

Aus dem Medizinischen Zentrum für
Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik - Zentrallaboratorium -
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Renz
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Neue chromogene Screening-Methoden der Fibrinolyse Diagnostik

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg vorgelegt

von
Frauke Baumeister, geb. Hinz
aus Gießen

Marburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 26.09.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Rothmund

Referent: PD Dr. med. Stief

Korreferent: PD Dr. med. Zeiler

	Seite
Inhaltsverzeichnis	2
1. Einleitung	8
1.1. Physiologie der Hämostase	8
1.1.1. Plasmatische Blutgerinnung	9
1.1.2. Plasmatische Fibrinolyse	11
1.1.2.1. Plasminogenaktivatoren	16
1.1.2.2. Inhibitoren der Fibrinolyse	18
1.2. Fragestellung der Arbeit	22
2. Material und Methoden	23
2.1. Fibrinolysis Parameters Assay (FIPA)	23
2.1.1. Material	23
2.1.1.1. Blutproben	23
2.1.1.2. Human-Plasma	23
2.1.1.3. Urokinase-Reagenz	23
2.1.1.4. Chromogenes Plasmin-Substrat	24
2.1.1.5. Materialien zur Optimierung und Test-Abhängigkeit des FIPA	24
2.1.2. Methode	24
2.1.2.1. Standard FIPA	24
2.1.2.2. Optimierung der Urokinase-Aktivität	25
2.1.2.3. Optimierung der Tranexamsäure-Konzentration	25
2.1.2.4. Test-Abhängigkeit von verschiedenen Parametern	25
2.1.2.5. Test-Validierung	26
2.1.2.6. Normalverteilung	27
2.1.2.7. Korrelation zwischen funktionellem PAI-1 und FIPA	27
2.2. Activated Fibrinolysis Parameters Assay (AFIPA)	27
2.2.1. Material	27
2.2.1.1. Blutproben	27
2.2.1.2. Oxidans	28

	Seite
2.2.1.3. Aktivator-Reagenz	28
2.2.1.4. Chromogenes Plasmin-Substrat	28
2.2.2. Methode	29
2.2.2.1. Activated Fibrinolysis Parameters Assay (AFIPA)	29
2.2.2.2. Optimierung der Ellagsäure	29
2.2.2.3. Test-Validierung	29
2.3. PAI-2 Test	30
2.3.1. Material	30
2.3.1.1. Blutproben	30
2.3.1.2. Urokinase-Reagenz	30
2.3.1.3. Oxidans	31
2.1.3.4. Glu-Plasminogen	31
2.1.3.5. Chromogenes Plasmin-Substrat	31
2.3.2. Methode	31
2.3.2.1. PAI-2 Test	31
2.3.2.2. Optimierung der Inkubationszeit	32
2.3.2.3. Test-Validierung	32
2.3.2.4. Korrelation zwischen funktioneller PAI-1 und PAI-2 Aktivität	33
3. Ergebnisse	34
3.1. Fibrinolysis Parameters Assay (FIPA)	34
3.1.1. Optimale Urokinase-Aktivität	34
3.1.2. Optimale Tranexamsäure-Konzentration	35
3.1.3. Abhängigkeit von plasmatischem PAI	37
3.1.4. Abhängigkeit von Aprotinin und Heparin	38
3.1.5. Abhängigkeit von reinem α_2 -Makroglobulin und α_2 -Antiplasmin	39
3.1.6. Einfluß von TAFI, scu-PA und t-PA auf FIPA	40
3.1.7. Test-Validierung	41
3.1.8. Normalverteilung	42

	Seite
3.2. Activated Fibrinolysis Parameters Assay (AFIPA)	43
3.2.1. Arginin stabilisiertes Citratplasma	44
3.2.2. Ellagsäure-Konzentration im Neothromtin [®] -Reagenz	44
3.2.3. Test-Validierung	44
3.3. Plasmatischer PAI-2 Test	45
3.3.1. PAI-2 Standardkurven	46
3.3.2. Korrelation des funktionellen PAI-2 Tests mit einem Antigentest	48
3.3.3. Einfluß von Heparin	49
3.3.4. Test-Validierung	49
3.3.5. PAI-1 und PAI-2	50
4. Diskussion	51
4.1. Fibrinolysis Parameters Assay (FIPA)	51
4.2. Activated Fibrinolysis Parameters Assay (AFIPA)	54
4.3. Plasmatischer PAI-2 Test	55
5. Zusammenfassung	57
5.1. Fibrinolysis Parameters Assay (FIPA)	57
5.2. Activated Fibrinolysis Parameters Assay (AFIPA)	57
5.3. Plasmatischer PAI-2 Test	58
5. Abstract	59
5.1. Fibrinolysis Parameters Assay (FIPA)	59
5.2. Activated Fibrinolysis Parameters Assay (aFIPA)	60
5.3. Plasmatic PAI-2 Assay	60
6. Literaturverzeichnis	62

Verzeichnis der Abkürzungen:

α_2 -AP	α_2 -Antiplasmin
μ l	Mikroliter
μ mol	Mikromol
Abb.	Abbildung
AFIPA	Activated Fibrinolysis Parameters Assay
AMCA	Aminomethylcyclohexansäure (Tranexamsäure)
Arg	Arginin
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calciumionen
D	Dalton
F II	Faktor II (Prothrombin)
F IIa	aktivierter Faktor II (Thrombin)
F IX	Faktor IX (Christmas-Faktor)
F IXa	aktivierter Faktor IX (Christmas-Faktor)
F V	Faktor V (Proaccelerin)
F Va	aktivierter Faktor V (Accelerin)
F VII	Faktor VII (Proconvertin)
F VIIa	aktivierter Faktor VII (Convertin)
F VIII	Faktor VIII
F VIIIa	aktivierter Faktor VIII
F X	Faktor X (Stuart-Prower-Faktor)
F Xa	aktivierter Faktor X
F XI	Faktor XI (Plasma-Thromboplastin-Antecedent)
F XIa	aktivierter Faktor XI
F XII	Faktor XII (Hageman-Faktor)
F XIIa	aktivierter Faktor XII
F XIII	Faktor XIII (fibrinstabilisierender Faktor)
F XIIIa	aktivierter Faktor XIII
FIPA	Fibrinolysis Parameters Assay
g	Gramm
Glu	Glutaminsäure

h	Stunde
HMW	High molecular weight
HMWK	High molecular weight-Kininogen
IU	internationale Einheiten
KCl	Kaliumchlorid
KIU	Kallikrein-Inhibitor-Einheiten
l	Liter
LMW	Low molecular weight
Lys	Lysin
mA	Milliabsorptionseinheit
Met	Methionin
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
mmol	Millimol
n	Anzahl
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PA	Plasminogenaktivator
PAI	Plasminogenaktivator-Inhibitor
P-Lip	Phospholipide
PMA	Phorbolmyristataacetat
PMN	Polymorphnukleäre Granulozyten
r	Korrelationsfaktor
RT	Raumtemperatur
sct-PA	single-chain tissue-type plasminogen activator
scu-PA	Prourokinase (single-chain urokinase-type plasminogen activator)
TAFI	Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor
tct-PA	two-chain tissue-type plasminogen activator
tcu-PA	two-chain urokinase-type plasminogen activator

TNF	Tumornekrosefaktor
t-PA	Gewebeplasminogenaktivator (tissue-type plasminogen activator)
U	Einheiten
u-PA	Urokinase (urinary-type plasminogen activator)
Val	Valin
VK	Variationskoeffizient
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

In der Geschichte der Medizin hat Blut immer eine große Bedeutung gehabt. Seit mehr als 2000 Jahren werden Thrombosen, Embolien und Varizen beschrieben. So erkannte Hippokrates, dass das Blut geschlachteter Tiere gerinnt und Aristoteles beschrieb die Notwendigkeit der Fibrinfäden für die Blutgerinnung [26].

Die Erforschung der Blutgerinnung und der Fibrinolyse seit dem 18. Jahrhundert erbrachten weitere Erkenntnisse. Mitte des 19. Jahrhunderts beschrieben A. Buchanan und A. Schmidt den Übergang von Fibrinogen in Fibrin als Enzymreaktion und entdeckten das Thrombin [25]. A. Dastre führte 1893 den Begriff „Fibrinolyse“ ein [43][109] und P. Morawitz veröffentlichte 1904 sein Schema der Blutgerinnung, das in seinen Grundprinzipien noch heute Gültigkeit besitzt [121][76].

Erst 50 Jahre später entdeckten R. Christensen und M. Macleod, daß das plasmatische fibrinolytische System aus der Bildung von Plasmin aus Plasminogen besteht [32]. In den darauf folgenden Jahren erfolgte die Erforschung der Plasminogenaktivatoren und der Inhibitoren der Fibrinolyse. Bis heute werden an der Fibrinolyse beteiligte Faktoren noch erstmals nachgewiesen, charakterisiert und für therapeutische Zwecke eingesetzt.

1.1. Physiologie der Hämostase

Die Hämostase basiert auf der Wechselwirkung zwischen Gefäßwand, Thrombozyten, plasmatischer Gerinnung und dem fibrinolytischen System. Die Entstehung und der Abbau von Thromben ist ein ausbalanciertes System.

Traditionell kann man die Hämostase in drei Phasen aufteilen:

- primäre Hämostase: Bildung des primären Plättchenthrombus.
- sekundäre Hämostase: Aktivierung der plasmatischen Gerinnung.
- Fibrinolyse: Auflösung von Fibringerinnseln und Erhaltung bzw. Wiederherstellung der Gefäßdurchgängigkeit.

Alle drei Phasen verlaufen parallel zueinander, wobei die Fibrinolyse etwas zeitversetzt ist, d.h. dass die primäre und sekundäre Hämostase-Aktivierung innerhalb von Sekunden bis Minuten verläuft, während die Fibrinolyse innerhalb von Stunden abläuft [163].

1.1.1. Plasmatische Blutgerinnung

Die Aktivierung der plasmatischen Gerinnung kann über zwei Reaktionswege erfolgen: das Extrinsic- und das Intrinsic-System [86][108][145]. Beide Reaktionswege resultieren in der Aktivierung von Faktor X zu Xa [116][69].

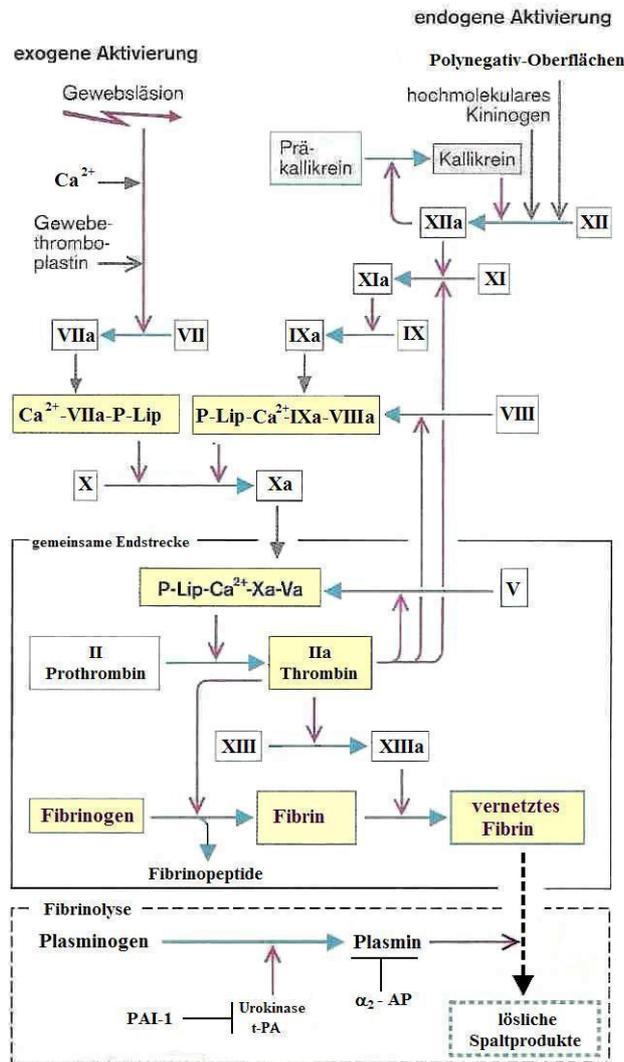


Abbildung 1.1.: Blutgerinnung und Fibrinolyse, modifiziert
Aus Klinke R, Silbernagel S: Lehrbuch der Physiologie [137].

Das Extrinsic-System wird aktiviert durch den bei einer Gewebeläsion frei werdenden membranständigen Gewebefaktor (TF) [149]. Anschließend bindet der Gewebefaktor Faktor VII bzw. VIIa [179][59]. Dieser Komplex aktiviert die plasmatische Gerinnungskaskade durch Umwandlung von Faktor X in Xa, was die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin bewirkt [178][129].

Der Aktivierungsweg des Intrinsic-Systems erfolgt über mehrfach negativ geladene Fremdoberflächen wie beispielsweise durch Glas, Kaolin, Sulfatide und andere Materialien [86][196]. Durch Kontakt mit diesen unphysiologischen Oberflächen werden Präkallikrein und Faktor XII unter Mitwirkung von hochmolekularem Kininogen aktiviert. Nachfolgend stimuliert Faktor XIIa in einer Kettenreaktion Faktor IX zu Faktor IXa, was dann letztlich über Faktor X zur Aktivierung von Prothrombin führt [178]. Zu dem Kontaktaktivierungssystem gehören also Präkallikrein, Faktor XII, Faktor XI und hochmolekulares Kininogen, wobei die ersten drei genannten im Plasma als Proenzyme vorliegen.

Fibrinbildung:

Als Endprodukt der plasmatischen Gerinnung entsteht durch die Einwirkung von Thrombin auf Fibrinogen ein Fibrinmonomer [59]. Diese polymerisieren spontan zu langen Fibrinfäden, wodurch sie ein weit verzweigtes und dichtes Netzwerk bilden [159].

Fibrinogen besteht aus drei Paaren unterschiedlicher Polypeptidketten: A α -, B β - und γ -Kette [54]. Durch die Einwirkung von Thrombin werden die Fibrinopeptide A und B vom Fibrinogen abgespalten und Fibrinmonomere entstehen [123][124].

Die polymerisierten Fibrinfäden werden von Plasmin an den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin gespalten [19]. Es entstehen als kleinste Abbauprodukte die Spaltprodukte D und E sowie das D-Dimer. Dieses Abbauprodukt unterscheidet sich von denen des Fibrinogens und dient deshalb als Plasmamarker bei der Unterscheidung zwischen Fibrinolyse und Fibrinogenolyse und als Hämostase-Aktivierungsmarker.

Plasmin wird durch proteolytische Aktivität von Plasminogenaktivatoren aus Plasminogen freigesetzt [100][142]. Dazu zählt der Gewebe-Plasminogenaktivator (t-PA) und die Urokinase (u-PA) [46][101]. Plasmin und die Plasminogenaktivatoren gehören zu der Gruppe der Serinproteasen. Aktivierte proteolytische Serinproteasen werden durch Serinprotease-Inhibitoren (Serpine) durch 1:1 Komplexierung inaktiviert. Plasminogen kommt im Plasma bzw. Serum von Erwachsenen in einer Konzentration von ca. 0,16 mg/ml bzw. 1,8 µmol/l mit einem Schwankungsbereich zwischen 0,1 und 0,2 mg/ml vor. Das in der Leber synthetisierte Glykoprotein besitzt ein Molekulargewicht von 92 000 D [38].

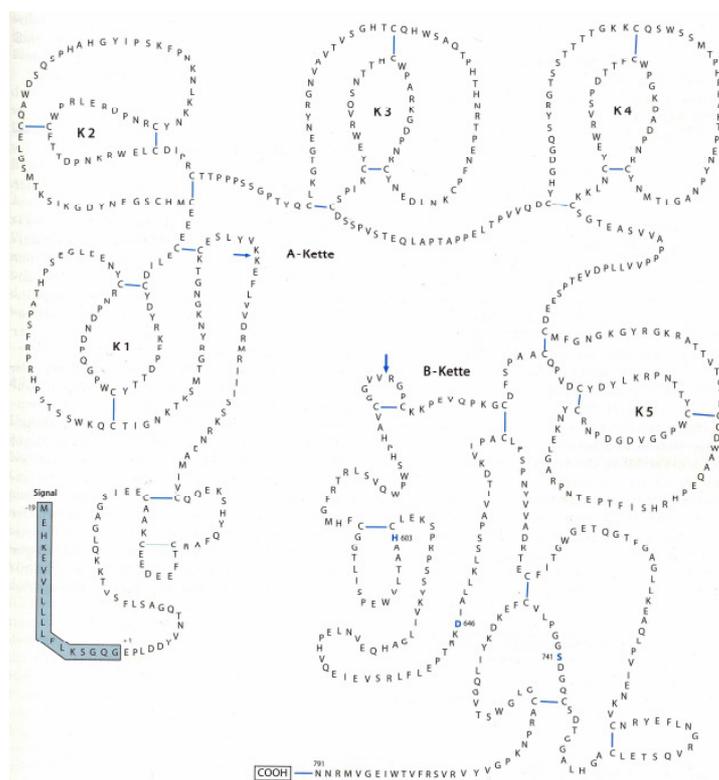


Abbildung 1.3.: Molekülstruktur des Plasminogenmoleküls

Aus Müller-Berghaus G, Pötzsch B: Hämostaseologie: Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik [155].

Die Molekülstruktur von Plasminogen enthält im NH₂-terminalen Bereich ein aus 19 Aminosäuren bestehendes Signalpeptid, welches intrazellulär abgespalten wird. Plasminogen hat fünf typische Kringeldomänen mit „lysine binding site“ (LBS) unterschiedlicher Affinität, die für die Bindung von Plasminogen an Fibrin und α_2 -Antiplasmin, aber auch an Tetranektin, histidinreiche Glykoproteine, Thrombospondin, Immunglobulin G und Strukturen der extrazellulären Matrix verantwortlich sind. Durch die Spaltung der Peptidbindung Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶² entstehen die A- und B-Kette des Plasmins, die durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden bleiben [100][143][38]. Das Zweiketten-Plasmin trägt an der schweren Kette oder A-Kette das NH₂-terminale Ende und an der leichten Kette oder B-Kette das COOH-terminalen Ende des Plasminogens. Die B-Kette des Plasmins enthält das aktive Zentrum der Serin-Protease, das aus den drei Aminosäuren His⁶⁰², Asp⁶⁴⁵ und Ser⁷⁴⁰ gebildet wird [39].

Im plasmatischen PAI-2 Test wird Glu-Plasminogen verwendet, wobei sich das native Plasminogen am NH₂-terminalen Ende durch die Aminosäure Glutaminsäure auszeichnet. Durch limitierte plasmatische Spaltung können modifizierte Formen mit NH₂-terminalen Lysin, Valin oder Methionin entstehen, wobei vornehmlich Lys-Plasminogen vorkommt [38]. Durch Hydrolyse von Arg⁶⁷-Met⁶⁸, Lys⁷⁶-Lys⁷⁷ oder Lys⁷⁷-Val⁷⁸ werden Peptidbindungen gespalten und es entstehen die drei oben genannten Plasminogenvarianten. Glu-Plasminogen besitzt eine Plasmahalbwertszeit von $2,24 \pm 0,29$ Tagen, Lys-Plasminogen von nur 0,8 Tagen [39]. Die Aktivierung von Glu-Plasminogen zu Plasmin durch Urokinase in einem gereinigten System erfolgt wesentlich langsamer als die Aktivierung von Lys-Plasminogen, in beiden Fällen entsteht allerdings Lys-Plasmin [34][188][176].

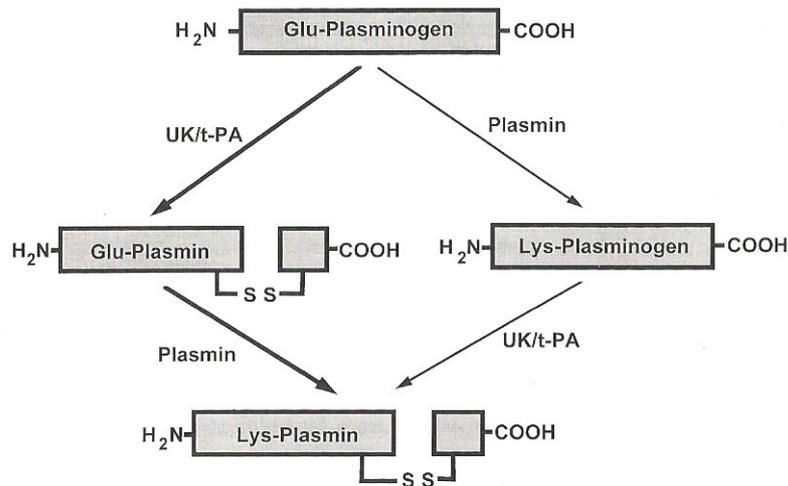


Abbildung 1.4.: Plasminogen-Aktivierung

Aus Müller-Berghaus G, Pötzsch B: Hämostaseologie: Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik [155].

In der Gegenwart von omega-Aminocarbonsäuren, wie z.B. 6-Aminohexansäure (Tranexamsäure, AMCA) steigt die Aktivierungsrate von Glu-Plasminogen durch Urokinase stark an bis auf den Maximalwert der Aktivierungsrate von Urokinase auf Lys-Plasminogen. AMCA verändert nicht die Aktivierungsrate von Lys-Plasminogen [34][188][112][189].

Das aus Plasminogen aktivierte Plasmin kann nicht nur Fibrin, sondern auch Fibrinogen proteolytisch abbauen. Dabei kommt es zu Fibrin- oder Fibrinogenspaltprodukten. [130][110]. Fibrin/Fibrinogen wird durch Plasmin zunächst in großmolekulare, anschließend in kleinmolekulare Spaltprodukte abgebaut. Schließlich entstehen aus einem Molekül Fibrinogen zwei D- und ein E-Spaltprodukt, wobei vornehmlich die D-Dimere als Fibrinspaltprodukte von einem besonderen klinischen Interesse sind, da sie die Aktivität von Thrombin und Plasmin anzeigen, d.h. sie helfen eine Hämostase-Aktivierung zu diagnostizieren. Eine Verminderung bzw. einen Mangel an Plasminogen können bei endogenen Hyperfibrinolyse, bei systemischen fibrinolytischen Therapien oder durch eine eingeschränkte Lebersyntheseleistung vorkommen. Weiterhin können die Ursachen bei einer angeborenen Dysplasminogenämie, einer Verbrauchskoagulopathie, einem operativen Eingriffen oder als physiologischer Befund beim Neugeborenen liegen. Erhöhte Plasminogenkonzentrationen treten vor allem bei Entzündungen auf [14].

Das fibrinolytische System wird durch die beiden Serpine PAI-1 und α_2 -Antiplasmin kontrolliert: PAI-1 inaktiviert u-PA und t-PA, α_2 -Antiplasmin inaktiviert Plasmin (Abb. 1.1.). Eine weitere Regulierung erfolgt durch Fibrin und durch zelluläre Rezeptoren [141][28][41].

Zu dem Kontaktaktivierungssystem der Fibrinolyse gehören Präkallikrein, Faktor XII, Faktor XI und hochmolekulares Kininogen [158]. Faktor XII (Hageman-Faktor) ist ein einkettiges Glykoprotein im Plasma mit einem Molekulargewicht von 78 000 D. Die Plasmakonzentration beträgt 30 $\mu\text{g/ml}$ [42][196].

Das im Plasma vorkommende Präkallikrein ist ein einkettiges Glykoprotein der γ -Globulinfraktion. Die Plasmakonzentration beträgt ca. 35 bis 50 mg/l, wobei etwa 75% des Präkallikrein in komplexierter Form mit hochmolekularen Kininogenen auftreten und 25% in freier Form zirkulieren. Hauptsächlich findet die Biosynthese von Präkallikrein in der Leber statt, ebenfalls in Niere, Nebenniere und Plazenta [42][196].

Als initiale Komponente des Gerinnungs- und Fibrinolyseystems aktiviert Kallikrein nach Kontakt mit einer polynegativ geladenen Oberfläche Prourokinase zu Urokinase, die dann Plasminogen zu Plasmin aktiviert [157]. Faktor XII kommt vornehmlich im Plasma und interstitiellen Körperflüssigkeiten vor und wird in der Leber synthetisiert. Die Halbwertszeit beträgt 50 – 70 h [42].

Kallikrein und Faktor XII aktivieren sich gegenseitig [56]. Oberflächenaktive Substanzen, zu denen polynegative Substanzen wie Ellagsäure, Dextransulfat, Glas, Koalin zählen [182], binden Kontaktfaktoren sowie Präkallikrein und HMWK (High molecular weight kininogen) an ihre negativ geladene Oberflächen. Faktor XIIa aktiviert Präkallikrein zu Kallikrein, das wiederum zusammen mit seinem Kofaktor HMWK den Faktor XII zu Faktor XIIa aktivieren kann (Kallikrein-Loop) [154][87]. Diese gegenseitige Aktivierung setzt sich solange fort, bis die Substrate lokal erschöpft sind.

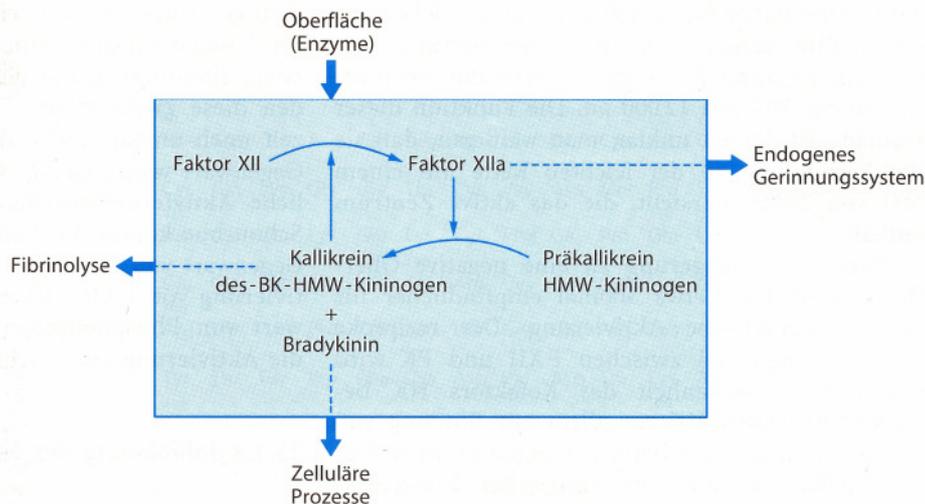


Abbildung 1.5.: Funktion des Faktor XII in Gerinnung und Fibrinolyse

Aus Müller-Berghaus G, Pötzsch B: Hämostaseologie: Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik [111].

Faktor XII wird durch die Bindung an polynegativ geladenen Oberflächen ca. 500mal empfindlicher für die proteolytische Aktivierung. Durch die Anwesenheit des Kofaktors HMWK wird der reziproke Aktivierungsprozeß zwischen Faktor XII und Präkallikrein beschleunigt. Kallikrein ist der Hauptaktivator von Faktor XII. Aktiviertes Präkallikrein kann das assoziierte HMWK rasch und effizient unter Freisetzung von Bradykinin spalten [65][196].

1.1.2.1. Plasminogenaktivatoren

Zu den Plasminogenaktivatoren gehören der Gewebepasminogenaktivator (t-PA) [73] und die Urokinase (u-PA) [17][75].

Der Gewebepasminogenaktivator (t-PA) wird aus Endothelzellen durch verschiedene Stimuli wie Thrombin, Hormonen (Östrogene, Glukokortikoide, Gonadotropine), vasoaktiven Substanzen, Stress oder venösem Stau freigesetzt. Der Plasmaspiegel von t-PA Antigen beträgt ca. 5 ng/ml.

t-PA bindet an Fibrin. Diese Veränderung der molekularen Konformation des t-PA Moleküls bewirkt, dass t-PA mit höherer Affinität Plasminogen bindet und folglich Plasmin aktiviert. Plasminogen ist das einzige bekannte Substrat des t-PA. Die Endothelzellen sezernieren t-PA in einkettiger Form (sct-PA), das durch Plasmin in die zweikettige Form (tct-PA) überführt wird [52]. Im Gegensatz zu den anderen

Serinproteasen ist bereits die einkettige Form aktiv. Die katalytische Aktivität des tct-PA ist in Anwesenheit von Fibrin allerdings 20-50mal höher als in Abwesenheit eines Stimulans.

Zu den endogenen physiologischen Plasminogenaktivatoren auch Serinproteasen genannt gehört Urokinase („two-chain urokinase type“, tcu-PA = u-PA), ebenso wie der Gewebeplasminogenaktivator t-PA. Serinproteasen bestehen aus einer katalytischen COOH-terminalen (leichte Kette) und einer nicht katalytischen NH₂-terminalen (schwere Kette) funktioneller Region. Weiterhin kommen in den fibrinolytischen Proteasen Kringeldomäne, Epidermal-Growth-Factor-Domäne bzw. Fingerdomäne in unterschiedlicher Kombination zur Regulation der Proteaseaktivität vor.

Urokinase ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 54 000 (HMW-tcu-PA)/33 000 (LMW-tcu-PA). Die niedermolekulare Form der Urokinase (LMW-tcu-PA) entsteht durch Abspaltung eines NH₂-terminalen Anteils der schweren Kette und besteht aus 157 Aminosäuren, während die schwere Form aus 253 Aminosäuren aufgebaut ist [39][74]. Die intermolekulare Disulfidbrücke zwischen Cys 194 und Cys 222 ist für die Aktivierung der Urokinase nötig [118]. Beide Formen der Urokinase, Low molecular weight urokinase und high molecular weight urokinase, dienen als Thrombolyse-Präparat [148][79][138][184]. Die Plasmakonzentration beträgt ca. 0,008 mg/l bzw. 150 pmol/l mit einer Plasmahalbwertszeit von 5-10 Minuten [144]. Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen, aktivierte Zellen wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten, aber auch Tumorzellen und Nierenzellen synthetisieren die inaktive Zymogenform der Urokinase, die Prourokinase („single-chain urokinase-type“, scu-PA) [136][45]. Die einkettige Prourokinase wird durch Kallikrein oder Plasmin in die zweikettige Urokinase umgewandelt [74][106]. Urokinase ist Fibrin unabhängig und wesentlich aktiver als Prourokinase [81]. Mit hoher Affinität aktiviert Urokinase das inaktive Zymogen Plasminogen proteolytisch in das aktive Enzym Plasmin. α_2 -Makroglobulin oder Antithrombin III, aber auch α_1 -Antitrypsin III sind langsame Urokinase-Inhibitoren [122][135][36][37][153].

Im Plasma liegt Prourokinase in einkettiger Form (scu-PA) vor, die nach seiner Aktivierung in ein Zweikettenmolekül (tcu-PA), d.h. Urokinase umgewandelt wird. In humanem Blut ist die Prourokinase sehr stabil. Es ist ein einkettiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 54 000 D [39][125]. Der Plasmaspiegel von scu-PA beträgt ca. 5 ng/ml. Die Halbwertszeit der aktiven Plasminogen Aktivatoren beträgt

ca. 5 Minuten. Es besteht aus einer A-Kette mit der NH₂-terminalen Region und einer B-Kette mit der COOH-terminalen Region. Durch limitierte Proteolyse wird Prourokinase in high molecular weight urokinase überführt. Die Aktivierung von Plasminogen durch Prourokinase erfolgt durch drei aufeinander folgende sequentielle Reaktionen. Im ersten Schritt wird Plasminogen direkt durch scu-PA, das sich als Enzym in dieser Instanz verhält, zu Plasmin aktiviert. Im zweiten Schritt wird scu-PA, das sich diesmal als Substrat verhält, durch das im ersten Schritt gebildete Plasmin zu Urokinase umgewandelt. Im dritten Schritt wird Plasminogen direkt zu Plasmin aktiviert durch die im zweiten Schritt gebildete Urokinase. Die A-Kette von Prourokinase und High Molecular Weight Urokinase beinhaltet eine homologe Region zu dem humanen epidermalen growth factor (EGF). Die B-Kette besitzt Homologie zu den B-Ketten anderer Serinproteasen [148].

Nichtionische Detergenzien wie Triton X-100, sowie insbesondere Tween 80 steigern die Plasminogen Aktivierung durch Urokinase oder auch durch t-PA [93].

1.1.2.2. Inhibitoren der Fibrinolyse

Die Hemmung der Fibrinolyse in der flüssigen Phase kann auf zwei Arten erfolgen: einerseits auf der Ebene des Effektorenzyms Plasmin durch α_2 -Antiplasmin [101][177] und andererseits auf der Ebene der Aktivierung von Plasminogenaktivatoren durch Plasminogenaktivator-Inhibitoren (PAI-1, PAI-2) [99].

Der Plasminogenaktivator-Inhibitor PAI-1 gilt als wichtigster Inhibitor der Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA [83][82][45][60]. PAI-1 ist ein einkettiges Glykoprotein und wird von vaskulären Endothelzellen, Thrombozyten, Hepatozyten und anderen Zellen produziert [2][45].

Im Plasma kommt PAI-1 in einer stabilisierten freien und in einer kovalent gebundenen Form vor, wobei nur die freie Form aktiv ist. Das Molekül wird als einkettiges Polypeptid synthetisiert und hat ein Molekulargewicht von 52 000 mit einer Plasmaaktivität von ca. 1 u-PA inhibierender Einheit/ml (ca. 10 ng/ml). PAI-1 inaktiviert Plasminogenaktivatoren (PA), indem es einen PA-PAI-Komplex bildet. Die spontane t-PA-Aktivität des Normalplasmas ist durch die hohe Konzentration an PAI-1 gegenüber t-PA nahezu 0 IU/ml.

Der PAI-1 Spiegel des Blutes kann durch verschiedene Hormone, wie z.B. Kortikosteroide und Insulin, aber auch durch Zytokine, Akut-Phase-Reaktion, Körpergewicht, Triglyzeride und Schwangerschaft beeinflusst werden. Plasminogenaktivator-Inhibitoren werden inaktiviert z.B. durch Komplexbildung mit t-PA und u-PA oder mittels Oxidanzien oder durch Thrombin, sowie durch die Zerstörung durch Elastase [80][162].

Der PAI-1 Spiegel im Blut wird durch Diurese, Hormone (Kortikoide, Insulin, Adrenalin, Angiotensin II), Körpergewicht, Schwangerschaft, Triglyzeriden, Zytokinen und Alter beeinflusst [3][195].

Bei einer Erniedrigung des PAI-1 Spiegels kann Blutungsneigung auftreten. Dagegen verursacht ein erhöhter PAI-1 Spiegel eine Hypofibrinolyse. Erhöhte PAI-1 Werte wurden bei unspezifischen akuten Erkrankungen, venöser und arterieller Thrombose, Myokardinfarkt, Arteriosklerose, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Sepsis, Disseminierte intravasale Gerinnung, Malignomen und Lebererkrankungen entdeckt [195][162].

Der Plasminogenaktivator Inhibitor Typ 2 (PAI-2) ist ein wichtiges Regulationsprotein der Fibrinolyse und der Entzündungen [85]. u-PA und das zweikettige t-PA kann PAI-2 besser und schneller als das einkettige t-PA und Plasmin inhibieren. Im Vergleich zu PAI-1 ist PAI-2 ein 10fach langsamerer Inhibitor. Es sind zwei Formen des PAI-2 bekannt: die hauptsächlich intrazelluläre nicht-glykosylierte Form (MG 47000) und die sezernierte glykosylierte Form (MG 60000) [11]. Beide scheinen sich nicht in ihrer biologischen Aktivität zu unterscheiden.

Normalerweise wird PAI-2 in Zellen produziert, die zum retikulohistiozytären System gehören, wie zum Beispiel Monozyten bzw. Makrophagen, Fibroblasten [11] und in Trophoplasten der Plazenta. Die Synthese wird durch Zytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren reguliert. Tumornekrosefaktor (TNF), Phorbolster (PMA) und Endotoxin wirken stimulierend und Glukokortikoide wirken supprimierend.

PAI-2 wurde in der Plazenta im Trophoblastenepithel in hohen Konzentrationen gefunden [10][128]. Es wird vermutet, dass PAI-2 das Trophoblastenepithel vor frühzeitiger proteolytischer Degradation schützt. PAI-2 scheint ein Marker für die Funktion der fetoplazentaren Einheit zu sein [128][66].

Es kommt in zwei verschiedenen Formen vor, die sich in ihrer biologischen Aktivität nicht unterscheiden: 1. eine nicht-glykosylierte Form (LMW) mit ca. 75 kDa, die vorzugsweise intrazellulär vorkommt und 2. eine glykosylierte Form (HMW) mit ca. 130 kDa, die sezerniert wird [11][20][94]. Nur eine geringe Menge an PAI-2 wird in die Blutzirkulation abgegeben. Daher sind im fetalen, männlichen oder nicht schwangeren Blut sehr geringe PAI-2 Mengen oder kein PAI-2 nachweisbar. Während der Schwangerschaft steigen die Plasmawerte von PAI-2 an. Diese können ab der 8. Schwangerschaftswoche nachgewiesen werden, steigen bis zur Entbindung an und persistieren in der mütterlichen Zirkulation bis zu 7 Tagen nach der Entbindung [20][95][96][47][49][194][16]. In einer gesunden Schwangerschaft mit normaler Entwicklung des Embryos bilden die Plazenta-Throphoblasten-Zellen große Mengen an PAI-2 (>20 Urokinase inhibierende Einheiten/ml) [95]. Eine Schwangerschaft wird von massiven Veränderungen im hämostaseologischen System begleitet [180][22]. Eine Plazentainsuffizienz, wie zum Beispiel bei der Präeklampsie, resultiert in einem abfallenden PAI-2 Blutspiegel und einem ansteigendem PAI-1 [95][48][11][197].

Das α_2 -Antiplasmin ist der wichtigste spezifische und funktionelle Inhibitor des Plasmins [41][114]. Es ist ein einkettiges Glykoprotein, das man in der α_2 -Globulinfraktion findet und ein Molekulargewicht von 70 000 D besitzt [39][120]. Das in der Leber synthetisierte α_2 -Antiplasmin besitzt eine Halbwertszeit von $2,6 \pm 0,32$ Tagen [115]. Die Plasmakonzentration beträgt 70 mg/l [122] [193], diese stellt ungefähr die Hälfte der Plasmakonzentration von Plasminogen dar. Ebenso kann α_2 -Antiplasmin neben Plasmin auch Trypsin, Chromotrypsin und weitere Proteasen des Gerinnungs- und des Kininogensystems inaktivieren, wobei deutliche Unterschiede in der Affinität und Reaktionsgeschwindigkeit mit den einzelnen Substraten bestehen. Die höchste Affinität und Reaktionsgeschwindigkeit zeigt das Serpin α_2 -Antiplasmin zur Serin-Protease Plasmin. Es bindet im Verhältnis 1:1 mit Plasmin, so dass bei massiver Plasminogen-Aktivierung große Mengen an freiem Plasmin auftreten [14]. Die im COOH-terminalen Bereich lokalisierte Plasminogenbindungsstelle ist für die hohe Spezifität des α_2 -Antiplasmin verantwortlich. Es entstehen konkurrierende Interaktionen an der „lysine binding site“ (LBS) zwischen Plasminogen und α_2 -Antiplasmin, der α -Kette von Fibrin/Fibrinogen und omega-Aminocarbonsäure wie ϵ -Aminocaprinsäure (EACA) oder Tranexamsäure (AMCHA = Aminomethylcyclohexanoic-acid) [181]. Plasmin bindet an α_2 -Antiplasmin über die „lysine binding sites“ an die Lysine in Position 452 und 436 des α_2 -Antiplasmin,

wonach es zur Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen Ser⁷⁴⁰ des Plasmins und Arg³⁶⁴ des α_2 -Antiplasmins kommt. Dadurch ist das aktive Zentrum von Plasmin blockiert. Während eines Gerinnungsprozesses wird ca. 25% des plasmatischen α_2 -Antiplasmin kovalent an Fibrinogen durch Faktor XIIIa gebunden [97]. Dadurch kann α_2 -Antiplasmin zur Stabilität des Fibringerinnsels beitragen, indem es kleinere Mengen von Plasmin während eines Gerinnungsvorganges sofort inhibieren kann [8]. α_2 -Antiplasmin verbindet sich folglich mit aktivem Plasmin zu einem inaktiven Komplex und verhindert dadurch eine vorzeitige Fibrinolyse des Fibringerinnsels [102][104][40]. Zellgebundenes Plasmin kann im Gegensatz zu Plasmin in der flüssigen Phase nicht mehr durch α_2 -Antiplasmin gehemmt werden.

Es können angeborene, autosomal rezessiv vererbte oder erworbene Ursachen eines α_2 -Antiplasminmangels vorliegen, allerdings ist dieser Parameter nahezu ausschließlich bei erhöhter fibrinolytischer Aktivität vermindert. Aber auch fortgeschrittene Lebererkrankungen wie z.B. Leberzirrhose [7], ausgeprägter Mangel an α_2 -Antiplasmin bei akuter Promyelozytenleukämie [174], größeren operativen Eingriffen und bei Hämodilation können einen α_2 -Antiplasminmangel verursachen. Es kann die fibrinolytische Aktivität von Plasmin nicht mehr reguliert werden und dadurch kommt es zu einer vorzeitigen Fibrinolyse von Fibringerinnseln [9].

Bei einem α_2 -Antiplasmin-Mangel kommt es zu einer typischen Blutungssymptomatik: zunächst erfolgt eine Blutstillung, der dann sehr schnell eine starke und lang anhaltende Blutung folgt. Als Antifibrinolytikum wirkt Tranexamsäure, welches als Lysin-Analogon die Lysin-Bindungsstellen im Plasmin-(ogen) blockiert. Alternativ kann mit dem Plasmin-Inhibitor Aprotinin therapiert werden [105], das den Vorteil einer besseren Steuerbarkeit besitzt.

Zu den unspezifischen fibrinolytischen Inhibitoren zählt das α_2 -Makroglobulin, das neben anderen Proteinasen wie z.B. Thrombin, Kallikrein und Elastase auch Plasmin und die Plasminogenaktivatoren inhibieren kann. Das α_2 -Makroglobulin ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 720 000 D und im Plasma in einer Konzentration von 2 – 4 mg/ml vorliegt. Jedes einzelne α_2 -Makroglobulinmolekül besteht aus vier identischen Untereinheiten, wobei das COOH- und NH₂-terminale Ende jeder Untereinheiten „armförmig“ nach oben gerichtet ist. Das Plasminmolekül mit

seinem relativ hohen Molekulargewicht von 88 000 D und seiner starken Asymmetrie kann durch Interaktion mit α_2 -Makroglobulin einen 1:1 Komplex ausbilden [92]. α_2 -Makroglobulin interagiert schwächer und wesentlich langsamer mit Plasmin als α_2 -Antiplasmin. Plasmin wird komplexiert und reversibel inhibiert [39][177].

1.2. Fragestellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines schnellen, einfachen, handhabbaren und wirtschaftlich funktionellen Globaltest für die Fibrinolyse-Diagnostik. Für den Fibrinolysis Parameters Assay (FIPA) wird die optimale Urokinase-Plasminogenaktivator-Aktivität, die optimale Tranexamsäure-Konzentration, die Präzision, Sensitivität, Linearität, Wiederfindungsrate nach Aufstockung, Normalverteilung und Testabhängigkeit von verschiedenen Parametern bzw. Störfaktoren sowie die Anwendbarkeit im Laboralltag bestimmt. Dieses ist das Schwerpunktthema der vorliegenden Arbeit.

Darüber hinaus wird in dieser Arbeit die Grundzüge eines weiteren Globaltests der Fibrinolyse Diagnostik vorgestellt, der auf der physiologischen Kontaktaktivierung der Fibrinolyse beruht. Bei der Methode des Activated Fibrinolysis Parameters Assay (AFIPA) erfolgt die Stabilisierung von plasmatischer scu-PA, die Optimierung der Ellagsäure-Konzentration und die Validierung des Tests.

Ein weiterer Test, der die Plasminogenaktivator Inhibitor Typ 2 Aktivität im Blut bestimmt, wird unter der Berücksichtigung der Optimierung der Inkubationszeit, der Testvalidierung und der Korrelation zwischen PAI-1 und PAI-2 erarbeitet.

2. Material und Methoden

2.1. Fibrinolysis Parameter Assay (FIPA)

2.1.1. Material

2.1.1.1. Blutproben

Für den FIPA wurde von gesunden Blutspendern im Alter zwischen 18 - 65 Jahren Blut entnommen. Das venöse Blut wurde ohne verlängerte Blutstauung in vorbereitete Plastikröhrchen, die 1/10 106 mM Natrium-Citrat enthielten, abgenommen (Monovette[®], Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland). Sofort nach Entnahme wurde die verschlossene Monovette rotiert, um eine optimale Durchmischung mit dem Antikoagulanzen zu erzielen.

Die Vollblutproben wurden bei 2500 g für 10 Minuten zentrifugiert (4000 Umdrehungen/Minute; Zentrifuge: Varifuge K, Heraeus Holding GmbH, Deutschland). Das Plasma wurde unmittelbar nach der Zentrifugation mit einer Kunststoffpipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in ein Kunststoffröhrchen (12 ml, Greiner, Solingen, Deutschland) abpipettiert und im FIPA analysiert.

2.1.1.2. Human-Plasma

Human-Plasma (lyophilisiert; Dade Behring, Marburg, Deutschland) wurde in 1 ml Aqua dest. unter vorsichtigem Schütteln gelöst und mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen bevor es im Test eingesetzt wurde.

2.1.1.3. Urokinase-Reagenz

Urokinase (100.000 IU/Flasche Trockensubstanz; Medac, Wedel, Deutschland) wurde in 1 ml Puffer gelöst. Der Puffer bestand aus: 200 mM NaHCO₃, pH 8,0 (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 1% Polygelin (Haemaccel[®], Behring, Marburg, Deutschland), 0,1% Triton X 100[®] [93] (Sigma, Steinheim/St. Louis, Deutschland), 10 mM Tranexamsäure (Ugurol[®], Bayer, Leverkusen, Deutschland).

Zur Herstellung des Urokinase-Reagenzes wurden 10 IU/ml Urokinase (Gesamtaktivität 100.000 IU/ml), 1,1 mM Tranexamsäure und PBS, pH 7,4 verwendet.

2.1.1.4. Chromogenes Plasmin-Substrat

Das Chromogene Substrat H-D-Val-Leu-Lys-pNA (H-D-Valin-L-Leucin-L-Lysin-p-Nitroanilin dihydrochlorid, S-2251TM, Chromogenix, Mölndal, Schweden) 3 mM in 1,05 M KCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde vor Licht geschützt.

2.1.1.5. Materialien zur Optimierung und Test-Abhängigkeit des FIPA

PAI Kontrollplasma: 1 u-PA inhibierende Einheit [IU] = 6,3 t-PA inhibierende Einheiten [IU], d.h. für u-PA MG von 54000 D und für t-PA MG von 68000 D, Biopool; PAI-1: Berichrom PAI[®] (Dade Behring, Marburg, Deutschland); PAI-2 (Calbiochem Behring, Frankfurt, Deutschland); Plasminogen: Glu-Plasminogen (Chromogenix, Mölndal, Schweden); α_2 -Antiplasmin (American Diagnostica, Greenwich, USA); Aprotinin: Trasylo[®] (Bayer, Leverkusen, Deutschland); unfractioniertes Heparin (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz); scu-PA (American Diagnostica, Greenwich, USA); polyklonale Anti-TAFI-Antikörper: Antikörper gegen humanen Thrombin aktivierenden Fibrinolyse Inhibitor (Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen, Deutschland); α_2 -Makroglobulin (Sigma, Steinheim/St. Louis, Deutschland).

2.1.2. Methode

2.1.2.1. Standard FIPA

Der Standard Fibrinolysis Parameter Assay (FIPA) wird folgendermaßen durchgeführt:

50 μ l Plasma werden mit 50 μ l Urokinase-Reagenz, bestehend aus 10 IU/ml u-PA/ml, 1,1 mM Tranexamsäure, 1% Polygelin, 0,1% Triton X 100, PBS, pH 7,4, bei 37°C 20 Minuten inkubiert.

Anschließend werden 50 μ l 3 mM H-D-Val-Leu-Lys-pNA, die in 1,05 M KCl gelöst sind, hinzugefügt. Die Endkonzentration im FIPA von dem chromogenen Substrat beträgt dann 1,0 mM. Die resultierende lineare Kinetik wird mit einem Mikrotiterplatten Fotometer (Milenia, DPC, Los Angeles, USA) bei einer Absorption von 405 nm pro 10 Minuten bei 37°C Inkubation bestimmt. Die Meßwerte werden gegen einen 100% Normal-Plasma-Pool geeicht.

KCl in einer Testkonzentration von 300-400 mM inhibiert Plasminogenaktivator-Aktivität, aber beeinflusst nicht die Plasmin-Aktivität [2.2]

2.1.2.2. Optimierung der Urokinase-Aktivität

Humanes Normal-Plasma, das

- A: 1,3 Urokinase inhibierende Einheiten von PAI-1/ml (100% Kontrolle)
- B: 3,8 Einheiten von PAI-1/ml (pathologisches PAI-1 Plasma) [31][151]
- C: 6,3 Einheiten PAI-1/ml (hoch-pathologisches PAI-1 Plasma)

enthielt, wurde im FIPA gemessen und analysiert. Die Urokinase-Aktivität wurde mit folgenden Ergebnissen als optimal betrachtet, wenn

1. die Plasmin Aktivität für Plasma A einen Anstieg >25 mA/min bewirkte
2. die Plasmin Aktivität für Plasma B höchstens 75% von Plasma A und für Plasma C höchstens 50% von Plasma A betrug

2.1.2.3. Optimierung der Tranexamsäure-Konzentration

Human-Plasma und Plasma mit 50% iger α_2 -Antiplasmin Aktivität wurde mit verschiedenen Konzentrationen an Tranexamsäure im Urokinase-Reagenz inkubiert und im FIPA bestimmt. Die Konzentration, die als optimal angesehen wurde, bewirkte

1. eine maximale Plasmin Aktivität
2. eine pathologisch ansteigendes FIPA Resultat in dem Plasma mit 50% iger α_2 -Antiplasmin Aktivität.

2.1.2.4. Test-Abhängigkeit von verschiedenen Parametern

Der FIPA wurde auf den Einfluß von PAI-1, PAI-2, Plasminogen, α_2 -Antiplasmin, Aprotinin, scu-PA oder TAFI [21] in Proben getestet. Dafür wurden 50 μ l Human-Plasma, das unterschiedliche Mengen an

- a) PAI-1 (0-10 IU/ml [u-PA inhibierende Einheiten pro ml])
- b) PAI-2 (0-10 IU/ml [u-PA inhibierende Einheiten pro ml])

- c) Plasminogen (0-2 U/ml [Plasmaeinheiten] = 0-200%)
- d) α_2 -Antiplasmin (0-2 U/ml [Plasmaeinheiten] = 0-200%)
- e) Aprotinin (0-500 KIU/ml; in Anwesenheit von unfraktioniertem Heparin (0-1 IU/ml) (Hofmann-La Roche, Basel, Schweiz)
- f) scu-PA (5, 50, 500 ng/ml) (American Diagnostic, Greenwich, USA)

enthielt, mit 50 μ l Urokinase-Reagenz 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 50 μ l 3 mM H-D-Val-Leu-Lys-pNA, 1,05 M KCl zugefügt und ΔA bei 405 nm pro 10 Minuten bestimmt.

Um den Einfluß von TAFI auf den FIPA zu untersuchen, wurde 50 μ l 100 % Kontrollplasma Probe oder gepoolte Seren Proben, die mit 0, 100 oder 200 μ g polyklonale Anti-TAFI-Antikörper versetzt waren, 30 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Danach wurde der Probe 50 μ l Urokinase-Reagenz zugegeben und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 50 μ l 3 mM H-D-Val-Leu-Lys-pNA, 1,05 M KCl wurde pro 10 Minuten ΔA bei 405 nm bestimmt.

Damit man die Stabilität von individuellen fibrinolytischen Faktoren über die Reaktionszeit überprüfen konnte, wurde normales Human-Plasma 0, 20, 40 oder 60 Minuten bei 37°C vorinkubiert, bevor der FIPA durchgeführt wurde.

Um den Effekt der Fibrinolyseinhibitoren α_2 -Antiplasmin und α_2 -Makroglobulin auf den FIPA zu messen, wurde in einem gereinigten System 50 μ l 0,1 g/l Glu-Plasminogen in PBS und 1% Rinderalbumin, versetzt mit 0-1 U/ml humanes α_2 -Antiplasmin oder mit 0-1 U/ml humanes α_2 -Makroglobulin inkubiert und im FIPA bestimmt.

2.1.2.5. Test-Validierung

Der FIPA wurde 10-mal mit 10-facher Bestimmung von 50 %, 100 % und 150 % Plasma durchgeführt, um die intra- und interassay Variationskoeffizienten zu bestimmen (Testpräzision).

Zur Bestimmung der Linearität wurde ein Human-Plasma mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.

Die Sensitivität bzw. Untere-Nachweisgrenze definierte sich als die dreifache Standardabweichung einer 0% FIPA Probe, d.h. plasminogenfreies Plasma.

2.1.2.6. Normalverteilung

126 Normalplasmen wurden von gesunden Blutspendern im Alter zwischen 18-65 Jahren gewonnen und im FIPA ausgewertet.

Das venöse Blut wurde ohne verlängerte Stauungszeit in Plastikröhrchen abgezogen, die 1/10 106 mM Natrium-Citrat enthalten haben. Anschließend wurde 10 Minuten bei 2500 g zentrifugiert, um eine Thrombozyten-Kontamination zu verhindern, die wiederum eine PAI-1 Freisetzung verursacht. Das gewonnene Plasma wurde sofort abgezogen und im FIPA analysiert.

2.1.2.7. Korrelation zwischen funktionellem PAI-1 und FIPA

Die PAI-1 und die FIPA-Aktivität wurden in 134 randomisierten, den Laboranalysen unterworfenen Blutproben erfasst. Der Korrelationsfaktor r wurde mit Hilfe der Methode nach Spearman berechnet.

Die FIPA Ergebnisse wurden in einem Histogramm dargestellt.

Testschema des FIPA:

50 μ l	Plasma
50 μ l	10 IU/ml u-PA, 1,1 mM Tranexamsäure, PBS, pH 7,4
Inkubation: 20 min, 37°C	
50 μ l	3 mM H-D-Val-Leu-Lys-pNA, 1,05 M KCl
A 405 nm / 10 min	

2.2. Activated Fibrinolysis Parameters Assay (AFIPA)

2.2.1. Material

2.2.1.1. Blutproben

Für jeden Versuch wurde Citratblut von freiwilligen Spendern entnommen. Ohne verlängerte Blutstauung wurde nach sorgfältiger Venenpunktion Blut über die Cubitalvene entnommen und in ein vorgefertigtes Plastikröhrchen (Monovette[®], Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland), dem 1/10 106 mM Natrium-Citrat zugesetzt war, aufgezoogen. Anschließend wurde das Blut zur Durchmischung mit dem

Antikoagulant und Arginin vorsichtig 2-3-mal geschwenkt. Zur Stabilisierung des Blutes wurden zusätzlich 100 mM Arginin (Plasmakonzentration) (Sigma, Steinheim/St. Louis, Deutschland) pH 8,7 zugegeben.

Citrat-Arginin-Plasma wurde durch Zentrifugation bei 2500 g für 10 Minuten aus den Vollblutproben gewonnen und mit einer Kunststoffpipette in ein Kunststoffröhrchen abpipettiert. Sofort anschließend wurden die Plasma-Proben im AFIPA analysiert.

2.2.1.2. Oxidans

50 mM Chloramin T[®] (N-Chloro-p-Toluene-Sulfonamide-Natrium, Sigma, Steinheim/St. Louis, Deutschland) wurde in 100 mM NaHCO₃ (Roth, Karlsruhe, Deutschland) pH 8,0 gelöst.

2.2.1.3. Aktivator-Reagenz

Der Aktivator Neothromtin[®] (3 ml Fläschchen, Behring, Marburg, Deutschland) wurde in 9 ml PBS, dem 0,02% Triton X 100[®] (Sigma, Steinheim/St. Louis, Deutschland) zugesetzt worden war, unter vorsichtigem Schwenken ohne Schaumbildung gelöst. Die Konzentration an Ellagsäure in diesem Neothromtin[®]-Reagenz betrug 0,1 g/l. Neothromtin[®] besteht aus Ellagsäure und pflanzlichem Phospholipid, stabilisiert mit Glycin und dient als Oberflächenaktivator, der normalerweise als PTT-Reagenz eingesetzt wird.

2.2.1.4. Chromogenes Plasmin-Substrat

6,0 mM chromogenes Substrat H-D-Val-Leu-Lys-pNA in 3,5 M KCl wurde angesetzt. Das chromogene Substrat wurde vor Licht geschützt.

2.2.2. Methode

2.2.2.1. Activated Fibrinolysis Parameters Assay (AFIPA)

Zur Durchführung des Activated Fibrinolysis Parameters Assay werden 50 µl Plasma, das mit 100 mM Arginin, pH 8,7 stabilisiert ist, mit 25 µl 50 mM Chloramin T[®] in 100 mM NaHCO₃; pH 8,0 bei 37°C 5 Minuten inkubiert. Anschließend werden 150 µl 0.1 g/l Ellagsäure hinzupipettiert und 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der zweiten Inkubation werden 25 µl 6,0 mM chromogenes Substrat H-D-Val-Leu-Lys-pNA in 3,5 M KCl zugegeben und die Absorption bei 405 nm nach 0 und 30 Minuten bei 37°C mittels eines Mikrotiterplatten-Fotometers (Milenia, DPC, Los Angeles, USA) bestimmt. Die Extinktionsdifferenzen werden berechnet.

2.2.2.2. Optimierung der Ellagsäure

Zur Optimierung der Ellagsäure wurde ein Neothromtin[®]-Reagenz, das 0,6 g/l Ellagsäure enthielt, vorbereitet (Neothromtin[®] (3 ml Fläschchen) wurde in 1,5 ml PBS mit 0,02% Triton X 100[®] gelöst). In einer geometrischen Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 wurden 0,6 g/l Ellagsäure herunterverdünnt bis zu einer 1:32 Verdünnung (0,019 g/l Ellagsäure). Die Neothromtin[®]-Reagenz Ansätze mit absteigender Ellagsäurekonzentrationen, sowie einer Kontrolle bestehend aus 0,0 g/l Ellagsäure in PBS; 0,02% Triton X 100[®], wurden im AFIPA analysiert. Die Ellagsäurekonzentration, die als optimal angesehen wurde, bewirkte eine maximale Plasmin Aktivität.

2.2.2.3. Test-Validierung

Zur Bestimmung der Präzision wurde der AFIPA bei Normalplasma 10-fach in der Serie und in 10 Serien durchgeführt und die Variationskoeffizienten (VK) berechnet.

Wiederfindung und Linearität wurden ermittelt, indem Citratplasma, das 100 mM Arginin enthielt, mit reinem scu-PA aufgestockt wurde:

- 1) 0 ng/ml scu-PA (Kontrolle)
- 2) 5 ng/ml scu-PA
- 3) 10 ng/ml scu-PA
- 4) 20 ng/ml scu-PA
- 5) 40 ng/ml scu-PA

Das Citratplasma besaß eine FIPA-Aktivität von 116%. Die mit scu-PA aufgestockten Citratplasmen wurden im AFIPA analysiert und eine Grafik erstellt. Es sollte eine linearer Anstieg gemäß der scu-PA Konzentrationen erfolgen.

Testschema des AFIPA:

50 µl	Plasma + 100 mM Arginin, pH 8,7
25 µl	Chloramin T [®] 50 mM in 100 mM NaHCO ₃ , pH 8,0
5 min, 37°C	
150 µl	Neothromtin [®] (0,1 g/l) in PBS; 0,02% Triton X 100 [®]
120 min, 37°C	
25 µl	6 mM H-D-Val-Leu-Lys-pNA; 3,5 M KCl
A 405 nm / 30 min	

2.3. Test für plasmatisches PAI-2

2.3.1. Material

2.3.1.1. Blutproben

Die Blutproben stammten von Schwangeren zum Geburtstermin aus der Gynäkologie und Geburtshilfe des Klinikums der Philipps-Universität-Marburg. Die Vollblutproben wurden nach Abnahme bei 2500 g 10 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (2,5 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) abpipettiert und bei -80°C tiefgefroren.

2.3.1.2. Urokinase-Reagenz

100 000 IU Trockensubstanz Urokinase pro Flasche (Medac, Wedel, Deutschland) wurde in 1 ml Puffer, der aus 200 mM NaHCO₃ (Roth, Karlsruhe, Deutschland) pH 8, 1% Polygelin (Haemaccel[®], Behring, Marburg, Deutschland), 0,1% Triton X 100[®] (Sigma, Steinheim/St. Louis, Deutschland), 10 mM Tranexamsäure (Ugurol[®], Bayer, Leverkusen, Deutschland) bestand, gelöst.

40 IU/ml Urokinase wurden in 100 mM Tris (Tris-hydroxymethyl-aminomethan, Roth, Karlsruhe, Deutschland) pH 8,4, 0,1% TritonX 100[®], 1% Polygelin, Aqua dest. (Testpuffer) aufgenommen.

2.3.1.3. Oxidans

40 mM Chloramin T[®] wurde in Aqua dest. gelöst.

2.3.1.4. Glu-Plasminogen

Zu lyophilisiertem Glu-Plasminogen (Chromogenix, Mölndal, Schweden) wurde Testpuffer, der 60 mM Tranexamsäure (Ugurol[®], Bayer, Leverkusen, Deutschland) enthielt, gegeben und vorsichtig ohne Schaumbildung aufgelöst. Glu-Plasminogen lag anschließend in einer Konzentration von 0,4 g/l (4,34 µM) vor.

Aus wirtschaftlichen Gründen konnte anstelle von 25 µl Glu-Plasminogen 100 µl normales Human-Plasma, das mit 20 mM Chloramin T[®] zur Inaktivierung von α₂-Antiplasmin 15 Minuten bei 37°C oxidiert worden war, verwendet werden.

2.3.1.5. Chromogenes Plasmin-Substrat

1,8 mM chromogenes Substrat H-D-Val-Leu-Lys-pNA wurde in 1,39 M KCl gelöst. Die Substanz wurde vor Licht geschützt.

2.3.2. Methode

2.3.2.1. PAI-2 Test

PAI-2 in Plasma von Schwangeren wird folgendermaßen bestimmt: 25 µl Schwangerenplasma werden mit 25 µl 40 IU/ml u-PA (PAI-2 Urokinase-Reagenz) für 5 Minuten oder für 35 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 25 µl 40 mM Chloramin T[®] und 25 µl 0,4 g/l Glu-Plasminogen zugefügt. Nach 5 Minuten bei 37°C werden 50 µl 1,8 mM H-D-Val-Leu-Lys-pNA in 1,39 M KCl zugegeben und die Absorption bei 405 nm durch ein Mikrotiterplatten-Fotometer (Milenia, DPC, Los Angeles, USA) bestimmt. Die lineare Kinetik ($\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$) wird in einem Diagramm dargestellt und die Differenz der Inhibierung zwischen 35 Minuten und 5 Minuten

berechnet. Wird anstelle von 25 µl 0,4 g/l Glu-Plasminogen 100 µl oxidiertes normales Plasma (wie oben beschrieben) hinzugefügt, so muss die anschließende Inkubationszeit von 5 auf 30 Minuten verlängert werden.

2.3.2.2. Optimierung der Inkubationszeit

Zur Ermittlung von PAI-2 Standardkurven in Abhängigkeit von der PAI-2 Aktivität und der Zeit, wurde dem Plasma 0, 10, 20, 30 bzw. 40 U/ml PAI-2 (Calbiochem-Behring, Marburg, Deutschland) zugesetzt und im plasmatischen PAI-2 Test bestimmt.

Ein normales Human-Plasma und ein normales Plasma, das mit 30 U/ml PAI-2 versetzt war, wurden für die Kalibrierung getestet.

Für die funktionelle Bestimmung von PAI-1 wurde die Inhibition durch Urokinase in der 5 Minuten Inkubationszeit von Patientenplasma, PAI-1 Kontrollplasma, PAI-2 Kontrollplasma und PAI Mangelplasma ermittelt. Hat der Patient PAI-2 im Plasma, so ermittelt man zunächst die PAI-2 Aktivität, wie in 2.3.2.1. beschrieben. Danach wird über den PAI-2 Standard die Inhibition dieser PAI-2 Aktivität innerhalb der ersten 5 Minuten Reaktionszeit errechnet und dieser Wert von der PAI-1 Aktivität abgezogen.

Zur Überprüfung der Korrelation zwischen dem funktionellen plasmatischen PAI-2 Test und einem Antigen Test (ELISA: TintElize® PAI-2, Biopool, Ventura, Californien, USA), wurden 40 Plasmen von Schwangeren getestet und in einer Grafik dargestellt.

2.3.2.3. Test-Validierung

Zur Bestimmung des Intra- und des Interassay Variationskoeffizienten des PAI-2 Tests wurde 10 mal eine 10-fach Bestimmung eines Kontrollplasmas mit 40 U/ml PAI-2 durchgeführt.

Die Wiederfindung von PAI-2 erfolgte mit Human-Plasma, das mit 20 U/ml PAI-2 aufgestockt war.

Plasma mit 0-40 U/ml PAI-2 wurde zur Überprüfung der Linearität und der unteren Nachweisgrenze (Sensitivität) des PAI-2 Testes eingesetzt.

2.3.2.4. Korrelation zwischen funktioneller PAI-1 und PAI-2 Aktivität

Plasma-Proben von 68 Schwangeren wurden funktionell auf PAI-1 und auf PAI-2 analysiert. Der Vergleich zwischen der PAI-1 und der PAI-2 Aktivität wurde in einer Grafik gezeigt und der Mittelwert von PAI-1 und PAI-2, sowie die Standardabweichungen und der Korrelationsfaktor bestimmt.

Testschema des plasmatischen PAI-2 Tests:

25 µl	Plasma
25 µl	u-PA (40 IU/ml) in 100 mM Tris; 0,1% Triton X 100 [®] ; 1% Polygelin; pH 8,4
Inkubation: 5 min bzw. 35 min bei 37°C	
25 µl	40 mM Chloramin T [®]
25 µl	0,4 g/l Glu-Plasminogen in 100 mM Tris; 0,1% Triton X 100 [®] ; 1% Polygelin; 60 mM Tranexamsäure; pH 8,4
Inkubation: 5 min bei 37°C	
50 µl	1,8 mM H-D-Val-Leu-Lys-pNA; 1,39 KCl
A 405 nm; 0, 10 min	

3. Ergebnisse

3.1. Fibrinolysis Parameters Assay (FIPA)

Der FIPA ist ein einfacher, schneller und wirtschaftlicher Test zur Bestimmung von plasmatischen Fibrinolyse Parametern. Das Testprinzip des FIPA besteht darin, dass zum Plasma Zweiketten-Urokinase-Plasminogen-Aktivator hinzugefügt wird. Während der Inkubationszeit von 20 Minuten bei 37°C wird Plasmin durch die proteolytische Aktivität des Plasminogenaktivators u-PA gegenüber Plasminogen, das wie auch α_2 -Antiplasmin in den Blutproben in unterschiedlicher Menge vorhanden ist, freigesetzt. Nach der Plasminentwicklungszeit wird das chromogene Substrat H-D-Val-Leu-Lys-pNA hinzugefügt, das von Plasmin in H-D-Val-Leu-Lys-OH + pNA gespalten wird. Die Menge der pNA Freisetzung und damit der Steigerung der Absorption pro Sekunde bei 405 nm, ist proportional zur Enzymaktivität und wird mit einem Mikrotiterplatten Fotometer gemessen.

3.1.1. Optimale Urokinase-Plasminogenaktivator Aktivität

Die optimale u-PA Aktivität, die man einer 50 μ l Plasmaprobe zufügt, beträgt 0,5 IU, dieses entspricht der Zugabe von 50 μ l 10 IU/ml u-PA Reagenz. Dadurch erzielt man die geforderten Testergebnisse: die Plasmin-Aktivität steigt um mehr als 25 mA/min an und die Plasmin-Aktivität von Plasma B (3,8 IU/ml PAI-1) beträgt 75% und von Plasma C (6,3 IU/ml PAI-1) 50%. Bei dieser u-PA Aktivität gestattet der Test eine sensitive Bestimmung von Veränderungen durch PAI-1 Aktivität. Ein valides Testergebnis kann innerhalb von 30 Minuten erreicht werden, die FIPA-Aktivität von 100% Kontroll-Plasma beträgt 270 ± 5 mA/10 Minuten (RT).

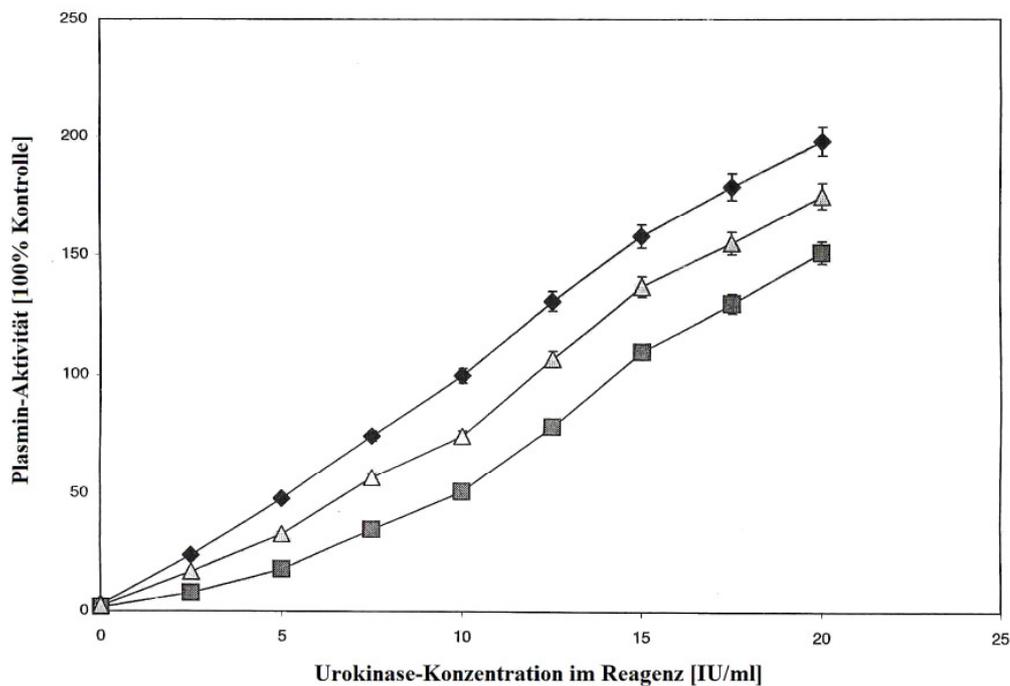


Abbildung 3.1.: Optimale Urokinase-Aktivität

Human-Plasma (100% Kontrolle) mit 1,3 IU/ml PAI-1 (◆), Plasmaprobe B mit 3,8 IU/ml PAI-1 (Δ) und Plasmaprobe C mit 6,3 IU/ml PAI-1 (■) wurden im FIPA getestet.

Eine modifizierte FIPA Version, die nur 5 IU/ml u-PA im u-PA Reagenz enthält, ist sensitiver für einen PAI-1 Anstieg, aber die Inkubationszeit verdoppelt sich, welches zu unspezifischen Reaktionen führt, z.B. u-PA/Antithrombin [35][168] und die hämostaseologische Diagnostik verzögert.

3.1.2. Optimale Tranexamsäure-Konzentration

Die optimale Tranexamsäure-Konzentration im Test mit physiologischem pH-Wert beträgt 0,35 - 0,7 mmol/l, d.h. dass im u-PA Reagenz eine Konzentration von 0,7 - 1,4 mmol/l Tranexamsäure vorliegen muss. In diesem Bereich erhält man maximale Plasmin-Aktivität. Diese Tranexamsäure-Konzentration ergibt signifikante FIPA Veränderungen in Plasma mit 50 % α_2 -Antiplasmin-Aktivität. Die Plasmin-Aktivität steigt pathologisch an.

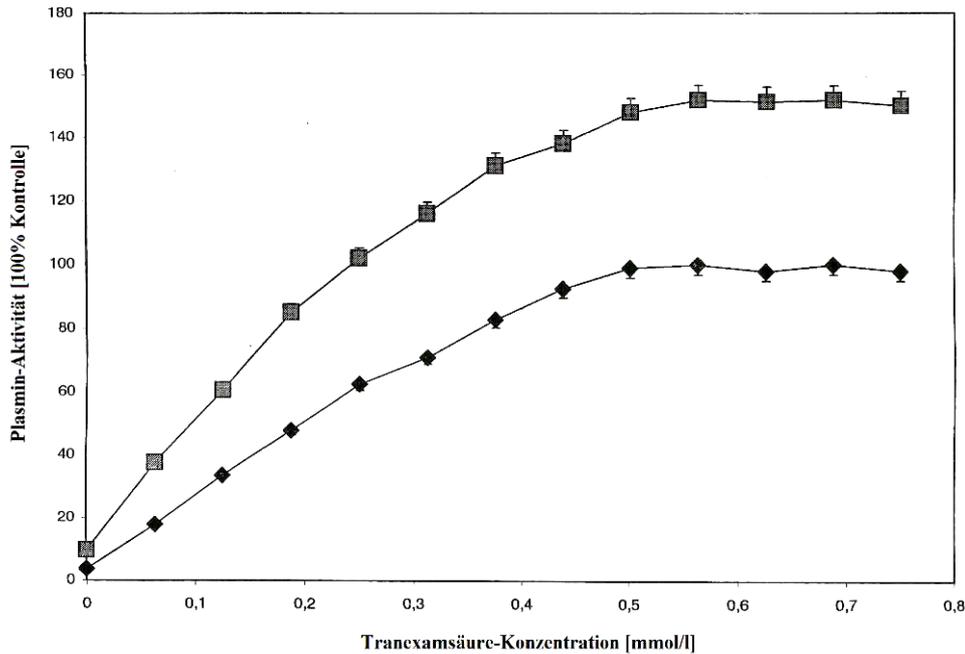


Abbildung 3.2.: Optimale Tranexamsäure-Konzentration

Human-Plasma (◆) und Plasma mit 50% α_2 -Antiplasmin Aktivität (■) wurden im FIPA mit verschiedenen Tranexamsäure-Konzentrationen analysiert.

Ohne Tranexamsäure könnte normalerweise keine Plasmin-Aktivität entdeckt werden, da α_2 -Antiplasmin entstehendes Plasmin sofort inaktivieren würde [12]. Tranexamsäure unterdrückt allerdings teilweise die Aktivität von α_2 -Antiplasmin. Dadurch ist der FIPA abhängig von dem Haupthemmer des Plasmins, Veränderungen der α_2 -Antiplasmin-Aktivität zeigen sich im FIPA. Der FIPA ist ebenfalls sensitiv für abnormale Plasminogen Aktivität. 50% Veränderung des normalen Human-Plasmas durch α_2 -Antiplasmin oder Plasminogen wird im FIPA entdeckt.

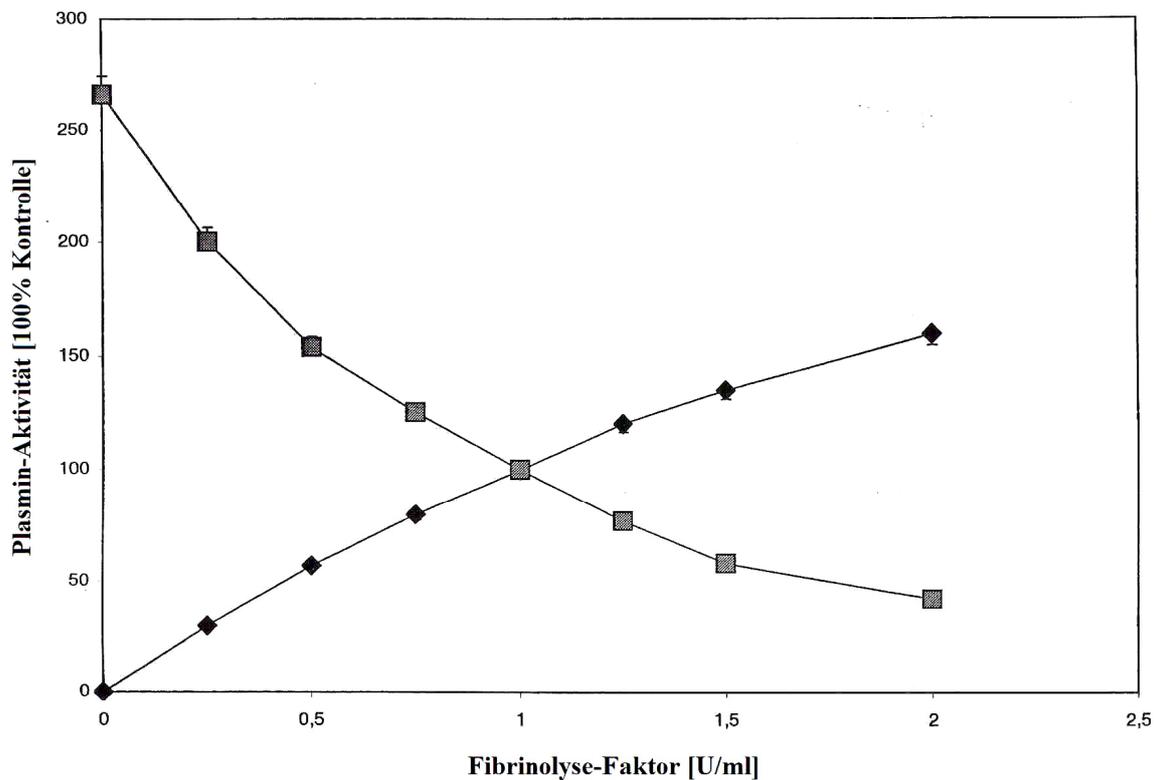


Abbildung 3.3.: Beeinflussung von plasmatischem α_2 -Antiplasmin und Plasminogen auf FIPA.

50 μ l Human-Plasma mit 0-2 U/ml Plasminogen (◆) oder 0-2 U/ml α_2 -Antiplasmin (■) wurden im FIPA getestet.

3.1.3. Abhängigkeit von plasmatischen PAI

Der FIPA ist sensitiv für PAI-1. Wie in der Grafik 3.4. gezeigt wird, ist der Test abhängig von PAI-1 Konzentrationen. Eine pathologisch zunehmende PAI-1 Aktivität > 4 IU/ml ergibt eine $> 25\%$ abnehmende Plasmin-Aktivität im FIPA. Bei 10 IU/ml PAI-1 Aktivität hat die FIPA-Aktivität um ca. 75% abgenommen.

Zunehmende PAI-2 Aktivität wird im FIPA registriert, wenn die PAI-2 Konzentration > 10 U/ml beträgt.

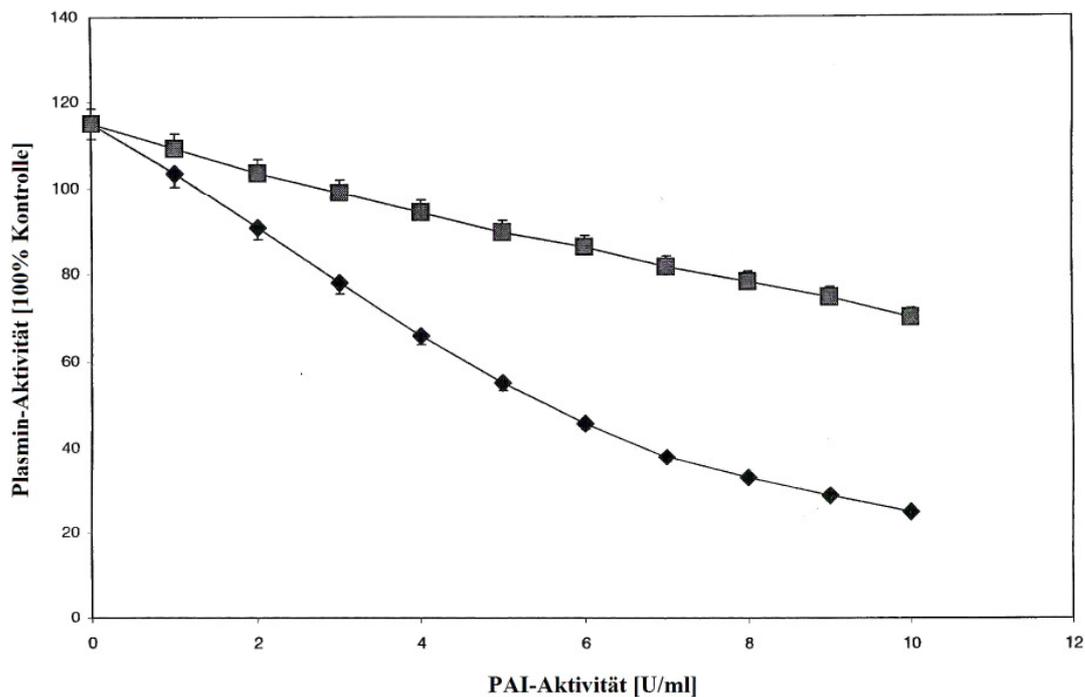


Abbildung 3.4.: Testbeeinflussung plasmatischer Plasminogenaktivator-Inhibitoren (PAI) auf FIPA.

50 μ l Human-Plasma mit 0-10 IU/ml PAI-1 (◆) oder 0-10 U/ml PAI-2 (■) wurden im FIPA untersucht.

3.1.4. Abhängigkeit von Aprotinin und Heparin

Die Aktivität des Medikaments Aprotinin kann im dargestellten Test kontrolliert werden. Die Aktivität des Plasmins geht mit Ansteigen der Aprotininkonzentration zurück. Der FIPA ist unabhängig von therapeutischen Dosen unfraktionierten Heparins in Anwesenheit oder Abwesenheit von Aprotinin.

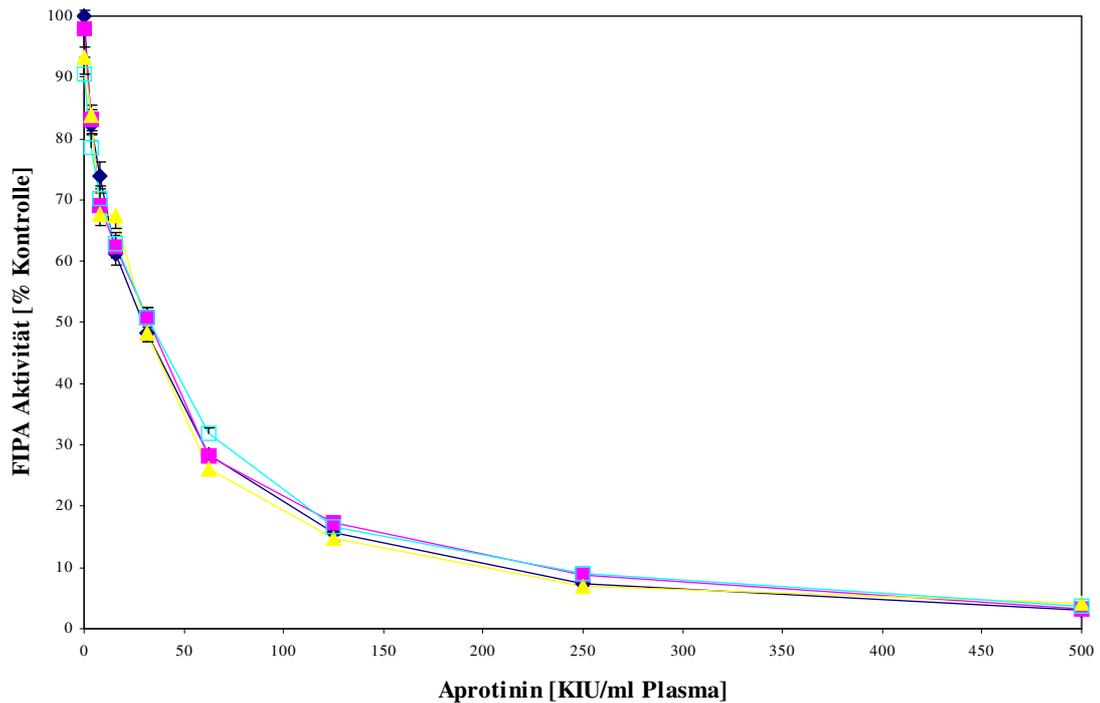


Abbildung 3.5.: Beeinflussung von Aprotinin und Heparin auf FIPA.

50 μ l Human-Plasma mit 0-500 KIU/ml Aprotinin Zusatz und 0 IU/ml (\blacklozenge), 0,25 IU/ml (\blacksquare), 0,5 IU/ml (\blacktriangle) oder 1,0 IU/ml (\square) unfraktioniertem Heparin wurde im FIPA analysiert.

3.1.5. Abhängigkeit von reinem α_2 -Makroglobulin oder α_2 -Antiplasmin

In einem gereinigten System ergibt eine Konzentration von 1 U/ml α_2 -Antiplasmin im FIPA eine Aktivität von 36% verglichen mit einer 0 U/ml α_2 -Antiplasmin-Probe.

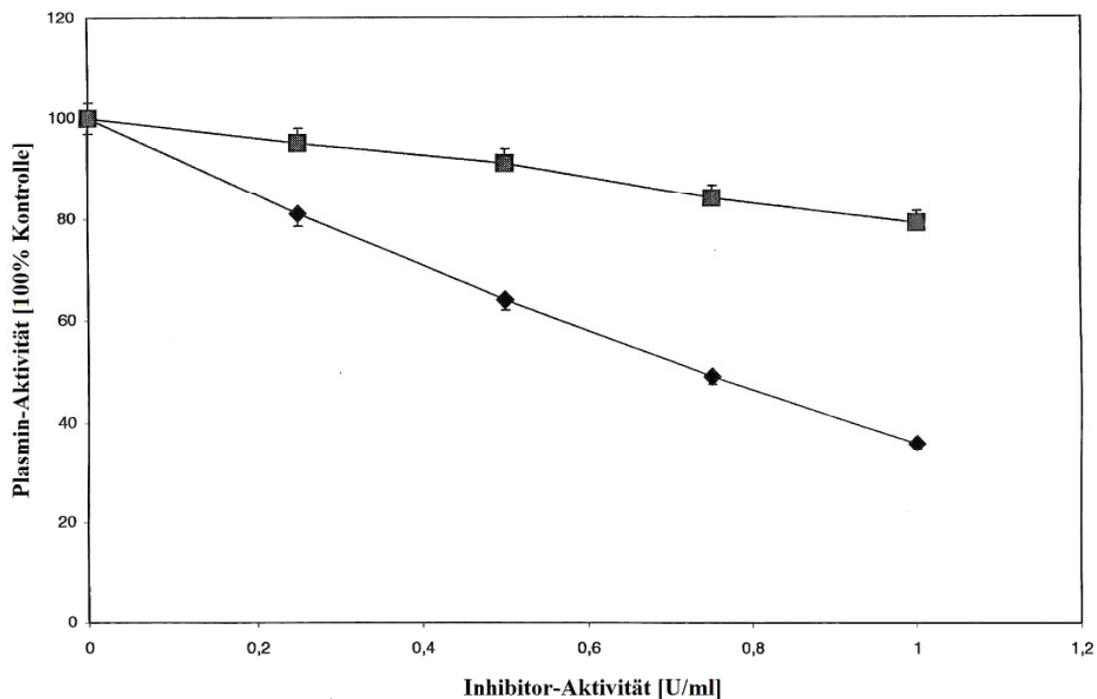


Abbildung 3.6.: Beeinflussung von reinem α_2 -Makroglobulin oder α_2 -Antiplasmin auf FIPA.

50 μ l Plasma-Probe mit 0-1 U/ml humanem α_2 -Makroglobulin (■) oder α_2 -Antiplasmin (◆) in PBS und 1% Albumin wurden im FIPA untersucht.

Der FIPA ist nur schwach sensitiv für den Breitspektrum-Inhibitor α_2 -Makroglobulin. Die FIPA-Aktivität nimmt in einem gereinigten System durch 1 U/ml α_2 -Makroglobulin um 21% ab. Eine Kombination von 1 U/ml α_2 -Antiplasmin und 1 U/ml α_2 -Makroglobulin in einem gereinigten System ergibt im FIPA eine Aktivität von 44% verglichen mit einem Kontroll-Puffer, das bedeutet, dass α_2 -Makroglobulin ca. 8% der entstandenen Plasminmoleküle vor der Inhibition durch α_2 -Antiplasmin schützt. α_2 -Makroglobulin scheint demzufolge auf die plasmatische Fibrinolyse relativ schwach zu wirken [168].

3.1.6. Einfluß von TAFI, scu-PA und t-PA auf FIPA

Der FIPA ist nicht sensitiv für TAFI [131]. Durch die Zugabe von 100 μ g oder 200 μ g polyklonale Anti-TAFI-Antikörper zu 50 μ l Kontroll-Plasma vermindert sich die FIPA-Aktivität um 10,5% bzw. 15,5%. Die FIPA-Aktivität fällt durch 100 μ g Anti-TAFI-

Antikörper in gepoolten Serum um 7,8% und um 11,6% bei 200 µg Anti-TAFI-Antikörper ab.

Weiterhin ist der FIPA nicht sensitiv für geringe Veränderungen ($\pm 50\%$) von plasmatischen scu-PA; nur eine scu-PA Aktivität über das zehnfache der normalen Plasmakonzentration können im FIPA bestimmt werden. 100% Plasma aufgestockt mit 50 ng/ml scu-PA ergibt im FIPA eine Aktivität von 124%, ein Plasma, versetzt mit 500 ng/ml scu-PA zeigt eine FIPA-Aktivität von 371%. Das inaktive scu-PA wandelt sich demzufolge nur partiell in u-PA um.

Die Konzentration von aktivem t-PA in normalem Plasma ist sehr gering. Sie beträgt ca. 0,5 IU/ml [151] und liegt damit ca. 10-fach unter der Aktivität von plasmatischem PAI-1, dem Hauptinhibitor von t-PA. Im FIPA wird die Omega-Amino-Säure Tranexamsäure für die teilweise Neutralisation von α_2 -Antiplasmin benutzt. Tranexamsäure inhibiert t-PA durch Blockade der Lysin-Bindungsstellen im t-PA Molekül stark. Daher ist der FIPA [4] nicht sensitiv für plasmatisches t-PA.

Die Fibrinolyse Faktoren, die im FIPA untersucht werden, sind mindestens 1 Stunde bei 37°C stabil. Daher verändern sich die Fibrinolyse Faktoren während der 20 Minuten Inkubationzeit zur Erzeugung von Plasmin nicht.

3.1.7. Test-Validierung

Die Intra- und Interassay-Variationskoeffizienten liegen unter 5%.

Untersuchungen zur Linearität ergeben, dass 1:2 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünntes Standard-Human-Plasma einen FIPA-Wert von 62 % besitzt.

Die Untere-Nachweisgrenze, definiert als 3-fache Standardabweichung eines 0% FIPA-Plasmas (Plasminogen-Mangelplasma), beträgt 5% der Aktivität des Normalplasmas.

3.1.8. Normalverteilung

Die normale FIPA-Aktivität beträgt 100%; $\sigma = 25\%$

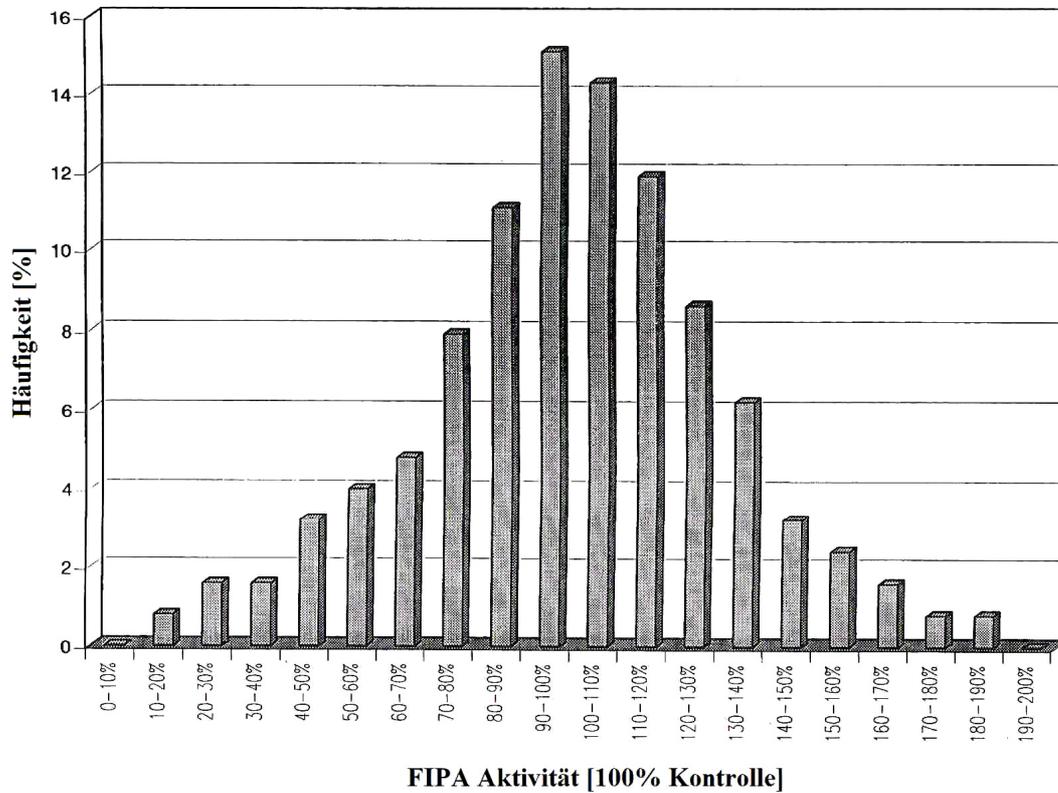


Abbildung 3.7.: Normalverteilung der FIPA-Aktivität.

n = 126 Plasmaproben von gesunden Blutspendern

(zwischen 18-65 Jahren) wurden im FIPA untersucht.

Der FIPA korreliert negativ mit der PAI-1 Aktivität in 134 Patientenproben ($r = -0,684$, $p < 0,05$).

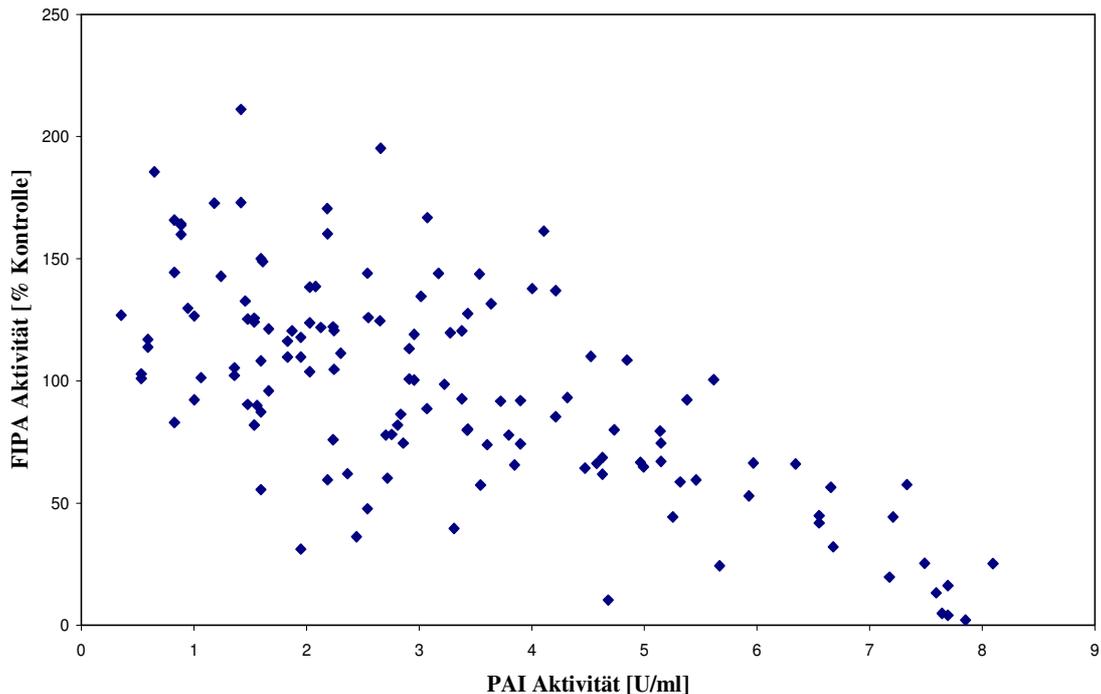


Abbildung 3.8.: Korrelation zwischen funktionalem plasmatischem PAI-1 und FIPA.

In $n = 134$ randomisierten Patienten Plasmaproben für Routine-Analyse wurde plasmatische PAI-1 Aktivität und FIPA Aktivität getestet. Beide Parameter korrelieren negativ mit $r = -0,684$, $p < 0,05$.

3.2. Activated Fibrinolysis Parameters Assay

Der AFIPA basiert auf der intrinsischen Aktivierung der Fibrinolyse. Prourokinase (scu-PA) wird durch Kallikrein zu Urokinase (u-PA) umgewandelt.

Die Prourokinase in der Plasmaprobe wird durch Arginin stabilisiert. Durch die Zugabe von Chloramin T[®] wird der bedeutendste Plasmininhibitor α_2 -Antiplasmin inaktiviert. Nach der ersten Inkubationszeit, in der die Inaktivierung von α_2 -Antiplasmin erfolgt, wird Ellagsäure zugesetzt. Ellagsäure ist ein potenter Oberflächenaktivator, der Kallikrein aktiviert, das Prourokinase zu Urokinase umwandelt. Plasmin wird aus Plasminogen gebildet und wird anschließend durch die Spaltung des chromogenen Substrates bei einer Absorption von 405 nm mittels des Mikrotiterplatten-Fotometers bestimmt.

3.2.1. Arginin stabilisiertes Citratplasma

Arginin stabilisiertes Citratplasma enthält das Zweifache an Prourokinase (scu-PA) wie normales Citratplasma.

3.2.2. Ellagsäure-Konzentration im Neothromtin[®]-Reagenz

Die optimale Ellagsäure-Konzentration im Neothromtin[®]-Reagenz beträgt 0,1 g/l. Das bedeutet, dass 0,06 g/l Ellagsäure im Test vorliegen. Bei dieser Konzentration ist eine optimale Plasminaktivität erreicht.

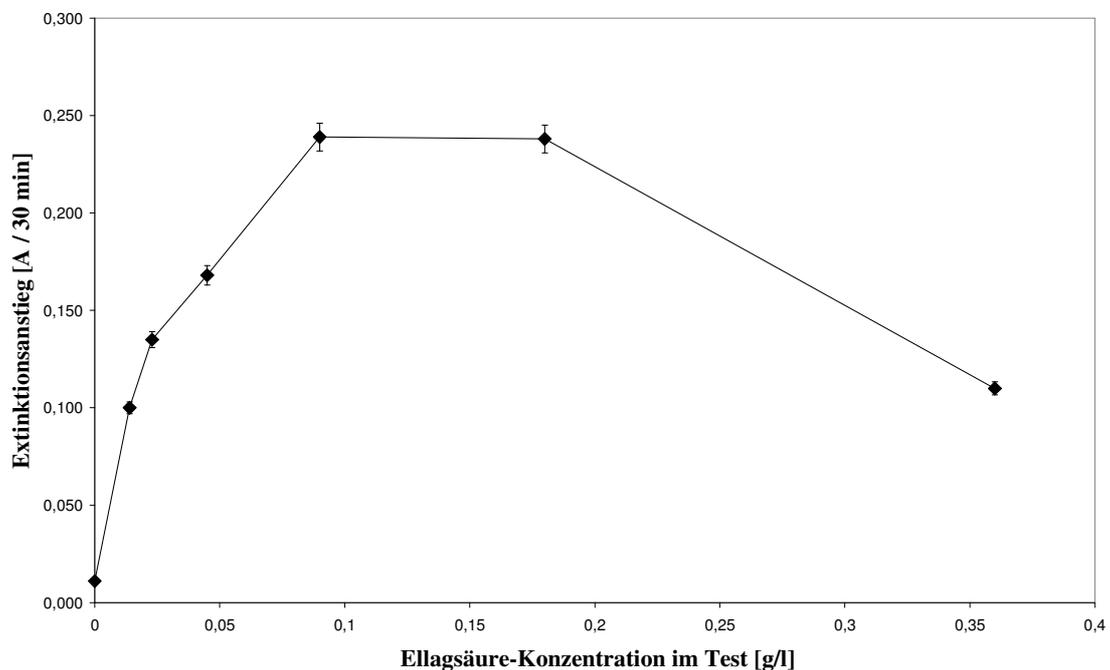


Abbildung 3.9.: Optimale Ellagsäure-Konzentration im Neothromtin[®]-Reagenz.

50 μ l Citrat-Plasma mit 100 mM Arginin und 0 - 0,36 g/l Ellagsäure im Test wurden im AFIPA analysiert.

3.2.3. Test-Validierung

Die intra- und interassay Variationskoeffizienten der Präzision für normales Plasma lagen unter 5%

Die Zugabe von 5, 10, 20, 40 ng/ml reiner scu-PA zu Arginin stabilisiertem Normal-Plasma-Pool ergab einen nahezu linearen Anstieg der resultierenden Plasmin-Aktivität, was einer Wiederfindung > 90% gleichkommt.

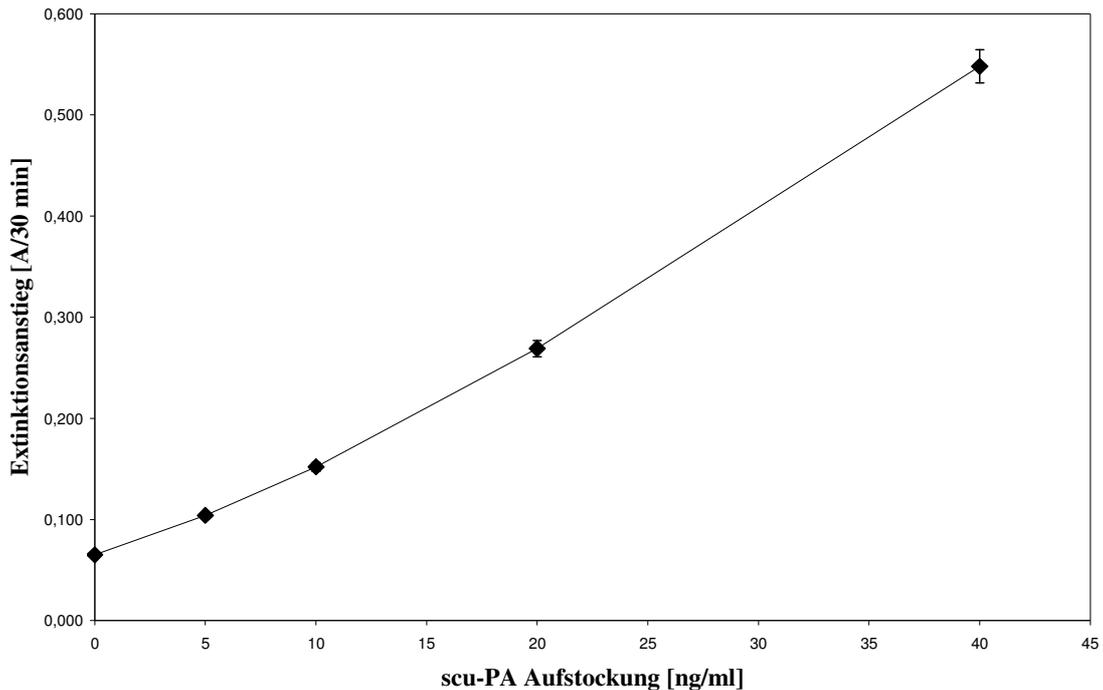


Abbildung 3.10.: Linearität des AFIPA.

50 μ l Citrat-Plasma mit 100 mM Arginin und 0 – 40 ng/ml scu-PA wurden im AFIPA getestet.

Die Extinktionsdifferenz bei Zusatz 0 ng/ml reiner scu-PA beträgt nicht 0,00, da scu-PA bereits im Citratplasma vorkommt. Die Addition von 5 ng/ml scu-PA resultiert in etwa der doppelten Plasmin-Aktivität verglichen mit nicht aufgestocktem Plasma. Dies bedeutet, dass normales Plasma ca. 5 ng/ml scu-PA enthält.

3.3. Plasmatischer PAI-2 Test

Dieser Test der Fibrinolyse Diagnostik ist ein schneller, funktioneller und direkter Test zur Bestimmung von plasmatischen PAI-2.

Der Plasminogen-Aktivator Urokinase (tcu-PA) reagiert mit dem plasmatischen Plasminogenaktivator-Inhibitoren PAI-1 und PAI-2. PAI-2 besitzt eine langsamere Reaktionskinetik als PAI-1. Daher ist die PAI-1/u-PA Reaktion nach 5 Minuten beendet, während die PAI-2/u-PA Reaktion etwa die 5-10 fache Zeit benötigt. Das Oxidans Chloramin T[®] inaktiviert unter anderem α_2 -Antiplasmin, den bedeutendsten Inhibitor des Plasmins, beeinträchtigt jedoch nicht Plasmin. Glu-Plasminogen [72][117] wird durch die aktive Urokinase innerhalb der zweiten Inkubationsphase zu Plasmin

umgewandelt. Plasmin spaltet das chromogene Plasmin-Substrat H-D-Val-Leu-Lys-pNA zu H-D-Val-Leu-Lys-OH + pNA, das bei einer Absorption von 405 nm durch das Mikrotiterplatten-Fotometer gemessen werden kann. Die PAI-2 Aktivität kann aus der Differenz zwischen 35 Minuten und 5 Minuten Inkubationszeit berechnet werden.

3.3.1. PAI-2 Standardkurven

Die PAI-2 Aktivität ist abhängig von der Inkubationszeit zwischen Plasma und u-PA. In dieser Inkubationsphase reagiert u-PA zuerst mit dem Plasminogenaktivator-Inhibitor PAI-1. Nach 5 Minuten ist die PAI-1/u-PA Reaktion abgeschlossen, welches durch Mitführen eines PAI-1 Kontrollplasmas bewiesen wird. Die optimale Inkubationszeit für die PAI-2/u-PA Reaktion beträgt 35 Minuten.

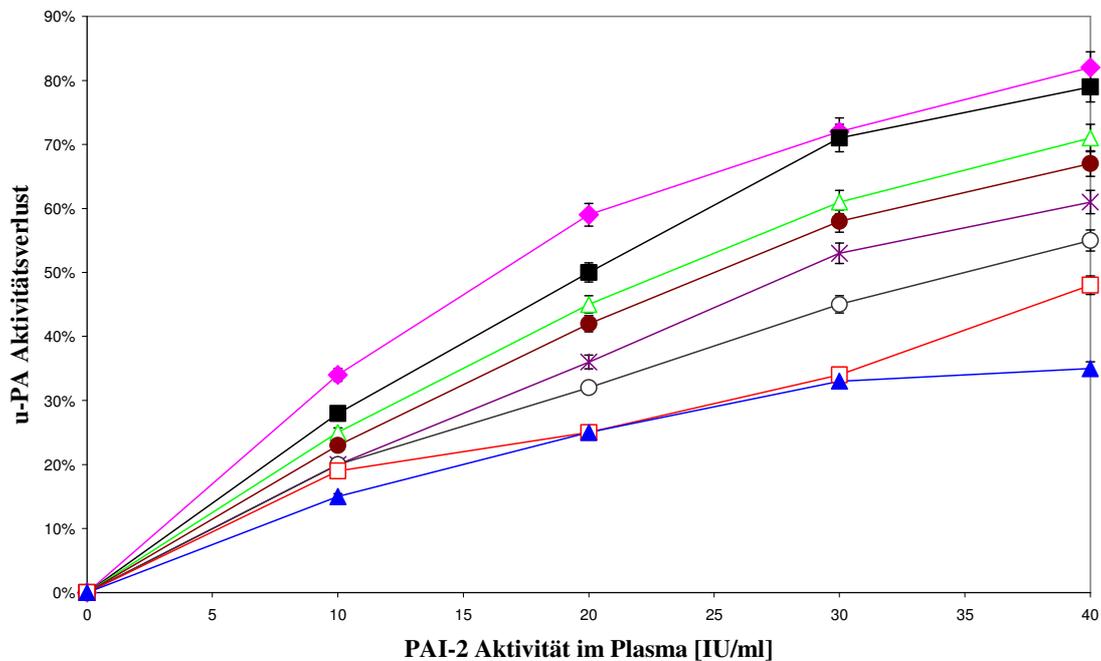


Abbildung 3.11.: PAI-2 Standardkurven in Abhängigkeit von PAI-2 Aktivität.

25 µl Human-Plasma mit 0–40 U/ml PAI-2 wurden mit 25 µl 40 U/ml u-PA Reagenz für 5 min (▲), 10 min (□), 15 min (○), 20 min (*), 25 min (●), 30 min(△), 35 min (■) und 40 min (◆) inkubiert und im Plasmatischem PAI-2 Test analysiert.

Der Aktivitätsverlust der Urokinase nach 35 Minuten Inkubation, bestimmt anhand eines 0,0 U/ml PAI-2 Standardplasmas, betrug ca. das Zweifache der 5 Minuten Inkubation. Dieses wurde ebenfalls dargestellt in der Grafik 3.12.

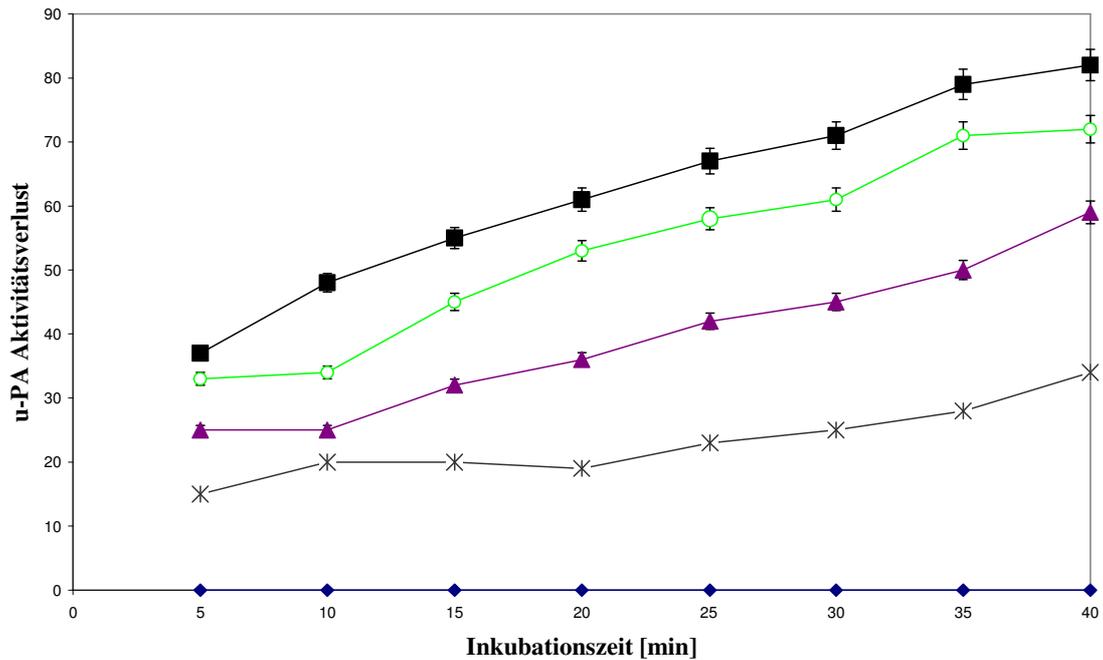


Abbildung 3.12.: PAI-2 Standardkurven in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

25 μ l Human-Plasma mit 0,0 U/ml (◆), 10 U/ml (*), 20 U/ml (▲), 30 U/ml (○) und 40 U/ml (■) PAI-2 wurden mit 25 μ l 40 U/ml u-PA Reagenz für 5-40 Minuten inkubiert und im Plasmatischem PAI-2 Test untersucht.

Aus wirtschaftlichen Gründen wird anstelle von Glu-Plasminogen Plasma, das mit Chloramin T[®] oxidiert wurde, verwendet.

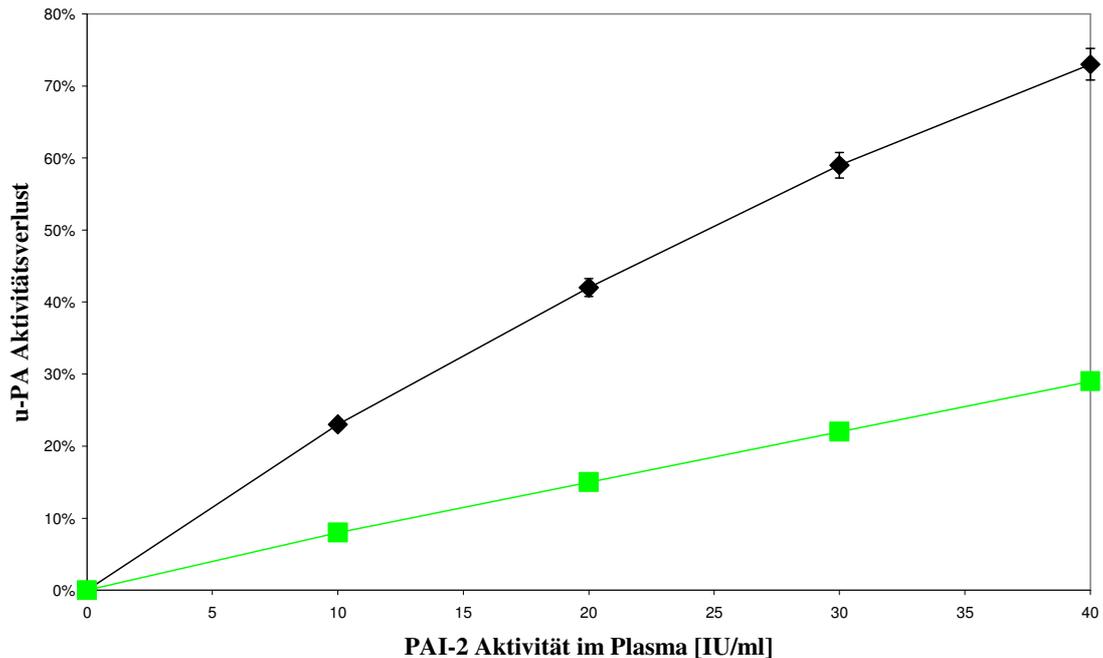


Abbildung 3.13.: PAI-2 Standardkurven in Abhängigkeit von PAI-2 Aktivität mit Chloramin T[®] oxidiertem Plasma.

25 µl Plasma mit 0-40 U/ml PAI-2 wurden mit 25 µl 40 U/ml u-PA Reagenz 5 Minuten (■) und 35 Minuten (◆) inkubiert und im Plasmatischem PAI-2 Test untersucht.

Um jedoch das gleiche Ergebnis zu erhalten, muss man das oxidierte Plasma in vierfachem Volumen dem plasmatischen PAI-2 Test zusetzen, d.h. man muss 100 µl verwenden. Die anschließende Inkubationszeit in der Plasmin gebildet wird, verlängert sich auf 30 Minuten.

3.3.2. Korrelation des funktionellen PAI-2 Tests mit einem Antigentest

Der funktionelle plasmatische PAI-2 Test wurde mit einem Enzym Immunoassay, der PAI-2-Antigen quantitativ bestimmt, verglichen. Dazu wurden 40 Proben von Schwangeren in beiden Test analysiert.

Die PAI-2 Aktivität betrug im funktionellen plasmatischen PAI-2 Test durchschnittlich 29,2 U/ml ± 16,9 (Mittelwert ± Standardabweichung), im ELISA 246,5 ng/ml ± 112,0. Der funktionelle plasmatische PAI-2 Test korreliert mit dem ELISA bei $r = 0,70$.

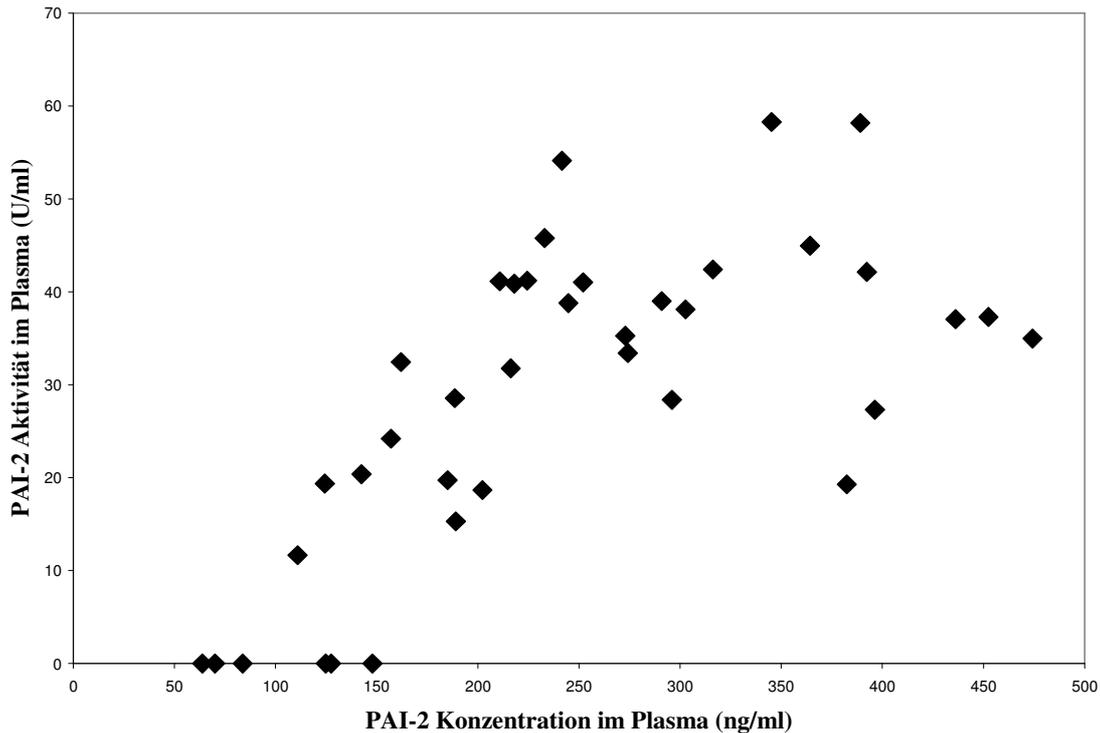


Abbildung 3.14.: Vergleich zwischen funktionellem PAI-2 und PAI-2-Antigen.

Plasma-Proben von $n = 40$ Schwangeren wurde mit dem funktionellem plasmatischem PAI-2 Test und mit einem Enzym Immunoassay für quantitativem PAI-2 Antigen verglichen.

3.3.3. Einfluß von Heparin

Der Test wird nicht gestört durch therapeutische Heparin Plasma-Konzentrationen.

3.3.4. Test-Validierung

Die Intra- und die Interassay-Variationskoeffizienten eines Kontrollplasmas mit 40 U/ml PAI-2 liegen unter 5%.

Die untere Nachweisgrenze (Sensitivität) liegt bei 2 U/ml PAI-2.

Die Wiederfindung eines mit 20 U/ml aufgestocktem Human-Plasmas liegt bei $95 \pm 7\%$ (Berechnungsformel: Wiederfindung = gefunden/zugesetzt \cdot 100%).

Plasmas, aufgestockt mit 0 - 40 U/ml PAI-2, ergibt eine negative Linearität zwischen PAI-2 und Extinktion.

3.3.5. PAI-1 und PAI-2

68 Plasma-Proben von Schwangeren zum Geburtstermin wurden im funktionellem PAI-2 Test untersucht und die Menge an PAI-1 und PAI-2 jeder einzelnen Plasmaprobe gemäß Abbildung 3.13. berechnet. Die durchschnittliche PAI-1 Aktivität betrug $17,4 \text{ IU/ml} \pm 11,2$, die durchschnittliche PAI-2 Aktivität $30,3 \text{ U/ml} \pm 19,9$. Die plasmatische PAI-2 Aktivität korreliert negativ mit der plasmatischen PAI-1 Aktivität ($r = 0,730$).

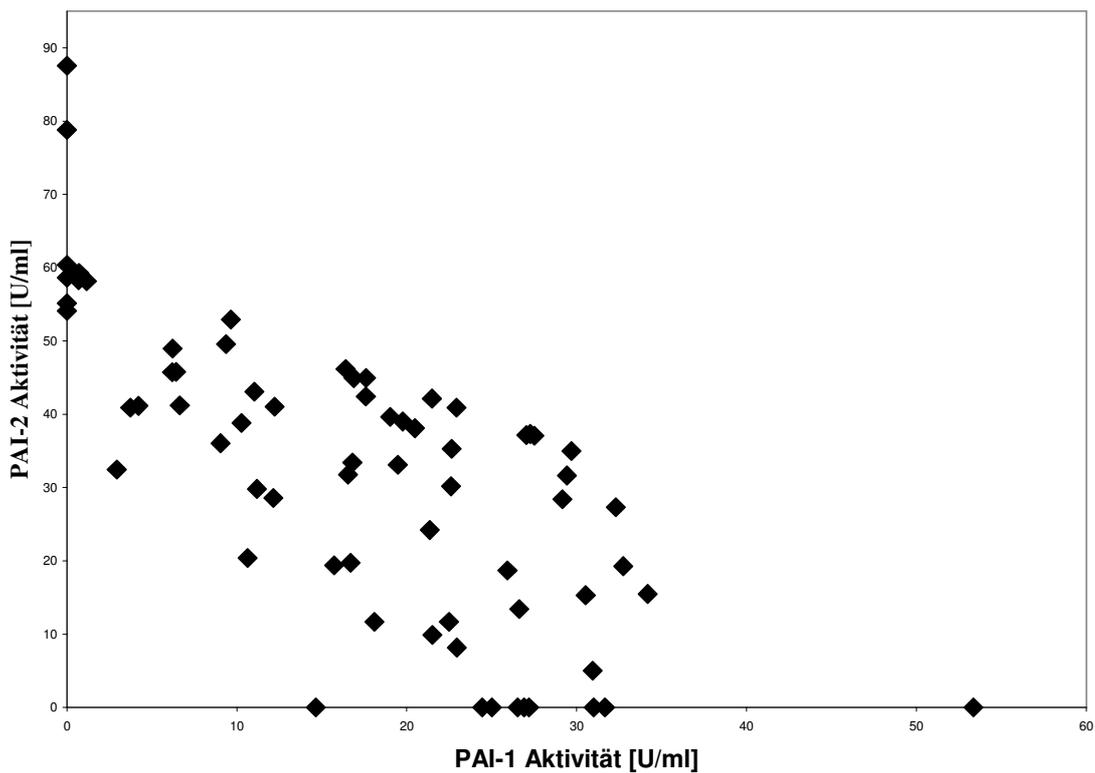


Abbildung 3.15.: Vergleich zwischen PAI-1- und PAI-2 Aktivität in der Schwangerschaft.

n = 68 Plasma-Proben von Schwangeren zum Geburtstermin wurden im funktionellem plasmatischen PAI-2 Test untersucht und die PAI-1- und PAI-2 Aktivität errechnet.

unter anderem die fibrinolytische Aktivität erhöht sein [23][185]. Weiterhin können Amyloidosen [173], angeborener α_2 -Antiplasminmangel [90], erworbener Mangel an histidinreichem Glykoprotein [152] mit einer erhöhten fibrinolytischen Aktivität einhergehen. Venöse und arterielle Verschlusskrankheiten gehen dagegen mit einem herabgesetzten fibrinolytischen Potential einher, dazu gehören die kardiovaskulären und zerebrovaskulären Erkrankungen, Thrombose und Thrombembolie [63][147][161][113][29][160][57][78]. Lebererkrankungen wie die alkoholtoxische Leberzirrhose können eine herabgesetzte fibrinolytischen Aktivität hervorrufen [23][185]. Daraus resultiert die enorme klinische Bedeutung dieses Tests in der Hämostase.

Verschiedene Methoden wurden benutzt, um die fibrinolytische Aktivität im Plasma zu bestimmen: direkt durch zum Beispiel Eugloblin-Lysezeit (euglobulin clot lysis time ECLT): ein globaler, zeitaufwendiger (2-4 h) Test, der die Zeit bestimmt, in der sich die Euglobinfraktion des Plasmas auflöst. Die Euglobinpräzipitate enthalten unter anderem Plasminogen und Plasminogenaktivatoren und werden durch Verdünnung, Ansäuerung und Abkühlung auf 4°C gewonnen. [186][133][61][14][24][80]. Ebenfalls ein globaler, zeitintensiver (24-48 h) Fibrinolyse-Test ist die Fibrinplattenmethode, in dem die Aktivatoraktivität in der Plasmaeuglobinfraktion durch Größenmessung der Lysehöfe bestimmt werden. Er besitzt allerdings eine geringe Kapazität und eine Ungenauigkeit in der Bestimmung der Lyse-Höfe. Die Messergebnisse werden von PA-Inhibitoren, freiem Plasmin und vom pH-Wert des Testmilieus beeinflusst [77][191][132][53].

Teilaspekte der plasmatischen Fibrinolyse-Status können durch die Bestimmung von aktiven t-PA [134][6][71], Messung von aktiven PAI-1 oder inaktiven t-PA/PAI-1 Komplexen [5], t-PA-Antigen- oder funktionelle α_2 -Antiplasmin-Bestimmung und durch die Messung von Fibrinogen- und Fibrinospaltprodukten mittels monoklonaler Antikörper [14][58] erfasst werden. Da diese Tests nur einzelne Fibrinolysefaktoren messen ist ihre klinische Praktikabilität nur bedingt geeignet [187][50][183][12][4]. Sinnvoller als die Messung einzelner Fibrinolysefaktoren ist es, die fibrinolytische Gesamtheit zu betrachten [18], denn nicht immer sind pathologische Werte eines Fibrinolysefaktors mit einem Krankheitsbild assoziiert.

Mit dem FIPA ist ein Globaltest für die Fibrinolyse-Diagnostik entwickelt worden. Er ist ein schneller, einfacher und wirtschaftlich funktioneller Screening-Test für Fibrinolyse-Parameter wie Plasminogen, Plasminogenaktivator Inhibitor Typ 1 (PAI 1)

und α_2 -Antiplasmin. Das Prinzip dieses neuen Testes besteht darin, die Fibrinolyse durch die Zugabe einer definierten Menge an Urokinase zu aktivieren.

Beim Fibrinolysis Parameters Assay (FIPA) reagiert Urokinase im ersten Schritt mit den Plasminogenaktivator-Inhibitoren PAI-1 [30] und PAI-2, hauptsächlich jedoch mit PAI-1, weil PAI-2 meist nur in Plasma von Schwangeren zu finden ist und 5-10 fach langsamer reagiert [20][11][67].

Damit der FIPA physiologischen Verhältnissen entspricht, wird das Urokinase-Reagenz auf den pH-Wert 7,4 eingestellt. Die Fibrinolyse-Parameter im Plasma sind physiologischen Bedingungen ausgesetzt und die in vitro Reaktionen sind vergleichbar mit in vivo Verhalten.

Abfallende Plasmakonzentrationen von Plasminogen, können im dargestellten Test aufgezeigt werden.

Schließlich wird Plasmin durch α_2 -Antiplasmin und in einem geringeren Umfang durch α_2 -Makroglobulin inaktiviert.

Normalerweise ist die Plasmin/ α_2 -Antiplasmin-Reaktion so effizient und schnell, dass nur sehr geringe Mengen an bestimmbar aktiven Plasmin verbleiben. Daher wird im FIPA plasmatisches α_2 -Antiplasmin durch die Omega-Aminosäure Tranexamsäure, ein zyklisches Derivat der ϵ -Aminocapronsäure, teilweise neutralisiert. Es kommt zu einer reversiblen Komplexbildung zwischen Tranexamsäure und Plasminogen mit Konformationsänderung. 20 $\mu\text{mol/l}$ Tranexamsäure setzen die Plasmin/ α_2 -Antiplasmin Reaktion um 50% herab [12]. Tranexamsäure hat eine zweite bedeutende Eigenschaft: sie beschleunigt um etwa das Dreifache die Plasminogen-Proteolyse durch u-PA [167].

Verbleibendes Plasmin wird dann durch Spaltung eines geeigneten chromogenen Substrats bestimmt [148]. K^+ -Ionen in Konzentration $> 300 \text{ mM}$ erhöhen die Substratspezifität und inhibieren Plasminogenaktivatoren-Aktivität ohne Einfluss auf die Plasmin-Aktivität zu nehmen.

Das chromogene Substrat ist der einzige signifikante Kostenfaktor des FIPA. Ein FIPA kostet mit Doppelbestimmung weniger als einen Euro. Daher kann der FIPA als hämostaseologische Screening-Methode für Patienten zum Einsatz kommen.

Pathologische Abweichungen von plasmatischen α_2 -Antiplasmin oder Plasminogen kann durch eine signifikante Veränderung im FIPA Ergebnis diagnostiziert werden. Daraus folgt, dass Patienten mit Blutungsneigungen, zu denen auch ein suffizientes

plasmatisches α_2 -Antiplasmin gehört (< 50% des Normalplasmas) [84][91][89][70][88][192], durch eine stark erhöhte FIPA-Aktivität auffallen. Pathologische Aktivitäten von plasmatischen PAI-1 sind im FIPA bestimmbar. Erhöhte PAI-1 Spiegel wie sie bei venösen und arteriellen Thrombosen, Arteriosklerose, Tumore, nach Polytrauma, in der postoperativen Phase, bei Sepsis, bei extrakorporalem Kreislauf, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus und bei Akut-Phase-Reaktionen beschrieben werden, verursachen im Sinne einer Hypofibrinolyse eine thrombotische Komplikation. [14][80]. Eine abfallende PAI-1 Aktivität [156][44][146][98][51] würde den FIPA signifikant verändern. Patienten mit angeborenen oder erworbenen PAI-1 Mangel z.B. bei Leberzirrhose entwickeln bei chirurgischen Eingriffen oder Traumen eine Blutungsneigung. Die Bestimmung von erhöhten PAI-1 Werten hat größere klinische Relevanz als eine verminderte PAI-1 Aktivität [27].

Der FIPA erfasst allerdings nicht die zelluläre Komponente der Fibrinolyse, d. h. die Aktivität des Polymorphnukleären Granulozyten Systems (PMN) bzw. die Interaktion der neutrophilen Granulozyten mit dem Endothel [172].

4.2. Activated Fibrinolysis Parameters Assay (AFIPA)

Der AFIPA ist ebenfalls ein Globaltest der Fibrinolyse-Diagnostik. Sein Testprinzip basiert auf der Physiologischen Kontaktaktivierung der Fibrinolyse zu dem Faktor XII, Präkallikrein, HMWK und Faktor XI zählen [196]. Der AFIPA erfasst im Gegensatz zum FIPA auch die im Plasma vorhandene scu-PA.

Kallikrein aktiviert Plasminogen und etwas schwächer Urokinase, aber es ist auch ein hervorragender Aktivator für Prourokinase (scu-PA). Dadurch kann das fibrinolytischen System aktiviert werden [74][196].

Im AFIPA wird die Kontaktaktivierung durch Ellagsäure gestartet. Am Ende steht die Aktivierung der Prourokinase durch Kallikrein zu Urokinase. Aktivierte Phagozyten produzieren eine große Menge an scu-PA und an reaktiven Oxidanzien, wie Chloramin und HOCl. Plasmatische Inhibitoren wie z. B. α_2 -Antiplasmin, Antithrombin III und α_1 -Protease Inhibitor, die die funktionelle scu-PA Bestimmung stören, werden durch die Zugabe von Chloramin T zerstört ohne signifikante Beeinflussung der Serin-Proteasenaktivität [167][166][164][165]. Chloramin unterstützt die Aktivierung von

scu-PA [169], das vormals stabile plasmatische scu-PA wird aktivierbar. Die optimale Aktivierung erfolgt bei 3-5 mM Chloramin T als Endkonzentration im Test (50 mM im Chloramin T[®]-Reagenz) [169]. Niedrigere Chloramin-Konzentrationen sind insuffizient in der Inaktivierung von α_2 -Antiplasmin und höhere Konzentrationen denaturieren u-PA und Plasmin(ogen) [167]. Chloramin T imitiert dabei die physiologischen Oxidantien, die von aktivierten Phagozyten gebildet werden [190]. Die scu-PA Konzentration in gesunden Probanden beträgt $5,8 \pm 1,6$ ng/ml [169]. Unter körperlicher Belastung und Streß steigt der scu-PA Level deutlich an. Prourokinase wird durch Arginin stabilisiert. Arginin inhibiert die Aktivierung der Hämostase und dient dadurch als Stabilisator. Es verhindert eine pathologische Hämostase-Aktivierung, die durch das ursprünglich verwendete flüssige Citrat in Plasma-Proben nicht ausreichend gegeben war [170].

4.3. Plasmatischer PAI-2 Test

Der entwickelte plasmatische PAI-2 Test ist ein schneller funktioneller Test für plasmatisches PAI-2 und imitiert die physiologische periphagozytäre Mikroumgebung der Entzündung: Oxidantien und Proteasen sind wichtige Produkte von aktivierten polymorphkernigen Neutrophilen. Diese Agens reagieren untereinander und steigern die Entzündungsreaktion. Das biologische Resultat ist ein Anstieg der Proteo- und Fibrinolyse [171].

Während einer physiologischen Schwangerschaft kommt es zu einer Veränderung der Hämostase im Sinne einer Hyperkoagulation um eine Blutungskomplikation auch während der Geburt zu verringern. Die Fibrinolyse-Aktivität wird während der Schwangerschaft durch einen abfallenden PAI-1- und vor allem durch einen abfallenden PAI-2-Spiegel verringert [68]. Daher unterstützt der plasmatische PAI-2 Test den Nachweis von Plazentainsuffizienzen [11][128].

Im plasmatischen PAI-2 Test reagiert die Urokinase, wie bereits im FIPA beschrieben, zuerst mit den Plasminogenaktivator Inhibitoren PAI-1 und PAI-2. PAI-2 inhibiert sowohl Urokinase (u-PA) als auch den zweikettigen Gewebepasminaktivator (t-PA), ist aber im Vergleich zu PAI-1 ein 10-fach langsamerer Inhibitor [94].

Die Oxidation von humanem Plasma mit Chloramin, ein Oxidanz wie es die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten oder die Makrophagen produzieren,

bewirkt eine oxidative konzentrationsabhängige Inaktivierung von α_2 -Antiplasmin [166]. Die Aktivität von Urokinase und Plasmin kann nicht signifikant beeinflusst werden durch Oxidantien [164][13]. In Gegenwart von Chloramin T wird reaktiver PAI-1 sehr schnell und irreversibel inaktiviert [103]. Daher sollte Chloramin T erst nach der PAI-1/u-PA Reaktion zugesetzt werden, die Serpin/Serpinprotease Komplexe sind oxidationsresistent.

5. Zusammenfassung

5.1. Fibrinolysis Parameters Assay (FIPA)

Mit dem FIPA ist ein Globaltest der Fibrinolyse-Diagnostik entwickelt worden. Er ist ein einfacher, schneller und wirtschaftlicher Routine-Test für klinisch relevante plasmatische Fibrinolyse Parameter wie Plasminogen, Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 1 (PAI-1) und α_2 -Antiplasmin. Die Wirkung von Aprotinin kann unter anderem mit dem FIPA beurteilt werden. Allerdings ist er nicht sensitiv für physiologische Konzentrationen an Prourokinase (scu-PA) oder Gewebe Plasminogenaktivator (t-PA).

Als optimaler Testaufbau stellten sich folgende Konzentrationen heraus: 50 μ l Citratplasma werden mit 50 μ l Urokinase-Reagenz bestehend aus 10 IU u-PA/ml, 1,1 mmol/l Tranexamsäure, 1%Polygelin, 0,1% Triton X 100[®], PBS, pH 7,4 für 20 Minuten bei 37°C inkubiert, die so genannte Plasmin Erzeugungsphase. Anschließend werden für die Plasmin Bestimmungsphase 50 μ l einer 3 mmol/l H-D-Val-Leu-Lys-pNA, 1,05 mol/l KCl Substratlösung hinzugefügt. Die lineare Kinetik wird mittels eines Mikrotiterplatten Fotometers bei 405 nm durch die Differenzbildung zwischen dem freigesetzten pNA und dem Originalsubstrat bestimmt. Die Ergebnisse werden gegen ein gepooltes Normalserum (100% FIPA-Aktivität) kalibriert. Die intra- und interassay-Variationskoeffizienten liegen bei < 5%. Die untere Nachweisgrenze des funktionellen Fibrinolyse Test ergibt 5% der Aktivität des Kontrollplasmas. Die normale FIPA-Aktivität beträgt 100%, σ = 25%. Die FIPA Aktivität korreliert negativ ($r = - 0,684$) mit der Aktivität des Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) von Patienten-Proben.

5.2. Activated Fibrinolysis Parameters Assay (AFIPA)

Neben dem FIPA ist mit dem AFIPA ein weiterer Globaltest der Fibrinolyse-Diagnostik entwickelt worden. Durch sein Testprinzip basierend auf der physiologischen Kontaktaktivierung der Fibrinolyse ist er sensitiv auch für scu-PA.

Der AFIPA wird folgendermaßen durchgeführt: 50 μ l Plasma mit 100 mM Arginin pH 8,7 stabilisiert und 25 μ l 50 mM Chloramin T[®] in 100 mM NaHCO₃; pH 8,0 bei 37°C 5 Minuten inkubiert. Anschließend werden 150 μ l 0.1 g/l Ellagsäure hinzupipettiert und 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der zweiten Inkubation

werden 25 µl 6,0 mM chromogenes Substrat H-D-Val-Leu-Lys-pNA in 3,5 M KCl zugegeben und die lineare Kinetik ($\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$) wird nach 0 und 30 Minuten bei einer Absorption von 405 nm durch ein Mikrotiterplatten-Fotometer gemessen.

Die intra- und interassay-Variationskoeffizienten liegen bei $< 5\%$. Es konnte eine nahezu lineare Plasminaktivität nachgewiesen werden mit einer Wiederfindung von 90%.

5.3. Plasmatischer PAI-2 Test

Durch den neu entwickelten plasmatischen PAI-2 Test kann die PAI-2 Aktivität im Blut bestimmt werden. PAI-2 ist ein Marker der Plazentafunktion und hat klinische Relevanz bei der Beurteilung von normaler Schwangerschaft und Plazentainsuffizienz, wie zum Beispiel bei der Präeklampsie.

PAI-2 besitzt eine langsamere Reaktionskinetik als PAI-1. Nachdem die PAI-1/u-PA-Reaktion nach 5 Minuten bei 37°C komplett abgeschlossen ist, kann die PAI-2 Aktivität durch die Bestimmung der Differenz in der u-PA Inhibition zwischen 35 Minuten und 5 Minuten Inkubationszeit errechnet werden. PAI-2 im Plasma von Schwangeren wird im PAI-2 Test folgendermaßen bestimmt: 25 µl Plasma werden mit 25 µl 40 IU/ml Urokinase (u-PA) pH 8,4 in 100 mM Tris, 0,1% Triton X 100[®], 1% Polygelin, Aqua dest. (Testpuffer) für 5 Minuten oder für 35 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 25 µl 40 mM Chloramin T[®] und 25 µl 0,4 g/l (4,34 µM) Glu-Plasminogen in Testpuffer mit 60 mM Tranexamsäure zugefügt. Nach 5 Minuten bei 37°C werden 50 µl 1,8 mM H-D-Val-Leu-Lys-pNA in 1,39 M KCl zugegeben, und die lineare Kinetik ($\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$) wird bei einer Absorption von 405 nm durch ein Mikrotiterplatten-Fotometer gemessen. Die Differenz der Inhibierung zwischen 35 Minuten und 5 Minuten wird zur Bestimmung der PAI-2 Aktivitäten berechnet.

Die PAI-2 Tests werden nicht beeinflusst durch therapeutische Heparin Plasmakonzentrationen. Die intra- und interassay-Variationskoeffizienten liegen bei $< 5\%$, die untere Nachweisgrenze liegt bei 2 U/ml PAI-2 und die Wiederfindung bei $95 \pm 7\%$. Eine negative Linearität besteht zwischen PAI-2 und Extinktion. Die PAI-2 Aktivität von Schwangeren beträgt $30,3 \pm 19,9$ U/ml. Die plasmatische PAI-2 Aktivität korreliert mit der PAI-1 Aktivität negativ ($r = - 0,730$).

Zusammengenommen werden in der vorliegenden Arbeit drei neue chromogene Fibrinolyseteste erforscht. Insbesondere der Globaltest FIPA, aber auch AFIPA und PAI-2 Test sind wertvolle neue Techniken, um den Fibrinolyse-Status von Patienten zu bestimmen.

5. Abstract

5.1. Fibrinolysis Parameters Assay (FIPA)

Through FIPA a global assay of fibrinolysis diagnostics has been developed. It is a simple, rapid and economical routine test for several clinical relevant plasmatic fibrinolysis parameters like plasminogen, plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and α_2 -Antiplasmin. The effect of aprotinin can, among other things, be judged by FIPA. However, the FIPA is not sensitive to physiological concentrations of prourokinase (scu-PA) or tissue-type plasminogen activator (t-PA).

The following assay volumes and concentrations turned out to be optimal for the test set up: 50 μ l citrate plasma and 50 μ l urokinase reagent consisting of 10 IU u-PA/ml, 1,1 mmol/l tranexamic acid, 1% polygelin, 0,1% Triton X 100[®], PBS, pH 7,4 are incubated for 20 minutes at 37°C, the so called plasmin generation phase. Subsequently, for the plasmin determination phase 50 μ l of 3 mmol/l H-D-Val-Leu-Lys-pNA, 1,05 mol/l KCl is added. The linear kinetic is determined by means of a microtiterplate reader at 405 nm through the balance of the formation of released pNA and the original substrate. The results are calibrated against pooled normal plasma (100% FIPA activity). The intra- and interassay coefficients of variation have been found to be less than 5%. The detection limit (sensitivity) of the functional fibrinolysis assay is 5% of the normal plasmatic FIPA activity. The normal FIPA activity amounts to 100%, $\sigma = 25\%$. The FIPA activity correlates negatively ($r = - 0,684$) with the activity of the plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) of patient samples.

5.2. Activated Fibrinolysis Parameters Assay (aFIPA)

In addition to FIPA the development of aFIPA produced an additional global assay of fibrinolysis diagnostics. Due to the test principal being based on the physiological contact activation of fibrinolysis, it is sensitive also for scu-PA.

aFIPA assay is carried out as follows: 50 μ l citrate plasma stabilized with 100 mM arginine pH 8,7 and 25 μ l 50 mM Chloramin T[®] in 100 mM NaHCO₃, pH 8,0 is incubated at 37°C for 5 minutes. Subsequently 150 μ l 0.1 g/l ellagic acid is added by a pipette and incubated for 120 minutes at 37°C. After the second incubation, 25 μ l 6,0 mM chromogenic substrate H-D-Val-Leu-Lys-pNA in 3,5 M KCl is added and the linear kinetic ($\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$) is measured at 0 and 30 minutes at a wavelength of 405 nm through a microtiterplate reader.

The intra- and interassay coefficients of variation have been found to be < 5%. A linear plasmin activity could almost be proven to recover at 90%.

5.3. Plasmatic PAI-2 Assay

PAI-2 activity in the blood can be determined through the newly developed plasmatic PAI-2 assay. PAI-2 is marking placenta function and has clinical relevance differentiating normal pregnancy and placental insufficiency, for example pre-eclampsia.

PAI-2 possesses a slower kinetic reaction than PAI-1. Since the PAI-1/u-PA-reaction is complete within 5 minutes at 37°C, PAI-2 activity can be calculated by determining the difference in u-PA inhibition between 35 minutes and 5 minutes incubation time.

PAI-2 in plasma of pregnant women is determined as follows: 25 μ l plasma is being incubated with 25 μ l 40 IU/ml urokinase (u-PA) pH 8,4 in 100 mM Tris, 0,1% Triton X 100[®], 1% polygelin, Aqua dest. (assay buffer) for 5 minutes or incubated for 35 minutes at 37°C. Then 25 μ l of 40 mM Chloramin T[®] and 25 μ l 0,4 g/l (4,34 μ M) Glu-plasminogen in assay puffer, containing 60 mM tranexamic acid are added.

After 5 minutes at 37°C, 50 μ l 1,8 mM H-D-Val-Leu-Lys-pNA in 1,39 M KCl is added and the linear kinetic ($\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$) is being measured through absorption at a

wavelength of 405 nm using a microtiterplate reader. The inhibition difference between 35 minutes and 5 minutes incubation time is calculated.

The assay is not sensitive to therapeutic plasma concentrations of heparin. The intra- and interassay coefficients of variation have been found to be less than 5%. The detection limit equals 2 U/ml PAI-2 and the recovery at $95 \pm 7\%$. A negative linearity exists between PAI-2 and extinction. The PAI-2 activity of pregnant women at term is $30,3 \pm 19,9$ U/ml. The plasmatc PAI-2 activity correlates negatively with the PAI-1 activity ($r = - 0,730$).

In summary, three new chromogenic fibrinolysis assays are being investigated by this dissertation. In particular, the global FIPA assay, but also aFIPA and PAI-2 assay, are valuable new techniques to determine the fibrinolysis status of patients.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Abler A.
Untersuchung zur Biokompatibilität von Oxygenatoren in einem Herz-Lungen-Maschinen-Modell – Vergleich von unbeschichteten gegen heparinbeschichtete Oberflächen.
Dissertation, Tübingen 2002
- [2] Alessi MC, Declerck PJ, De Mol M, Nelles L, Collen D.
Purification and characterization of natural and recombinant human plasMinutenogen activator inhibitor-1 (PAI-1).
Eur J Biochem 1988; 175: 531-540
- [3] Alessi MC, Morange P, Juhan-Vague I.
Fat cell function and fibrinolysis.
Horm Metab Res 2000; 32: 504-508
- [4] Amiral J, Malmejac A, Gin H, Pannell R, Vissac AM, Seigneur M, Scarabin PY, Boisseau M, Guize L, Gurewich V.
Evaluation of the fibrinolytic potential on plasma: physiological and pathological variations, and associations with cardio-vascular disease risk factors.
Fibrinolysis & Proteolysis 1999; 13 Suppl 1: 1-10
- [5] Amiral J, Plassart V, Contant G, Guyader AM.
Different methods for the determination of tissue plasminogen activator (t-PA) and of its inhibitor (PAI).
J Clin Lab Inst Reag 1990; 13: 599-610
- [6] Anglés-Cano E.
A spectrophotometric solid-phase fibrin-tissue plasminogen activator activity assay (SOFIA-t-PA) for high-fibrin-affinity tissue plasminogen activators.
Anal Biochem 1986; 153: 201-210

- [7] Aoki N, Yamanaka T.
The α_2 -plasmin inhibitor levels in liver disease.
Clin. Chim. Acta 1978; 84: 99.
- [8] Aoki N.
 α_2 -Antiplasmin: Biochemie, Molekularbiologie und Physiologie.
In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B (Hrsg). Hämostaseologie: Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1999
- [9] Aoki N.
 α_2 -Antiplasminmangelerkrankungen: Pathophysiologie, Klinik, Diagnostik und Therapie.
In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B (Hrsg). Hämostaseologie: Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1999
- [10] Astedt B, Hagerstrand I, Lecander I.
Cellular localisation in placenta of placental type plasminogen activator inhibitor.
Thromb Haemost 1986; 56: 63-65
- [11] Astedt B, Lindoff C, Lecander I.
Significance of the plasminogen activator inhibitor of placental type (PAI-2) in pregnancy.
Semin Thromb Hemost 1998; 24: 431-435
- [12] Bachmann F.
The plasminogen-plasmin enzyme system. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, editors.
Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, 3 rd ed.
Philadelphia: Lippincott; 1994. p. 1592-622

- [13] Baker MS, Green SP, Goss N, Katrantzis M, Doe WF.
Plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2) is not inactivated by exposure to oxidants which can be released from activated neutrophils.
Biochem Biophys Res Commun 1990; 166: 993-1000
- [14] Barthels M, Poliwoda H.
Gerinnungsanalysen: Schnellorientierung, Befundinterpretation, klinische Konsequenzen.
Georg Thieme Verlag, 6. Auflage, Stuttgart/New York, 1998
- [15] Bell WR.
The fibrinolytic system in neoplasia.
Semin Thromb Hemost 1996; 22: 459-478
- [16] Bellart J, Gilabert R, Fontcuberta J, Borrell M, Miralles RM, Cabero L.
Fibrinolysis changes in normal pregnancy.
J Perinat Med 1997; 25: 368-372
- [17] Binder BR.
Influence of urokinase on cell proliferation and invasion.
Blood Coagul Fibrinolysis 1990; 1: 717-720
- [18] Bishop R, Ekert H, Gilchrist G, Shanbrom E, Fekete L.
The preparation and evaluation of a standardized fibrin plate for the Assessment of fibrinolytic activity.
Thromb Diath Haemorrh 1970; 23: 202-210
- [19] Bok RA, Mangel WF.
Quantitative characterization of the binding of plasminogen to intact fibrin clots, lysine-sepharose, and fibrin cleaved by plasmin.
Biochemistry 1985; 24:3279-3286

- [20] Booth NA, Reith A, Bennett B.
A plasminogen activator inhibitor (PAI-2) circulates in two molecular forms during pregnancy.
Thromb Haemost 1988; 59: 77-79
- [21] Bouma BN, Mosnier LO, Meijers JC, Griffin JH.
Factor XI dependent and independent activation of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in plasma associated with clot formation.
Thromb Haemost 1999; 82: 1703-1708
- [22] Brenner B.
Haemostatic changes in pregnancy.
Thromb Res 2004; 114: 409-414
- [23] Brommer EJP, Broks AL, Schalm SW, Rijken DJ, Verheijen JH.
Inhibitoren von Gerinnung und Fibrinolyse bei akuter und dekompensierter chronischer Leberinsuffizienz.
In Tilsner V, Matthias FR: Leber, Blutgerinnung und Hämostase.
Roche, Basel, 1984
- [24] Bruhn HD.
Thrombolyse-Therapie.
Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg 1976
- [25] Buchanan A.
Thrombose und Embolie in Geburtshilfe und Frauenheilkunde. Zit. n. Koller, Merz, Stamm, Marbert. Im Ergänzungsband des Seitzschen Handbuches der Biologie und Pathologie des Weibes. 1. Erg Bd. Seitz HD (Hrsg). München: Urban & Schwarzenberg 1957
- [26] Buess H.
Marksteine in der Entwicklung der Lehre von der Thrombose und Embolie
Gesnerue 1955; 12: 157-89.

- [27] Carmeliet P, Stassen JM, Schoonjans L, Ream B, van den Oord JJ, De Mol M, Mulligan RC, Collen D.
Plasminogen activator inhibitor-1 gene deficient mice. II. Effects on hemostasis, thrombosis, and thrombolysis.
J Clin Invest 1993; 92: 2756-2760
- [28] Castellino FJ, Urano T, de Serrano V, Morris JP, Chipper BA.
Control of human plasminogen activation.
Haemostasis 1988; 18 Suppl 1: 15-23
- [29] Catto AJ, Grant PJ.
Risk factors for cerebrovascular disease and the role of coagulation and fibrinolysis.
Blood Coag Fibrinolysis 1995; 6: 497-510
- [30] Chmielewska J, Ranby M, Wiman B.
Kinetic of the inhibition of plasminogen activators by the plasminogen-activator inhibitor. Evidence for "second-site" interactions.
Biochem J 1988; 251: 327-332
- [31] Chmielewska J, Ranby M, Wiman B.
Evidence for rapid inhibitor to tissue plasminogen activator.
Thromb Res 1983; 31: 427-436
- [32] Christensen LR.
Streptococcal fibrinolysis: a proteolytic reaction to a serum enzyme activated by streptococcal fibrinolysin.
J Gen Physiol 1945; 28: 363-83
- [33] Chung SI, Lee SY, Uchino R, Carmassi F.
Factors that control extravascular fibrinolysis.
Semin Thromb Hemost 1996; 22: 479-488

- [34] Claeys H, Vermeylen J.
Physico-chemical and proenzyme properties of NH₂-terminal lysine human plasminogen. Influence of 6-aminohexanoic acid.
Biochim. Biophys. Acta 1974; 342: 351.
- [35] Clemens I.
Inhibition of urokinase by complex formation with human antithrombin III in absence and presence of heparin.
Thromb Haemostas 1978; 39: 616-23
- [36] Clemmensen I, Christensen F.
Inhibition of urokinase by complex formation with human alpha₁-antitrypsin.
Biochim. Biophys. Acta. 1976; 249: 591
- [37] Clemmensen I.
Inhibition of urokinase by complex formation with human antithrombin III in absence and presence of heparin.
Thromb. Haemost. 1978; 39: 616
- [38] Cockell CS, Marshall JM, Dawson KM, Cederholm Williams SA, Ponting CP.
Evidence that the conformation of unliganded human Plasminogen is maintained via an intramolecular interaction between the lysine-binding site of kringle 5 and the N-terminal peptide.
Biochem J 1998; 333: 99-105
- [39] Collen D, Lijnen HR.
The fibrinolytic system in man.
Crit Rev Oncol Hematol 1986; 4: 249-301
- [40] Collen D, Wiman B.
Fast-acting plasmin inhibitor in human plasma.
Blood 1978; 51: 563-569

- [41] Collen D.
Fibrin-specific thrombolytic agents.
Klin Wochenschr 1988; 66 Suppl 12: 15-23
- [42] Colman RW, Schmaier AH.
Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant,
profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes.
Blood 1997; 90: 3819-3843
- [43] Dastre A.
Fibrinolyse dans le sang.
Arch int physiol norm path Paris 1893; 5:661
- [44] Dieval J, Nguyen G, Gross S, Delobel J, Kruithof EK.
A lifelong bleeding disorder associated with a deficiency of plasminogen
activator inhibitor type 1.
Blood 1991; 77: 528-532
- [45] Eddy AA.
Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney.
Am J Physiol Renal Physiol 2002; 283: 209-220
- [46] Ellis V, Wun TC, Behrendt N, Ronne E, Dano K.
Inhibition of receptor-bound urokinase by plasminogen-activator inhibitors.
J Biol Chem 1990; 265: 9904-9908
- [47] Estelles A, Gilabert J, Andres C, Espana F, Aznar J.
Plasminogen activator inhibitor type 1 and type 2 and plasminogen activators in
amniotic fluid during pregnancy.
Thromb Haemost 1990; 64: 281-285

- [48] Estelles A, Gilabert J, Aznar J, Loskutoff DJ, Schleef RR.
Changes in the plasma levels of type 1 and type 2 plasminogen activator inhibitors in normal pregnancy and in patient with severe preeclampsia.
Blood 1989; 74: 1332-1338
- [49] Estelles A, Gilabert J, Espana F, Aznar J, Galbis M.
Fibrinolytic parameters in normotensive pregnancy with intrauterine fetal growth retardation and in severe preeclampsia.
Am J Obstet Gynecol 1991; 165: 138-142
- [50] Fareed J, Hoppensteadt DA, Leya F, Iqbal O, Wolf H, Bick R.
Useful laboratory tests for studying thrombogenesis in acute cardiac syndromes.
Clin Chem 1998; 44: 1845-1853
- [51] Fay WP, Parker AC, Condrey LR, Shapiro AD.
Human plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) deficiency: characterization of a large kindred with a null mutation in the PAI-1 gene.
Blood 1997; 90: 204-8
- [52] Fischer B.
Mechanisms of activation of tissue-type plasminogenactivator.
Arzneimittelforschung 1990; 40: 625-632
- [53] Fossum S, Hoem NO.
Urokinase and non-urokinase fibrinolytic activity in protease-inhibitor-deprived plasma, assayed by a fibrin micro-plate method.
Immunopharmacology 1996; 32: 119-121
- [54] Francis CW, Marder VJ.
Mechanisms of fibrinolysis.
Aus: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA (Hrsg.):
Hematology (4.Aufl.). McGraw-Hill, New York, 1990.1313-1321

- [55] Francis CW, Marder VJ.
Physiologic regulation and pathologic disorders of fibrinolysis.
Hum Pathol 1987; 18: 263-274
- [56] Friberger P, Gallimore MJ: Activation of Fibrinolysis.
In Köstering H, Kreuzer H, Neuhaus KL: Thrombolytische Therapie des akuten
Myokardinfarkts.
Schattauer, Stuttgart-New York 1986
- [57] Fujii S.
PAI-1 in thrombosis and arteriosclerosis.
Fibrinol Proteol 1997; 11: 137-140
- [58] Gaffney PJ, Perry MJ.
Unreliability of current serum fibrin degradation product (FDP) assay.
Thromb. Haemost 1985; 53: 301
- [59] Gerlach E, Becker BF.
Interaction of blood and the vascular wall: hemostatic aspects.
Z Kardiol 1993; 82 Suppl 5: 13-21
- [60] Gils A, Declerck PJ.
Plasminogen activator inhibitor-1.
Curr Med Chem 2004; 11: 2323-2334
- [61] Glassman A, Abram M, Baxter G, Swett A.
Euglobulin lysis times: an update.
Ann Clin Lab Sci 1993; 23: 329-332
- [62] Graeff H.
Klinische und prognostische Bedeutung der tumorassoziierten Fibrinolyse in der
Onkologie.
Fibrinolyse 1991; 3:1

- [63] Grimaudo V, Bachmann F, Hauert J, Christe MA, Kruithof EK.
Hypofibrinolysis in patients with a history of idiopathic deep vein thrombosis
and/or pulmonary embolism.
Thromb Haemost 1992; 67: 397-401
- [64] Gröbble R, Geiger St.
Perioperative Gerinnungsstörung I.
- [65] Guo YL, Colman RW.
Two faces of high-molekular-weight kininogen (HK) in angiogenesis:
Bradykinin turns it on and cleaved HK (HKa) turns it of.
J Thromb Haemost 2005; 3: 670-676
- [66] Halligan A, Bonnar J, Sheppard B, Darling M, Walshe J.
Haemostatic, fibrinolytic and endothelial variables in normal pregnancies and
preeclampsia.
Br J Obstet Gynaecol 1994; 101: 488-492
- [67] Hekman CM, Loskutoff DJ.
Kinetic analysis of the interactions between activator inhibitor 1 and both
urokinase and tissue plasminogen activator.
Arch Biochem Biophys 1988; 262: 199-210
- [68] Hellgren M.
Hemostasis during normal pregnancy and puerperium.
Semin Thromb Hemost 2003; 29: 125-130
- [69] Hertzberg M.
Biochemistry of factor X.
Blood Rev 1994; 8: 56-62

- [70] Holmes WE, Lijnen HR, Nelles L, Kluft C Nieuwenhuis HR, Rijken DC, Collen D.
Alpha 2-antiplasmin Enschede: alanine insertion and abolition of plasmin inhibitory activity.
Science 1987; 238: 209-211
- [71] Holvoet P, Boes J, Collew D.
Measurement of free, one chain tissue-type plasminogen activator in human plasma with an enzym-linked immuno sorbent assay based on an active-site specific murine monoclonal antibody.
Blood 1987; 69: 284-289
- [72] Holvoet P, Lijnen HR, Collen D.
A monoclonal antibody specific for Lys-plasminogen. Application to the study of the activation pathway of plasminogen in vivo.
J Biol Chem 1985; 260: 12106-12111
- [73] Ichinose A, Kisiel W, Fujikawa K.
Proteolytic activation of tissue plasminogen activator by plasma and tissue enzymes.
FEBS Lett 1984; 175: 412-418
- [74] Ichose A, Fujikawa K, Suyama T.
The actiation of pro-urokinase by plasma Kallikrein and its inactivation by thrombin.
J Biol Chem 1986; 261: 3486-3489
- [75] Irigoyen JP, Munoz-Canoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y.
The plasminogen activator system: biology and regulation.
Cell Mol Life Sci 1999; 56: 104-132

- [76] Jaenecke J.
Blutgerinnung. Zur Geschichte.
Aus: Jaenecke J (Hrsg.). Antikoagulantien- und Fibrinolysetherapie.
Georg Thieme, Stuttgart 1976.1-4
- [77] Jespersen J, Astrup T.
A study of the fibrin plate assay of fibrinolytic agents. Optimal conditions,
reproducibility and precision.
Haemostasis 1983; 13: 301-315
- [78] Juhan-Vague I, Alessi MC, Declerck PJ.
Pathophysiologie of fibrinolysis.
Baillieres Clin Haematol 1995; 8: 329-343
- [79] Kakkar VV, Scully MF.
Thrombolytic therapie.
Br. Med. Bull. 1978; 34: 191
- [80] Kapiotis S, Speiser W.
Synthese und Umsatzstörung des Plasminogenaktivator Typ 1.
In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B (Hrsg). Hämostaseologie: Molekulare und
zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1999
- [81] Kapiotis S, Speiser W.
Synthese und Umsatzstörungen der Urokinase.
In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B (Hrsg). Hämostaseologie: Molekulare und
zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1999

- [82] Keijer J, Ehrlich HJ, Linders M, Preissner KT, Pannekoek H.
Vitronectin governs the interaction between plasminogen activator inhibitor 1
and tissue-type plasminogen activator.
J Biol Chem 1991; 266: 107000-107007
- [83] Keijer J, Linders M, Van Zonneveld AJ, Ehrlich HJ, de Boer JP, Pannekoek H.
The interaction of plasminogen activator inhibitor 1 with plasminogen activators
(tissue-type and urokinase-type) and fibrin: localization of interaction sites and
physiologic relevance.
Blood 1991; 78: 401-409
- [84] Kettle P, Mayne EE.
A bleeding disorder due to deficiency of α_2 -Antiplasmin.
J Clin Pathol 1985; 38: 428-9
- [85] Kinnby B, Matson L, Astedt B.
Aggravation of gingival inflammatory symptoms during pregnancy associated
with the concentration of plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI-2) in
gingival fluid.
J Periodontal Res 1996; 31: 271-277
- [86] Kisiel W, Fujikawa K.
Enzymological aspect of blood coagulation.
Behring Inst Mitt 1983 Aug; 73: 29-42
- [87] Kluft C, Dooijewaard.
Faktor XII (Hageman Faktor). Seine Rolle in der Blutgerinnung und Fibrinolyse
Hämostasiologie 1988; 11: 102

- [88] Kluft C, Nieuwenhuis HK, Rijken DC, Groeneveld E, Wijngaards G, van Berkel W, Dooijewaard G, Sixma JJ.
Alpha 2-Antiplasmin Enschede: dysfunctional alpha 2-antiplasmin molecule associated with an autosomal recessive hemorrhagic disorder.
J Clin Invest 1987; 80: 1391-1400
- [89] Knot EA, ten Cate JW, Lamping RJ, Gie LK.
Alpha 2-antiplasmin: functional characterization and metabolism in a heterozygote deficient patient.
Thromb Haemost 1986; 55: 375-378
- [90] Koie K, Kamiya T, Ogata D, Takamatsu J.
2-Plasmin inhibitor deficiency (Miyasato disease).
Lancet 1978; 2: 1334-1336
- [91] Kordich L, Feldman L, Porterie P, Lago O.
Severe hemorrhagic tendency in heterozygous alpha 2-antiplasmin deficiency.
Thromb Res 1985; 40: 645-651
- [92] Koyama T, Aoki N.
 α_2 -Makroglobulin und Protease Nexin 1: Struktur und Funktion.
In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B (Hrsg). Hämostaseologie: Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1999
- [93] Kruithof EK, Ransijn A, Bachmann F.
Influence of detergents on the measurement of the fibrinolytic activity of plasminogen activator.
Thromb Res 1982; 28: 251-260

- [94] Kruithof EKO, Bachmann F.
Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 2: Biochemie, Molekularbiologie und Physiologie.
In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B (Hrsg). Hämostaseologie: Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1999
- [95] Kruithof EKO, Tran-Thang C, Gudinchet A, Hauert J, Nicoloso G, Genton C, Welti H, Bachmann F.
Fibrinolyse in pregnancy: a study of plasminogen activator inhibitors.
Blood 1987; 69: 460-466
- [96] Lecander I, Åstedt B.
Isolation of a new specific plasminogen activator inhibitor from pregnancy plasma.
Br J Haematol 1986; 62: 221-228
- [97] Lee KN, Lee CS, Tae WC, Jackson KW, Christiansen VJ, Mc Kee PA.
Crosslinking of alpha 2-antiplasmin to fibrin.
Ann N Y Acad Sci 2001; 936: 335-339
- [98] Lee MH, Vosburgh E, Anderson K, McDonagh J.
Deficiency of plasma plasminogen activator inhibitor 1 results in hyperfibrinolytic bleeding.
Blood 1993; 81: 2357-2362
- [99] Liew MA, Mcphun V, Baker MS.
Topological localization of plasmonogen activator inhibitor type 2.
Cytometry 2000; 40: 32-41
- [100] Lijnen HR, Collen D.
Mechanisms of physiological fibrinolysis.
Baillieres Clin Haematol 1995; 8: 277-290

- [101] Lijnen HR.
Elements of the fibrinolytic system.
Ann N Y Acad Sci 2001; 936: 226-236
- [102] Lijnen HR.
Gene targeting in hemostasis. Alpha2-antiplasmin.
Front Biosci 2001; 6: D239-247
- [103] Lindahl TL, Sigurdardottir O, Wiman B.
Stability of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1).
Thromb Haemost 1989; 62: 748-751
- [104] Longstaff C, Gaffney PJ.
Studies on the mechanism of binding of serpins and serine proteases.
Blood Coagul Fibrinolysis 1992; 3:89-97
- [105] Longstaff C.
Studies on the mechanisms of action of aprotinin and tranexamic acid as plasmin inhibitors and antifibrinolytic agents.
Blood Coagul Fibrinolysis 1994; 5:537-542
- [106] Longstaff C, Clough AM, Gaffney PJ.
Kinetics of plasmin activation of single chain urinary-type plasminogen activator (scu-PA) and demonstration of a high affinity interaction between scu-PA and plasminogen.
J Biol Chem 1992; 267: 173-179
- [107] Lorand L.
Factor XIII: structure, activation, and interactions with fibrinogen and fibrin.
Ann N Y Acad Sci 2001; 936: 291 – 311

- [108] Luchtman-Jones L, Broze GJ Jr.
The current status of coagulation.
Ann Med 1995; 27:47-52
- [109] Macfarlane RG, Biggs R.
Fibrinolysis. Its mechanism and significance.
Blood 1948; 3: 1167-1187
- [110] Mammen EF.
Gerinnungsstörung: Eine Herausforderung für den Kliniker.
In: Mammen E.F. (Hrsg). Intensivmedizin aktuell: Sicherheit in Diagnose und
Therapie von Gerinnungsstörungen.
Die Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg 1987
- [111] Manhalter C.
Faktor XII: Biochemie, Molekularbiologie, Physiologie.
In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B (Hrsg). Hämostaseologie: Molekulare und
zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1999
- [112] Markus G, Ever J.L, Hobika G.H.
Comparison of some properties of native (Glu) and modified (Lys) human
plasminogen.
J. Biol. Chem. 1978; 253: 733.
- [113] Meade TW, Ruddock V, Stirling Y, Chakrabarty R, Miller GJ.
Fibrinolytic activity, clotting factors, and longterm incidence of ischaemic heart
disease in the Northwick Park Heart Study.
Lancet 1993; 342: 1076-1079
- [114] Menoud PA, Sappino N, Boudal-Khoshbeen M, Vassalli JD, Sappino AP.
The kidney is a major site of α_2 -Antiplasmin production.
J Clin Invest 1996; 97: 2478-2484

- [115] Menoud PA, Sappino N, Boudal-Khoshbeen M, Vassalli JD, Sappino AP.
The kidney is a major site of alpha (2)-antiplasmin production.
J Clin Invest 1996; 97: 2478-2484
- [116] Mertens K, Bertina RM.
Activation of human coagulation factor VIII by activated factor X, the common
product of the intrinsic and the extrinsic pathway of blood coagulation.
Thromb Haemost 1982; 47: 96-100
- [117] Miles LA, Dahlberg CM, Plow EF.
The cell-binding domains of plasminogen and their function in plasma.
J Biol Chem 1988; 263: 11928-11934
- [118] Miwa N, Sawada T, Suzuki A.
A specific disulfide bond associated with the activity of human urokinase.
Eur. J. Biochem. 1984; 140: 539
- [119] Moaddel M, Falls LA, Farrell DH.
The role of gamma A/ gamma fibrinogen in plasma factor XIII activation.
J Biol Chem 2000; 275: 32135-32140
- [120] Moore S, Pepper DS, Cash JD.
The isolation and characterization of a platelet-specific beta-globulin (beta-
thromboglobulin) and the detection of anti-urokinase and antiplasmin released
from thrombin-aggregated washed human platelets.
Biochim Biophys Acta 1975; 379: 360
- [121] Morawitz P.
Über einige postmortale Blutveränderungen.
Z ges Biochemie 1906; 8:1

- [122] Moroi M, Aoki N.
Isolation and characterization of α_2 -antiplasmin inhibitor from human plasma. A novel proteinase inhibitor which inhibits activator-induced clot lysis.
J. Biol. Chem. 1976; 251: 5956
- [123] Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA.
The structure and biological features of fibrinogen and fibrin.
Ann N Y Acad Sci 2001; 936:11-30
- [124] Mosesson MW.
Fibrinogen and fibrin polymerization: appraisal of the binding events that accompany fibrin generation and fibrin clot assembly.
Blood Coagul Fibrinolysis 1997; 8: 257-267
- [125] Müller M, Seifried E.
Pharmakokinetik von Plasminogenaktivatoren.
In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B (Hrsg). Hämostaseologie: Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1999
- [126] Müllertz S.
Fibrinolysis. General aspects, characteristic features and perspectives.
Fibrinolysis 1987; 1:3-12
- [127] Muszbek L, Adany R, Mikkola H.
Novel aspects of blood coagulation factor XIII. I. Structure, distribution, activation, and function.
Crit Rev Clin Lab Sci 1996; 33: 357-421
- [128] Nakashima A, Kobayashi T, Terao T.
Fibrinolysis during normal pregnancy and severe preeclampsia relationships between plasma levels of plasminogen activators and inhibitors.
Gynecol Obstet Invest 1996;42: 95-101

- [129] Narayanan S.
Multifunctional roles of thrombin.
Ann Clin Lab Sci 1999; 29: 275-280
- [130] Nesheim M.
Thrombin and Fibrinolysis
Chest 2003; 124 (3 Suppl): 33S-9S
- [131] Nesheim ME.
TAFI.
Fibrinolysis & Proteolysis 1999; 13: 72-77
- [132] Nilsson IM, Hedner U, Pandolfi M.
The measurement of fibrinolytic activities.
In Markwardt FN: Fibrinolysis and Antifibrinolytics.
Handbuch der experimentellen Pharmakologie, vol.43, Springer, Berlin, 1978
- [133] Nordby E, Arnesen H, Andersen P, Godal HC.
The euglobulin clot lysis time, a rapid and sensitive method for the assay of
fibrinolytic activity after venous stasis.
Scand J Haematol 1980; 25: 407-411
- [134] Nsiri B, Gritli N, Mazigh C, Gazhouani E, Fattoum S, Maghghoul S.
Fibrinolytic response to venous occlusion in patients with homozygous sickle cell
disease.
Hemato Cell Ther 1997; 39: 229-230
- [135] Ogston D, Bennett B, Herbert RJ, Douglas AS.
The inhibition of urokinase by alpha₂-macroglobulin.
Clin Sci. 1973; 44: 73

- [136] Ossowski L, Masucci MT, Blasi F.
In vivo paracrine interaction between urokinase and its receptor: effect on tumor cell invasion.
J Cell Biol 1991; 115: 1107-1112
- [137] P.Gaetgens.
Das Kreislaufsystem.
In: Klinke R, Silbernagel S (Hrsg). Lehrbuch der Physiologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 1996
- [138] Paoletti R, Sherry S.
Eds., Thrombosis and Urokinase.
Academic. Press, London 1977
- [139] Pâques EP, Heimburger N.
Das fibrinolytische System.
Hämostaseologie 1986; 6: 139-147
- [140] Patthy L.
Evolution of blood coagulation and fibrinolysis.
Blood Coagul Fibrinolysis 1990; 1: 153-166
- [141] Plow EF, Felez J, Miles LA.
Cellular regulation of fibrinolysis.
Thromb Haemost 1991; 66: 32-36
- [142] Plow EF, Herren T, Redlitz A, Miles LA, Hoover-Plow JL.
The cell biology of the plasminogen system.
FASEB J 1995; 9: 939-945
- [143] Ponting CP, Marshall JM, Cederholm-Williams SA.
Plasminogen: a structural review.
Blood Coagul Fibrinolysis 1992; 3: 605-614

- [144] Priglinger U, Binder BR.
Das Fibrinolyse-System.
In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B (Hrsg). Hämostaseologie: Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1999
- [145] Rai R, Sprengeler PA, Elrod KC, Young WB.
Perspectives on factor Xa inhibition.
Curr Med Chem 2001; 8: 101-119
- [146] Reilly TM, Mousa SA, Seetharam R, Racanelli AL.
Recombinant plasminogen activator inhibitor type 1: a review of structural, functional, and biological aspects.
Blood Coagul Fibrinolysis 1994; 5: 73-81
- [147] Ridker PM.
Intrinsic fibrinolytic capacity and systemic inflammation: novel risk factors for arterial thrombotic disease.
Haemostasis 1997; 27: 2-11
- [148] Robison AK, Collen D.
Activation of the Fibrinolytic System.
Cardiology clinics. 1987; 5: 13-19
- [149] Rock G, Wells P.
New concepts in coagulation.
Crit Rev Clin Lab Sci 1997;34: 475-501
- [150] Römisch J, Schüler E, Pâques EP, Heimburger N.
Hemostasis, fibrinolysis, proteolysis: interaction with inflammatory reactions.
Behring Inst Mitt 1990; 86: 129-145

- [151] Rosen S, Wejkum L, Billing-Claeson S, Ghosh R, Grdic K, Chmielewska J, Meijer P, Klufft C, Tengborn L, Conkie J, Walker I.
Evaluation of a bioimmuno assay for t-PA activity and its relation to PAI-1 activity and antigen levels.
Fibrinolysis & Proteolysis 1998; 12: 340-346
- [152] Saito H, Goodnough LT, Boyle LM, Heimburger N.
Reduced histidine-rich glycoprotein levels in plasma of patients with advanced liver cirrhosis. Possible implications for enhanced fibrinolysis.
Amer J Med 1982; 73: 179-182
- [153] Samama M, Castel M, Matsuo O, Hoylaerts M, Lijnen HR.
Comparative study of the activity of high and low molecular weight urokinase in the presence of fibrin.
Thromb. Haemost. 1982; 47: 36
- [154] Schaier AH, Silverberg M, Kaplan AP: Contact activation and its abnormalities.
In Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW: Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Therapy, 2nd ed. Lippincott, Philadelphia 1987
- [155] Scharrer I, Pötzsch B.
Plasminogen.
In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B (Hrsg). Hämostaseologie: Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1999
- [156] Schleef RR, Higgins DL, Pillemer E, Levitt LJ.
Bleeding diathesis due to decreased functional activity of type 1 plasminogen activator inhibitor.
J Clin Invest 1989; 83: 1747-1752

- [157] Schousboe I, Feddersen K, Rojkjaer R.
Faktor XIIIa is a kinetically favourable Plasminogen activator.
Thromb Haemost 1999; 82: 1041-1046
- [158] Scott CF, Silver LD, Schapira M, Colman RW.
Cleavage of human high molecular weight kininogen markedly enhances its
coagulant activity. Evidence that this molecule exists as a profactor.
J Clin Invest 1984; 73: 954-962
- [159] Sidelmann JJ, Gram J, Jespersen J, Kluft C.
Fibrin clot formation and lysis: basic mechanisms.
Semin Thromb Hemost 2000; 26: 605-618
- [160] Sloan IG, Firkin BG.
Impaired fibrinolysis in patients with thrombotic or haemostatic defects.
Thromb Res 1989; 55: 559-567
- [161] Smith FB, Lee AJ, Rumley A, Fowkes FGR, Lowe GDO.
Tissue-plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor and risk of
peripheral arterial disease.
Artherosclerosis 1995; 115: 35-43
- [162] Sobel BE, Taatjes DJ, Schneider DJ.
Intramural Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 and Coronary
Atherosclerosis.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23: 1979-1989
- [163] Stassen JM, Arnout J, Deckmyn H.
The hemostatic system.
Curr Med Chem 2004; 11: 2245-2260

- [164] Stief TW, Aab A, Heimbürger N.
Oxidative inactivation of purified human alpha-2-antiplasmin, antithrombin III,
and C1-inhibitor.
Thromb Res 1988; 49: 581-589
- [165] Stief TW, Bänder R, Richter A, Maisch B, Renz H, Fareed J.
In vitro simulation of therapeutic plasmatc Fibrinolysis.
Clin Appl Thromb Hemost 2003; 9: 211-220
- [166] Stief TW, Heimbürger N.
Inactivation of serine proteinase inhibitors (serpins) in human plasma by
reactive oxidants.
Biol Chem Hoppe Seyler 1988; 369: 1337-1342
- [167] Stief TW, Lenz P, Becker U, Heimbürger N.
Determination of plasminogen activator inhibitor (PAI) capacity of human
plasma in presence of oxidants: a novel principle.
Thromb Res 1988; 50: 559-573
- [168] Stief TW, Martin E, Villalobos E, Yoldi F, Rodriguez JM.
Specific of functional determination of urokinase in human plasma using
selective oxidants.
Fibrinolysis 1990; 4 Suppl 2: 148-149
- [169] Stief TW, Stief MH, Ehrental W, Darius H, Martin E.
Nonradical oxidants of the phagocyte type induce the activation of plasmatc
single chain-urokinase.
Thromb Res 1991; 64: 597-610
- [170] Stief TW, Weippert M, Kretschmer V, Renz H.
Arginine inhibits hemostasis activation.
Thromb Res 2001; 104: 265-274

- [171] Stief TW.
A direct approach in fibrinolysis diagnostic: mimicry of the leukocyte attack by oxidants.
Thromb Res 1989; 56: 213-220
- [172] Stief TW.
The blood fibrinolysis/deep-sea analogy: a hypothesis on the cell signals oxygen/photons as natural antithrombotics.
Thromb Res 2000; 1-20
- [173] Stump DC, Taylor FB, Nesheim ME, Giles Ar, Dzik WH, Bovill EG.
Pathologic fibrinolysis as cause of clinical bleeding.
Semin Thromb Hemost 1990; 16: 260-273
- [174] Ten Cate JW.
In: Tilsner V, Matthias F.R. Leber, Blutgerinnung und Hämostase.
Roche, Basel 1984: 207.
- [175] Ten Cate JW.
In Tilsner V, Matthias FR: Leber, Blutgerinnung und Hämostase.
Roche, Basel, 1984
- [176] Thorsen S, Kok P, Astrup T.
Reversible and irreversible alternations of human plasminogen indicated by changes in susceptibility to plasminogen activators and in response to epsilon-aminocaproic acid.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1974; 32: 325
- [177] Travis J, Salvesen G.
Control of coagulation and fibrinolysis by plasma proteinase inhibitors.
Behring Inst Mitt 1983; 73: 56-65

- [178] Triantaphyllopoulos DC, Leech SC.
Thrombin generation in normal plasma enriched with purified coagulation factors.
Thromb Res 1983; 29: 355-369
- [179] Triplett DA.
The extrinsic system.
Clin Lab Med 1984; 4: 221-244
- [180] Tsatas D, Baker M, Baker MS, Rice GE.
Differential expression of proteases in human gestational tissue before, during and after spontaneous-onset labour at term.
J Reprod Fertil 1999; 116: 43-49
- [181] Unkrig C.
Therapie mit Antifibrinolytika.
In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B (Hrsg). Hämostaseologie: Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1999
- [182] Van der Graaf F, Keus FJA, Vlooswijk RAA, Bouma BN.
The contact activation mechanism in human plasma: Activation induced by dextran sulfate.
Blood 1982, 59: 1225
- [183] Van Giezen JJ, Chung-A-Hing JE, Vegter CB, Bouma BN, Jansen JW.
Fibrinolytic activity in blood is distributed over a cellular and the plasma fraction which can be modulated separately.
Thromb Haemost 1994; 72: 887-892

- [184] Verstraete M.
A far-reaching program: rapid, safe and predictable thrombolysis in man,
in Fibrinolysis Kline DL and Reddy NN.
Eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1980, 129
- [185] Violi F, Ferro D, Basill S, Quintarelli C, Saliola M, Alessandri C, Cordova C,
Balsano F.
Hyperfibrinolysis increases the risk of gastrointestinal hemorrhage in patients
with advanced cirrhosis.
Hepatology 1992; 15: 672-676
- [186] Von Kaulla KN, von Kaulla E.
Remarks on the euglobulin lysis time.
Prog Chem Fibrin Thromb 1975; 1: 131-149
- [187] Von Kaulla E, von Kaulla KN.
Detection of hypercoagulability states by a modified ethanol gelation test and its
correlation with other coagulation procedures.
Am J Clin Pathol 1974; 61: 810-822
- [188] Wallen P, Wiman B.
On the generation of intermediat plasminogen and its significance for activation,
in Proteases and Biological Control.
In: Reich E, Rifkin D.B, Shaw E. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring
Harbor, N.Y. 1975; 291.
- [189] Walther PJ, Hill HL, McKee PA.
The importance of the preactivation peptide in two stage mechanism of human
plasminogen activation.
J. Biol. Chem. 1975; 250: 5926.

- [190] Weiss SJ, Lampert MB, Test ST.
Long lived oxidans generated by human neutrophils: characterization and bioactivity.
Science. 1983; 222: 625-628
- [191] Wentscher U.
Untersuchungen zur Methode des „umgekehrten Fibrinplattenassay“ zur Bestimmung der Empfindlichkeit von Patientenfibrin gegenüber Fibrinolyse durch Urokinase.
Dissertation, Marburg 1993
- [192] Williams EC.
Plasma alpha 2-antiplasmin activity. Role in evaluation and management of fibrinolytic states and other bleeding disorders.
Arch Intern Med 1989; 149: 1769-1772
- [193] Wiman B, Collen D.
Purification and characterization of human antiplasmin, the fast-acting plasmin inhibitor in plasma.
Eur J Biochem 1977; 78: 19
- [194] Wright JG, Cooper P, Astedt B, Lecander I, Wilde JT, Preston FE, Greaves M.
Fibrinolysis during normal human pregnancy: complex inter-relationships between plasma levels of tissue plasminogen activator and inhibitors and the euglobulin clot lysis time.
Br J Haematol 1988; 69: 253-258
- [195] Yamamoto K, Takeshita K, Shimokawa T, Yi H, Isobe K, Loskutoff DJ, Saito H.
Plasminogen activator inhibitor-1 is a major-regulated gene: implications for stress-induced thrombosis in aged individuals.
Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 890-895

- [196] Yarovaya GA, Blokhina TB, Neshkova EA.
Contact system. New Concepts on activation mechanisms and bioregulatory functions.
Biochemistry 2002; 67: 13-24
- [197] Yin KH, Koh SC, Malcus P, Svenmontan S, Biswas A, Arulkumaran S, Ratnam SS.
Preclampsia: haemostatic status and the short-term effects of methyldopa and isradipine therapy.
J Obstet Gynaecol Res 1998; 24: 231-238

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Baumeister, geb. Hinz
Vorname: Frauke
Geburtsdatum/-ort: 13.07.1972, Gießen
Anschrift: Ellerstraße 65
49088 Osnabrück
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

08/1979 – 06/1983 Grundschule Marbach in Marburg
08/1983 – 05/1992 Gymnasium Martin-Luther-Schule, Marburg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung:

09/1992 – 06/1995 Ausbildung zur Biologielaborantin bei den
Behringwerken Marburg

Hochschulbildung:

10/1995 – 04/2001 Studium der Humanmedizin an der
Philipps-Universität Marburg
09/1997 Ärztliche Vorprüfung
09/1998 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2001 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2001 – 06/2002 Studium der Humanmedizin an der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
Praktisches Jahr: Universitätsklinikum Münster
05/2002 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Berufstätigkeit:

08/2002 – 08/2004 Ärztin im Praktikum, anschließend Assistenzärztin in
Schüchtermann Kliniken, Bad Rothenfelde bei
Prof. Dr. med. Thale in den Abteilungen Kardiologie,
Kardiochirurgie und Kardioanästhesie
08/2004 – 05/2005 Assistenzärztin im Diakonie-Klinikum Osnabrücker-
Land, Georgsmarienhütte bei Dr. med. Riedesel
in den Abteilungen Geriatrie und Suchterkrankung
07/2005 – 11/2005 Assistenzärztin in den Schüchtermann-Klinik,
Bad Rothenfelde bei Prof. Dr. med. Thale
in den Abteilungen Kardiologie
11/2005 – 12/2005 Assistenzärztin im Krankenhaus Waldfriede, Berlin bei
Frau Dr. med. Ehren in der chirurgischen Abteilung
01/2006 – 03/2006 Assistenzärztin im Klinikum Osnabrück bei
Prof. Dr. med. Clemens in der chirurgischen Abteilung
04/2006 – 02/2007 Assistenzärztin im Diakonie-Klinikum Osnabrücker-
Land, Georgsmarienhütte bei Dr. med. Riedesel
in den Abteilungen Geriatrie und Suchterkrankung
Seit 03/2007 Assistenzärztin im Lukas Krankenhaus Bünde bei
Dr. med. Wejda in der Abteilungen für Innere Medizin

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

In Marburg:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Christiansen, Czubayko, Doss, Engel, Geus, Gotzen, Griss, Gröne, Gudermann, Habermehl, Happle, Hellinger, Hesse, Hofmann, Kern, Klenk, Klose, König, Koolman, Kretschmer, Krieg, Lang, Lennartz, Maisch, Oertel, Reichardt, Remschmidt, Renz, Röhm, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schnabel, Schneyer, Schulz, Seitz, Stief, Vohland, Voigt, von Wichert, Weihe, Werner.

In Münster:

Berdel, Breithard, Brug, Domschke, Grabbe, Hengst, Luger, Rahn, Schaefer, Senninger.

Danksagung

Meinen besonderen Dank gilt PD Dr. Thomas Stief für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas, sowie für die hervorragende Betreuung und Unterstützung in fachlicher und außerfachlicher Hinsicht beim Durchführen dieser Arbeit.

Den Mitarbeitern der Klinischen Chemie und Molekularen Diagnostik des Universitätsklinikums Giessen und Marburg, Standort Marburg danke ich herzlich für die stete Hilfsbereitschaft und Ansprechbarkeit.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Neue chromogene Screening-Methoden der Fibrinolyse Diagnostik“ im Medizinischen Zentrum für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik - Zentrallaboratorium - unter Leitung von Prof. Dr. Renz mit Unterstützung durch PD Dr. Stief ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen „A Simple Screening Assay for Certain Fibrinolysis Parameters (FIPA)“ in Thrombosis Research 97 (2000) 231-237 veröffentlicht.

Marburg, den 14.10.2008