.4.1 Eliminationskinetik von Aktivierungsmarkern

Um Aktivierungsmarker zur Beurteilung des Zustandes der Hämostase heranzuziehen, ist zunächst die Charakterisierung einer Eliminationskinetik notwendig. Soll die Plasmakonzentration des jeweiligen Markers als Maß der Hämostaseaktivierung zum Zeitpunkt einer Blutentnahme bewertet werden, ist insbesondere das Verständnis ihrer jeweiligen Eliminationskinetik von besonderer Bedeutung. Die Eliminationskinetiken vieler Hämostaseparameter sind bis heute nicht vollends geklärt, da deren laboranalytisch gemessene Plasmakonzentration *in vitro* nicht das gesamte Ausmaß der Hämostaseaktivierung *in vivo* widerspiegelt. Grund dafür sind die bisher fehlenden laborchemisch-analytischen Methoden, die ermöglichen, das Verhalten mehrerer Biomarker zum gleichen Zeitpunkt zu evaluieren, da sich die Prozesse der Gerinnelbildung und -auflösung häufig überlagern. Vor dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ansatz wurden bereits radioaktiv markierte Moleküle eingesetzt, um die Elimination von F1+2, TAT, PAP und D-Dimer aus der Zirkulation zu untersuchen (Bauer et al., 1985; Reeve et al., 1981; Collen und D. Wiman, B., 1979; Catanzaro und Edgington, 1974). Das Fehlen einer großen Probandenanzahl, sowie die Durchführung der Versuche im Tiermodell erschweren die Übertragung dieser Ergebnisse auf den Menschen.

1.5 Ziel der Arbeit

Wesentliches Entscheidungskriterium bei der medikamentösen Therapie und Prophylaxe der VTE ist die Bewertung des Thromboserisikos. Die zu diesem Zweck durchgeführte Labordiagnostik basiert derzeit auf dem Nachweis definierter thrombophiler Risikofaktoren, die jedoch bei einem Großteil der Patienten mit VTE nicht vorliegen. Aktivierungsmarker aus Stoffwechselprozessen der Hämostase könnten genutzt werden, um das Thromboserisiko zuverlässiger einschätzen zu können und eine entsprechende

Antikoagulation frühzeitig zu beginnen. Voraussetzung für eine klinische Bewertung dieser Biomarker ist das Wissen über ihre Eliminationskinetik.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Eliminationskinetik verschiedener Biomarker der Hämostase durch die Transfusion autologen Serums, das solche Biomarker in hohen Konzentrationen enthält, untersucht werden. Mit diesem neuartigen methodischen Ansatz wurden mehrere Ziele verfolgt, die mit den bisher zu diesem Zweck eingesetzten radioaktiven Techniken nicht möglich sind. Erstens sollte mit dem neuen Ansatz die verschiedenen Biomarker direkt quantifiziert werden, nicht indirekt durch Messung der Radioaktivität. Zweitens sollte mit ihm eine gleichzeitige Messung verschiedener Biomarker erfolgen, was mittels radioaktiver Markierung nur bei Einsatz unterschiedlicher Isotope möglich ist. Drittens sollte die Elimination großer Mengen von Biomarkern beobachtet werden, die denjenigen entsprechen, die bei der Entstehung von Blutgerinnseln gebildet werden. Aufgrund der hohen Strahlenbelastung wäre eine solche Untersuchung mittels radioaktiver Techniken im Menschen nicht umsetzbar. Viertens sollte untersucht werden, ob durch die eingesetzte autologe Serumtransfusion eine Gerinnungsaktivierung ausgelöst werden kann. Eine solche Gerinnungsaktivierung würde zu einer zusätzlichen Bildung der exogen zugeführten Biomarker führen und eine Charakterisierung ihrer Eliminationskinetik behindern.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1 Verwendete Chemikalien

Die aufgelisteten Chemikalien wurden für die beschriebenen Experimente genutzt (s. Tab. 4).

Tab. 4: Eingesetzte Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl_2)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge (NaOH) 1 mmol/l	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar, Deutschland
Salzsäure (HCl) 1 mmol/l	
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid-Dihydrat (MgCl_2)	
Kaliumchlorid (KCl)	
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	
Natriumchlorid (NaCl)	
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	
Tris-HCl 1 M (pH 8,0)	

2.1.2 Verwendete Reagenzien

Die genannten Reagenzien wurden für die durchgeführten Experimente genutzt (s. Tab. 5).

Tab. 5: Eingesetzte Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Argatroban (Argatra)	Mitsubishi Pharma, Düsseldorf, Deutschland
Streptavidin ultrapure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Alteplase (Actilyse [®])	Boehringer Ingelheim, Biberach, Deutschland
Aqua dest. (Ampuwa [®])	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
Dynabeads M-280 Streptavidin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
HD1-22 3'biotinyliertes, ssDNA Aptamer	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
Fluorogenes Peptidsubstrat I-1560 (Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-AMC)	Bachem, Weil am Rhein, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tween 20	
DMSO	

2.1.3 Verwendete Pufferlösungen

Die genannten Pufferlösungen wurden in der beschriebenen Zusammensetzung für die durchgeführten Experimente genutzt (s. Tab. 6).

Tab. 6: Eingesetzte Pufferlösungen

Name des Puffers	Zusammensetzung
Coating-Buffer, pH 9,0	30 mM Na ₂ CO ₃ 200 mM NaHCO ₃ ad ddH ₂ O
10x PBS, pH 7,4	137 M NaCl 27 mM KCl 96 mM Na ₂ HPO ₄ 15 mM KH ₂ PO ₄ ad ddH ₂ O
PBS-Waschpuffer, pH 7,4	3 mM MgCl ₂ 0,05 % Tween ad 1x PBS
TBS-Waschpuffer	NaCl 0,9 % 10 mM TrisHCl 1 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ 0,05 % Tween
Streptavidin-Puffer, pH 7,4	3 mM MgCl ₂ 0,1% BSA ad 1x PBS
Aptamerpuffer	NaCl 0,9 % 10 mM TrisHCl 1 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ 0,1 % BSA
Substratpuffer, pH 8,5	NaCl 0,9 % 10 mM TrisHCl 4 mM CaCl ₂

2.1.4 Verwendete Materialien

Die genannten Materialien wurden für die Experimente genutzt (s. Tab. 7).

Tab. 7: Eingesetzte Materialien

Material	Hersteller
Perfusorspritze 50 ml	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Injekt Einmalspritze 10 ml	
Vasofix Safty® Venenverweilkanülen, 18G	
Venofix Safty® Sicherheitsvenenpunktionsbesteck, 21G	
Reagenzien für mikrobiologische Testung: BacT/ALERT SA, Art. Nr. 259789 und BacT/ALERT SN, Art. Nr. 259790	bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich
Einweg-Pasteurpipetten (3 ml)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Reagiergefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
CompoFlex Single® Fresenius, Standardblutbeutel	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Kolbenhubpipetten (P 10, P 20, P 200, P 1000, P 5000)	Gilson, Ohio, USA
Microtiter TM 96-Well Mikrotiterplatte (weiß)	Nunc GmbH & CO KG Thermo Fischer Scientific, Wiesbaden, Deutschland
SAFETY-MULTIFLY® Kanüle, Größe: 21G	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® Gerinnungsanalytik 5 ml	
S-Monovette® Kalium-EDTA 2,7 ml	
S-Monovette® Serum-Gel 7,5 ml	
S-Monovette® Lithium-Heparin 7,5 ml	

2.1.5 Verwendete Geräte

Die aufgelisteten Geräte wurden für die Experimente genutzt (s. Tab. 8).

Tab. 8: Eingesetzte Geräte

Gerät	Hersteller
Architect i2000 SR	Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Deutschland
Gerät für mikrobiologische Testung: bioMérieux Kulturautomat	bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich
Perfusor Space, Typ 8713030	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Plattenfluorometer FLX 800	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland
Vortex-Gerät	Cenco Instrumenten B.V., Breda, Niederlande
Tischzentrifuge 5804	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Wasserbad GFL (37 °C)	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgweder, Deutschland
Silenta RS Kühlzentrifuge	Hettlich, Tuttlingen, Deutschland
Mini Block Heater Einsatz, Art.-NR 848923 (1,5 ml)	Greiner Bio-One, Deutschland
pH-Meter 744	Metrohm Deutsche GmbH & Co, Filderstadt, Deutschland
Digitalwaage, Modell PL1200	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Plattenfluorometer FluroScan	Nunc GmbH & CO KG Thermo Fischer Scientific, Wiesbaden, Deutschland
Mastercycler® X50, PCR	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Tecan SLT-Washer für Mikrotiterplatten	SLT Labinstrumente Deutschland GmbH, Dreieich, Deutschland
BCS XP Gerinnungsanalyser	Siemens, Marburg, Deutschland
Hämatologie Analysator, XN-1000	Sysmex, Hamburg, Deutschland
Platten-Fluoro / Luminometer Fluoroscant Ascent	Thermo Fischer Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Terumo SC-201A TSCD® Steriles Schlauchschweißgerät	Terumo, Tokyo, Japan

2.1.6 Verwendete Test-Kits

Die gelisteten Test-Kits wurden für die Experimente genutzt (s. Tab. 9).

Tab. 9: Eingesetzte Test-Kits

Kitname	Hersteller
Enzygnost® TAT Micro Enzygnost® F1+2 monoclonal	Enzygnost, Siemens, Marburg, Deutschland
Multifibren® U, Dade® Innovin®, Actin® FSL, Berichrom® Factor XIII, Berichrom® Antithrombin III, Berichrom® Plasminogen, Berichrom® Protein C, INNOVANCE D- Dimer, INNOVANCE Free PS Ag, Faktor II- Dade Innovin, Factor V-Dade Innovin, Factor VII-Dade Innovin, Factor XI-Dade Innovin	Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland
Staclot® Villa rTF	Stago GmbH, Düsseldorf, Germany
TECHNOZYM® T-PA AG ELISA TECHNOZYM® PAP ELISA KIT TECHNOZYM® PAI-1 ELISA KIT	Technoclone, Wien, Österreich

2.1.7 Probandenkollektiv

Die Probandenrekrutierung erfolgte im Zeitraum von Juli 2014 bis Februar 2015 durch einen Aushang in der Blutspende des Institutes für Hämatologie und Transfusionsmedizin der Universität Bonn. Ein Votum wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Nummer 082/14 eingeholt. Eine Aufwandsentschädigung von 100 Euro wurde den Probanden gewährt. Es stellten sich 17 Personen vor, darunter befanden sich 10 Frauen und 7 Männer. Die Ein- und Ausschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie (s. Tab. 10) wurden durch Anamnese und durch laborchemische Untersuchungen von Blutproben vor Beginn der Studie geprüft.

Tab. 10: Ein- und Ausschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie

Einschlusskriterien
Alter \geq 18 Jahre und \leq 60 Jahre
geeigneter peripherer Venenstatus
Körpergewicht $>$ 50 kg
14-tägige Medikamentenkarenz bezüglich Antithrombotika und Analgetika
keine Blutspende in den vergangenen zwei Monaten
Ausschlusskriterien
Hämoglobinwert $<$ 125 g/l
kardiovaskuläre Erkrankungen, maligne Erkrankungen, Leber- oder Nierenerkrankungen
Schwangerschaft oder Stillzeit
Auffälligkeiten im Thrombophilie-Screening (AT-Mangel, Protein S-Mangel, Protein C-Mangel, FV Leiden (FVL)- oder ProthombinG20210A-Mutation)

Konnten die Einschlusskriterien erfüllt werden, war die Teilnahme der Probanden an der Studie möglich. Insgesamt wurden 15 Probanden, darunter 10 Frauen und 5 Männer, in die Studie eingeschlossen. Einer der Probanden nahm die vereinbarten Termine zur Blutentnahme nicht wahr, sodass er aus der Studie ausgeschlossen wurde. Bei einem weiteren Probanden wurde in den Voruntersuchungen die FVL-Mutation nachgewiesen, sodass er ebenfalls ausgeschlossen werden musste. Unter Beachtung der Deklaration von Helsinki wurden die Probanden über möglichen Nebenwirkungen und Risiken durch die Teilnahme an der Studie ärztlich aufgeklärt. Die Einwilligung der Probanden wurde vor Beginn der Studie schriftlich dokumentiert.

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeines Versuchsprinzip

Ziel der vorliegenden Arbeit war die möglichst genaue Erfassung der Eliminationskinetik verschiedener Biomarker der Gerinnselbildung sowie der Fibrinolyse *in vivo*. Dazu mussten die ausgewählten Biomarker zunächst in hohen Konzentrationen in einer physiologischen Matrix hergestellt werden. Folgendes musste dabei beachtet werden: wird Vollblut aus dem Gefäßsystem entnommen, kommt es unter Verbrauch von Gerinnungsfaktoren zur Gerinnselbildung. Wird die Probe zentrifugiert, trennt sich der feste zelluläre vom flüssigen Bestandteil. Der flüssige Überstand wird als Serum bezeichnet und enthält zahlreiche Stoffwechselprodukte, die während der

Gerinnselformung produziert wurden. Da sich das in der Vollblutspende bildende Gerinnselformung nicht spontan auflöst, werden jedoch Parameter der Fibrinolyse, wie etwa D-Dimere, nicht produziert. Durch Zugabe des biotechnologisch hergestellten und thrombolytisch wirkenden tPAs (Actilyse®) zum gerinnenden Vollblut kann dieser Prozess künstlich induziert werden. Zur Umsetzung des Vorhabens wurden aus einer mit Actilyse® versetzten Vollblutspende in mehreren Schritten eine Serumpräparation hergestellt, welche die Biomarker der Gerinnselformung und Fibrinolyse in hohen Konzentrationen enthält. Diese Serumpräparation wurde den Probanden autolog reinfundiert und durch sequentielle Blutentnahme vor, während und nach der autologen Transfusion die Eliminationskinetik verschiedener Biomarker durch laboranalytische Messung der Plasmaspiegel bestimmt.

2.2.2 Zeitlicher Ablauf des Vorhabens

Ein orientierender zeitlicher Ablauf der Aktivitäten, die im Rahmen der Studie durchgeführt wurden, ist in Tab. 11 dargestellt. Die Pseudonymisierung der Probandendaten wurde über die Zuordnung einer Probandennummer vorgenommen. Sie wurde auch zur Datenerfassung im Laborinformationssystem des Instituts verwendet. Für jeden Probanden wurde für die Teilnahme an der Studie ein zeitlicher Rahmen von 7 - 9 Wochen festgelegt.

Tab. 11: Zeitlicher Ablauf der Studie

Zeitpunkt	Aktivitäten
Start	Aufklärung und Screening
< 3 Wochen nach Start	Eigenblutentnahme, Herstellung und Kryokonservierung des autologen Serums
> 4 Wochen nach Eigenblutspende	Eigentlicher Seruminfusionsversuch mit folgendem zeitlichen Ablauf:
unmittelbar vor Beginn der Infusion	1. Blutentnahme
t = 0 min	Beginn der Seruminfusion
t = 15 min	2. Blutentnahme
t = 30 min	Ende der Infusion, 3. Blutentnahme
t = 45 min	4. Blutentnahme
t = 60 min	5. Blutentnahme
t = 180 min	6. Blutentnahme
t = 450 min	7. Blutentnahme
t = 24 h	8. Blutentnahme
t = 48 h	9. Blutentnahme

Zu Beginn der Studie wurden die rekrutierten Probanden ausführlich über die Risiken und Nebenwirkungen der Studie aufgeklärt, gefolgt von einer ausführlichen Anamnese und einer orientierenden körperlichen Untersuchung. Für das laboranalytische Screening auf pathologische Blutwerte wurde jedem Probanden mit Hilfe von Monovetten ca. 40 ml Blut entnommen, davon 2 x 7,5 ml Serum, 2 x 2,7 ml EDTA-Blut und 4 x 5 ml Citrat. Die zu bestimmenden Parameter wurden so gewählt, dass mithilfe des laboranalytischen Screenings hereditäre Thrombophilien, erhöhte Blutungsneigung oder sonstigen Störung des Gerinnungssystems ausgeschlossen werden konnten. Zudem wurden die Leber- und Nierenfunktion überprüft, da die Biomarker auf diesen Wegen aus dem Körper ausgeschieden werden. Die laboranalytisch bestimmten Parameter sind in Tab. 12 aufgelistet.

Tab. 12: Laboranalytisch bestimmte hämostaseologische und nicht-hämostaseologische Parameter

Nicht-hämostaseologische Parameter	Hämostaseologische Parameter
AST (Aspartat-Aminotransferase)	FI
ALT (Alanin-Aminotransferase)	FII
γ GT (Gamma-Glutamyl-Transferase)	FVII
Harnstoff	FXI
GFR (Glomeruläre Filtrationsrate)	PLG
Kreatinin	AT
HIV-1/2 AK (Humanes Immundefizienz-Virus Antikörper)	PC
Anti-HBC AK (Antikörper gegen das Hepatitis B Virus core Antigen)	α_2 AP
HBsAG (Hepatitis B Virus surface Antigen)	D-Dimere
HCV (Hepatitis C Virus)	F1+2
Lues AK (Antikörper-Suchtest gegen <i>Treponema pallidum</i>)	TAT
HCV PCR (Hepatitis C Polymerasekettenreaktion)	PAP
HIV PCR	tPA
Blutgruppe	PAI
Blutbild	FVL-PCR (Faktor V Leiden Polymerase Kettenreaktion)
---	FII-PCR (Faktor II Polymerase Kettenreaktion)

Sofern sich aus der Analyse der laborchemischen Befunde keine Ausschlussgründe ergaben, konnte innerhalb der nachfolgenden drei Wochen zur Herstellung der Serumpräparation 250 ml Eigenblut entnommen werden. Zur Qualitätsprüfung wurde am Tag der Blutspende erneut eine infektionsserologische Diagnostik durchgeführt und das Blut des jeweiligen Probanden auf HCV, HIV, HBV und *Treponema pallidum* getestet. Nach Herstellung wurde die Serumpräparation bei -70 °C gelagert. Um die Regeneration des Blutverlustes zu gewährleisten, wurde der eigentliche Seruminfusionsversuch vier Wochen nach der Vollblutspende durchgeführt.

2.2.3 Herstellung der Serumpräparation aus den Eigenblutproben

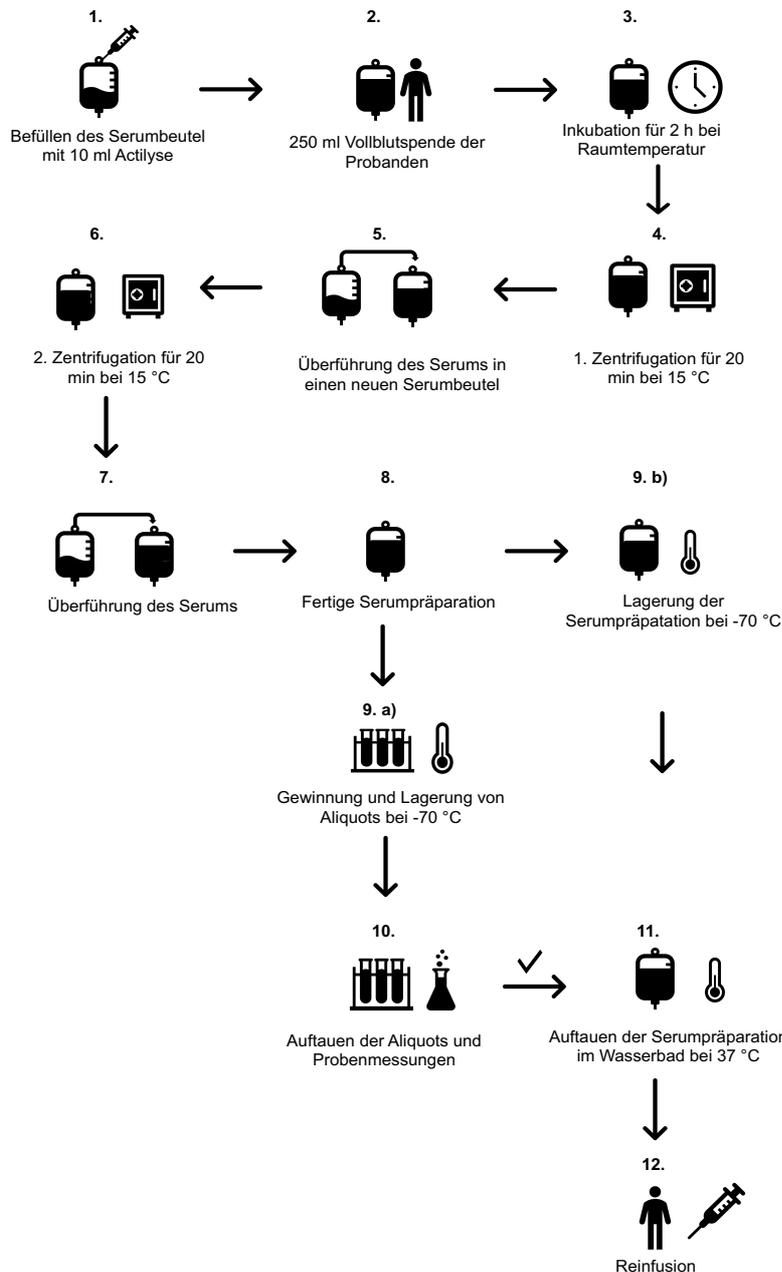


Abb. 7: Herstellungsprozess der Serumpräparation

Nach Befüllen des Leerbeutels mit 10 ml (1 mg/ml) Actilyse® wurde die Vollblutspende von 250 ml hinzugeben und die Probe für 2 h inkubiert. Es folgten zwei Zentrifugationen je mit Überführung des Überstands in einen weiteren Leerbeutel und anschließender Gewinnung von Aliquots, die später zur laboranalytischen Messung verwendet wurden. Die Proben wurden bei -70 °C eingefroren und am Tag der Reinfusion im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut.

Zu Beginn wurde der Leerbeutel unmittelbar vor der Eigenblutspende mit 10 ml (1 mg/ml) tPA (Actilyse®) befüllt (Schritt 1). Die Actilyse® wurde gemäß Herstelleranweisung aufgelöst und in eine 10 ml Spritze aufgezogen. Zur Gewährleistung steriler Bedingungen wurde die Injektion der Actilyse® in den Serumbeutel unter einer sterilen Werkbank vorgenommen. Die im Vollblut enthaltene Menge an Actilyse® wurde so gewählt, dass sie vollständig umgesetzt werden konnte und eine weitere intravasale Lyse durch eine Restmenge im Rahmen der späteren autologen Transfusion der Serumpräparation verhindert wurde. Im nächsten Schritt wurde den Probanden 250 ml Vollblut in einen Leerbeutel entnommen und bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert (Schritte 2 und 3). Nachfolgend wurde der Serumbeutel bei 4042 x g für 20 min bei 15 °C zentrifugiert (Schritt 4) und mit einem zweiten Leerbeutel durch eine sterile Schlauchschweißverbindung verbunden, sodass der Serumüberstand des ersten Beutels in einen neuen Beutel überführt werden konnte (Schritt 5). Die Zentrifugation und das Überführen des Serums in einen weiteren Beutel wurden wiederholt (Schritte 6 und 7). Aus der fertigen Serumpräparation (Schritt 8) wurden zur Messung der Gerinnungs- und Aktivierungsmarker 10 Aliquots mit je 1 ml entnommen (Schritt 9a) und zur Lagerung bei -70 °C eingefroren (Schritt 9a). Die fertige Serumpräparation wurde ebenfalls bei -70 °C gelagert (Schritt 9b). Die Überprüfung der Sterilität erfolgte mit Hilfe bioMérieux Kulturautomat anhand eines Schlauchsegments der sterilen Schlauchschweißverbindung. Zur laboranalytischen Untersuchung der Serumpräparation wurden die Aliquots in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und ausgewählte Gerinnungsparameter mit Hilfe des Siemens BCS und den zugehörigen Analysematerialien nach Herstelleranweisungen gemessen (Schritt 10). Nachdem alle Parameter bestimmt wurden und das Ergebnis der mikrobiologischen Testung des Serums auf Sterilität vorlag, erfolgte die Reinfusion der Serumpräparation (Schritt 11).

2.2.4 Autologe Serumtransfusion und Probengewinnung

Am Tag der Seruminfusion wurde den Probanden nach erneuter körperlicher Untersuchung beidseits Venenverweilkanülen in die Armvenen gelegt, über welche unmittelbar vor der Serumtransfusion die erste Blutabnahme durchgeführt wurde. Nach Auftauen im Wasserbad bei 37 °C wurden 50 ml der Serumpräparation in eine Perfusorspritze aufgezogen und den Probanden mit Hilfe eines Infusionsgeräts mit einer

Geschwindigkeit von 100 ml/h über einen Zeitraum von 30 min unter Verwendung der Venenverweilkanülen reinfundiert. Wie bereits in Tab. 11 dargestellt, wurden die Blutentnahmen unter Zuhilfenahme eines Sicherheitsvenenpunktionsbestecks nach 15 min, 30 min (= Ende der Seruminfusion), 60 min, 120 min, 180 min, 24 h und 48 h durchgeführt. Je Blutentnahme wurden 4 x 5 ml Citrat-Blut, 1 x 3 ml mit Argatroban versetztes Citrat-Blut (finale Argatroban-Konzentration 15 µg/ml) und 1 x 2 ml EDTA-Blut entnommen. Aus dem EDTA-Blut wurde unmittelbar nach der Blutentnahme mit Hilfe des Hämatologie-Analysators ein Blutbild erstellt. Die Citratröhrchen wurden nach Entnahme 10 min bei 3000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand (Blutplasma) in 1 ml Aliquots überführt und bei -70 °C eingefroren.

2.2.5 Messung der Gerinnungs- und Aktivierungsmarker

2.2.5.1 Messung mit Hilfe des Gerinnungsanalysers

Gerinnungs- und Aktivierungsparameter sowohl aus der Serumpräparation als auch aus den im Rahmen der Serumtransfusion entnommenen Blutplasmaproben wurden mit Hilfe des BCS XP Koagulationsanalysers gemessen. Die Methode der Gerinnungstests beruht entweder auf der Messung der mit der Konzentration korrelierenden Aktivität eines Gerinnungsfaktors, oder auf dem Prinzip der Koagulometrie, bei der die Aktivität einzelner Faktoren über die Geschwindigkeit der Fibrinbildung ermittelt wird. Gemessen wurden folgende Gerinnungsparameter:

- FI
- FII
- FVII
- FXI
- FIB
- PC
- PS
- PLG
- α_2 AP
- D-Dimere
- AT

2.2.5.1.1 Testprinzipien

Im folgenden Abschnitt werden die Testprinzipien zur Konzentrationsbestimmung der Hämostaseparameter erläutert. Alle Tests wurden nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers durchgeführt und entsprechende Puffer und Analysesubstanzen aus den Test-Kits verwendet.

Faktoren II, V, VII

Das Prinzip des Tests beruht auf der Aktivierung des extrinsischen Wegs der Hämostase und der anschließenden Gerinnelbildung, die durch die Zugabe des TF zu einer Probe entsteht. Liegt im Blutplasma ein Mangel eines Gerinnungsfaktors vor, führt dies zu einer Verlängerung der Zeit bis zur Gerinnelbildung. Diese Zeit wird auch als Thromboplastinzeit bezeichnet.

Das zu testende Blutplasma wird in einem automatisierten Prozess mit einem vorgegebenen Mangelplasma vermischt, welches bis auf den zu bestimmenden Einzelfaktor alle Gerinnungsfaktoren im Überschuss enthält. Anschließend werden der TF und Calciumionen hinzugegeben und die Zeit bis zur Gerinnelbildung gemessen. Durch Verdünnung von Standard Human-Plasma in der Mischung mit dem Mangelplasma wird eine Bezugskurve hergestellt und die Aktivität des Gerinnungsfaktors in % von der Norm angegeben.

Faktor XI

Das Testprinzip beruht auf der Aktivierung des intrinsischen Wegs der Hämostase und erfolgt über die Bestimmung der aPTT. Der Mangel eines Faktors aus diesem Teil der Gerinnungskaskade führt zur Verlängerung der aPTT. Zur Bestimmung des FXI wird das zu untersuchende Plasma in einem automatisierten Prozess mit Mangelplasma vermischt. Anschließend werden Calciumionen und Phospholipide hinzugegeben und die Zeit bis zur Gerinnelbildung gemessen. Die Aktivitätsspiegel werden in % von der Norm angegeben.

Fibrinogen

Die Zugabe von Thrombin im Überschuss zu der zu testenden Probe führt durch die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin zur Gerinnelbildung. Die Zeit bis zur

Gerinnungsbildung ist weitgehend abhängig von dem Gehalt an Fibrinogen in der Probe. Die Gerinnungszeit ist antiproportional zur Konzentration des in der Probe enthaltenen Fibrinogens. Die Trübung der Probe wird photometrisch bei 405 nm gemessen und gilt als Indikator der Fibrinbildung.

PLG

Der zu testenden Probe wird eine definierte Menge Streptokinase hinzugefügt, die das vorhandene PLG in der Probe in einen Streptokinase-Plasmin-Komplex umwandelt. Der Komplex hydrolysiert seinerseits anschließend ein chromogenes Substrat, wobei ein Farbstoff abgespalten wird, dessen Absorptionsspektrum bei 405 nm gemessen werden kann. Die Farbintensität ist proportional zur Plasminogen-Aktivität.

AT

Die Aktivität an AT in der Probe wird über die Hemmung von Thrombin in Gegenwart von Heparin bestimmt. Dabei inaktiviert das im Plasma vorhandene AT überschüssiges Thrombin, kann dieses aber nicht vollständig binden. Die Extinktion des in der Probe verbliebenen, nicht inaktivierten Thrombins wird photometrisch bei 405 nm gemessen. Die Extinktion ist antiproportional zur Antithrombinaktivität.

PC

Die Menge an PC in der Probe wird mit einem aus dem Gift des nordamerikanischen Kupferkopfs gewonnenen PC-Aktivator aktiviert. Dabei hydrolysiert das aktivierte PC ein synthetisches chromogenes Substrat aus der Probe und setzt Paranitroanilin frei, welches photometrisch bei 405 nm gemessen wird. Die freigesetzte Paranitroanilinkonzentration ist antiproportional zum PC-Spiegel.

D-Dimere

In der vom Hersteller vorgegebenen Testsubstanz sind Polystyrolpartikel enthalten, die kovalent mit dem monoklonalen Antikörper 8D3 beladen sind. Diese Partikel aggregieren, sobald sie mit D-Dimeren aus der zu testenden Probe in Berührung kommen. Anschließend wird die Veränderung der optischen Dichte in der Probe gemessen. Diese ist proportional zur Menge der vorhandenen D-Dimere.

α_2 AP

Die Konzentration an α_2 AP wird bestimmt, indem der Probe eine definierte Menge an Plasmin im Überschuss hinzugegeben wird. Durch die Bindung von Plasmin an Antiplasmin entsteht der α_2 AP-Komplex. Anschließend wird der Probe ein chromogenes Substrat hinzugegeben, das von der verbleibenden Menge Plasmin hydrolysiert wird. Das Absorptionsspektrum der Probe wird bei 405 nm photometrisch gemessen und ist antiproportional zur Konzentration von α_2 AP.

2.2.5.2 STACLOT® VIIa-rTF

2.2.5.2.1 Testprinzip

Der Gerinnungsfaktor VII wird im Rahmen der Gerinnungskaskade nach Gefäßverletzung durch Kontakt mit dem TF und Calcium zu FVIIa aktiviert und leitet damit die Gerinnung ein. FVIIa aktiviert seinerseits in Anwesenheit von Calcium und Phospholipiden FX zu FXa, der wiederum Thrombin aktiviert. Das Resultat ist die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin. Das Prinzip des Tests beruht auf der Fähigkeit eines rekombinanten löslichen Tissue Factors (rsTF), den in der Probe vorhandenen FVIIa zu binden. rsTF besitzt zudem die Funktion eines Kofaktors, die spezifisch an den FVIIa bindet und in Anwesenheit von Calcium und Phospholipiden zur Koagulation der Probe führt. Die Zeit bis zur Koagulation wird gemessen und ist antiproportional zur Konzentration des in der Probe vorhandenen FVIIa.

2.2.5.2.2 Durchführung

In der vorliegenden Studie wurde die Konzentration an FVIIa in den Serumpräparationen bestimmt. Das Test-Kit beinhaltet fünf Reagenzien:

- Reagenz 1: Verdünnungspuffer
- Reagenz 2: gefriergetrocknetes Humanplasma, aus dem der FVIIa entfernt wurde
- Reagenz 3: rsTF in Phospholipiden
- Reagenz 4: trockengefrorenes Gemisch aus einer bekannten Menge von rekombinatem FVIIa
- Reagenz 5: Gemisch mit bekannter Konzentration an FVIIa, Kontrolle

Reagenz 4 wurde zur Kalibartion des Tests verwendet und 1:10 mit Reagenz 1 verdünnt (100 µl Reagenz 4 + 900 µl Reagenz 1). Die zu testenden Serumpräparationen und die Kontrollen wurden anschließend im gleichen Durchlauf präpariert und gemessen. Aus den Verdünnungsproben der Kontrollen und der Serumproben (1:10) wurden je 50 µl in 1 ml Reagiergefäße überführt. Anschließend wurden in jedes dieser Gefäße sowohl 50 µl des Reagenz 2 und 50 µl des Reagenz 3 pipettiert. Die Proben wurden mit Hilfe eines Vortexgeräts gemischt und für 3 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl einer vorgewärmten Calciumlösung wurde die Reaktion gestartet und mit Hilfe einer Stoppuhr die Zeit bis zur Koagulation der Probe gemessen.

2.2.5.3 Enzyme-linked Immunosorbent-Assay (ELISA)

2.2.5.3.1 Testprinzip

Der ELISA gehört zu den enzym-gekoppelten Immunoassays und ist ein laborchemischer Test zum Nachweis von Proteinen in einer Probe. Das Prinzip des Tests beruht auf dem Mechanismus der Antigen-Antikörper-Reaktion des Immunsystems. Soll ein bestimmtes Protein in einer Probe nachgewiesen werden, wird der dazugehörige Antikörper verwendet, um das Antigen in der Probe zu binden. Der Antikörper wird zuvor gentechnisch präpariert und an ein Enzym gekoppelt. Die Messung der Antigen-Antikörper-Reaktion in der Probe erfolgt mit Hilfe eines Enzyms, welches nach Zugabe eines Substrats einen Farbumschlag in der Probe erzeugt, der photometrisch gemessen wird.

Es lassen sich mehrere ELISA-Methoden unterscheiden. Die gebräuchlichsten Methoden sind der direkte und indirekte ELISA, sowie der Sandwich-ELISA. Die Prinzipien der Methoden sind in Abb. 8 dargestellt.

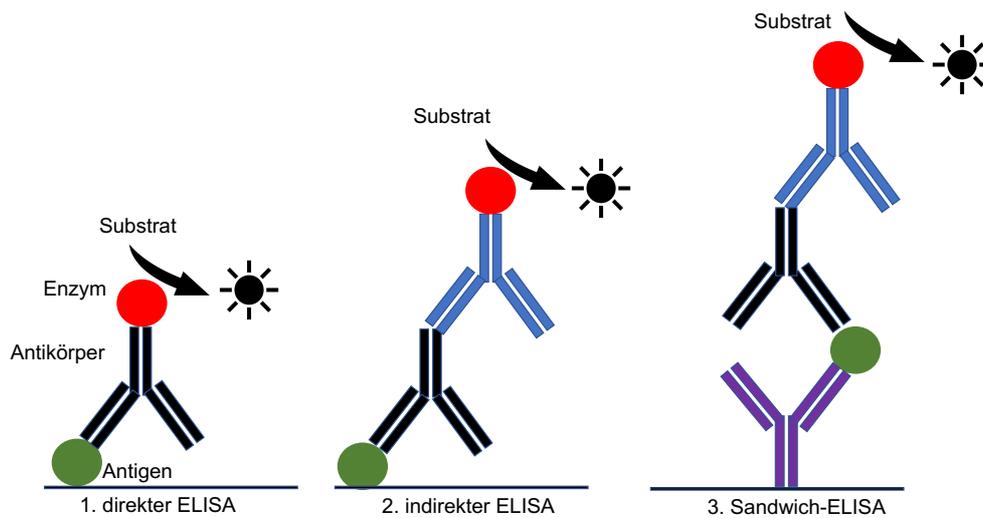


Abb. 8: Schematische Darstellung des ELISA-Prinzips
 Bei dem direkten ELISA (1.) wird das Antigen direkt an die Mikrotiterplatte fixiert. Der in einer Probenmatrix enthaltene Antikörper, gekoppelt an ein Enzym, bindet an das Antigen. Das an den Antikörper gebundene Enzym setzt ein Substrat um, welches photometrisch messbar ist. Beim indirekten ELISA (2.) wird der antigenbindende Antikörper durch einen zweiten Antikörper nachgewiesen. In dem Sandwich-ELISA (3.) befindet sich das Antigen zwischen zwei Antikörpern.

Beim direkten ELISA wird die Oberfläche einer Mikrotiterplatte mit einem Antigen beschichtet. Nach Zugabe einer Probenmatrix wird das auf der Oberfläche immobilisierte Antigen von einem Antikörper aus der Probe gebunden. Der Antikörper ist seinerseits an ein Enzym gekoppelt. Der Nachweis erfolgt anschließend durch die Zugabe eines Substrats, welches vom Enzym umgesetzt wird, sodass ein photometrisch messbarer Farbumschlag in der Probe entsteht. Die Menge des Farbumschlags ist proportional zur Konzentration des zu bestimmenden Proteins.

Der indirekte ELISA ist dem direkten Verfahren sehr ähnlich, wobei hier der antigenbindende Antikörper durch einen zweiten, gekoppelten Antikörper nachgewiesen wird. Beim Sandwich-ELISA hingegen wird das Antigen gleichzeitig von zwei Antikörpern erkannt, sodass ein Komplex entsteht, in dessen Zentrum sich das Antigen befindet.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Test-Kits zur Detektion von F1+2, TAT, PAP, tPA und PAI beruhen auf dem Sandwich-Prinzip. Alle ELISAs wurden nach der Gebrauchsanweisung des jeweiligen Herstellers durchgeführt und die vom Hersteller vorgegebenen Puffer und Substrate verwendet.

2.2.5.3.2 Durchführung der ELISAs

F1+2

Die Mikrotiterplatte wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen F1+2 beschichtet. Nach Zugabe von 50 µl Probenpuffer und 50 µl Probenplasma erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 30 min. Während der Inkubation bindet das in der Probe vorhandene F1+2 an seinen Antikörper. Anschließend wurden die Proben 3 x mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen und in einem nächsten Schritt ein Peroxidase-konjugierter Antikörper gegen humanes F1+2 hinzugefügt, der während der Inkubation bei 37 °C für 15 min an die freien Bindungsstellen des F1+2 bindet. Die drei Waschschrte mit jeweils 300 µl wurden wiederholt. Anschließend erfolgte die Zugabe eines chromogenen Substrats und Wasserstoffperoxid. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min wurde die Farbbildung durch Zugabe von 100 µl Stopplösung beendet. Die photometrische Messung erfolgte bei 450 nm und ist proportional zur Konzentration an F1+2.

TAT

Die Durchführung des TAT-ELISAs erfolgte analog zu der des F1+2 ELISAs (s. oben). Die Mikrotiterplatten wurden mit einem gegen α -Thrombin gerichteten Antikörper beschichtet. Während der ersten Inkubationszeit bindet das in der Probe vorhandene TAT an den α -Thrombin Antikörper. Nachdem unspezifische Bindungen ausgewaschen wurden, erfolgte im nächsten Schritt die Zugabe eines Peroxidase-konjugierten α -AT Antikörpers, der an freie Bindungsstellen des AT bindet. Nach Zugabe eines Substrats, Inkubation für 30 min und Beendigung der Reaktion durch Zugabe einer Stopplösung erfolgte die Messung der Enzymaktivität photometrisch.

PAP

Die Mikrotiterplatten wurden mit dem monoklonalen α -PAP-6 Antikörper beschichtet. Es erfolgte die Zugabe von 100 µl Plasmaprobe. Während der Inkubation über Nacht bei 4 °C erfolgte die Bindung des in der Probe vorhandenen PAP an die Antikörper. Anschließend wurden zwei Waschschrte mit jeweils 200 µl Waschpuffer durchgeführt. Nach dem Auswaschen wurde den Proben 100 µl Peroxidase-konjugierter Antikörper hinzugegeben, der an die PAP-Bindungsstelle bindet. Die Mikrotiterplatten wurden bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert und anschließend die Reaktion durch Zugabe von

100 µl Stopplösung beendet. Die Farbbildung der Probe wurde bei 450 nm gemessen. Die Konzentration von PAP ist proportional zur gemessenen Farbintensität.

tPA

Die Mikrotiterplatten wurden mit einem α -tPA Antikörper beschichtet. Es erfolgte die Zugabe von 25 µl Plasmaprobe und 75 µl Probenverdünnungspuffer. Das in der Probe vorhandene tPA bindet während der Inkubation bei 37 °C für 60 min an die Antikörper. Nach dem Entfernen der Flüssigkeit aus den Mikrotiterplatten wurden 100 µl Peroxidasegekoppelter- α -tPA Antikörper hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine erneute Inkubation bei 37 °C für 60 min, sowie drei erneute Waschschrte mit jeweils 200 µl. Der Waschpuffer wurde entfernt und die Proben anschließend mit 100 µl Substratlösung für 20 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 µl Stopplösung beendet. Die Farbbildung der Proben wurde bei 450 nm gemessen. Der Farbumschlag ist proportional zur Konzentration des tPAs.

2.2.5.4 Messung der freien Thrombinkonzentration mittels Oligonucleotide-based EnzymeCapture Assay (OECA)

2.2.5.4.1 Testprinzip

Der Nachweis von freiem Thrombin in den Serumpräparationen und in den Blutplasmaproben wurde mit Hilfe des OECA durchgeführt. Das Prinzip des laborchemischen Tests ist in Abb. 9 dargestellt.

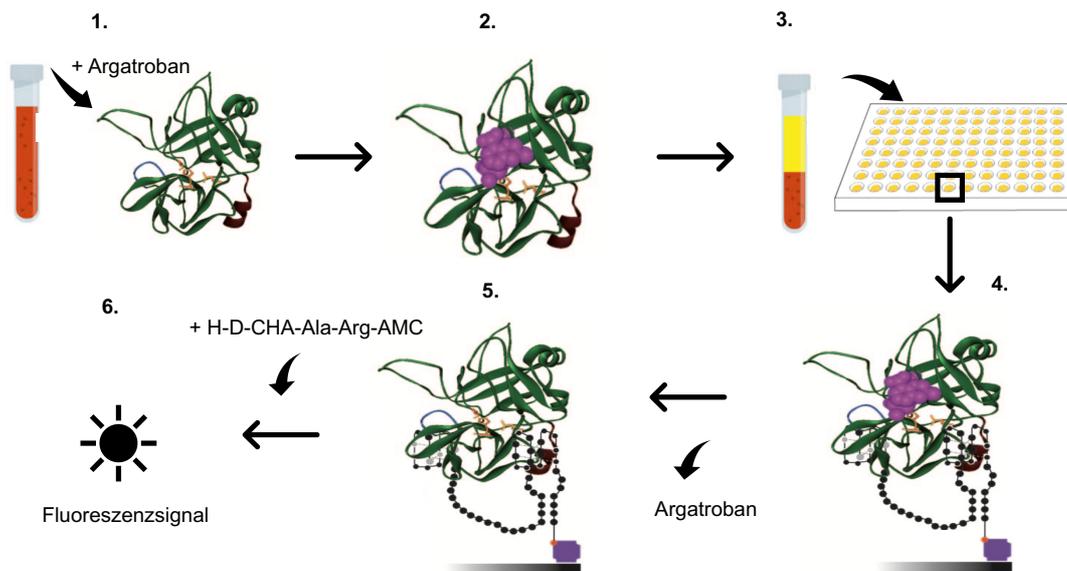


Abb. 9: Testprinzip des OECA zur Messung von freiem Thrombin

a.) Vor der Blutentnahme wird dem Citratröhrchen Argatroban hinzugefügt (1.), welches bei der Blutentnahme reversibel an die aktive Domäne des freien Thrombins bindet (2.) und die irreversible Hemmung von Thrombin durch endogene Thrombininhibitoren vermeidet. Die Mikrotiterplatten wurden mit dem Aptamer HD1-22 beschichtet. Dieser bindet nach Zugabe der Plasmaprobe gleichzeitig an zwei Bindungsstellen des in der Probe vorhandenen freien Thrombins (4.). Nach Inkubation wurde der Überstand entfernt und ein Waschschrift durchgeführt. Anschließend wurde ein Thrombin-spezifisches Peptidsubstrat hinzugefügt (5.), welches durch Thrombin proteolytisch gespalten wird. Durch die Messung eines Fluoreszenzsignals wurde die Menge an Thrombin bestimmt. Modifiziert übernommen aus Müller et al., 2011.

Der OECA ist ein Verfahren, das dem Prinzip der Immunoassays ähnelt und die Messung von freiem Thrombin in einer Blutprobe erlaubt. Die Methode basiert auf der Mobilisierung von freiem Thrombin in einer Plasmaprobe durch Aptamere. Dazu wird das Aptamer HD1-22 in mehreren Schritten am Boden der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte fixiert. Nach Zugabe einer Plasmaprobe bindet das Aptamer mit hoher Affinität gleichzeitig an zwei Bindungsstellen des freien Thrombins in der Probe, sodass das es fixiert wird. Der Nachweis des gebundenen Thrombins erfolgt anschließend durch die Zugabe eines Thrombin-spezifischen Peptidsubstrats, bestehend aus einer Aminosäurekette mit dem Farbstoff 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC). Durch die Thrombin-vermittelte proteolytische Spaltung des Substrats wird ein Farbstoff freigesetzt, der photometrisch gemessen wird. Ermittelt wird die Konzentration des freien Thrombins durch den Vergleich mit einer kalibrierten Standardkurve (Müller et al., 2011).

2.2.5.4.2 Präanalytik

In einer Blutprobe ist Thrombin sehr instabil, da es durch endogene Thrombin-Inhibitoren irreversibel gebunden wird. Um diese Instabilität zu verhindern und den Nachweis von Thrombin in der Probe zu ermöglichen, wurde Argatroban, ein synthetisch hergestellter direkter Inhibitor des Thrombins verwendet. Unmittelbar vor der Blutentnahme wurden die Citratröhrchen jeweils mit 45 µg Argatroban versetzt, um eine finale Konzentration von 15 µg/ml Argatroban in der Plasmaprobe zu erreichen. Argatroban bindet und stabilisiert freies Thrombin in der Probe reversibel. Nach der Blutentnahme wurden die Citratröhrchen für 10 min bei 3000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in 1 ml Aliquots überführt und bei -70 °C eingefroren. Unmittelbar vor der Messung wurden die Proben in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut.

2.2.5.4.3 Durchführung des OECA

Zum Bestücken wurden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte zunächst mit je 100 µl einer Lösung von 10 µg/ml biotinyliertem BSA in Beschichtungspuffer beschichtet. Der pH-Wert von 9,0 der Lösung schafft optimale Bedingungen für die Bindung des BSA an die Mikrotiterplatten. Nach Inkubation über Nacht im Dunklen bei 4 °C wurden die Proben in drei Zyklen mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Lösung aus PBS Waschpuffer, 1 mg/ml BSA und 10 µg/ml Streptavidin für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation erfolgt die Bindung des Streptavidins an die Bindungsstellen des biotinylierten BSA. Durch einen erneuten Waschvorgang wurden unspezifische Bindungen entfernt und die freien Bindungsstellen des Streptavidins anschließend durch Zugabe von 200 µl Blockpuffer je Vertiefung blockiert. Das Aptamer HD-1-22 wurde zuvor in Tris-Puffer gelöst und mit 1 mg/ml BSA verdünnt, sodass die finale Konzentration des Aptamers in der Lösung 5 nM betrug. Nach Aspiration des Blockpuffers wurden die mit Streptavidin-bestückten Mikrotiterplatten mit je 100 µl der Aptamer Lösung pro Vertiefung beladen und erneut für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Unspezifische Bindungen wurden durch einen Waschzyklus mit 100 µl PBS entfernt und 100 µl des Substrat I-1560 gelöst in Waschpuffer in jede Vertiefung pipettiert.

2.2.5.4.4 Messung des generierten Fluoreszenzsignals

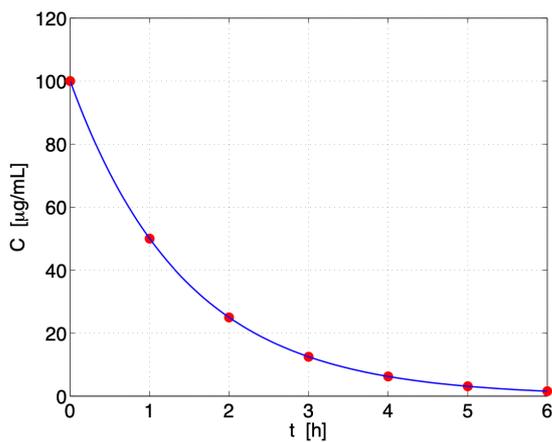
Zur Kalibration der Messung wurden Kalibratoren mit bekannter Thrombinkonzentration mitgeführt. Dazu wurde humanes Poolplasma verwendet, dem bekannte Konzentrationen

von 0 - 10 $\mu\text{g/ml}$ Thrombin (0 - 272 pmol/l) hinzugegeben wurde. Mit Hilfe dieser Kalibratoren wurde eine halblogarithmische Standardkurve erstellt, auf deren Grundlage aus dem Fluoreszenzsignal der Proben die Konzentration des freien Thrombins ermittelt wurde. Nach dem Auftragen des Substrats wurde das Fluoreszenzsignal der Proben innerhalb von 2 h gemessen.

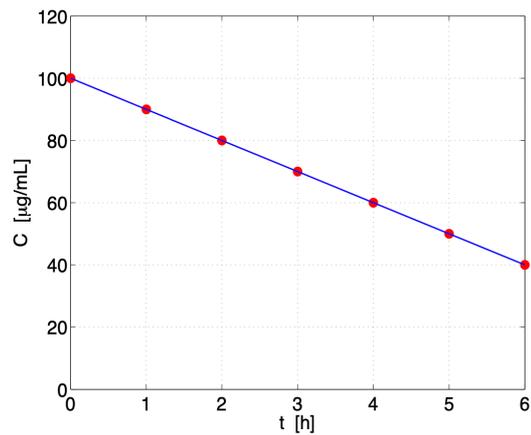
2.2.6 Pharmakokinetik

Im Folgenden sollen einige Grundprinzipien und Messgrößen der Pharmakokinetik erläutert werden. Diese Messgrößen wurden eingesetzt, um die Elimination der durch Seruminfusion zugeführten Aktivierungsmarker im Organismus zu charakterisieren.

Der Begriff der Pharmakokinetik beschreibt, wie der Körper auf eine Substanz reagiert, wenn er diese aufnimmt, verteilt, verstoffwechselt und wieder ausscheidet. Charakterisiert wird die Pharmakokinetik durch drei wesentliche Prozesse: Resorption, Distribution und Metabolisierung/Elimination. Nach Freisetzung einer Substanz, u. a. aus einem Arzneimittel oder einem Prodrug, erfolgt die Resorption, worunter die Aufnahme der Substanz in die Blutbahn des Körpers zu verstehen ist. Durch aktiven oder passiven Transport gelangt die Substanz über die Lipidmembran, wird in die Blutbahn aufgenommen und verteilt sich im Körper in verschiedenen Stoffwechsellräumen, die auch als Kompartimente bezeichnet werden. Die Verteilung der Substanz ist abhängig von ihrer physikochemischen Eigenschaft und unter anderem von der Durchblutung des Gewebes. Die Elimination umfasst alle Prozesse des Körpers, die an der biochemischen Umwandlung und der Exkretion einer Substanz aus den Organen des Körpers beteiligt sind. Die finale Ausscheidung der metabolisierten Abbauprodukte erfolgt im Wesentlichen über die Niere mit dem Urin, über die Leber mit der Gallenflüssigkeit oder über den Darm mit dem Stuhl. Während Resorption, Verteilung, Metabolisierung und Elimination ändert sich mit der Zeit die Konzentration einer Substanz (Gugeler und Klotz, 2000). Abb. 10 zeigt eine schematische Darstellung zweier Formen der Eliminationskinetik.



a).



b).

Abb. 10: Schematische Darstellung der Eliminationskinetik 0. und 1. Ordnung

Die Konzentration einer Substanz C ist in µg/ml auf der y-Achse gegen die Zeit t in h auf der x-Achse aufgetragen. a.) Eliminationskinetik 1. Ordnung: Die Geschwindigkeit der Elimination ist abhängig von der Plasmakonzentration einer Substanz. b.) Eliminationskinetik 0. Ordnung: die Geschwindigkeit der Elimination einer Substanz ist unabhängig von der Plasmakonzentration. Modifiziert übernommen aus Greiner C, 2011.

Die häufigste Form der Elimination ist die Kinetik 1. Ordnung, bei der die Geschwindigkeit der Elimination mit abnehmender Plasmakonzentration sinkt. Die Halbwertszeit (HWZ) der Substanz ist dosisabhängig und nicht konstant. Die zweite Form wird beschrieben durch die Kinetik 0. Ordnung, bei der pro Zeiteinheit immer die gleiche Menge einer Substanz aus dem Körper eliminiert wird. Die HWZ ist konstant und dosisunabhängig. Grund für diese Form der Kinetik ist meist eine Sättigung der eliminierenden Enzyme. Zur Veranschaulichung des Verhaltens einer Substanz im Körper bedient sich die Pharmakokinetik der Theorie der Kompartiment-Modelle. Dabei wird der Körper als ein kinetisches System verstanden und in verschiedene Kompartimente (Stoffwechselräume) aufgeteilt. Die einfachste Variante stellt das Ein-Kompartiment-Modell dar, bei dem der gesamte Körper als ein Raum betrachtet wird, in dem sich eine Substanz verteilt und die Ausscheidung nur über einen Weg erfolgen kann. Bei einem Zwei-Kompartiment-Modell wird der Körper in zwei kinetisch unterschiedliche Räume geteilt, die aus einem zentralen und einem peripheren Kompartiment bestehen (Gugeler und Klotz, 2000). In den meisten Fällen wird das zentrale Kompartiment der systemischen Zirkulation zugeordnet, während das periphere Kompartiment dem Gewebe entspricht. Wird eine Substanz intravenös als Bolus verabreicht, verteilt sie sich ausgehend vom zentralen in die peripheren

Kompartimente. Die anschließende Elimination der Substanz erfolgt stets aus dem zentralen Kompartiment, die Substanz muss also zunächst aus dem peripheren in das zentrale Kompartiment zurückgelangen, um anschließend ausgeschieden zu werden.

Zur Beschreibung des Verhaltens der Substanz im Körper gibt es eine Reihe pharmakokinetischer Parameter, die durch zeitlich aufeinanderfolgende Bestimmungen von Plasmakonzentrationen einer Substanz ermittelt werden können.

Ein wichtiger Parameter ist das Verteilungsvolumen (V_D) einer Substanz im Körper. Nach Applikation einer definierten Dosis D einer Substanz wird diese nach Aufnahme in die Blutbahn in verschiedenen Räumen des Körpers verteilt. Dabei wird angenommen, dass sich die Substanz vollständig und homolog im Körper verteilt. V_D ist ein fiktives Volumen, das sich aus dem Quotienten der verabreichten Dosis D einer Substanz und der resultierenden Konzentration im Blut errechnet. Es gilt:

$$V_D = \frac{\text{Gesamtmenge der applizierten Substanz (g)}}{\text{Plasmakonzentration der Substanz (g/l)}}$$

Es werden zwei Verteilungsvolumina unterschieden: das zentrale Verteilungsvolumen V_C stellt die Verteilung der Substanz nach Aufnahme in den Körper dar, während das Volumen im *steady state* $V_{D_{SS}}$ das Volumen nach der Verteilung im Körper in die Kompartimente darstellt. In den meisten Fällen wird das $V_{D_{SS}}$ angegeben, da es unabhängig von Verteilungs- und Eliminationsprozessen für eine intravenös verabreichte Substanz berechnet werden kann. $V_{D_{SS}}$ kann aus der mittleren Verweildauer einer Substanz Mean resident time (MRT) und der Clearance (CL) (s. unten) errechnet werden:

$$V_{D_{SS}} = CL * MRT$$

Eine weitere wichtige Kenngröße in der Pharmakokinetik ist die HWZ, welche die Verweildauer einer Substanz im Körper beschreibt. Sie gibt an, wie lange es dauert, bis die Plasmakonzentration einer Substanz auf die Hälfte der maximalen Konzentration gesunken ist. In der Regel wird die sogenannte terminale HWZ angegeben. Die HWZ ist abhängig von der Clearance und dem Verteilungsvolumen. Liegen beispielsweise eine hohe Clearance und ein vermindertes Verteilungsvolumen vor, hat die Substanz eine kurze HWZ. Die Berechnung erfolgt durch die folgende Formel:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2 \times V_D}{CL}$$

Unter dem Begriff Clearance (CL) versteht man die Fähigkeit des Körpers, eine Substanz auszuscheiden. Definiert ist die Clearance als Plasmavolumen, das pro Zeiteinheit von einer bestimmten Substanz befreit wird. Es wird in der Einheit ml/min angegeben und wird errechnet aus dem Quotienten der Konzentration einer ausgeschiedenen Substanz pro Zeit (DE/Dt) und der Konzentration der Substanz C im Plasma:

$$CL = \frac{DE}{Dt} / C$$

Die Clearance steht in engem Zusammenhang mit der Gesamtfläche unter einer Kurve (AUC, *area under the curve*). Wird die Konzentration einer Substanz nach Verabreichung zu mehreren Zeitpunkten gemessen, so kann aus den Daten eine Konzentrations-Zeit-Kurve erstellt werden. Die Konzentration der gemessenen Substanz wird gegen den Zeitpunkt der Abnahme aufgetragen und daraus die AUC berechnet. Die AUC spiegelt also die Menge einer Substanz im zeitlichen Rahmen wider, d. h. sie bringt die gesamte Konzentration einer dem Körper im Laufe der Zeit ausgesetzten Substanz zum Ausdruck. Die AUC kann graphisch unter Zuhilfenahme der Trapezregel berechnet werden. Aus der Fläche unter der Kurve wird ein Trapez gebildet, dessen Flächeninhalt anschließend berechnet wird. Außerdem kann die AUC auch aus dem Quotienten der Dosis und der Clearance errechnet werden:

$$AUC = \frac{D}{CL}$$

Eine weitere Variable der Pharmakokinetik ist die MRT, welche die mittlere Verweildauer einer Substanz im Körper beschreibt. Definiert ist die MRT als die Zeit, in der die Hälfte der Substanz den Körper wieder verlassen hat. Sie stellt damit einen alternativen Parameter zur HWZ dar und ist abhängig von der Darreichungsform der Substanz. Zur Berechnung der MRT wird die AUMC (*Area under the first moment curve*) benötigt. Die erste Momentkurve ist die Darstellung des Produkts aus Zeit und Konzentration aufgetragen gegen die Zeit. Die MRT wird als Quotient der AUMC und der AUC berechnet:

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC}$$

2.2.7 Datenanalyse

Die Berechnung der Eliminationskinetik erfolgte unter Zuhilfenahme der *PKSolver*-Software, angewandt auf die Gerinnungsparameter TAT, PAP, D-Dimere und F1+2 (Zhang et al., 2010). Als Grundlage der Berechnung dienten die aus dem Blutplasma ermittelten Konzentrationsspiegel, und zwar vor, während und nach der autologen Serumtransfusion. Anhand der Datensätze wurde zunächst überprüft, welches der Kompartiment-Modelle (vgl. Abschnitt 2.2.6) zur Auswertung der Ergebnisse am besten geeignet ist. Anschließend wurden auf Grundlage der Messdaten für jeden dieser Parameter das Verteilungsvolumen, die terminale HWZ, die CLR, die AUC und die MRT errechnet.

2.2.8 Statistische Methoden

Die Auswertung der errechneten Daten erfolgte nach den gängigen Methoden der Statistik mit Hilfe von Excel 2010. Die deskriptive Statistik besteht aus dem Median und dem Interquartilbereich (IQR).

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung einer Serumpräparation mit Biomarkern der Gerinnungsbildung und Fibrinolyse

Grundsätzliche Überlegung:

Da Vollblut außerhalb des Körpers gerinnt, wird es zur Analyse in der Routine-Diagnostik durch die Zugabe von Natriumcitrat und dem daraus folgenden Entzug freier Calciumionen ungerinnbar gemacht. Wird Vollblut zentrifugiert, trennt sich das Blutplasma als flüssiger Anteil von den zellulären Bestandteilen. Blutplasma beinhaltet folglich alle Bestandteile vor Ablauf der Gerinnung wie Fibrinogen und viele weitere Gerinnungsfaktoren. Ohne die Zugabe von gerinnungshemmenden Substanzen zu einer Vollblutspende wird die Gerinnungskaskade nach Blutentnahme *in vitro* unter Verbrauch von zahlreichen Gerinnungsfaktoren aktiviert. Die Schlüsselreaktion ist die Bildung von Thrombin durch limitierte Proteolyse mit der anschließenden Spaltung von wasserlöslichem Fibrinogen in Fibrin, welches als feste und klebrige Substanz das Grundgerüst der Gerinnungsbildung darstellt. Bei der Spaltung von Thrombin aus Prothrombin entsteht F1+2. Freies Thrombin kommt im Blut praktisch nicht vor, da es unmittelbar nach Aktivierung im TAT-Komplex gebunden wird. Durch Zentrifugation des Vollblutes mit dem enthaltenen Gerinnsel wird der flüssige Überstand, jetzt als Serum bezeichnet von den zellulären Bestandteilen getrennt. Nach Ablauf der Gerinnungsbildung liegen im Serum folglich die Biomarker F1+2 und TAT vor. Die Fibrinolyse wird in einer geronnenen Vollblutspende nicht spontan aktiviert. Versetzt man die entnommene Vollblutspende aber mit einem rekombinanten tPA, so wird die Auflösung des Gerinnsels künstlich erzeugt, indem Plasminogen proteolytisch zu Plasmin gespalten wird. Plasmin spaltet das aus Fibrin bestehende Grundgerüst des Gerinnsels in die wasserlösliche Degradationsprodukte (D-Dimer). Freies Plasmin in der Probe wird schlagartig im PAP-Komplex gebunden und inaktiviert. Im Serum werden im Rahmen dieses Prozesses also auch die Biomarker D-Dimere und PAP gebildet.

Umsetzung der Überlegung:

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Herstellung einer Serumpräparation in mehreren Schritten ein Testsystem entwickelt, in dem einerseits die ausgewählten Biomarker der Gerinnungsbildung und der Fibrinolyse in einer physiologischen Matrix in ausreichenden

Mengen produziert wurden. Andererseits wurde nach autologer Reinfusion der Serumpräparation die Eliminationskinetik dieser Biomarker *in vivo* bestimmt. Dazu wurden in Vorversuchen die Umsetzung des Vorhabens getestet. Zunächst wurde eine geeignete tPA-Dosis ermittelt, die zur Erzeugung von u. a. hohen Konzentrationen an D-Dimeren als Biomarker der Fibrinolyse notwendig ist. Die Menge von 20 µg/ml Actilyse® in einer Vollblutspende von 250 ml erwies sich hierfür als ausreichend.

Da die Reinfusion der Serumpräparation zu einer intravasalen Verdünnung führt, bestand ein zweiter Vorversuch in der Erstellung von Verdünnungsreihen, um *in vitro* die *in vivo* Situation möglichst genau widerzuspiegeln. Idealerweise sollten auch nach dem Verdünnen hohe Konzentrationen an Biomarkern in der Serumpräparation vorliegen, damit eine Eliminationskinetik berechnet werden kann. Dazu wurde die Serumpräparation 1:50 und 1:100 mit Poolplasma verdünnt und die Konzentrationen der ausgewählten Biomarker erneut ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 13 dargestellt.

Tab. 13: Konzentration der Hämostaseparameter in der Serumpräparation der Vorversuche
250 ml Vollblut wurde in einen mit Actilyse® befüllten Blutentnahmebeutel gegeben. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde durch Zentrifugation Serum aus dem Präparat gewonnen.

Parameter	Referenzwert	Verdünnung		
		unverdünnt	1:50	1:100
D-dimer [mg/l]	< 0.5	338,0 ± 23,9	4,8 ± 2,2	2,9 ± 1,5
F1+2 [nmol/l]	≤ 0.34	1.054,0 ± 65,9	19,8 ± 3,1	11,0 ± 4,3
TAT [ng/ml]	0,1 - 3,9	154.098 ± 30.106	2.283 ± 917	1.340 ± 424
PAP [ng/ml]	163 - 606	303.703 ± 26.720	5.298 ± 592	2.996 ± 223
t-PA [ng/ml]	≤ 10	38.670 ± 976	638 ± 159	310 ± 51

Die Ergebnisse der Vorversuche zeigen, dass die Umsetzung des Vorhabens erfolgreich war: in der Vollblutspende wurden nach Abnahme die Biomarker der Gerinnelbildung wie TAT und F1+2 in großen Mengen produziert. Zudem wurden durch Zugabe von Actilyse® zu der Vollblutprobe große Mengen an D-Dimeren und PAP als Biomarker der Fibrinolyse gebildet. Auch nach Verdünnungen der Serumpräparation in Poolplasma (1:50 und 1:100) sind noch erhöhte Konzentrationen aller Biomarker vorhanden.

3.2 Patientenkollektiv

Wie bereits in Absatz 2.1.7 erläutert, stimmten 17 Probanden nach ausführlicher Aufklärung schriftlich der Teilnahme an der Studie zu, von denen 15 die Studie erfolgreich und ohne Komplikationen abschlossen. Ein Überblick über die Probandencharakteristika ist in 4 zusammengefasst.

Tab. 14: Probandencharakteristika

Studienkollektiv	Ergebnis
Probanden	5 Männer, 10 Frauen
Durchschnittsalter	29 (23 - 53) Jahre
BMI	22,5 (19,6 - 27,5)
Körpergewicht	68 (53 - 92) kg
kalkuliertes Plasmavolumen	2.980 (2.516 – 3.754) ml

3.3 Hämostaseparameter in der Serumpräparation der Probanden

Nach erfolgreicher Herstellung wurden die Konzentrationen der Biomarker, sowie weitere Hämostaseparameter der Serumpräparation laboranalytisch bestimmt. Dafür verwendet wurden die während des Herstellungsprozesses aus der Serumpräparation entnommenen Aliquots. Die Ergebnisse sind in Tab. 15 aufgelistet. Die gemessenen Werte sind als Median und Interquartilbereiche IQR (interquartile range) angegeben.

Tab. 15: Hämostaseparameter in der Serumpräparation der Probanden nach Kryokonservierung

Als Probandenzahl für FVIIa gilt n = 11, für alle weiteren Parameter n = 15. Die Werte sind angegeben als Median gefolgt von den jeweiligen Interquartilbereichen als Streuungsmaß in Klammern.

Parameter	Referenz (Menge im Plasma)	Median (Interquartilbereich)
D-dimer [mg/l]	< 0.5	692 (497 - 1.311)
F1+2 [nmol/l]	< 0,34	881 (610 - 1.056)
TAT [ng/ml]	0,1 - 3,9	147.330 (122.590 - 170.905)
PAP [ng/ml]	163 - 606	317.036 (232.624 - 480.081)
Thrombin [ng/ml]	nicht nachweisbar	5,68 (4,61 - 8,22)
FVIIa [ng/ml]	0,03 – 1,06	11,21 (9,37 - 12,04)
t-PA [ng/ml]	< 10	38.920 (32.055 - 41.995)
PAI [ng/ml]	4 - 43	456 (270 - 516)
Fibrinogen [mg/ml]	1,80 - 3,55	nicht nachweisbar
Antithrombin [%]	85 - 120	64,5 (55,1 - 67,8)
Plasminogen [%]	82 - 150	32,2 (28,8 - 43,8)
α_2 -Antiplasmin [%]	90 - 110	nicht nachweisbar

Die Konzentrations- und Aktivitätsspiegel zeigen, dass es in der Vollblutspende, aus der die Serumpräparation hergestellt wurde, bei allen Probanden zur Aktivierung und zum Verbrauch von Gerinnungsfaktoren gekommen war. Die Aktivierung der Gerinnungskaskade lässt sich insbesondere aus den Konzentrationen von F1+2, TAT, Thrombin, FVIIa und Fibrinogen erschließen. FVIIa entsteht im Rahmen der Aktivierung der Gerinnungsbildung durch Komplexbildung mit TF. Seine Konzentration in der Serumpräparation war folglich im Median auf 11,21 ng/ml angestiegen. Nach Aktivierung der Gerinnungsbildung entsteht durch proteolytische Spaltung Thrombin aus Prothrombin, dabei entsteht der Biomarker F1+2. Deren Konzentration in der Serumpräparation war folglich ebenfalls angestiegen und zeigte im Median eine Konzentration von 881 nmol/l. Thrombin war in der Serumpräparation nur noch in minimaler Konzentration nachweisbar, da es unmittelbar nach seiner Bildung durch Bindung im TAT-Komplex inaktiviert wurde. Im Median zeigte sich eine Konzentration von 5,68 ng/ml. Die Konzentration des TAT-Komplexes hingegen stieg im Median auf 147.330 ng/ml deutlich an. Infolge der

Thrombinbildung ist das Fibrinogen vollständig umgewandelt worden und ist in der Probe laboranalytisch nicht mehr nachweisbar. Die Zugabe von tPA zur Vollblutspende erzielte in der Serumpräparation eine Konzentration der D-Dimere von 692 mg/l im Median. tPA war in der Serumpräparation im Median mit einer Konzentration von 38.920 ng/ml nachweisbar. Da durch tPA in der Vollblutspende das vorhandene Plasminogen zu Plasmin aktiviert wurde, war der Aktivitätsspiegel von Plasminogen in der Serumpräparation im Median auf 32,2 % gesunken. tPA wurde in der Vollblutspende durch seinen Inhibitor PAI gebunden und zeigte in der Serumpräparation einen Anstieg der Konzentration im Median auf 456 ng/ml. Auch α_2 AP wurde im Rahmen der Fibrinolyse zur Inaktivierung des freien Plasmins durch Bindung im PAP-Komplex verbraucht. Seine Aktivität im Serum war nicht mehr nachweisbar. Die Konzentration des PAP-Komplexes stieg somit an und ergab im Median in der Serumpräparation einen Anstieg auf 317.036 ng/ml.

3.4 Einfluss der autologen Serumtransfusion auf die Plasmaspiegel verschiedener Hämostaseparameter

Nach erfolgreicher Herstellung der Serumpräparation wurde die autologe Serumtransfusion unter Aufzeichnung der Vitalparameter wie Sauerstoffsättigung, EKG und Blutdruckmessung durchgeführt. Zur Bestimmung des Ausgangswerts zum Zeitpunkt $t = 0$ min erfolgte vor Beginn der Transfusion die erste Blutentnahme. Anschließend wurden 50 ml der Serumpräparation über 30 min mit einer Infusionsrate von 100 ml/h intravenös appliziert. Fortlaufend wurden neun Blutentnahmen zu vorgegebenen Zeitpunkten durchgeführt. Alle Probanden haben die Transfusion gut vertragen, Nebenwirkungen traten nicht auf. Mit Hilfe des Ausgangswerts zum Zeitpunkt $t = 0$ min und der Plasmakonzentrationen nach Beendigung der Transfusion zum Zeitpunkt $t = 30$ min konnte der relative Anstieg der Hämostase- und Fibrinolyseparameter im Plasma der Probanden errechnet werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 16 dargestellt.

Tab. 16: Relativer Anstieg der Konzentrations- und Aktivitätsspiegel der Gerinnungs- und Fibrinolyseparameter im Blutplasma nach autologer Serumtransfusion
Die Daten sind angegeben als Median der Probe, als Streuungsmaß ist der Interquartilbereich in Klammern dargestellt. Nn: nicht nachweisbar

Parameter	Ausgangswert	t = 30 min	relativer Anstieg
D-dimer [mg/l]	0,30 (0,22 - 0,48)	13,43 (8,69 - 16,93)	34,2 (24,9 - 78,6)
F1+2 [nmol/l]	0,15 (0,08 - 0,18)	3,70 (2,62 - 5,29)	28,9 (18,3 - 42,0)
TAT [ng/ml]	2,00 (2,00 - 2,19)	393 (317 - 489)	189,6 (131,8 - 244,7)
PAP [ng/ml]	574 (462 - 721)	3.829 (3.627 - 4.046)	7,0 (5,3 - 8,1)
Thrombin [ng/ml]	nn	0,04 (nn - 0,08)	-
FVIIa [ng/ml]	3,35 (2,29 - 3,79)	2,95 (2,15 - 4,05)	1,1 (0,9 - 1,2)
t-PA [ng/ml]	1,96 (1,40 - 2,76)	26,08 (22,55 - 49,48)	17,4 (9,9 - 21,9)
PAI [ng/ml]	8,85 (3,45 - 11,31)	4,51 (4,01 - 10,08)	1,1 (0,8 - 1,3)
Fibrinogen [mg/ml]	2,75 (2,52 - 2,98)	2,55 (2,42 - 2,88)	1,0 (1,0 - 1,0)
Factor II [%]	113 (103 - 129)	109 (101 - 130)	1,0 (0,9 - 1,0)
Factor VII [%]	115 (103 - 131)	103 (101 - 126)	1,0 (1,0 - 1,0)
Factor XI [%]	96 (92 - 100)	97 (89 - 106)	1,0 (1,0 - 1,0)
Antithrombin [%]	100 (95 - 103)	96 (91 - 101)	1,0 (0,9 - 1,0)
Plasminogen [%]	103 (96 - 137)	97 (94 - 126)	0,9 (0,9 - 1,0)
α_2 -Antiplasmin [%]	105 (98 - 115)	98 (89 - 105)	0,9 (0,9 - 0,9)

Die Gerinnungsparameter im Blutplasma aller Probanden lagen vor der autologen Transfusion innerhalb der laborintern vorgegebenen Referenzwerte (s. Tab.15). Zum Zeitpunkt t = 30 min unmittelbar nach Transfusion der Serumpräparation war die Konzentration einiger Biomarker wie erwartet deutlich angestiegen: der Plasmaspiegel der D-Dimere stieg im Median von 0,30 auf 13,43 mg/l, woraus sich ein relativer Anstieg von 34,2 errechnen ließ. Der Plasmaspiegel von F1+2 stieg im Median von 0,18 auf 4,74 nmol/l und zeigte einen relativen Anstieg auf 28,9. Für TAT konnte der größte relative Anstieg mit einem Median von 189,6 errechnet werden, der Plasmaspiegel stieg im Median von 2,00 auf 393 ng/ml. Freies Thrombin im Blutplasma war vor der autologen Transfusion nicht nachweisbar und zeigte auch nach 30 min keinen Anstieg. Der Plasmaspiegel von tPA stieg im Median von 1,96 auf 26,08 ng/ml, woraus sich ein relativer

Anstieg von 17,4 errechnen ließ. PAP zeigte den geringsten relativen Anstieg mit einem Median von 7,0 bei einem Anstieg der Plasmakonzentration von 574 auf 3.829 ng/ml. Für alle weiteren Gerinnungsparameter ergab sich, wie erwartet, keine oder nur eine minimale Veränderung der Plasmaspiegel.

3.5 Pharmakokinetik ausgewählter Aktivierungsmarker nach autologer Serumtransfusion
Um die Eliminationskinetik einer Substanz nach intravenöser Applikation besser verstehen zu können, bedient man sich verschiedener Modellvorstellungen, die die Wechselwirkungen eines Systems in seiner Gesamtheit betrachten. Dazu werden Plasmakonzentrationen gegen die Zeit graphisch dargestellt und anhand mathematischer Formeln aus den Momenten der Kurve eine Pharmakokinetik errechnet. Als Grundlage der Konzentrations-Zeit-Kurven wurden in der vorliegenden Arbeit die Konzentrations- und Aktivitätsspiegel aus den Plasmaproben vor, während und nach der Serumtransfusion verwendet. Als Ausgangswert der Kurve wurde die erste Blutentnahme unmittelbar vor der Serumtransfusion verwendet. Nach Beginn der Transfusion erfolgte die nächste Blutentnahme nach 15 min, gefolgt von der Entnahme nach Ende der Transfusion bei $t = 30$ min, sowie zu den Zeitpunkten $t = 60$ min, $t = 180$ min, $t = 450$ min, $t = 24$ h und $t = 48$ h. Die folgenden Konzentrations-Zeit-Kurven stellen die Eliminationsphasen der ausgewählten Hämostaseparameter aus dem Blutplasma dar.

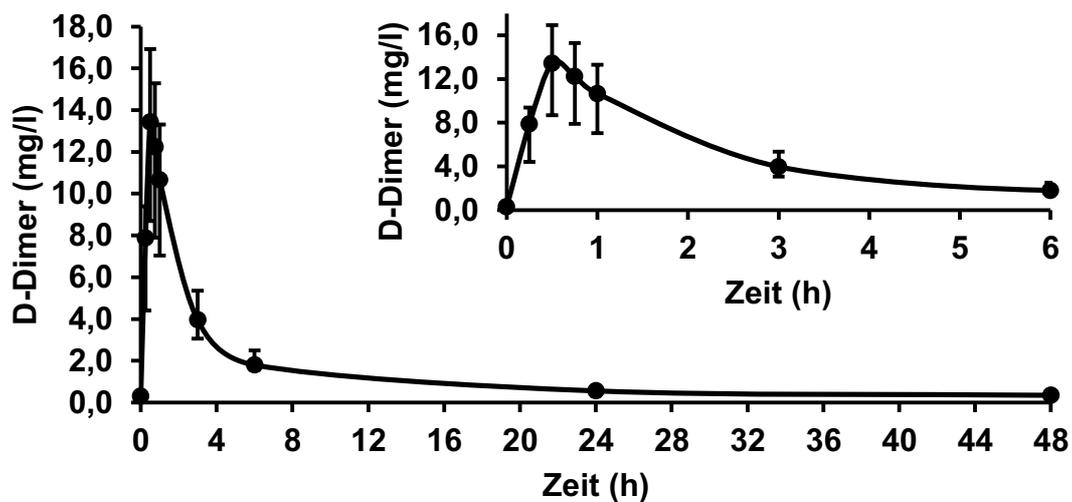


Abb. 11: Konzentrations-Zeit-Kurve der D-Dimere im Blutplasma vor, während und nach der autologen Serumtransfusion über einen Zeitraum von 48 h
Das eingeschobene Diagramm stellt zusätzlich den Verlauf der Konzentration in den ersten 6 Stunden dar. Die Daten sind generiert aus $n = 15$ Probanden und dargestellt als Median, die Fehlerbalken als Interquartilabstand. Die Konzentration der D-Dimere zeigt nach intravenöser Applikation des Serums einen biphasischen Verlauf beginnend unmittelbar mit einem raschen Anstieg in den ersten 30 min und einem langsamen Abfall innerhalb der ersten 6 h.

Der Plasmaspiegel der D-Dimere stieg unmittelbar nach Beginn der autologen Serumtransfusion rasch an und zeigte bei $t = 30$ min seinen Höchstwert mit einem Median von fast 14 mg/l (s. Abb. 11). Anschließend fiel er rasch wieder ab und war nach 6 h nahezu auf den Ausgangswert gesunken. Anhand der Konzentrations-Zeit-Kurve lässt sich ablesen, dass die Plasmakonzentration durch einen biphasischen kinetischen Verlauf charakterisiert ist, der sich in eine schnelle Verteilungsphase und eine langsame Eliminationsphase einteilen lässt.

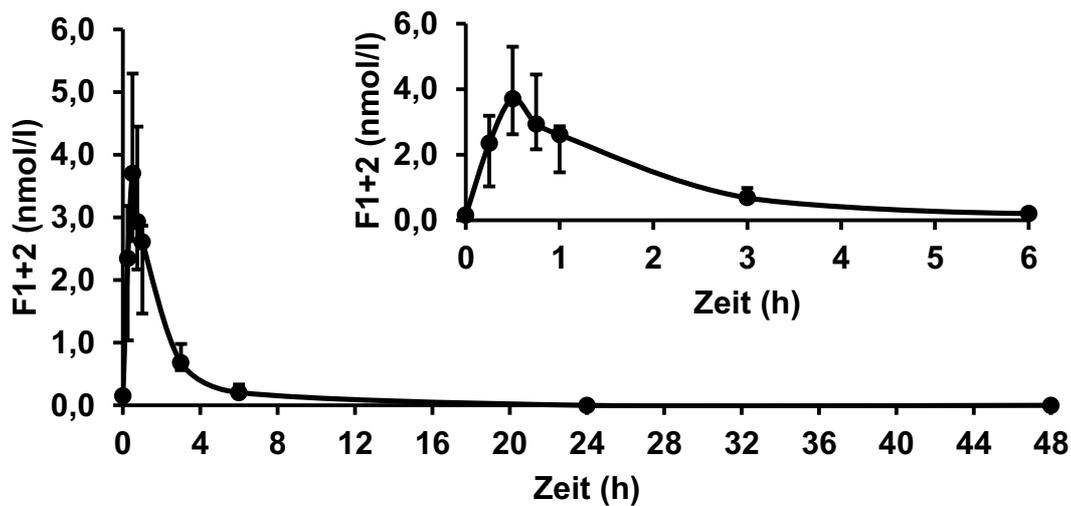


Abb. 12: Konzentrations-Zeit-Kurve von F1+2 im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion

Das eingeschobene Diagramm stellt zusätzlich den Verlauf der Konzentration in den ersten 6 Stunden dar. Die Konzentration von F1+2 zeigt nach intravenöser Applikation des Serums einen biphasischen Verlauf beginnend unmittelbar mit einem raschen Anstieg in den ersten 30 min und einem langsamen Abfall innerhalb von 3 h.

Wie im Fall der D-Dimere zeigte auch der Plasmaspiegel von F1+2 während der autologen Serumtransfusion einen raschen Anstieg (s. Abb. 12). Die höchste Konzentration wurde unmittelbar nach Ende der Transfusion bei $t = 30$ min mit einem Wert von knapp 4 nmol/L gemessen. Anschließend folgte ein stetiger Abfall der Konzentration, bis 24 h nach der Transfusion der Plasmaspiegel wieder annähernd den Ausgangswert erreicht hatte und erneut innerhalb des Referenzbereichs lag. Auch hier zeigte sich ein biphasischer Verlauf mit einer schnellen Verteilungsphase und einer langsamen Eliminationsphase.

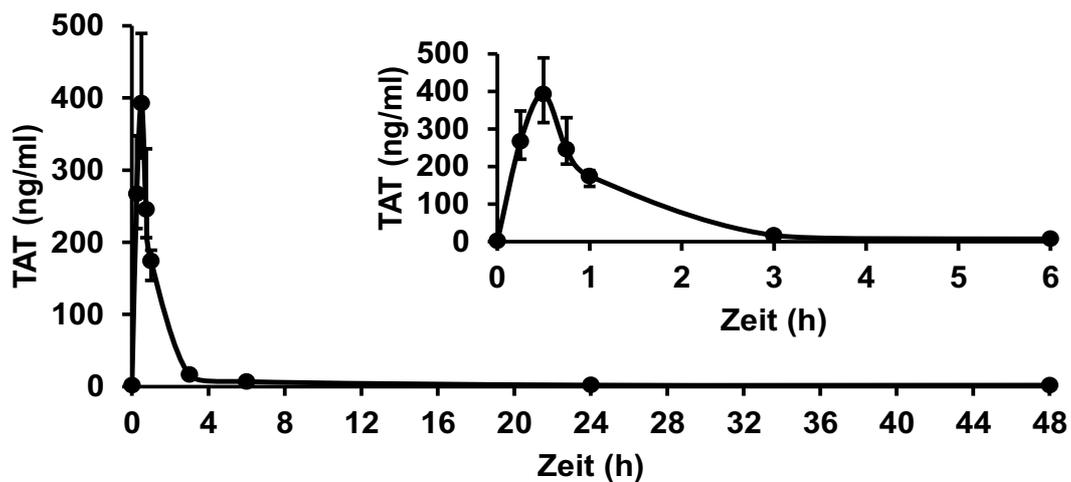


Abb. 13: Konzentrations-Zeit-Kurve von TAT im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion

Das eingeschobene Diagramm stellt zusätzlich den Verlauf der Konzentration in den ersten 6 Stunden dar. Die Konzentration von TAT zeigt nach intravenöser Applikation des Serums einen biphasischen Verlauf beginnend unmittelbar mit einem raschen Anstieg in den ersten 30 min und einem langsamen Abfall innerhalb von 3 h.

Die Konzentrations-Zeit-Kurve zeigt einen steilen Kurvenanstieg des Plasmaspiegels von TAT unmittelbar nach Beginn der Serumtransfusion mit einem Maximalwert zum Ende der Transfusion bei $t = 30$ min von knapp 400 ng/ml (s. Abb. 13). Anschließend kam es zu einer schnellen Elimination, bis ca. 3 h nach der Transfusion die Konzentration des TAT-Komplexes im Plasma wieder dem Ausgangswert entsprach. Auch hier kann die Kinetik als biphasisch beschrieben werden.

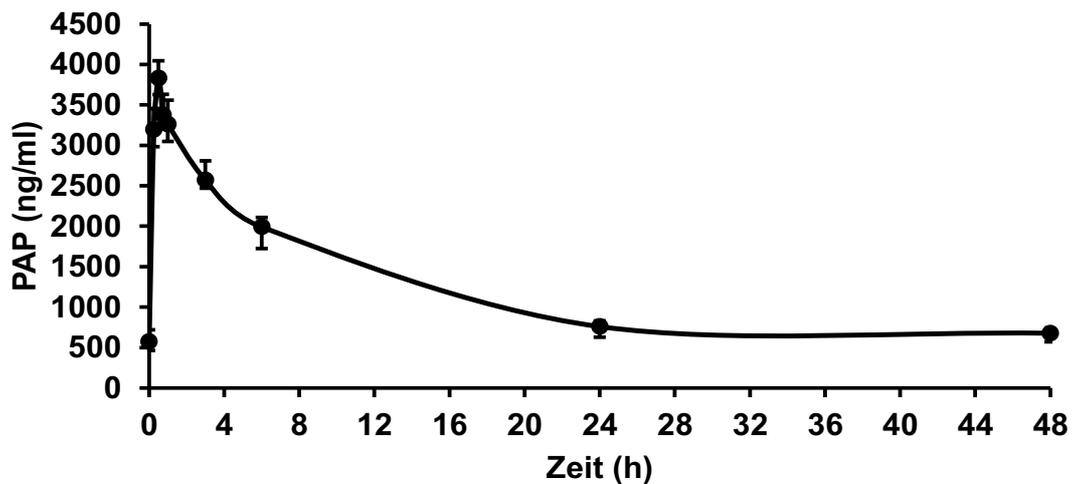


Abb. 14: Konzentrations-Zeit-Kurve von PAP im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion

Die Konzentration von PAP zeigt nach intravenöser Applikation des Serums einen biphasischen Verlauf beginnend unmittelbar mit einem raschen Anstieg in den ersten 30 min und einem langsamen Abfall innerhalb der folgenden 24 h.

Der Konzentrations-Zeit-Kurve von PAP (s. Abb. 14) kann entnommen werden, dass unmittelbar vor der autologen Transfusion die Konzentration von PAP bei knapp über 500 ng/ml lag, was innerhalb des Referenzbereichs war. Im Verlauf der autologen Serumtransfusion stieg die Konzentration auf einen Maximalwert von knapp 4000 ng/ml an und begann unmittelbar nach der Transfusion stetig abzufallen. Nach 24 h lag der Plasmaspiegel wieder im Referenzbereich. Auch hier zeigte sich ein biphasischer Verlauf der Elimination.

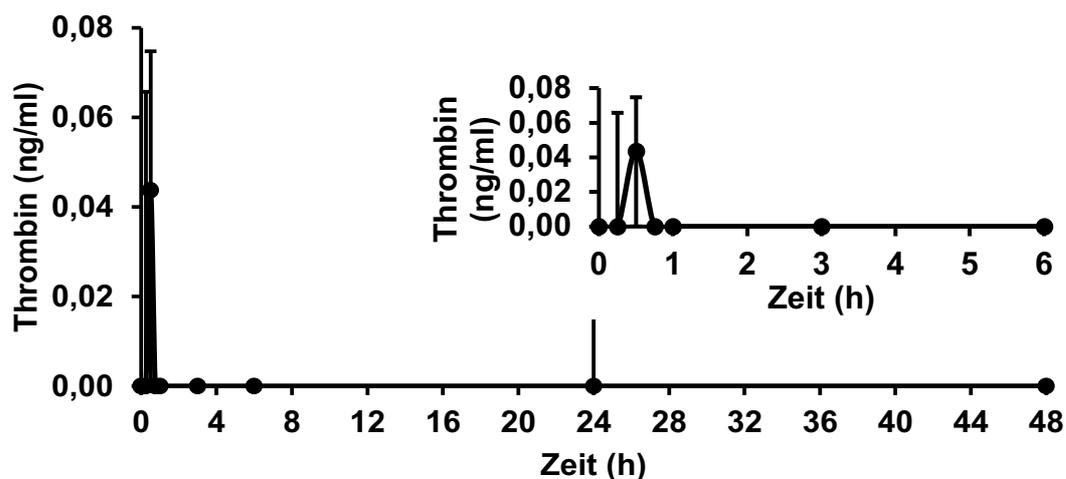


Abb. 15: Konzentrations-Zeit-Kurve von Thrombin im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion
 Das eingeschobene Diagramm stellt zusätzlich den Verlauf der Konzentration in den ersten 6 h dar. Die Konzentration von Thrombin zeigt einen minimalen Anstieg unmittelbar nach Beginn der intravenösen Applikation mit einem schnellen Abfall noch während der ersten 30 min.

Vor der Serumtransfusion konnte Thrombin, bei keinem der Probanden im Blutplasma nachgewiesen werden (s. Abb. 15). Unmittelbar während der Transfusion zeigte sich ein leichter Anstieg bis auf einen Maximalwert von etwa 0,04 ng/ml nach Ende der Transfusion. In weniger als 1 h nach der ersten Messung fiel die Plasmakonzentration stetig, bis schließlich das freie Thrombin im Plasma nicht mehr nachweisbar war. Bei nur einem Probanden zeigte sich punktuell eine leichte erhöhte Konzentration von Thrombin, die sich nach 48 h nicht mehr nachweisen ließ.

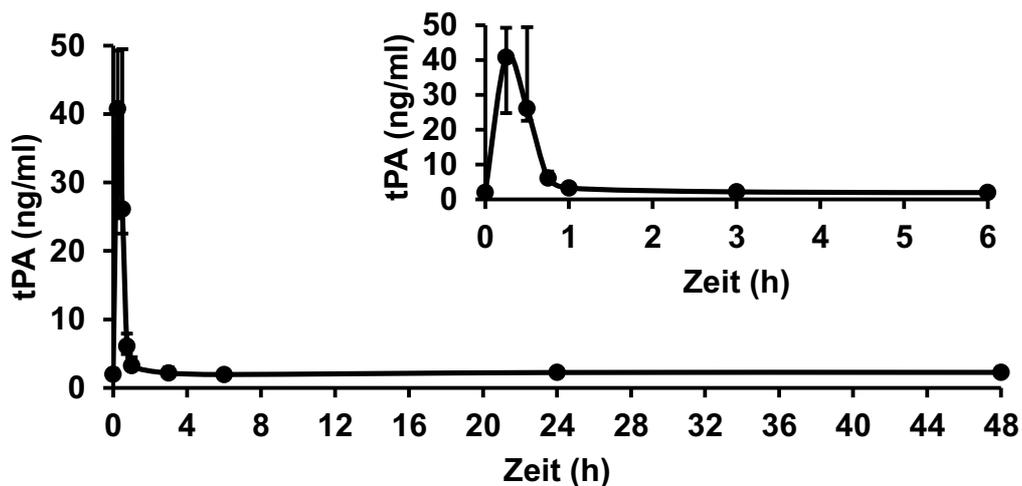


Abb. 16: Konzentrations-Zeit-Kurve von tPA im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion
 Das eingeschobene Diagramm stellt zusätzlich den Verlauf der Konzentration in den ersten 6 h dar. Die Konzentration zeigt unmittelbar nach der intravenösen Applikation des Serums einen biphasischen Verlauf mit einem raschen Anstieg, sowie einen raschen Abfall innerhalb der ersten Stunde.

Die Konzentration des tPAs (s. Abb. 16) unmittelbar vor der Serumtransfusion lag bei allen Probanden innerhalb des Referenzbereichs. Nach Beginn der Transfusion zeigte sich ein Anstieg des tPAs im Blutplasma bis zu einem Maximalwert von ca. 40 ng/ml unmittelbar nach Ende der Transfusion, gefolgt von einem stetigen Abfall des Plasmaspiegels innerhalb der ersten Stunde zurück bis auf das Ausgangsniveau. Im Verlauf der folgenden 48 h lag der Plasmaspiegel des tPAs innerhalb des Referenzbereichs. Auch für die Kinetik des tPAs lag ein biphasischer Verlauf vor.

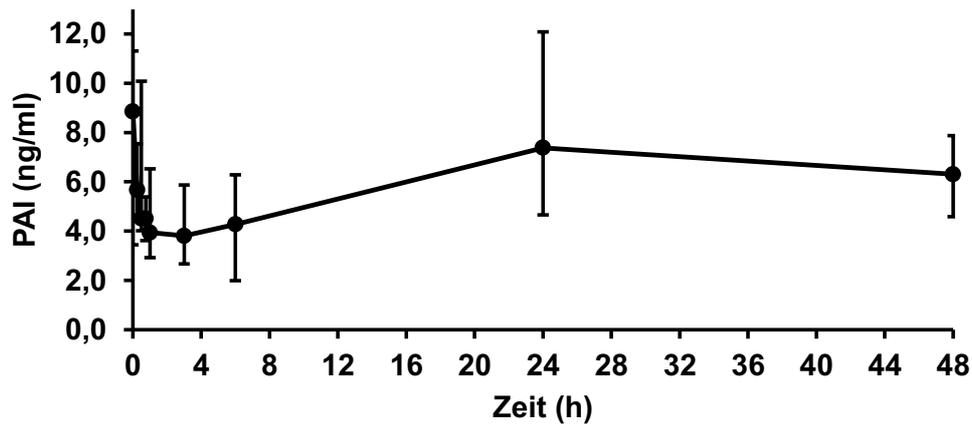


Abb. 17: Konzentrations-Zeit-Kurve von PAI im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion
Die Konzentration von PAI bleibt während und nach der Serumtransfusion im Referenzbereich.

Der Plasmaspiegel von PAI lag bei allen Messungen zwischen 3,5 und 9,0 ng/ml und damit innerhalb des Referenzbereichs (s. Abb. 17). Eine Änderung der Konzentration durch die Serumtransfusion konnte nicht festgestellt werden.

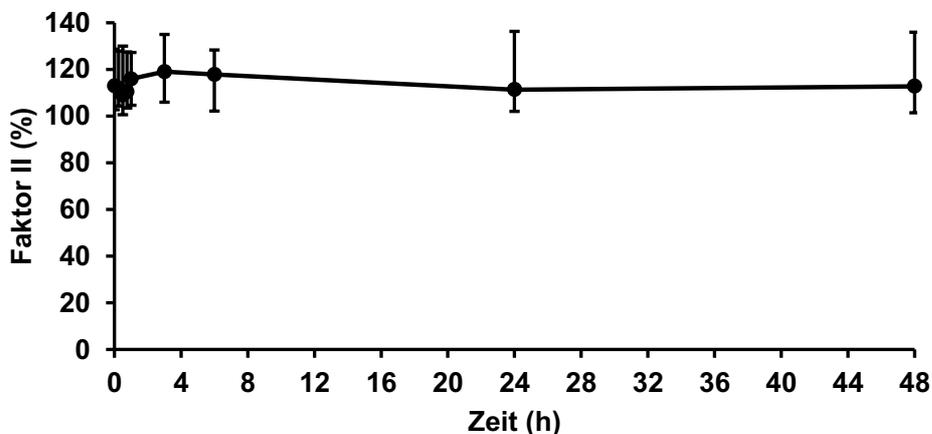


Abb. 18: Konzentrations-Zeit-Kurve von FII im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion
Der Aktivitätsspiegel von FII bleibt während der Serumtransfusion im Referenzbereich.

Die Konzentrations-Zeit-Kurve von FII zeigt, dass der Aktivitätsspiegel von Faktor II bei allen Probanden während aller Messungen konstant zwischen 100 – 120 % lag (s. Abb. 18). Die Serumtransfusion führte folglich nicht zu einer Aktivierung der Hämostase, sodass es zu keinem Verbrauch von Gerinnungsfaktoren kam.

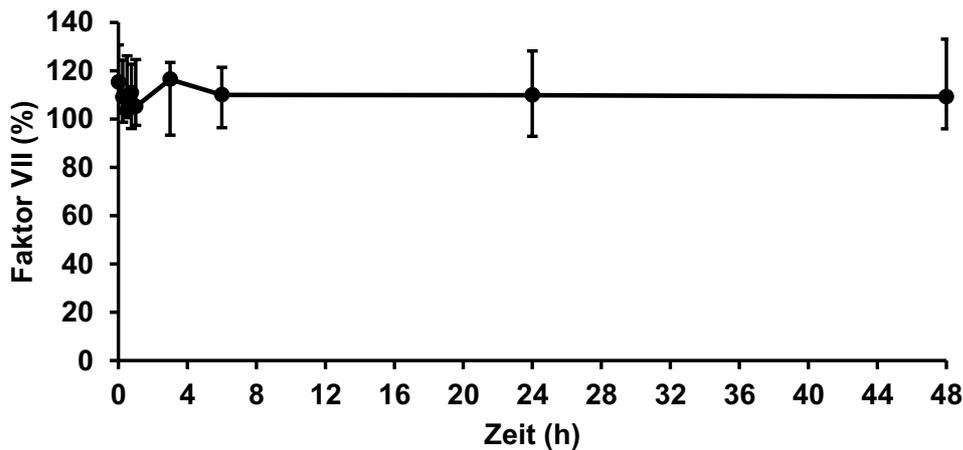


Abb. 19: Konzentrations-Zeit-Kurve von FVII im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion
Der Aktivitätsspiegel bleibt während und nach der Serumtransfusion im Referenzbereich.

Die Konzentrations-Zeit-Kurve von FVII (s. Abb. 19) zeigt, dass der vor und nach der Serumtransfusion gemessene Aktivitätsspiegel von Faktor VII im Blutplasma aller Probanden im Wesentlichen zwischen 100 – 120 % lag. Dieses Ergebnis zeigt ebenfalls, dass es durch die Serumtransfusion nicht zu einer Aktivierung der Gerinnselbildung gekommen ist.

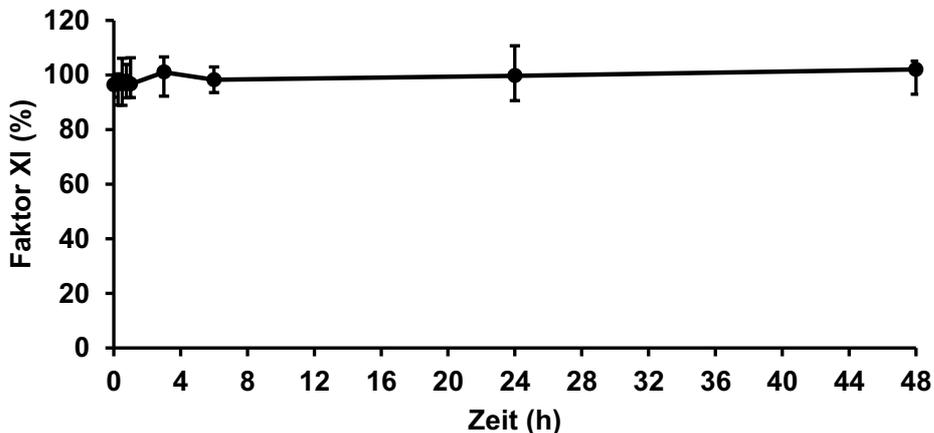


Abb. 20: Konzentrations-Zeit-Kurve von FXI im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion
Der Aktivitätsspiegel von FXI bleibt während der Serumtransfusion im Referenzbereich.

Die Konzentrations-Zeit-Kurve von FXI zeigt im Wesentlichen einen konstanten Verlauf, der Aktivitätsspiegel lag während des gesamten Zeitraums zwischen 90 – 100 % (s. Abb. 20). Ein Einfluss der Serumtransfusion auf den Aktivitätsspiegel von FXI lag nicht vor.

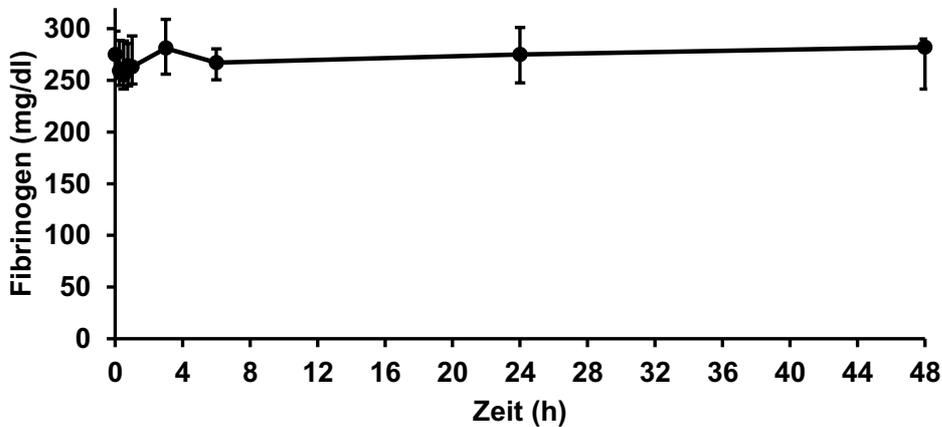


Abb. 21: Konzentrations-Zeit-Kurve von Fibrinogen im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion
Der Fibrinogenspiegel bleibt während und nach der Serumtransfusion im Referenzbereich.

Der Plasmaspiegel von Fibrinogen lag bei allen Probanden vor, während und nach der Serumtransfusion im Wesentlichen konstant zwischen 250 - 300 ng/dl und damit innerhalb der Referenzwerte (s. Abb. 21). Einen Verbrauch von Fibrinogen gab es im Rahmen der Transfusion nicht, da es nicht zur Aktivierung der Gerinnungskaskade kam.

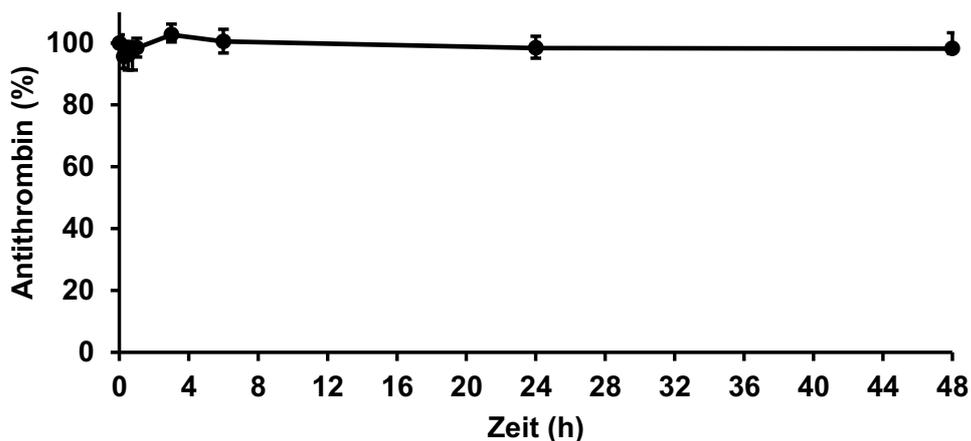


Abb. 22: Konzentrations-Zeit-Kurve von Antithrombin im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion
Der Aktivitätsspiegel von Antithrombin bleibt während und nach der Serumtransfusion im Referenzbereich.

Der Aktivitätsspiegel von AT (s. Abb. 22) lag bei allen Probanden im Wesentlichen konstant bei 90 – 110 %. Eine Änderung durch die Serumtransfusion konnte nicht festgestellt werden. Damit hatte die Serumtransfusion keinen Einfluss auf die Inhibition der Hämostase.

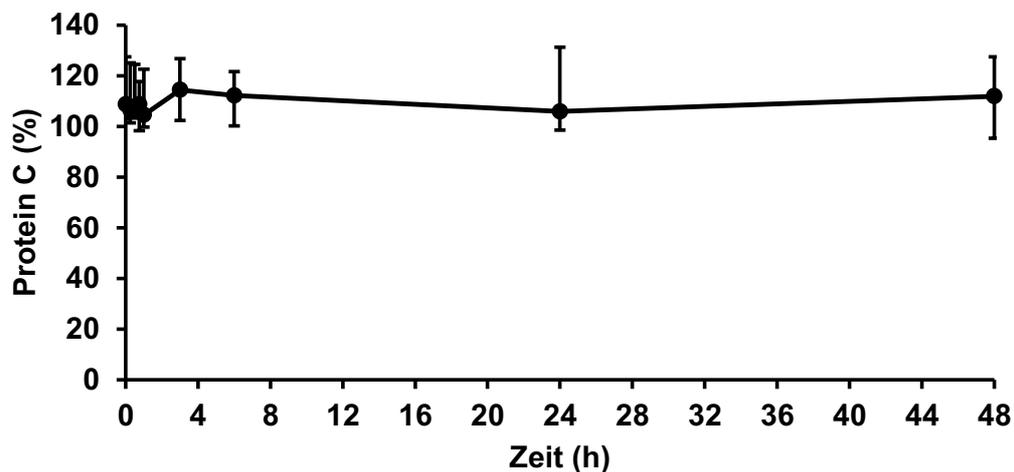


Abb. 23: Konzentrations-Zeit-Kurve von PC im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion
Der Aktivitätsspiegel von PC bleibt während und nach der Serumtransfusion im Referenzbereich.

Die Konzentrations-Zeit-Kurve zeigt, dass der Aktivitätsspiegel von PC während der gesamten Untersuchung im Wesentlichen konstant zwischen 100 – 130 % lag (s. Abb. 23). Eine Änderung durch die Serumtransfusion konnte nicht festgestellt werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Serumtransfusion keinen Einfluss auf die zentralen Inhibitoren des Gerinnungssystems hatte.

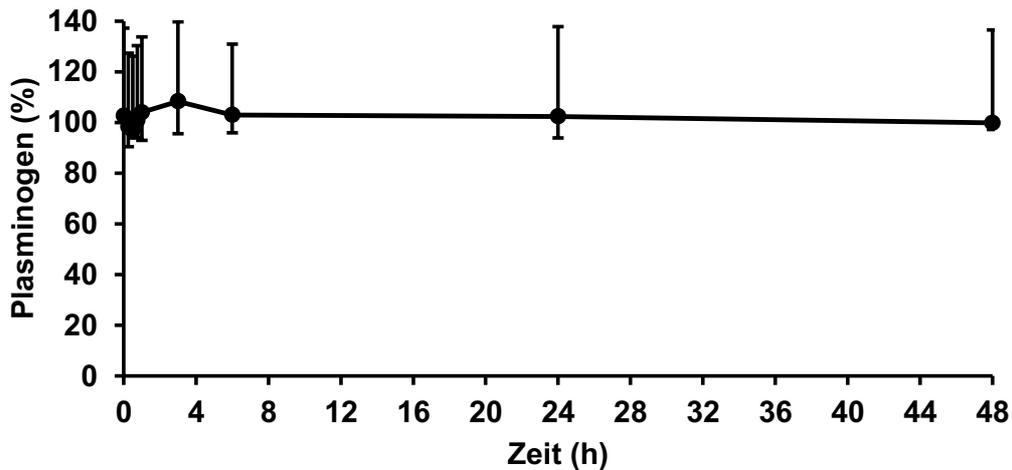


Abb. 24: Konzentrations-Zeit-Kurve von Plasminogen im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion
Der Aktivitätsspiegel von Plasminogen bleibt während und nach der Serumtransfusion im Referenzbereich.

Auch der Aktivitätsspiegel von Plasminogen lag bei allen Messungen im Bereich von 90 – 130 % (s. Abb. 24), was dem Referenzwert entsprach. Dies zeigt ebenfalls, dass die Serumtransfusion zu keiner Aktivierung der Fibrinolyse geführt hatte.

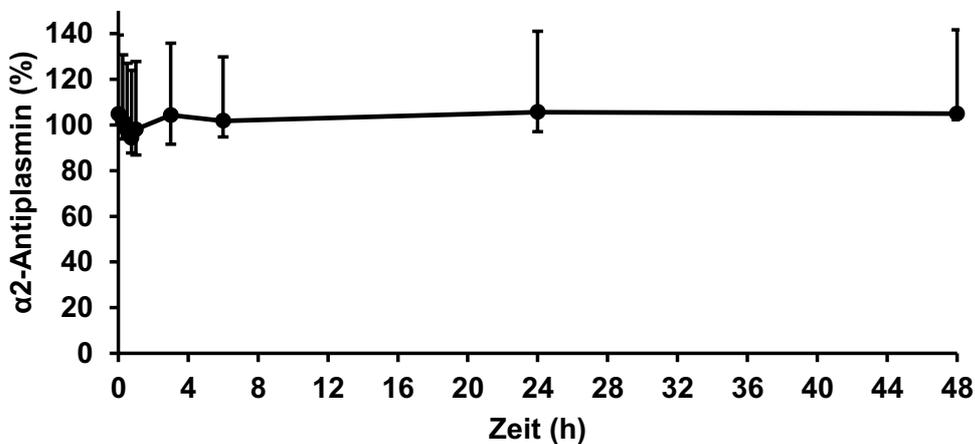


Abb. 25: Konzentrations-Zeit-Kurve von α_2 AP im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion
Der Aktivitätsspiegel von α_2 AP bleibt während und nach der Serumtransfusion im Referenzbereich.

Die Graphik zeigt, dass der Aktivitätsspiegel von α_2 AP bei allen Probanden konstant und innerhalb des Referenzbereichs zwischen 90 – 120 % lag (s. Abb. 25). Eine signifikante

Änderung des Aktivitätsspiegels durch die Serumtransfusion konnte nicht festgestellt werden.

3.6 Eliminationskinetik ausgewählter Aktivierungsmarker

Unter Zuhilfenahme der *PKSolver*-Software erfolgte die Berechnungen der Eliminationskinetiken auf Grundlage der erstellten Konzentrations-Zeit-Kurven (s. Tab. 17). Zur Berechnung der Parameter wurde anhand der Kurven zunächst das passende Kompartiment-Modell ausgewählt: für D-Dimere, F1+2, TAT und PAP eignet sich ein Zwei-Kompartiment-Modell, bei dem angenommen wird, dass sich die Serumpräparation nach intravenöser Gabe rasch mit dem Blut vermischt und sich anschließend im Gewebe verteilt. Die jeweiligen graphischen Darstellungen der Eliminationskinetiken sind in Abb. 11 - 14 dargestellt. Zum besseren Verständnis werden in Tab. 17 zunächst die Daten im Median von n = 15 Probanden aufgelistet und erklärt. Nachfolgend werden in Tab. 18 diese Daten geschlechtsspezifisch differenziert aufgelistet.

Tab. 17: Errechnete Parameter der Eliminationskinetiken nach Anpassung an ein Zwei-Kompartiment-Modell für D-Dimer, F1+2, TAT, und PAP
Die Daten sind als Median und in Klammern angegebenem Interquartilbereich von n = 15 Probanden angegeben. $t_{1/2}$ = Halbwertszeit, AUC = Area under the curve, CLR = Clearance, MRT = median resistance time, V_{Dss} = Volume of distribution at steady state. Die Einheit der AUC ist mg/l·h für D-Dimer, nmol/l·h für F1+2, ng/ml·h für TAT, und für PAP µg/ml·h.

Parameter	D-Dimer	F1+2	TAT	PAP
$t_{1/2}$ [h]	15,8 (13,1 - 23,1)	1,9 (1,3 - 3,6)	0,7 (0,7 - 2,6)	10,8 (8,8 - 11,4)
AUC	58,6 (48,1 - 69,3)	6,6 (4,7 - 7,8)	401,0 (360,6 - 489,7)	37,6 (35,6 - 43,0)
CLR [ml/kg·h]	7,2 (6,4 - 11,9)	64,3 (57,1 - 81,9)	269,7 (200,1 - 308,8)	6,2 (3,8 - 7,1)
MRT [h]	15,4 (13,5 - 19,4)	2,4 (1,9 - 3,7)	0,9 (0,7 - 1,5)	15,2 (12,3 - 16,1)
V_{Dss} [ml/kg]	167,9 (83,4 - 219,5)	272,0 (129,8 - 335,1)	242,5 (180,5 - 294,5)	78,0 (55,6 - 101,7)

Die Abnahme der Plasmaspiegel der Biomarker nach intravenöser Verabreichung lässt sich durch die HWZ quantitativ beschreiben. Die D-Dimere zeigten im Blutplasma im Median eine HWZ von 15,8 h. Die HWZ alleine reicht aber nicht aus, um einen Eliminationsvorgang zu veranschaulichen, da die Rückverteilung aus dem peripheren Kompartiment zurück in das zentrale Kompartiment die Geschwindigkeit des Abbaus beeinflussen kann. Deshalb wurde als weiteres Maß des Eliminationsvorgangs die CLR

hinzugezogen. Sie bezeichnet die Effizienz der Elimination einer Substanz aus dem Körper. Im Falle der D-Dimere ließ sich im Median eine CLR von 7,2 ml/kg*h ermitteln. Eine weitere die Pharmakokinetik beschreibenden Kenngröße ist die AUC. Sie stellt die Fläche unter der Plasmakonzentrationskurve und damit die gesamte Konzentration dar, die dem Körper im Zeitverlauf ausgesetzt wurde. Im Falle der D-Dimere ließ sich im Median ein Wert von 58,6 berechnen. Mit Hilfe des Verteilungsvolumens wurden die scheinbaren Verteilungsvorgänge der Biomarker nach intravenöser Applikation errechnet. Auf Grundlage des hier vorliegenden Zwei-Kompartiment Modells muss das V_{Dss} im *steady state*, d. h. zum Zeitpunkt eines Fließgleichgewichts, bei dem sich das gesamte System im Gleichgewicht befindet, berechnet werden. So wird das Verteilungsvolumen von den Eliminationsprozessen unabhängig gemacht und ermöglicht den Vergleich innerhalb des Probandenkollektivs. Das V_{Dss} wurde im Median mit 167,9 ml/kg für die D-Dimere errechnet. Die MRT fasst die Verweildauer einer Substanz im Körper zusammen und beinhaltet alle kinetischen Vorgänge einschließlich der Absorption und aller Verteilungsprozesse. Die D-Dimere zeigten im Median eine MRT von 15,4 h.

Vergleicht man die Pharmakokinetik der Biomarker untereinander, zeigten die D-Dimere die längste HWZ, gefolgt von PAP mit einem Median von 10,8 h. Die HWZ sowohl von F1+2 mit einem Median von 1,9 h, als auch von TAT mit einem Median von 0,7 h waren deutlich kürzer. Die längste CLR wurde für TAT mit einem Median von 269,7 ml/kg*h, gefolgt von F1+2 mit einem Median von 64,3 ml/kg*h berechnet. Die CLR der D-Dimere und PAP war deutlich geringer, zeigten aber annähernd ähnliche Werte im Median (D-Dimere: 7,2 ml/kg*h; PAP: 6,2 ml/kg*h). Beim Vergleich der AUC lag die größte Fläche unter der Plasmakonzentrationskurve von TAT mit einem Median von 401,0. F1+2 und TAT zeigten das größte V_{Dss} von 272,0 bzw. 242,5 ml/kg, während sich für PAP mit einem Median von 78,0 ml/kg das geringste V_{Dss} errechnen ließ. Die MRT war bei den D-Dimeren und PAP ähnlich und zeigte im Vergleich zu den andern Biomarkern mit einem Median von 15,4 bzw. 15,2 die längsten Verweildauern im Körper.

In der folgenden Tab. 18 werden die bereits diskutierten Daten aus dem vorangegangenen Abschnitt geschlechtsspezifisch differenziert. Bei der Auswertung muss beachtet werden, dass in der vorliegenden Studie das männliche Geschlecht mit einer Probandenanzahl von $n = 5$ Probanden und das weibliche Geschlecht mit einer Probandenanzahl von $n = 10$ vertreten war.

Tab. 18: Geschlechtsspezifische Unterschiede errechnet anhand der Parameter der Eliminationskinetiken für D-Dimer, F1+2, TAT, und PAP

Die Daten sind als Median und in Klammern als Interquartilbereich von n = 15 Probanden, m = männliches Geschlecht mit n = 5 Probanden, f = weibliches Geschlecht mit n = 10 Probanden angegeben. Ausnahme: *f für D-Dimere Probandenanzahl f = 9. $t_{1/2}$ = Halbwertszeit, AUC = Area under the curve, CLR = Clearance, MRT = median residence time, V_{Dss} = Volume of distribution at steady state. Die Einheit der AUC ist mg/l·h für D-Dimer, nmol/l·h für F1+2, ng/ml·h für TAT, und für PAP µg/ml·h.

Parameter	Median (IQR), n = 15 (m = 5; f = 10; *f = 9)			
	D-dimer	F1+2	TAT	PAP
$t_{1/2}$	15,8 (13,1 – 21,1)	2,0 (1,5 – 2,4)	0,74 (0,68 – 2,61)	10,8 (8,8 – 11,4)
m	18,6 (14,5 – 19,2)	2,1 (1,7 – 2,1)	0,72 (0,70 – 2,50)	11,2 (9,5 – 11,6)
*f	14,4 (11,9 – 17,0) (h)	1,6 (1,3 – 2,3) (h)	0,74 (0,67 – 2,73) (h)	9,67 (8,7 – 11,0) (h)
AUC	58,6 (48,1 – 69,3)	8,2 (5,3 – 9,8)	401,0(360,6 – 489,7)	37,6 (35,6 – 43,0)
m	53,9 (46,1 – 58,6)	7,5 (5,3 – 7,9)	341,5(335,0 – 355,4)	33,1 (26,2 – 35,9)
f	61,1 (50,9 – 69,9) (mg/l·h)	8,8 (6,1 – 12,2) (nmol/l·h)	484,9(420,6 – 499,9) (ng/ml·h)	39,3 (37,6 – 44,2) (µg/ml·h)
clearance	7,2 (6,4 – 11,9)	78,2 (62,7 – 102,5)	269,7(200,1 – 308,8)	6,2 (3,8 – 7,1)
m	7,2 (7,1 – 13,2)	71,6 (60,0 – 78,2)	290,5(270,0 – 315,1)	7,5 (6,5 – 28,6)
f	8,1 (6,2 – 10,4) (ml/kg·h)	91,7 (65,8 – 119,5) (ml/kg·h)	228,6(200,0 – 295,7) (ml/kg·h)	5,2 (3,7 – 6,2) (ml/kg·h)
MRT	15,4 (13,5 – 19,4)	2,4 (1,9 – 2,6)	0,9 (0,7 – 1,5)	15,2 (12,3 – 16,1)
m	17,2 (14,2 – 20,2)	2,4 (2,4 – 2,5)	0,9 (0,7 – 1,7)	15,5 (12,3 – 16,4)
f	15,3 (13,2 – 18,2) (h)	2,1 (1,6 – 3,1) (h)	0,9 (0,8 – 1,3) (h)	14,4 (12,5 - 15,8) (h)
V_{Dss}	167,9(83,4 – 219,5)	185,9(129,1 – 311,2)	242,5(180,5 – 294,5)	78,0 (55,6 – 101,7)
m	194,9(122,4 - 235)	185,9(120,3 – 190,1)	228,6(181,1 – 256,3)	111,4(92,0 – 291,3)
f	152,5(80,1 – 212,5) (ml/kg)	214,4(141,1 – 393,9) (ml/kg)	257,5(186,7 – 300,7) (ml/kg)	69,2 (55,2 – 81,8) (ml/kg)

Beim Vergleich der Eliminationskinetik zwischen Männern und Frauen zeigen sich im Falle der D-Dimere die größte Abweichung: bei den männlichen Probanden lag die HWZ im Median bei 18,6 (14,5 – 19,2) h, während für Frauen im Median eine HWZ von 14,4 (11,9 – 17,0) h errechnet wurde. In beiden Fällen muss die relativ große Spannweite innerhalb der Geschlechter beachtet werden. AUC, MRT, CLR und V_{Dss} zeigen im Falle

der D-Dimere in Bezug auf den geschlechtsspezifischen Unterschied keine großen Schwankungen. Auch für F1+2 unterscheidet sich die HWZ geschlechtsspezifisch: im Median lag die HWZ in der männlichen Probandengruppe bei 2,1 h (1,5 – 2,4), während für die weibliche Probandengruppe im Median eine HWZ von 1,6 (1,3 – 2,4) h errechnet wurde. Darüber hinaus wurden für die CLR abweichende Werte ermittelt: bei den männlichen Probanden lag sie für F1+2 im Median bei 71,6 (60 – 78,2) ml/kg*h, während sie in der weiblichen Probandengruppe mit im Median 91,7 (65,8 – 119,5) ml/kg*h höher war. Ebenfalls weist das V_{DSS} für F1+2 einen geschlechtsspezifischen Unterschied auf: bei den männlichen Probanden war es mit im Median von 185,9 (120,3 – 190,1) ml/kg größer als bei den weiblichen Probanden mit einem Median von 214,4 (141,1 – 393,9) ml/kg. Bei der Eliminationskinetik von PAP weist nur das V_{DSS} einen größeren Unterschied auf: für die männlichen Probanden wurde es mit 111,4 (92, - 291,3) ml/kg berechnet, während für die weiblichen Probandengruppe ein deutlich geringeres V_{DSS} mit im Median 69,2 (55,1 – 81,8) ml/kg errechnet wurde. Bei allen weiteren Parametern zeigten sich keine großen Schwankungen.

4. Diskussion

4.1 Problematik der bisher etablierten Gerinnungsuntersuchungen zur Feststellung von thrombophilen Risikofaktoren

Zur Identifizierung von Risikofaktoren, die zum Entstehen eines thrombophilen Ereignisses beitragen, werden in der hämostaseologischen Routinediagnostik eine Reihe an laborchemischen Methoden verwendet. Beispiele solcher standardisierten Methoden sind die molekulargenetische Bestimmung der FVL-Mutation oder die Bestimmung der Plasmaspiegel zur Feststellung eines qualitativen oder quantitativen Mangels an Gerinnungsparametern. Darüber hinaus können Aktivierungsmarker zur Beurteilung eines hyperkoagulablen Zustands der Gerinnung herangezogen werden. Diese Aktivierungsmarker sind Substrate, Enzymkomplexe und Inhibitoren der Hämostase wie beispielsweise D-Dimere, F1+2, TAT und PAP. Die häufigsten verwendeten Aktivierungsmarker sind die D-Dimere, die in erster Linie sowohl zum Ausschluss einer VTE als auch zur Bestimmung einer Verbrauchskoagulopathie herangezogen werden (Taylor et al., 2001). Erhöhte D-Dimere zeigen sich aber auch im Rahmen anderer Erkrankungen, wie etwa bei Patienten mit Vorhofflimmern (Lip et al., 1996). Die Aussagekraft der D-Dimere ist ohne einen klinischen Kontext nur gering, sodass deren häufige Routinebestimmung wie etwa in der Notfallaufnahme zu unnötiger Diagnostik führt. Eine weitere Problematik der bisher verwendeten Tests besteht zudem darin, dass meist nur einzelne Komponenten der Hämostase erfasst werden, von denen nicht auf den gesamten Aktivitätszustand der Gerinnung geschlossen werden kann. Der Einsatz vieler Aktivierungsmarker der Hämostase in der Routinediagnostik ist auch bisher nicht standardisiert, da unter anderem kaum Arbeiten über deren *in vivo* Verhalten vorliegen. Ein Grund für die mangelnde Datenlage ist u.a. sowohl die Schwierigkeit der Analyse der sich gleichzeitig während der Hämostase bildenden und auflösenden Biomarker, als auch deren richtige Einordnung in Zusammenhang mit dem klinischen Kontext.

Wünschenswert wäre es, anhand der Plasmaspiegel von Biomarkern eine verminderte oder erhöhte Gerinnbarkeit des Blutes vorzeitig zu erkennen und dadurch bereits vor der Manifestation eines thromboembolischen Ereignisses geeignete therapeutische Maßnahmen zu ergreifen. Sollen aber die Plasmaspiegel solcher Biomarker zur Beurteilung und Entscheidung beispielsweise über die Einleitung einer Antikoagulation

herangezogen werden, ist es zunächst notwendig, deren Verhaltensweisen und Interaktionen im menschlichen Körper in ihrer Gesamtheit zu kennen. Außerdem sind die Kenntnis über deren Eliminationskinetik, charakterisiert u. a. durch die HWZ, die Clearance und das Verteilungsvolumen, ein unverzichtbares Hilfsmittel, um deren Konzentration zum Zeitpunkt einer Blutentnahme richtig einschätzen zu können.

4.2 Aktivierung der Hämostase *in vitro*

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete experimentelle System erlaubt die Herstellung von Stoffwechselprodukten der Hämostase *in vitro* innerhalb einer physiologischen Matrix. In dem hier verwendeten System wurde nach Abnahme der Vollblutspende die Hämostase im Serumbeutel durch Gerinnen des Blutes auf physiologische Weise aktiviert. Im Rahmen der Gerinnungsbildung wurden sowohl durch die Spaltung von Prothrombin zu Thrombin F1+2, als auch durch die Bildung von Thrombin der TAT-Komplexes produziert. Das vor Abnahme der Vollblutspende hinzugegebene tPA führte zur künstlichen Aktivierung der Fibrinolyse, sodass durch Auflösung der quervernetzten Fibrinolyseprodukte des Gerinnsels im Serumbeutel sowohl D-Dimere, als auch PAP produziert wurde. Nach abgelaufener Hämostase und Zentrifugation wurden die flüssigen Bestandteile von den festen Bestandteilen getrennt, um eine reine Serumpräparation zu gewinnen. Dieses entwickelte Testsystem erlaubt die gleichzeitige Beurteilung der auch auf physiologische Weise intravasal gleichzeitig ablaufenden Prozesse der Gerinnungsbildung und -auflösung. Bei allen Probanden war die Aktivierung der Gerinnung im Serumbeutel erfolgreich – die Serumpräparationen enthielten die Hämostaseparameter D-Dimere, F1+2, PAP und TAT, deren Konzentration 500 - 7.000-fach höher waren als bei intravasal ablaufender Hämostase (s.Tab.15). Durch den Verbrauch von Gerinnungsfaktoren im Rahmen der Fibrinbildung konnte in der Serumpräparation wie erwartet weder Fibrinogen noch α_2 AP nachgewiesen werden. Zudem spiegeln sowohl die Konzentration von Thrombin im Median von 5,68 ng/ml, als auch der Anstieg von FVIIa auf einen Median von 11,25 ng/ml die Serumbildung wider.

4.3 Einfluss der Serumtransfusion auf die Gerinnung *in vivo*

Vor Beginn der autologen Serumtransfusion musste zunächst sichergestellt werden, dass die enthaltenen Faktoren der Serumpräparation keine Auswirkungen auf die intravasale

Koagulation des Blutes haben. Bereits vor vielen Jahren wurde herausgefunden, dass die Infusion von Serum in die Blutbahn keinerlei Effekt auf das Gerinnungssystem hat (Egeberg, 1962). In dieser Studie wurde freiwilligen Probanden 270 ml Serum über einen Zeitraum von 40 min in die Blutbahn infundiert, wobei sich kein Effekt auf das Gerinnungssystem nachweisen ließ. Allerdings zeigten andere wissenschaftliche Arbeiten im Tiermodell, dass die Infusion von Serum zu einem prothrombogenen Effekt führt: Wessler wies 1955 nach Infusion von Serum in die abgeklemmte Vena jugularis eines Hundes intravasal einen vorübergehenden hyperkoagulablen Zustand nach. Einerseits wurde der thrombogene Effekt dem Vorhandensein von aktivem Thrombin im Serum zugeschrieben. Andererseits wurde bereits in dieser Arbeit beschrieben, dass bei der Entstehung von Thromben zudem sowohl eine vorangegangene Schädigung des Endothels, als auch die Stase des Blutes eine entscheidende Rolle spielte. In der hier vorliegenden Arbeit wurde u. a. aus diesem Grund die Konzentration an Thrombin in den Serumpräparationen gemessen. Sie zeigte im Median einen Wert von 5,68 ng/ml (s.Tab.15). Siller-Matula et al. führten 2011 eine Studie im Tiermodell zum *in vivo* Effekt von Thrombin durch, bei dem sich weder durch die langsame Infusion von Thrombin bei konstanter Rate (bis zu 1,6 U/kg/min) noch durch die Infusion von großen Mengen Thrombin bei geringer Rate (0,05 U/kg/min) ein prokoagulatorischer Effekt nachweisen ließ. In der hier vorliegenden Studie wurde den Probanden 50 ml der Serumpräparation autolog transfundiert. Berechnet man die Menge der dadurch transfundierten Konzentration an Thrombin, ist es sehr unwahrscheinlich, dass eine Konzentration von im Median 300 ng (= 0,9 U) Thrombin ein thromboembolisches Ereignis nach sich zieht. Durch einen positiven Feedbackmechanismus führen kleine Mengen an Thrombin jedoch zur Ausbreitung und Verstärkung der Thrombinbildung (Pötzsch und Madlener, 2010). Um auch während und nach der autologen Transfusion der Serumpräparation sicherzustellen, dass die Transfusion zu keinem Zeitpunkt zu einer übermäßigen endogenen Thrombinbildung führt, wurde bei allen Blutentnahmen die Thrombinkonzentration bestimmt. Unmittelbar während der Transfusion zeigte sich ein minimaler Anstieg des Plasmaspiegels von Thrombin mit anschließender schneller Elimination (s. Abb. 15). Am Ende der Transfusion lag nur noch eine geringe Restmenge von 4 % vor. 48 h nach der Transfusion war Thrombin nicht mehr nachweisbar. Wie bereits von Rühl et al. 2012

publiziert wurde, ist anzunehmen, dass das in der Serumpräparation vorhandene Thrombin bereits während der Serumtransfusion von AT inaktiviert wurde.

Auch FVIIa kann zum Nachweis eines hyperkoagulablen Zustands verwendet werden. Er wird im Rahmen des extrinsischen Wegs der Gerinnungskaskade unter anderem durch die Komplexbildung mit TF aktiviert (Vine, 2009). Der Komplex seinerseits führt nachfolgend zur Aktivierung des FX zu FXa mit der anschließenden Spaltung von Prothrombin zu Thrombin unter der Bildung von F1+2. Als eindeutiger Risikofaktor für die Entstehung einer VTE ist er nicht gelistet, wurde aber im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen wie etwa Gefäßverschlusserkrankungen beschrieben (Mennen et al., 1996). Dennoch ist der FVIIa schon lange Gegenstand wissenschaftlicher Forschung: bereits 1992 führten Bauer et al. eine wissenschaftliche Arbeit zur Aktivierung der Gerinnungskaskade durch die Infusion von FVIIa in die Blutbahn von gesunden Probanden durch. Sie konnten zeigen, dass die Infusion von 10 µg/kg FVIIa nur zu einem geringfügigen Anstieg von F1+2 führte, die Infusion von FVIIa also keine überschießende Gerinnungsaktivierung verursacht. In einer weiteren Studie zur Pharmakokinetik von rekombinantem FVIIa konnte nachgewiesen werden, dass bei der Infusion von 160 µg/kg/KG FVIIa in die Blutbahn gesunder Probanden keinerlei thromboembolische Komplikationen auftraten (Fridberg et al., 2005). In der hier vorliegenden Studie lag die Konzentration des in der Serumpräparation gemessenen FVIIa im Median bei 11,21 ng/ml (s. Tab. 15). Auf Grundlage der vorab erwähnten Studien ist die Aktivierung der Gerinnungskaskade durch die Serumtransfusion bei Verwendung einer 1.000-fach geringeren Menge FVIIa unwahrscheinlich.

Auch das restliche, in der Serumpräparation vorhandene tPA, das im Rahmen der Fibrinolyse nicht vollständig umgesetzt wurde, hat vermutlich während der Serumtransfusion keinen Einfluss auf die Hämostase. Insbesondere die Entstehung einer Blutung durch die Anwendung von tPA sollte unbedingt vermieden werden. Chandler et al. zeigten im Jahr 2000, dass die Infusion von 5 µg/kg tPA zu einem Anstieg des Plasmaspiegels von PAP führte. Das durch das tPA entstandene Plasmin im Blutplasma wurde durch Bindung an im PAP-Komplex unmittelbar nach Entstehung inaktiviert. Einen Einfluss der tPA-Infusion auf die Plasmaspiegel von Plasminogen und α_2 AP, sowie insbesondere auf die Produktion von D-Dimeren konnte von den Wissenschaftlern nicht nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit lag die restliche Menge an tPA in der

Serumpräparation im Median bei 38.920 ng/ml (s. Tab. 15). Berechnet man die Gesamtmenge des durch die Serumpräparation (50 ml) infundierten tPAs, so ist die intravasale Aktivierung der Fibrinolyse und das damit verbundene Risiko der Entstehung einer Blutung durch Anwendung von weniger als 2 mg tPA unwahrscheinlich. Diese Vermutung kann durch folgende klinische Anwendung von tPA gestützt werden: nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie wird im Rahmen der Behandlung eines Schlaganfalls zur Rekanalisierung eines Gefäßes eine Therapie mit 0,9 mg/kg tPA empfohlen (Ragoschke-Schumm et al., 2017). Folglich wird bei einem Patienten mit 70 kg eine Menge von 63 mg tPA verwendet; die Gesamtmenge zur gewünschten Aktivierung der Fibrinolyse im Falle eines Gefäßverschlusses ist also im Vergleich zur hier durchgeführten Studie 30-fach höher.

4.4 Eliminationskinetik der Biomarker D-Dimere, F1+2, TAT und PAP

Wie in Abschnitt 3.6 beschrieben, war unter Berücksichtigung der Konzentrations-Zeit-Kurven von D-Dimer, F1+2, TAT und PAP das geeignete Modell zur Beschreibung ihrer Eliminationskinetik ein Zwei-Kompartiment-Modell. Das Ein-Kompartiment-Modell, bei dem die Blutbahn als einziger Verteilungsraum der Biomarker betrachtet wird und die Plasmakonzentration nur von der applizierten Dosis und der Größe des Verteilungsraums abhängig ist, wird den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Eliminationen nicht gerecht. Für dieses Modell müsste die Plasmakonzentration in der Konzentrations-Zeit-Kurve eine Gerade über die Zeit ergeben, d. h. es gäbe nur eine Phase der Verteilung mit konstanter Abnahme des Konzentrationsspiegels im Blut. Die Elimination würde dann der Kinetik 0. Ordnung folgen. Es zeigten sich aber bei allen vier Biomarkern nach intravenöser Applikation der Serumpräparation zwei unterschiedliche Phasen, die sich in eine schnelle Verteilungsphase mit einer anschließenden langsameren Eliminationsphase unterteilen lassen (s. Abb. 11 - 14). Als Verteilungsräume werden in dem ausgewählten Zwei-Kompartiment-Modell Blut als das zentrale und Gewebe als das periphere Kompartiment angesehen.

4.4.1 D-Dimere und ihre Abbaukinetik

Je mehr Fibrin durch Plasmin im Rahmen der Auflösung eines Blutgerinnsels intravasal abgebaut wird, desto höher ist die Konzentration an D-Dimeren. Allerdings gibt der

Nachweis einer erhöhten Plasmakonzentration keine Hinweise auf den Ursprung der Fibrinspaltung. Die Rolle der D-Dimere als Biomarker gewann in den letzten Jahren auch außerhalb der Diagnostik einer VTE an Bedeutung. So zeigten Sodeck et al. 2007, dass ein negativer D-Dimer-Test eine Aortendissektion zu 100 % ausschließt. In der Akutdiagnostik können sie zur Differentialdiagnostik wegweisend sein: bei akutem Thoraxschmerz und einem negativem D-Dimer-Test muss zunächst eher an einen Herzinfarkt, als an eine Aortendissektion gedacht werden (Weber et al., 2003). Auch wurde eine erhöhte D-Dimer Produktion während einer Sichelzellkrise nachgewiesen (Austin et al., 2007). Des Weiteren finden die D-Dimere Anwendung beim Ausschluss einer zerebralen venösen Thrombose Anwendung (Cucchiara et al., 2005). Dass eine basale D-Dimer Produktion auch bei Gesunden ohne das Vorliegen einer Erkrankung stattfindet, spricht für eine physiologische kontinuierliche Bildung und Auflösung von Fibrin. Zudem ist bekannt, dass sich die Fibrinolyse in fortgeschrittenem Alter verändert, was die Interpretation eines erhöhten Plasmaspiegels an D-Dimeren bei älteren Menschen, die im Vergleich zur jüngeren Bevölkerung auch häufiger erkranken, zusätzlich erschwert (Hager und Platt, 1995). Auch werden D-Dimere zur Bestimmung über die Dauer einer Antikoagulation verwendet (Kearon et al., 2016). Allerdings scheint deren Plasmaspiegel abhängig von der zur Antikoagulation verwendeten medikamentösen Therapie zu sein: Legnani et al. beschreiben 2019, dass der Plasmaspiegel der D-Dimere bei Verlaufskontrollen nach Antikoagulation mit DOAKS höher ist als bei Antikoagulation mit Vitamin-K-Antagonisten.

Für eine bessere Beurteilbarkeit der Plasmaspiegel von D-Dimeren zum Zeitpunkt einer Blutentnahme ist das Wissen über deren Eliminationskinetik notwendig. Eine ausführliche Eliminationskinetik fehlt aber bis heute in der Literatur. Wie bereits erwähnt eignet sich für die Beschreibung der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Elimination der D-Dimere das Zwei-Kompartiment-Modell. Nach intravenöser Applikation beginnt der Verteilungsvorgang im gesamten Körper (s. Abb. 11). Er ist insbesondere abhängig von der Vaskularisierung der Organe, der Geschwindigkeit des Blutflusses und vom Herzzeitvolumen. Nach Verteilung im Plasma, entweder in freier Form oder durch Bindung an Plasmaproteine, penetrieren die D-Dimere in das periphere Gewebe. Die Gewebefixierung kann nur schwer direkt gemessen werden, weshalb das Verteilungsvolumen einen indirekten Hinweis auf das Ausmaß der Gewebefixierung

darstellt. Ein großes Verteilungsvolumen zeigt einerseits eine gute Penetration in die peripheren Organe, andererseits eine starke Gewebefestbindung (Gugeler und Klotz, 2000). Im Median lag das V_{Dss} der D-Dimere bei 167,9 ml/kg (s. Tab. 17). Die Interquartilabstände zeigen ein relativ hohes interindividuelles Verteilungsvolumen. Eine Erklärung dafür ist, dass sich mit zunehmendem Gewicht durch Verschiebung der Gewichtsanteile von Muskeln, Wasser und Fett das Verteilungsvolumen vergrößert. Zudem wird es beeinflusst durch das Alter, da sich mit zunehmendem Alter der prozentuale Anteil des Körperfetts vergrößert. Wie beschrieben, schließt sich dem Verteilungsprozess die Elimination an, charakterisiert durch die Kenngrößen der HWZ und der CLR. Die Elimination der D-Dimere folgt entsprechend einer Reaktionskinetik 1. Ordnung dosisunabhängig. Die für die D-Dimere ermittelte HWZ lag im Median bei 15,8 h. Bei der Beurteilung der HWZ ist es wichtig, vorgeschaltete initiale Verteilungsprozesse zu berücksichtigen. Die Anwendung der HWZ zur Charakterisierung der Eliminationskinetik ist bei sehr langen HWZ nur bedingt geeignet, da der Rückverteilungsprozess vom peripheren Gewebe zurück ins Blut geschwindigkeitsbestimmend sein kann. Lange HWZ können also durch Variationen der Verteilung zustande kommen und sind nicht immer Folge eines langen Eliminationsprozesses (Gugeler und Klotz, 2000).

Im Vergleich zu anderen Arbeiten ist die errechnete HWZ der D-Dimere in der vorliegenden Studie fast doppelt so lang. Franks beschrieb 1984 anhand radioaktiv markierter Proteine eine HWZ von 9 - 10 h. Auch fanden Hager und Platt 1995 heraus, dass die D-Dimere nach erhöhter Produktion 8 h im Körper nachweisbar sind. Ein Grund für die unterschiedlichen HWZ ist, dass Franks et al. ein Kollektiv von nur drei Probanden untersuchte, was statistisch nicht belastbar ist bzw. lediglich einen Trend aufzeigen kann. Zudem lag in der hier vorliegenden Studie sowohl eine hohe interindividuelle Variation der HWZ, also auch ein geschlechtsspezifischer Unterschied vor: bei Frauen lag die HWZ im Median bei 14,4 (11,9 - 17,0) h, während sie bei Männern im Median mit 18,6 (14,5 - 19,2) h deutlich länger war (s.Tab.18). Auch hier muss beachtet werden, dass der Muskel- und Körperfettanteil, der die Verteilungs- und Eliminationsprozesse beeinflusst, sich bei Männern und Frauen physiologisch deutlich unterscheidet. Da die HWZ vom Rückverteilungsprozess beeinflusst wird, ist ein geeigneteres Maß zur Charakterisierung der Elimination die CLR. Bei ihrer Berechnung wird angenommen, dass die Elimination aus dem zentralen Kompartiment erst nach abgeschlossener Rückverteilung aus dem

peripheren Gewebe erfolgt. Sie ist für die D-Dimere mit einem Median von 7,2 ml/kg*h relativ niedrig und spricht dafür, dass ihre HWZ durch einen langen Rückverteilungsprozess definiert wird. Vergleichswerte liegen in der Literatur nicht vor. Zudem ist der genaue Eliminationsmechanismus der D-Dimere bis heute nicht vollends geklärt. Ein über die Leber gesteuerter Abbau wird vermutet, da bei Patienten mit Lebererkrankungen wie etwa bei der Leberzirrhose ein erhöhter Plasmaspiegel vorliegt, welcher auch bei Verschlechterung der Erkrankung fortlaufend erhöht bleibt (Cioni et al., 1990; Saray et al., 2012). Die vollständige Verweildauer der D-Dimere im Körper kann zusammenfassend mit der MRT errechnet werden und zeigt einen Median von 15,4 h.

4.4.2 F1+2 und seine Abbaukinetik

Hohe Plasmakonzentrationen von F1+2 sind Hinweis auf eine Gerinnungsaktivierung und zeigen ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines thrombotischen Ereignisses an. Sie sind ein direktes Maß für die *in vivo* Thrombinbildung (Pelzer et al., 1991). Erhöht sind sie beispielsweise im Zusammenhang mit einer Verbrauchskoagulopathie oder bei arteriellen Verschlüssen. Bisher ist nicht eindeutig geklärt, wie F1+2 in der Diagnose eines hyperkoagulablen Zustandes eingesetzt werden kann und welche Vorteile die Bestimmung des Konzentrationsspiegels mit sich bringt. Ota et al. stellten 2008 erhöhte Konzentration von F1+2 sowohl bei zahlreichen Patienten mit Thrombose als auch bei gesunden Patienten fest und konnten dadurch zeigen, dass auch bei gesunden Probanden die Konversion von Prothrombin zu Thrombin ohne klinisches Ereignis stattfindet. Auch wurde beschrieben, dass sich der Konzentrationsspiegel zur Überwachung der Effektivität einer Antikoagulation mit Vitamin K-Antagonisten eignet (Bruhn et al. 1993). Ihre Verwendung zur Therapiekontrolle konnte sich im klinischen Alltag bis heute aber nicht durchsetzen, da der Nachweisprozess im Vergleich zum schnell verfügbaren D-Dimer-Test wesentlich länger dauert. Zur Beschreibung des *in vivo* Verhalten von F1+2 und insbesondere zur Eliminationskinetik sind bis heute nur wenige Daten in der Literatur vorhanden. Wie bereits erwähnt richtet sich die Verteilung von F1+2 nach intravenöser Applikation nach einem Zwei-Kompartiment-Modell (s. Abb. 12). Das im Vergleich zu den D-Dimeren errechnete hohe Verteilungsvolumen von 272,0 ml/kg spricht für eine sehr gute Penetration in das periphere Gewebe (s. Tab. 17). Aufgrund der errechneten kurzen HWZ für F1+2 mit im Median von 1,9 h gilt dies auch für die

Rückverteilung vom peripheren ins zentrale Kompartiment. Die Elimination aus dem zentralen Kompartiment erfolgt entsprechend der Reaktion 1. Ordnung. Die ermittelten Werte für die HWZ sind vergleichbar mit den wenig in der Literatur angegebenen HWZ: Bauer et al. errechneten 1988 anhand eines Radioimmunoassays für F1+2 eine HWZ von 90 min. Dazu wurde ein an F1+2 gekoppelter Antikörper intravenös appliziert und die Elimination über mehrere Blutabnahmen innerhalb von 6 h bestimmt. Bei der Berechnung der HWZ ist es notwendig, dass die Messung der Plasmaspiegel über einen ausreichend langen Zeitraum erfolgt, da andernfalls ihre vollständige Erfassung nicht gewährleistet werden kann (Poon, 2006). Diese Überlegung könnte erklären, warum die in der vorliegenden Arbeit ermittelte HWZ für F1+2 mit 1,9 h gemessen über 48 h im Vergleich zur Studie von Bauer et al. mit einer Erfassung von 6 h geringfügig länger ist.

In der Literatur ist eine Methode beschrieben, bei der die Eliminationskinetik von F1+2 mit Hilfe eines Computermodells errechnet wurde: in der Arbeit von Chandler und Velan wurde 2003 die *in vivo* Thrombin- und Fibrinbildung anhand der Plasmaspiegel von F1+2, TAT und dem Fibrinogenpeptid A im Verlauf einer kardiopulmonalen Bypassoperation gemessen. Anhand eines das Gefäßsystem darstellenden Computermodells wurde die Bildung eines Thrombinmoleküls sowohl mit der Entstehung eines F1+2 und eines TAT berechnet und anschließend eine Pharmakokinetik erstellt. Die errechnete HWZ mit 88 ± 24 min ist trotz der unterschiedlichen Methodik mit dem Ergebnis der vorliegenden Studie vergleichbar. Die Ausscheidung von F1+2 erfolgt hauptsächlich über die Niere durch glomeruläre Filtration und ist demzufolge altersabhängig (Bezeaud et al., 1978). Die CLR von F1+2 mit im Median $64,3 \text{ ml/kg} \cdot \text{h}$ ist im Vergleich zu den D-Dimeren deutlich größer. Die kurze HWZ, das hohe Verteilungsvolumen, sowie die schnelle CLR führt zu der geringen MRT von F1+2 mit im Median 2,4 h.

4.4.3 TAT und seine Abbaukinetik

Wie bereits erwähnt kommt Thrombin intravasal in freier Form kaum vor, da es unmittelbar nach Bildung im TAT-Komplex an AT gebunden wird. Ist zusätzlich Heparin vorhanden, wird dieser Vorgang beschleunigt. Erhöhte Plasmaspiegel von TAT können im Zusammenhang mit Erkrankungen, die mit einer gesteigerten intravasalen Gerinnung einhergehen, gemessen werden und spiegeln das Ausmaß der intravasalen Gerinnung wider. Erhöhte Plasmaspiegel von TAT wurden aber auch bei Patienten mit Diabetes

mellitus gemessen (Yano et al., 2003). Interessanterweise zeigt sich in einigen Fällen bei Patienten mit Koronararterienverschluss ein erhöhter TAT-Konzentrationsspiegel nach Einleitung einer fibrinolytischen Therapie (Schaer, 1987). Auch konnte nachgewiesen werden, dass es bei Patientin, bei denen 90 min nach der Einleitung einer fibrinolytischen Therapie ein erhöhter TAT-Konzentrationsspiegel gemessen wurde, zu einem erneuten Gefäßverschluss oder zu keiner erfolgreichen Rekanalisation des Gefäßes kam (Gulba et al., 1991).

Über die Eliminationskinetik von TAT liegen in der Literatur kaum Daten vor. Die Verteilung von TAT erfolgt nach intravenöser Applikation ebenfalls nach dem Zwei-Kompartiment-Modell (s. Abb. 13). Das große Verteilungsvolumen mit einem Median von 242,5 ml/kg ist vergleichbar mit dem von F1+2. Die Elimination erfolgt ebenfalls nach der Reaktion 1. Ordnung. Die errechnete HWZ von TAT lag im Median bei 0,74 h (s. Tab. 17). Vergleichbare HWZ sind bis dato nur anhand von Tiermodellen errechnet worden: Reeve et al. führten 1981 eine Studie zum AT-Metabolismus durch und konnten nach Injektion von mit radioaktiv markiertem AT in die Venen eines Hundes für TAT eine HWZ von 30 min errechnen. Ebenfalls injizierten Shifman und Pizzo 1982 radioaktiv markiertes AT in das Blutsystem von Mäusen und errechneten eine HWZ für TAT von 2 - 3,5 min. Hingegen war das Ergebnis bei Vogel et al. 1979 nach Injektion von radioaktiv markiertem AT in die Vene von Kaninchen eine HWZ für TAT von 2 - 11 h. Die voneinander abweichende Durchführung der Studien, sowie die Verwendung unterschiedlicher Tiermodelle mit stark differierenden Blutvolumina bzw. hiermit verbundenen Messunsicherheiten erschweren die Vergleichbarkeit der genannten HWZ. Die einzige in der Literatur vorliegende Studie zur HWZ von TAT im Menschen ist die bereits erwähnte *in silico* Studie von Chandler und Velan aus dem Jahr 2003, bei der anhand eines Computermodells eine im Vergleich zur vorliegenden Studie deutlich kürzere HWZ für TAT von 9 ± 6 min errechnet wurde. Eine Erklärung für die unterschiedlichen HWZ ist, dass die Plasmaspiegel bei Chandler et al. im Rahmen einer Bypass-Operation gemessen wurden, während derer auch hohe Dosen an unfraktioniertem Heparin appliziert wurden. Dies führt in der Konsequenz zu einer deutlichen Beschleunigung der Inaktivierung von Thrombin, weshalb anzunehmen ist, dass TAT in Anwesenheit von Heparin auch schneller eliminiert wird. Der genaue Mechanismus der Elimination von TAT ist noch unbekannt.

4.4.4 Eliminationskinetik von PAP

Freies Plasmin kommt, in Analogie zu Thrombin, im Blut kaum vor, da es unmittelbar nach seiner Bildung direkt in einem Komplex mit seinem Inhibitor gebunden wird. Die Konzentration von PAP im Blutplasma ist daher ein Maß für die fibrinolytische Aktivität in der Blutbahn. Cushman et al. konnten 1999 erhöhte PAP-Konzentrationen bei Patienten mit einem Myokardinfarkt nachweisen. In der hier vorliegenden Arbeit zeigte PAP nach intravenöser Applikation das geringste Verteilungsvolumen mit im Median 78,0 ml/kg (s. Tab. 17). Sein geringes Verteilungsvolumen bedeutet, dass PAP wahrscheinlich in hohem Maße an Blutbestandteile gebunden ist und die Penetration ins periphere Gewebe durch beispielsweise eine schlechte Membrangängigkeit nur sehr langsam abläuft (Gugeler und Klotz, 2000). Der sehr lang andauernde Verteilungsprozess, lässt sich auch anhand der Konzentrations-Zeit-Kurve ablesen: weil die Verteilung nach intravenöser Applikation sehr gering ist, fällt der Plasmaspiegel auch nur sehr langsam ab (s. Abb. 14). Da sich aus der CLR und dem Verteilungsvolumen die HWZ berechnen lässt, ist diese mit im Median 10,8 h ebenfalls sehr lang. Durch die lange HWZ und die sehr geringen CLR mit im Median 6,2 ml/kg*h lässt sich auch die hohe MRT mit im Median von 15,2 h erklären.

Die HWZ von PAP wurde 1979 in einer Studie von Collen und D. Wiman untersucht, indem mit radioaktivem Iod markiertes AP intravenös sowohl in Patienten, die eine thrombolytische Therapie erhielten, als auch in die Blutbahnen von Mitgliedern einer gesunden Kontrollgruppe appliziert wurde. Die HWZ wurde anhand der Abnahme der Konzentration radioaktiv markierten Antiplasmins im Plasma gemessen. Die errechnete HWZ von ca. 12 h ist vergleichbar mit der in der vorliegenden Studie gemessenen HWZ von im Median 10,8 h (s. Tab. 17).

In einer weiteren Studie errechneten Chandler et al. 2000 eine HWZ für PAP von 4,5 h. Sie infundierten elf gesunden Probanden einen Bolus von 5 µg/kg tPA und bestimmten die HWZ über die Abnahme des Plasmaspiegels durch sequentielle Blutentnahmen über 6 h nach Infusion. Wie bereits erwähnt und von Poon 2006 beschrieben, könnte die HWZ auch hier durch eine zu kurze Aufzeichnung der Plasmaspiegel unterschätzt worden sein. In der vorliegenden Arbeit enthielt die Serumpräparation eine geringe Menge an tPA, sodass eine intravasale Bildung von Plasmin und die damit verbundene Produktion von PAP durch die Transfusion nicht vollends ausgeschlossen werden kann. Da die Konzentration des tPA im Plasma aber nur unmittelbar während der Serumtransfusion

kurzzeitig erhöht war, ist das Risiko für die Entstehung einer Blutung durch die verbliebene Menge an tPA sehr gering. Zudem liegt die HWZ von tPA bei 5 – 10 min, was bedeutet, dass das im Rahmen der Serumtransfusion verabreichte tPA schnell eliminiert wird und nicht mehr zur Produktion von intravasalem PAP beitragen kann (Verstraete et al., 1985). Demzufolge ist es auch unwahrscheinlich, dass durch das noch in der Serumpräparation vorhandene tPA die Eliminationskinetik von PAP verlängert wird. Der genaue Mechanismus der Elimination von PAP ist bis heute unbekannt. Gonias et al. fanden 1982 Hinweise darauf, dass die Elimination über die Leber erfolgt.

4.5 Fazit und Ausblick

Die laborchemische Analyse von verschiedenen Biomarkern kann zur Einschätzung eines erhöhten Thromboserisikos herangezogen werden. Mit der entsprechenden Kenntnis über ihre Eliminationskinetik kann das Ausmaß der Gerinnungsaktivierung zum Zeitpunkt einer Blutentnahme besser eingeschätzt werden. Insbesondere bieten die kurzen HWZ von F1+2 und TAT die Möglichkeit, eine kurzfristige Bildung von intravasalem Thrombin nachzuweisen, was die Aktivierung der Gerinnungskaskade widerspiegelt. Auch eignen sich D-Dimere und PAP als Biomarker zur Beobachtung der Fibrinolyse, allerdings aufgrund ihrer langen HWZ eher als Langzeitmarker. Überträgt man die Ergebnisse der vorliegenden Studie auf den klinischen Alltag, können bei Patienten mit erhöhten D-Dimeren zur weiteren Differenzierung die Biomarker F1+2, TAT und PAP bestimmt werden. Sind alle Marker erhöht, liegt ein hyperkoagulabiler Zustand vor, der die Einleitung einer medikamentösen Therapie nach sich ziehen sollte. Zeigen sie jedoch einen Normalbefund, könnten die erhöhten Plasmaspiegel der D-Dimere das Resultat der Umverteilung der D-Dimere vom peripheren in das zentrale Kompartiment im Rahmen ihrer Elimination sein. Hier würde die Einleitung einer antikoagulatorischen Therapie ggf. zu einem erhöhten Blutungsrisiko führen.

Die im Rahmen dieser Studie etablierte Methode, welche vollständig ohne radioaktive Markierung und den damit verbundenen Risiken funktioniert, bietet zudem eine neuartige Testmethode, um die Eliminationskinetik *in vivo* im gesamtheitlichen Ansatz zu betrachten. Dies spiegelt die *in vivo*-Situation besser wider als die bisher zur Verfügung stehenden Testsysteme, die in der Regel nur Ausschnitte aus dem komplexen Zusammenspiel der Hämostase analysieren. Es wäre denkbar, dieses Testsystem bei

Patienten anzuwenden, die aufgrund einer chronischen Erkrankung eine eingeschränkte Eliminationsfähigkeit der Leber oder Nieren zeigen. Weiterhin könnte man dieses System auf Patienten mit genetisch-bedingten Erkrankungen des Gerinnungssystems, wie beispielsweise die angeborenen oder erworbenen Thromophilien anwenden, um herauszufinden, ob die jeweiligen Erkrankungen Einfluss auf die Eliminationsprozesse von Hämostaseparameter haben.

5. Zusammenfassung

Die Inzidenz der VTE ist in den letzten Jahren angestiegen. Die zugrundeliegenden Faktoren sind multifaktorieller Genese und beinhalten sowohl genetisch bedingte Erkrankungen als auch vorübergehende Risiken, wie etwa Immobilisation nach operativen Eingriffen oder Tumorerkrankungen. Trotz der zur Verfügung stehenden Analysemethoden zur Feststellung einer VTE ist die Diagnostik in vielen Fällen unzuverlässig und erschwert die Entscheidung über die Einleitung oder Fortführung einer medikamentösen Antikoagulation. Dem Nutzen der Antikoagulation zur Verhinderung eines thromboembolischen Ereignisses steht das Risiko einer Blutung gegenüber. Deshalb sollte ihr Einsatz patientenindividuell und abhängig von situativen Risikofaktoren entschieden werden.

Ein Ansatz, um das Aktivierungsniveau der Gerinnung besser einschätzen zu können, ist die laboranalytische Bestimmung von Stoffwechselprodukten wie Enzymen, Inhibitoren oder Komplexen der Hämostase, die auch als Biomarker bezeichnet werden. Bisher fehlt eine ausreichende Charakterisierung solcher Biomarker, da ihre vollständige *in vivo* Erfassung durch die intravasal gleichzeitig ablaufenden Prozesse der Gerinnselbildung und Fibrinolyse mit den bisher etablierten Testmethoden nicht möglich ist. In der vorliegenden Studie wurde ein Testsystem entwickelt, das die gleichzeitige Messung und Quantifizierung verschiedener Biomarker der Gerinnselbildung und Fibrinolyse ohne Einsatz einer den Organismus belastenden radioaktiven Detektionsmethode erlaubt. Für dieses Vorhaben wurde von 15 Probanden aus je einer Vollblutspende in mehreren Schritten Serum gewonnen. Durch den vorausgegangenen Gerinnungsprozess enthält das Serum die verschiedenen Biomarker der Hämostase in hoher Konzentration. Damit die Serumpräparation nicht nur die Marker der Gerinnungsaktivierung, sondern auch Marker der Fibrinolyseaktivierung enthält, wurde die Vollblutspende der Probanden mit tPA versetzt, welches das sich bildende Gerinnsel auflöst. Zur Beobachtung der Eliminationskinetik ausgewählter Biomarker wurde die Serumpräparation über einen Zeitraum von 30 min autolog transfundiert und die Konzentrationsspiegel der Biomarker durch aufeinanderfolgende Blutentnahmen über 48 h bestimmt. Die Transfusionen wurden von allen Probanden gut vertragen und hatte keine Auswirkung auf die Aktivierung der Gerinnungskaskade, da u.a. eine endogene Thrombinbildung während und auch nach der Infusion nicht nachgewiesen werden konnte. Anhand des Verhaltens der

Plasmakonzentrationen wurden Konzentrations-Zeit-Kurven erstellt, die als Grundlage für die Berechnung der Eliminationskinetik von F1+2, TAT, PAP und der D-Dimere verwendet wurden. Unmittelbar nach der autologen Transfusion konnte für alle vier Biomarker ein starker Anstieg der Konzentration gefolgt von einem raschen Abfall gemessen werden. Das für die Beschreibung der Eliminationskinetik passende Modell war ein Zwei-Kompartiment-Modell mit einer schnellen Verteilungsphase und einer langsamen Eliminationsphase. Die anhand des Modells errechneten HWZ für F1+2 lag im Median bei 1,0 (1,3 - 3,6) h, für TAT bei 0,7 (0,7 - 2,6) h, für PAP bei 10,8 (8,8 - 11,4) h und für D-Dimer bei 15,8 (13,1 - 23,1) h. Die Daten zeigen, dass auf Basis der Plasmakonzentrationen von Biomarkern der Zustand der Hämostase zuverlässiger eingeschätzt werden kann. Zudem eignen sie sich sowohl zu differentialdiagnostischen Zwecken, als auch als Entscheidungskriterium für die Dauer einer Antikoagulation.

6. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Vortestwahrscheinlichkeit nach Wells für das Vorhandensein einer TVT.....	23
Tab. 2: Antikoagulanzen zur Therapie und Prophylaxe einer Thrombose.	26
Tab. 3: Laboranalytische Untersuchungen im Rahmen eines Thrombophilie-Screenings.....	31
Tab. 4: Eingesetzte Chemikalien.	36
Tab. 5: Eingesetzte Reagenzien.	36
Tab. 6: Eingesetzte Pufferlösungen.....	37
Tab. 7: Eingesetzte Materialien.....	38
Tab. 8: Eingesetzte Geräte.	39
Tab. 9: Eingesetzte Test-Kits.....	40
Tab. 10: Ein- und Ausschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie.	41
Tab. 11: Zeitlicher Ablauf der Studie.....	43
Tab. 12: Laboranalytisch bestimmte hämostaseologische und nicht-hämostaseologische Parameter.	44
Tab. 13: Konzentration der Hämostaseparameter in der Serumpräparation der Vorversuche.....	63
Tab. 14: Probandencharakteristika. Beschreibung des gewählten Probanden- kollektivs in Bezug auf Alter, BMI, Gewicht und kalkuliertes Plasmavolumen.....	64
Tab. 15: Hämostaseparameter in der Serumpräparation der Probanden nach Kryokonservierung.	65
Tab. 16: Relativer Anstieg der Konzentrations- und Aktivitätsspiegel der Gerinnungs- und Fibrinolyseparameter im Blutplasma nach autologer Serumtransfusion.....	67
Tab. 17: Errechnete Parameter der Eliminationskinetiken nach Anpassung an ein Zwei-Kompartiment-Modell für D-Dimer, F1+2, TAT, und PAP.	80
Tab. 18: Geschlechtsspezifische Unterschiede errechnet anhand der Parameter der Eliminationskinetiken für D-Dimer, F1+2, TAT, und PAP.....	82

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht über den extrinsischen und intrinsischen Weg der plasmatischen Gerinnung.	16
Abb. 2: Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin unter Bildung der Prothrombinfragmente F1+2.	18
Abb. 3: Antithrombin-Heparin-Mechanismus.....	20
Abb. 4: Protein C-Mechanismus.....	21
Abb. 5: Diagnostischer Algorithmus bei Verdacht auf TVT.	24
Abb. 6: Indirekte Biomarker der Gerinnungsaktivierung und Fibrinolyse.	33
Abb. 7: Herstellungsprozess der Serumpräparation.	45
Abb. 8: Schematische Darstellung des ELISA-Prinzips.	52
Abb. 9: Testprinzip des OECA zur Messung von freiem Thrombin.....	55
Abb. 10: Schematische Darstellung der Eliminationskinetik 0. und 1. Ordnung.	58
Abb. 11: Konzentrations-Zeit-Kurve der D-Dimere im Blutplasma vor, während und nach der autologen Serumtransfusion über einen Zeitraum von 48 h.	69
Abb. 12: Konzentrations-Zeit-Kurve von F1+2 im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion.	70
Abb. 13: Konzentrations-Zeit-Kurve von TAT im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion.	71
Abb. 14: Konzentrations-Zeit-Kurve von PAP im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion.	72
Abb. 15: Konzentrations-Zeit-Kurve von Thrombin im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion.	73
Abb. 16: Konzentrations-Zeit-Kurve von tPA im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion.	74
Abb. 17: Konzentrations-Zeit-Kurve von PAI im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion.	75
Abb. 18: Konzentrations-Zeit-Kurve von FII im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion.	75
Abb. 19: Konzentrations-Zeit-Kurve von FVII im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion.	76

Abb. 20: Konzentrations-Zeit-Kurve von FXI im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion.	76
Abb. 21: Konzentrations-Zeit-Kurve von Fibrinogen im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion.	77
Abb. 22: Konzentrations-Zeit-Kurve von Antithrombin im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion.	77
Abb. 23: Konzentrations-Zeit-Kurve von PC im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion.	78
Abb. 24: Konzentrations-Zeit-Kurve von Plasminogen im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion.	79
Abb. 25: Konzentrations-Zeit-Kurve von α_2 AP im Blutplasma während und nach der autologen Serumtransfusion.	79

8. Literaturverzeichnis

Adam SS, Key NS, Greenberg CS. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. *Blood* 2009; 13: 2878–2887

Agno W, Becattini C, Brighton T, Selby R, Kamphuisen PW. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism: a meta-analysis. *Circulation* 2008; 1: 93–102

Alban S. Heparine und andere Glykoantikoagulanzen. In: Pötzsch B, Madlener K, Hrgs. *Hämostaseologie*. 2. Auflage. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, 2010: 749-794

Ali N, Ayyub M, Khan SA. High prevalence of protein C, protein S, antithrombin deficiency, and Factor V Leiden mutation as a cause of hereditary thrombophilia in patients of venous thromboembolism and cerebrovascular accident. *Pak J Med Sci* 2014; 6: 1323–1326

Allman-Farinelli MA. Obesity and venous thrombosis: a review. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2011; 8: 903–907

Austin H, Key NS, Benson J M, Lally C, Dowling NF, Whitsett C, Hooper WC. Sickle cell trait and the risk of venous thromboembolism among blacks. *Blood* 2007; 3: 908–912

Baglin T. The measurement and application of thrombin generation. *Br J Haematol* 2005; 5: 653–661

Bauer KA, Broekmans AW, Bertina RM, Conard J, Horellou MH, Samama MM, Rosenberg RD. Hemostatic enzyme generation in the blood of patients with hereditary protein C deficiency. *Blood* 1988; 5: 1418–1426

Bauer KA, Goodman TL, Kass B L, Rosenberg RD. Elevated factor Xa activity in the blood of asymptomatic patients with congenital antithrombin deficiency. *J Clin Invest* 1985; 2: 826–836

Bauer KA, Mannucci PM, Gringeri A, Tradati F, Barzegar S, Kass BL, Cate H, Kestin AS, Brettler DB, Rosenberg RD. Factor IXa-factor VIIIa-cell surface complex does not contribute to the basal activation of the coagulation mechanism in vivo. *Blood* 1992; 8: 2039–2047

Bauersachs RM. Clinical presentation of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *Best practice & research. Clinical haematology* 2012; 3: 243–251

Bergmann F, Czwalińska A. Aktivierungsmarker der Gerinnung und Fibrinolyse. In: Monika Bartels. Hrgs. *Das Gerinnungskompodium*. 2. Auflage. Stuttgart: George Thieme Verlag, 2003: 686-710

Bergqvist D und Lowe G. Venous thromboembolism in patients undergoing laparoscopic and arthroscopic surgery and in leg casts. *Arch Intern Med* 2002; 19: 2173–2176

Bertina RM. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64–67

Bezeaud A, Aronson DL, Menache D, Guillin MC. Identification of a prothrombin derivative in human urine. *Thrombosis research* 1978; 3: 551–556

Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, Rosendaal FR. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *JAMA* 2005; 6: 715–722

Božič M, Blinc A, Stegnar M. D-dimer, other markers of haemostasis activation and soluble adhesion molecules in patients with different clinical probabilities of deep vein thrombosis. *Thrombosis research* 2002; 2-3: 107–114

Bruhn HD, Zurborn KH. Messung des Prothrombinfragments F1+2 zur Kontrolle der Antikoagulatorischen Wirkung von Phenprocoumon. *DMW* 1993; 26: 967-970

Carson JL, Kelley MA, Duff A, Weg JG, Fulkerson WJ, Palevsky HI, Schwartz JS, Thompson BT, Popovich J, Hobbins TE. The clinical course of pulmonary embolism. *The New England journal of medicine* 1992; 19: 1240–1245

Cassidy MR, Rosenkranz P, McAneny D. Reducing postoperative venous thromboembolism complications with a standardized risk-stratified prophylaxis protocol and mobilization program. *J Am Coll Surg* 2014; 6: 1095–1104

Catanzaro A, Edgington TS. The in vivo behavior of the terminal derivatives of fibrinogen and fibrin cleaved by plasmin. *J Lab Clin Med* 1974; 3: 458–466

Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* 2005; 3: 307–321

Chandler WL, Initial evaluation of hemostasis: reagent and method selection. In: Kitchen S, Olson JD, Preston FE, eds. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis*. Oxford: Wiley-Blackwell, 2003: 63-71

Chandler WL, Alessi MC, Aillaud M, Vague P, Juhan-Vague I. Formation, Inhibition and Clearance of Plasmin in vivo. *Pathophysiol Haemos Thromb* 2000; 4: 204–218

Chandler WL, Velan T. Estimating the rate of thrombin and fibrin generation in vivo during cardiopulmonary bypass. *Blood* 2003; 11: 4355–4362

Cioni G, Cristani A, Mussini C, Grandi S, Pentore R, Zeneroli ML, Tizzanini W, Zagni G, Ventura E. Incidence and clinical significance of elevated fibrin(ogen) degradation product and/or D-dimer levels in liver cirrhosis patients. *Ital J Gastroenterol* 1990; 2: 70–74

Cogo A, Lensing AW, Koopman MM, Piovella F, Siragusa S, Wells PS, Villalta S, Büller HR, Turpie AG, Prandoni P. Compression ultrasonography for diagnostic management of patients with clinically suspected deep vein thrombosis: prospective cohort study. *BMJ (Clinical research ed.)* 1998; 7124: 17–20

Collen D, Wiman B. Turnover of antiplasmin, the fast-acting plasmin inhibitor of plasma. *Blood* 1979; 2: 313–324

Colman TRW, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ, Marder VJ. Overview of haemostasis. In: *Haemostasis and Thrombosis. Basic principles and clinical practice*. 5. Auflage. Philadelphia: Lippincott, William & Wilkins; 2006: 3-16.

Coppens M, Reijnders JH, Middeldorp S, Doggen CJ, Rosendaal FR. Testing for inherited thrombophilia does not reduce the recurrence of venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2008; 9: 1474–1477

Cucchiara B, Messe S, Taylor R, Clarke J, Pollak E. Utility of D-dimer in the diagnosis of cerebral venous sinus thrombosis. *J Thromb Haemost* 2005; 2: 387–389

Cushman M, Lemaitre RN, Kuller LH, Psaty BM, Macy EM, Sharrett AR, Tracy RP. Fibrinolytic activation markers predict myocardial infarction in the elderly. The Cardiovascular Health Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 3: 493–498

Dahlbäck B, Villoutreix BO. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS letters* 2005; 15: 3310–3316

Dempfle CE. Determination of D-Dimer Antigen in Clinical Routine. *Dtsch Arztebl* 2005; 102: 428-423

Di Nisio M, Squizzato A, Rutjes AW, Büller HR, Zwinderman AH, Bossuyt PM. Diagnostic accuracy of D-dimer test for exclusion of venous thromboembolism: a systematic review. *J Thromb Haemost* 2007; 2: 296–304

Douketis JD, Kearon C, Bates S, Duku EK, Ginsberg JS. Risk of fatal pulmonary embolism in patients with treated venous thromboembolism. *JAMA* 1998; 6: 458–462

Dykes AC, Walker ID, McMahon AD, Islam SI, Tait RC. A study of Protein S antigen levels in 3788 healthy volunteers: influence of age, sex and hormone use, and estimate for prevalence of deficiency state. *Br J Haematol* 2001; 3: 636–641

Egeberg O. The Effect of Serum Infusion on the Blood Clotting System. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 1962; 5: 475–477

Engelmann B, Luther T, Mueller I. Intravascular tissue factor pathway-a model for rapid initiation of coagulation within blood vessel. *Thromb Haemost* 2003; 89: 3-8

Esmon CT, Esmon NL, Harris KW. Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation. *J Biol Chem* 1982; 14: 7944–7947

Esmon CT, Jackson CM. The conversion of prothrombin to thrombin. III. The factor Xa-catalyzed activation of prothrombin. *J Biol Chem* 1974; 24: 7782–7790

Favaloro EJ, McDonald D, Lippi G. Laboratory investigation of thrombophilia: the good, the bad, and the ugly. *Semin Thromb Hemost* 2009; 35: 695-710

Franks JJ, Kirsch RE, Kao B, Kloppel TM. Fibrinogen and Fibrinogen-related Peptides in Cancer. In: Mariani G. *Pathophysiology of plasma protein metabolism*, New York: Plenum Press; 1984; 265-278.

Fridberg MJ, Hedner U, Roberts HR, Erhardtson E. A study of the pharmacokinetics and safety of recombinant activated factor VII in healthy Caucasian and Japanese subjects. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* 2005; 4: 259–266

Gaffney PJ. Distinction between fibrinogen and fibrin degradation products in plasma. *Clinica Chimica Acta* 1975; 1: 109–115

Geiger M. Komponenten des Fibrinolytischen Systems. In: Pötzsch B, Madlener K, Hrgs. Hämostaseologie. 2. Auflage. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, 2010: 259-266

Gohil R, Peck G, Sharma P. The genetics of venous thromboembolism. A meta-analysis involving approximately 120,000 cases and 180,000 controls. *Thromb Haemost* 2009; 2: 360–370

Gomes M P, Deitcher SR. Risk of venous thromboembolic disease associated with hormonal contraceptives and hormone replacement therapy: a clinical review. *Arch Intern Med* 2004; 18: 1965–1976

Gonias SL, Fuchs HE, Pizzo SV. A Unique Pathway for the Plasma Elimination of α 2-Antiplasmin-Protease Complexes in Mice. *Thromb Haemost* 1982; 02: 208–210

Greengard J, Sun X, Xu X, Fernandez J, Griffin J, Evatt B. Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. *Lancet* 1994; 8909: 1361–1362

Greiner C, 2011: Eliminationshalbwertszeit – wie schnell die Plasmakonzentration einer Substanz sinkt. <https://www.bvdn.de/home-bvdn/neurotransmitter/archiv-2011/200-neurotransmitter-05-2011>. (Zugriffsdatum: 5. November 2020)

Gugeler N, Klotz U. Einführung in die Pharmakokinetik. 2., neubearb. Aufl. Eschborn: Govi-Verl, 2000

Gulba DC, Barthels M, Westhoff-Bleck M, Jost S, Rafflenbeul WG, Daniel WG, Hecker H, Lichtlen PR. Increased thrombin levels during thrombolytic therapy in acute myocardial infarction: relevance for the success of therapy. *Circulation* 1991; 83: 937–944.

Hager K, Platt D. Fibrin degeneration product concentrations (D-dimers) in the course of ageing. *Gerontology* 1995; 3: 159–165

Hansson PO, Sörbo J, Eriksson H. Recurrent venous thromboembolism after deep vein thrombosis: incidence and risk factors. *Arch Intern Med* 2000; 6: 769–774

Heit JA. The epidemiology of venous thromboembolism in the community: implications for prevention and management. *J Thromb Thrombolysis* 2006; 1: 23–29

Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ. Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Arch Intern Med* 2000; 6: 809–815

Herold G. *Innere Medizin* 2017. Köln: Im Selbstverl., 2013

Holvoet P, Boer A, Verstreken M, Collen D. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of plasmin-alpha 2-antiplasmin complex in human plasma-application to the detection of in vivo activation of the fibrinolytic system. *Thromb Haemost* 1986; 2: 124–127

Jackson C. Antithrombin, heparinkofaktoren II und Protein-C-Inhibitoren. In: Pötzsch B, Madlener K. *Hämostaseologie*. 2. Auflage. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, 2010

Kahn SR. Post-thrombotic syndrome after deep venous thrombosis: risk factors, prevention, and therapeutic options. *Clin Adv Hematol Oncol* 2009; 7: 433–435

Kakkar VV, Howe CT, Flanc C, Clarke MB. Natural History of postoperative deep-vein Thrombosis. *Lancet* 1969; 7614: 230–233

Kaushansky K, Levi M. *Williams hematology. Haemostasis and Thrombosis*. McGraw-Hill Education. New York, 2018. <https://oncohemakey.com/molecular-biology-and-biochemistry-of-the-coagulation-factors-and-pathways-of-hemostasis-2> (Zugriffsdatum: 01.03.2020)

Kearon C, Akl EA, Ornelas J, Blaivas A, Jimenez D, Bounameaux H, Huismann M, King CS, Timothy AM, Scoot AM, Sood N, Vintch JR, Wells P, Woller SR, Moores L. Antithrombotic Therapy for VTE Disease: CHEST Guideline and Expert Panel Report. *Chest* 2016; 149:315–52.

Kearon C, Kahn SR, Agnelli G, Goldhaber S, Raskob GE, Comerota AJ. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 2008; 6: 454-545

Kline JA, Wells PS. Methodology for a rapid protocol to rule out pulmonary embolism in the emergency department. *Annals of emergency medicine* 2003; 2: 266–275

Koster T, Rosendaal FR, Briet E, van der Meer FJ, Colly LP, Trienekens PH, Poort SR, Reitsma PH, Vandenbroucke JP. Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study). *Blood* 1995; 10: 2756–2761

Koster T, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR, Ronde H, Briët E, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993; 1503–1506

Kyrle PA, Eichinger S, Hrgs. Pathogenese und Risikofaktoren der venösen Thrombose. In: Pötzsch B, Madlener K. *Hämostaseologie*. 2. Auflage. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, 2010

Lawson JH, Kalafatis M, Stram S, Mann KG. A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study. *J Biol Chem* 1994; 269: 23357-23366

Leebeek FW, Stadhouders NA, van Stein D, Gómez-García EB, Kappers-Klunne MC. Hypercoagulability states in upper-extremity deep venous thrombosis. *Am J Hematol* 2001; 1: 15–19

Lip GY, Lip PL, Zarifis J, Watson RD, Bareford D, Lowe GD, Beevers DG. Fibrin D-dimer and beta-thromboglobulin as markers of thrombogenesis and platelet activation in atrial fibrillation. Effects of introducing ultra-low-dose warfarin and aspirin. *Circulation* 1996; 3: 425–431

López JA, Kearon C, Lee AY. Deep venous thrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004; 439–456

Lualdi JC, Goldhaber SZ. Right ventricular dysfunction after acute pulmonary embolism: Pathophysiologic factors, detection, and therapeutic implications. *American Heart Journal* 1995; 6: 1276–1282

Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 1964; 498–499

Mahlfeld K, Böck M, Franke J, Meinecke I, Schaeper O, Kayser R, Grasshoff H. Beitrag zur Bedeutung und Inzidenz der Heparininduzierten Thrombozytopenie (HIT) Typ II. Eine prospektive Studie. *Zentralbl Chir* 2001; 1: 39–43

Manly DA, Boles J, Mackman N. Role of tissue factor in venous thrombosis. *Annu Rev Physiol* 2011; 515–525

Mari D, Mannucci PM, Coppola R, Bottasso B, Bauer KA, Rosenberg RD. Hypercoagulability in centenarians: the paradox of successful aging. *Blood* 1995; 11: 3144–3149

Martinelli I, Mannucci PM, Stefano V de, Taioli E, Rossi V, Crosti F, Paciaroni K, Leone G, Faioni EM. Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. *Blood* 1998; 7: 2353–2358

Martinelli I, Stefano V, Mannucci PM. Inherited risk factors for venous thromboembolism. *Nature reviews. Cardiology* 2014; 3: 140–156

Mateo J, Oliver A, Borrell M, Sala N, Fontcuberta J. Laboratory evaluation and clinical characteristics of 2,132 consecutive unselected patients with venous thromboembolism--results of the Spanish Multicentric Study on Thrombophilia (EMET-Study). *Thromb Haemost* 1997; 3: 444–451

Mennen LI, Schouten EG, Grobbee DE, Kluft C. Coagulation factor VII, dietary fat and blood lipids: a review. *Thromb Haemost* 1996; 4: 492–499

Merriman L, Greaves M. Testing for thrombophilia: an evidence-based approach. *Postgrad Med J* 2006; 973: 699–704

Müller J, Becher T, Braunstein J, Berdel P, Gravius S, Rohrbach F, Oldenburg J, Mayer G, Pötzsch B. Profiling of active thrombin in human blood by supramolecular complexes. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011; 27: 6075–6078

Mumme A, Hummel T. Die multimordale operative Therapie der tiefen Beinvenenthrombose Gefäßchirurgie. Springer 2013; 18: 695–703

Naess IA, Christiansen SC, Romundstad P, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Hammerstrøm J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *J Thromb Haemost* 2007; 4: 692–699

Nicolaidis AN, Kakkar VV, Renney JT. The soleal sinuses: origin of deep-vein thrombosis. *Br J Surg* 1970; 11: 860

Ota S, Wada H, Abe Y, Yamada E, Sakaguchi A, Nishioka J, Hatada T, Ishikura K, Yamada N, Sudo A, Uchida A, Nobori T. Elevated levels of prothrombin fragment 1 + 2 indicate high risk of thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2008; 3: 279–285

Palareti G, Cosmi B, Legnani C, Toso A, Brusi C, Lorio A, Pengo V, Ghirarduzzo A, Pattacini C, Testa S, Lensing AW, Tripodi A. D-dimer testing to determine the duration of anticoagulation therapy. *N Engl J Med* 2006; 355: 1780–9

Pelzer H, Schwarz A, Stüber W. Determination of human prothrombin activation fragment 1 + 2 in plasma with an antibody against a synthetic peptide. *Thromb Haemost* 1991; 2: 153–159

Petitou M. 1976–1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site. *Biochemie* 2003; 1-2: 83–89

Pomp ER, Rosendaal FR, Doggen JM. Smoking increases the risk of venous thrombosis and acts synergistically with oral contraceptive use. *Am J Hematol* 2008; 2: 97–102

Poon MC. Pharmacokinetics of factors IX, recombinant human activated factor VII and factor XIII. *Haemophilia* 2006; 4: 61–69

Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 10: 3698–3703

Pötzsch B, Madlener K. *Hämostaseologie*. 2. Auflage. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, 2010

Prandoni P, Lensing AWA, Prins MH, Frulla M, Marchiori A, Bernardi E, Tormene D, Mosena L, Pagnan A, Girolami A. Below-knee elastic compression stockings to prevent the post-thrombotic syndrome: a randomized, controlled trial. *Annals of internal medicine* 2004; 4: 249–256

Preissner KT. *Physiologie der Blutgerinnung und Fibrinolyse*. *Hamostaseologie* 2008; 05: 259–271

Ragoschke-Schumm A, Razouk A, Lesmeister M, Helwig S, Grunwald I, Fassbender K. Dosage Calculation for intravenous Thrombolysis of Ischemic Stroke: To weigh or to estimate. *Cerebrovasc Dis Extra* 2017; 7 : 103-110

Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 8983: 1133–1134

Reeve EB, Leonard B, Carlson T. Kinetic studies in vivo of antithrombin III. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1981; 680–694

Reitsma PH, Versteeg HH, Middeldorp S. Mechanistic view of risk factors for venous thromboembolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 3: 563–568

Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *The New England journal of medicine* 1995; 14: 912–917

Ridker PM, Hennekens CH, Miletich JP. G20210A mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in a large cohort of US men. *Circulation* 1999; 8: 999–1004

Righini M, Perrier A, Moerloose P, Bounameaux H. D-Dimer for venous thromboembolism diagnosis: 20 years later. *J Thromb Haemost*, 2008; 7: 1059–1071

Rijken DC, Lijnen HR. New insights in the molecular mechanism of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost* 2009; 7:4-13

Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995; 6: 1504–1508

Rosendaal FR, Reitsma PH. Genetics of venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2009; 301–304

Rosing J, Tans G, Govers-Riemslog JW, Zwaal RF, Hemker HC. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J Biol Chem* 1980; 1: 274–283

Rühl H, Berens C, Winterhagen A, Müller J, Oldenburg J, Pötzsch B. Label-Free Kinetic Studies of Hemostasis-Related Biomarkers Including D-Dimer Using Autologous Serum Transfusion. *PLOS ONE*, 2015; 12: e145012

Rühl H, Müller J, Harbrecht U, Fimmers R, Oldenburg J, Mayer G, Pötzsch B. Thrombin inhibition profiles in healthy individuals and thrombophilic patients. *Thromb Haemost* 2012; 5: 848–853

Sanson BJ, Simioni P, Tormene D, Moia M, Friederich PW, Huisman MV, Prandoni P, Bura A, Rejto L, Wells P, Mannucci PM, Girolami A, Büller HR, Prins MH. The incidence of venous thromboembolism in asymptomatic carriers of a deficiency of antithrombin, protein C, or protein S: a prospective cohort study. *Blood* 1999; 11: 3702–3706

Saray A, Mesihovic R, Gornjakovic S, Vanis N, Mehmedovic A, Nahodovic K, Glavas S, Papovic V. Association between high D-dimer plasma levels and ascites in patients with liver cirrhosis. *Med Arch* 2012; 6: 372–374

Schaer DH, Ross AM, Wassermann AG. Reinfarction, recurrent angina and reocclusion after thrombolytic therapy. *Circulation* 1987; 76: 57-62

Schreijer JM, Cannegieter SC, Meijers CM, Middeldorp S, Büller HR, Rosendaal FR. Activation of coagulation system during air travel: a crossover study. *Lancet* 2006; 9513: 832–838

Schulman S, Beyth RJ, Kearon C, Levine MN. Hemorrhagic complications of anticoagulant and thrombolytic treatment: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 2008; 6: 257-298

Segal JB, Brotman DJ, Necochea AJ, Emadi A, Samal L, Wilson LM, Crim MT, Bass EB. Predictive value of factor V Leiden and prothrombin G20210A in adults with venous thromboembolism and in family members of those with a mutation: a systematic review. *JAMA* 2009; 23: 2472–2485

Sharifi M, Mehdipour M, Bay C, Smith G, Sharifi J. Endovenous therapy for deep venous thrombosis: the TORPEDO trial. *Catheter Cardiovasc Interv* 2010; 3: 316–325

Shifman MA und Pizzo SV. The in vivo metabolism of antithrombin III and antithrombin III complexes. *J Biol Chem* 1982; 6: 3243–3248

Siller-Matula JM, Schwameis M, Blann A, Mannhalter C, Jilma B. Thrombin as a multi-functional enzyme. Focus on in vitro and in vivo effects. *Thromb Haemost* 2011; 6: 1020–1033

Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Arch Intern Med* 1998; 6: 585–593

Sodeck G, Domanovits H, Schillinger M, Ehrlich MP, Endler G, Herkner H, Laggner A. D-dimer in ruling out acute aortic dissection: a systematic review and prospective cohort study. *European heart journal* 2007; 24: 3067–3075

Souto JC, Almasy L, Borrell M, Blanco-Vaca F, Mateo J, Soria JM, Coll I, Felices R, Stone W, Fontcuberta J, Blangero J. Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT study. *Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia. Am J Hum Genet* 2000; 6: 1452–1459

Sprengers ED, Kluft C. Plasminogen activator inhibitors. *Blood* 1987; 2: 381–387

Studt JD. Angeborene Thrombophilien. In: Monika Bartels. Hrgs. Das Gerinnungskompodium. 2. Auflage. Stuttgart: George Thieme Verlag, 2003: 260-276

Taylor FB, Toh CH, Hoots WK, Wada H, Levi M. Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 2001; 5: 1327–1330

Thaler E, Lechner K. Antithrombin III deficiency and thromboembolism. *Clin Haematol* 1981; 2: 369–390

Verstraete M, Bounameaux H, Cock F de, van de Werf F, Collen DW. Pharmacokinetics and systemic fibrinolytic effects of recombinant human tissue-type plasminogen activator (rt-PA) in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 2: 506–512

Vine AK. Recent advances in haemostasis and thrombosis. *Retina* 2009; 1: 1–7

Virchow R. „Thrombose und Embolie. Gefässentzündung und septische Infektion“. *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin*. Frankfurt am Main: Meidinger & Sohn, 1846-1856; 219–732

Vogel CN, Kingdon HS, Lundblad RL. Correlation of in vivo and in vitro inhibition of thrombin by plasma inhibitors. *J Lab Clin Med* 1979; 4: 661–673

Vossen CY, Conard J, Fontcuberta J, Makris M, van der Meer FJM, Pabinger I, Palareti G, Preston FE, Scharrer I, Souto JC, Svensson P, Walker ID, Rosendaal FR. Risk of a first venous thrombotic event in carriers of a familial thrombophilic defect. The European Prospective Cohort on Thrombophilia (EPCOT). *J Thromb Haemost* 2005; 3: 459–464

Weber T, Högel S, Auer J, Berent R, Lassnig E, Kvas E, Eber B. D-Dimer in acute aortic dissection. *Chest* 2003; 123: 1375-1378

Weitz JI. Low-molecular-weight heparins. *The New England journal of medicine* 1997; 10: 688–698

Wells P, Hirsh J, Anderson D, Lensing AA, Foster G, Kearon C, Weitz J, D'Ovidio R, Cogo A, Prandoni P, Girolami A, Ginsberg J. Accuracy of clinical assessment of deep-vein thrombosis. *Lancet* 1995; 8961: 1326–1330

Wells PS, Anderson DR, Rodger M, Forgie M, Kearon C, Dreyer J, Kovacs G, Mitchell M, Lewandowski B, Kovacs MJ. Evaluation of D-dimer in the diagnosis of suspected deep-vein thrombosis. *The New England journal of medicine* 2003; 13: 1227–1235

Wells PS, Forgie MA, Rodger MA. Treatment of venous thromboembolism. *JAMA* 2014; 7: 717–728

Wells PS, Hirsh J, Anderson DR, Lensing AW, Foster G, Kearon C, Weitz J, D'Ovidio R, Cogo A, Prandoni P, Girolami A, Ginsberg JS. A simple clinical model for the diagnosis of deep-vein thrombosis combined with impedance plethysmography: potential for an improvement in the diagnostic process. *J Intern Med* 1998; 1: 15–23

Wessler S. Studies in intravascular coagulation. III. The pathogenesis of serum-induced venous thrombosis. *J Clin Invest* 1955; 4: 647–651

Witt I. Molekularbiologische Grundlagen und Diagnostik der hereditären Defekte von Antithrombin III, Protein C und Protein S. *Hamostaseologie* 1994; 04: 199–208

Yan SF, Mackman N, Kisiel W, Stern DM, Pinsky DJ. Hypoxia/Hypoxemia-Induced activation of the procoagulant pathways and the pathogenesis of ischemia-associated thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 9: 2029–2035

Yano Y, Kitagawa N, Gabazza E C, Morioka K, Urakawa H, Tanaka T, Katsuki A, Araki-Sasaki R, Hori Y, Nakatani K, Taguchi O, Sumida Y, Adachi Y. Increased plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor levels in normotensive type 2 diabetic patients

with microalbuminuria. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2003; 2: 736–741

Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed* 2010; 99: 306-314

9. Danksagung

Ich möchte mich bei alle Menschen herzlich bedanken, die mich in der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben. Ohne die Hilfe zahlreicher Personen hätte diese Arbeit in der Form nicht realisiert werden können. Insbesondere gilt mein Dank folgenden Personen:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Bernd Pötzsch für die Überlassung des Themas der Arbeit und die konstruktiven Ratschläge bei der Umsetzung,

PD Dr. med. Heiko Rühl, für die inhaltliche Ausrichtung und die thematische Eingrenzung, sowie für die wertvollen Tipps und Ermutigungen zur Bearbeitung des Themas, die mich in der Umsetzung stets begleitet haben,

meinen Eltern, die mich in meinem Leben und insbesondere in meinem Studium immer mit großem Engagement unterstützt haben, ihnen ist diese Arbeit gewidmet,

meinem Ehemann Kaspar, der mich in allen Aufgaben bedingungslos und unermüdlich unterstützt hat und mir für meine persönliche Verwirklichung stets den Rücken freihält,

meinen lieben Freunden Dr. Lars Godmann und Theresa Bathe, sowie meiner lieben Schwester Dr. med. Franziska Isabelle Winterhagen für das Korrekturlesen der Arbeit,

allen weiteren lieben Menschen, die mich durch das Leben begleiten und mich stets für meinen beruflichen Werdegang motiviert haben.