

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie,
Molekulare Diagnostik

Direktor: Prof. Dr. med. Harald Renz

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Thrombinaktivität basierter Test zur intrinsischen Gerinnung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Stefanie Otto (geb. Mantel) aus Bremen

Marburg 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 25.01.2016

Gedruckt mit freundlicher Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr PD Dr. T. W. Stief

1. Korreferent: Frau Prof. Dr. B. Kemkes-Matthes

In Jesus Christus liegen verborgen alle Schätze der Weisheit und der Erkenntnis.

(Die Bibel, Kolosser 2,3)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Hämostase unter besonderer Berücksichtigung des Thrombins....	1
1.1.1. Die Hämostase.....	1
1.1.2. Die thrombozytäre Gerinnung (primäre Hämostase)	4
1.1.3. Die plasmatische Gerinnung (sekundäre Hämostase).....	6
1.1.4. Inhibitoren der plasmatischen Gerinnung	13
1.1.5. Die Fibrinolyse (tertiäre Hämostase).....	15
1.1.6. Thrombin	16
1.2. Gerinnungsdiagnostik	20
1.2.1. Globalteste in der Gerinnungsdiagnostik	20
1.2.2. Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit	21
1.2.3. Thrombingenerierungsteste	24
1.2.4. Synthetische Peptidsubstrate.....	27
1.2.5. Das calibrierte automatisierte Thrombogramm	29
1.3. Fragestellung und Zielsetzung.....	34
2. Material und Methoden	36
2.1. Blutproben	36
2.2. Gruppenzuteilung	37
2.3. Analyseverfahren.....	38
2.3.1. Benötigte Materialien	38
2.3.2. Vorbereitungen.....	38
2.3.3. Durchführung des INCA	40
2.3.4. INCA als Kurve versus INCA als Zweipunktmessung	41
2.3.5. Weitere Variationen der Durchführung des INCA	42
2.4. Statistische Auswertung.....	43
3. Ergebnisse	44
3.1. Argininzusatz	44
3.2. INCA-Kinetik bei ausgeglichener Gerinnungslage.....	46
3.3. INCA bei Antikoagulation	49
3.4. Der Einfluss von Thrombozyten auf den INCA	54
3.5. Lyophilisierte Plasmen im INCA.....	56
3.6. Probenlagerung bei Raumtemperatur	57
3.7. Einfrieren und Auftauen von Plasma	58

3.8. INCA bei Raumtemperatur.....	61
3.9. Auswirkung von Kühlung auf den INCA.....	62
3.10. Variationskoeffizient und Normbereich.....	63
3.11. Einfluss des Matrixvolumens auf den INCA	64
3.12. Korrelation des INCA mit anderen Gerinnungstesten	66
3.13. Gruppenanalyse.....	70
4. Diskussion	75
4.1. Grundsätzliche Überlegungen zur Notwendigkeit eines neuen Gerinnungstests.....	75
4.2. Diskussion der Methodik des INCA	76
4.3. Diskussion der Ergebnisse	82
4.4. Schlussfolgerung und Ausblick	87
5. Zusammenfassungen	89
6. Literaturverzeichnis	95
7. Anhang.....	107
7.1. Abbildungsverzeichnis.....	107
7.2. Tabellenverzeichnis	108
7.3. Abkürzungsverzeichnis.....	109
7.4. Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	113
7.5. Danksagung.....	114

1. Einleitung

1.1. Die Hämostase unter besonderer Berücksichtigung des Thrombins

1.1.1. Die Hämostase

Der Begriff Hämostase leitet sich von den altgriechischen Worten für Blut (αἷμα, haima) und Stockung bzw. Stillstand (στάσις, stasis) ab. Die Hämostase umfasst somit die körpereigenen Prozesse der Blutstillung und ist für das Überleben des Menschen unverzichtbar. Bei einer Verletzung der Blutgefäße kommt es zum Blutverlust, der fatale Folgen für den Organismus haben kann und bei erheblichem Ausmaß in Schock und Kreislaufversagen mündet. Um das Blut als Organ des Körpers zu schützen und sowohl seinem Verlust als auch einer Thrombose vorzubeugen, muss die Blutung in angemessen kurzer Zeit zum Stehen gebracht werden. Hiermit wird gleichzeitig die Voraussetzung der Wundheilung geschaffen. Von entscheidender Bedeutung ist dabei, dass die Blutstillung lokal begrenzt am Ort der Gefäßverletzung stattfindet und sich nicht etwa auf benachbarte intakte Gefäße ausweitet. Andernfalls kann eine überschießende intravasale Blutgerinnung durch die Verlegung der Gefäßlumina zur Minderversorgung von nachgeschalteten Geweben und Organen führen. Im weiteren Sinne werden daher unter dem Begriff „Hämostase“ die Gerinnung und die Fibrinolyse zusammengefasst.

Die Hämostase ist ein komplexes Zusammenspiel physiologischer Prozesse, die sich in verschiedene Gruppen unterteilen lassen (siehe Tabelle 1). Als Erstes sei hier die zelluläre Gerinnung genannt, die auch als primäre Hämostase bezeichnet wird. Sie wird insbesondere durch Thrombozyten in Interaktion mit Endothelzellen und Subendothel vermittelt und führt zu einem Plättchenaggregat, das einen ersten aber noch instabilen Wundverschluss darstellt. In einem zweiten Schritt erfolgt durch plasmatische Vorgänge die sogenannte sekundäre Hämostase, bei der durch das Zusammenspiel ständig im Blut zirkulierender Gerinnungsfaktoren mit Gewebebestandteilen und von Thrombozyten bereitgestellten Stoffen schließlich ein Fibrinnetz hergestellt wird. Der so entstehende rote Thrombus, bestehend aus fibrinvernetzten Thrombozyten und Erythrozyten, gewährleistet schließlich einen stabilen Wundverschluss. Als Drittes wird der

entstandene Thrombus teilweise wieder aufgelöst und im Rahmen der Wundheilung umgebaut. Die Fibrinolyse trägt dazu bei, dass das verletzte Gefäß rekanalisiert und wieder von flüssigem Blut durchströmt wird. Die drei genannten Schritte der Hämostase laufen dabei nicht etwa getrennt voneinander ab, sondern sind eng miteinander verwoben (Gomez et al. 2010).

Die Hämostase als Ganzes gesehen ist ein System, das eine Vielzahl an Regulationsmechanismen aufweist. Diverse humorale und zelluläre Komponenten befinden sich stets in enger Interaktion mit den Gefäßwänden und der Blutzirkulation. Die gerinnungs-fördernden Faktoren einerseits und die Fibrinolyse bzw. das gerinnungs-inhibierende System andererseits stehen dabei physiologischerweise in einem empfindlichen Gleichgewicht, dessen Störung entweder zu einer Thrombose- oder einer Blutungsneigung führen würde.

Aktuelle Veröffentlichungen unterstreichen, dass nicht nur die an der Hämostase beteiligten Prozesse auf unterschiedlichste Weise miteinander gekoppelt sind, sondern dass darüber hinaus auch eine Vielzahl anderer Systeme des menschlichen Organismus wie die Angiogenese, das immunologische System und das Komplementsystem in engem Zusammenhang mit der Hämostase gesehen werden müssen (Woodruff et al. 2011, Nickel und Renné 2012, Lupu et al. 2014). Im Folgenden sollen nun die einzelnen Teilgebiete der Hämostase genauer beleuchtet werden.

Tabelle 1: Komponenten der Hämostasesysteme und ihre Wirkungen auf die Gerinnung und auf mit der Gerinnung verknüpfte Prozesse

Die Auflistung gibt einen Überblick über wesentliche Akteure der jeweiligen Systeme, verzichtet jedoch aufgrund der Vielzahl der beteiligten Komponenten auf Vollständigkeit.

Einteilung	Beteiligte Komponenten	Funktion
Endothelzellen und Subendothel	Subendotheliale Matrix, insbesondere Kollagen	Thrombozytenadhäsion, Aktivierung der intrinsischen Gerinnung (FXII)
	von-Willebrand-Faktor (vWF)	Thrombozytenadhäsion, Cofaktor für FVIII
	Gewebefaktor (tissue factor, FIII)	Aktivierung der extrinsischen Gerinnung (FVII)
	Thrombomodulin	Aktivierung des Inhibitorsystems (Protein C)
	t-PA, Plasminogen	Aktivierung der Fibrinolyse
	PAI-1	Hemmung der Fibrinolyse
	Endothelin-1	Vasokonstriktion
	NO, Prostacyclin	Vasodilatation und Thrombozytenaggregationshemmung
Thrombozytäres System	Oberflächenrezeptoren (z. B. GP Ic/IIa, GP Ib/IX, GP IIb/IIIa)	Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation
	Phospholipide der Thrombozytenmembran (z. B. Plättchenfaktor 3, gleichbedeutend mit PAF)	Aktivierung der plasmatischen (intrinsischen) Gerinnung
	Inhaltsstoffe der Thrombozytengranula (Fibrinogen, Serotonin, ADP, Ca ²⁺ , vWF, FV, FVIII, Plättchenfaktor 4, Fibroblasten-Wachstumsfaktoren, Platelet derived growth factor u. a.)	Thrombozytenaggregation, Vasokonstriktion, Verstärkung der plasmatischen Gerinnung, Abwehr, Entzündung, Angiogenese, Wundheilung
	Thromboxan A ₂	Vasokonstriktion
Plasmatisches Gerinnungssystem	Intrinsisches System (Präkallikrein, HK, FXII, FXI, FIX, FVIII, FX, FV, FII, FI) und extrinsisches System (FVII, FX, FV, FII, FI)	Sekundäre Hämostase (Entstehung von Fibrin), aber über Thrombin auch Thrombozytenaktivierung, t-PA-Freisetzung, Aktivierung von Protein C etc.
	Gerinnungsinhibitoren (Antithrombin, Protein C, Protein S, TFPI u. a.)	Hemmung der plasmatischen Gerinnung
	Fibrinolyse-System (Plasmin, Kallikrein, Urokinase u. a.)	Spaltung von Fibrin, Fibrinogen, FV und FVIII
	Fibrinolyseinhibitoren (Antiplasmin, PAI-1)	Hemmung der Fibrinolyse

1.1.2. Die thrombozytäre Gerinnung (primäre Hämostase)

Die gerinnungsfördernden Funktionen des primären Hämostasesystems werden aktiviert, sobald die endotheliale Auskleidung eines Blutgefäßes verletzt wird und das Blut mit der extrazellulären Matrix in Berührung kommt. Der erste Schritt hin zur Gefäßabdichtung besteht in der Anlagerung (Adhäsion) von Blutplättchen an Kollagen, Fibronectin, Laminin und andere Bestandteile der nun freigelegten subendothelialen Matrix. Die Plättchenadhäsion wird von einer Verlangsamung der Blutströmung, ausgelöst durch einen Vasospasmus der glatten Muskulatur, begünstigt. Auf der Thrombozytenoberfläche befinden sich spezifische Rezeptoren wie Glycoproteinrezeptor (GP) Ic/IIa, GP Ia/IIa und GP Ib/IX, deren Aufgabe es ist, an die Matrixproteine zu binden (Löwenberg et al. 2010, Stegner und Nieswandt 2011, Cimmino und Golino 2013). Letztgenannter Rezeptor vermittelt die Bindung an das hochmolekulare Adhäsivprotein von-Willebrand-Faktor (vWF), das wiederum durch die Bindung an Kollagen den Thrombozyten am Subendothel verankert und gleichzeitig aktiviert (Reininger 2008). Vor allem bei hohen Scherkräften sind GP Ib/IX und vWF von großer Bedeutung, da die Scherkräfte eine Entfaltung des kollagengebundenen vWFs bewirken, so dass dieser seine Bindungsstellen für die thrombozytären Glykoproteine freigibt. VWF wird von Endothelzellen und Thrombozyten gebildet und zirkuliert im Plasma als globuläres Protein. Seine Aufgaben in der Hämostase umfassen neben der Vermittlung der Thrombozytenadhäsion auch die Förderung der Aggregation der Plättchen untereinander durch Bindung an Fibrinogen und im Rahmen der plasmatischen Gerinnung die Bindung an Faktor VIII (FVIII), so dass er dessen vorzeitigen Abbau verhindert und als Cofaktor fungiert.

Im Anschluss an die Thrombozytenadhäsion kommt es zur Thrombozytenaktivierung. Die primären Plättchenaktivatoren Kollagen und Thrombin – Letzteres ist in Gefäßwänden und umliegendem Gewebe in geringem Maß vorhanden, wird aber vor allem intravasal durch die plasmatische Gerinnung bereitgestellt – veranlassen die Ausschüttung von Phospholipiden (PL) aus Mikrovesikeln der Thrombozyten sowie die Flip-flop-Reaktion, die ebenfalls Phospholipide an der äußeren Membran der Plättchen bereitstellt. Des Weiteren kommt es zur Freisetzung der sekundären Plättchenaktivatoren, indem die Blutplättchen ihre α -Granula, elektronendichten Granula („dense

bodies“) und, bei starker Stimulation, auch Lysosomen abgeben. Zu den ausgeschütteten Faktoren zählen u. a. Plättchenaktivierender Faktor (PAF), Adenosintriphosphat (ADP) und Fibrinogen. Das Gewebshormon Thromboxan A₂ verstärkt die Reaktion der Plättchen auf Kollagen und wirkt vasokonstriktorisch. Zusammen mit PAF und ADP lockt es weitere Plättchen an den Ort der Verletzung und unterstützt deren Andocken an die bereits vorhandenen Thrombozyten, mit anderen Worten die Thrombozytenaggregation. Die Aktivierung der Blutplättchen ruft gleichzeitig eine Veränderung ihres Zytoskeletts und ihrer äußeren Form („shape change“) hervor, die Calciumionen-induziert ist und aus dem Übergang von globulärem Aktin in fibrilläres Aktin resultiert. Während inaktive Thrombozyten scheibenförmig sind und eine glatte Oberfläche besitzen, bilden aktivierte Thrombozyten zahlreiche längliche Pseudopodien aus, mit deren Hilfe sie sich untereinander verzahnen können, und haben eine Kugelform. Darüber hinaus kommt es nach der Stimulierung der Blutplättchen zur Strukturveränderung ihres Glycoprotein-IIb/IIIa-Rezeptors (Synonym: Integrin α IIb β 3), der somit aktiviert wird. Dieser Rezeptor ermöglicht nun die Entstehung von Fibrinogenbrücken zwischen den einzelnen Thrombozyten (Rivera et al. 2009), so dass es durch die Verklebung (Aggregation) von immer mehr Plättchen miteinander zu einem abdichtenden Aggregat kommt. Dem so entstehenden weißen Thrombus mangelt es jedoch, verglichen mit dem roten Thrombus, der erst durch die sekundäre Blutgerinnung gebildet wird, noch an Stabilität.

Tabelle 2: Ablauf der primären Gerinnung in vier Phasen

1.	Ruhephase	intakte Endothelzellen verhindern die Anlagerung und Aktivierung der Thrombozyten (z. B. via Prostacyclin, NO)
2.	Anlagerungsreaktion (Adhäsion)	freiliegende Kollagenfasern und vWF bewirken die Adhäsion der Thrombozyten an das Subendothel via GP Ib/IX
3.	Thrombozytenaktivierung	unmittelbar auf die Adhäsion folgend: <ul style="list-style-type: none"> • Formveränderung (Ausbildung von Pseudopodien) • GP-IIb/IIIa-Exposition (leitet die Aggregation ein) • Sekretion der α-Granula und elektronendichten Granula
4.	Thrombusbildung (Aggregation)	Fibrinogen und Fibronectin binden an GP IIb/IIIa und bilden Quervernetzungen zwischen den Thrombozyten

1.1.3. Die plasmatische Gerinnung (sekundäre Hämostase)

Gleichzeitig zum ersten Kontakt der Thrombozyten mit dem Subendothel kommt es an der Stelle der Gefäßläsion auch zum Kontakt zwischen Gewebefaktor (engl. tissue faktor, TF) sowie Phospholipiden und Kollagen mit noch inaktiven Vorstufen von Gerinnungsfaktoren. Dies setzt die plasmatische oder sekundäre Gerinnungsreaktion in Gang, die durch die Aktivierung im Blut zirkulierender Proenzyme (siehe Tabelle 3) vermittelt wird. Das Verständnis dieses Systems hat sich in den vergangenen Jahrzehnten stark gewandelt.

Die Vorstellung von der plasmatischen Gerinnung als eine Abfolge, in der ein aktiviertes Gerinnungsenzym der Reihe nach jeweils das nächste Proenzym in die aktive Form überführt, geht auf die Untersuchungen von MacFarlane (1964) sowie Davie und Ratnoff (1964) zurück. Sie postulierten für die plasmatische Gerinnung eine wasserfallähnliche, sich selbst amplifizierende Kaskade. Einige Jahre später wurde deutlich, dass eine Verbindung zwischen extrinsischem und intrinsischem System via Faktor X besteht (Østerud et al. 1972, Fujikawa et al. 1974). Es wurde angenommen, dass diese zwei Systeme weitgehend unabhängig voneinander agieren, bis sie bei Faktor X zusammenlaufen (sog. gemeinsame Endstrecke). Nachfolgende Untersuchungen haben dazu geführt, dass auch diese Theorie seither in verschiedenen Punkten abgewandelt und ergänzt werden musste (Østerud und Rapaport 1977, Marlar et al. 1982, Broze 1995, Davie 2003, Hoffman 2003, Woodruff et al. 2011). So hat sich gezeigt, dass das Zusammenspiel von intrinsischem und extrinsischem Gerinnungssystem deutlich enger ist, als anfangs angenommen. Nach dem heutigen integrierten Konzept ist der stärkste „physiologische“ Aktivator der plasmatischen Gerinnung der Komplex aus TF und aktiviertem Faktor VII (FVIIa), der dem extrinsischen Weg zugerechnet wird (Mackman et al. 2007, Gomez et al. 2010). TF ist ein membranständiger Rezeptor, der in hoher Konzentration in Gefäßwänden, nämlich auf der Oberfläche der Zellen der Adventitia und der glatten Muskulatur, im Gehirn, Lunge, Plazenta und in der Epidermis exprimiert wird, während er auf Zellen, die physiologischerweise mit der Zirkulation in direktem Kontakt stehen, z. B. dem Gefäßendothel, unter normalen Bedingungen nicht zu finden ist. Dieses spezifische Vorkommen in der Ummantelung der Blutgefäße und in sehr empfindlichen Organen

wie dem Gehirn wirkt protektiv, da hier eine besonders rasche prokoagulatorische Reaktion auf austretendes Blut erforderlich ist. TF besitzt eine extrazelluläre Domäne, welche FVII und FVIIa mit hoher Affinität bindet (Ott 2010). Freier FVIIa katalysiert die proteolytische Aktivierung seiner Substrate nur in sehr geringem Maße, bis er an TF bindet, wodurch seine Aktivität einige tausendfach gesteigert wird. Welche Rolle der so genannten FVII aktivierenden Protease (FSAP) dabei für die Aktivierung von FVII und für die Initiierung der plasmatischen Gerinnung zukommt, bleibt derzeit wissenschaftlich umstritten (Stavenhagen et al. 2012). Sicher ist, dass der aus TF und FVIIa entstehende Komplex (extrinsische Tenase, TF-FVIIa-Ca²⁺-PL) seinerseits FX aktiviert. FXa ist in der Lage, geringe Mengen an FV zu aktivieren, was die Bildung des Prothrombinasekomplexes (FXa-FVa-Ca²⁺-PL) ermöglicht. Dieser überführt Prothrombin in das enzymatisch aktive (α -)Thrombin, zunächst jedoch nur in geringem Ausmaß. Um größere Mengen zu generieren, setzt dann eine positive Verstärkungsreaktion ein, indem Thrombin sehr effektiv FV und FVIII aktiviert. FVIIIa geht einen Komplex mit FIXa und den Cofaktoren Calciumionen (Ca²⁺) und Phospholipiden ein (Tenasekomplex). Der Tenasekomplex wiederum aktiviert FX, so dass Prothrombinasekomplex und Tenasekomplex in einer Schleife agieren, die in einer explosionsartigen Entstehung von Thrombin resultiert. Die enge Interaktion zwischen zellulären Komponenten und Gerinnungsfaktoren muss in diesem Zusammenhang hervorgehoben werden (Hoffman 2003), denn die Phospholipide auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten sind in besonderem Maße für die Anlagerung des Tenase- und Prothrombinasekomplexes via Ca²⁺ geeignet und steigern deren Aktivität um ein Vielfaches. Dadurch tragen Blutplättchen entscheidend zur besonders schnellen Bildung von Thrombin bei.

Ein weiterer Mechanismus, durch den Thrombin selbst die Aktivierung seines Proenzym verstärkt, ist die Aktivierung von FXI, die wiederum die Aktivierung von FIX nach sich zieht. Intrinsisches und extrinsisches System stehen über die genannten Wege der positiven Rückkopplung durch Thrombin in Verbindung. Es ist daher davon auszugehen, dass in vivo *ein* integrierter plasmatischer Weg (siehe Abb. 1) zur Thrombingenerierung führt, in dem Faktoren beider Systeme eine Rolle spielen (Hoffman 2003, Gomez et al. 2010).

Tabelle 3 (modifiziert nach Petrides 2007, Madlener und Pötzsch 2010): Plasmatische Gerinnungsfaktoren und Cofaktoren

Nr.	Name	Klassische Einteilung	Art	Synthese Vit.-K-abhängig
FI	Fibrinogen	gem. Endstrecke	Substratfaktor	-
FII	Prothrombin	gem. Endstrecke	Proenzym	+
FIII	Gewebethromboplastin (Tissue factor)	extrinsisch	membranständiger Rezeptor	-
FIV	Ca ²⁺	alle	nichtenzymatischer Cofaktor	
FV	Proakzelerin	gem. Endstrecke	nichtenzymatischer Cofaktor	-
FVII	Prokonvertin	extrinsisch	Proenzym	+
FVIII	antihämophiles Globulin A	intrinsisch	nichtenzymatischer Cofaktor	-
FIX	antihämophiles Globulin B (Christmas-Faktor)	intrinsisch	Proenzym	+
FX	Stuart-Power-Faktor	gem. Endstrecke	Proenzym	+
FXI	Rosenthal-Faktor	intrinsisch	Proenzym	-
FXII	Hageman-Faktor	intrinsisch	Proenzym	-
FXIII	fibrinstabilisierender Faktor	gem. Endstrecke	Proenzym	-
-	Präkallikrein (Fletcher-Faktor)	intrinsisch	Proenzym	-
-	hochmolekulares Kininogen	intrinsisch	nichtenzymatischer Cofaktor	-
-	Plättchenfaktor 3 (Phospholipide)	alle	nichtenzymatischer Cofaktor	-
-	von-Willebrand-Faktor	thrombozytäres System und intrinsisch	nichtenzymatischer Cofaktor	-

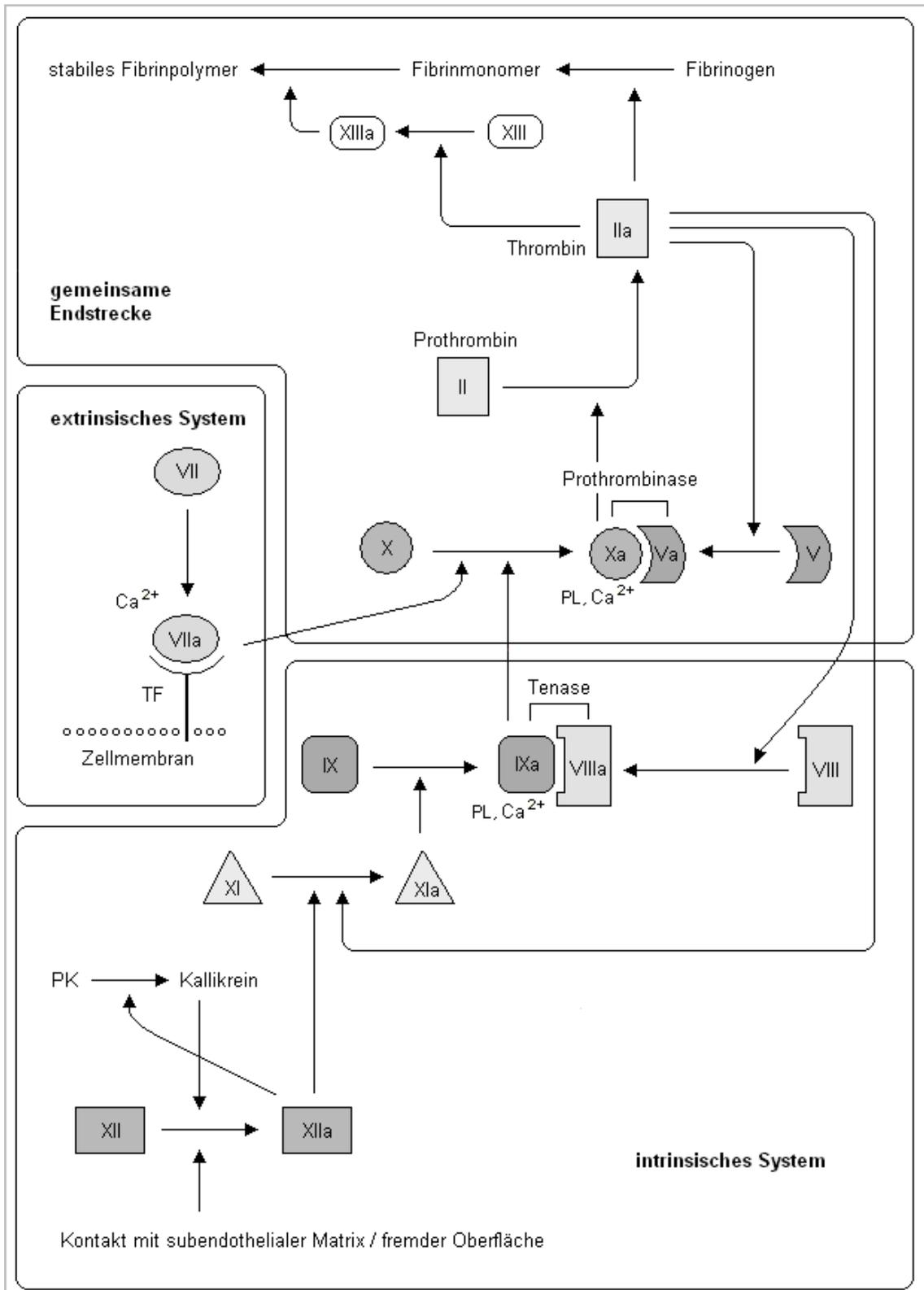


Abb. 1 (modifiziert nach Petrides 2007): Die plasmatische Gerinnung mit intrinsischem und extrinsischem System

a: aktiviert, Ca^{2+} : Calciumionen, PK: Präkallikrein, PL: Phospholipide, TF: Tissue factor (Gewebefaktor) gebunden an eine Membran, II-XIII: plasmatische Gerinnungsfaktoren bzw. deren inaktive Vorstufen.

Das nun in erheblichem Ausmaß bereitgestellte Thrombin leitet schließlich den letzten Schritt der Gerinnung ein, indem es die Fibrinopeptide A und B von Fibrinogen abspaltet, wobei Fibrinmonomere entstehen. Die weitere Polymerisation der Fibrinmonomere zu Fibrinsträngen erfolgt spontan durch physikochemische Interaktion der Monomere (Koagulation). Die Quervernetzung des Fibrins mittels kovalenter Bindungen wird durch FXIIIa, für dessen Aktivierung Thrombin verantwortlich ist, katalysiert. Vernetztes Fibrin ist das Endprodukt der plasmatischen Gerinnung und spannt sich wie ein stabilisierendes, festes Gerüst um ein Gebilde, in das sowohl aggregierte Thrombozyten als auch Leukozyten und Erythrozyten eingebettet sind. Dies ist das gemeinsame Erzeugnis von primärer und sekundärer Hämostase: der rote Thrombus.

Wurde im vorhergehenden Abschnitt die Aktivierung der plasmatischen Gerinnung über den der extrinsischen Bahn zugeordneten Gewebefaktor behandelt, sollen nun der intrinsische Weg und die Kontaktfaktoren genauer betrachtet werden. Die Kontaktaktivierung wird über drei Vorstufen von Serinproteasen, FXII, FXI und Präkallikrein (PK) sowie einem nichtenzymatischen Cofaktor, dem hochmolekularen Kininogen (HK), initiiert. Während sich FXII direkt an negativ geladene Oberflächen (z. B. Glas, Kaolin, Dextransulfat oder auch Endotoxine) anlagert, benötigen die beiden anderen Kontaktfaktoren HK für diesen Schritt. FXII erfährt durch die Bindung an negativ geladene pathologische Oberflächen eine Konformationsänderung und faltet sich selbst in eine schwere und eine leichte Kette, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden bleiben (Renné 2010). Alle vier Kontaktphasenproteine bilden gemeinsam einen Aktivierungskomplex auf pathologischen Oberflächen, binden aber auch spezifisch an Endothelzellen. Durch die Interaktionen im Aktivierungskomplex wird zunächst PK durch FXIIa in die aktive Form überführt (siehe Abb. 2) woraufhin eine positive Verstärkungsreaktion einsetzt, da aktiviertes Plasmakallikrein wiederum FXII aktiviert mit der Folge, dass es zu einem rasanten Anstieg der FXIIa-Aktivität kommt. FXIIa hat sowohl Bedeutung für die Gerinnung, indem er FXI aktiviert, als auch für das Gefäßsystem, indem er PK in die bradykininfreisetzende Protease Kallikrein (KK) überführt, und für die Fibrinolyse, da KK auch Pro-Urokinase in Urokinase umwandelt. Gleichzeitig beeinflusst FXIIa über KK, HK und Bradykinin

auch das Komplementsystem und das Renin-Angiotensinsystem (Colman und Schmaier 1997). KK überführt nicht nur FXII in FXIIa, sondern kann den bekannten Weg der intrinsischen Gerinnungskaskade abkürzen und Prothrombin unmittelbar aktivieren (Stief 2008 b) und erfüllt darüber hinaus eine Reihe verschiedener Funktionen in der Fibrinolyse, der Entzündungsmediation und beim Zellwachstum (Clements et al. 2004, Colman 2004, Woodruff et al. 2011). FXIa fördert die plasmatische Gerinnung, indem er Faktor IX aktiviert und, wie 2010 durch Whelihan et al. nachgewiesen werden konnte, die Cofaktoren FV und FVIII wenigstens in vitro ebenfalls zu aktivieren vermag. Über eine Aktivierung von FV und FX durch FXIa wird darüber hinaus von Matafonov et al. (2013) berichtet. FIX und der Vitamin-K-unabhängige Cofaktor FVIII bilden in aktivierter Form schließlich den intrinsischen Tenasekomplex, der FX aktiviert und somit die Verbindung zur gemeinsamen Endstrecke der plasmatischen Gerinnung darstellt.

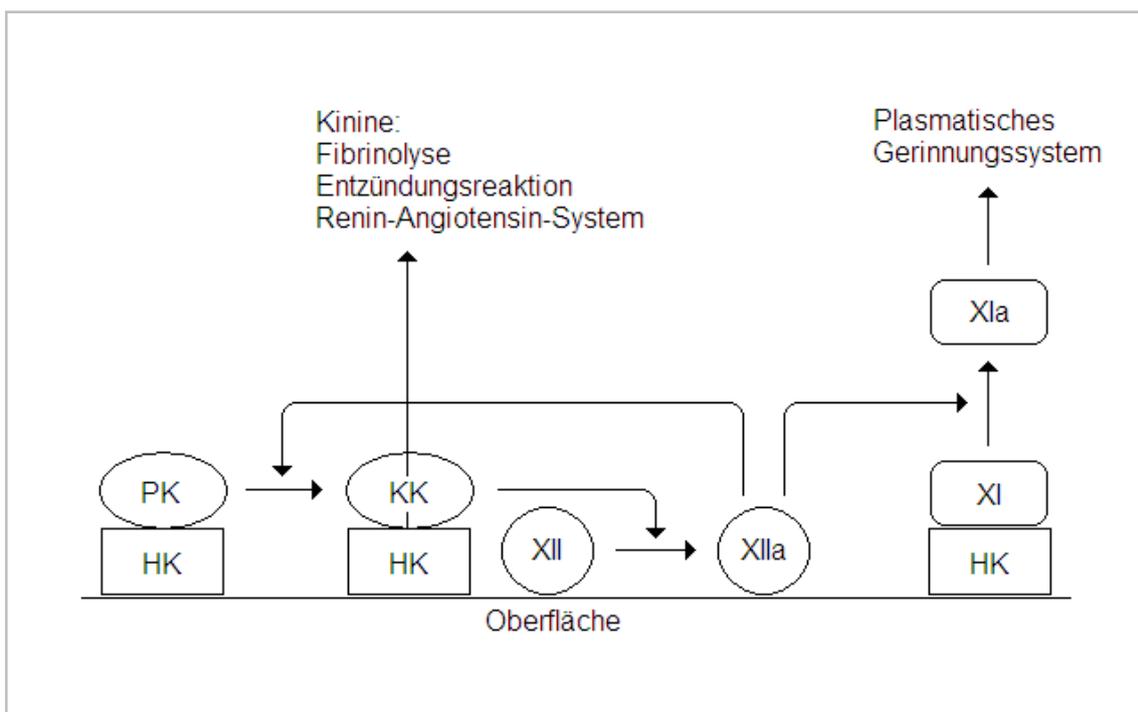


Abb. 2: Die Interaktionen der Kontaktfaktoren auf einer Oberfläche

a: aktiviert, HK: hochmolekulares Kininogen, KK: Kallikrein, PK: Präkallikrein, XI und XII: plasmatische Gerinnungsfaktoren bzw. deren inaktive Vorstufen.

Unter pathophysiologischen Bedingungen kann der Kontaktaktivierung über körperfremde Oberflächen (z. B. Hämodialysemembranen, Bakterien) oder körpereigene aber für gewöhnlich nicht mit der Zirkulation in direktem Kontakt stehende negativ geladene Oberflächen (z. B. Zellfragmente, DNS-Fragmente, Oligonukleotide, Polyphosphate,

Kollagen, Laminin und aggregierte bzw. fehlerhaft gefaltete Proteine) eine besondere Bedeutung zukommen. Derartige Oberflächen sind in der Lage, FXII zu aktivieren und sind als Kontaktaktivatoren in vivo identifiziert worden (Maas et al. 2011, Woodruff et al. 2011). In diversen Disziplinen der Medizin, allen voran in der Intensivmedizin, kommen fremde Oberflächen, die mit Blut in Kontakt geraten, zunehmend zum Einsatz. Es ist davon auszugehen, dass die Aktivierung des Kontaktsystems unter pathophysiologischen Umständen einen erheblichen Einfluss auf die Aktivierung der Gerinnung nimmt. So wird vermutet, dass die Kontaktfaktoren FXII, FXI und Präkallikrein insbesondere an der Bildung von gefäßokkludierenden pathologischen Thromben wesentlich beteiligt sind (Renné et al. 2005, Renné 2010, Revenko et al. 2011). Eine Studie an über 150 Patienten mit schwerem FXI-Mangel lässt auf einen Schutz vor ischämischem Schlaganfall schließen (Salomon et al. 2008). Eine weitere Studie zu FXI-Mangel zeigt eine signifikant niedrigere Rate an Thrombosen der tiefen Beinvenen im Vergleich zur Normalbevölkerung (Salomon et al. 2011). Gleichzeitig führt ein FXI-Mangel interessanterweise nur bei etwa der Hälfte der Betroffenen zu einer milden Blutungsneigung (Duga und Salomon 2013). Ein FXII-Mangel hingegen geht bei den meisten Patienten überhaupt nicht mit einer Blutungsneigung einher (Ratnoff und Colopy 1955, Goodnough et al. 1983). Letzteres scheint auch für die sehr selten vorkommende Defizienz an PK oder HK zu gelten (Davidson et al. 2001, Veen et al. 2009, Girolami et al. 2010). Somit besteht die Hoffnung, dass das Kontaktsystem zum Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Gerinnungsinhibitoren werden könnte, die, verglichen mit den derzeit auf dem Markt erhältlichen Medikamenten, trotz ebenso effektiver antikoagulatorischer Wirkung ein deutlich niedrigeres Risiko für Blutungskomplikationen mit sich bringen (Müller et al. 2011, Montfoort und Meijers 2013, Gruber 2014). Die Suche nach derartigen Medikamenten hat bereits begonnen (Woodruff et al. 2013) und wird zeigen, ob das bis dato geltende Dogma, ein Schutz vor thrombotischen Ereignissen sei nur durch eine vermehrte Blutungsneigung zu erkaufen (Colman 2006), revidiert werden muss.

1.1.4. Inhibitoren der plasmatischen Gerinnung

Ein so effizientes System wie die plasmatische Gerinnung würde dem menschlichen Organismus nicht nur wertvolle Dienste leisten, sondern ihn auch vital gefährden, gäbe es keine Gegenmechanismen, die seinen Wirkungsbereich einschränken oder es bei Bedarf gar deaktivieren können. So wäre beispielsweise die Menge an Thrombin, die aus nur 10 ml Plasma generiert werden kann, theoretisch in der Lage, das gesamte Fibrinogen im menschlichen Körper in 30 Sekunden gerinnen und so unser Blut erstarren zu lassen (Gomez et al. 2010). Die Kräfte, die dies verhindern – die Gegenspieler der plasmatischen Gerinnung – können in zwei Gruppen eingeteilt werden: die Erste inhibiert aktive Serinproteasen (Serinproteaseinhibitoren, Abk. Serpine, z. B. Antithrombin, C1-Esteraseinaktivator), die Zweite wirkt neutralisierend auf Cofaktoren des plasmatischen Systems (Protein C-System).

Antithrombin ist ein Glykoprotein und hemmt insbesondere Thrombin und FXa. Es ist klinisch sehr bedeutsam, da es der Hauptinaktivator von Thrombin ist. Durch die Bildung eines inaktivierenden 1:1 Protease/Proteaseinhibitor-Komplexes mit Thrombin verhindert es, dass freies Thrombin im Körper zirkuliert. Die Konformation von Antithrombin wird durch Heparin und das epithelzellgebundene heparinähnliche Heparansulfat verändert, was die Wirkung von Antithrombin massiv verstärkt. Die Thrombin-Antithrombin-Komplexe werden rasch von der Leber eliminiert. Ist Thrombin jedoch an Fibrin gebunden, so ist es vor der Inaktivierung durch Antithrombin geschützt (Lackner und Peetz 2003). Heparincofaktor II gehört ebenfalls in die Gruppe der Serpine und ist ein spezifischer Inhibitor für Thrombin, dessen Wirkung durch die Anwesenheit von Heparin gesteigert wird. C1-Esteraseinaktivator hemmt Faktoren des intrinsischen Systems, nämlich FXIa, FXIIa und Kallikrein. Darüber hinaus übt es eine, wenn auch schwächere, inhibitorische Wirkung auf Plasmin aus.

Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) wird hauptsächlich von Endothelzellen produziert und hemmt den extrinsischen Weg, indem er mit einer Domäne an den Komplex aus TF und FVIIa bindet und FVIIa inaktiviert. Zusätzlich bindet und inaktiviert er mit einer zweiten Domäne FXa.

Das Protein C-System umfasst die Serinprotease Protein C sowie Protein S, Thrombomodulin, Activated Protein C Inhibitor und C4b-Bindungsprotein. Aktiviertes Protein C (APC) neutralisiert in Verbindung mit seinem Cofaktor Protein S die Gerinnungs-Cofaktoren FVa und FVIIIa, welche durch ihre enorm starke katalysatorische Wirkung im Prothrombinase- bzw. Tenasekomplex einen wesentlichen Einfluss auf den Ablauf der plasmatischen Gerinnung ausüben. Um Protein C zu aktivieren, bedarf es des Komplexes aus Thrombin und Thrombomodulin. Letzteres ist ein Membranprotein der Endothelzellen. Indem Thrombomodulin Thrombin bindet, verändert es dessen enzymatische Eigenschaften, so dass Thrombin seine prokoagulatorische Wirkung (u. a. seine Aktivität gegenüber Fibrinogen) einbüßt, während seine Affinität zu Protein C massiv gesteigert wird. Somit steht Thrombin in intakten Gefäßen durch die Einwirkung von Thrombomodulin vorrangig im Dienst der Gerinnungsinhibitoren.

Das Protein-C-System wird reguliert durch Activated Protein C Inhibitor, auch Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 3 (PAI-3) genannt, welches APC und in geringem Ausmaß auch Thrombin und FXa inaktiviert. C4b-Bindungsprotein übt eine inhibitorische Wirkung auf das Protein-C-System aus, indem es Protein S bindet, welches in gebundener Form nicht als Cofaktor für Protein C zur Verfügung steht. Auch Thrombin kann in Abwesenheit von Thrombomodulin das Protein-C-System inhibieren, indem es Protein S spaltet.

Neben den Serpinen und dem Protein C-System kann auch Fibrin eine inhibitorische Wirkung auf Thrombin ausüben, die in vivo jedoch kaum von Bedeutung ist, da sie erst bei unphysiologisch hohen Thrombinaktivitäten in Erscheinung tritt. Fibrin in statu nascendi schließt Thrombin ein, wenn sehr hohe Thrombinaktivität entsteht. Früher wurde Fibrin daher auch als Antithrombin I bezeichnet. Die inhibitorische Aktivität scheint in der D-Domäne des Fibrins lokalisiert zu sein (Mosesson 2007). Anders als Antithrombin unterbindet Fibrin die katalytische Aktivität von Thrombin jedoch nicht zu 100%.

Die Abhängigkeit sowohl der Gerinnungsfaktoren als auch der Gerinnungsinhibitoren von der Interaktion mit Zellen, insbesondere Endothelzellen und Thrombozyten (Ofosu 2002), und deren Membranbestandteilen, sowie die Bindung des Thrombins innerhalb

des entstehenden Thrombus mittels Fibrin tragen entscheidend dazu bei, dass die Thrombusbildung lokal begrenzt erfolgt und sich nicht auf intakte Abschnitte des Gefäßbaumes ausweitet. Schlussendlich wird ein Großteil der aktiven Gerinnungsfaktoren und der gebildeten Enzym-Inhibitor-Komplexe, die dennoch den Ort der Gefäßverletzung verlassen und in entfernte Bereiche der Blutbahn gelangen, sehr rasch in der Leber eliminiert.

1.1.5. Die Fibrinolyse (tertiäre Hämostase)

Die Aufgabe des Fibrinolyse-Systems besteht darin, Fibringerinnsel wieder aufzulösen, sobald die Gefahr der Blutung aus einer Wunde gebannt ist und die Wundheilung einsetzt. Darüber hinaus muss gleichzeitig, während die plasmatische Gerinnung am Ort der Gefäßverletzung im Gange ist, im Überschuss gebildetes Fibrin gespalten werden. Andernfalls könnte sich das Fibringerüst bis in das intakte Gefäßsystem ausweiten und dort den Blutfluss behindern. Das Enzym, das die proteolytische Aufspaltung des Fibrins in unterschiedliche Bruchstücke bewerkstelligt, ist das Plasmin. Das Zymogen des Plasmins ist Plasminogen und wird durch die Serinproteasen tissue-type-Plasminogenaktivator (t-PA), der im Endothel synthetisiert wird, und urokinase-type-Plasminogenaktivator (u-PA), der in Niere und Endothel gebildet wird, aktiviert. Diese Plasminogenaktivatoren kommen in den einkettigen Proformen sct-PA bzw. scu-PA vor und bedürfen ihrerseits der Aktivierung, um ihre volle Wirkung entfalten zu können. So wird sct-PA nach Aktivierung des Kontaktsystems durch Plasmakallikrein in die zweikettige Form tct-PA überführt. Sowohl sct-PA als auch tct-PA binden an Fibrin, was ihre Aktivität um ein Vielfaches steigert. Auch Plasminogen, insbesondere in der Form des Lys-Plasminogens, hat eine hohe Affinität zu Fibrin. Die Bindung von Aktivator (t-PA) und Substrat (Lys-Plasminogen) an das Fibringerinnsel hat zur Folge, dass die Plasminogenaktivierung bevorzugt lokal auf der Oberfläche des Thrombus erfolgt und Fibrin somit gewissermaßen seine eigene Zersetzung katalysiert (Gomez et al. 2010).

Inhibitoren der Plasminogenaktivatoren (PAI) sind die Serpine PAI-1, PAI-2 und PAI-3, wobei dem PAI-1, welches sowohl t-PA als auch u-PA inaktivieren kann, die größte Bedeutung zukommt. Lösliches Plasmin wird ebenfalls durch ein Serpin, das α_2 -Anti-plasmin, inaktiviert. Ist Plasmin jedoch an Fibrin gebunden, kann es nicht inaktiviert

werden. Ähnlich wie das α_2 -Antiplasmin ist auch das α_2 -Makroglobulin fähig, Plasmin zu inhibieren.

Auch Thrombin kann die Fibrinolyse inhibieren, indem es im Komplex mit Thrombomodulin den thrombinaktivierbaren Fibrinolyseinhibitor (TAFI) aktiviert, der in der Lage ist, die Bindung von Plasminogen und t-PA an Fibrin zu hemmen (Foley et al. 2013).

1.1.6. Thrombin

Zu Recht wird Thrombin als das Schlüsselenzym der plasmatischen Gerinnung angesehen (Baglin 2005, Huntington 2008, Stief 2008 a, Preissner 2010). Die zentrale Bedeutung dieser Protease begründet sich darin, dass bei Thrombin zahlreiche sowie besonders bedeutsame Regulationsmechanismen der Gerinnung ansetzen, vor allem prokoagulatorische, aber auch antikoagulatorische (Tabelle 4). Da in der vorliegenden Arbeit ein neuer Test zur Aktivitätsbestimmung eben dieses Enzyms nach Aktivierung des intrinsischen Gerinnungswegs vorgestellt wird, ist eine eingehendere Betrachtung des Thrombins geboten.

Wie bei den meisten Faktoren des Gerinnungssystems handelt es sich auch bei Thrombin um eine Serinprotease. Die für den Menschen wichtigste Form des Thrombins, das aktive α -Thrombin, ist ein zweikettiges Protein, bestehend aus einer kleineren A-Kette (Molekulargewicht 6000 Dalton, 36 Aminosäuren) und einer größeren B-Kette (Molekulargewicht 33.000 Dalton, 259 Aminosäuren), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Preissner 2010). Die B-Kette enthält eine tiefe Tasche mit dem negativ geladenen aktiven Zentrum und einer apolaren Region. Das katalytische Zentrum, das von den drei Aminosäuren Ser195-His57-Asp102 gebildet wird, besitzt eine Trypsin-ähnliche Spezifität und schneidet seine Substrate an Arginin-Resten (Gallwitz et al. 2012, Stief 2013). Da Thrombin, wie bereits beschrieben wurde, sehr unterschiedliche Aufgaben erfüllen kann, je nachdem welches seiner Substrate es aktuell bevorzugt, bedarf es einer Regulierung der Substratspezifität, die über die Bindung an Exosites außerhalb des katalytisch aktiven Zentrums bestimmt wird (Malovichko et al. 2013, Stief 2013). Exosite-1 ist hydrophob und bindet sowohl Fibrin(ogen) durch Interaktion mit dessen E-Domäne als auch Thrombomodulin und

Protease-aktivierbarer Rezeptor (PAR)-1, der von Thrombozyten exprimiert wird (Huntington 2008). Exosite-2 hingegen ist positiv geladen und bindet negativ geladene Glycosaminoglykane wie Heparin. Auch die Plättchenaktivierung durch Thrombin wird über Exosite-2 in Interaktion mit Glycoprotein Iba α vermittelt (Lechtenberg et al. 2014). Über die D-Domäne von Fibrin(ogen)molekülen, die eine γ' -Kette enthalten, geht Thrombin mittels Exosite-2 eine Bindung mit hoher Affinität ein, die zu einer Drosselung seiner katalytischen Aktivität führt (Mosesson 2007).

Die B-Kette des Thrombins enthält eine Bindungsstelle für Kationen, welche durch die Bindung von Na⁺ eine Aktivitätssteigerung des Thrombins vermittelt (Huntington 2008, Niu et al. 2009) und so ebenfalls an der Regulation der Enzymaktivität beteiligt ist.

Zu den endogenen Inhibitoren des Thrombins werden Antithrombin, Heparincofaktor II, Fibrin, Fibrinogen und seine Spaltprodukte sowie α_2 -Makroglobulin gezählt. Etwa 10% des generierten Thrombins binden an α_2 -Makroglobulin, welches wie ein Transporter für Thrombin agiert, indem es Thrombin zwar bindet, jedoch nicht komplett inaktiviert, wenngleich es die Umsetzung von Fibrinogen verhindert. Vielmehr legt es sich wie ein schützender Käfig um das Thrombinmolekül, nachdem dieses die Bait-Region des α_2 -Makroglobulins gespalten hat, und macht es für große Moleküle wie Fibrin, Fibrinogen und Antithrombin unzugänglich (Arakawa et al. 1989). Nur kleine Moleküle wie Arginin mit einem Molekulargewicht von weniger als 1000 Dalton können an das aktive Zentrum des Thrombins im α_2 -Makroglobulin-Komplex gelangen. Unter besonderen Bedingungen, wie hohem oxidativem Stress oder proteolytischer Aktivität, kann der α_2 -Makroglobulin-Käfig aufgebrochen werden, sodass aktives Thrombin freigesetzt wird (Stief 2013). Gegensätzlich verhält es sich mit den restlichen 90% des freien Thrombins. Diese reagieren zum größten Teil mit Antithrombin und in geringem Ausmaß auch mit Fibrinogen, Fibrin und Heparincofaktor II und werden von Antithrombin inhibiert und aus dem Gefäßsystem entfernt. Die Reaktion von Thrombin mit Antithrombin unter Bildung des Thrombin-Antithrombin-Komplexes ist absolut irreversibel. Die Bindung von Serpinen (z. B. Antithrombin) an Thrombin kann durch Heparin entscheidend verstärkt werden. Des Weiteren kann Thrombin sehr selektiv von Hirudin inhibiert werden. Abgesehen von extremen Pathologien, wie fortgeschrittenen

Stadien von Sepsis, kommt ungebundenes Thrombin dank der oben genannten Mechanismen praktisch nur lokal am Ort von Gefäßverletzungen, nicht jedoch systemisch im Plasma vor.

Es wurde bereits festgestellt, dass die Hauptaufgabe des aktiven Thrombins in der proteolytischen Spaltung von Fibrinogen zu einem Fibrinmonomer und den Fibrinopeptiden A und B besteht. Jedoch übt Thrombin noch eine Reihe weiterer Funktionen aus, die hier noch einmal zusammengefasst werden sollen. Es ist für die Aktivierung von FXIII zuständig und verstärkt die Gerinnung sehr effektiv über die Aktivierung von FXI. Auch durch die Aktivierung von FV und FVIII katalysiert Thrombin seine eigene Freisetzung (positiver Feedbackmechanismus). Darüber hinaus ist Thrombin der potenteste Stimulator der Thrombozytenaktivierung und -aggregation, welche vor allem über die Thrombinrezeptoren PAR-1 und PAR-4 vermittelt wird (Covic et al. 2000, Ofosu et al. 2008).

Neben diesen gerinnungsfördernden Funktionen hat Thrombin aber auch gerinnungshemmende Eigenschaften. Durch die Bindung an das endotheliale Oberflächenprotein Thrombomodulin wird es so verändert, dass es vorrangig Protein C aktiviert, welches wiederum FVa und FVIIIa inaktiviert (negativer Feedbackmechanismus). Ebenfalls thrombomodulinvermittelt inhibiert Thrombin über TAFI die Fibrinolyse (Foley et al. 2013).

Thrombin hat weiterhin zahlreiche Effekte auf andere Zellen, allen voran auf Thrombozyten, wie bereits beschrieben, und auf Endothelzellen, welche thrombinvermittelt die Produktion und Sekretion verschiedener Substanzen, darunter auch der t-Plasminogenaktivator, aufnehmen (Rydholm et al. 1998, Hinsbergh 2012). Zu nennen sind auch eine mitogene Wirkung auf Fibroblasten und Makrophagen sowie eine chemotaktische Wirkung auf Granulozyten (Wakita et al. 1997, Coughlin 1999, Feistritzer et al. 2004, Stief 2013). Am Rande sei bemerkt, dass selbst eine Beteiligung an Wachstum, Regeneration und Apoptose von Nervenzellen und Astrozyten vermutet wird (Festoff et al. 1996).

Tabelle 4 (modifiziert nach Stief 2013): Zusammenfassung der Thrombinwirkungen und der bei Thrombin ansetzenden Regelmechanismen

<p>Prokoagulatorische Wirkungen von Thrombin: Wirkung auf Fibringerinnungsbildung:</p> <ul style="list-style-type: none">• Hauptfunktion: Überführung von Fibrinogen zu Fibrin (-monomer)• Aktivierung von FXIII → Quervernetzung von Fibrinpolymeren, d. h. Stabilisierung <p>Positive Feedbackmechanismen:</p> <ul style="list-style-type: none">• Aktivierung von FXI → Verstärkerschleife über intrinsischen Gerinnungsweg• Aktivierung von FVIII → Verstärkerschleife über Tenasekomplex• Aktivierung von FV → Verstärkerschleife über Prothrombinasekomplex <p>Wirkung auf Thrombozyten:</p> <ul style="list-style-type: none">• Thrombozytenaktivierung → Ausschüttung koagulationsfördernder Substanzen, Bereitstellung von Phospholipiden zur Anlagerung von Tenase- und Prothrombinasekomplex
<p>Antikoagulatorische Wirkung von Thrombin (via Thrombomodulinkomplex):</p> <ul style="list-style-type: none">• Aktivierung von Protein C → Inhibition von FVa und FVIIIa (neg. Feedbackmechanismus)
<p>Antifibrinolytische Wirkung von Thrombin (via Thrombomodulinkomplex):</p> <ul style="list-style-type: none">• Aktivierung von TAFI → hemmt die Interaktion von Plasminogen und Fibrin
<p>Thrombininhibitoren:</p> <ul style="list-style-type: none">• Serpine (vor allem Antithrombin) → irreversible Thrombininaktivierung• Fibrinogen und dessen Spaltprodukte (früher Antithrombin I) → Bindung von Thrombin• „Transporterprotein“ α_2-Makroglobulin → reversible Aktivitätseinschränkung
<p>Regulatorische Wirkung von Thrombin auf Zellsysteme:</p> <ul style="list-style-type: none">• Endothelzellen → Produktion/Ausschüttung von NO, TF, t-PA, Endothelin• Glatte Muskelzellen → Kontraktion• Fibroblasten → Proliferation• Phagozyten → Aktivierung, Chemotaxe, Zytokinproduktion• Nervenzellen → Wachstum, Regeneration, Apoptose

1.2. Gerinnungsdiagnostik

1.2.1. Globalteste in der Gerinnungsdiagnostik

Grundprinzip der plasmatischen Gerinnungsdiagnostik ist die Kombination zweier verschiedener Gruppen von Testen: Mit Hilfe der ersten Gruppe, den Suchtesten oder Globaltesten, werden bestimmte Teilbereiche der plasmatischen Gerinnung (z. B. extrinsisches System, intrinsisches System, Fibrinolyse) orientierend auf ihre Funktionalität hin geprüft. Die speziellen Ursachen für etwaige Abnormalitäten werden anschließend genauer bestimmt, indem die zweite Gruppe von Testen, die spezifischen Tests oder Einzelfaktorbestimmungen, zum Einsatz kommen. Diese messen nun konkret die Aktivität oder Konzentration der gewünschten Gerinnungsfaktoren. Somit wird erst eine orientierende Eingrenzung des von einer Störung betroffenen Gerinnungsteilbereichs vorgenommen und anschließend im Einzelnen nachgewiesen, welcher Faktor bzw. welche Faktoren für die Störung verantwortlich ist bzw. sind. Globalteste sollen es ermöglichen, bei normalen Werten eine schwere Gerinnungsstörung in dem erfassten Bereich praktisch auszuschließen, sie haben aber den Nachteil, dass geringfügige Verminderungen einzelner Gerinnungsfaktoraktivitäten nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden können und dass in seltenen Fällen verminderte Aktivitäten eines Faktors durch erhöhte Aktivitäten eines zweiten Faktors einander in etwa ausgleichen, so dass es den Anschein hat, der getestete Teilbereich funktioniere normal, während dies tatsächlich und insbesondere in vivo nicht der Fall ist. Die Globalteste sind dabei unterschiedlich empfindlich für bestimmte Faktoren innerhalb des Systems, das sie testen, und werden darüber hinaus durch physiologische Hemmstoffe der Gerinnung (z. B. Fibrin(ogen)spaltprodukte, Lupusantikoagulans) sowie durch Medikamente beeinflusst. Die wichtigsten heute routinemäßig gebräuchlichen Globalteste der Gerinnung sind die Prothrombinzeit (PT, auch Thromboplastinzeit oder Quick-Test) für das exogene System und die gemeinsame Endstrecke, die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) für das endogene System und die gemeinsame Endstrecke und die Thrombinzeit (TZ) für die Fibrinogen-Fibrin-Umwandlung der gemeinsamen Endstrecke.

Andere Verfahren, die bisher noch nicht zur Routinediagnostik gezählt werden, versuchen die plasmatische Gerinnung nicht isoliert, sondern gemeinsam mit der

primären Gerinnung und der Fibrinolyse zu testen, z. B. die Thrombelastographie (Hartert 1948) bzw. deren Weiterentwicklung, die Rotationsthrombelastometrie (Calatzis et al. 1996), die die Hämostase in Nativblut oder Zitratblut dynamisch messen, indem die Gerinnselfestigkeit aufgezeichnet wird.

Darüber hinaus gibt es Testsysteme, die mithilfe von chromogenen oder fluorogenen Substraten die Thrombingenerierung messen, wie das von Hemker et al. 2002 beschriebene Thrombogramm. Diese werden in den meisten Laboratorien jedoch ebenfalls bisher nicht routinemäßig als Globalteste eingesetzt. Der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Test zur intrinsischen Gerinnung ist ein neuer auf der Thrombingenerierung basierender Globaltest, der mit einem chromogenen Substrat arbeitet.

1.2.2. Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit ist der wichtigste etablierte Globaltest der intrinsischen Gerinnung. Ihr Vorläufer, die partielle Thromboplastinzeit (PTT) wurde 1953 von Langdell et al. erstmals beschrieben. Das Besondere an diesem Gerinnungstest waren die sog. *partiellen* Thromboplastine, das sind gerinnungsaktive Phospholipide, im Gegensatz zu dem für die Prothrombinzeit (Quick 1935) verwendeten Gemisch aus Gewebefaktor und Phospholipiden, welches früher auch als (vollständiges) Thromboplastin bezeichnet wurde. Mittels PTT wurden bei Hämophilie verlängerte Gerinnungszeiten gemessen, während die PT normale Gerinnungszeiten ergab. Somit war Dank Langdells Entdeckung nun eine Differenzierung zwischen Hämophiliepatienten und Gesunden möglich. Dennoch hatte es dieser neue Test schwer, sich durchzusetzen, da das Verfahren auf einer Kontaktaktivierung durch gespülte Glasbehälter beruhte, die anfällig für Fehler war. Abhilfe verschaffte die von Margolis (1958) entwickelte Technik, bei der die Kontaktaktivierung durch Kaolinpuder erfolgte. Heute wird dieser weiterentwickelte Test korrekterweise aktivierte partielle Thromboplastinzeit genannt, wenngleich sich neben diesem Terminus auch die weniger präzise Abkürzung PTT gehalten hat. Der Test war nun von der Oberfläche der Glasröhrchen unabhängig. Die aPTT mit Kaolin wurde von Proctor und Rapaport 1961 erfolgreich etabliert. Die Gerinnungsdiagnostik und besonders die Hämophiliediagnostik wurden dadurch wesentlich vorangebracht.

Zur Messung der aPTT benötigt man die schon angesprochenen gerinnungsaktiven Phospholipide, die z. B. in Gewebezellen und Thrombozyten vorkommen und eine negativ geladene Oberfläche besitzen. Des Weiteren werden oberflächenaktive Substanzen wie z. B. Kaolin, Celit oder Ellagsäure eingesetzt. Diese haben ebenfalls negativ geladene Oberflächen, die die Kontaktfaktoren FXII und FXI, Präkallikrein und hochmolekulares Kininogen binden und aktivieren und die Gerinnungszeit im Vergleich zur PTT verkürzen, was den Test präzisiert (Proctor und Rapaport 1961). Diese beiden Reagenzien sowie Calciumionen werden dem Zitratplasma zugesetzt, um die intrinsische Gerinnung mittels der Kallikrein/FXII-Schleife in Gang zu bringen. Wurde die Blutgerinnung somit gestartet, kommt es nach Ablauf der intrinsischen Kaskade schließlich zur Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin, welches wiederum Fibrinogen in Fibrinmonomere überführt. Die Fibrinbildung kann unter anderem photometrisch nachgewiesen oder mittels Kugelkoagulometrie oder Häkchenmethode ermittelt werden. Heute werden diese koagulometrischen Messungen zumeist von automatisierten Geräten bewerkstelligt. Die Zeit von der Zugabe der Calciumionen bis zur detektierbaren Fibrinbildung wird in Sekunden angegeben. Der Normwert der aPTT ist jedoch stark methodenabhängig und kann daher von Labor zu Labor variieren. Auch ist es nicht gelungen, die aPTT auf ähnliche Weise zu standardisieren, wie es mit der International Normalized Ratio (INR) für den Quick-Test möglich ist (Barthels et al. 2012).

Die aPTT testet insbesondere das intrinsische System der plasmatischen Gerinnung, welches die Faktoren XII, XI, IX und VIII beinhaltet, sowie die gemeinsame Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen Systems, welche Faktor X, Faktor V, Prothrombin und Fibrinogen umfasst. Auch PK und HK werden erfasst. Die Faktoren V und VIII scheinen allerdings den stärksten Einfluss auf die Gerinnungszeit zu haben.

Die aPTT eignet sich besonders zur Überwachung der Therapie mit unfraktioniertem Heparin, als Suchtest für Blutungsneigungen, allen voran sind hier Hämophilie A und B zu nennen, und als Suchtest bei Verdacht auf pathologische Gerinnungsinhibitoren wie Lupusantikoagulans oder Inhibitoren von Faktor VIII.

Eine Verlängerung der aPTT kann vielfältige Ursachen haben, unter anderem den Mangel oder die (angeborene oder erworbene) Aktivitätsminderung eines Gerinnungs-

faktors. Eine aPTT-Verlängerung kann z. B. durch Lupusantikoagulans oder Fibrinogenspaltprodukte hervorgerufen werden. Auch Medikamente wie Aprotinin (Kallikreininhibitor), Vitamin-K-Antagonisten in hoher Dosis und insbesondere Heparin und Hirudin verlängern die aPTT. Der Effekt von unfraktionierten Heparinen auf die aPTT ist dabei wesentlich stärker als der von niedermolekularem Heparin (NMH), so dass Letzteres in normaler Dosierung praktisch nicht von der aPTT erfasst wird (Fareed et al. 2004). Ursächlich für die unterschiedliche Empfindlichkeit der aPTT für unfraktioniertes Heparin im Vergleich zu NMH ist die Tatsache, dass hauptsächlich die Antithrombinaktivität des Heparins erfasst wird, während die Anti-FXa-Aktivität, die die Hauptwirkung der NMH darstellt, kaum im Messergebnis der aPTT widerspiegelt wird. Bei der Therapieüberwachung von unfraktioniertem Heparin mittels aPTT ist zu beachten, dass sich die Heparinempfindlichkeit der verschiedenen aPTT-Reagenzien deutlich unterscheidet (Barthels et al. 2012). Außerdem können Fehler bei der Blutentnahme, wie eine Unterfüllung der Zitratmonovette, Fehler bei der Durchführung des Tests oder Erkrankungen wie Leberzirrhose die Ursache für eine verlängerte aPTT sein. Neugeborene haben physiologischerweise eine im Vergleich zum Erwachsenen längere aPTT. Nicht immer bedeutet eine Verlängerung der aPTT eine Blutungsneigung. Bei Mangel an Kontaktfaktoren kann eine Verlängerung der aPTT vorkommen, ohne dass das Blutungsrisiko erhöht ist, und bei Vorliegen von Lupusantikoagulans kann sie gar ein Hinweis auf eine Thromboseneigung sein.

Eine verkürzte aPTT sollte, wenngleich sie häufig durch fehlerhaft durchgeführte Blutentnahme verursacht wird, nicht ignoriert werden, da sie Ausdruck eines klinisch bedeutsamen Zustandes oder einer manifesten Erkrankung sein kann. So tritt eine verkürzte aPTT z. B. postoperativ, im akuten Stadium von Infarkten, bei venösen Thrombosen und Entzündungen, bei Diabetes mellitus, im letzten Schwangerschaftstrimester, post partum oder bei Einnahme von Ovulationshemmern auf (Lippi et al. 2010). Sie kann jedoch auch Ausdruck einer pathologisch erhöhten Konzentration von Gerinnungsfaktoren sein (Mina et al. 2012). Obgleich eine verkürzte aPTT ein Hinweis auf eine Thrombophilie sein kann, ist es die Ausnahme und nicht die Regel, dass sich eine Thromboseneigung in der aPTT bemerkbar macht.

Durch eine in der Norm liegende aPTT kann weder eine milde Blutungsneigung noch eine Thrombophilie ausgeschlossen werden (Kitchens 2005). Daher ist es wichtig, die Messergebnisse der aPTT nur im Zusammenhang mit der klinischen Information zu interpretieren.

Sowohl in der Vorhersagbarkeit von Blutungskomplikationen einerseits und thromboembolischen Ereignissen andererseits als auch in der Überwachung von zahlreichen heutzutage gebräuchlichen Antikoagulanzen (z. B. den bereits erwähnten NMH) sind der aPTT klare Grenzen gesetzt. Als die aPTT 1958 entwickelt wurde, war eine Anwendung auf diesem Gebiet auch gar nicht intendiert.

Ein Defizit, das die aPTT mit allen anderen auf der Fibringerinnung basierenden Methoden in der Gerinnungsdiagnostik gemeinsam hat, besteht darin, dass die Fibringerinnung keineswegs allein von der Thrombinaktivität abhängt. Vielmehr haben auch die Interaktionen der Fibrinmonomere untereinander, die Interaktion der Fibrinstränge mit Thrombin und eine eventuelle Fibrinolyse einen Einfluss. Weitere Probleme ergeben sich aus der sehr hohen Aktivatorkonzentration, die bei der aPTT eingesetzt wird. Dies bedeutet eine starke Veränderung der Plasmamatrix, so dass die physiologischen Verhältnisse nicht mehr gegeben sind. Darüber hinaus lässt sich beispielsweise der Effekt, den ein eventuelles Einfrieren und Auftauen auf die Gerinnungsaktivität von Plasma hat, wie es bei Plasmakonserven (engl. Fresh Frozen Plasma) der Fall ist, nicht per aPTT messen.

1.2.3. Thrombingenerierungsteste

Die klassischen globalen Gerinnungsteste wie aPTT und Prothrombinzeit sind nur bei stark veränderten Gerinnungslagen, nicht jedoch bei annähernd physiologischen Verhältnissen, in der Lage, eine Aussage über den Grad der Gerinnungsaktivierung zu machen. Es besteht heutzutage in der Gerinnungsdiagnostik eine große Diskrepanz zwischen dem detaillierten Wissen über die zahlreichen an der Gerinnung beteiligten plasmatischen Faktoren und Plättchenkomponenten und der Tatsache, dass es keinen etablierten, präzisen und zudem einfach durchzuführenden Test gibt, der über die Gerinnungsaktivierung eines Plasmas Aufschluss gibt. Man stelle sich eine Skala vor, die von exzessivem Blutungsrisiko über ausgeglichene Hämostase bis hin zu massivem

Thromboserisiko reicht. Ideale Globalteste sollten in der Lage sein, einem getesteten Plasma einen Wert auf einer solchen Skala zuzuordnen. Dabei sollte die Funktionalität der gerinnungsfördernden ebenso wie die der gerinnungshemmenden Komponenten des Hämostasesystems miteinbezogen werden. Auch der Einfluss von diversen Medikamenten mit völlig unterschiedlichen Wirkmechanismen, die die Gerinnung fördern oder hemmen, sollte sich gleichermaßen widerspiegeln. Letztendlich sollte ein Normwert bzw. Normbereich für eine ausgeglichene Hämostaseaktivität existieren, so dass dem Kliniker im Vergleich zu anderen Laborwerten, die z. B. die Nierenfunktion oder den Blutzuckerspiegel abbilden, die Interpretation nicht erschwert wird.

Die Thrombingenerierung ist ein Indikator für die hämostatische Funktion eines Plasmas, der das Potential hat, die genannten Forderungen zu erfüllen und somit den Phänotyp des Gerinnungssystems offenzulegen. Diese Überlegungen sind die Grundlage der Entwicklung von modernen Thrombingenerierungstesten (Hemker und Béguin 2000). Denn die zentrale Stellung, die Thrombin in der Hämostase einnimmt, hat zur Folge, dass sich der intrinsische und der extrinsische Weg sowie die zahlreichen Steuerungsmechanismen (positive und negative Rückkopplungen eingeschlossen) und auch verschiedenartige Einflüsse, z. B. von Medikamenten oder systemischen Erkrankungen, letztlich immer auf die Thrombinaktivität auswirken, welche die Neigung zur Thrombusbildung bestimmt. Es gibt im plasmatischen Gerinnungssystem keinen einzigen pro- oder antikoagulatorischen Mechanismus, der Thrombin umgeht. Aus diesem Grund eignet sich die Thrombinaktivität besser als die jedes anderen Gerinnungsfaktors zur Messung der Gerinnungslage eines Plasmas. Als Beispiel hierfür können die unterschiedlichen pharmakologischen Wirkweisen von Antikoagulanzen dienen: Cumarine blockieren die Gamma-Carboxylierung der Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X, während Heparin einen Komplex mit Antithrombin III eingeht und die Inhibierung von Thrombin verstärkt. Acetylsalicylsäure hemmt die Thrombozytenaktivierung mit der Folge, dass weniger prokoagulatorische Oberflächen zur Verfügung stehen. Neue Antikoagulanzen inhibieren Thrombin oder FXa. Der Gerinnungskaskade folgend führen die Wirkungen aller dieser Medikamente zu einer verminderten Thrombinaktivität. Die Thrombinaktivität stellt vereinfacht ausgedrückt das gemeinsame Produkt der ihr vorgeschalteten Gerinnungskaskade dar.

Tests wie die aPTT oder die Prothrombinzeit geben jeweils nur die Wirkung von einem der genannten Medikamente wieder, da sie nur einen Teil der Gerinnungsreaktion abbilden, der noch dazu unter unphysiologischen Bedingungen abläuft, während ein Test, der die Thrombingenerierung misst und unter Bedingungen abläuft, die den (patho-)physiologischen Verhältnissen nahe kommen, in der Lage sein könnte, alle diese Wirkungen zu registrieren.

Die physiologische TF-initiierte Gerinnungsreaktion wird von Brummel et al. (2002) als ein in drei Schritten ablaufendes Geschehen beschrieben: Die Gerinnung startet und führt anfänglich zu einer langsamen Thrombinbildung (Initiierungsphase, engl. initiation phase), dann kommt es durch positive Feedbackmechanismen zum plötzlichen explosionsartigen Anstieg der Thrombinaktivität (Verstärkungsphase, engl. propagation phase) und schließlich durch Fibrin-vermittelte Inaktivierung des Thrombins zum Erliegen der Thrombinaktivität (Terminierungsphase, engl. termination phase). Die Fibrinbildung setzt mit Beginn der Verstärkungsphase ein. Brummel et al. konnten zeigen, dass 96% des während der Gerinnungsreaktion entstehenden Thrombins erst nach Einsetzen der Fibrinbildung generiert wird. Dies bedeutet, dass alle Tests, die Gerinnungszeiten messen und die Fibrinbildung als Endpunkt nutzen, nur einen geringen Teil der Hämostasereaktion, nämlich die erste der drei Phasen, vollständig erfassen können. Alle drei Phasen sind jedoch mithilfe eines Thrombingenerierungstests messbar (Regnault et al. 2004), sofern ein Verfahren gewählt wird, dass die Thrombinaktivität trotz einsetzender Fibrinbildung exakt bestimmen kann – wobei die ersten beiden Phasen wesentlich bedeutsamer sind als die Dritte, die oft ein in-vitro-Artefakt darstellt.

Erste Thrombingenerierungsteste wurden von MacFarlane und Biggs (1953) sowie von Pitney und Dacie (1953) entwickelt. Weiterentwicklungen dieser noch sehr aufwendigen Tests, welche die Thrombinaktivität von nacheinander entnommenen Unterstichproben eines gerinnenden Plasmas („Subsampling“-Methode) mittels der Geschwindigkeit der Fibrinogen-Fibrin-Umwandlung einer Fibrinogenlösung bestimmten, wurden durch die Erfindung der chromogenen Peptidsubstrate möglich, mit deren Hilfe die Thrombinaktivität durch Umsatz eines künstlichen Substrats gemessen werden konnte.

1.2.4. Synthetische Peptidsubstrate

Um einen globalen Gerinnungstest auf Basis der Thrombingenerierung zu entwickeln, der die genannten Probleme der aPTT und anderer etablierter Teste umgeht, ist die Verwendung von chromogenen oder fluorogenen Substraten eine vielversprechende Option. Ein solcher Test ist nicht von der Fibringerinnung als Endpunkt abhängig, sondern kann die Thrombinaktivität in IU messen. Um dies genauer zu erörtern, sollen zunächst die Entwicklung der Peptidsubstrate und deren bisherige Anwendung auf dem Gebiet der Gerinnungsdiagnostik dargestellt werden.

1954 entdeckten Sherry und Troll, dass Thrombin und Plasmin in ihrer Funktion als proteolytische Enzyme bestimmte Aminosäureester *in vitro* hydrolysieren. Aminosäureester waren aber als Substrat wenig spezifisch für die verwendete Protease. Auch ließ sich die entstehende Säure oder der Alkohol nur sehr aufwendig nachweisen. Svendsen et al. arbeiteten Anfang der 70er Jahre an der Synthese von Thrombininhibitoren. Dabei setzten sie Tripeptid-Methylester als Substrat für Thrombin ein. Die Tripeptidsequenz gestalteten sie so, dass diese der Spaltstelle an der A α -Kette des Fibrinogens ähnelte. Sie synthetisierten erstmals ein Peptidsubstrat, das eine chromogene Gruppe anstelle der Estergruppe enthielt: Phe-Val-Arg-pNA. P-Nitroanilin (pNA) war hierbei durch eine Amidbindung an die Carboxylgruppe des Arginins gekoppelt und wurde durch die Hydrolyseaktivität des Thrombins abgespalten. Das freie pNA konnte anhand seiner gelben Farbe anschließend photometrisch detektiert werden (Svendsen et al. 1972). In der Folge dieser wegweisenden Entdeckung wurden für verschiedene andere Proteasen synthetische chromogene Peptidsubstrate geschaffen. Die Aminosäurenabfolge wird dabei in der Regel so gewählt, dass die für die Spaltstelle des natürlichen Substrats charakteristische Aminosäuresequenz imitiert wird. Das zu messende Enzym spaltet dann eine chromogene Gruppe von dem Peptidsubstrat ab, was sich photometrisch nachweisen lässt, so dass die Geschwindigkeit des Substratumsatzes auf die Aktivität des zu messenden Enzyms rückschließen lässt. Die Herstellung von geeigneten synthetischen Substraten mit einer passenden Aminosäuresequenz gewährleistet dabei zwar eine gewisse Spezifität, dies allein reicht aber nicht aus, um sicherzustellen, dass andere im Plasma vorliegende Proteasen nicht ebenfalls das synthetisierte Peptid spalten und die Messung verfälschen.

Neben der Auswahl der zumeist drei bis vier Aminosäuren bzw. modifizierten Aminosäuren der Peptidsequenz ist auch der Substituent am n-terminalen Ende des Substrats von Bedeutung für die Spezifität und die Sensitivität des Verfahrens. Eine blockierende n-terminale Gruppe nimmt Einfluss auf die Affinität zwischen Enzym und Substrat und schützt das Substrat vor dem Abbau durch Exopeptidasen.

Bei der Spaltung des synthetisierten Peptidsubstrats durch das Enzym wird die c-terminale chromogene Gruppe freigesetzt. Das häufig eingesetzte Chromogen p-Nitroanilin hat in freier Form ein Absorptionsmaximum im Bereich von 385 nm. Solange es jedoch an das Substrat gebunden ist, liegt sein Absorptionsmaximum nur bei etwa 300 nm. Bei der photometrischen Messung einer Lösung, die sowohl gebundenes als auch freies pNA enthält, empfiehlt sich die Detektion bei 405 nm. Denn das freie p-Nitroanilin, dessen Absorptionsmaximum unweit entfernt liegt, hat in diesem Fall eine hohe Absorption, während das ungespaltene Substrat aufgrund des niedrigeren Absorptionsmaximums kaum zu einer Interferenz führen kann (Svendsen und Stocker 1977). Der Nachweis bei 405 nm kann kinetisch oder diskontinuierlich, d. h. als Endpunktmessung nach dem Stoppen der Reaktion, erfolgen. Bei Thrombingenerierungstesten gibt es Störfaktoren des Plasmas, die beachtet werden müssen (Hemker et al. 2002).

Neben pNA gibt es weitere chromogene Gruppen, die in Peptidsubstraten Verwendung finden. Hierzu seien 2-Methoxy-4-Nitroanilin (MNA) und 5-Amino-2-Nitrobenzoesäure (ANBA) genannt. Auch der Einsatz von Peptidsubstraten gekoppelt mit fluoreszierenden Gruppen (Ramjee 2000) und radioaktiven Gruppen ist möglich.

Besondere Bedeutung für die praktische Anwendbarkeit der chromogenen Testverfahren hat die Tatsache, dass sie sich gut automatisieren lassen (Friberger 1983) und somit Aufwand und Kosten gespart werden können. Hierfür sind moderne Photometer hilfreich, die ganze Mikrotiterplatten in einem Schritt ablesen.

In der Hämostaseologie und auch in vielen anderen Gebieten, z. B. der Endokrinologie und der Infektiologie, finden die chromogenen Substrate ein weites Einsatzspektrum (Gallimore und Friberger 1991). Was die Gerinnungsdiagnostik anbelangt, werden Peptidsubstrate insbesondere für den Einzelfaktornachweis genutzt, da sie die Möglichkeit bieten, eine Aussage über die Aktivität eines ganz bestimmten Enzyms zu

machen. Diese Einzelfaktorteste sind für eine große Anzahl von Proteasen der Gerinnungskaskade, der Fibrinolyse und des Kallikrein-Kininogen-Systems erhältlich (Róka und Rasche 1980, Witt 1991).

Auf die Einführung des Einzelfaktornachweises folgte einige Zeit später die Idee, auch für die sogenannten Globalteste, nämlich Prothrombinzeit und aPTT, chromogene Substrate anzuwenden (Becker et al. 1984, Becker et al. 1985). Dies geschah mittels der Fixed-Absorbance-Methode, bei der die Gerinnungsreaktion und die Nachweisreaktion, die die Freisetzung des Chromogens beinhaltet, gleichzeitig ablaufen. Mittels Photometer wurde so die Zeit bestimmt, bis eine festgesetzte Absorptionsänderung eingetreten ist. Die Absorptionsänderung wurde dabei nicht ausschließlich durch das freigesetzte Chromogen, sondern mit zunehmender Reaktionszeit auch durch das sich bildende Fibrin in der Probe bestimmt. In der Folge konnte nur der Anfang der Gerinnungsreaktion ausgewertet werden. Problematisch war zudem, dass insbesondere nach der Aktivierung der intrinsischen Gerinnung nicht nur Thrombin, sondern auch Kallikrein das synthetische Substrat umsetzte.

1.2.5. Das kalibrierte automatisierte Thrombogramm

Hemker und seine Kollegen arbeiten seit den 90er Jahren an einem Thrombingenerierungstest. Anfangs setzte die Gruppe ein chromogenes Thrombinsubstrat ein (Hemker et al. 1993) und versuchte, dem Problem der Fibrinbildung, welche die Absorptionsänderung beeinflusst und so die photometrische Messung stört, durch ein aufwändiges Verfahren, bei dem das Fibrinogen vor Beginn des Tests aus dem Plasma entfernt wird, zu begegnen. Dann ging Hemker zu einem Thrombingenerierungstest mit einem fluorogenen Substrat über, um trotz des entstehenden Fibringerinnsels eine exakte Messung der gebildeten Thrombinmenge zu erreichen. Der heute am weitesten verbreitete Globaltest zur Thrombingenerierung, der synthetische Peptidsubstrate nutzt, ist der von Hemker et al. entwickelte Test „Calibrated automated Thrombogram“ (CAT), der inzwischen auch kommerziell in vollautomatisierter Form von dem Unternehmen Thrombinoscope der Stago Group angeboten wird (Hemker et al. 2002, Thrombinoscope BV a). Bei diesem Test wird ein Substrat mit einer fluoreszierenden Gruppe eingesetzt. Es wird eine kontinuierliche Messmethode angewandt, d. h., während des

Ablaufs der Gerinnungsreaktion wird die aus dem Substrat freigesetzte fluorogene Aktivität kontinuierlich im Reaktionsansatz gemessen. Voraussetzung für die kontinuierliche Messung ist der Einsatz eines niedrig-affinen, langsam reagierenden Thrombinsubstrats (Hemker et al. 1993), um einen vorzeitigen Substratverbrauch zu vermeiden. Es resultiert eine Kurve, die die Thrombinaktivität im zeitlichen Verlauf darstellt, das sogenannte Thrombogramm. Die Fluorimetrie ermöglicht die Bestimmung der Thrombinbildung in plättchenarmem oder plättchenreichem Plasma (Hemker et al. 2000, Ramjee 2000, Hemker et al. 2003) und das bei gleichzeitiger Anwesenheit von Fibrin (Hemker et al. 2006). Sie hat jedoch den Nachteil, dass es unter anderem zum sogenannten „inneren Filtereffekt“ kommt: Die Farbe des Plasmas vermindert die Fluoreszenzintensität. Es ist daher nötig, einen Kalibrator simultan zu messen, um Störfaktoren zu korrigieren. Neben dem inneren Filtereffekt sind dies der vorzeitige Substratverbrauch, die Individualität der Plasmafärbung, die Bildung von Thrombin- α_2 -Makroglobulin-Komplexen und apparatabhängige Unterschiede, u. a. verursacht durch Alterung von Lampe und Filtern der Fluorometer (Hemker et al. 2002, ThrombinoScope BV b).

Die Durchführung des CAT verläuft wie folgt (Hemker et al. 2003): In einer 96-well-Mikrotiterplatte mit rundem Boden werden je vier Vertiefungen (U-wells) einer Plasmaprobe zugewiesen. Je Probe dienen zwei Wells (doppelte Ausführung) als Thrombingenerierungswell (TG-well), in dem die generierte Thrombinaktivität gemessen wird, und weitere zwei Wells als Kalibrierungswell (CL-well) zur kontinuierlichen Korrektur der Messwerte. Den TG-wells werden 20 μ l Puffer zugegeben. Der Puffer enthält 3 pmol/l rekombinanten Gewebefaktor als extrinsischen Gerinnungsaktivator für plättchenreiches Plasma und, wenn plättchenarmes Plasma gemessen wird, zusätzlich 24 μ mol/l Phospholipide. In den CL-wells wird anstelle des Puffers 20 μ l eines Kalibrators, der 600 nmol/l Thrombin- α_2 -Makroglobulin-Komplexe enthält, vorgelegt. In alle Wells wird 80 μ l Plasma zugegeben. Die Mikrotiterplatte wird im Fluorometer platziert und für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Es werden 20 μ l FluCa-Reagens bestehend aus einer Pufferlösung mit 60 mg/ml bovinem Serumalbumin, 0.1 mol/l CaCl_2 und 2.5 mmol/l fluorogenem Substrat (Z-Gly-Gly-Arg-AMC) je Well zugefügt (zu diesem Zeitpunkt startet die Gerinnungsreaktion und die

gleichzeitig ablaufende Nachweisreaktion) und die Platte wird zur besseren Durchmischung gerüttelt. Nun wird das Fluoreszenzsignal kontinuierlich registriert und mittels Computer und spezieller Software (Thrombinoscope BV b, Hemker et al. 2003) wird die Thrombinmenge berechnet und als Kurve dargestellt. Die Kurve wird auch als Thrombogramm bezeichnet und stellt die Thrombinmenge in der Einheit nmol/l in Abhängigkeit von der Zeit dar (siehe Abb. 3). Bestimmte Kenngrößen der Kurve können zur Beurteilung der jeweiligen Probe herangezogen werden: Dies sind die Verzögerungszeit (engl. lag time), der Höhepunkt bzw. das Thrombinmaximum (engl. peak height), die Zeit bis zum Erreichen des Thrombinmaximums (engl. peak time), die Fläche unter der Kurve (engl. area under the curve), die auch als endogenes Thrombinbildungspotential (ETP) bezeichnet wird, die maximale Thrombinbildungsgeschwindigkeit (engl. steepness of the rising slope) und andere. Die Verzögerungszeit (Einheit min) reflektiert ähnlich wie die Prothrombinzeit die Initiierungsphase der Gerinnung, d. h. die Zeit bis zum Auftreten der geringen Thrombinmengen, die zum Einsetzen der Gerinnung nötig sind. Erst deutlich später kommt es zum Thrombinmaximum (Einheit nmol/l), welches anzeigt, wie viel freies Thrombin maximal zu einem konkreten Zeitpunkt in der Probe vorhanden ist, während die Fläche unter der Kurve (Einheit nmol/l x min oder Prozent der Norm) die Gesamtmenge des während des Gerinnungsvorgangs gebildeten aktiven Thrombins darstellt. Die Fläche unter der Kurve findet bisher die größte Beachtung bei der Beurteilung des Gerinnungsstatus einer Probe anhand des CAT, da sich gezeigt hat, dass sie gut mit dem klinischen Erscheinungsbild korreliert (Al Dieri et al. 2012).

Der Thrombingenerierungstest CAT eignet sich insbesondere zur Erfassung von Phänotypen mit zu starker oder zu schwacher Gerinnungsaktivität (Hemker et al. 2002). Ein erhöhtes ETP (Fläche unter der Kurve) konnte als unabhängiger Risikofaktor für eine rezidivierende Venenthrombose identifiziert werden (Eichinger et al. 2008). Auch lässt sich anhand der präoperativen Thrombingenerierung das postoperative Blutungsrisiko eines Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen vorhersagen (Bosch et al. 2013). Die Tatsache, dass die Thrombingenerierung eine Altersabhängigkeit aufweist, indem sie mit zunehmendem Alter ansteigt und sich so um bis zu 60% erhöht

(Haidl et al. 2006), spiegelt möglicherweise das mit steigendem Alter zunehmende Thromboserisiko eines Individuums wieder.

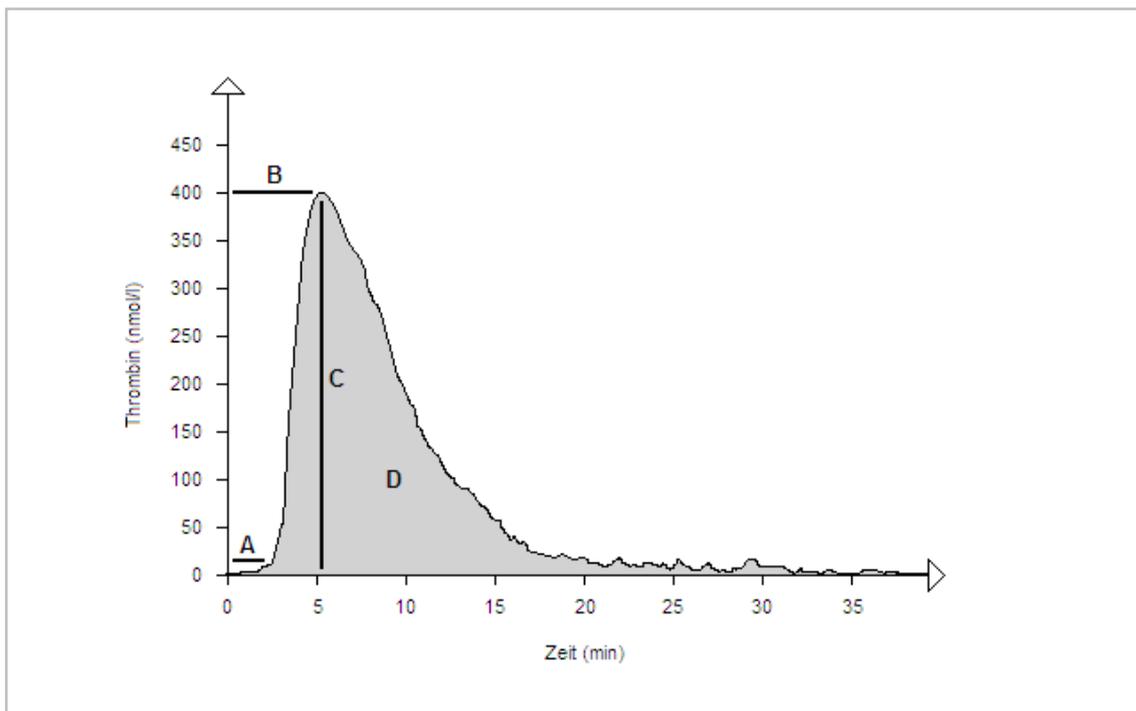


Abb. 3 (modifiziert nach Castoldi und Rosing 2011, Siegemund und Siegemund 2012): Thrombingenerierungskurve
A: Verzögerungszeit, B: Zeit bis zum Thrombinmaximum, C: Thrombinmaximum, D: Fläche unter der Kurve.

Es existieren umfangreiche Arbeiten zum Einsatz der Thrombingenerierung für Diagnostik und Therapiesteuerung bei Hämophilie, die belegen, dass dieser Test den herkömmlichen Tests in Hinblick auf die Darstellung der klinischen Heterogenität der Erkrankung und in Bezug auf die Überwachung bestimmter Therapieformen überlegen ist (Salvagno und Berntorp 2010, Ninivaggi et al. 2011, Young et al. 2013). Für die Steuerung und Überwachung von Therapien mit unterschiedlichen Antikoagulanzen inklusive der FXa- und Thrombininhibitoren kann der CAT ebenfalls hilfreich sein, da er erhebliche inter-individuelle Unterschiede in der Thrombingenerierung bei Gabe einer festen Dosierung eines Antikoagulans offenbart (Bloemen et al. 2013 b). Weitere Einsatzmöglichkeiten bestehen in dem Nachweis von prokoagulatorischen oder anti-koagulatorischen Nebenwirkungen von Medikamenten. So lässt sich belegen, dass Frauen unter oralen Ovulationshemmern oder oraler Hormonersatztherapie eine erhöhte Thrombinbildung aufweisen (Brummel-Ziedins et al. 2005, Scarabin et al. 2011). Demgegenüber konnte kürzlich durch Tripodi et al. (2014) unter Anwendung der CAT-

Methodik gezeigt werden, dass Statine bei Patienten mit Hypercholesterinämie die Thrombingenerierung, insbesondere das ETP, verringern.

Einen dem CAT ähnlichen Test bietet auch das österreichische Unternehmen Technoclone GmbH unter dem Namen Technothrombin® TGA an (Technoclone GmbH 2010). Einen Thrombingenerierungstest, der ein chromogenes Substrat und einen Fibrinaggregationshemmer (Polymerisationshemmer) nutzt, bietet die Firma Siemens Healthcare Diagnostics unter dem Namen Endogenes Thrombinpotential (ETP) an (Siemens Healthcare Diagnostics Inc. 2013). Beide letztgenannten haben jedoch im Vergleich zum CAT eine weniger weite Verbreitung gefunden.

Schwierigkeiten beim Einsatz von Thrombingenerierungstesten ergeben sich aus den zum Teil bereits angesprochenen Fehlerquellen. Hierzu zählen bei den fluorogenen und chromogenen Verfahren der vorzeitige Substratverbrauch, die Bildung von Thrombin- α_2 -Makroglobulin-Komplexen und die Fibrinbildung während des Fortschreitens der Gerinnungsreaktion. Die fluorogenen Verfahren einschließlich CAT bergen zudem das Problem des inneren Filtereffekts und der Individualität der Plasmafärbung. Eine weitere, bisher noch nicht genannte Fehlerquelle besteht darin, dass bei allen Verfahren, die kontinuierlich während der Gerinnungsreaktion messen (z. B. CAT), das synthetische Thrombinsubstrat mit den natürlichen Substraten um die Bindung an Thrombin konkurriert, was Einfluss auf die Feedback-abhängige Thrombingenerierung selbst hat und somit die Messung verfälschen kann (Butenas und Mann 2007). Insbesondere verlängert sich dadurch die Lag time, und die Thrombinaktivierung, welche von Antithrombin und Fibrin hervorgerufen wird, verzögert sich (Hemker und De Smedt 2007), wengleich Hemker und De Smedt argumentieren, dass die wesentlichen Parameter des CAT dennoch nicht verfälscht werden.

1.3. Fragestellung und Zielsetzung

Die Evidenz für die erhebliche Bedeutung des intrinsischen Wegs für die Blutgerinnung unter pathophysiologischen Bedingungen, z. B. für die Thrombusbildung, nimmt zu, gleichzeitig fehlt es jedoch an einem aussagekräftigen globalen Test zur intrinsischen Gerinnung. Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit ist derzeit der gebräuchlichste routinemäßig eingesetzte Test der intrinsischen Gerinnungsaktivität, obwohl sie ein relativ altes Testverfahren ist und die Gerinnungszeit in Sekunden, nicht die Gerinnungsaktivität in internationalen Einheiten (engl. International Units, IU) Thrombin, misst. Darüber hinaus kann sie zur Unterscheidung zwischen normaler Gerinnungsaktivität und pathologisch erhöhter bzw. pathologisch oder therapeutisch verminderter Gerinnungsaktivität nur sehr begrenzt genutzt werden.

Neben den herkömmlichen Globaltesten aPTT (intrinsisch) und PT (extrinsisch) gibt es neuere chromogene und fluorogene Testsysteme, welche die Gerinnung in IU Thrombin oder nmol/l Thrombin messen können. Letztere haben sich allerdings nur begrenzt in der Routine durchgesetzt und konzentrieren sich allesamt auf die extrinsische durch TF initiierte Gerinnung. Problematisch sind die schwierige Durchführung, die schwierige Interpretation und der zeitliche sowie der finanzielle Aufwand dieser Tests. Die unspezifischen Proteasen (wie Kallikrein) beeinflussen und stören die Messung, da sie wie Thrombin in der Lage sind, die synthetischen Substrate zu spalten. In Bezug auf die chromogenen Methoden konnte insbesondere das Problem der Verfälschung der Messung durch die einsetzende Fibrinbildung nicht überzeugend gelöst werden. Die fluorogenen Methoden hingegen nutzen ein aufwändiges Nachweisverfahren, das naturgemäß spezielle Gerätschaften erfordert, und bergen eigene methodische Fehlerquellen wie den inneren Filtereffekt, welche eine Korrekturrechnung erforderlich machen.

Mit dem Intrinsic Coagulation Activity Assay (INCA) soll die intrinsische Gerinnungsaktivität mit Hilfe eines chromogenen Substrats gemessen werden, dies soll jedoch auf einem neuen Weg geschehen (Stief 2006 b), der die genannten Nachteile der bekannten chromogenen Tests umgeht. Daher ergibt sich für diese Arbeit folgende Zielsetzung:

Der INCA, ein neuer chromogener Test zur Messung der intrinsischen Gerinnung anhand der Thrombinaktivität, soll in dieser Arbeit vorgestellt und diskutiert werden. Er soll ferner mit der aPTT verglichen werden. Insbesondere zu beantworten ist dabei die folgende Hauptfrage mit vier Unterfragen:

Kann die intrinsische Gerinnung mit einem chromogenen Globaltest gemessen werden?

1. Was ist der Normwert für INCA?
2. Wie verhält sich das Plasma von Personen mit Antikoagulation durch Cumarinderivate oder unfraktioniertes Heparin im INCA?
3. Wie hoch sind der intra-assay Variationskoeffizient und der inter-assay Variationskoeffizient des INCA?
4. Wie verhalten sich lyophilisierte Plasmen im INCA? Kann ihre Thrombinaktivität als Normwert des INCA gelten und können sie zur Kalibrierung des INCA herangezogen werden?

2. Material und Methoden

2.1. Blutproben

Das für die Messungen in Empfang genommene anonymisierte Venenblut befand sich in 5 ml fassenden Natriumzitat-Monovetten (0.5 ml 106 mmol/l Natriumzitat + 4.5 ml Blut) der Firma Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) und war bereits zentrifugiert (10 min bei 2800 g bei 23 °C) und in der Routine analysiert. Es wurden je Monovette 50 µl Plasmaproben für die Durchführung des INCA entnommen. Das Plasma war zu diesem Zeitpunkt der Probenvernichtung ca. sechs Stunden alt. Es wurde, soweit nicht anders angegeben, bis zur Durchführung des INCA bei Raumtemperatur gelagert. Die INCA-Ergebnisse beurteilen auch die Probenqualität der gelagerten Routineproben. Normale Proben von Gesunden wurden nach schriftlichem Einverständnis genommen und waren ca. 1–3 h alt (genauere Angaben zur Lagerungsdauer sind dem Ergebnisteil zu entnehmen).

Bei der INCA-Messung blieben die Patienten anonym, d. h., es wurden weder die Namen noch andere personenbezogene Daten der Patienten, von denen die Blutproben stammten, ermittelt. Es wurden lediglich die für die Blutgerinnung relevanten Werte der Routinediagnostik nämlich aPTT, PT, INR, Fibrinogen, D-Dimere, Antithrombin und eine eventuelle Behandlung mit Antikoagulanzen notiert. Um eine Zuordnung dieser Daten zu den Blutproben zu ermöglichen, wurden die Proben mit fortlaufenden Nummern versehen. Weitere Patientendaten wurden nicht erhoben. Alle erhobenen anonymisierten Patientendaten sowie die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden vertraulich behandelt, nicht an Dritte weitergegeben und ausschließlich zu Forschungszwecken im Rahmen der Qualitätskontrolle genutzt.

Einzig für die in Kapitel 3.2., 3.5., 3.6., 3.7. und 3.10. dargestellten Messungen wurden keine Patientenblutproben, sondern Proben von gesunden Freiwilligen, deren schriftliches Einverständnis eingeholt wurde, verwendet. Die Daten der gesunden Freiwilligen wurden ebenso wie die der Patienten anonymisiert und vertraulich behandelt. Für einige Messungen wurde aus den Proben der gesunden Freiwilligen oder aus den Proben der Patienten ein Plasmapool hergestellt.

2.2. Gruppeneinteilung

Das oben genannte Patientenkollektiv wurde nach den Kriterien Antikoagulation und Gerinnungsstatus in folgende Untergruppen eingeteilt:

- Patienten mit in der Norm liegenden Werten in den Routinetesten Quick und aPTT (mit einem Quick-Wert von $\geq 70\%$ und einer aPTT ≤ 36 s): Gruppe „nicht antikoaguliert“. Im Folgenden werden diese Plasmen auch als Plasmen nicht antikoagulierter Patienten bezeichnet.
- Patienten mit einem Quick-Wert von $< 70\%$ (in der Regel haben diese Patienten zusätzlich eine INR von > 1.15 und/oder aktuelle Cumarintherapie): Gruppe „erhöhte INR“.
- Patienten mit einer aPTT von > 36 s (ein Großteil dieser Patienten hat aktuell eine Heparintherapie): Gruppe „verlängerte aPTT“.

Sofern eine Probe gleichzeitig die Kriterien der Gruppen „verlängerte aPTT“ und „erhöhte INR“ erfüllte, wurde sie je nach dem, welcher Wert am stärksten von der Norm abwich, nur einer der beiden Gruppen zugeteilt. Zu beachten ist bei dieser Gruppeneinteilung, dass die beiden letztgenannten Gruppen mitunter Patienten enthalten, bei denen die Therapie mit der jeweiligen Substanz (Heparin bzw. Cumarinderivat) zum Zeitpunkt der Blutentnahme gerade erst begonnen bzw. schon wieder abgesetzt wurde. Der therapeutisch wirksame Bereich (ab INR 2.0 bzw. ab aPTT 54 s) ist bei einigen dieser Patienten nicht erreicht. Darum gilt es, im Einzelfall die jeweiligen Gerinnungswerte zu berücksichtigen. Die Gruppeneinteilung soll lediglich eine Hilfe darstellen, um zwischen Proben von Patienten ohne Antikoagulation und solchen von Patienten mit Antikoagulation oder Gerinnungsstörungen leichter unterscheiden zu können. Die Gabe von niedermolekularem Heparin (LMW-Heparin) wurde gesondert vermerkt.

Es ist anzumerken, dass zum Zeitpunkt der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit in den Jahren 2005 bis 2006 die Markteinführung der neuen oralen Antikoagulanzen noch ausstand, wodurch ein Einfluss dieser Medikamente auf die untersuchten Blutproben ausgeschlossen ist.

2.3. Analyseverfahren

2.3.1. Benötigte Materialien

Zur Durchführung des INCA wurden folgende Materialien verwendet:

- Zitratplasmaproben
- Standard Human Plasma für Gerinnungsteste im Normalbereich (DadeBehring, Marburg, Deutschland)
- Pathromtin® SL (DadeBehring)
- Calciumchlorid (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- 2.5 mol/l Arginin mit einem pH von 8.6 (Sigma)
- chromogenes Substrat für Thrombin Cyclohexylglycyl-alanyl-arginyl-para-nitro-anilid (CHG-Ala-Arg-pNA; Pentapharm, Basel, Schweiz)
- Mikrotiterplatte aus Polystyrol mit flachen Wells oder U-förmigen Wells (Polysorp; NUNC, Wiesbaden, Deutschland)
- gereinigtes Rinderthrombin (DadeBehring)
- Humanalbumin (Kabi, Stockholm, Schweden)
- Wasserbad mit digital kontrollierter Temperatur von 37 °C
- Rüttler für Mikrotiterplatten
- Photometer für Mikrotiterplatten, geeignet für die Messung im 1-mA-Bereich (Milenia-DPC, Los Angeles, Kalifornien, USA)
- Pipetten und Multipipetten mit entsprechenden Aufsätzen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- destilliertes Wasser
- Stoppuhr

2.3.2. Vorbereitungen

Zur eigentlichen Durchführung des INCA mussten vorbereitend einige Reagenzien angesetzt werden, nämlich der Aktivator, das chromogene Substrat und der Thrombinstandard.

Der Aktivator ist vor jedem INCA frisch anzusetzen, um eine gleich starke Aktivierung der Gerinnung bei jeder neuen Messung zu gewährleisten. Hierzu wurden 50 µl 2.75 mol/l CaCl₂ mit 300 µl H₂O und 200 µl Pathromtin® SL (PSL) versetzt, so dass

eine Verdünnung des PSL 1: 2.75 mit 393 mmol/l CaCl_2 entsteht und die Ca^{2+} -Ionenkonzentration im Reagenz 250 mmol/l beträgt. Die im PSL enthaltenen SiO_2 -Partikel aktivieren auf dem intrinsischen Weg die Blutgerinnung und führen somit letztlich zur Entstehung der „Endstreckenprotease“ der Gerinnungskaskade: des Thrombins.

Das chromogene Thrombinsubstrat wurde ebenfalls frisch angesetzt, kann aber auch aufgetaut werden. 1 mmol/l des Substrats CHG-Ala-Arg-pNA wurde in 1.25 mol/l Arginin mit einem pH-Wert von 8.7 gelöst (Lyophilisat gelöst in H_2O , dann verdünnt mit gleichem Volumen 2.5 mol/l Arginin). Dieses Substrat wird von Thrombin gespalten, was zu einer Gelbfärbung führt, die im 405 nm-Bereich gemessen werden kann. So wird Thrombin quantitativ bestimmt (siehe Abb. 4).

Der Thrombinstandard besteht aus 1 IU/ml gereinigtem Rinderthrombin in 6.7% Humanalbumin (dieser kann eingefroren und aufgetaut werden). Er dient zur Kalibrierung der Absorptionswerte.

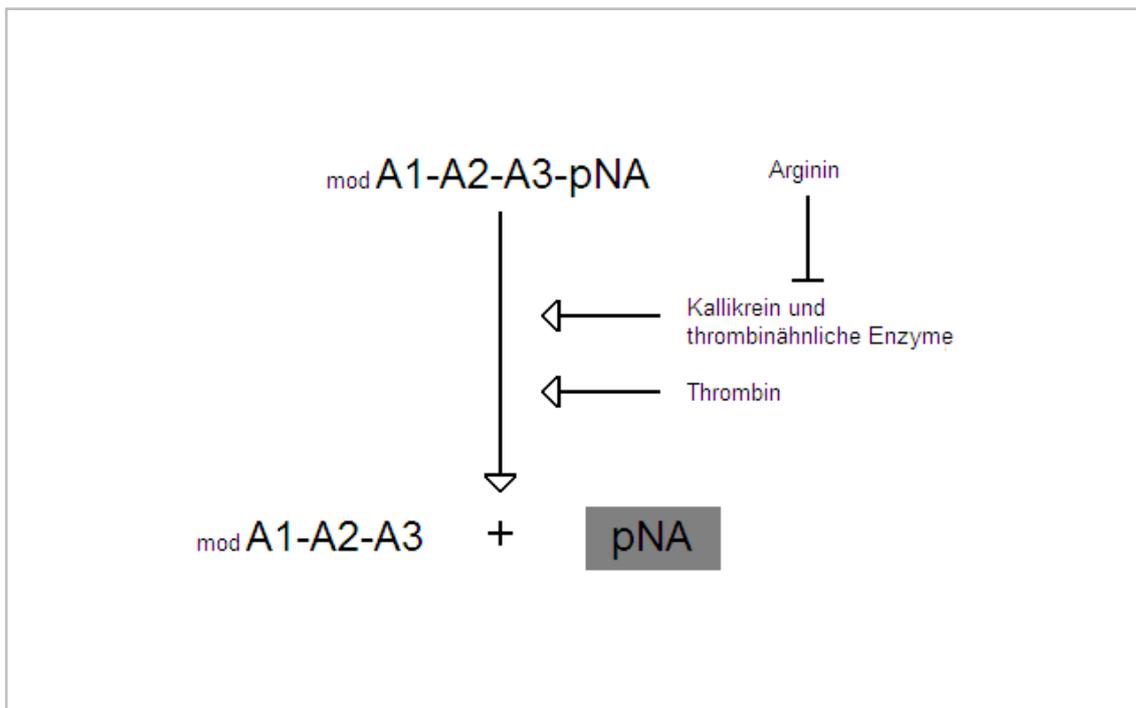


Abb. 4: Die Indikatorreaktion des INCA

Thrombin setzt das chromogene Substrat in einen Peptidanteil und freies pNA um, das eine gelbe Farbe hat (hier grau hinterlegt). Kallikrein und andere thrombinähnliche Proteasen sind hierzu ebenfalls in der Lage, werden im INCA aber durch einen Überschuss an Arginin inhibiert. modA1: modifizierte Aminosäure 1 als blockierende Gruppe; A2 und A3: Aminosäuren 2 und 3; pNA: p-Nitroanilin.

Eine vorbereitende Maßnahme ist des Weiteren von besonderer Wichtigkeit: Alle Pipetten- und Multipettenaufsätze sowie eventuell verwendete Kunststoffgefäße müssen vor Gebrauch mit destilliertem Wasser gespült und vollständig entleert werden. Es hat sich gezeigt, dass es sonst zu einer Inhibition der Gerinnung kommen kann, vermutlich hervorgerufen durch Polypropylenrückstände mit heparinähnlicher Wirkung.

2.3.3. Durchführung des INCA

50 µl Probenplasma oder Thrombinstandard wurden vorgelegt. Die Mikrotiterplatte wurde daraufhin kurz auf dem Rüttler gerüttelt. Anschließend wurde die Platte in das auf 37 °C aufgeheizte Wasserbad überführt und die Gerinnung wurde auf der gesamten Mikrotiterplatte durch die zügige Zugabe von 5 µl des frisch angesetzten Aktivators gestartet. Nach 0–18 Minuten wurde die Gerinnungsreaktion durch die Zugabe von 100 µl Arginin abgestoppt. Daraufhin wurde die Mikrotiterplatte aus dem Wasserbad genommen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zugabe von 50 µl frisch angesetztem Substrat für die Messung des Thrombins. Die Platte wurde zur besseren Durchmischung erneut gerüttelt und daraufhin sofort im Photometer bei 405 nm ausgelesen. Die Auslesung wurde nach fünf, 20 und 40 Minuten wiederholt. Zur Auswertung wurden die Absorptionwertdifferenzen (ΔA) zwischen der Photometermessung direkt nach Zugabe des Substrats und der Messung nach 20 Minuten genutzt (siehe Tabelle 5).

Es gilt festzuhalten, dass die wesentliche Inkubationszeit des INCA die Gerinnungsreaktionszeit ist, in welcher Thrombin bei physiologischen 37 °C generiert wird. Die daran anschließende Detektion des Thrombins findet bei Raumtemperatur statt.

Tabelle 5: Durchführung des Intrinsic Coagulation Activity Assay

Die grundlegenden Arbeitsschritte sind der Reihe nach aufgeführt. RT: Raumtemperatur.

Arbeitsschritte		Temperatur
1. Vorbereitung	Bestückung der Wells der Mikrotiterplatte mit je 50 µl Plasma	RT
2. Start der Gerinnungsreaktion	Durch Zugabe von 5 µl Aktivator (SiO ₂ , 250 mmol/l CaCl ₂) startet die Gerinnungsreaktion/Thrombin-generierung. Für die Dauer der Gerinnungsreaktion verbleibt die Platte im Wasserbad.	37 °C (Wasserbad)
3. Stopp der Gerinnungsreaktion	Zugabe von 100 µl 2,5 mol/l Arginin (pH 8,6) nach 0–18 Minuten	37 °C (Wasserbad)
4. Fibrindepolymerisation	Abwarten für 20 min, währenddessen Auflösung des Fibrins durch Arginin	RT
5. Indikatorreaktion	Durch Zugabe von 50 µl chromogenem Thrombinsubstrat (CHG-Ala-Arg-pNA) startet die Indikatorreaktion	RT
6. Detektion mittels Photometer	Auslesung der Absorptionwerte bei 405 nm direkt nach Zugabe des Thrombinsubstrats und erneut 20 min nach Start der Indikatorreaktion = Ermittlung von ΔA bei 405 nm	RT

2.3.4. INCA als Kurve versus INCA als Zweipunktmessung

Im Hinblick auf die Interpretation der Messwerte ist zu bedenken, dass das oben beschriebene Verfahren zu einer Thrombingenerierungskurve führt, die die Gerinnungsaktivität in der Gestalt von IU Thrombin über die Zeit von null bis 18 Minuten Gerinnungsreaktionszeit wiedergibt. Die Ermittlung dieser Kurve ist sinnvoll, um eine differenzierte Betrachtung der Gerinnung über einen längeren Zeitraum zu ermöglichen. Für die klinische Routine ist dieses Verfahren jedoch weniger geeignet, da es vergleichsweise umständlich durchzuführen ist und auch einen größeren zeitlichen Aufwand bedeutet. Zudem wird die Interpretation einer Kurve dem Kliniker schwerer fallen als die eines einfachen Laborwerts mit angegebenem Referenzintervall. Die Interpretation der gesamten Kurve ist jedoch in der Routine auch gar nicht nötig. Wie im Weiteren deutlich werden wird, lässt sich der INCA alternativ anhand der Werte für vier und fünf Minuten Gerinnungsreaktionszeit (INCA-4 und INCA-5) interpretieren.

Für diese Variation des INCA werden pro Patient nur diese zwei Werte gemessen. Es wird folglich die Gerinnungsreaktion nach vier und fünf Minuten mit Arginin gestoppt. Die weitere Durchführung entspricht der unter 2.4.3. genannten. Für dieses Verfahren werden je zwei Mikrotiterplatten belegt. Jeder Plasmaprobe werden pro Platte zwei

Wells zugewiesen, wobei jeder Wert doppelt bestimmt wird. Anschließend wird jeweils der entsprechende Mittelwert gebildet. Eine der Platten wird zur Messung von INCA-4, die andere zur Messung von INCA-5 genutzt. Somit erhält man pro Probe je einen INCA-4-Mittelwert und einen INCA-5-Mittelwert.

INCA-4 dient hierbei als Hauptwert während INCA-5 den Kontrollwert darstellt. Aus Haupt- und Kontrollwert, bzw. bei doppelter Messung aus den gebildeten Mittelwerten, lässt sich ein Bruch bilden ($INCA-5/INCA-4$). Ist der Wert dieses Quotienten größer als eins, so bedeutet das, dass der INCA-4-Wert wie gewünscht in den ansteigenden Anteil der Kurve fällt. Das heißt, nach vier Minuten Gerinnungsreaktionszeit hat die plasmatische Thrombinkonzentration ihr Maximum noch nicht erreicht. Anhand des Hauptwertes kann in diesem Fall eine verwertbare Aussage über die Gerinnungsaktivität der Probe gemacht werden. Ist der Wert des Quotienten geringer als eins, was selten der Fall sein dürfte, ist die Messung mit den Werten INCA-3 (neuer Hauptwert) und INCA-4 (neuer Kontrollwert) erneut durchzuführen.

2.3.5. Weitere Variationen der Durchführung des INCA

Für bestimmte Fragestellungen wurde der INCA in veränderter Form durchgeführt. Hierzu gehören die Messung der Trübungsabnahme durch Argininzusatz und der Gerinnungsinhibition durch Argininzusatz (Kapitel 3.1.), die Messung von Patientenplasmen in der 20- μ l-Testversion (Kapitel 3.3.), die Messung mit plättchenreichem Plasma (Kapitel 3.4.), die Messung von lyophilisiertem Plasma (Kapitel 3.5.), die Messung von bei Raumtemperatur gelagerten Proben (Kapitel 3.6.), die Messung von Tiefgefrorenen und wieder aufgetauten Proben (Kapitel 3.7.), die Durchführung des INCA bei Raumtemperatur (Kapitel 3.8.), die Messung der Auswirkung von Kühlung auf den INCA (Kapitel 3.9.), die Bestimmung von Variationskoeffizient und Normalbereich des INCA (Kapitel 3.10.) und die Messung zum Einfluss des Matrixvolumens auf den INCA (Kapitel 3.11.). Auf die exakte Methode dieser Variationen wird im Einzelnen – zur besseren Übersichtlichkeit – im Ergebnisteil dieser Arbeit eingegangen.

2.4. Statistische Auswertung

Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden allgemein gebräuchliche Methoden verwendet, wie die Berechnung der arithmetischen Mittelwerte, der Standardabweichungen und des Variationskoeffizienten als Maß der Unpräzision (Variationskoeffizient = $\text{Standardabweichung}_{(n-1)} / \text{Mittelwert} \times 100\%$). Die Datenauswertung erfolgte mithilfe der Software Microsoft Excel (Versionen 97 und 2011).

Die induktive statistische Datenanalyse erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics (Version 22). Zur Prüfung der Daten auf Varianzhomogenität wurde der Levene-Test ausgeführt. Aufgrund nicht gegebener Varianzhomogenität im Levene-Test ($p < 0.001$) wurden geeignete statistische Verfahren ohne Varianzhomogenitätsvoraussetzungen gewählt: Um zu untersuchen, welche Mittelwerte sich unterscheiden, wurden der Welch-Test und eine post-hoc-Analyse (Games-Howell-Test) durchgeführt. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde bei einem p-Wert von $< 0,05$ angenommen. Die statistische Prüfung auf Signifikanz der Mittelwertunterschiede der gebildeten drei Gruppen umfasste zusätzlich die Schätzung von bias-korrigierten Bootstrapping-Konfidenzintervallen, die durch insgesamt 1000 Bootstrapping-Stichproben erfolgte (Efron 1979, Efron und Tibshirani 1986, MacKinnon 2008). Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde angenommen, wenn das bias-korrigierte 95%-Konfidenzintervall nicht den Wert Null enthielt.

3. Ergebnisse

3.1. Argininzusatz

Abbildung 5 zeigt den Verlauf der bei 405 nm photometrisch gemessenen Trübung, die bei Ablauf des Gerinnungsvorganges durch die Bildung von Fibrin entsteht, in Abhängigkeit von der Zeit (die bis zur 21. Minute, in der das Arginin zugegeben wird, der Gerinnungsreaktionszeit entspricht). Diese Trübung ist ein möglicher Störfaktor, da es zur Durchführung des INCA erforderlich ist, mittels der gelben Farbe des freien pNA, das in der Indikatorreaktion aus dem chromogenen Substrat entsteht, die Thrombinaktivität nachzuweisen. Durch supra-molare Argininkonzentrationen kann die fibrinbedingte Trübung beseitigt werden, was eine spezifische photometrische Bestimmung des freien pNA bei 405 nm erst ermöglicht. Das Ziel dieser Messung war es zu ermitteln, welche Argininkonzentration hierfür erforderlich ist und wie lange das entstandene Fibrin mit Arginin bei Raumtemperatur inkubiert werden muss, um eine Verfälschung der photometrischen Auslesung der Indikatorreaktion auszuschließen.

Um eine Aussage über den Trübungsgrad im Verlauf der GRZ und nach Zusatz von unterschiedlichen Argininkonzentrationen machen zu können, wurde eine Mikrotiterplatte mit flachem Boden (F-wells) mit 50 µl Pool aus Plasmen mit jeweils in der Norm liegenden Werten von aPTT und Quick (d. h. ein Pool aus Rest-Plasmen der Gruppe „nicht antikoaguliert“) je Well bestückt und nach Zugabe des Gerinnungsaktivators entgegen der sonst üblichen Vorgehensweise bei Raumtemperatur (23 °C) inkubiert. Der zeitliche Trübungsverlauf wurde photometrisch beobachtet. Nach 21 Minuten GRZ wurden 50–200 µl Arginin der Konzentration 2.5 mol/l zugegeben, was nicht nur die Gerinnungsreaktion stoppt, sondern auch das entstandene (noch nicht quervernetzte) Fibrin auflöst und so die Trübung beseitigt. Es wurde kein chromogenes Substrat zugefügt (d. h. die Indikatorreaktion des INCA wurde bei dieser Messung nicht gestartet).

Wie die Grafik veranschaulicht, verringert sich die entstandene Trübung direkt nach der Zugabe von Arginin deutlich, bis sie nach weiteren 21 Minuten kaum noch vorhanden ist. Der Absorptionsanstieg liegt nach 42 Minuten Reaktionszeit nur noch geringfügig

über dem Ausgangswert. Hierfür sind 50 μl 2.5 mol/l Arginin praktisch ebenso effektiv wie 200 μl 2.5 mol/l Arginin.

Eine wichtige Voraussetzung zur Durchführung des INCA ist die Tatsache, dass Argininzusatz in der Lage ist, die Gerinnungsreaktion zu stoppen und somit unter anderem die Bildung von Fibrin zu verhindern. Um dies zu prüfen, wurden ein Pool aus Plasmen mit jeweils in der Norm liegenden Werten von aPTT und Quick und Ci-Trol®-1-Plasma (lyophilisiertes Plasma) je eine Minute nach Zusatz des Gerinnungsaktivators mit unterschiedlich konzentriertem Arginin oder mit Wasser versetzt und photometrisch ausgewertet. Nur der Plasmapool, dem Wasser anstelle von Arginin zugefügt wurde, zeigt einen deutlichen Absorptionsanstieg im Verlauf der Reaktionszeit (Abb. 6): Nach fünf Minuten übersteigt die Absorption mit 474 mA die Werte der übrigen Proben. Die Trübung steigt im Verlauf der 30 Minuten stetig an bis zu 920 mA, während die vier mit Arginin versetzten Proben jeweils über die gesamte Reaktionszeit praktisch keine Veränderung ihrer Ausgangsabsorption aufweisen.

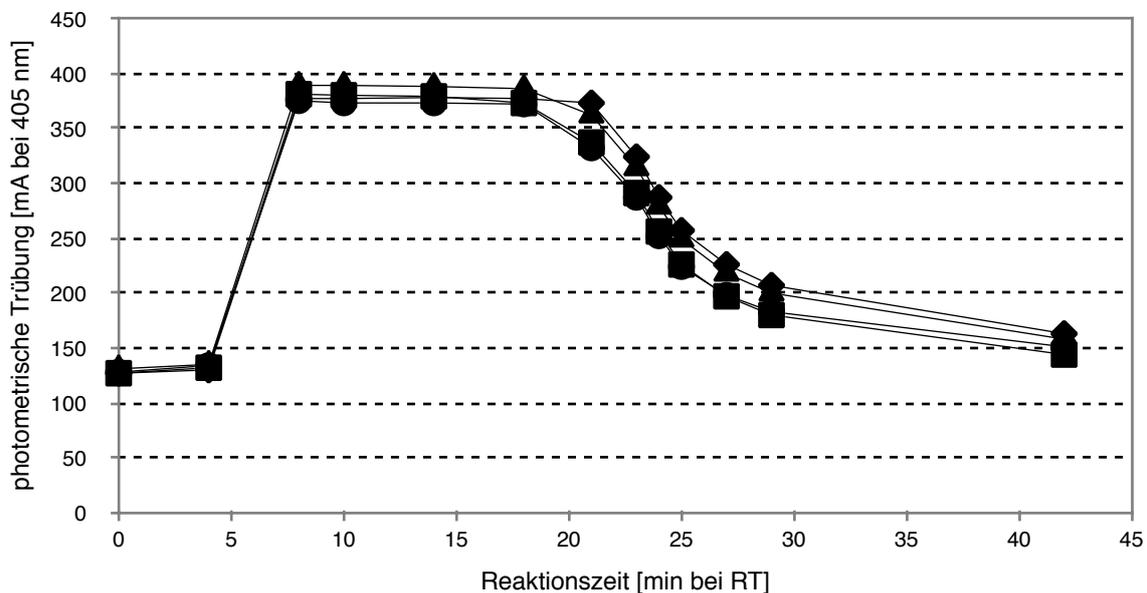


Abb. 5: Trübungsabnahme durch Argininzusatz

Die Gerinnungsreaktion erfolgte bei 23 °C (RT) anstelle der sonst üblichen 37 °C. Die photometrische Messung bei 405 nm erfolgte nach 0–42 Minuten. Nach 21 Minuten GRZ wurden 50 μl (●), 100 μl (■), 150 μl (▲), bzw. 200 μl (◆) 2.5 mol/l Arginin mit einem pH-Wert von 8.6 zugefügt.

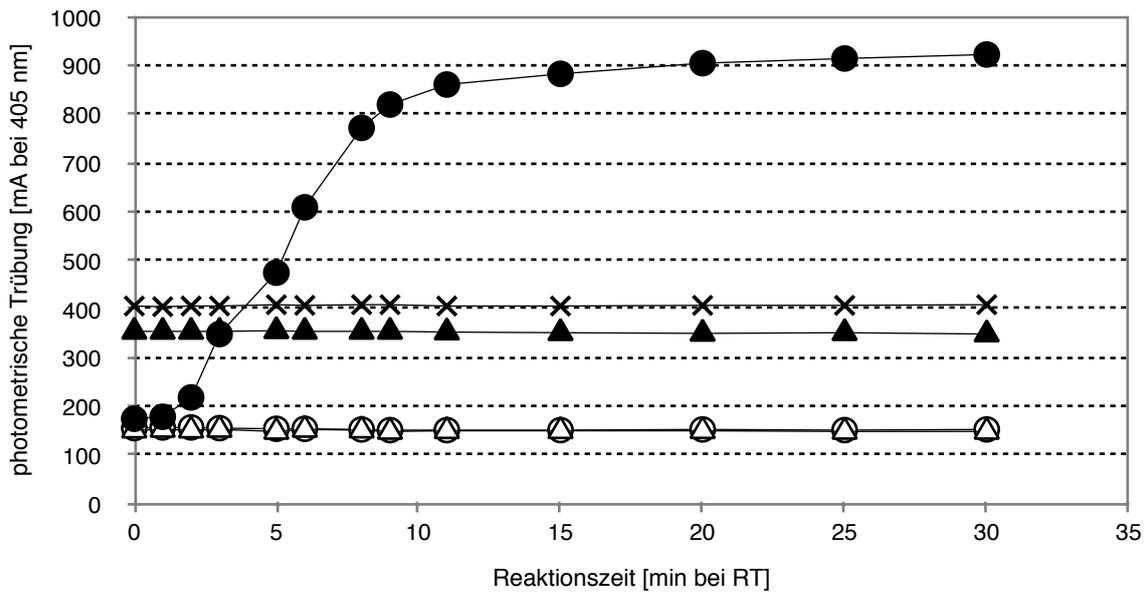


Abb. 6: Gerinnungsinhibition durch Argininzusatz

Je 50 µl eines „nicht antikoaguliert“-Plasmapools bzw. Ci-Trol®-1-Plasma wurden mit 20 µl Pathromtin® SL, enthaltend 63 mM CaCl₂ bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Minute bei RT wurden 100 µl 0, 0.75 oder 1.5 mol/l Arginin, pH 8.7, zugefügt und die Trübung bei 405 nm wurde nach 30 Minuten photometrisch bestimmt; Pool + H₂O (●), Pool + 0.75 mol/l Arginin (Δ), Pool + 1.5 mol/l Arginin (○), Ci-Trol®-1 + 0.75 mol/l Arginin (x), Ci-Trol®-1 + 1.5 mol/l Arginin (▲).

3.2. INCA-Kinetik bei ausgeglichener Gerinnungslage

Um den normalen Verlauf der INCA-Kinetik darzustellen, wurde bei 15 gesunden Spendern eine venöse Blutentnahme durchgeführt. Durch fehlerhafte Blutentnahme kam es bei drei Proben zu einer Hämolyse. Das aus den 15 Blutproben gewonnene Plasma wurde nach einer dreistündigen Lagerung bei Raumtemperatur mittels INCA analysiert. Dazu wurden je 50 µl Plasma in U-wells vorgelegt, sodann wurde die Gerinnungsreaktion durch Zugabe des Aktivators gestartet und die Thrombinaktivität in Abhängigkeit von der GRZ gemessen, wie in Abbildung 7 zu sehen ist. Hierbei zeigte sich, dass die drei grau hinterlegten hämolytischen Plasmaproben verglichen mit den übrigen Proben nach fünf Minuten GRZ etwa die zehnfache Menge an Thrombin erzeugen. Nach sechs Minuten GRZ hat die Thrombinaktivität aller nicht hämolytischen Proben ihr Maximum noch nicht erreicht, während die Thrombinaktivität bei einer der hämolytischen Proben bereits wieder abfällt. Innerhalb von sechs Minuten Gerinnungsreaktionszeit wird bei den Proben mit normaler Gerinnungslage und korrekter Blutentnahme nur der ansteigende Teil der Thrombingenerierungskurve erfasst.

Die Abbildungen 7 und 8 lassen erkennen, dass bei gesunden Spendern und korrekter Blutentnahme innerhalb der ersten drei Minuten GRZ (37 °C) praktisch kein zusätzliches Thrombin gebildet wird. Erst danach setzt die eigentliche Thrombin-generierung ein. Lediglich eine der hämolytischen Proben verhält sich anders und generiert bereits innerhalb der ersten drei Minuten GRZ geringe Mengen an Thrombin (Abb. 7). Die basale Thrombinaktivität der Proben von n = 14 gesunden Spendern liegt hier bei etwa 0.01–0.025 IU/ml (Abb. 8).

Die Thrombinaktivität von Patientenplasmen, die eine in der Norm liegende aPTT und INR aufweisen, liegt bei zwei Minuten GRZ bei allen Proben noch unter 0.1 IU/ml (Abb. 9). Nach fünf Minuten sind vier von fünf Normalplasmen auf eine Thrombin-aktivität von ≥ 1 IU/ml angestiegen. Der Pool aus den fünf Normalplasmen verhält sich ebenso wie die einzelnen Plasmen. Die Thrombinaktivität erreicht nach etwa acht Minuten einen Höhepunkt von ca. 3–6 IU/ml und sinkt anschließend wieder ab, bis sie nach 20 Minuten Gerinnungsreaktionszeit bei allen Proben wieder unter 1 IU/ml liegt.

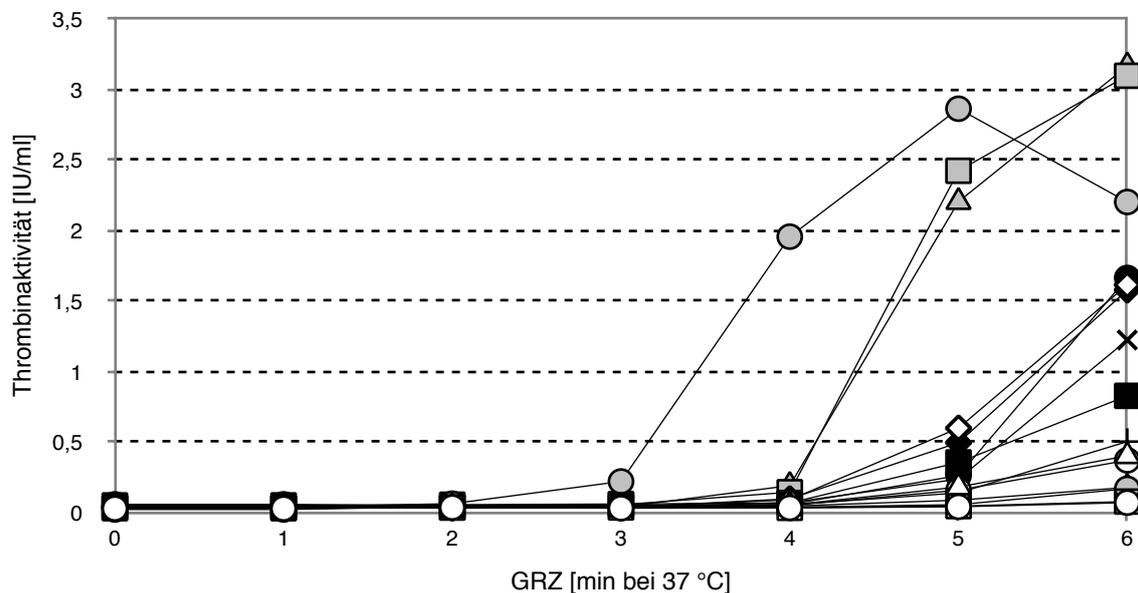


Abb. 7: Plasma von gesunden Spendern in der INCA-Kinetik

Plasma von n = 15 gesunden Spendern wurde im INCA analysiert (50 µl, U-wells). Jeder Spender wurde mit einem individuellen Symbol dargestellt. Die drei grauen Symbole stehen für durch fehlerhafte Blutentnahme hämolytische Proben.

Thrombinaktivität basierter Test zur intrinsischen Gerinnung

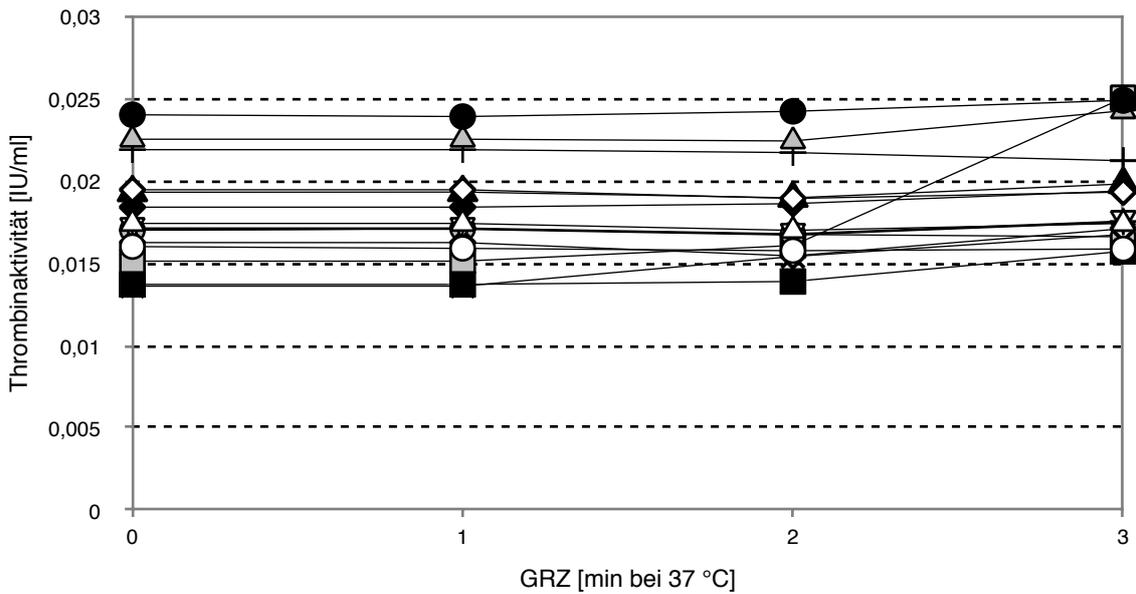


Abb. 8: Plasma von gesunden Spendern in der INCA-Frühphase

Vergrößerte Darstellung der Frühphase. Es handelt sich um 14 der 15 Proben, die in Abbildung 7 zu sehen sind. Dargestellt sind die nicht hämolytischen Proben sowie zwei der hämolytischen Proben, die sich in der Frühphase noch ähnlich wie die nicht hämolytischen verhalten. Die dritte hämolytische Probe (graues O) wurde der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt, da sie bereits in der Frühphase bei 3 min GRZ ca. 0.24 IU/ml Thrombin generierte (vergleiche Abb. 7).

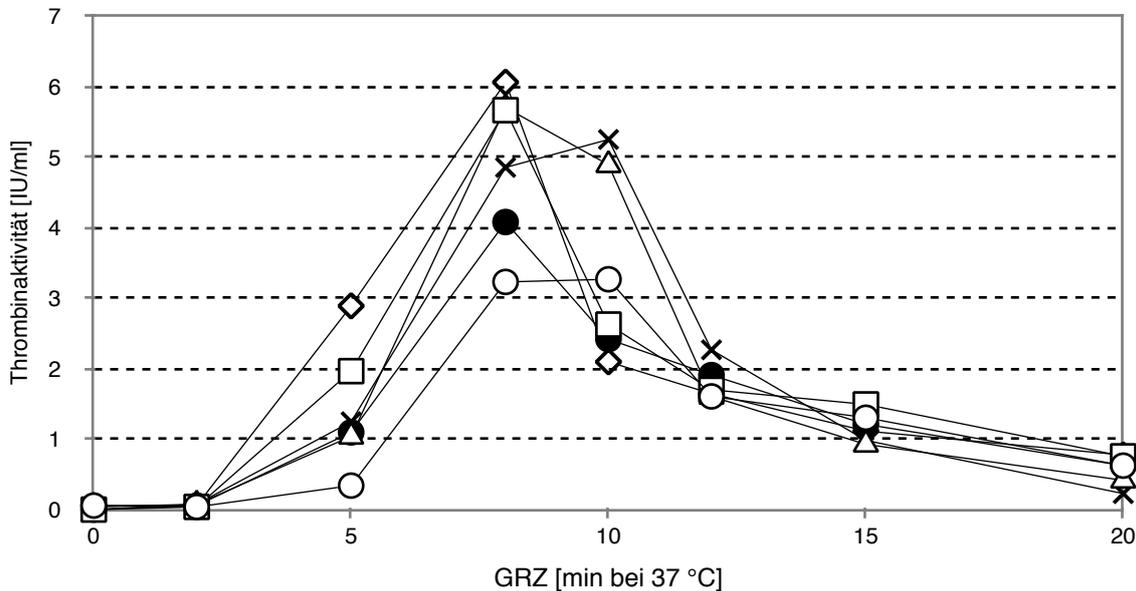


Abb. 9: Patientenplasmen der Gruppe „nicht antikoaguliert“ einzeln und als Pool

Fünf Plasmen von Patienten mit in der Norm liegenden Werten von aPTT, Quick und INR (individuelle Symbole) und ein Pool aus diesen fünf (●) wurden im INCA getestet (50 µl Proben in U-wells).

3.3. INCA bei Antikoagulation

Abbildung 10 stellt den Verlauf des INCA von Patientenplasma aus der Gruppe „nicht antikoaguliert“ dem Verlauf des INCA von Plasmen der Gruppen „verlängerte aPTT“ und „erhöhte INR“ sowie lyophilisiertem Ci-Trol®-1-Plasma der Firma DadeBehring gegenüber. Das Plasma der Patienten mit normalem Gerinnungsstatus in den etablierten Tests erzeugt nach vier Minuten GRZ eine Thrombinaktivität von ca. 1 IU/ml und nach fünf Minuten GRZ bis zu 6 IU/ml. Proben von Patienten mit Antikoagulation bilden deutlich weniger Thrombin als die Plasmen der Nicht-Antikoagulierten bzw. das Ci-Trol®-1-Plasma. Drei von vier „verlängerte aPTT“-Plasmen liegen nach fünf Minuten GRZ noch bei ca. 0.5 IU/ml Thrombinaktivität. Ähnlich verhält sich ein Plasma mit einer INR von 2.5, dass zu keinem Zeitpunkt eine Thrombinaktivität von > 0.5 IU/ml aufweist. Die Thrombinaktivität des Ci-Trol®-1-Plasmas steigt im Vergleich zu den Plasmen nicht antikoagulierter Patienten langsamer an, erreicht mit 7 IU/ml nach sieben Minuten GRZ aber einen ähnlich hohen Wert wie jene, während die Plasmen von antikoagulierten Patienten allesamt deutlich geringere Anstiege nach sieben Minuten GRZ aufweisen.

Der Vergleich von fünf Plasmen mit normalen Werten in Quick-Test, INR und aPTT mit sieben Patientenplasmen mit unterschiedlich stark erhöhter INR ist Abbildung 11 zu entnehmen. Die Plasmen mit erhöhter INR zeigen im Schnitt eine später einsetzende und deutlich schwächer ausfallende Thrombingenerierung, insbesondere wenn die Antikoagulation im therapeutischen Bereich von INR 2–3 liegt. Nach fünf Minuten GRZ weisen vier von fünf Plasmen der Gruppe „nicht antikoaguliert“ Thrombinaktivitäten zwischen 1.5 und 2.6 IU/ml auf, während keines der Plasmen von cumarinisierten Patienten zu diesem Zeitpunkt eine Thrombinaktivität von mehr als 0.6 IU/ml erzeugt.

Abbildung 12 verdeutlicht das Verhalten von verschiedenen Plasmapools im INCA. Hier ist zu beachten, dass einer der beiden Plasmapools aus der Gruppe „nicht antikoaguliert“ vor der Testung tiefgefroren und wieder aufgetaut wurde. Dieser Pool zeigt zwischen vier und fünf Minuten GRZ einen schnelleren Anstieg und erreicht bei acht Minuten GRZ mit 3.6 IU/ml ein höheres Maximum an Thrombinaktivität als der ungefrorene Plasmapool aus der Gruppe „nicht antikoaguliert“, dessen Maximum bei

2.2 IU/ml liegt. Die ungefrorenen Einzelplasmen aus der Gruppe „nicht antikoaguliert“ weisen in der Anfangsphase die schnellste Thrombingenerierung auf und erreichen bei INCA-5 ein Maximum von 2.9 IU/ml. Ein Pool aus $n = 7$ ungefrorenen Plasmen von heparinisierten Patienten bleibt weit hinter den Plasmen der nicht antikoagulierten Patienten zurück und erreicht im gesamten Verlauf keine Thrombinaktivität von ≥ 0.25 IU/ml. Ähnlich verhält sich hier das Plasma zweier cumarinisierter Patienten, das ein Maximum von 0.35 IU/ml Thrombinaktivität generiert.

In Abbildung 13 zeigen die ungefrorenen Plasmen nicht antikoagulierter Patienten ein uneinheitliches Bild. Zwei dieser Proben erzeugen in den ersten fünf Minuten mehr, sechs andere Proben jedoch weniger Thrombinaktivität als der bei -80 °C tiefgefrorene und wieder aufgetaute Pool aus Plasmen der Gruppe „nicht antikoaguliert“, der nach fünf Minuten Gerinnungsreaktionszeit bei 1.55 IU/ml Thrombinaktivität liegt und nach sieben Minuten GRZ 8.8 IU/ml Thrombinaktivität generiert. Das Plasma eines Patienten mit auf 46 Sekunden verlängerter aPTT steigt erst nach sieben Minuten GRZ auf 1.7 IU/ml Thrombinaktivität an.

Eine vergrößerte Darstellung der frühen Phase der Gerinnungsreaktion ist in Abbildung 14 zu sehen. In den ersten drei Minuten GRZ wird kein zusätzliches Thrombin gebildet. Ausgehend von der basalen Thrombinaktivität verringert sich in diesem Zeitabschnitt sogar bei einigen Proben die Aktivität noch leicht. Dies ist möglicherweise auf die Auflösung des Thrombin- α_2 -Makroglobulin-Komplexes zurückzuführen, so dass Thrombin von Antithrombin inaktiviert werden kann. Der tiefgefrorene und aufgetaute Pool aus Plasmen der Gruppe „nicht antikoaguliert“ zeigt eine geringfügig höhere basale Thrombinaktivität von etwa 0.04 IU/ml im Vergleich zu den frischen Einzelproben mit Werten von etwa 0.02–0.03 IU/ml.

Abbildung 15 beleuchtet die späte Phase der Gerinnungsreaktion mit Messungen nach 20 bzw. 30 Minuten GRZ. Dieser Test wurde mit geringerem Volumen durchgeführt, nämlich 20 μ l Plasma und dementsprechender Reduktion aller anderen Reagenzien, d. h. 2 μ l INCA-Aktivator, 40 μ l 2.5 mol/l Arginin pH 8.6, 20 μ l chromogenes Substrat (0.77 mmol/l in 2 mol/l Arginin). Es wurde eine Mikrotiterplatte mit rundem Boden (U-wells) benutzt. Hier wurden geringere Thrombinaktivitäten gemessen als in der

50- μ l-Testversion. Der Pool aus Plasmen der Gruppe „nicht antikoaguliert“ generiert nach zehn min GRZ ein Maximum von ca. 4 IU/ml Thrombinaktivität, das Plasma eines nicht antikoagulierten Patienten 1 IU/ml, die Mehrzahl der Plasmen von antikoagulierten Patienten jedoch weniger als 0.1 IU/ml. Die von den Plasmen der Patienten mit Antikoagulation generierte Thrombinaktivität bleibt somit hinter der Aktivität des ungefrorenen Pools aus Plasmen der Gruppe „nicht antikoaguliert“ zurück.

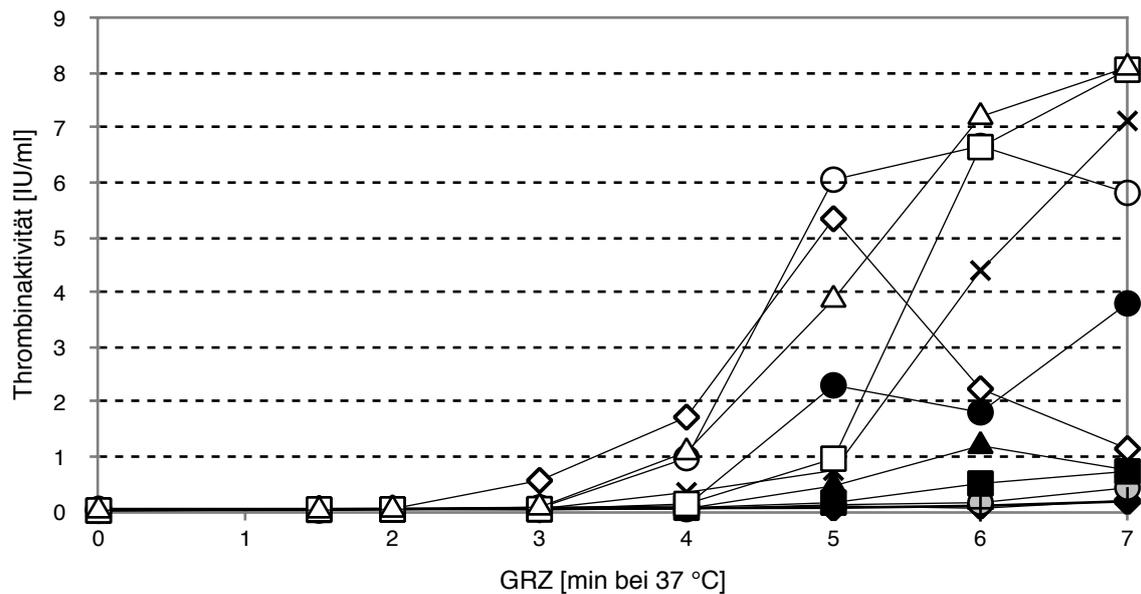


Abb. 10: Plasmen von Nicht-Antikoagulierten verglichen mit Plasmen von Antikoagulierten
 Der INCA wurde mit je 50- μ l-Proben von n = 4 Plasmen von nicht antikoagulierten Patienten (weiße Symbole), Ci-Trol®-1-Plasma (x), Plasma von vier heparinisierten Patienten mit einer aPTT von 54–72 s (●, ▲, ■, ◆), Plasma eines cumarinisierten Patienten mit einer INR von 2.5 (graues O) und dem Plasma eines Patienten mit Fibrinogen von 7.4 g/l (+) in U-wells ausgeführt.

Thrombinaktivität basierter Test zur intrinsischen Gerinnung

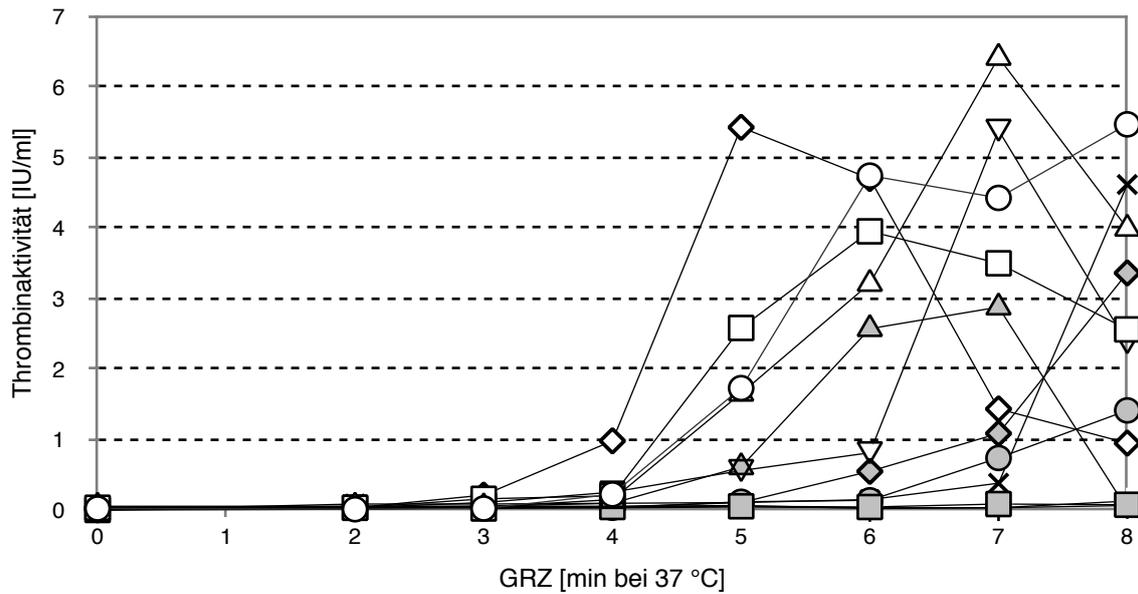


Abb. 11: Vergleich von Plasmen der Gruppe „nicht antikoaguliert“ mit „erhöhte INR“-Plasmen
 N = 5 Plasmen von Patienten ohne Antikoagulation (weiße Symbole) und n = 7 „erhöhte INR“-Plasmen mit INR = 3.05 (graues □), INR = 1.3 (graues O), INR = 1.39 (graues ◇), INR = 1.65 (graues Δ), INR = 2.56 (x), INR = 3.13 (+) und INR = 2.76 (+ grau hinterlegt) wurden mittels INCA getestet (50 µl Proben in U-wells).

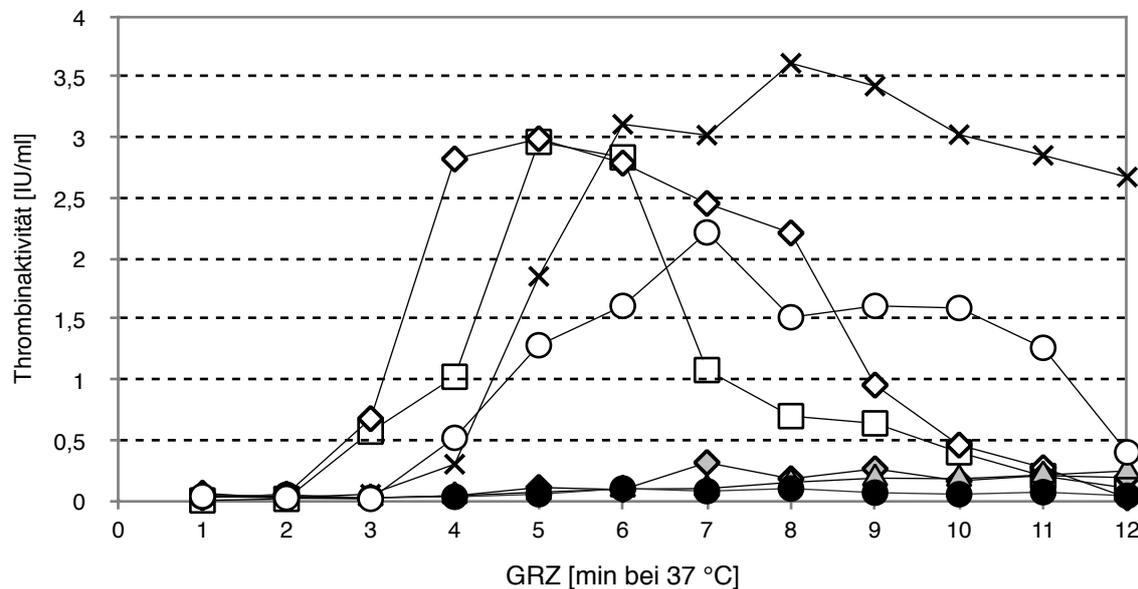


Abb. 12: Nicht antikoagulierte und antikoagulierte Plasmen gepoolt und als Einzelproben
 Ein ungefrorener Pool aus n = 10 Plasmen von nicht antikoagulierten Patienten (O), ein tiefgefrorener und wieder aufgetauter Pool aus n = 18 „nicht antikoaguliert“-Plasmen (x), ein ungefrorener Pool aus dem Plasma von n = 7 heparinisierten Patienten (●), n = 2 einzelne Plasmen cumarinisierter Patienten (graues Δ, graue ◇) und n = 2 Plasmen von Patienten ohne Antikoagulation (◇, □) wurden im INCA analysiert (50 µl Proben, U-wells).

Thrombinaktivität basierter Test zur intrinsischen Gerinnung

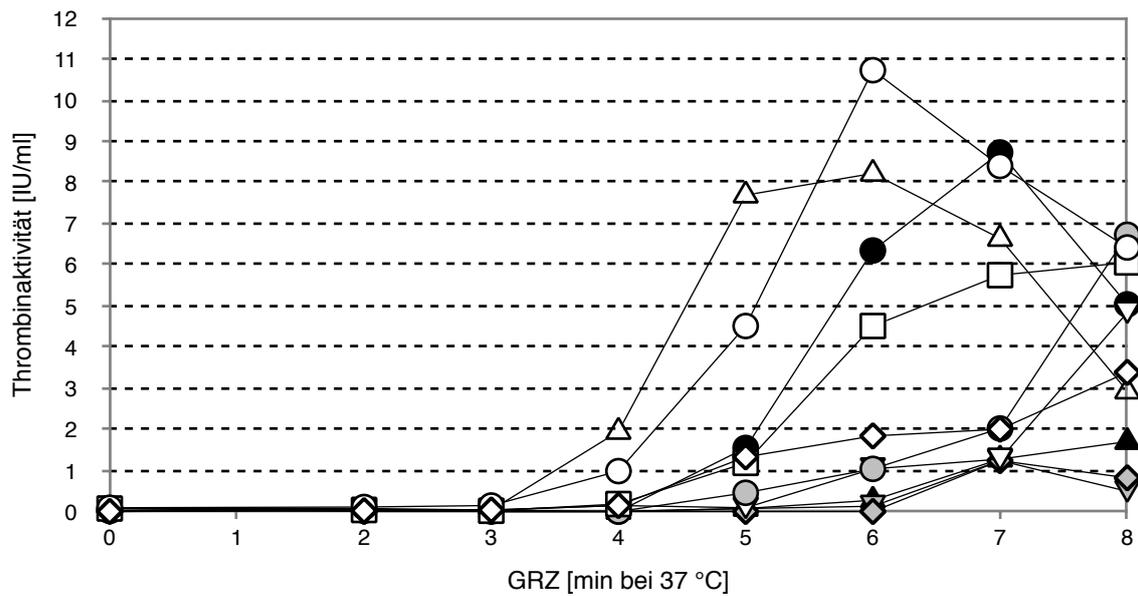


Abb. 13: Kinetik verschiedener Patientenplasmen im INCA

N = 8 Plasmen von Patienten ohne Antikoagulation (individuelle Symbole weiß oder grau), ein tiefgefrorener und wieder aufgetauter „nicht antikoaguliert“-Plasmapool (●) und ein Plasma mit verlängerter aPTT = 46 s (▲) wurden im INCA getestet (50 µl Proben, U-wells).

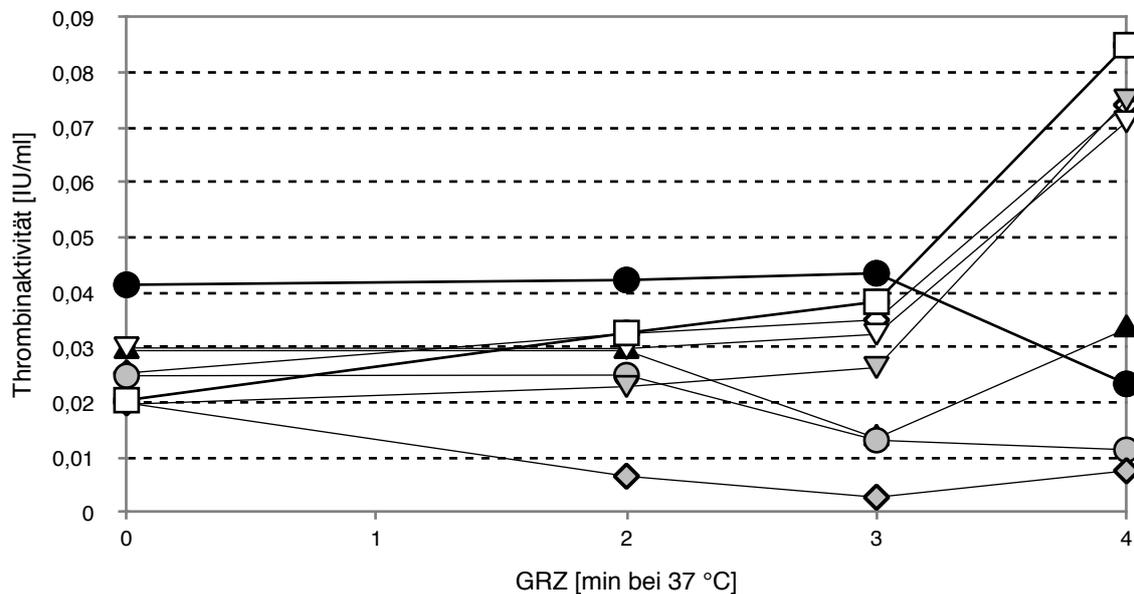


Abb. 14: Frühphase der Kinetik verschiedener Patientenplasmen im INCA

N = 6 Plasmen von Patienten ohne Antikoagulation (individuelle Symbole weiß und grau), ein Plasma mit aPTT = 46 s (▲) und ein tiefgefrorener und wieder aufgetauter „nicht antikoaguliert“-Plasmapool (●) wurden im INCA getestet (50 µl Proben in U-wells, die Proben entsprechen denen aus Abbildung 13). Es wurde nur die Frühphase bis vier Minuten GRZ dargestellt. Der Übersichtlichkeit halber wurden die zwei Plasmen von Patienten ohne Antikoagulation, die bei 4 min GRZ 1 bzw. 2 IU/ml Thrombinaktivität generieren, nicht dargestellt (vgl. Abb. 13).

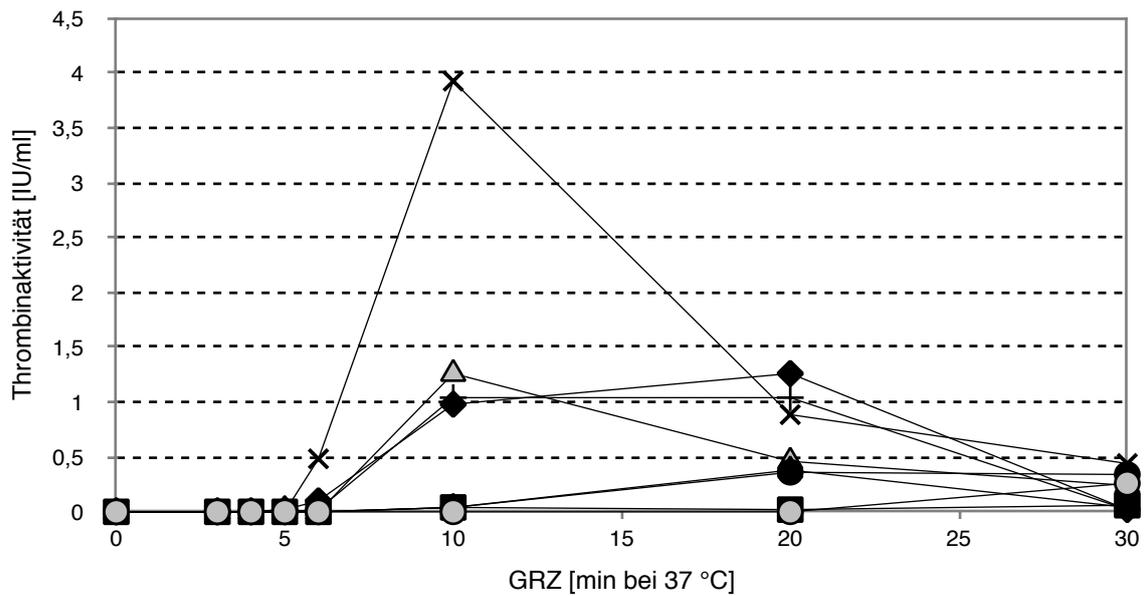


Abb. 15: Patientenplasmen in der 20- μ l-Testversion (mit Spätphase)

Ein „nicht antikoaguliert“-Plasmapool (x), n = 5 „erhöhte INR“-Plasmen mit INR = 2.12 (grauer O), INR = 4.22 (■), INR = 2.03 (◊), INR = 2.56 (▲), INR = 2.36 (●), INR = 1.88 und aPTT = 42 s und LMW-Heparin (graues Δ) und ein Plasma eines nicht antikoagulierten Patienten (+) wurden mittels INCA getestet (20 μ l Proben in U-wells).

3.4. Der Einfluss von Thrombozyten auf den INCA

Im Folgenden wurden Thrombinaktivitäten im INCA mit plättchenarmem Plasma (PAP) und plättchenreichem Plasma (PRP) bestimmt (Abb. 16 und 17), um eine Aussage darüber machen zu können, wie die Thrombozyten den INCA beeinflussen. Es zeigte sich, dass der Gebrauch von plättchenreichem Plasma zu einem schnelleren Anstieg der Thrombinaktivität führt, was insbesondere am INCA-4 Wert (INCA-Wert nach vier Minuten Gerinnungsreaktionszeit) zu sehen ist: Während bei den PAP-Proben die Mehrzahl einen INCA-4 Wert von < 2 IU/ml aufweist, zeigen die PRP-Proben, mit Ausnahme zweier Plasmen von antikoagulierten Patienten, nach vier Minuten Gerinnungsreaktionszeit Thrombinaktivitäten von etwa 3–11 IU/ml. Plättchen erhöhen somit den INCA-4-Wert. Die Messungen erfolgten in der 20- μ l-Testversion.

Thrombinaktivität basierter Test zur intrinsischen Gerinnung

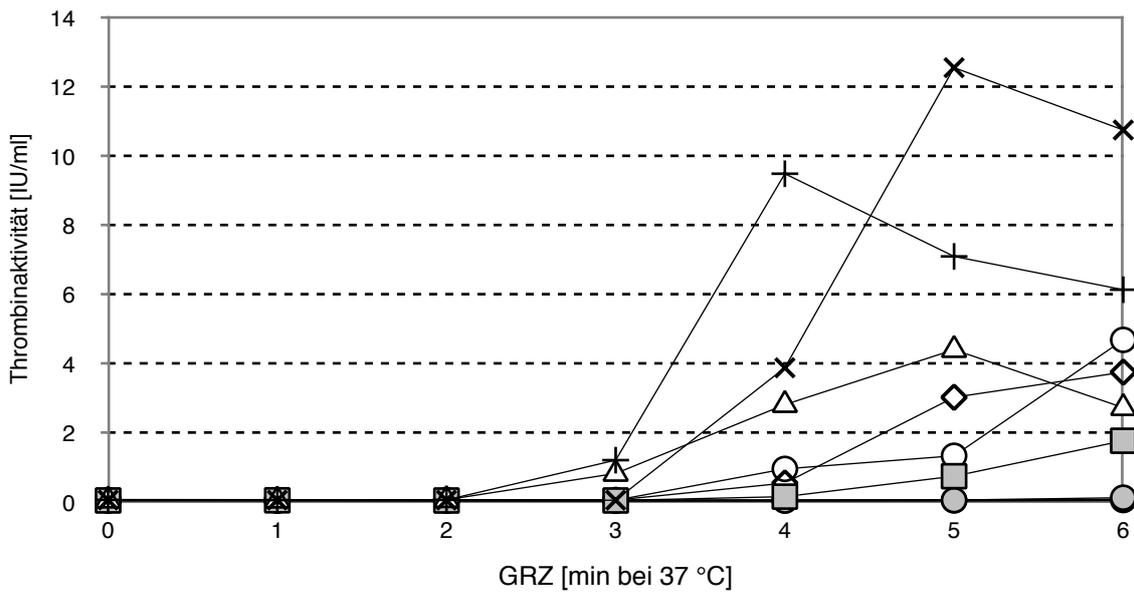


Abb. 16: Einfluss von Plättchen auf den INCA, Messung mit PAP

N = 3 „nicht antikoaguliert“-Plasmen (weiße Symbole), eine Probe eines Nicht-Antikoagulierten mit ALT = 56 U/l (+), n = 2 „verlängerte aPTT“-Proben: aPTT = 39 s (graues ◻), aPTT = 50 s (graues ◐), eine Probe mit INR = 2.2 (●) und ein tiefgefrorener und wieder aufgetauter „nicht antikoaguliert“-Plasmapool (x) wurden zu je 20 µl in U-wells mit 2 µl INCA-Aktivator inkubiert. Nach der GRZ wurden 40 µl 2.5 mol/l Arginin, pH 8.6, zugefügt. Nach 20 Minuten bei RT wurde die basale Trübung bei 405 nm ausgelesen, 20 µl des chromogenen Substrats (0.77 mmol/l in 2 mol/l Arginin) wurden hinzugegeben und ΔA wurde bei 405 nm ermittelt.

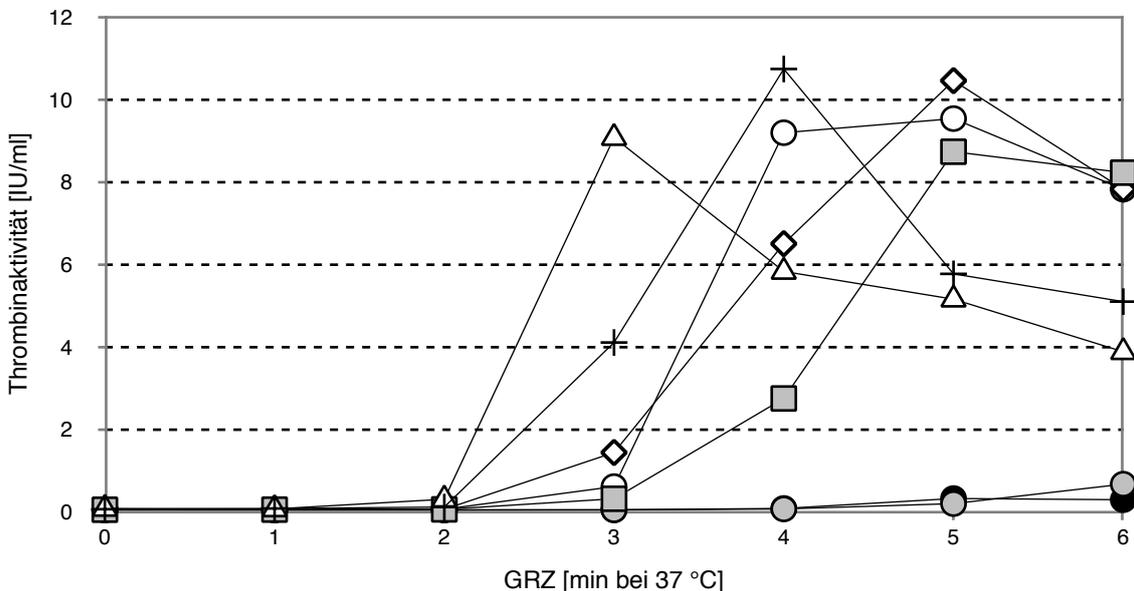


Abb. 17: Einfluss von Plättchen auf den INCA, Messung mit PRP

Von denselben Patienten, von denen auch die Plasmaproben der Abbildung 16 stammen, wurden nun plättchenreiche Plasmaproben analysiert.

3.5. Lyophilisierte Plasmen im INCA

Um das Verhalten käuflich zu erwerbender gefriergetrockneter Plasmen im INCA genauer zu beleuchten, wurden drei unterschiedliche lyophilisierte Plasmen der Firma DadeBehring und drei frische (Lagerungsdauer < 2 h bei RT) Plasmen gesunder Spender mittels INCA analysiert und miteinander verglichen. Die Messung erfolgte in einer Mikrotiterplatte mit flachem Boden (F-wells), und der 50- μ l-Testansatz wurde gewählt. Die lyophilisierten Plasmen zeigen – ähnlich dem tiefgefrorenen und wieder aufgetauten Plasmapool aus Abbildung 12 – einen deutlich schnelleren Anstieg der Thrombinaktivität und liegen nach fünf bis sieben Minuten GRZ höher als die zwei nicht hämolytischen Plasmen der Gesunden. Diese Messung zeigt, dass lyophilisierte Plasmen sich im INCA von den frischen nicht hämolytischen Plasmen von Gesunden unterscheiden. Die durch fehlerhafte Blutentnahme hämolytische Probe verhält sich ebenso deutlich überschießend wie die lyophilisierten Plasmen. Dieses Verhalten ist vergleichbar mit den hämolytischen Proben in Abbildung 7. Der verwendete Thrombinstandard (1 IU/ml Thrombin), der in der mit (x) bezeichneten Reihe die Plasmaprobe ersetzte, bringt wie erwartet konstante Werte, unabhängig von der Gerinnungsreaktionszeit.

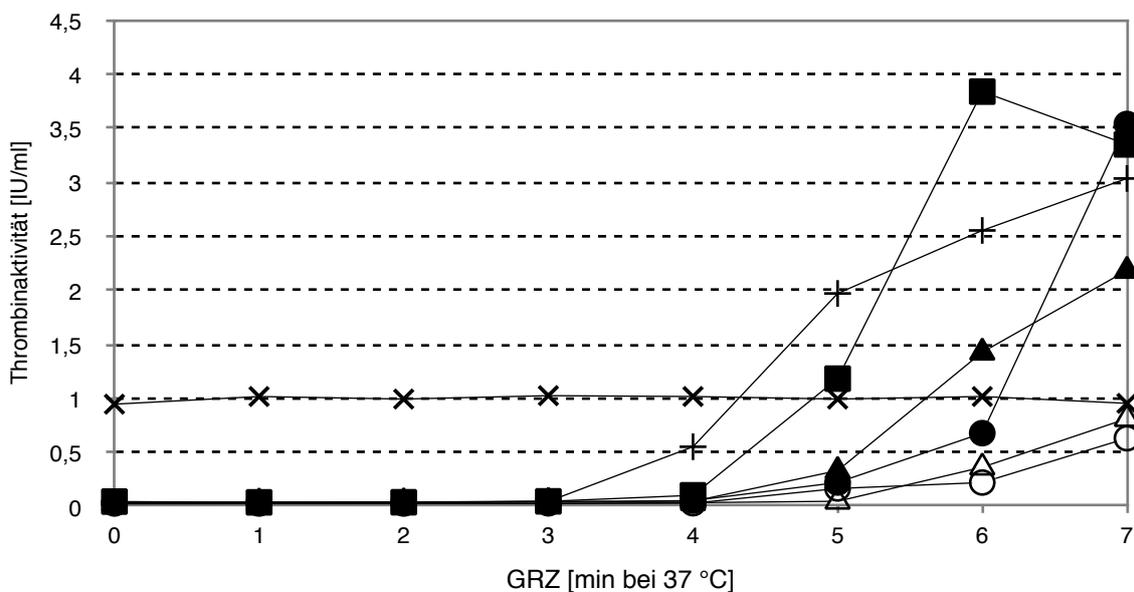


Abb. 18: Verhalten von lyophilisierten Plasmen im INCA

Standard human plasma (●), Control plasma N® (▲), Ci-Trol®-1-Plasma (■), zwei Plasmen von gesunden Spendern (O, Δ), ein hämolytisches Plasma eines Gesunden (+) und zum Vergleich 1 IU/ml Thrombin in 6.7% Humanalbumin (x) wurden zu je 50- μ l-Proben in F-wells mit 5 μ l INCA-Aktivator inkubiert und entsprechend dem INCA analysiert.

3.6. Probenlagerung bei Raumtemperatur

Anhand von vier Blut- bzw. Plasmaproben eines gesunden Spenders wurde die Auswirkung der Lagerungsdauer bei Raumtemperatur auf die Gerinnungsaktivierung im INCA untersucht. Da es im klinischen Alltag häufig nicht möglich ist, eine Blutprobe unmittelbar nach der Blutentnahme im Labor zu analysieren, kommt es mitunter zur Lagerung der Proben für einige Stunden. Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, verändert die Lagerung von Plasma oder Blut für acht Stunden bei Raumtemperatur den INCA-4-Wert (Thrombinaktivität nach 4 Minuten GRZ) eher moderat, während INCA-5 bei einer längeren Lagerungszeit (acht Stunden bei Raumtemperatur im Vergleich zu zwei Stunden bei RT) deutlich niedriger ausfällt. Dies gilt sowohl für die Lagerung von unzentrifugiertem Blut als auch für die Lagerung von zentrifugiertem Blut oder bereits abgeschöpftem Plasma. Der INCA-4-Wert aller vier Proben liegt zwischen 1 und 2 IU/ml Thrombinaktivität. Der INCA-5-Wert der drei für acht Stunden gelagerten Proben beträgt zwischen 4 und 5 IU/ml, während die nur für zwei Stunden gelagerte Probe in derselben Zeit eine Thrombinaktivität von 8.9 IU/ml generierte.

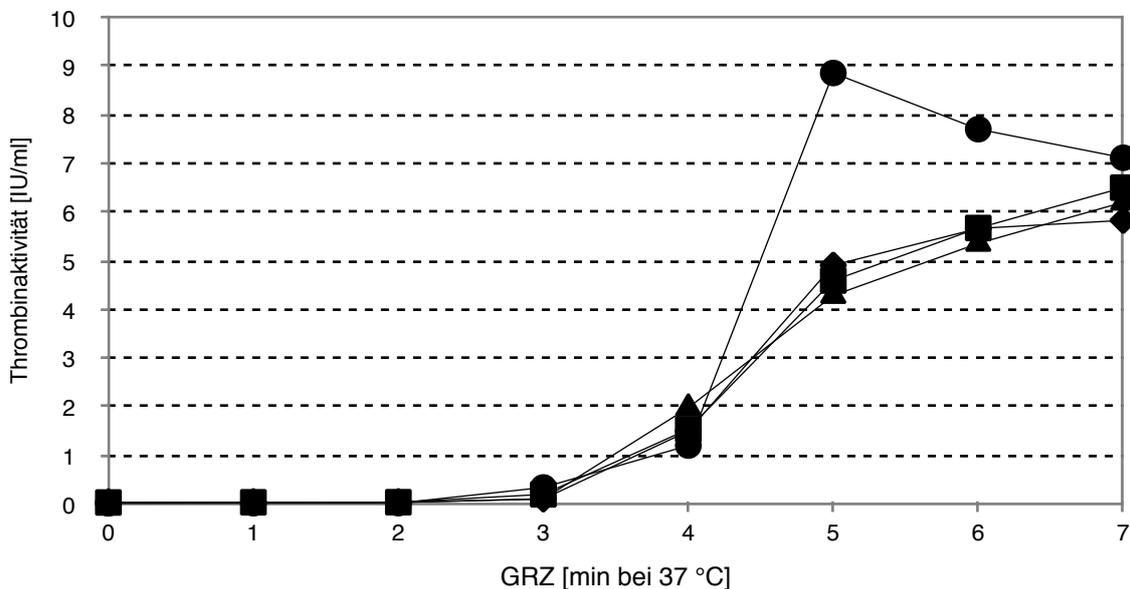


Abb. 19: Blut- bzw. Plasmalagerung bei Raumtemperatur

Zwei Stunden bei Raumtemperatur gelagertes Plasma (●), nach Trennung von den zentrifugierten Blutzellen acht Stunden bei RT gelagertes Plasma (▲), ohne Trennung von den zentrifugierten Blutzellen acht Stunden bei RT gelagertes Plasma (◆) und aus acht Stunden bei RT (unzentrifugiert) gelagertem Blut gewonnenes Plasma (■) wurden im INCA getestet (50 µl Proben in F-wells). Alle Proben stammen vom selben gesunden Spender.

3.7. Einfrieren und Auftauen von Plasma

Um den Effekt des Einfrierens und Auftauens von Plasma auf die Aktivierung der Hämostase gemessen im INCA darzustellen, wurden Plasmaproben von neun gesunden Personen einmal frisch (nach Lagerung für maximal zwei Stunden bei Raumtemperatur) und einmal nach Einfrieren (-20 °C) der gesamten bereits mit Plasma bestückten Mikrotiterplatte und anschließendem Auftauen bei Raumtemperatur untersucht. Eine Gegenüberstellung der Abbildungen 20 und 21 verdeutlicht, dass die Thrombin-generierung bei aufgetauten Proben stärker ausfällt, insbesondere gilt dies für INCA-4. Die nicht tiefgefrorenen Proben erzeugen nach vier Minuten Gerinnungsreaktionszeit maximal 1 IU/ml Thrombinaktivität, während die tiefgefrorenen und aufgetauten Proben nach vier Minuten GRZ bis zu 2.9 IU/ml Thrombinaktivität generieren.

Die Abbildungen 22 und 23 stellen das Einfrieren und Auftauen bei unterschiedlichen Temperaturen dar. Von zwei gesunden Spendern wurden Plasmaproben gewonnen. Nach sechsstündiger Lagerung bei Raumtemperatur wurden je 500 µl Plasma in 1-ml-fassende Eppendorf-Cups überführt, in denen sie tiefgefroren und daraufhin wieder aufgetaut wurden. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit den Proben bestückt. Es wurde ein schwächerer INCA-Aktivator (50 µl 2.75 mol/l CaCl₂ + 450 µl H₂O + 50 µl Pathromtin® SL) benutzt, so dass sich der Unterschied von aufgetautem Plasma und umgefrorenem Plasma besonders deutlich darstellt. In diesem Ansatz wies das aufgetaute Plasma im Vergleich zu den bei Raumtemperatur gelagerten Plasmen eine etwa 80-fach stärkere Thrombinaktivität nach fünf Minuten GRZ auf. Das Tieffrieren bei -20 °C bewirkte dabei eine etwas weniger starke intrinsische Gerinnungsaktivierung als das Tieffrieren bei -80 °C. Namentlich bildet das nicht eingefrorene Plasma des ersten Spenders aufgrund der schwachen Aktivierung erst nach acht Minuten eine Thrombinaktivität von 1.3 IU/ml, wohingegen alle drei eingefrorenen Plasmaproben desselben Spenders nach vier Minuten Gerinnungsreaktionszeit mindestens 4 IU/ml generieren, angeführt vom bei -80 °C tiefgefrorenen und bei Raumtemperatur aufgetauten Plasma mit 7.3 IU/ml Thrombinaktivität (Abb. 22). Die Proben des zweiten Spenders zeigen ein vergleichbares Bild: Das nicht eingefrorene Plasma weist noch nach acht Minuten GRZ eine Aktivität von < 0.5 IU/ml auf. Im Gegensatz dazu bilden die eingefrorenen Proben schon nach fünf Minuten Thrombin-

aktivitäten von > 1.5 IU/ml, angeführt von dem bei -80 °C tiefgefrorenen und bei 37 °C im Wasserbad aufgetauten Plasma (90 Sekunden bei 37 °C) mit 8 IU/ml (Abb. 23).

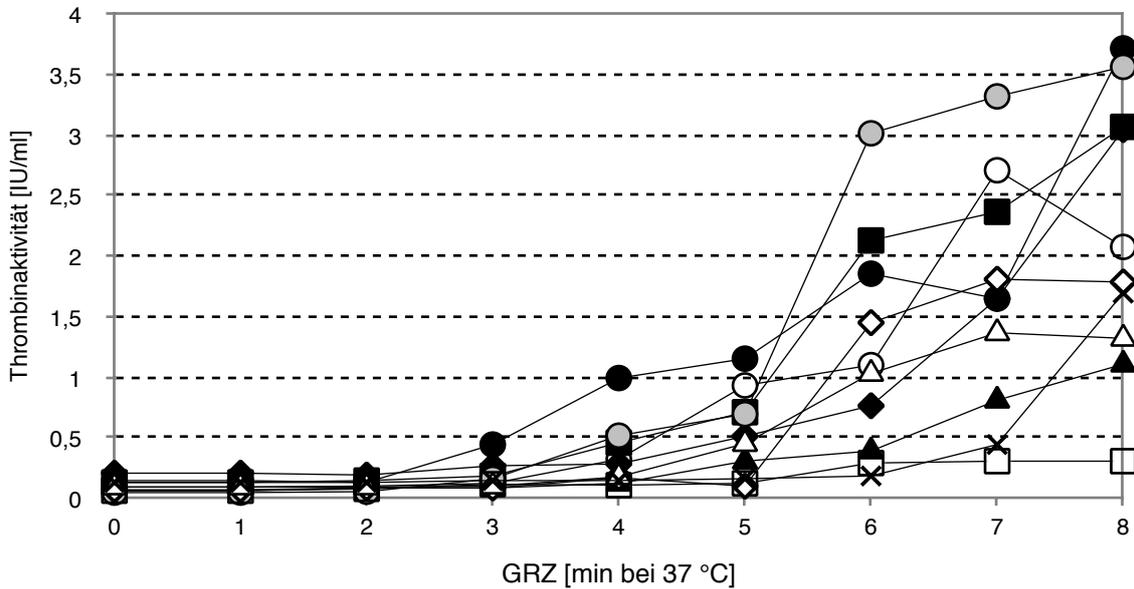


Abb. 20: Kinetik von ungefrorenen Plasmen in der 20- μ l-Testversion

Plasma von $n = 9$ gesunden Spendern (individuelle Symbole) und ein Pool aus diesen (O) wurden zu je $20 \mu\text{l}$ in U-wells mit $2 \mu\text{l}$ INCA-Aktivator (PSL, $250 \text{ mmol/l CaCl}_2$, zweimal tiefgefroren) inkubiert und entsprechend des INCA analysiert.

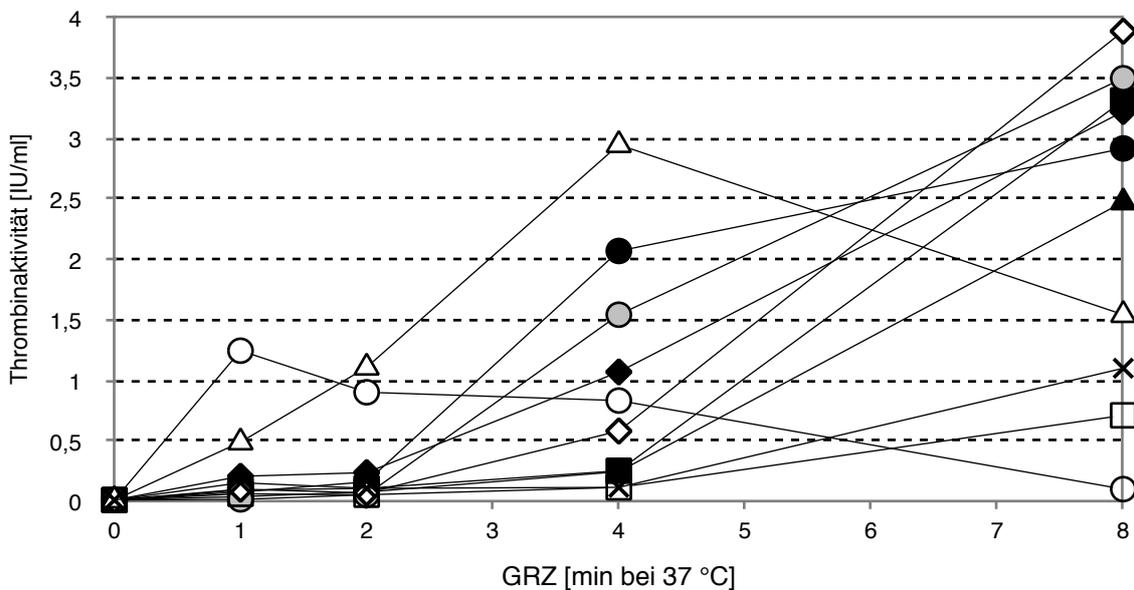


Abb. 21: Kinetik eingefrorener/aufgetauter Plasmen in der 20- μ l-Testversion

Diese Plasmen entsprechen denen von Abbildung 20, wurden jedoch bei -20 °C tiefgefroren (nach Bestückung der Mikrotiterplatte) und bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden sie auf die gleiche Weise behandelt wie die Proben in Abbildung 20.

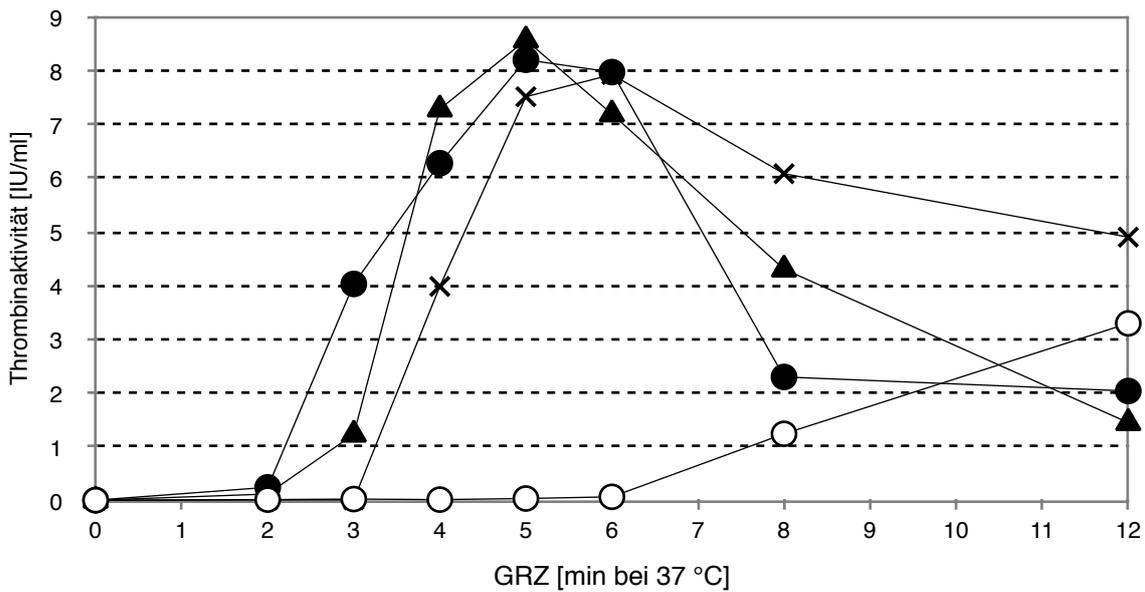


Abb. 22: Tieffrieren und Auftauen von Plasma bei verschiedenen Temperaturen (1)

Plasmaproben (nach sechs Stunden Lagerung bei RT) eines gesunden Spenders wurden zu je 500 µl in 1-ml-Eppendorf-Cups gefüllt und entweder bei -80 °C tiefgefroren sowie bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut (●) bzw. bei RT aufgetaut (▲) oder bei -20 °C eingefroren und bei RT aufgetaut (x) oder gar nicht tiefgefroren (O). Mit je 50 µl des Plasmas wurde eine F-well-Mikrotiterplatte befüllt. Die Gerinnungsreaktion wurde mit 5 µl eines frisch angesetzten schwachen INCA-Aktivators (50 µl 2.75 mol/l CaCl₂ + 450 µl H₂O + 50 µl Pathromtin® SL) gestartet und die Proben wurden daraufhin wie bei der üblichen Durchführung des INCA weiterbehandelt.

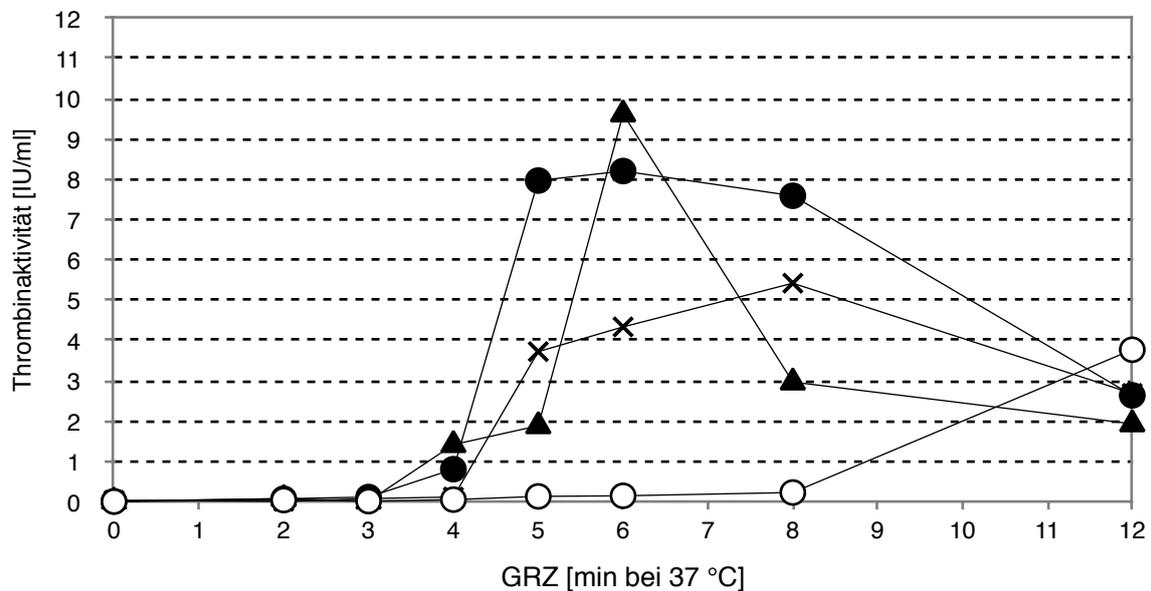


Abb. 23: Tieffrieren und Auftauen von Plasma bei verschiedenen Temperaturen (2)

Das Plasma eines zweiten gesunden Spenders wurde ebenfalls auf die bei Abbildung 22 beschriebene Weise behandelt und im INCA (ebenfalls mit schwachem Aktivator) untersucht. Das Plasma wurde bei -80 °C tiefgefroren und bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut (●) bzw. bei RT aufgetaut (▲) oder bei -20 °C tiefgefroren und bei RT aufgetaut (x) oder bei RT gelagert und nicht tiefgefroren (O).

3.8. INCA bei Raumtemperatur

Den Effekt, den ein Herabsetzen der Temperatur während der Gerinnungsreaktionszeit von den physiologischen 37 °C auf Raumtemperatur hat, demonstriert Abbildung 25. Vergleicht man Abbildung 24 mit Abbildung 25, so ist festzustellen, dass bis zum Beginn der Thrombingenerierung knapp doppelt so viel Zeit vergeht: Bei vier bis fünf Minuten GRZ 37 °C haben der aufgetaute Pool und zwei Plasmen der nicht antikoagulierten Patienten eine Thrombinaktivität von ≥ 1 IU/ml erreicht, während dies in Abbildung 25 erst bei acht Minuten GRZ 23 °C der Fall ist. Ähnlich verspätet treten die Maximalwerte der zwei nicht antikoagulierten Proben und des aufgetauten Pools bei 23 °C-Inkubation auf (5–6 Minuten GRZ bei 37 °C im Gegensatz zu 8–10 Minuten GRZ bei 23 °C). Man kann daher von einer Verlangsamung der Thrombingenerierung bei Raumtemperatur um das 1.7-fache im Vergleich zu 37 °C ausgehen. Sofern es die Umstände des jeweiligen Labors zulassen, sollte für die Gerinnungsreaktion bei Durchführung des INCA eine Temperatur von 37 °C gewählt werden, um die physiologischen Gegebenheiten so gut wie möglich abzubilden.

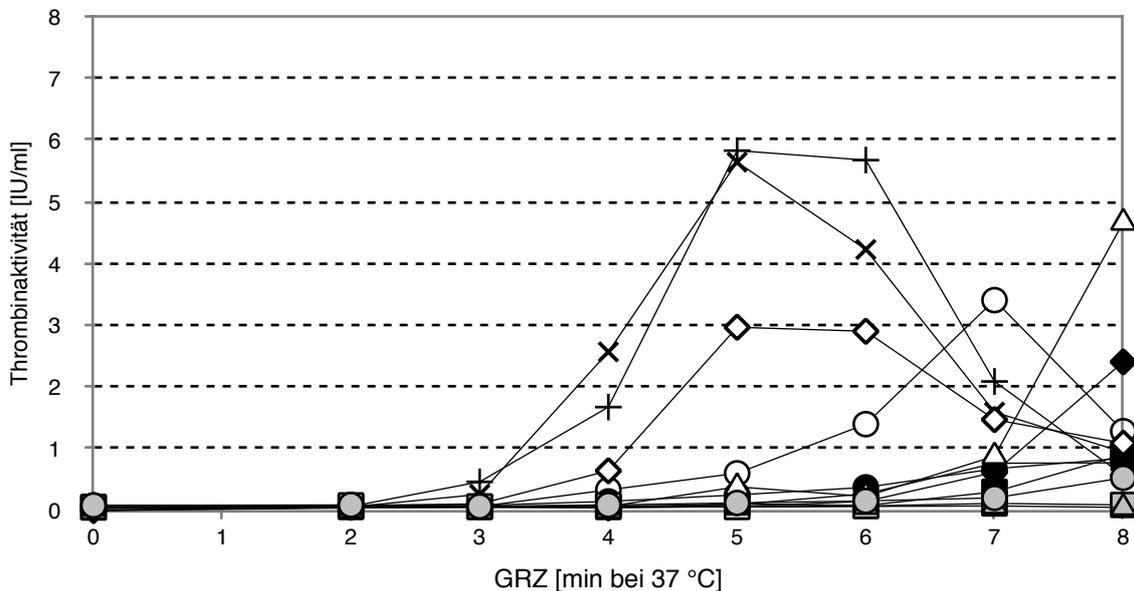


Abb. 24: Auswirkung der Testtemperatur im INCA (37 °C)

Ein frischer Pool aus Plasmen von nicht antikoagulierten Patienten (O), ein tiefgefrorener und aufgetauter Pool aus Plasmen von nicht antikoagulierten Patienten (x), n = 3 einzelne Plasmen aus der Gruppe „nicht antikoaguliert“ (Δ, ◇, +), n = 3 Plasmen von cumarinisierten Patienten mit INR = 2.33 (graues O, hämolytisch), INR = 2.65 (graues Δ), INR = 1.83 (graues □) und n = 4 Plasmen von heparinisierten Patienten mit aPTT = 59 s (●), aPTT = 61 s (■), aPTT = 45 s (◆), aPTT = 64 s (▲), wurden im INCA bei den üblichen 37 °C (Temperatur während der Gerinnungsreaktion) analysiert.

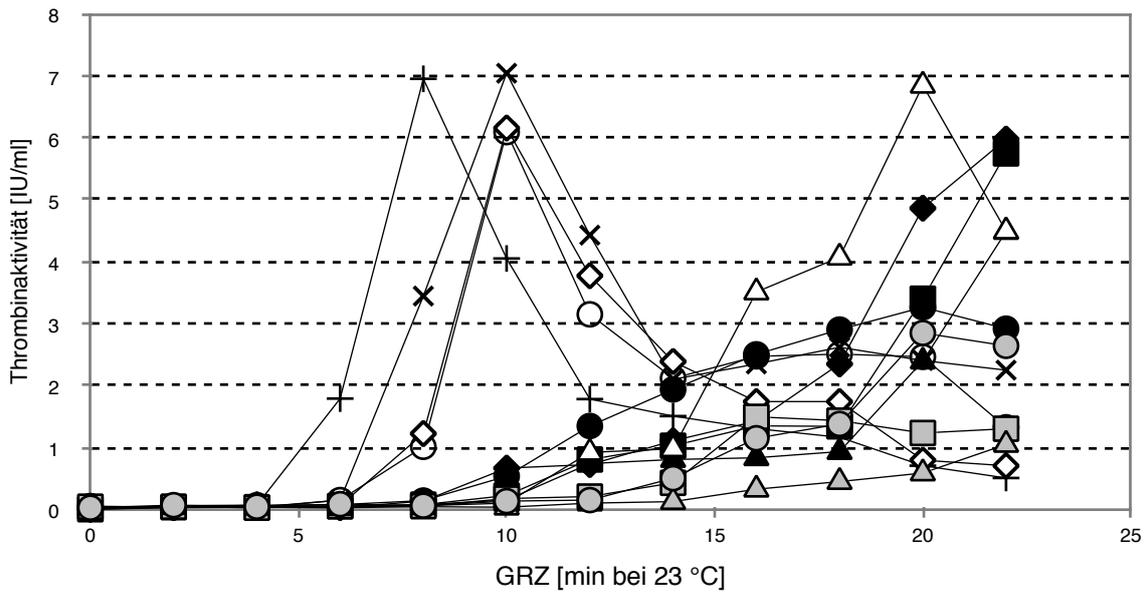


Abb. 25: Auswirkung der Testtemperatur im INCA (23 °C)

Die gleichen Plasmen wie in Abbildung 24 wurden bei 23 °C (Temperatur während der Gerinnungsreaktion) analysiert.

3.9. Auswirkung von Kühlung auf den INCA

Die hier gezeigten Grafiken dienen zur Darstellung der Auswirkungen, die die Kühlung von Plasmaproben auf den INCA hat. Die gleichen Proben wurden einmal nach siebenstündiger Lagerung bei Raumtemperatur und einmal nach sechsstündiger Lagerung bei Raumtemperatur und anschließender einstündiger Lagerung bei 4 °C in der 20- μ l-Testversion des INCA analysiert. Die Gerinnungsreaktion fand jeweils wie üblich bei 37 °C statt. Es wurden sieben Patientenplasmen ohne Antikoagulation und mit im Normbereich liegenden Werten in den herkömmlichen Gerinnungstesten (aPTT, Quick und INR) sowie ein lyophilisiertes Plasma untersucht. Dabei zeigt sich, dass der INCA-4-Wert der gekühlten Plasmen relativ stabil bleibt, während sie tendenziell etwas mehr Thrombinaktivität im INCA-5 erzeugen. Jedoch verhalten sich die Proben nicht einheitlich. Bei einigen gekühlten Proben fallen insbesondere INCA-5 und/oder INCA-6 niedriger aus als bei denjenigen, die bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden. Es erscheint ratsam, für die Probenlagerung ein festes Schema zu etablieren, um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit der INCA-Werte untereinander zu erzielen. In der klinischen Routine wird eine Lagerungstemperatur von 23 °C am einfachsten umzusetzen sein, da Blutproben schon vor Erreichen des Labors gewöhnlich bei Raumtemperatur lagern.

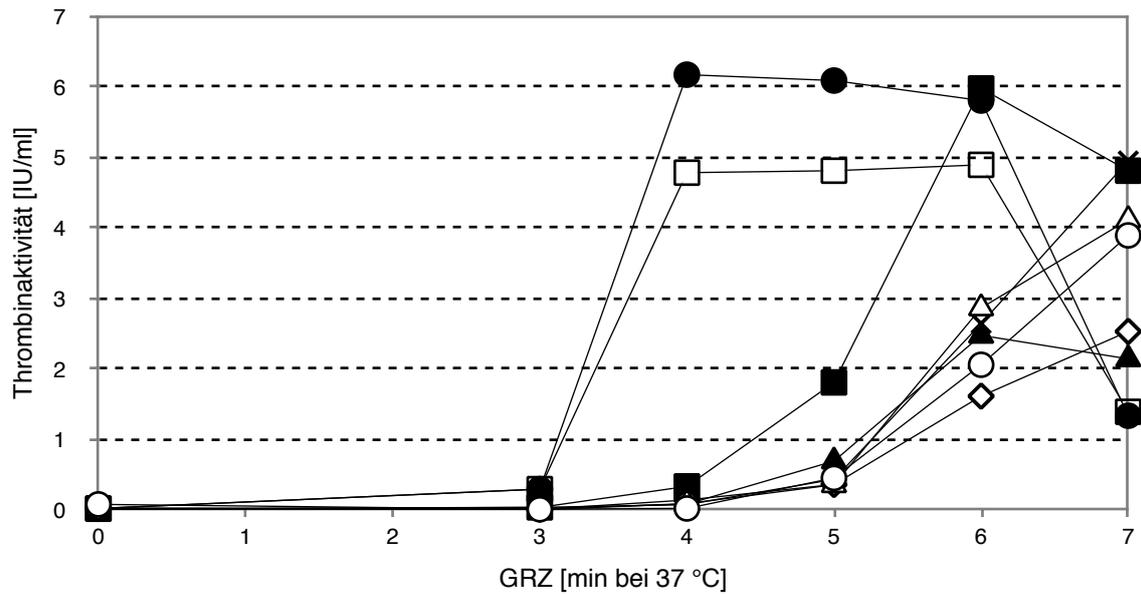


Abb. 26: Lagerung von Plasma bei Raumtemperatur für sieben Stunden

Der INCA wurde mit n = 7 Plasmen von nicht antikoagulierten Patienten (individuelle Symbole) und Standard human plasma (x), je 20 µl Proben in U-wells, durchgeführt, nachdem das Plasma für sieben Stunden bei Raumtemperatur gelagert worden war.

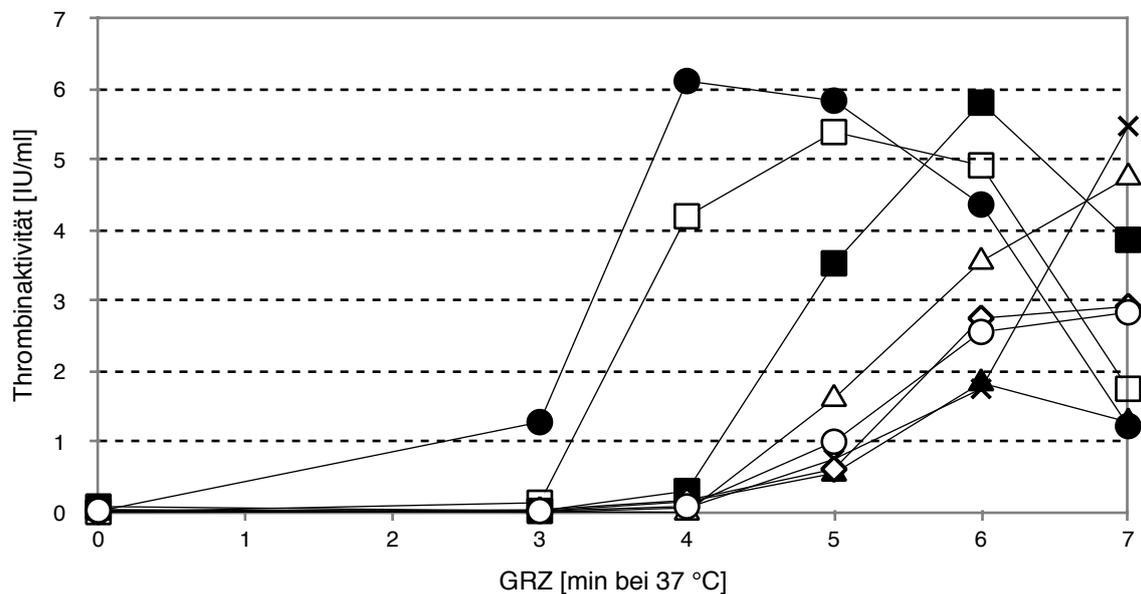


Abb. 27: 4 °C-Kühlung des Plasmas für eine Stunde

Durchführung des INCA mit den gleichen Plasmen wie in Abbildung 26 nach sechsständiger Lagerung bei Raumtemperatur und anschließender einstündiger Kühlung des Plasmas bei 4 °C.

3.10. Variationskoeffizient und Normbereich

Es erfolgte die Analyse von 39 frischen (Lagerungsdauer < 2 h bei RT) Plasmen gesunder Spender (50-µl-Testansatz in F-wells), um den Normbereich des INCA

festzulegen. Der Mittelwert der nach vier Minuten Gerinnungsreaktionszeit erzeugten Thrombinaktivitäten betrug 0.5 IU/ml. Dies ist der 100%-der-Norm-Wert für INCA-4. Die mittlere Thrombinaktivität derselben Proben nach fünf Minuten Gerinnungsreaktionszeit lag bei 1.9 IU/ml, was dem 100%-der-Norm-Wert für INCA-5 entspricht. Der Normbereich des INCA beträgt $100 \pm 30\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) der normalen Thrombingenerierung in frischen Plasmaproben von gesunden Spendern.

Auf der Grundlage der zehnfachen Messung eines frischen (Lagerungsdauer < 2 h bei RT) Pools aus Plasmen von Gesunden wurde der Variationskoeffizient bei manueller Durchführung ermittelt. Dies erfolgte je einmal unter Verwendung einer F-well-Mikrotiterplatte und einer U-well-Mikrotiterplatte. Der so erlangte intra-assay Variationskoeffizient (bei sofortiger 10-fach Bestimmung) beträgt < 10% (in F-wells 6.3% für INCA-4 und in U-wells 8.9% für INCA-4 bzw. in F-wells 5.4% für INCA-5 und in U-wells 8.1% für INCA-5). Das Ergebnis weist darauf hin, dass die INCA-Messung in F-wells eine höhere Präzision ermöglicht als in U-wells. Der inter-assay Variationskoeffizient (bei 10-fach Bestimmung an zehn verschiedenen aufeinanderfolgenden Tests) ergab < 15%.

3.11. Einfluss des Matrixvolumens auf den INCA

Es wurde die Auswirkung eines erhöhten Volumens (Verdünnung mit 0.9% NaCl) des Kontaktaktivators auf die Thrombingenerierung im INCA untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine U-well-Mikrotiterplatte mit 20 μ l Standard human plasma und unterschiedlichen Mengen an isotonischer Kochsalzlösung bestückt, bevor die Zugabe von je 2 μ l INCA-Aktivator (Pathromtin® SL verdünnt 1:32 mit 250 mmol/l CaCl_2) erfolgte. Der INCA wurde daraufhin wie üblich ausgeführt. Es stellte sich heraus, dass die Verdünnung der Matrix in deutlich erhöhten Thrombinaktivitäten resultiert (Abb. 28), d. h. die Aktivierung der Gerinnung fällt bei Erhöhung des Matrixvolumens stärker aus. Ein Zusatz von 2 μ l NaCl zu 5 μ l Aktivator hat keinen nennenswerten Effekt, während ein Zusatz von 4 μ l NaCl bereits INCA-6 und INCA-8 verstärkt. Insbesondere die Zugabe von 10–40 μ l 0.9% NaCl zeigte einen erheblichen Verstärkungseffekt, von dem besonders die INCA-Werte bei einer Gerinnungsreaktionszeit zwischen vier und sechs Minuten betroffen sind, wie in Abbildung 29 zu sehen ist. Zur Durchführung des INCA

ist, vor diesem Hintergrund betrachtet, eine Matrix anzustreben, die der Zusammensetzung des menschlichen Plasmas so nah wie möglich kommt.

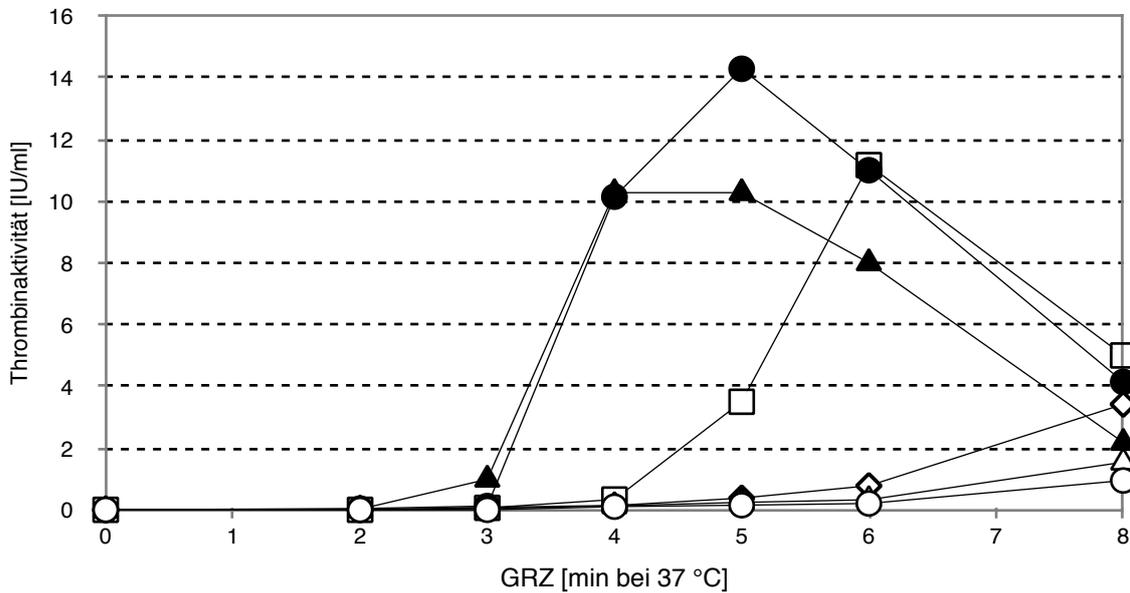


Abb. 28: Volumenzusatz zum INCA-Aktivator (1)

20 µl Standard human plasma wurden in mit jeweils 2 µl INCA-Aktivator (PSL 1:32 verdünnt mit 250 mmol/l CaCl₂) und 0 µl (O), 2 µl (Δ), 4 µl (◇), 10 µl (□), 20 µl (●) und 40 µl 0.9% NaCl (▲) befüllte U-wells gegeben und die erzeugte Thrombinaktivität wurde mittels INCA bestimmt.

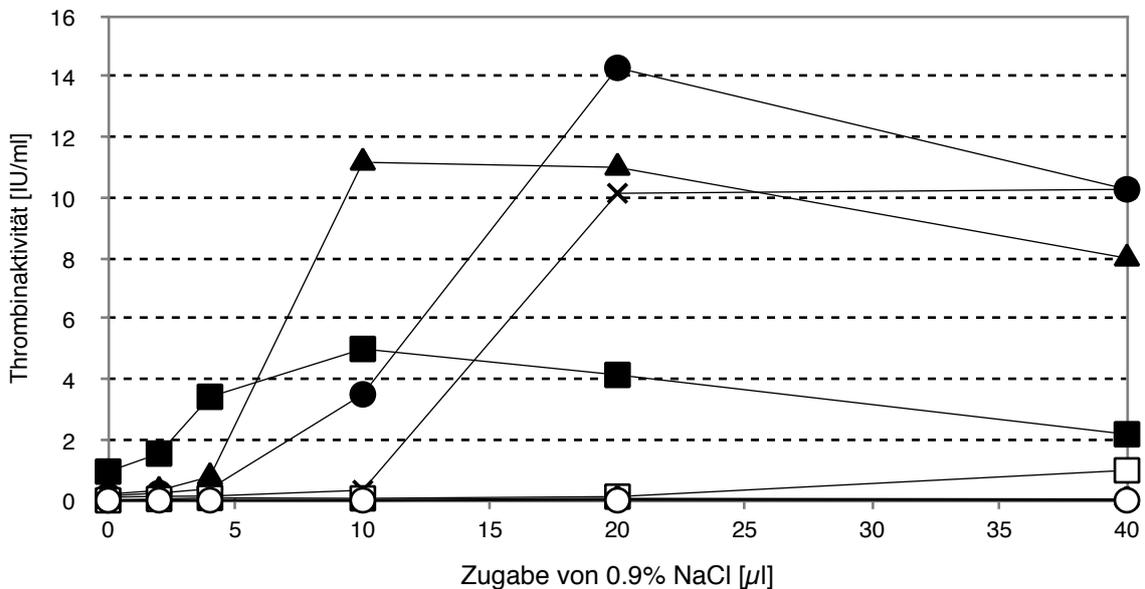


Abb. 29: Volumenzusatz zum INCA-Aktivator (2)

Darstellung der Thrombinaktivität der Plasmen von Abbildung 28 in Abhängigkeit vom Volumenzusatz: 0 min GRZ (O), 2 min GRZ (Δ), 3 min GRZ (□), 4 min GRZ (x), 5 min GRZ (●), 6 min GRZ (▲), 8 min GRZ (■).

3.12. Korrelation des INCA mit anderen Gerinnungstesten

193 unselektionierte Rest-Plasmaproben von Patienten wurden in der 50- μ l-Testversion des INCA bei Gebrauch von F-well-Mikrotiterplatten untersucht. Die Proben waren zu diesem Zeitpunkt ca. sechs Stunden alt. Die Gerinnungsreaktion fand bei 37 °C im Wasserbad statt. Die Ergebnisse werden in den folgenden Diagrammen dargestellt.

In den Abbildungen 30 bis 33 wurden jeweils der INCA-Wert einer festgesetzten GRZ und die aPTT der Proben miteinander korreliert. INCA-4 und aPTT weisen mit $r = -0.256$ einen schwachen bis mäßigen negativen Zusammenhang auf. Mit steigender Gerinnungsreaktionszeit steigt im Bereich 4–12 Minuten auch der Betrag des Korrelationskoeffizienten stetig an. Der stärkste negative Zusammenhang zeigt sich also für aPTT und INCA-12. Er beträgt $r = -0.559$, was eine deutliche Korrelation anzeigt. Zur Berechnung dieser Korrelation wurden nur Werte herangezogen, die die Bedingung $\text{INCA-12}/\text{INCA-8} > 1$ erfüllen, um sicherzustellen, dass die Messwerte dem aufsteigenden Anteil der INCA-Kinetik entstammen. Werte, die diese Bedingung nicht erfüllen, könnten das Ergebnis verfälschen, da das Thrombin nach dem Höhepunkt der Kurve bereits durch die Antithrombin-I-Aktivität von Fibrin inaktiviert wird und somit der INCA-12 Wert ungeeignet für eine Beurteilung der Thrombingenerierung der Probe wäre.

Abbildung 34 stellt die Thrombingenerierung in INCA-5 in Abhängigkeit von der INR der 193 Patientenplasmen dar. Der Korrelationskoeffizient beträgt $r = -0.285$ und zeigt demnach einen etwas schwächeren negativen Zusammenhang an, als zwischen INCA-5 und aPTT mit $r = -0.348$. Zwischen dem INCA und den beiden häufig eingesetzten Tests der routinemäßigen Gerinnungsdiagnostik, aPTT und INR, ergab sich keine Korrelation mit $|r| > 0.6$ (Abb. 30–34).

Die Fibrinogenkonzentration zeigt mit INCA-5 nur einen äußerst geringfügigen negativen Zusammenhang (Abb. 35). Der entsprechende Korrelationskoeffizient beträgt $r = -0.083$.

Die Thrombinaktivitäten der Werte INCA-4 und INCA-5 weisen eine deutliche positive Korrelation von $r = 0.73$ auf, wobei wiederum nur die Werte im aufsteigenden Teil der

INCA-Kinetik berücksichtigt wurden, die die Bedingung $INCA-5/INCA-4 > 1$ erfüllen (Abb. 36).

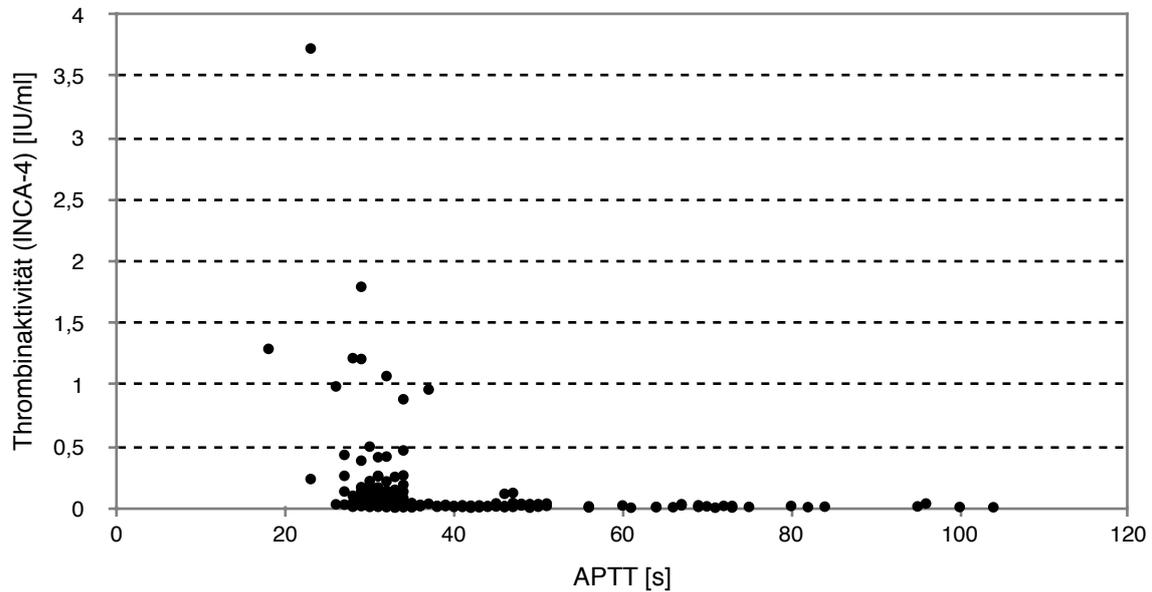


Abb. 30: Korrelation von aPTT und INCA-4

Der INCA wurde in F-wells mit 50 μ l Patienten-Plasmaproben ausgeführt. Die nach vier Minuten GRZ bei 37 $^{\circ}$ C gebildete Thrombinaktivität wurde mit der aPTT korreliert. Mittelwert \pm Standardabweichung: aPTT = 40.9 ± 15.6 s, INCA-4 = 0.14 ± 0.38 IU/ml, Korrelationskoeffizient: $r = -0.256$, $n = 174$.

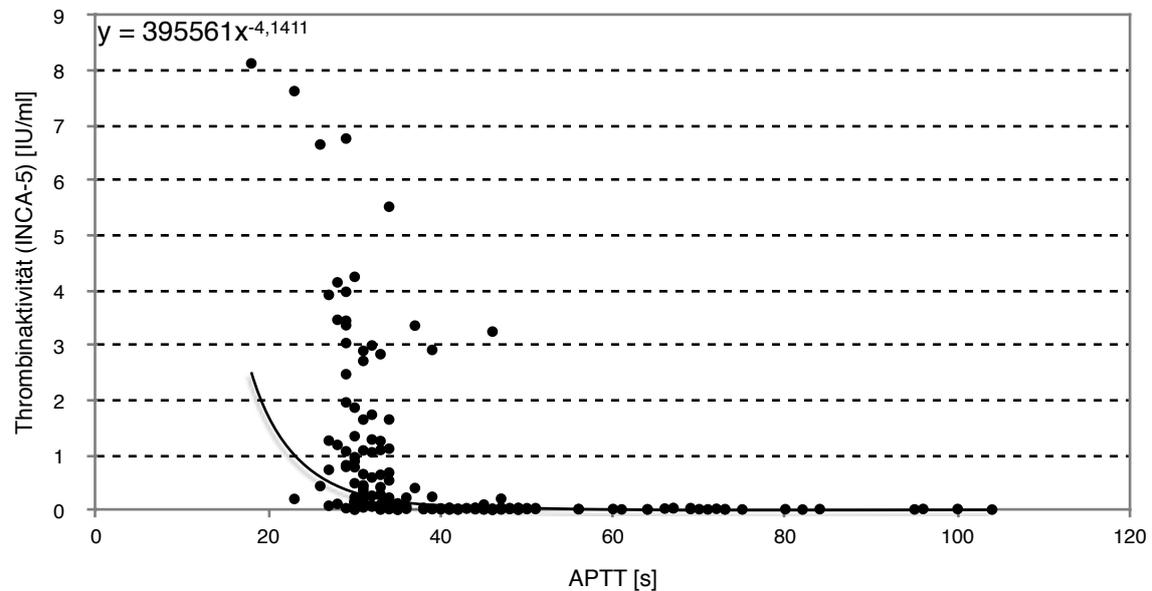


Abb. 31: Korrelation von aPTT und INCA-5

Es handelt sich um die gleichen Plasmaproben wie in Abb. 32. Mittelwert \pm Standardabweichung: aPTT = 40.9 ± 15.6 s, INCA-5 = 0.72 ± 1.46 IU/ml, Korrelationskoeffizient: $r = -0.348$, $n = 174$.

Thrombinaktivität basierter Test zur intrinsischen Gerinnung

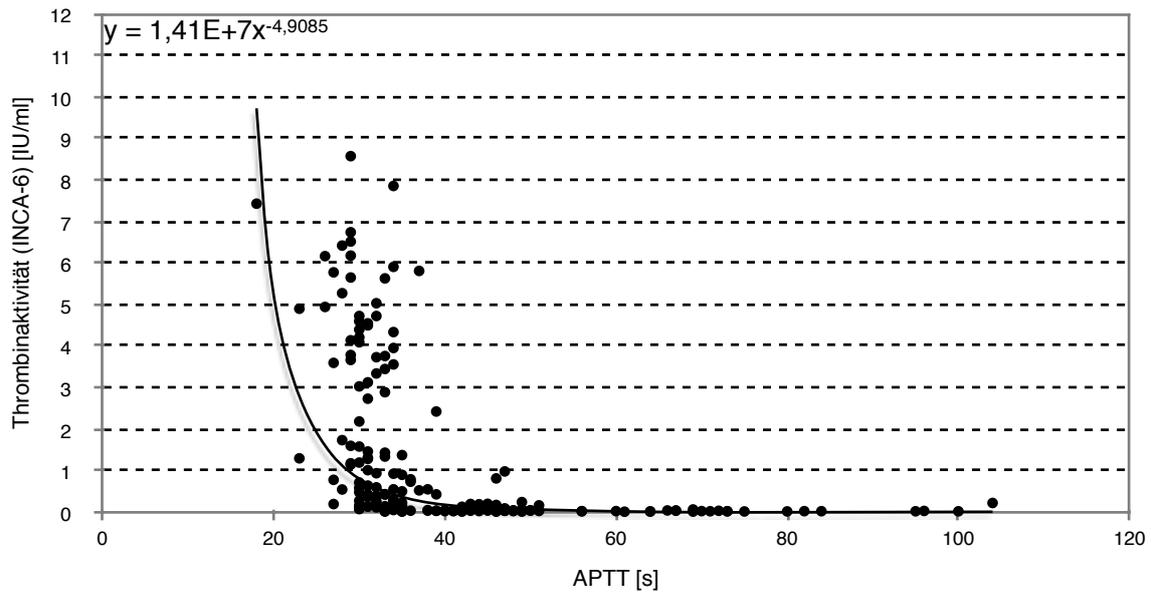


Abb. 32: Korrelation von aPTT und INCA-6

Mittelwert \pm Standardabweichung: aPTT = 40.9 ± 15.6 s; INCA-6 = 1.37 ± 2.06 IU/ml, Korrelationskoeffizient: $r = -0.439$, $n = 174$.

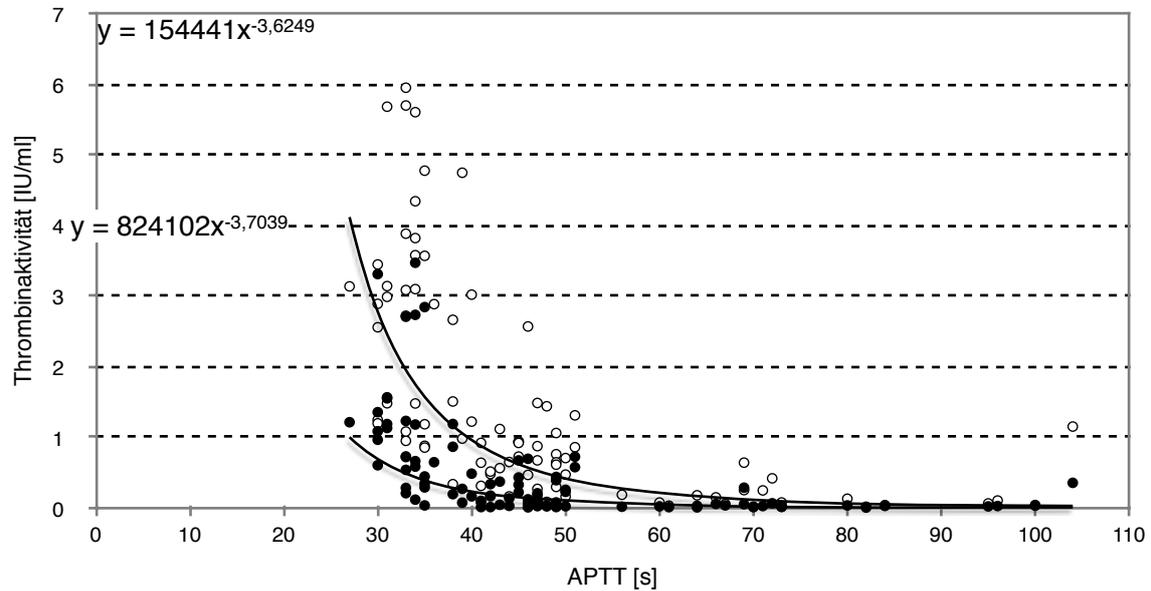


Abb. 33: Korrelation von aPTT und INCA-8 bzw. INCA-12

Mittelwert \pm Standardabweichung und zugehöriger Korrelationskoeffizient: aPTT = 47.9 ± 17.2 s, INCA-8 (\bullet) = 0.49 ± 0.73 IU/ml, $r = -0.456$, INCA-12 (O) = 1.39 ± 1.55 IU/ml, $r = -0.559$, $n = 93$. Es sind nur Werte mit INCA-12/ INCA-8 > 1 aufgeführt. INCA-8 korreliert mit INCA-12: $r = 0.615$.

Thrombinaktivität basierter Test zur intrinsischen Gerinnung

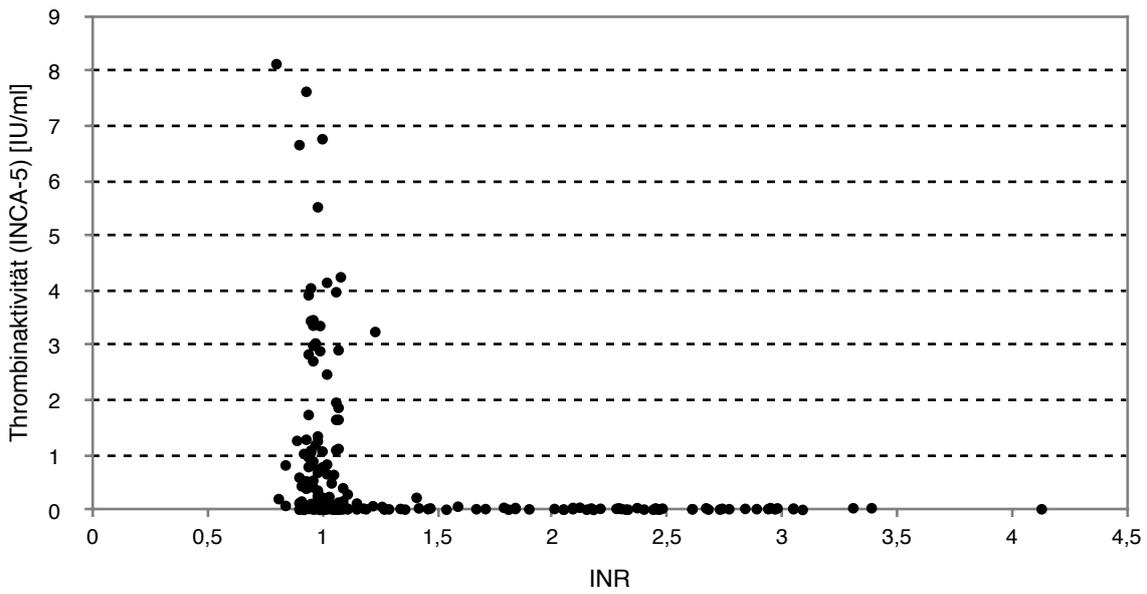


Abb. 34: Korrelation von INR und INCA-5

Mittelwert \pm Standardabweichung: INR = 1.39 ± 0.68 , INCA-5 = 0.69 ± 1.42 IU/ml,
Korrelationskoeffizient: $r = -0.285$; $n = 193$.

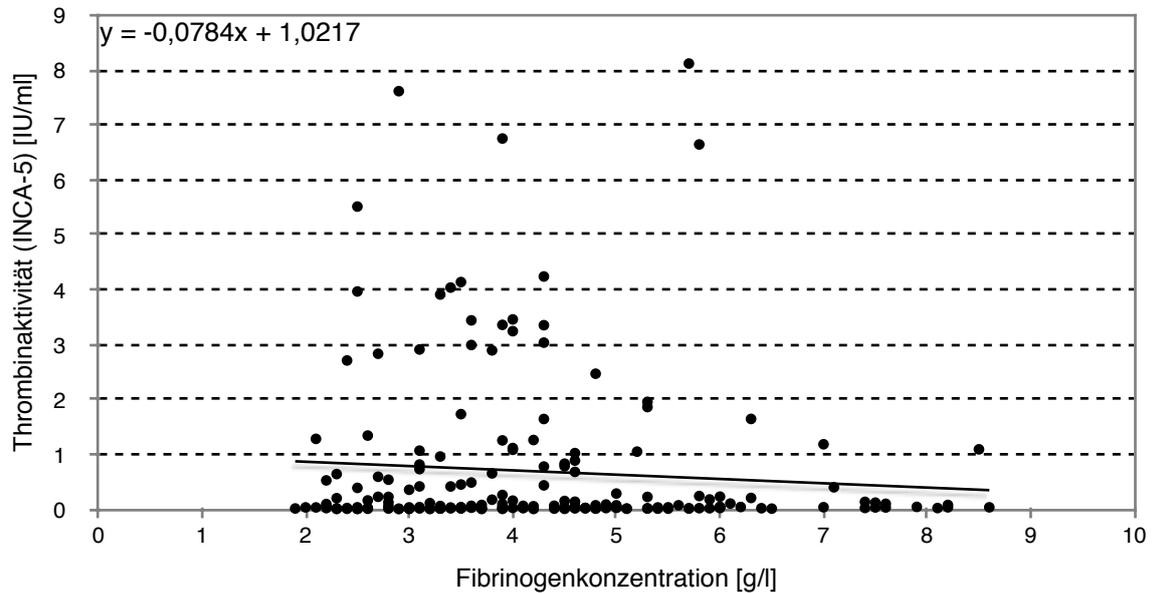


Abb. 35: Korrelation von Fibrinogenkonzentration und INCA-5

Mittelwert \pm Standardabweichung: Fibrinogenkonzentration = 4.3 ± 1.5 g/l, INCA-5 = 0.69 ± 1.42 IU/ml,
Korrelationskoeffizient: $r = -0.083$, $n = 193$.

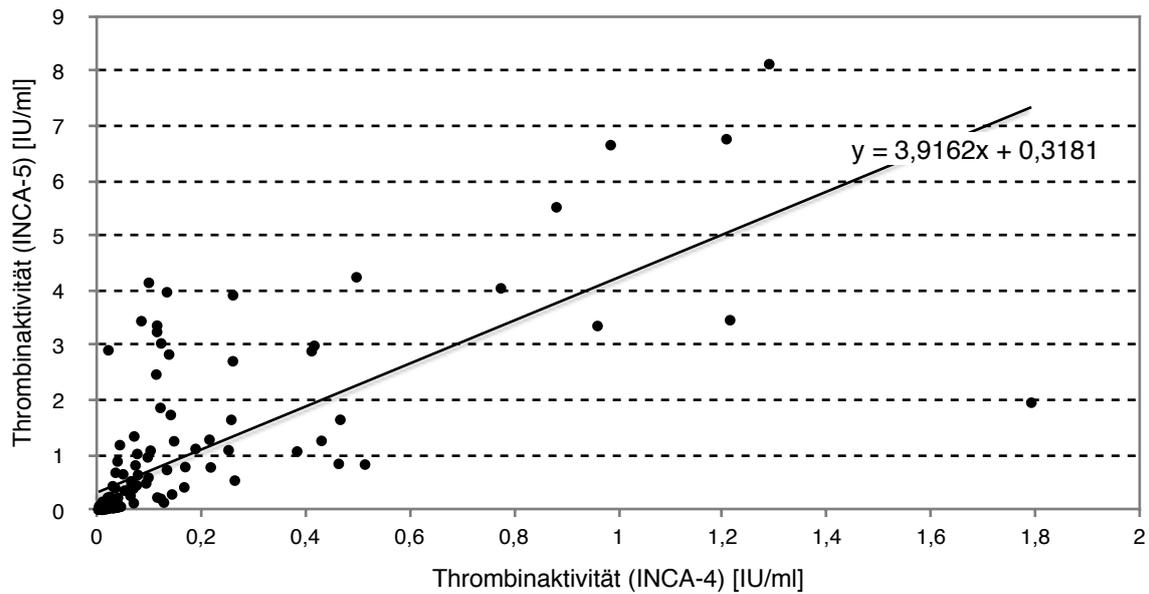


Abb. 36: Korrelation von INCA-4 und INCA-5

Mittelwert \pm Standardabweichung: INCA-4 = 0.14 ± 0.28 IU/ml, INCA-5 = 0.85 ± 1.48 IU/ml, Korrelationskoeffizient: $r = 0.728$, $n = 145$. Es sind nur Werte mit $\text{INCA-5}/\text{INCA-4} > 1$ aufgeführt.

3.13. Gruppenanalyse

Für 173 der 193 unselektionierten Rest-Plasmaproben, deren Korrelationen in Kapitel 3.12. dargelegt wurden, konnte eine Gruppeneinteilung nach den in Kapitel 2.2. beschriebenen Kriterien vorgenommen werden. Aufgrund fehlender aPTT-Werte konnten 18 Proben keiner Gruppe zugeordnet werden. Zwei Proben wurden aus anderen Gründen von der Gruppeneinteilung ausgeschlossen (D-Dimer von 819 mg/l und extremer statistischer Ausreißer). Unter den 173 Plasmen, für die eine Gruppeneinteilung vorgenommen wurde, waren 95 Plasmen mit der Gruppeneinteilung „nicht antikoaguliert“ (mit in der Norm liegenden Werten von aPTT und Quick; der INR-Mittelwert dieser Gruppe beträgt 0,98 und der aPTT-Mittelwert beträgt 31,03 s), 42 Patientenplasmen mit der Gruppeneinteilung „erhöhte INR“ (Plasmen mit erniedrigtem Quick-Wert, welche in der Regel auch eine erhöhte INR aufweisen; der INR-Mittelwert dieser Gruppe beträgt 2,32 und der aPTT-Mittelwert beträgt 46,64 s) und 36 Patientenplasmen mit der Gruppeneinteilung „verlängerte aPTT“ (Plasmen mit $\text{aPTT} > 36$ s; der INR-Mittelwert dieser Gruppe beträgt 1,12 und der aPTT-Mittelwert beträgt 59,61 s).

Der Mittelwert der nach vier Minuten Gerinnungsreaktionszeit gebildeten Thrombinaktivitäten der Plasmen von nicht antikoagulierten Patienten liegt bei 0,199 IU/ml, während die Plasmen mit verlängerter aPTT im Mittel 0,021 IU/ml Thrombinaktivität generieren und die Plasmen mit erhöhter INR im Mittel nur 0,018 IU/ml Thrombinaktivität generieren, was ungefähr der basalen Thrombinaktivität entspricht (Abb. 37). Nach fünf Minuten GRZ generieren die nicht antikoagulierten Plasmen im Durchschnitt 1,158 IU/ml Thrombinaktivität. Auch in INCA-5 bleiben die Plasmen von Antikoagulierten mit einer mittleren Thrombinaktivität von 0,211 IU/ml für die Gruppe „verlängerte aPTT“ und einer mittleren Thrombinaktivität von 0,031 IU/ml für die Gruppe „erhöhte INR“ deutlich hinter den Plasmen von nicht antikoagulierten Patienten zurück (Abb. 38).

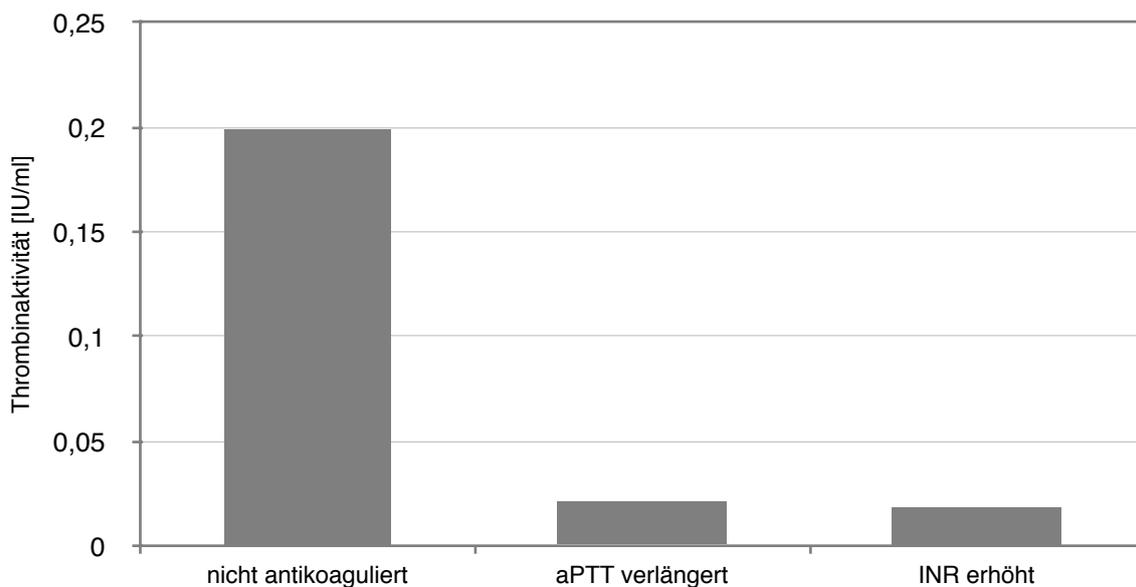


Abb. 37: INCA-4-Mittelwerte nach Gruppenzugehörigkeit aufgetragen

Mittelwerte der nach vier Minuten GRZ generierten Thrombinaktivität der drei Gruppen (Gesamtkollektiv n = 173 Patienten). Mittelwert \pm Standardabweichung: Gruppe „nicht antikoaguliert“ = 0.199 ± 0.325 IU/ml, Gruppe „aPTT verlängert“ = 0.021 ± 0.026 IU/ml, Gruppe „INR erhöht“ = 0.018 ± 0.010 IU/ml.

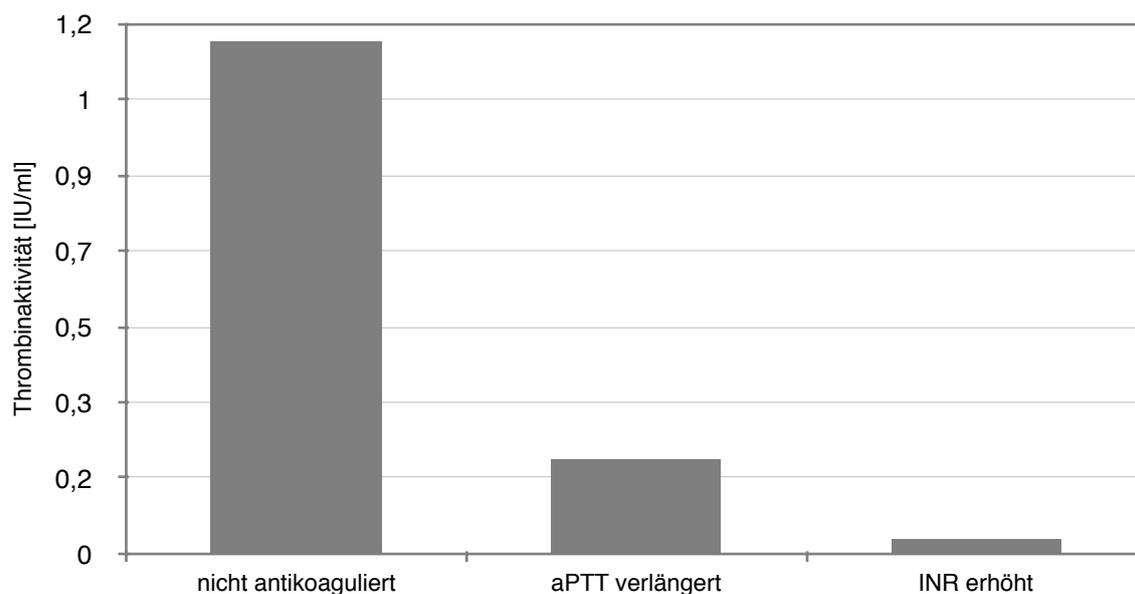


Abb. 38: INCA-5-Mittelwerte nach Gruppenzugehörigkeit aufgetragen

Mittelwerte der nach fünf Minuten GRZ generierten Thrombinaktivität der drei Gruppen (Gesamtkollektiv n = 173 Patienten). Mittelwert \pm Standardabweichung: Gruppe „nicht antikoaguliert“ = 1.158 ± 1.663 IU/ml, Gruppe „aPTT verlängert“ = 0.211 ± 0.710 IU/ml, Gruppe „INR erhöht“ = 0.031 ± 0.034 IU/ml.

Für die Auswertung mithilfe induktiver Statistik wurde zuerst die Varianzhomogenität zwischen INR, aPTT und INCA-4 bzw. INCA-5 mit dem Levene-Test geprüft (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Levene-Statistik (Prüfung auf Homogenität der Varianzen)

	Levene-Statistik (F-Wert)	p-Wert
INR	74,902	< 0,001
aPTT	77,451	< 0,001
INCA-4	23,037	< 0,001
INCA-5	28,857	< 0,001

Aufgrund ungleicher Varianzen wurde für den Mittelwertvergleich als a-priori-Test der Welch-Test verwendet. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde bei einem p-Wert von $< 0,05$ angenommen. Es zeigen sich signifikante Gruppenunterschiede: für INR: $F(2,0; 53,193) = 101,052$, $p < 0,001$; für aPTT: $F(2,0; 57,136) = 90,641$, $p < 0,001$; für INCA-4: $F(2,0; 80,291) = 14,633$, $p < 0,001$; für INCA-5: $F(2,0; 68,244) = 22,750$, $p < 0,001$.

Für die differenzierte statistische Absicherung von Gruppenunterschieden wurde zum einen ein post-hoc-Test (Games-Howell) ohne Varianzhomogenitätsvoraussetzungen verwendet und zum anderen eine Schätzung bias-korrigierter Bootstrapping-Konfidenzintervalle (Efron 1979, Efron und Tibshirani 1986, MacKinnon 2008) vorgenommen. Die Schätzung erfolgte durch 1000 Bootstrapping-Stichproben. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppenmittelwerten wurde angenommen, wenn das bias-korrigierte 95%-Konfidenzintervall nicht den Wert Null enthielt. Die Ergebnisse zeigten, dass in Bezug auf die abhängige Variable INCA-4 ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gruppen „nicht antikoaguliert“ und „erhöhte INR“ besteht. Ebenso besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den INCA-4-Mittelwerten der Gruppen „nicht antikoaguliert“ und „verlängerte aPTT“. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die INCA-4-Mittelwerte der Gruppen „erhöhte INR“ und „verlängerte aPTT“ nicht signifikant voneinander. Betrachtet man die abhängige Variable INCA-5, so zeigt sich das gleiche Ergebnis: Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gruppen „nicht antikoaguliert“ und „erhöhte INR“ und zwischen den Mittelwerten der Gruppen „nicht antikoaguliert“ und „verlängerte aPTT“, während sich die INCA-5-Mittelwerte der Gruppen „erhöhte INR“ und „verlängerte aPTT“ nicht signifikant voneinander unterscheiden (Tabelle 7).

Tabelle 7: Games-Howell-Test und biaskorrigierte 95%-Konfidenzintervalle (Vergleich der Mittelwerte der Gruppen)

abhängige Variable	Gruppenvergleich	Games-Howell (mittlere Differenz)	p-Wert	untere Grenze BC 95%- Konfidenzintervall	obere Grenze BC 95%- Konfidenzintervall
INCA-4	nicht antikoaguliert – erhöhte INR	0,180628	< 0,001	0,120586	0,251125
	nicht antikoaguliert – verlängerte aPTT	0,178075	< 0,001	0,119386	0,249170
	erhöhte INR – verlängerte aPTT	-0,002553	0,848	-0,013368	0,006266
INCA-5	nicht antikoaguliert – erhöhte INR	1,127701	< 0,001	0,795964	1,502910
	nicht antikoaguliert – verlängerte aPTT	0,947031	< 0,001	0,509552	1,385824
	erhöhte INR – verlängerte aPTT	-0,180670	0,292	-0,486409	0,003076

4. Diskussion

4.1. Grundsätzliche Überlegungen zur Notwendigkeit eines neuen Gerinnungstests

In der Gerinnungsdiagnostik besteht der dringende Bedarf an aussagekräftigen Globaltesten, die sowohl pro- als auch antikoagulatorische Einflüsse verschiedenster Art erfassen und die hämostatische Funktion eines Patienten so abbilden, dass das Risiko für Blutungskomplikationen einerseits und thrombotische Erkrankungen andererseits eingeschätzt werden kann. Nur durch Tests, die bereits leichte Störungen des hämostatischen Systems detektieren und es somit ermöglichen frühzeitig, ggf. noch vor dem Auftreten von Symptomen bzw. Komplikationen, eine Therapie einzuleiten bzw. das Therapieregime anzupassen, kann die Sicherheit für die zahlreichen Patienten, die von Gerinnungsstörungen oder Antikoagulantientherapien betroffen sind, erhöht werden. Die etablierten Globalteste der Gerinnung wie aPTT und Thromboplastinzeit (Quick-Wert) werden diesen Ansprüchen nicht gerecht, da sie unphysiologisch stark aktiviert werden und somit in der Regel weder leichte Antikoagulation noch prothrombotische Zustände detektieren können (Castoldi und Rosing 2011). Die Anforderungen, die an zeitgemäße globale Gerinnungsteste zu stellen sind, sind folgende: Die Tests sollten in der Lage sein, mit im Vergleich zu den derzeit etablierten Tests wesentlich höherer Sensitivität thrombophile Diathesen oder prothrombotische Risiken (z. B. frühe Stadien von disseminierter intravasaler Gerinnung, DIC) zu detektieren, sollten gerinnungshemmende Einflüsse wiedergeben können (inkl. der Wirkung verschiedener bewährter und neuer Antikoagulantien, die sich mit den etablierten Tests nicht erfassen lassen), sollten nicht die Gerinnselbildungszeit, sondern die Aktivität von Thrombin in IU/ml messen und sollten unter möglichst physiologischen Testbedingungen messen, was beinhaltet, dass die Plasmamatrix kaum verändert wird. Setzt man sich zum Ziel, ein derartiges Testsystem zu entwickeln, wird deutlich, dass ein Thrombingenerierungstest eine aussichtsreiche Möglichkeit darstellt.

Eine wesentliche diagnostische Lücke besteht im Bereich der intrinsischen Gerinnung. Abgesehen von der seit über fünf Jahrzehnten gebräuchlichen aPTT werden aktuell in der Gerinnungsdiagnostik kaum Globalteste eingesetzt, die mit Kontaktaktivatoren

arbeiten und speziell den intrinsischen Weg der plasmatischen Gerinnung abbilden. Auch die Methodik des Thrombogramms von Hemker et al. (2002) nutzt TF als Gerinnungsaktivator, d. h. sie konzentriert sich ebenfalls auf den extrinsischen Weg, der weniger kompliziert und störanfällig ist. Dass die Kontaktfaktoren auch in vivo von nicht zu unterschätzender (patho-)physiologischer Bedeutung sind, wird klinisch anhand der Thromboseneigung durch Blut-Matrix-Änderung ersichtlich (Siegerink et al. 2010). Im Hinblick auf die Erkenntnisse, die aus der Erforschung des intrinsischen Gerinnungssystems erwachsen sind (Montfoort und Meijers 2013, Gruber 2014) und die dazu geführt haben, dass die Entwicklung von FXII-hemmenden Medikamenten bereits begonnen wurde (Hagedorn et al. 2010, Woodruff et al. 2013), ist es von großem Interesse, moderne Testverfahren zu haben, die insbesondere die intrinsische Gerinnung und die Kontaktaktivierung sehr sensitiv messen können.

4.2. Diskussion der Methodik des INCA

INCA ist ein neuartiger Thrombingenerierungstest zur Messung der intrinsischen Gerinnung basierend auf der Thrombinaktivität in IU/ml. Der Test ist damit unabhängig von der Gerinnselbildungszeit. Während herkömmliche Globalteste der Gerinnung, die die Gerinnselbildungszeit in Sekunden messen, in der Lage sind, etwa 1–10 IU/ml Thrombin zu detektieren, kann mittels INCA Thrombin in der Größenordnung 0.001 IU/ml detektiert werden, d. h., der INCA ist ca. um den Faktor 1000 sensitiver (Stief 2006 b, Stief 2013). INCA ist eine Weiterentwicklung von bereits bekannten Testsystemen, die chromogene oder fluorogene Peptidsubstrate nutzen und auf der Thrombingenerierung basieren. Insbesondere ist hier der Thrombingenerierungstest CAT von Hemker et al. (2002) zu nennen. Auf dem Gebiet der Thrombingenerierung ist – nach bestem Wissen der Autorin – der INCA derzeit der einzige Test, der speziell für die Abbildung der intrinsischen Gerinnung konzipiert ist und einen Kontaktaktivator verwendet. Es gibt drei Eigenheiten des INCA, die dafür verantwortlich sind, dass dieser Test eine besonders hohe Empfindlichkeit aufweist und bekannte Fehlermöglichkeiten bei der Anwendung von chromogenen und anderen künstlichen Substraten (Hemker et al. 2003, Pötzsch und Madlener 2010, Al Dieri et al. 2012) umgeht: die geringe Aktivatorkonzentration, die Anwendung von Arginin und das

schnell reagierende Thrombinsubstrat, das in einer finalen Konzentration von weniger als 0.6 mmol/l eingesetzt wird. Die Bedeutung dieser drei Punkte und weiterer Besonderheiten des INCA wird im Folgenden genauer erörtert. Im Anschluss an die Diskussion der dem INCA zugrundeliegenden Methodik werden die Ergebnisse der INCA-Messungen von Plasmaproben, die in Kapitel 3 vorgestellt wurden, diskutiert.

Bei der Durchführung des INCA wird, vergleichbar der aPTT, die Gerinnung auf dem intrinsischen Weg mittels Kontaktaktivator (SiO_2) gestartet. Um die Thrombinaktivität von Plasmaproben exakt bestimmen zu können, ist es wichtig, dass die Kontaktaktivierung weder zu stark noch zu schwach ausfällt und die Matrix der Probe möglichst wenig verändert wird. Die aPTT ist unphysiologisch stark getriggert, was dazu führt, dass die Klinik von Patienten oftmals nicht richtig widerspiegelt wird (z. B. kommt es vor, dass die Plasmaprobe eines Patienten eine in der Norm liegende aPTT aufweist, obwohl der Patient klinisch gesehen an prothrombotischen Zuständen leidet). Vor diesem Hintergrund wurde für den INCA eine sehr geringe Aktivatorkonzentration gewählt: Es wird beim INCA weniger als 5% der bei Durchführung der aPTT üblichen Aktivatorkonzentration angewendet, was zu einer höheren Empfindlichkeit führt. Die geringe Aktivatorkonzentration hat unter anderem zur Folge, dass die Gerinnungsreaktion im INCA langsamer abläuft als in der überschießend aktivierenden aPTT. Die wichtigsten INCA-Werte sind daher die nach vier bzw. fünf Minuten GRZ (Hauptwert bzw. Kontrollwert). Bei der Durchführung des INCA erwiesen sich größere SiO_2 -Partikel von 0.5–10 μm verglichen mit kleineren Partikeln von 0.007 bzw. 0.014 μm als die stärkeren Kontaktaktivatoren und sind daher zu bevorzugen. Da der INCA die Kontaktaktivierung in nur minimal verdünntem Plasma (1 Teil Aktivator-Reagenz auf 10 Teile Zitratplasma) imitiert und die Thrombingenerierung bei 37 °C erfolgt, kommt dieser neue klinische Gerinnungstest den physiologischen Gegebenheiten sehr nahe. Dabei werden sowohl eine ausgeglichene Gerinnungslage als auch prothrombotische Zustände und verschiedenartige antikoagulatorische Einflüsse durch den INCA erfasst.

Für die Durchführung des INCA ist die Anwendung von ca. 1.5-molarem Arginin (finale Konzentration) entscheidend. Arginin blockiert kompetitiv die aktiven Zentren von Serinproteasen (Danø und Reich 1979, Stief et. al. 2001) wie Thrombin und den

aktivierten Kontaktfaktoren (von besonderer Wichtigkeit ist hier das thrombinähnliche Kallikrein). Die Gerinnungsreaktion, und somit die Thrombingenerierung, wird daher durch Arginin gestoppt, d. h., nach der Zugabe von ausreichend hohen Konzentrationen an Arginin entsteht kein weiteres Thrombin, wie die in Kapitel 3.1. und 3.2. dargestellten Ergebnisse zeigen. Dies ist die notwendige Voraussetzung, um die Thrombinaktivität exakt nach Ablauf einer gewünschten Gerinnungsreaktionszeit ermitteln zu können. Während Abb. 6 zeigt, dass die Zugabe von Arginin vor Zugabe des Aktivators die Entstehung von Fibrin verhindert, ist aus Abb. 5 zu ersehen, wie das bereits entstandene aber noch nicht quervernetzte Fibrin durch die Zugabe von Arginin wieder aufgelöst wird: 2.5 mol/l Arginin sind in der Lage, innerhalb von ca. 20 Minuten die durch die Gerinnungsreaktion entstandene fibrinbedingte Trübung in 50 µl Plasma aufzulösen. Es ist unerheblich, ob 50, 100, 150 oder 200 µl 2.5 mol/l Arginin eingesetzt werden. Für den INCA wurde aufgrund dieser Daten ein Zusatz von 100 µl 2.5 mol/l Arginin nach Ablauf der Gerinnungsreaktionszeit und eine Inkubationszeit nach Argininzusatz von 20 Minuten festgelegt. Die besondere Bedeutung der Auflösung des Fibrins besteht darin, dass in einer ungetrübten fibrinfreien Probe eine wesentlich exaktere photometrische Bestimmung des umgesetzten Thrombinsubstrats (freies pNA) möglich ist. So ermöglicht der Einsatz von Arginin die quantitative Bestimmung der Thrombinbildung über den Zeitpunkt der Fibrinbildung hinaus – jedoch nicht über den Zeitpunkt der Quervernetzung (FXIIIa-Stabilisierung) des Fibrins hinaus – mit chromogenen Substraten. Dies war bisher nur mit fluorogenen Peptidsubstraten möglich (Hemker et al. 2006), was einer der Gründe dafür ist, dass sich die Thrombingenerierung bis heute nicht als allgemein gebräuchliches Verfahren durchsetzen konnte. Die Detektion von chromogenen Substraten ist wesentlich einfacher und auch kostensparender als die von fluorogenen Substraten. Denn um freies pNA nachzuweisen, ist nur ein Photometer erforderlich. Der INCA ist daher in Gerinnungslaboren mit der üblichen Ausstattung ohne weiteres durchführbar. Die Tatsache, dass Arginin Fibrin auflöst, ist auch deshalb so bedeutsam, weil Fibrin die Thrombinaktivität direkt beeinflusst, indem es eine inhibierende Wirkung auf Thrombin ausübt und Thrombin bindet (Mosesson 2007), weshalb es früher auch als Antithrombin I bezeichnet wurde. Bei der Antithrombin-I-Aktivität von Fibrin handelt es sich jedoch überwiegend um ein

in-vitro-Artefakt. Thrombingenerierungsteste, die ohne Arginin durchgeführt werden, erfassen die Antithrombin-I-Wirkung von Fibrin mit, als ob es ein physiologisch wirksames Antithrombin wäre. Dies hat zur Folge, dass die wahre Thrombingenerierung unterschätzt wird. Im INCA hingegen wird die Antithrombin-I-Wirkung von Fibrin durch die supramolare finale Arginkonzentration inhibiert, solange das Fibrin noch nicht durch FXIIIa quervernetzt wurde. Dies hat zur Folge, dass die wahre intrinsische Thrombingenerierung insbesondere im aufsteigenden Teil der Thrombingenerierungskurve, vor dem Einsetzen der Fibrin-Quervernetzung, besser reflektiert wird.

Kommerziell verfügbare Testverfahren zur Thrombingenerierung (z. B. CAT, Hemker et al. 2002) messen die Thrombinbildung kontinuierlich, während die Gerinnungsreaktion abläuft. Dies hat den Nachteil, dass das synthetische Peptidsubstrat während der Gerinnungsreaktion anwesend ist und mit den natürlichen Thrombinsubstraten um die Bindung an Thrombin konkurriert, was zur Folge hat, dass die positiven Rückkopplungsmechanismen, die u. a. über FV- und FVIII-Aktivierung die Thrombingenerierung enorm beschleunigen, verzögert werden können. Ebenso interagiert das künstliche Substrat mit der Thrombininaktivierung durch Störung der negativen Rückkopplungsmechanismen. Kurz gesagt stört bei dieser Methodik die bloße Anwesenheit des synthetischen Substrats die Bestimmung der Thrombinbildung, die es eigentlich detektieren soll, indem sowohl physiologische als auch synthetische Thrombinsubstrate gleichzeitig während des Ablaufs der plasmatischen Gerinnung auf die Thrombinaktivität Einfluss nehmen (Butenas und Mann 2007). Dieses Problem besteht bei der Durchführung des INCA nicht: Setzt man in einem Thrombingenerierungstest Arginin so ein, wie dies bei INCA oder bei Extrinsic Coagulation Activity Assay (EXCA, Stief et al. 2008) getan wird, erreicht man genau das, was schon die ersten bekannten Thrombingenerierungsteste (MacFarlane und Biggs 1953, Pitney und Dacie 1953) durch Anwendung der aufwendigen „Subsampling“-Methode bewerkstelligten: die Trennung von Gerinnungsreaktion und Indikatorreaktion. Diese Trennung verhindert, dass das künstliche Substrat mit den natürlichen Substraten konkurriert, jedoch ist das „Subsampling“-Verfahren so zeitaufwändig und mühsam, dass es heute nicht mehr gebräuchlich ist (Castoldi und Rosing 2011). INCA vereint in gewisser Weise die Vorteile der exakteren „Subsampling“-Methode mit den

Annehmlichkeiten der kontinuierlichen Messmethode. Gleichzeitig gewährleistet die Methodik des INCA während der Phase der Gerinnungsreaktion ein nahezu physiologisches Milieu mit nur minimal veränderter Plasmamatrix.

Das Problem der Mitbestimmung der Aktivitäten von unspezifischen Proteasen, die ebenfalls das niedermolekulare künstliche Substrat spalten und eine falsch-hohe Thrombinaktivität vortäuschen, wurde bei anderen Thrombingererierungstesten bisher nicht gelöst. Der Gebrauch von Arginin vermag auch in diesem wichtigen Punkt Abhilfe zu schaffen: Das während der Indikatorreaktion des INCA im Überschuss vorhandene Arginin führt zu einer fast vollständigen Reduzierung der Aktivitäten der thrombin-ähnlichen unspezifischen Proteasen (Gerinnungsenzyme wie z. B. Kallikrein), da deren aktives Zentrum für Argininmoleküle sehr leicht zugänglich ist (Debela et al. 2007). Im Gegensatz dazu ist das aktive Zentrum von Thrombin für Arginin nicht frei zugänglich, weil ein negativ geladenes Glutamin (Glu192) ein Hindernis auf dem Weg zum aktiven Zentrum darstellt (Bode 2006). INCA macht es sich zunutze, dass Arginin in supra-molaren Konzentrationen die Thrombinaktivität daher „nur“ um ca. 60–70% reduziert, so dass die restliche enzymatische Aktivität des Thrombins ausreicht, um diese isoliert von den genannten Störfaktoren wie Kallikrein, dessen Aktivität um nahezu 100% reduziert wird, zu bestimmen (Stief 2007 a, Stief 2007 b, Stief und Klingmüller 2012). Der Einsatz eines Thrombinstandards bekannter Aktivität (siehe Kapitel 2) als Korrekturfaktor ermöglicht den Rückschluss auf die volle (100% statt der verbleibenden 30–40%) Thrombinaktivität. Die Tatsache, dass im intrinsischen Gerinnungsweg unspezifische Proteasen sehr viel stärker berücksichtigt werden müssen als im kürzeren extrinsischen Weg, hat bislang die Entwicklung eines sensitiven Tests für die intrinsische Gerinnung verhindert. Während es neu entwickelte Tests zur extrinsischen Gerinnung gibt (z. B. CAT), fehlte bislang ein solcher Test für die klinisch außerordentlich bedeutsame intrinsische Gerinnung. Durch den Einsatz von Arginin, welches die unspezifischen Proteasen blockiert, könnte INCA möglicherweise in der Lage sein, diese Lücke zu schließen.

Nur am Rande sei bemerkt, dass die in dieser und anderen Arbeiten beschriebenen antikoagulatorischen und Hämostase-stabilisierenden Eigenschaften der Aminosäure Arginin nach eingehender klinischer Prüfung in der Zukunft therapeutische Anwendung

finden könnten (Stief et al. 2001, Stief 2006 a). Es wäre denkbar, in Fällen von schwerwiegenden Gerinnungsstörungen, beispielsweise im Rahmen von Sepsis und disseminierter intravasaler Gerinnung, Arginin oral oder intravenös zu verabreichen, wie dies bei anderen Indikationen bereits erprobte klinische Praxis ist (Appleton 2002, Coman et al. 2008). Es ist zu erwarten, dass Arginin in vivo über die kompetitiv blockierende Wirkung auf Serinproteasen wie Thrombin und Kallikrein, die in dieser Arbeit genannt wurden, hinausgehende antikoagulatorische Eigenschaften entfaltet, da der Argininmetabolismus NO hervorbringt (Wu und Morris 1998), welches die Plättchenaktivierung hemmt und vasodilatatorisch wirkt.

Das für den INCA verwendete chromogene Substrat zur Messung der Thrombinaktivität, CHG-Ala-Arg-pNA, wird, verglichen mit anderen Substraten, besonders schnell durch Thrombin umgesetzt. Derartige Substrate haben einerseits den Vorteil, dass sie bei Anwendung von Arginin weit weniger von unspezifischen thrombinähnlichen Proteasen wie Kallikrein gespalten werden. Dies ermöglicht eine besonders spezifische Detektion des Thrombins (Stief 2006 b). Andererseits besteht jedoch die Gefahr, dass es zum vorzeitigen Substratverbrauch kommt, d. h., dass die Thrombinaktivität aufgrund von zu schnellem Substratumsatz und -verbrauch falsch-niedrig gemessen wird. Um dies zu verhindern, ist streng darauf zu achten, dass nur die ersten 40% der Substratumsetzung bei der Auswertung berücksichtigt werden. Durch die Wahl eines geeigneten Hauptwerts (vorzugsweise INCA-4) und eines Kontrollwerts (vorzugsweise INCA-5), die sich im aufsteigenden Teil der INCA-Kinetik befinden, kann dies weitgehend gewährleistet werden. Die finale Konzentration des chromogenen Substrats muss weniger als 0.6 mmol/l betragen, da Enzyme der Kontaktphase (insbesondere Präkallikrein) andernfalls in die aktive Form überführt werden können, in welcher sie ihrerseits das chromogene Substrat spalten (Gallimore und Friberger 1991, Stief 2006 b).

Eine weitere Schwierigkeit der korrekten Bestimmung der Thrombingenerierung besteht in der Bildung von Thrombin- α_2 -Makroglobulin-Komplexen (Pötzsch und Madlener 2010). α_2 -Makroglobulin legt sich wie ein Käfig um Thrombin und inhibiert so jegliche Interaktion des aktiven Zentrums mit großen Molekülen, zu denen die natürlichen Substrate des Thrombins zählen. Kleine Moleküle wie die Peptidsubstrate können

jedoch durch die schmale Öffnung des α_2 -Makroglobulin-Käfigs schlüpfen und gelangen so an das weiterhin funktionsfähige aktive Zentrum, wo sie gespalten werden. Entscheidend für die Durchführung des INCA ist, dass die sehr kleinen Argininmoleküle zum aktiven Zentrum des gebundenen Thrombins vordringen und es während der Indikatorreaktion im gleichen Ausmaß inhibieren, wie dies bei freiem Thrombin der Fall ist. Der INCA erfasst also die Aktivität sowohl vom freien Thrombin als auch vom α_2 -Makroglobulin-gebundenen Thrombin. Da eine feste Korrelation zwischen der Konzentration von freiem Thrombin und der Geschwindigkeit der Bildung von α_2 -Makroglobulin-Thrombin-Komplexen besteht, ist es daher grundsätzlich möglich, direkt auf die Aktivität des freien Thrombins zurückzuschließen, sofern eine vom α_2 -Makroglobulin-gebundenen Thrombin unabhängige Betrachtung gewünscht wird (analog zu der Methode, die von Hemker et al. 2006 in Bezug auf das von ihnen entwickelte Thrombogramm vorgeschlagen wurde).

4.3. Diskussion der Ergebnisse

Die in Kapitel 3.1. dargelegten Ergebnisse wurden bereits im Kapitel 4.2. mitdiskutiert, da sie die dem INCA zugrundeliegende Methodik betreffen. In Kapitel 3.2. konnte gezeigt werden, dass der INCA geeignet ist, Thrombingenerierungskurven von Patienten ohne Antikoagulation zu erstellen und dass die ersten drei bis vier Minuten GRZ die Initiierungsphase repräsentieren, während nach fünf bis sechs Minuten die Verstärkungsphase einsetzt und sich ab circa acht bis zehn Minuten GRZ die Terminierungsphase anschließt. Die aussagekräftigsten INCA-Werte sind die nach vier bzw. fünf Minuten Gerinnungsreaktionszeit, während in der Terminierungsphase liegende INCA-Werte (nach > 10 min Gerinnungsreaktionszeit) aufgrund der einsetzenden Antithrombin-I-Wirkung von Fibrin, die als in-vitro-Artefakt zu werten ist, nicht dem physiologischen Ablauf der Gerinnung entsprechen. Auch ist mittels INCA eine ungefähre Bestimmung der basalen Thrombinaktivität möglich. Hämolytische Proben stellen eine mögliche Fehlerquelle dar: Sie verfälschen den INCA stark und führen zur Registrierung von falsch-hohen Thrombinaktivitäten. Eine korrekte Blutentnahme ist daher unbedingte Voraussetzung für die Gerinnungsdiagnostik mittels INCA.

Die in den Kapiteln 3.3., 3.12. und 3.13. beschriebenen Ergebnisse machen deutlich, wie unterschiedlich das Verhalten von nicht antikoagulierten Plasmaproben und solchen mit Antikoagulation im INCA ist. Eine Antikoagulation mit unfraktioniertem Heparin oder Cumarinen, die sich in einer auffälligen aPTT und/oder einem auffälligen Quick-Wert bzw. INR niederschlägt, wird im INCA registriert und führt zu einer später einsetzenden und geringer ausfallenden Thrombingenerierung, wie dies grafisch in den Abbildungen in Kapitel 3.3. zu sehen ist. Für die Gruppeneinteilung der Patientenplasmen wurden lediglich die aPTT und der Quick-Wert, nicht jedoch die INR, berücksichtigt, da der Quick-Wert bei Proben, die gar nicht oder nur schwach antikoaguliert sind, der INR vorzuziehen ist. In den Abbildungen wurde der besseren Übersichtlichkeit halber in der Legende nur der INR-Wert der Proben und nicht der zugehörige Quick-Wert angegeben. Die INR wurde hier dem Quick-Wert vorgezogen, weil der INR-Wert für Patienten mit Cumarintherapie im therapeutischen Bereich von INR 2–3 eine höhere Genauigkeit zulässt als der Quick-Wert und weil der therapeutische Bereich möglichst genau erfasst werden sollte. Aus dieser Überlegung heraus resultiert auch die Gruppenbezeichnung „erhöhte INR“.

Die Messung von 173 Plasmaproben (95 Plasmen von Patienten mit in der Norm liegenden Werten von aPTT und Quick, 42 Patientenplasmen mit erniedrigtem Quick-Wert und 36 Patientenplasmen mit verlängerter aPTT) zeigt, dass der Mittelwert der nach vier Minuten Gerinnungsreaktionszeit gebildeten Thrombinaktivität der nicht antikoagulierten Plasmen bei 0.199 IU/ml liegt, während der Mittelwert sowohl von den Plasmen mit verlängerter aPTT als auch von denen mit erniedrigtem Quick-Wert bzw. erhöhter INR um ca. das 10-fache niedriger ausfällt, was unterstreicht, dass der INCA sehr deutlich zwischen antikoagulierten und nicht antikoagulierten Plasmen zu unterscheiden vermag (Kapitel 3.13.). Es zeigt sich dementsprechend im Games-Howell-Test ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den INCA-4-Mittelwerten der Gruppen „erhöhte INR“ bzw. „verlängerte aPTT“ jeweils im Vergleich zu der Gruppe „nicht antikoaguliert“. Gleiches zeigt sich für die INCA-5-Mittelwerte. Jedoch zeigt sich weder für INCA-4 noch für INCA-5 ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gruppen „erhöhte INR“ und „verlängerte aPTT“, was die These unterstützt, dass INCA im Sinne eines „besonders globalen“

Globaltests die Antikoagulation mittels unfraktioniertem Heparin gleichermaßen erfasst wie die Antikoagulation mittels Cumarinderivaten – im Gegensatz zu aPTT und Quick-Wert bzw. INR, welche jeweils nur die Antikoagulation mit einem der genannten Medikamente adäquat zu erfassen vermögen.

Kommerzielle lyophilisierte, stabilisierte Plasmen generieren deutlich mehr Thrombin als frische Plasmen von Gesunden (Kapitel 3.5.) und sind daher nur eingeschränkt zur Kalibrierung des INCA geeignet. Ihre Thrombinaktivität darf nicht als Normwert des INCA angesehen werden.

Ist $\text{INCA-5/INCA-4} > 1$, zeigt dies, dass INCA-4 im aufsteigenden Teil der Kurve liegt und als Hauptwert herangezogen werden darf. Die ermittelten Normwerte für Gesunde (0.5 IU/ml Thrombinaktivität für INCA-4 und 1.9 IU/ml Thrombinaktivität für INCA-5) demonstrieren, dass dies bei Gesunden gewöhnlich der Fall ist (Kapitel 3.10.). Ergibt sich jedoch ein Wert < 1 , muss eine kürzere Gerinnungsreaktionszeit gewählt werden.

Die intra-assay und inter-assay Variationskoeffizienten von $< 10\%$ bzw. $< 15\%$ zeigen eine ausreichend hohe Genauigkeit für die von Hand pipettierte Testdurchführung (Kapitel 3.10.).

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des INCA ist bei zukünftigen Messungen besonders auf eine Standardisierung der Testbedingungen zu achten. Es konnte gezeigt werden, dass zahlreiche Veränderungen der Testbedingungen das Ergebnis des INCA mehr oder weniger stark beeinflussen:

- Die 20- μl -Testversion führt zur Generierung von geringeren Thrombinaktivitäten im Vergleich zur 50- μl -Testversion (Kapitel 3.3., Abb. 10, 12 und 15).
- Der Gebrauch von plättchenreichem Plasma führt im Vergleich zu plättchenarmem Plasma zu einem schnelleren Anstieg der Thrombinaktivität insbesondere in INCA-4 und zu deutlich höheren maximalen Thrombinaktivitäten (Kapitel 3.4.). Dies ist vermutlich auf die Bedeutung der Phospholipide der Plättchenmembran für die intrinsische Gerinnung zurückzuführen.
- Eine Lagerung der Plasmaproben bei Raumtemperatur für bis zu acht Stunden hat einen mäßigen Einfluss auf den INCA-4-Wert (Hauptwert), während INCA-5 nach achtstündiger Lagerung deutlich niedriger ausfällt. Nach Möglichkeit sollte die Lagerungszeit standardisiert werden (Kapitel 3.6.).

- Das Einfrieren und Auftauen von Plasmaproben ist zu vermeiden, da die Thrombingenerierung bei aufgetauten Proben stärker ausfällt, insbesondere gilt dies für INCA-4. Bei Proben, die bei -20 °C eingefroren/aufgetaut werden, muss mit einer in etwa um den Faktor zwei bis drei verstärkten Thrombingenerierung gerechnet werden (Kapitel 3.7.). Wird Plasma bei -80 °C eingefroren und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, ist der Effekt noch ausgeprägter (Abb. 23).
- Die Testtemperatur während der Gerinnungsreaktion sollte nach Möglichkeit physiologische 37 °C betragen. Bei Raumtemperatur ist hingegen mit einer Verlangsamung der Thrombingenerierung um das 1.7-fache im Vergleich zu 37 °C auszugehen (Kapitel 3.8.).
- Eine Kühlung von Plasmaproben ist zu vermeiden. Nach einstündiger Kühlung bei 4 °C bleibt zwar der INCA-4-Wert relativ stabil, jedoch verhalten sich die Plasmen nicht einheitlich. Bei einigen gekühlten Proben fallen insbesondere INCA-5 und/oder INCA-6 niedriger aus als bei den bei Raumtemperatur aufbewahrten Proben (Kapitel 3.9.).
- Auch die Zusammensetzung der Testmatrix muss unbedingt standardisiert sein, da eine Verdünnung der Matrix deutlich erhöhte Thrombinaktivitäten zur Folge hat (Kapitel 3.11., Abb. 28), d. h., dass die Aktivierung der Gerinnung bei Erhöhung des Matrixvolumens stärker ausfällt. Insbesondere die Zugabe von 10–40 µl 0.9% NaCl zeigt einen erheblichen Verstärkungseffekt. Optimal ist eine Testmatrix, die dem menschlichen Plasma so nah wie möglich kommt.
- Die Interaktion des Plasmas mit Plastikbehältern hat ebenfalls Auswirkungen auf das Ergebnis des INCA und sollte standardisiert werden. Plastikoberflächen können einen heparinähnlichen oder einen kontaktaktivierenden Einfluss haben. Die Verwendung von Mikrotiterplatten mit flachem Boden (F-wells) ist der von Platten mit rundem Boden (U-wells) vorzuziehen (Kapitel 3.10.). Multipettenaufsätze sollten vor Gebrauch gründlich mit H₂O gespült und entleert werden, da sie andernfalls ein Plastikmaterial mit heparinähnlicher Wirkung freisetzen und den INCA verfälschen können.
- Das PSL-Reagenz muss sachgerecht gelagert werden (d. h. gekühlt bei 6 °C) und darf nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden, da die Gerinnungsaktivierung sonst zu schwach ausfällt.

Werden jeweils der INCA-Wert einer festgesetzten GRZ und die aPTT von 193 Patienten-Plasmaproben miteinander korreliert (Kapitel 3.12.), zeigt sich ein schwacher bis mäßiger negativer Zusammenhang, der mit steigender Gerinnungsreaktionszeit zunimmt. Zwischen dem INCA und den beiden häufig eingesetzten Tests der

routinemäßigen Gerinnungsdiagnostik, aPTT und INR, ergab sich keine Korrelation mit $|r| > 0.6$. Dies bekräftigt, dass die Information, die der INCA über die Thrombingenerierung und damit über den Gerinnungsstatus der Proben liefert, durch keinen dieser etablierten Tests gewonnen werden kann.

Anhand von frischen Proben lässt sich die Thrombinaktivität am genauesten bestimmen. Deshalb wurden für bestimmte Teile der vorliegenden Arbeit (Kapitel 3.5., 3.6., 3.10. und Teile von Kapitel 3.2. und 3.7.) frische Proben von Gesunden verwendet. Diese Proben wurden zuvor ein bis drei Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Für die Untersuchungen, die in den Kapiteln 3.1., 3.3., 3.4., 3.8., 3.9., 3.12. und 3.13. sowie in Teilen des Kapitels 3.2. dargestellt sind, wurden Plasmaproben von Patienten mit oder ohne Antikoagulation verwendet. Diese Proben wurden vor den Untersuchungen sechs Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Der Grund für diese Lagerungszeit ist, dass diese Proben erst zum Zeitpunkt der Vernichtung übernommen wurden. Nur so konnte gewährleistet werden, dass gerinnungsanalytische Nachforderungen bis zu diesem Zeitpunkt möglich blieben. Anhand der für sechs Stunden gelagerten Proben von Patienten wurde erstmalig gezeigt, wie sich Patientenplasmen verhalten, wenn mittels INCA intrinsisch Thrombin generiert wird. Frischere Patientenplasmen standen hierzu für die vorliegende Arbeit nicht zur Verfügung. In nachfolgenden Arbeiten sollte, sofern dies durchführbar ist, eine feste Lagerungszeit von bis zu maximal drei Stunden gewählt werden. Der durch die Lagerungszeit verursachte systematische Fehler wurde in Kapitel 3.6. untersucht. In INCA ist eine Auswertung von bis zu acht Stunden gelagertem Plasma oder von Plasma, das aus für acht Stunden (unzentrifugiert) gelagertem Blut gewonnen wurde, zwar mit der genannten Störanfälligkeit verbunden aber grundsätzlich möglich. Anders ist es mit Thrombingenerierungstesten wie RECA (Stief 2008 d), die nur durch die Zugabe von Calcium und ohne intrinsischen oder extrinsischen Aktivator Thrombin generieren: Diese dürfen nicht zur Messung von länger als ca. zwei Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrten Proben herangezogen werden, denn die sehr schwache Aktivierung hat zur Folge, dass sie noch empfindlicher auf verlängerte Lagerungszeiten reagieren.

4.4. Schlussfolgerung und Ausblick

Die dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass der INCA das Potential hat, ein wertvolles diagnostisches Instrument in der klinischen Routine der Gerinnungslabore zu werden. Neue Testverfahren, die ähnlich wie der INCA, jedoch für andere Fragestellungen, konzipiert sind (Stief 2008 a, Stief 2013) und in der möglichen späteren Anwendung in Kombination mit dem INCA eingesetzt werden können, sind der Extrinsic Coagulation Activity Assay (EXCA) zur Testung des extrinsischen Gerinnungswegs (Stief et al. 2008), der Recalcified Coagulation Activity Assay (RECA) zur Detektion prokoagulatorischer Plasmaveränderungen (Stief 2008 d) sowie der F2a-Test zur Detektion des systemisch in Form von α_2 -Makroglobulin-Komplex-gebundener Form zirkulierenden Thrombins (Stief 2008 c).

Eine mögliche Fragestellung für zukünftige Forschungsvorhaben könnte sein, ob sich der INCA analog zur heute gebräuchlichen aPTT als Screeningtest für Funktionsstörungen im intrinsischen System (z. B. Hämophilie A und B) eignet und möglicherweise im EXCA eine passende Ergänzung findet als Screeningtest für Defekte im extrinsischen System analog zum heute gebräuchlichen Quick-Test bzw. INR. Zu beachten ist, dass sowohl INCA als auch EXCA zwar einen Teil der gemeinsamen Endstrecke beinhalten (FX und Thrombin), jedoch in Ergänzung mittels Thrombinzeit noch der letzte Schritt der plasmatischen Gerinnung, die Fibrinogen-Fibrin-Umwandlung, zu untersuchen ist, da INCA und EXCA diesen Schritt nicht erfassen.

Ein zweites mögliches Einsatzgebiet für den INCA könnte die Überwachung von Antikoagulantientherapie sein. Die zukünftige Forschung sollte sich zu diesem Zweck unter anderem damit befassen, ob es möglich ist, mithilfe des INCA eine eventuelle Über- oder Unterdosierung von bekannten Antikoagulantien sensitiver zu erfassen als mittels aPTT bzw. INR, indem geprüft wird, ob die etablierten Tests oder der INCA geeigneter sind, bei antikoagulierten Patienten (z. B. unter Dauertherapie mit Cumarinen, Heparin oder NMH) Blutungskomplikationen und thrombotische Komplikationen vorherzusagen. Hierzu bedarf es einer prospektiven nicht-interventionellen Studie mit hohen Fallzahlen, um aussagekräftige statistische Ergebnisse zu erlangen. Weiterhin könnte es Gegenstand der künftigen Forschung sein, wie sich die

neuen oralen Antikoagulanzen, die mit der Routinediagnostik, wie aPTT oder Quick-Test, nur unzureichend überwacht werden können (Bloemen et al. 2013 a, Cate 2013), auf den INCA auswirken und wie sich die derzeit noch in der Entwicklung bzw. noch nicht auf dem Markt befindlichen Antikoagulanzen auswirken, die ihren Angriffspunkt am Anfang der intrinsischen Kaskade haben.

Wenn sich der Nutzen des INCA für die Gerinnungsdiagnostik in weiteren Arbeiten bekräftigen lässt, wäre es wünschenswert, das Verfahren zu automatisieren, so dass es in verschiedenen Gerinnungslaboren nach festen Standards zur Anwendung kommen kann. So wäre es gegebenenfalls möglich, die derzeit diagnostisch vernachlässigte intrinsische Gerinnung weitaus stärker in der Gerinnungsdiagnostik und in Therapieentscheidungen zu berücksichtigen, was sowohl für die zahlreichen Patienten, die von Störungen oder medikamentösen Einflüssen im intrinsischen System betroffen sind, als auch für die behandelnden Ärzte einen großen medizinischen Fortschritt bedeuten könnte.

5. Zusammenfassungen

Thrombin activity based test for intrinsic coagulation

The Intrinsic Coagulation Activity Assay (INCA) is a new general chromogenic hemostasis test for the intrinsic pathway of blood coagulation. At the present time, the most common assay to measure intrinsic coagulation is the Activated Partial Thromboplastin Time (aPTT). Meanwhile it is generally recognized that the aPTT is not capable of reflecting the full spectrum of coagulation activation in terms of giving clear account of a normal coagulatory response or detecting prothrombotic and anticoagulatory stages. While being able to monitor unfractionated heparin therapy, the aPTT is unsuitable for monitoring therapy with many other anticoagulants. New thrombin generation assays, chromogenic and fluorogenic ones, have been introduced, but are hampered by the problem of fibrin formation, interference of contact activation, or the need for special calculation software and fluorescence readers, respectively. Furthermore, these assays have all been developed with focus on reflecting the extrinsic pathway. At the same time, the need for a sensitive assay for the intrinsic pathway is emphasized by the rising evidence of the part played by the intrinsic coagulation factors in pathologic thrombus formation and prothrombotic diseases.

INCA is designed for measuring thrombin activity in International Units (IU) using a chromogenic peptide substrate and a photometer. INCA involves two reactions which take place separately from each other: First the coagulation reaction is carried out by incubating 50 µl citrated plasma with 5 µl SiO₂ (Pathromtin® SL) and 250 mmol/l CaCl₂ in polystyrene flat-bottom wells at 37°C in a digitally controlled water bath. To obtain the most important part of a thrombin generation curve, after four or five minutes coagulation reaction time (CRT) the reaction is stopped by adding 100 µl of 2.5 mol/l arginine, pH 8.6, to inhibit hemostasis and depolymerize fibrin. After an incubation time of 20 minutes at room temperature, 50 µl of 1 mmol/l chromogenic peptide substrate CHG-Ala-Arg-pNA in 1.25 mol/l arginine, pH 8.7, is added (final concentration 0.24 mmol/l), starting the detection reaction. The chromogenic substrate is cleaved by thrombin releasing free pNA. In a microtiter plate photometer the change in absorbance (ΔA) is detected at 405 nm. For calibration, a standard containing 1 IU/ml thrombin is

used. INCA measured at four and five minutes CRT (INCA-4 and INCA-5) yields all necessary information for evaluating a plasma sample if INCA-5/INCA-4 ratio is greater than one, indicating that thrombin is measured in the ascending part of the curve, that is, in the phase of increasing thrombin activity.

This work shows that the normal thrombin activity of INCA-4 (main value) is about 0.5 IU/ml (= 100% of normal) and of INCA-5 (control value) is about 1.9 IU/ml (= 100% of normal), the normal range being $100\% \pm 30\%$ (mean value \pm standard deviation), determined by measuring 39 plasmas of healthy adults. A 10-fold measurement of pooled fresh normal plasma demonstrated that the intra-assay or inter-assay coefficients of variation are $< 10\%$ and $< 15\%$, respectively. The analysis of 173 patient plasmas revealed that the mean value for INCA-4 in patients with prolonged aPTT or increased International Normalized Ratio (INR) respectively was about 10% of the INCA-4 activity of patients without anticoagulation. The difference of the INCA-4 mean values of the groups „prolonged aPTT“ or „elevated INR“, respectively, compared to those patients without anticoagulation was statistically significant, which suggests that INCA reflects the therapeutic effect of heparins and coumarins. Correlations of INCA values with aPTT or INR values show a weak to moderate negative correlation. None of the correlations yield a value of $|r| > 0.6$, emphasizing that INCA provides unique information – beyond what can be assessed by the routine assays.

INCA is very sensitive to changes in the plasma matrix as dilution of the activator increases INCA values artificially. Also, pre-analytic freezing/thawing of plasma enhances the INCA-4 value. Storage of plasmas or whole blood samples at room temperature for up to eight hours results in a moderate change of INCA-4. A possible source of errors are hemolytic plasmas as they might generate about 10-fold more thrombin than normal plasmas, and interactions with plastic materials, such as the reaction well and multipette tips, which should be standardized.

As a result of three special features of the INCA, namely the use of arginine for hemostasis stabilization and fibrin depolymerization, the low concentration of the INCA activator (less than 5% of the contact activator amount of the aPTT), and the fast reacting chromogenic substrate, the INCA is extremely sensitive: INCA is suitable for

detecting thrombin in the range of 0.001 IU/ml, while the aPTT is able to do so in the range of 1–10 IU/ml.

Further research is needed to evaluate whether INCA can be used as a screening test for a dysfunctional intrinsic hemostasis system and whether INCA is helpful for more precisely monitoring anticoagulant therapies of various types. If so, INCA may become a valuable diagnostic instrument in the hemostasis laboratory, possibly capable of filling the gap in hemostasis analysis of the intrinsic pathway.

Thrombinaktivität basierter Test zur intrinsischen Gerinnung

Der Intrinsic Coagulation Activity Assay (INCA) ist ein neuer chromogener Globaltest für die intrinsische Blutgerinnung. Bisher ist die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) der am weitesten verbreitete Test zur Messung der intrinsischen Gerinnung, obgleich bekannt ist, dass die aPTT nicht in der Lage ist, das volle Spektrum der Gerinnungsaktivierung wiederzugeben, d. h. eine ausgeglichene Gerinnungsaktivität einerseits und prothrombotische oder antikoagulatorische Zustände andererseits klar als solche zu erkennen. Die aPTT eignet sich dazu, die Therapie mit unfraktioniertem Heparin zu überwachen, während sie für die Therapieüberwachung vieler anderer Antikoagulanzen nicht geeignet ist. Neue chromogene und fluorogene Thrombingenerierungsteste wurden entwickelt, konnten gewisse Probleme jedoch nicht überzeugend lösen: das Problem der Fibrinbildung, die Interferenz der Kontaktaktivierung und den Bedarf an spezieller Computersoftware und Fluorometer im Falle der fluorogenen Methoden. Darüber hinaus wurden alle diese Tests zur Messung der extrinsischen Gerinnung entwickelt. Die zunehmende Evidenz für die Bedeutung der Kontaktfaktoren für die pathologische Thrombusbildung und für prothrombotische Krankheitsbilder unterstreicht unterdessen den Bedarf an einem neuen sensitiven Test zur intrinsischen Gerinnung.

Der INCA misst die Thrombinaktivität in internationalen Einheiten (IU) unter Verwendung eines chromogenen Peptidsubstrats und eines Photometers. INCA beinhaltet zwei Reaktionen, welche getrennt voneinander ablaufen: Zuerst startet die Gerinnungsreaktion durch Inkubation von 50 µl Zitratplasma mit 5 µl SiO₂ (Pathromtin® SL) und 250 mmol/l CaCl₂ in Polystyrol-F-wells bei 37 °C in einem digital kontrollierten Wasserbad. Um den wichtigsten Teil einer Thrombingenerierungskurve zu erstellen, wird die Reaktion sodann nach vier bzw. fünf Minuten Gerinnungsreaktionszeit (GRZ) durch Zugabe von 100 µl 2.5 mol/l Arginin, pH 8.6, welches die Gerinnung inhibiert und Fibrin depolymerisiert, gestoppt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur werden 50 µl 1 mmol/l chromogenes Peptidsubstrat CHG-Ala-Arg-pNA in 1.25 mol/l Arginin, pH 8.7, zugefügt (finale Konzentration 0.24 mmol/l), um die Nachweisreaktion zu starten. Das chromogene Substrat wird von Thrombin gespalten und setzt pNA frei. In einem Mikrotiterplatten-

photometer wird der Absorptionsunterschied (ΔA) bei 405 nm registriert. Zur Kalibrierung dient ein Standard, welcher 1 IU/ml Thrombin enthält. INCA gemessen nach vier und fünf Minuten GRZ (INCA-4 und INCA-5) liefert die zur Beurteilung einer Plasmaprobe nötige Information, vorausgesetzt, dass der Quotient INCA-5/INCA-4 größer als eins ist, was anzeigt, dass Thrombin im ansteigenden Kurventeil gemessen wird.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die normale Thrombinaktivität von INCA-4 (Hauptwert) ca. 0.5 IU/ml (= 100% der Norm) und von INCA-5 (Kontrollwert) ca. 1.9 IU/ml (= 100% der Norm) beträgt. Wie durch die Messung von 39 Plasmen gesunder erwachsener Spender ermittelt wurde, ist der Normbereich $100\% \pm 30\%$ (Durchschnitt \pm Standardabweichung). Die 10-fach-Bestimmung eines frischen Normalplasmapools ergab einen intra-assay bzw. inter-assay Variationskoeffizienten von $< 10\%$ bzw. $< 15\%$. Die Analyse von 173 Patientenplasmen zeigte, dass der Durchschnittswert für INCA-4 bei Patienten mit verlängerter aPTT oder erhöhter International Normalized Ratio (INR) ca. 10% der INCA-4-Aktivität von nicht antikoagulierten Patienten beträgt. Der Unterschied in den INCA-4-Mittelwerten der Gruppen „verlängerte aPTT“ und „erhöhte INR“ jeweils im Vergleich zu den Nicht-Antikoagulierten war statistisch signifikant, was darauf hindeutet, dass der Effekt von Heparin und Cumarinderivaten von INCA erfasst wird. Die Korrelation von INCA-Aktivitäten mit der aPTT oder der INR zeigen einen schwachen bis mäßigen negativen Zusammenhang. Keine der Korrelationen ergab Werte mit $|r| > 0.6$, was unterstreicht, dass der INCA Informationen liefert, die über jene hinausgehen, welche mit den gängigen Gerinnungstesten gewonnen werden können.

INCA ist sehr empfindlich in Bezug auf Veränderungen der Plasmamatrix, so dass eine Verdünnung des Aktivators zu falsch-hohen INCA-Werten führt. Auch das präanalytische Einfrieren und Auftauen von Plasma erhöht den INCA-4-Wert. Die Lagerung von Plasma oder Vollblutproben bei Raumtemperatur für bis zu acht Stunden führt zu einer moderaten Veränderung von INCA-4. Eine mögliche Fehlerquelle sind hämolytische Plasmen, da sie verglichen mit normalen Plasmen ca. 10-mal mehr Thrombin generieren können, und Interaktionen mit Plastikoberflächen wie den Mikrotiterplatten und Multipettenspitzen, welche standardisiert werden sollten.

Aufgrund von drei Eigenheiten des INCA, nämlich dem Einsatz von Arginin zur Hämostasestabilisierung und Fibrindepolymerisierung, der geringen Aktivator-konzentration (weniger als 5% der Kontaktaktivatormenge der aPTT) und dem schnell reagierenden chromogenen Substrat, ist der INCA sehr empfindlich: INCA kann Thrombin in der Größenordnung von 0.001 IU/ml messen, während die aPTT Thrombin umgerechnet in der Größenordnung 1–10 IU/ml bestimmen kann.

Durch zukünftige Forschung ist zu klären, ob der INCA als Screeningtest für Funktionsstörungen im intrinsischen Gerinnungssystem geeignet ist und ob er dazu beitragen kann, die Therapieüberwachung von verschiedenartigen Antikoagulanzen zu verbessern. Wenn sich dies bestätigt, könnte INCA ein wertvolles diagnostisches Instrument in den Gerinnungslaboren werden, welches möglicherweise in der Lage wäre, die Lücke in der Gerinnungsanalyse des intrinsischen Systems zu schließen.

6. Literaturverzeichnis

- Al Dieri R, de Laat B, Hemker HC (2012): Thrombin generation: What have we learned? *Blood Rev* 26(5):197–203
- Appleton J (2002): Arginine: Clinical potential of a semi-essential amino acid. *Altern Med Rev* 7(6):512–522
- Arakawa H, Nishigai M, Ikai A (1989): α_2 -Macroglobulin traps a proteinase in the midregion of its arms. An immunoelectron microscopic study. *J Biol Chem* 5(264):2350–2356
- Baglin T (2005): The measurement and application of thrombin generation. *Br J Haematol* 130:653–661
- Barthels M, Bergmann F, Czwalinna A (2012): Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT). In: Barthels M (Hrsg.): *Das Gerinnungskompandium*. 2. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 371–386
- Becker U, Bartl K, Lill H, Wahlefeld AW (1985): Development of a photometric assay for activated partial thromboplastin time and its application to the Cobas Bio centrifugal analyzer. *Thromb Res* 40(6):721–730
- Becker U, Jering H, Bartl K, Jilek F (1984): Automated prothrombin-time test with use of a chromogenic peptide substrate and a centrifugal analyzer. *Clin Chem* 30(4):524–528
- Bloemen S, de Laat M, de Laat B, Hemker HC, Al Dieri R (2013 a): Will One Size of Anticoagulant Dosage Fit All? *Drug development research* 74:406–412
- Bloemen S, Hemker HC, Al Dieri R (2013 b): Large inter-individual variation of the pharmacodynamic effect of anticoagulant drugs on thrombin generation. *Haematologica* 98(4):549–554
- Bode W (2006): Structure and interaction modes of thrombin. *Blood Cells Mol Dis* 36(2):122–130
- Bosch Y, Al Dieri R, ten Cate H, Nelemans P, Bloemen S, Hemker C, Weerwind P, Maessen J, Mochtar B (2013): Preoperative thrombin generation is predictive for the risk of blood loss after cardiac surgery: a research article. *J Cardiothorac Surg* 8:154
- Broze GJ Jr. (1995): Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Annu Rev Med* 46:103–12
- Brummel KE, Paradis SG, Butenas S, Mann KG (2002): Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood* 100(1):148–152

- Brummel-Ziedins K, Vossen CY, Rosendaal FR, Umezaki K, Mann KG (2005): The plasma hemostatic proteome: thrombin generation in healthy individuals. *J Thromb Haemost* 3(7):1472–1481
- Butenas S, Mann KG (2007): Caution in the interpretation of continuous thrombin generation assays. *J Thromb Haemost* 5:1084–1085
- Calatzis AN, Kling M, Calatzis AL, et al. (1996): Fast and specific coagulation monitoring through modified thrombelastography. *Ann Hematol* 72(1):92
- Castoldi E, Rosing J (2011): Thrombin generation tests. *Thromb Res.* 127 Suppl 3:21–25
- Cate H ten (2013): New oral anticoagulants: discussion on monitoring and adherence should start now! *Thromb J* 11(1):8
- Cimmino G, Golino P (2013): Platelet biology and receptor pathways. *J Cardiovasc Transl Res* 6(3):299–309
- Clements JA, Willemsen NM, Myers SA, Dong Y (2004): The tissue kallikrein family of serine proteases: functional roles in human disease and potential as clinical biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci* 41(3):265–312
- Colman RW (2004): The contact system and angiogenesis: potential for therapeutic control of malignancy. *Semin Thromb Hemost* 30(1):45–61
- Colman RW (2006): Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin? *J Exp Med* 203(3):493–495
- Colman RW, Schmaier AH (1997): Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood* 90(10):3819–3843
- Coman D, Yapliito-Lee J, Boneh A (2008): New indications and controversies in arginine therapy. *Clin Nutr* 27(4):489–496
- Coughlin SR (1999): How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20):11023–11027
- Covic L, Gresser AL, Kuliopulos A (2000): Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry* 39(18):5458–5467
- Danø K, Reich E (1979): Plasminogen activator from cells transformed by an oncogenic virus: inhibitors of the activation reaction. *Biochim Biophys Acta.* 566(1):138–151

- Davidson SJ, Burman JF, Rutherford LC, Keogh BF, Yacoub MH (2001): High molecular weight kininogen deficiency: a patient who underwent cardiac surgery. *Thromb Haemost* 85(2):195–197
- Davie EW (2003): A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation. *J Biol Chem* 278(51):50819–50832
- Davie EW, Ratnoff OD (1964): Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 145:1310–1312
- Debela M, Hess P, Magdolen V, Schechter NM, Steiner T, Huber R, Bode W, Goettig P (2007): Chymotryptic specificity determinants in the 1.0 A structure of the zinc-inhibited human tissue kallikrein 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(41):16086–16091
- Duga S, Salomon O (2013): Congenital factor XI deficiency: an update. *Semin Thromb Hemost* 39(6):621–631
- Efron B (1979): Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. *Ann Statist* 7(1):1–26
- Efron B, Tibshirani R (1986): Bootstrap Methods for Standard Errors, Confidence Intervals, and Other Measures of Statistical Accuracy. *Statist Sci* 1(1):54-75
- Eichinger S, Hron G, Kollars M, Kyrle PA (2008): Prediction of recurrent venous thromboembolism by endogenous thrombin potential and D-dimer. *Clin Chem* 54(12):2042–2048
- Fareed J, Ma Q, Florian M, Maddineni J, Iqbal O, Hoppensteadt DA, Bick RL (2004): Differentiation of low-molecular-weight heparins: impact on the future of the management of thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 30 Suppl 1:89–104
- Feistritzer C, Mosheimer BA, Kaneider NC, Riewald M, Patsch JR, Wiedermann CJ (2004): Thrombin affects eosinophil migration via protease-activated receptor-1. *Int Arch Allergy Immunol* 135(1):12–16
- Festoff BW, Smirnova IV, Ma J, Citron BA (1996): Thrombin, its receptor and protease nexin I, its potent serpin, in the nervous system. *Semin Thromb Hemost* 22(3):267–271
- Foley JH, Kim PY, Mutch NJ, Gils A (2013): Insights into thrombin activatable fibrinolysis inhibitor function and regulation. *J Thromb Haemost* 11(Suppl. 1):306–315
- Friberger P (1983): Synthetic peptide substrate assays in coagulation and fibrinolysis and their application on automates. *Semin Thromb Hemost* 9(4):281–300

- Fujikawa K, Coan MH, Legaz ME, Davie EW (1974): The mechanism of activation of bovine factor X (Stuart factor) by intrinsic and extrinsic pathways. *Biochemistry* 13(26):5290–5299
- Gallimore MJ, Friberger P (1991): Chromogenic peptide substrate assays and their clinical applications. *Blood Rev* 5(2):117–127
- Gallwitz M, Enoksson M, Thorpe M, Hellman L (2012): The Extended Cleavage Specificity of Human Thrombin. *PLoS One* 7(2): e31756
- Girolami A, Scarparo P, Candeo N, Lombardi AM (2010): Congenital prekallikrein deficiency. *Expert Rev Hematol* 3(6):685–695
- Gomez K, Tuddenham EGD, McVey J (2010): Normal haemostasis. In: Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham EGD, Green AR (Hrsg.): *Postgraduate Haematology*. 6. Aufl. Wiley-Blackwell, Chichester, 746–771
- Goodnough LT, Saito H, Ratnoff OD (1983): Thrombosis or myocardial infarction in congenital clotting factor abnormalities and chronic thrombocytopenias: a report of 21 patients and a review of 50 previously reported cases. *Medicine (Baltimore)* 62(4):248–255
- Gruber A (2014): The role of the contact pathway in thrombus propagation. *Thromb Res* 133 Suppl 1:45–47
- Hagedorn I, Schmidbauer S, Pleines I, Kleinschnitz C, Kronthaler U, Stoll G, Dickneite G, Nieswandt B (2010): Factor XIIa inhibitor recombinant human albumin Infestin-4 abolishes occlusive arterial thrombus formation without affecting bleeding. *Circulation* 121(13):1510–1517
- Haidl H, Cimenti C, Leschnik B, Zach D, Muntean W (2006): Age-dependency of thrombin generation measured by means of calibrated automated thrombography (CAT). *Thromb Haemost* 95(5):772–775
- Hartert H (1948): Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. *Klin Wochenschr* 26:577–583
- Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S (2006): Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost* 96(5): 553–561
- Hemker HC, Béguin S (2000): Phenotyping the clotting system. *Thromb Haemost* 84(5):747–751
- Hemker HC, De Smedt E (2007): Caution in the interpretation of continuous thrombin generation assays: a rebuttal. *J Thromb Haemost* 5: 1085–1087

- Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoord R, Lecompte T, Béguin S (2002): The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 32(5–6):249–253
- Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R, Lecompte T, Béguin S (2003): Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 33(1):4–15
- Hemker HC, Giesen PL, Ramjee M, Wagenvoord R, Béguin S (2000): The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost* 83:589–591
- Hemker HC, Wienders S, Kessels H, Béguin S (1993): Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thromb Haemost* 70(4):617–624
- Hinsbergh VW van (2012): Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol* 34(1):93–106
- Hoffman M (2003): Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis* 16(1–2):17–20
- Huntington JA (2008): How Na⁺ activates thrombin--a review of the functional and structural data. *Biol Chem* 389(8):1025–1035
- Kitchens CS (2005): To bleed or not to bleed? Is that the question for the PTT? *J Thromb Haemost* 3:2607–2611
- Lackner KJ, Peetz D (2003): Hämostaseologie. In: Renz H (Hrsg.): *Integrative Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin*. Walter de Gruyter, Berlin New York, 209–243
- Langdell RD, Wagner RH, Brinkhous KM (1953): Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests; a presumptive test for hemophilia and a simple one-stage antihemophilic factor assay procedure. *J Lab Clin Med* 41(4):637–647
- Lechtenberg BC, Freund SM, Huntington JA (2014): GpIb α interacts exclusively with exosite II of thrombin. *J Mol Biol* 426(4):881–893
- Lippi G, Salvagno GL, Ippolito L, Franchini M, Favaloro EJ (2010): Shortened activated partial thromboplastin time: causes and management. *Blood Coagul Fibrinolysis* 21(5):459–463
- Löwenberg EC, Meijers JC, Levi M (2010): Platelet-vessel wall interaction in health and disease. *Neth J Med*. 68(6):242–251

- Lupu F, Keshari RS, Lambris JD, Mark Coggeshall K (2014): Crosstalk between the coagulation and complement systems in sepsis. *Thromb Res* 133 Suppl 1:28–31
- Maas C, Oschatz C, Renné T (2011): The plasma contact system 2.0. *Semin Thromb Hemost* 37(4):375–381
- MacFarlane RG (1964): An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. *Nature* 202:498–499
- MacFarlane RG, Biggs R (1953): A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J Clin Pathol* 6(1):3–8
- MacKinnon DP (2008): *Introduction to Statistical Mediation Analysis*. 1. Aufl. Lawrence Erlbaum Associates, New York London, 333–335
- Mackman N, Tilley RE, Key NS (2007): Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(8):1687–1693
- Madlener K, Pötzsch B (2010): Hämostasesystem. In: Pötzsch B, Madlener K (Hrsg.): *Hämostaseologie*. 2. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York, 7–12
- Malovichko MV, Sabo TM, Maurer MC (2013): Ligand binding to anion-binding exosites regulates conformational properties of thrombin. *J Biol Chem* 288(12):8667–8678
- Margolis J (1958): The kaolin clotting time: a rapid one-stage method for diagnosis of coagulation defects. *J Clin Pathol* 11(5):406–409
- Marlar RA, Kleiss AJ, Griffin JH (1982): An alternative extrinsic pathway of human blood coagulation. *Blood* 60(6):1353–1358
- Matafonov A, Cheng Q, Geng Y, Verhamme IM, Umunakwe O, Tucker EI, Sun MF, Serebrov V, Gruber A, Gailani D (2013): Evidence for factor IX-independent roles for factor XIa in blood coagulation. *J Thromb Haemost* 11(12):2118–2127
- Mina A, Favalaro EJ, Koutts J (2012): Relationship between short activated partial thromboplastin times, thrombin generation, procoagulant factors and procoagulant phospholipid activity. *Blood Coagul Fibrinolysis* 23:203–207
- Montfoort ML van, Meijers JC (2013): Anticoagulation beyond direct thrombin and factor Xa inhibitors: indications for targeting the intrinsic pathway? *Thromb Haemost* 110(2):223–232

- Mosesson MW (2007): Update on antithrombin I (fibrin). *Thromb Haemost* 98(1):105–108
- Müller F, Gailani D, Renné T (2011): Factor XI and XII as antithrombotic targets. *Curr Opin Hematol* 18(5):349–355
- Nickel KF, Renné T (2012): Crosstalk of the plasma contact system with bacteria. *Thromb Res* 130 Suppl 1:78–83
- Ninivaggi M, Dargaud Y, van Oerle R, de Laat B, Hemker HC, Lindhout T (2011): Thrombin generation assay using factor IXa as a trigger to quantify accurately factor VIII levels in haemophilia A. *J Thromb Haemost* 1549–1555
- Niu W, Chen Z, Bush-Pelc LA, Bah A, Gandhi PS, Cera E Di (2009): Mutant N143P Reveals How Na⁺ Activates Thrombin. *J Biol Chem* 284(52): 36175–36185
- Ofosu FA (2002): The blood platelet as a model for regulating blood coagulation on cell surfaces and its consequences. *Biochemistry (Mosc)* 67(1):47–55
- Ofosu FA, Dewar L, Craven SJ, Song Y, Cedrone A, Freedman J, Fenton JW 2nd (2008): Coordinate activation of human platelet protease-activated receptor-1 and -4 in response to subnanomolar alpha-thrombin. *J Biol Chem* 283(40): 26886–26893
- Østerud B, Berre A, Otnaess AB, Bjorklid E, Prydz H (1972): Activation of the coagulation factor VII by tissue thromboplastin and calcium. *Biochemistry* 11(15):2853–2857
- Østerud B, Rapaport SI (1977): Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12):5260–5264
- Ott I (2010): Tissue Factor (TF). In: Pötzsch B, Madlener K (Hrsg.): *Hämostaseologie*. 2. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York, 130–145
- Petrides PE (2007): Blut. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (Hrsg.): *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York, 951-1000
- Pitney WR, Dacie JV (1953): A simple method of studying the generation of thrombin in recalcified plasma; application in the investigation of haemophilia. *J Clin Pathol* 6(1):9–14
- Pötzsch B, Madlener K (2010): Thrombingenerierung und endogenes Thrombinbildungspotential. In: Pötzsch B, Madlener K (Hrsg.): *Hämostaseologie*. 2. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York, 873–876

- Preissner KT (2010): Vitamin-K-abhängige Gerinnungsfaktoren. In: Pötzsch B, Madlener K (Hrsg.): Hämostaseologie. 2. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York, 159–168
- Proctor RR, Rapaport SI (1961): The partial thromboplastin time with kaolin: a simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiencies. *Am J Clin Pathol* 36:212–219
- Quick AJ (1935): The prothrombin in hemophilia and in obstructive jaundice. *J Biol Chem* 109:83
- Ramjee MK (2000): The use of fluorogenic substrates to monitor thrombin generation for the analysis of plasma and whole blood coagulation. *Anal Biochem* 277(1):11–18
- Ratnoff OD, Colopy JE (1955): A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma. *J Clin Invest* 34(4):602–613
- Regnault V, Hemker HC, Wahl D, Lecompte T (2004): Phenotyping the haemostatic system by thrombography--potential for the estimation of thrombotic risk. *Thromb Res* 114(5–6):539–545
- Reininger AJ (2008): VWF attributes--impact on thrombus formation. *Thromb Res* 122 Suppl 4:9–13
- Renné T (2010): Kontaktfaktoren. In: Pötzsch B, Madlener K (Hrsg.): Hämostaseologie. 2. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York, 204–212
- Renné T, Pozgajová M, Grüner S, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, Gailani D, Nieswandt B (2005): Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med* 202(2):271–281
- Revenko AS, Gao D, Crosby JR, Bhattacharjee G, Zhao C, May C, Gailani D, Monia BP, MacLeod AR (2011): Selective depletion of plasma prekallikrein or coagulation factor XII inhibits thrombosis in mice without increased risk of bleeding. *Blood* 118(19):5302–5311
- Rivera J, Lozano ML, Navarro-Nunez L, Vicente V (2009): Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica* 94(5):700–711
- Róka L, Rasche H (1980): Blutgerinnungsdiagnostik mit chromogenen Substraten. *Internist (Berl)* 21(4):189–194
- Rydholm HE, Falk P, Eriksson E, Risberg B (1998): Thrombin signal transduction of the fibrinolytic system in human adult venous endothelium in vitro. *Scand J Clin Lab Invest* 58(4):347–352

- Salomon O, Steinberg DM, Koren-Morag N, Tanne D, Seligsohn U (2008): Reduced incidence of ischemic stroke in patients with severe factor XI deficiency. *Blood* 111(8):4113–4117
- Salomon O, Steinberg DM, Zucker M, Varon D, Zivelin A, Seligsohn U (2011): Patients with severe factor XI deficiency have a reduced incidence of deep-vein thrombosis. *Thromb Haemost* 105(2):269–273
- Salvagno GL, Berntorp E (2010): Thrombin generation testing for monitoring hemophilia treatment: a clinical perspective. *Semin Thromb Hemost* 36(7): 780–790
- Scarabin PY, Hemker HC, Clément C, Soisson V, Alhenc-Gelas M (2011): Increased thrombin generation among postmenopausal women using hormone therapy: importance of the route of estrogen administration and progestogens. *Menopause* 18(8):873–879
- Sherry S, Troll W (1945): The action of thrombin on synthetic substrates. *J Biol Chem* 208(1):95–105
- Siegemund T, Siegemund A (2012): Thrombingenerierungstest. In: Barthels M (Hrsg.): *Das Gerinnungskompodium*. 2. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 400–412
- Siegerink B, Govers-Riemslog JW, Rosendaal FR, ten Cate H, Algra A (2010): Intrinsic coagulation activation and the risk of arterial thrombosis in young women: results from the Risk of Arterial Thrombosis in relation to Oral contraceptives (RATIO) case-control study. *Circulation* 122(18):1854–1861
- Siemens Healthcare Diagnostics Inc. (2013): Hämostase-Diagnostik von Siemens Healthcare Diagnostics. URL: http://www.healthcare.siemens.de/siemens_hwem-hwem_ssxa_websites-context-root/wcm/idc/siemens_hwem-hwem_ssxa_websites-context-root/wcm/idc/groups/public/@de/@lab/documents/download/mdax/ntky/~edisp/dx-de-haemostase-diagnostik-shd-reagenzien-kontrollen-kalibratoren-09-01-13-00837732.pdf [Stand: 11.10.2014]
- Stavenuiter F, Dienava-Verdoold I, Boon-Spijker MG, Brinkman HJ, Meijer AB, Mertens K (2012): Factor seven activating protease (FSAP): does it activate factor VII? *J Thromb Haemost* 10(5):859–866
- Stegner D, Nieswandt B (2011): Platelet receptor signaling in thrombus formation. *J Mol Med (Berl)* 89(2):109–121

- Stief TW (2006 a): Inhibition of intrinsic thrombin generation. *Drug Target Insights* 1:5–10
- Stief TW (2006 b): Specific determination of plasmatic thrombin activity. *Clin Appl Thromb Hemost* 12(3):324–329
- Stief TW (2007 a): Arginine inhibits serpins. *Clin Appl Thromb Hemost* 13(2):213–218
- Stief TW (2007 b): Inhibition of thrombin in plasma by heparin or arginine. *Clin Appl Thromb Hemost* 13(2):146–153
- Stief TW (2008 a): Innovative tests of plasmatic hemostasis. *Lab-Medicine* 39:225–230
- Stief TW (2008 b): Kallikrein activates prothrombin. *Clin Appl Thromb Hemost* 14(1):97–98
- Stief TW (2008 c): The laboratory diagnosis of the pre-phase of pathologic disseminated intravascular coagulation. *Hemostasis Laboratory* 1:3–19
- Stief TW (2008 d): The recalcified coagulation activity. *Clin Appl Thromb Hemost* 14(4):447–453
- Stief TW (2013): *Clinical Biochemistry of Thrombin*. *Hemostasis Laboratory* 6(1):1–11
- Stief TW, Klingmüller V (2012): Diagnostic ultrasound augments intrinsic coagulation activity. In: Stief TW (Hrsg.): *Thrombin: Function and Pathophysiology*. Nova Science Publishers, New York, 131–147
- Stief TW, Weippert M, Kretschmer V, Renz H (2001): Arginine inhibits hemostasis activation. *Thromb Res* 104(4):265–274
- Stief TW, Wiczerzak A, Renz H (2008): The extrinsic coagulation activity assay. *Clin Appl Thromb Hemost* 14(3):303–318
- Svendsen L, Blombäck B, Blombäck M, Olsson PJ (1972): Synthetic chromogenic substrates for determination of trypsin, thrombin and thrombinlike enzymes. *Thromb Res* 1:267–278
- Svendsen L, Stocker K (1977): Determination of protease activities with specifically constructed peptide-p-nitroanilide derivatives. In: Witt I (Hrsg.): *New methods for the analysis of coagulation using chromogenic substrates*. De Gruyter, Berlin, 23–35
- Technoclone GmbH (2010): *Technothrombin® TGA*. URL: http://www.technoclone.com/pdf/folder/files/TGA001E.013_Technothrombin%20TGA.pdf [Stand: 11.10.2014]
- Thrombinoscope BV a (o. J.): *Thrombinoscope*. URL: <http://www.thrombinoscope.com/about-thrombinoscope/thrombinoscope/> [Stand: 11.10.2014]

- Thrombinoscope BV b (o. J.): How to measure the Thrombogram – The Thrombinoscope Software Program. URL: <http://www.thrombinoscope.com/method-products/method/> [Stand: 11.10.2014]
- Tripodi A, Pellegatta F, Chantarangkul V, Grigore L, Garlaschelli K, Baragetti A, Lemma L, Catapano A (2014): Statins decrease thrombin generation in patients with hypercholesterolemia. *Eur J Intern Med* 25(5):449–451
- Veen JJ van, Laidlaw S, Swanevelder J, Harvey N, Watson C, Kitchen S, Makris M (2009): Contact factor deficiencies and cardiopulmonary bypass surgery: detection of the defect and monitoring of heparin. *Eur J Haematol* 82(3):208–212
- Wakita H, Furukawa F, Takigawa M (1997): Thrombin and trypsin induce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 gene expression in cultured normal human keratinocytes. *Proc Assoc Am Physicians* 109(2):190–207
- Whelihan MF, Orfeo T, Gissel MT, Mann KG (2010): Coagulation procofactor activation by factor XIa. *J Thromb Haemost* 8(7):1532–1539
- Witt I (1991): Test systems with synthetic peptide substrates in haemostaseology. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 29(6):355–374
- Woodruff RS, Sullenger B, Becker RC (2011): The many faces of the contact pathway and their role in thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* 32(1):9–20
- Woodruff RS, Xu Y, Layzer J, Wu W, Ogletree ML, Sullenger BA (2013): Inhibiting the intrinsic pathway of coagulation with a factor XII-targeting RNA aptamer. *J Thromb Haemost* 11(7):1364–1373
- Wu G, Morris SM Jr (1998): Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336 (Pt 1):1–17
- Young G, Sørensen B, Dargaud Y, Negrier C, Brummel-Ziedins K, Key NS (2013): Thrombin generation and whole blood viscoelastic assays in the management of hemophilia: current state of art and future perspectives. *Blood* 121(11):1944–1950

Eigene Publikationen:

Stief TW, Otto S, Renz H (2006): The intrinsic coagulation activity assay. Blood Coagul Fibrinolysis 17(5):369-378

Stief TW, Otto S, Renz H (2007): Influence of coagulation factors on intrinsic thrombin generation. Blood Coagul Fibrinolysis 18(1):67-71

Stief TW, Otto S, Renz H (2009): Intrinsic hemostasis activation by freezing and thawing of plasma. Clin Appl Thromb Hemost 15(1):59-64

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die plasmatische Gerinnung mit intrinsischem und extrinsischem System	9
Abb. 2: Die Interaktionen der Kontaktfaktoren auf einer Oberfläche	11
Abb. 3: Thrombingenerierungskurve	32
Abb. 4: Die Indikatorreaktion des INCA	39
Abb. 5: Trübungsabnahme durch Argininzusatz	45
Abb. 6: Gerinnungsinhibition durch Argininzusatz	46
Abb. 7: Plasma von gesunden Spendern in der INCA-Kinetik	47
Abb. 8: Plasma von gesunden Spendern in der INCA-Frühphase	48
Abb. 9: Patientenplasmen der Gruppe „nicht antikoaguliert“ einzeln und als Pool	48
Abb. 10: Plasmen von Nicht-Antikoagulierten verglichen mit Plasmen von Antikoagulierten	51
Abb. 11: Vergleich von Plasmen der Gruppe „nicht antikoaguliert“ mit „erhöhte INR“-Plasmen	52
Abb. 12: Nicht antikoagulierte und antikoagulierte Plasmen gepoolt und als Einzelproben	52
Abb. 13: Kinetik verschiedener Patientenplasmen im INCA	53
Abb. 14: Frühphase der Kinetik verschiedener Patientenplasmen im INCA	53
Abb. 15: Patientenplasmen in der 20- μ l-Testversion (mit Spätphase)	54
Abb. 16: Einfluss von Plättchen auf den INCA, Messung mit PAP	55
Abb. 17: Einfluss von Plättchen auf den INCA, Messung mit PRP	55
Abb. 18: Verhalten von lyophilisierten Plasmen im INCA	56
Abb. 19: Blut- bzw. Plasmalagerung bei Raumtemperatur	57
Abb. 20: Kinetik von ungefrorenen Plasmen in der 20- μ l-Testversion	59
Abb. 21: Kinetik eingefrorener/aufgetauter Plasmen in der 20- μ l-Testversion	59
Abb. 22: Tieffrieren und Auftauen von Plasma bei verschiedenen Temperaturen (1) ...	60
Abb. 23: Tieffrieren und Auftauen von Plasma bei verschiedenen Temperaturen (2) ...	60
Abb. 24: Auswirkung der Testtemperatur im INCA (37 °C)	61

Abb. 25: Auswirkung der Testtemperatur im INCA (23 °C)	62
Abb. 26: Lagerung von Plasma bei Raumtemperatur für sieben Stunden	63
Abb. 27: 4 °C-Kühlung von Plasma für eine Stunde	63
Abb. 28: Volumenzusatz zum INCA-Aktivator (1)	65
Abb. 29: Volumenzusatz zum INCA-Aktivator (2)	65
Abb. 30: Korrelation von aPTT und INCA-4	67
Abb. 31: Korrelation von aPTT und INCA-5	67
Abb. 32: Korrelation von aPTT und INCA-6.....	68
Abb. 33: Korrelation von aPTT und INCA-8 bzw. INCA-12	68
Abb. 34: Korrelation von INR und INCA-5	69
Abb. 35: Korrelation von Fibrinogenkonzentration und INCA-5	69
Abb. 36: Korrelation von INCA-4 und INCA-5.....	70
Abb. 37: INCA-4-Mittelwerte nach Gruppenzugehörigkeit aufgetragen	71
Abb. 38: INCA-5-Mittelwerte nach Gruppenzugehörigkeit aufgetragen	72

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Komponenten der Hämostasesysteme und ihre Wirkungen auf die Gerinnung und auf mit der Gerinnung verknüpfte Prozesse	3
Tabelle 2: Ablauf der primären Gerinnung in vier Phasen	5
Tabelle 3: Plasmatische Gerinnungsfaktoren und Cofaktoren	8
Tabelle 4: Zusammenfassung der Thrombinwirkungen und der bei Thrombin ansetzenden Regelmechanismen	19
Tabelle 5: Durchführung des Intrinsic Coagulation Activity Assay	41
Tabelle 6: Levene-Statistik	72
Tabelle 7: Games-Howell-Test und biaskorrigierte 95%-Konfidenzintervalle	74

7.3. Abkürzungsverzeichnis

a	aktiviert (z. B. FXa = aktivierter Faktor X)
A	spektrales Absorptionsmaß (kurz: Absorption)
ADP	Adenosintriphosphat
Ala	Alanin
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMC	7-Amino-4-Methylcumarin
ANBA	5-Amino-2-Nitro-Benzoesäure
APC	aktiviertes Protein C
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit (engl. Activated Partial Thromboplastin Time)
Arg	Arginin
Asp	Aspartat, Asparaginsäure
BC	bias-korrigiert
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	ionisiertes Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAT	Calibrated Automated Thrombogram
CHG	Cyclohexylglycin
CL-well	Kalibrierungswell (Mikrotiterplattenvertiefung zur Kalibrierung)
CRT	Coagulation Reaction Time
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung (engl. Disseminated Intravascular Coagulation)
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor
ETP	endogenes Thrombinbildungspotential (d. h. die Fläche unter der Thrombingenerierungskurve) bzw. Endogenes Thrombinpotential der Firma Siemens Healthcare Diagnostics
EXCA	Extrinsic Coagulation Activity Assay
F	Faktor (z. B. FX = Faktor X)

Thrombinaktivität basierter Test zur intrinsischen Gerinnung

FluCa	von Hemker et al. (2003) beschriebene Pufferlösung enthaltend CaCl ₂ und das fluorogene Substrat Z-Gly-Gly-Arg-AMC
FSAP	Faktor VII aktivierende Protease
F-well	Mikrotiterplattenvertiefung mit flachem Boden
g	Gramm
g	g-Kraft bzw. Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung
Glu	Glutamin
Gly	Glycin
GP	Glykoprotein bzw. Glykoproteinrezeptor
GRZ	Gerinnungsreaktionszeit
h	Stunde
His	Histidin
HK	hochmolekulares Kininogen
H ₂ O	Wasser
INCA	Intrinsic Coagulation Activity Assay
INCA-x	Thrombinaktivität nach x Minuten Gerinnungsreaktionszeit
INR	International Normalized Ratio
IU	internationale Einheiten (engl. International Units)
KK	Kallikrein
l	Liter
LMW	Low Molecular Weight
Lys	Lysin
mA	Milliabsorption
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MNA	2-Methoxy-4-Nitroanilin
mol	Mol

Thrombinaktivität basierter Test zur intrinsischen Gerinnung

n	Probenanzahl
Na ⁺	ionisiertes Natrium
nm	Nanometer
NMH	niedermolekulares Heparin
nmol	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor
PAP	plättchenarmes Plasma
PAR	proteaseaktivierbarer Rezeptor
pH	pH-Wert
Phe	Phenylalanin
PK	Präkallikrein
PL	Phospholipid
pmol	Pikomol
pNA	p-Nitroanilin
PRP	plättchenreiches Plasma
PSL	Pathromtin® SL
PT	Prothrombinzeit (engl. Prothrombin Time); Synonyme: Quick-Test, Thromboplastinzeit
PTT	partielle Thromboplastinzeit
r	Korrelationskoeffizient
RECA	Recalcified Coagulation Activity Assay
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
sct-PA	einkettige tissue-type-Plasminogenaktivator-Proform
scu-PA	einkettige urokinase-type-Plasminogenaktivator-Proform
Ser	Serin
Serpin	Serinproteaseinhibitor

Thrombinaktivität basierter Test zur intrinsischen Gerinnung

SiO ₂	Siliciumdioxid
TAFI	thrombinaktivierbarer Fibrinolyseinhibitor
tct-PA	zweikettige tissue-type-Plasminogenaktivator-Proform
TF	Gewebefaktor (engl. Tissue Factor)
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TG-well	Thrombingenerierungswell (Mikrotiterplattenvertiefung zur Thrombingenerierung)
t-PA	tissue-type-Plasminogenaktivator
TZ	Thrombinzeit
U	Einheit (engl. Unit)
u-PA	urokinase-type-Plasminogenaktivator
U-well	Mikrotiterplattenvertiefung mit rundem Boden
Val	Valin
vWF	Von-Willebrand-Faktor
Z	Benzyloxycarbonyl
ΔA	Absorptionsunterschied
μl	Mikroliter
μmol	Mikromol

7.4. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Adamkiewicz, Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Baumann, Becker, Bertalanffy, Bien, Bolm, Boudriot, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Del Rey, Dünne, Eilers, Feuser, Gerdes, Görg, Gotthardt, Gotzen, Grau, Griss, Grundmann, Grzeschnik, Gudermann, Hasilik, Hemmeter, Hertl, Hoeffken, Hofmann, Hörle, Jungclas, Kill, Klaus, Klenk, Klose, Knobloch von, König, Koolmann, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kühnert, Lang, Lenz, Lill, Löffler, Lohoff, Lüers, Lührmann, Maier, Maisch, Mandrek, Mennel, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Radsak, Ramaswamy, Rausch, Renschmidt, Renz, Richter, Röhm, Röper, Rosenow, Rothmund, Sahmland, Schäfer, Schmidt, Schmidt S., Schnabel, Schrader, Seitz, Steiniger, Stief, Stiletto, Vedder, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wilhelm, Wulf und Zettl.

Meine akademischen Lehrer in Gießen waren die Damen und Herren:

Schmidt und Weiler.

7.5. Danksagung

Herrn PD Dr. med. Thomas W. Stief möchte ich für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, die hervorragende Betreuung, die stete Ansprechbarkeit und Hilfsbereitschaft sowie für die wertvollen Anregungen sehr herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. med. Harald Renz und den Mitarbeitern des Zentrallabors bin ich für die Überlassung eines Laborarbeitsplatzes und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit sehr dankbar.

Frau Dr. med. Aleksandra Hirsch danke ich ganz besonders für ihre Freundschaft, den anregenden fachlichen Austausch und die stete Ermutigung.

Ich danke Herrn Dipl.-Psych. Jan Spilski sehr herzlich für seine investierte Zeit, für die sehr hilfreichen Gespräche und die großartige Unterstützung in Form von Beratung und Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Herrn Mathias Ricken, Ph.D., danke ich sehr herzlich für die orthographische Korrektur der englischen Zusammenfassung.

Meinem Ehemann Johannes Otto bin ich zutiefst dankbar für sein Mittragen und Ermutigen und für seine tatkräftige Hilfe – sei es durch orthographische Korrekturen, Textformatierung oder durch die Beaufsichtigung unserer Tochter. Mit unzähligen Dingen hat er mich unterstützt und mir so dazu verholfen, diese Arbeit fertig zu stellen.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meiner Mutter für ihr stetes Interesse, viele hilfreiche Gespräche und ihren Zuspruch sowie bei meiner Schwester, meinen Schwiegereltern und meiner Schwägerin für ihre Unterstützung und ihre aufbauenden Worte.