

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

1. Medizinische Klinik und Poliklinik des
Klinikums rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz)

Zirkulierender Tissue Faktor und Mikropartikel bei Patienten mit akuter venöser Thrombose

Jörg Martin Hassenpflug

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. I. V. Ott

2. Univ. Prof. Dr. K.-L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 13.11.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.04.2016 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeine Einführung	1
1.1.1	Epidemiologische Daten	1
1.1.2	Definition der akuten venösen Thrombose und Manifestation der venösen Thromboembolie	1
1.2	Mechanismen der venösen Thrombose	3
1.2.1	Einführung	3
1.2.2	Grundlagen der Hämostase	4
1.2.3	Mechanismen der Thrombusbildung	6
1.3	Bedeutung von Tissue Factor und Mikropartikeln	8
1.3.1	Einführung	8
1.3.2	Zusammenhang von Tissue Factor und malignen Tumoren	9
1.3.3	Zirkulierende Mikropartikel	10
1.3.4	Antikoagulatorische Mechanismen	13
1.3.5	Zusammenhang zwischen Inflammation und Thrombose	14
1.4	Diagnostik der venösen Thrombose	18
1.4.1	Einführung	18
1.4.2	Diagnostische Methoden	18
1.5	Zielsetzung der Arbeit	21
2	Studienaufbau	22
2.1	Studienpopulation und Einschlusskriterien	22
2.2	Ausschlusskriterien	22
2.3	Kontrollgruppe	22
2.4	Studiendesign	22
3	Material und Methoden	23
3.1	Anamnese und Diagnostik	23
3.2	Probengewinnung	23

3.3	Grundlagen des Verfahrens zur Bestimmung der prokoagulatorischen Tissue Faktor Aktivität	24
3.4	Messung der prokoagulatorischen Tissue Factor-Aktivität im Blutplasma	25
3.5	Messung der mikropartikelassozierten prokoagulatorischen Aktivität	26
3.6	Quantifizierung von zirkulierendem Tissue Factor-Antigen	27
3.7	Plasmakonzentrationsbestimmung von Prothrombinfragment F1+2	27
3.8	Konzentrationsbestimmung der Entzündungsmediatoren	28
3.9	Weitere Labordiagnostik	29
3.10	Statistische Auswertung	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Charakterisierung der Studienpopulation	31
4.2	Ergebnisse der Gerinnungsdiagnostik	33
4.3	Ergebnisse der Zytokindiagnostik	33
5	Diskussion	35
5.1	Einleitung	35
5.2	Beurteilung der Tissue Factor-Aktivität bei akuter venöser Thromboembolie	35
5.3	Zusammenhang von Inflammation, Thrombose und Tissue Factor	38
5.4	Limitierung	41
6	Zusammenfassung	42
7	Abkürzungsverzeichnis	44
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	45
9	Literaturangaben	46
10	Teilveröffentlichung	61
11	Lebenslauf	62
12	Danksagung	63

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

1.1.1 Epidemiologische Daten

Die venöse Thromboembolie (VT) ist als ein Krankheitskomplex zu betrachten, bei dem das klinische Bild einer Phlebothrombose (PT) oder einer Lungenarterienembolie (LAE) im Vordergrund steht. Die jährliche Inzidenz der PT wird in den USA durchschnittlich mit 48-122/100.000 Personen und die der Lungenembolie durchschnittlich mit 23/100.000 Personen angegeben (Bulger et al., 2004). In Westeuropa ergibt sich mit etwa 1,5 Ereignissen pro 1000 Einwohner pro Jahr eine ähnliche Inzidenz für die PT (Cohen et al., 2007). Während die Anzahl der ersten VT bei Kindern bis zu 15 Jahren mit weniger als fünf pro 100.000 pro Jahr gering ist, steigt sie bei über 80-jährigen Personen auf 450 bis 600 pro 100.000 pro Jahr an (White, 2003). In der Bundesrepublik Deutschland wurden laut statistischem Bundesamt im Jahr 2005 unter der Hauptdiagnose I80 (Thrombose, Phlebitis und Thrombophlebitis) 49.703 Patienten stationär behandelt. Etwa ein Drittel der symptomatischen Patienten erkranken an einer LAE. Sie stellt eine potenziell lebensbedrohliche akute Erkrankung dar, deren Prognose durch die frühzeitige Diagnostik und effektive gerinnungshemmende Therapie bestimmt wird. Die Mortalität einer akuten LAE erreicht etwa 10% innerhalb der ersten drei Monate (Laporte et al., 2009). Auf der Grundlage von autoptischen Studien wird in Deutschland die Anzahl der Todesfälle in Folge einer LAE auf 10.000 - 25.000 pro Jahr geschätzt (Lignitz et al., 1995; Marshall, 1986).

1.1.2 Definition der akuten venösen Thrombose und Manifestation der venösen Thromboembolie

Die venöse Thrombose manifestiert sich am häufigsten als tiefe Becken-Bein-Venenthrombose (TVT) oder als Lungenarterienembolie (LAE). Bei der akuten TVT handelt es sich um eine partielle oder vollständige Verlegung der tiefen Leit- und Muskelvenen durch ein intravasales Blutgerinnsel. Solche Gerinnsel neigen zum Wachstum und können in die Lungen embolisieren, wobei mehr als 90% der

Lungenarterienembolien auf Thrombosen der unteren Extremität zurückzuführen sind (Girolami et al., 1995; Hull et al., 1986). Teilweise kommt es im Verlauf zu einer bindegewebigen Organisation der Thromben, überwiegend aber zu einer Rekanalisation der Venen mit Zerstörung der Venenklappen. Diese Veränderungen führen bei 20 bis 50% der betroffenen Patienten zur Entwicklung einer chronischen Veneninsuffizienz in Form eines postthrombotischen Syndroms (Kahn et al., 2008; Prandoni et al., 1996).

Verschiedene Faktoren gehen mit einem erhöhten Thromboserisiko einher. Zu diesen gehören vorübergehende und reversible Ereignisse wie operative Eingriffe, Traumata, Immobilisation, Bettlägerigkeit, lange Reisen, Östrogentherapie und Schwangerschaft, während andere wie beispielsweise Malignome oder das Antiphospholipidsyndrom anhaltende und irreversible Faktoren darstellen (Rosendaal, 1999). Zu den genetischen und damit angeborenen Defekten, die mit einer VT assoziiert sind, zählen Mängel an gerinnungshemmenden Faktoren wie Antithrombin, Protein C und Protein S sowie Mutationen bei Faktor-V-Leiden und beim Prothrombin-20210A-Gendefekt (Dahm et al., 2003).

Die VT kann abhängig von der An- oder Abwesenheit von Risikofaktoren in eine provozierte (sekundäre) oder eine primäre (idiopathische) Form eingeteilt werden (Zhu et al., 2009). Bei 25% bis 50% der Patienten mit erstmaliger VT ist das Auftreten als idiopathisch einzuordnen, ohne dass ein Risikofaktor festzustellen war (White, 2003).

Eine gute theoretische Einschätzung der individuellen Risikosituation vermittelt das Vogel-Modell (Vogel, 1994). Danach kommt es zur Manifestation einer Thrombose, wenn die Summe akut auftretender Faktoren und einer ständig vorhandenen Anfälligkeit für thrombotische Ereignisse einen gewissen Schwellenwert überschreitet.

1.2 Mechanismen der venösen Thrombose

1.2.1 Einführung

Trotz der großen Häufigkeit und den schwerwiegenden Ausprägungen der VT, ist der genaue Pathomechanismus bisher nicht bis ins letzte Detail verstanden.

Nach wie vor stellt die Virchow'sche Trias (Virchow, 1856) eine gute Hypothese für die Entstehung der venösen Thrombose dar, obwohl die einzelnen pathogenetischen Faktoren Stase, Schädigung der Gefäßwand und Hyperkoagulabilität mit immer neuen Einblicken in molekulare Mechanismen heute wesentlich differenzierter zu betrachten sind.

Im Gegensatz zur arteriellen Thrombose scheint die Gefäßwandverletzung nicht der Auslöser der venösen Thrombose zu sein (Sevitt, 1974). Eine Ausnahme stellt in diesem Zusammenhang das vermehrte Auftreten von venösen Thrombosen nach operativen Eingriffen wie beispielsweise dem Hüftgelenkersatz dar, bei denen es auch durch eine direkte Verletzung von venösen Gefäßen zur Entstehung einer VT kommen kann (Stamatakis et al., 1977).

Venöse Thromben bestehen aus einer fibrinreichen Region mit eingeschlossenen Erythrozyten (roter Thrombus) und einer zum größten Teil aus Thrombozyten bestehenden Region (weißer Thrombus). Der fibrinreiche Thrombusteil liegt im Querschnitt der intakten venösen Gefäßwand an, während sich der thrombozytenreiche weiße Thrombus dem roten Thrombus auflagert, ohne selbst Kontakt zur Gefäßwand zu haben. Diese Thrombuseigenschaften, die schon 1974 von Sevitt beobachtet wurden, weisen auf eine Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems als Auslöser der VT hin (Sevitt, 1974). Der Mechanismus der Thrombozytenaktivierung, der nach Endothelverletzung durch Kontakt zu subendothelialelem Gewebe und Tissue Factor (TF) als Initiator der arteriellen Gefäßthrombose gilt (Furie and Furie, 2008), ist bei der venösen Thrombusbildung erst im weiteren Verlauf von Bedeutung (Lopez et al., 2004). Dies erklärt auch den sehr erfolgreichen Einsatz von Thrombozyten-Aggregationshemmern wie Acetylsalicylsäure bei der Prävention von arteriellen Thrombosen (Baigent et al., 2009; Patrono, 2001) und ihre nur bedingte Wirksamkeit bei der venösen Thromboseprophylaxe (Patrono et al., 1998).

Es gibt jedoch ebenfalls Hinweise auf eine tragende Rolle von zirkulierendem TF bei einer arteriellen Thrombusbildung ohne Plaqueruptur oder nur oberflächlicher Endothelläsion. Entsprechend dieser Annahme korrelierten in verschiedene Studien erhöhte Konzentrationen von zirkulierendem TF mit einem vermehrten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse sowie einer erhöhten Mortalität nach akutem Koronarsyndrom (Morange et al., 2006; Steppich et al., 2009).

Hauptsächlich werden Phlebothrombosen durch eine Hyperkoagulabilität und Stase im venösen Blutsystem ausgelöst. Die Hyperkoagulabilität ist als vermehrte Gerinnbarkeit des Blutes definiert und abhängig von einer Vielzahl von unterschiedlichen Faktoren. Angeborene Gendefekte, vermehrtes Auftreten prokoagulatorischer Faktoren und ein Mangel an Gerinnungsinhibitoren tragen hierzu bei. Schon früh konnte die Stase als ein möglicher Hauptverursacher eines thrombotischen Geschehens in venösen Gefäßen erkannt werden. Die fehlende Blutzirkulation und damit einhergehende Hypoxie, vor allem im Bereich der Venenklappen, konnte in unterschiedlichen Studien sowie phlebographischen Untersuchungen bestätigt werden (Lund et al., 1969; Sevitt, 1974).

Insgesamt gesehen ist eine venöse Thromboembolie vor allem in ihrer Initiation ein multifaktorielles Ereignis, dessen Ursache im Einzelnen stark variieren kann. Die molekularen Mechanismen sind bis zum heutigen Tage nicht bis ins Letzte verstanden.

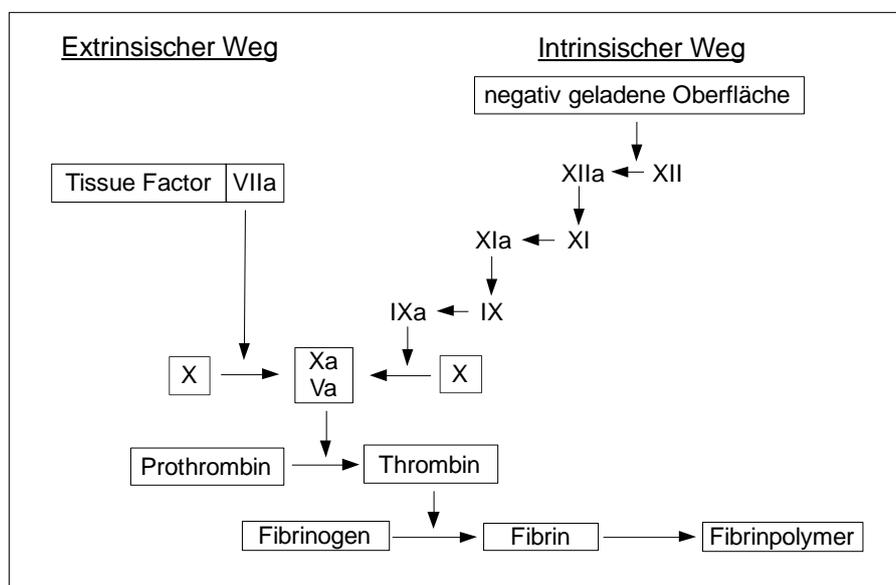
1.2.2 Grundlagen der Hämostase

Die Hämostase (Blutstillung) beschreibt einen pathophysiologischen Mechanismus, der sich sowohl im arteriellen als auch venösen Gefäßsystem abspielen kann. Sie gewährleistet die Beendigung von Blutungen und wird ermöglicht durch eine plasmatische (Koagulation, Fibrinbildung) sowie eine zelluläre Komponente (Plättchenadhäsion und deren Aktivierung). Die Blutgerinnung beim Menschen ist eine komplexe Kaskade von Aktivierungsschritten, die letztendlich zur Bildung eines Blutgerinnsels führen.

Die Gerinnungskaskade besteht aus einem intrinsischen und einem extrinsischen Weg (MacFarlane, 1964; Davie and Ratnoff, 1964). Von einem intrinsischen (endogenen) Weg wird gesprochen, wenn Blut an negativ geladenen Oberflächen gerinnt. Dabei wird durch Aktivierung des Gerinnungsfaktors XII, der im Blut zirkuliert, eine Kaskade mit Aktivierung von Faktor XI und Faktor IX in Gang gesetzt. Nach heutigem Kenntnisstand spielt der intrinsische Weg im Sinne einer Oberflächenkontaktaktivierung bei der Initiierung der Gerinnung *in vivo* jedoch eher eine untergeordnete Rolle, beispielsweise beim Kontakt von Blut mit künstlichen Oberflächen (Courtney and Forbes, 1994). So wiesen Patienten mit einem Mangel an Faktor XII, dem Initiatorprotein des intrinsischen Weges, im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie keine gesteigerte Blutungsneigungen auf (Lammle et al., 1991).

Der extrinsische (exogene) Weg wird unter pathophysiologischen Umständen ausgelöst, wenn Plasma mit Zellen in Kontakt kommt, die TF exprimieren. Beide Wege haben in der Aktivierung des Gerinnungsfaktors Faktor X ihre gemeinsame Endstrecke. Faktor Xa bildet mit Faktor Va, Calcium und Prothrombin den Prothrombinasekomplex, der die Bildung von Thrombin ermöglicht. Die wichtigste Funktion von Thrombin bei der Thrombusbildung ist es, Fibrinogen in Fibrinmonomere umzuwandeln, die in der Lage sind, sich untereinander in Fibrinpolymeren zu vernetzen (**Abbildung 1**).

Abbildung 1: Klassische Einteilung der Gerinnungskaskade in ein intrinsisches und ein extrinsisches System. (MacFarlane, 1964; Davie and Ratnoff, 1964).



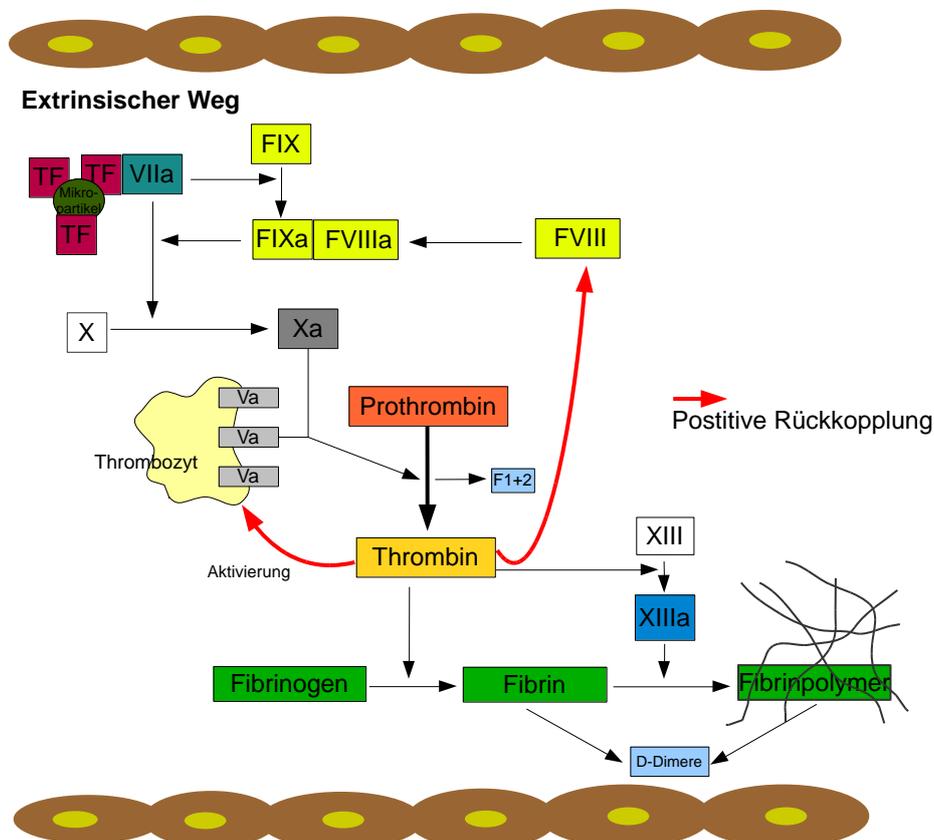
1.2.3 Mechanismen der Thrombusbildung

Bei der Thrombozytenaktivierung im Rahmen der Thrombusbildung scheinen also zwei unterschiedliche Wege eine Rolle zu spielen. Diese werden aufgrund von tierexperimentellen Studien mit *knock out* Mäusen diskutiert (Dubois et al., 2006; Mangin et al., 2006). Beim intrinsischen Weg erfolgt die Thrombozytenaktivierung durch freiliegendes Kollagen bei Gefäßverletzungen. Im Falle der extrinsischen Aktivierung führt die Exposition von TF gegenüber zirkulierendem Vollblut zur Thrombinbildung, welches wiederum über eine positive Rückkopplung zur Aktivierung von Thrombozyten beiträgt. Genauer zu betrachten ist im Zusammenhang mit der venösen Thrombose die Möglichkeit der Thrombusbildung ohne Gefäßverletzung. In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Thrombusbildung auch in Abwesenheit von Endothelverletzungen initiiert werden kann und unabhängig ist von ‚von Willebrand Faktor‘ (Dubois et al., 2007) und Glykoprotein VI (Dubois et al., 2006).

Die Thrombusbildung wird ausgelöst durch einen Komplex aus TF und der Serinprotease Faktor VIIa (FVIIa), die alleine nur eine schwache Proteaseaktivität besitzt (Eilertsen and Osterud, 2004). Erst nach Bindung an TF und in der Gegenwart von negativ geladenen Phospholipiden wie Phosphatidylserin (PS), welche sich u.a. auf der Oberfläche von Mikropartikeln befinden, steigt die katalytische Aktivität stark an (Kunzelmann-Marche et al., 2000; Ruf et al., 1991). Im nächsten Schritt wandelt der TF/FVIIa Komplex in Gegenwart von Ca^{2+} das Proenzym Faktor X (FX) in seine aktive Form, FXa, um. FXa kann auch durch einen Tenasekomplex gebildet werden, der sich aus dem vom TF/FVIIa-Komplex aktivierten Faktor IX, aktiviertem Faktor VIII, Ca^{2+} und Faktor X zusammensetzt. In der initialen Phase der Blutgerinnung ist dieser Aktivierungsweg nicht von Bedeutung. Mit zunehmender Entstehung von Thrombin wird jedoch auch FVIII aktiviert und dem Tenasekomplex zur Verfügung gestellt. Dieser positive Feedback-Mechanismus wird auch als Josso-Schleife bezeichnet. Der aktivierte Faktor X (FXa) kann nun zusammen mit seinem Coenzym, FVa, der sich auf der phosphatidylserinreichen Oberfläche von aktivierten Thrombozyten befindet, den Prothrombinasekomplex bilden, der zur Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin führt. Bei der Bildung von Thrombin wird als Nebenprodukt Prothrombinfragment (F1+2) am aminoterminalen Ende von

Prothrombin abgespalten (Aronson et al., 1977). Thrombin aktiviert im letzten Schritt der plasmatischen Gerinnung Fibrinogen zu Fibrin, den fibrinstabilisierenden Faktor XIII, sowie die Faktoren V, VII und VIII im Zuge der positiven Rückkopplung (Bruhn, 2007). Zusätzlich ist Thrombin einer der potentesten Agonisten der Thrombozytenaktivierung und trägt dadurch in einem positiven Feedback-Kreislauf mit Thrombinaktivierung und Fibrinbildung maßgeblich zur Bildung des weißen Thrombusanteils der venösen Thrombose bei. Thrombin bindet dabei vor allem an PARs (protease aktivated receptors) an der Thrombozytenoberfläche, wobei sich die prokoagulatorische Aktivität von Thrombozyten im *ex vivo* Experiment um bis zu einem Fünffachen erhöhte (Andersen et al., 1999). Die Aktivierung wird durch die anionischen Phospholipide Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) hervorgerufen, die in großem Ausmaß die Anordnung von aktivierten Gerinnungsfaktoren auf der Thrombozytenoberfläche hervorrufen. (**Abbildung 2**).

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Thrombusbildung bei intaktem Gefäßendothel. Nähere Erläuterungen im Text.



1.3 Bedeutung von Tissue Factor (TF) und Mikropartikeln

1.3.1 Einführung

Das menschliche TF-Gen setzt sich aus 12,4 Kilobasenpaaren zusammen. Es besteht aus fünf Introns und sechs Exons, von denen die Exons 2-5 für die Kofaktor- und Rezeptorfunktion der extrazellulären Domäne kodieren (Koyama et al., 1994). TF ist ein einzelkettiges, integrales 47 Kilodalton schweres membranständiges Glykoprotein der Subklasse II der Zytokin-Rezeptor-Superfamilie (Osterud, 1997), zu der auch Interferon- α/β - und Interferon- γ -Rezeptoren gehören. Es wird von 263 Aminosäuren (AS) gebildet, welche sich gemäß ihrer räumlichen Anordnung in eine lösliche extrazelluläre, aus 219 AS bestehende und als Rezeptor für Faktor VII/VIIa agierende Domäne, eine 23 AS beinhaltende unlösliche transmembranäre, sowie eine zytoplasmatische, 21 AS umfassende Komponente untergliedern lassen. Die zytoplasmatische Domäne verfügt über drei Serinreste, die potenzielle Phosphorylierungsorte darstellen (Siegbahn, 2000).

Tissue Factor wird im Wesentlichen von Zellen exprimiert, die Blutgefäße umgeben. Das Endothel verhindert dabei den Kontakt des stark wirksamen Auslösers der Gerinnungskaskade mit dem im Blutplasma zirkulierenden Liganden Faktor VII/VIIa (Morrissey et al., 1993). Die Exposition von Blut zu TF kann nur unter spezifischen, meistens pathologischen Umständen auftreten. Dazu gehören Gefäßverletzungen, Strukturdefekte an Gefäßwänden, angiogenetische Stimulation, TF-tragende Mikropartikel (Giesen et al., 1999) oder das Eindringen von größeren Zahlen an TF-exprimierenden Zellen in die Blutbahn (Chen et al., 2001; Fernandez and Rickles, 2002; Morrissey, 2001). Der Gehalt an TF in Mikropartikeln steigt bei schweren Krankheitsbildern wie Sepsis oder Malignomen und wird "blood-borne" (*engl.* „im Blut entstanden“) TF genannt. Er ist möglicherweise verantwortlich für das erhöhte Thromboserisiko bei bestimmten Krankheitsbildern.

TF kann außerdem vermehrt in gut vaskularisierten Organen wie Plazenta, Herz, Gehirn, Nieren und Lungen nachgewiesen werden und liefert dem entsprechenden Organ einen zusätzlichen Schutz vor Blutungen. Verschiedene Zelltypen, die die Blutgefäße umgeben, tragen dabei TF auf ihrer Oberfläche. So exprimieren Fibroblasten der Adventitia, Gefäßmuskelzellen, Keratinozyten der Haut,

Astrogliazellen im Gehirn und Myozyten im Herz vermehrt TF (Cui et al., 1996; Drake et al., 1989). Von allen Zellen, die direkten Kontakt zum Blut haben (Blutzellen und Zellen der Gefäßwände) besitzen Monozyten als einzige Blutzellen nachweisbare mRNA für TF und sind somit zur Synthese von TF fähig. Die Regulation der Expression liegt auf der Transkriptionsebene (Edgington et al., 1991). Da in Endothelzellen *in vivo* bisher keine TF-Synthese nachgewiesen werden konnte, sind Monozyten die bisher einzig gesicherte Quelle für eine TF-induzierte VT bei intaktem Gefäßendothel (Osterud, 2010).

Neben der Hämostase konnte TF eine weitere wichtige Bedeutung bei der Neoangiogenese im embryonalen Entwicklungsstadium zugeschrieben werden. 1996 konnte bei TF *knock out* Mäusen in verschiedenen Arbeitsgruppen eine Letalität von bis zu 90% am zehnten Entwicklungstag aufgrund von Defekten im Gefäßaufbau festgestellt werden (Bugge et al., 1996; Carmeliet et al., 1996; Toomey et al., 1996). Weitere Funktionen von TF bei der tumorassoziierten Angiogenese (Contrino et al., 1996) oder der Wundheilung (Nakagawa et al., 1998) konnten daraufhin belegt werden.

1.3.2 Zusammenhang von Tissue factor und malignen Tumoren

Bei Malignompatienten ist die Wahrscheinlichkeit einer venösen Thromboembolie (VT) im Vergleich zur Normalbevölkerung signifikant erhöht. Das Risiko, an einer VT zu erkranken, steigt um ein Vierfaches und bei zusätzlicher Chemotherapie sogar um das Sechsfache (Heit, 2005). Umgekehrt kann beim Auftreten einer tiefen Venenthrombose ohne erkennbare Risikofaktoren in etwa 10% der Fälle ein bis dahin nicht bekanntes Malignom erkannt werden (Piccioli and Prandoni, 2001).

Eine Vielzahl von klinischen Studien hat das Auftreten von Tissue Factor im Zusammenhang mit malignen Geschehen in den Mittelpunkt gestellt. Viele Tumorzellen exprimieren TF. Dazu gehören die Zellen von kolorektalen Karzinomen, Pankreaskarzinomen, Prostatakarzinomen, Mammakarzinomen, malignen Gliomen, Leberzellkarzinomen, malignen Melanomen, Nierenzellkarzinomen und ovariellen Tumoren (Rickles et al., 1995). Der Grad der TF-Expression variiert dabei zwischen

den verschiedenen Tumoren und nimmt mit zunehmenden Tumorstadien weiter zu (Kakkar et al., 1995). Die erhobenen Daten lassen außerdem einen Zusammenhang zwischen TF und Tumorangiogenese vermuten. Ein Hinweis auf diesen Zusammenhang ist die Korrelation zwischen TF-Expression und der Dichte von Mikrogefäßen, deren Ausprägung ein etablierter Marker für die Tumorangiogenese ist (Vrana et al., 1996).

1.3.3 Zirkulierende Mikropartikel

Es konnte nachgewiesen werden, dass TF auch im Blutplasma zirkulieren kann (Contrino et al., 1996; Koyama et al., 1994), wobei er zum großen Teil an Mikropartikel gebunden ist (Giesen et al., 1999) oder in einer löslichen alternativ gespleißten Form vorliegt (Bogdanov et al., 2003). Für die Gerinnungsaktivierung sind beide TF-Formen von Bedeutung, im Besonderen aber die Mikropartikel-assoziierte Form. TF kann desweiteren in einer inaktivierten (eng.: encrypted) und einer durch die Proteindisulfidomerase (PDI) direkt aktivierten (eng.: decrypted) TF-Form vorliegen. Dieser Aktivierungsmechanismus konnte bisher bei der arteriellen Thrombose im Mausmodell nachgewiesen werden (Reinhardt et al., 2008). Thrombozyten sind in der Lage nach Aktivierung die PDI zu sezernieren (Cho et al., 2008) und könnten einen wichtigen Beitrag zur Aktivierung von zirkulierendem oder an Mikropartikel gebundenem TF bei der Entstehung von Thrombosen leisten (Osterud, 2001).

Mikropartikel (MP), die vor 40 Jahren erstmals als Zellnebel beschrieben wurden, sind Fragmente, die aus Zellen unter dem Einfluss von Zellaktivierung, Apoptose, Zellreifung oder mechanischem Stress freigesetzt werden. Sie sind von einer Plasmamembran umgeben und können im Blut unter physiologischen Bedingungen zirkulieren. Bei einem Durchmesser von 0,1 bis 0,8 µm enthalten sie nur eine minimale Menge an Cytosol. Ihrem proteinreichen Inhalt fehlt DNA, sie besitzen aber die Möglichkeit RNA zu transportieren (Deregibus et al., 2007). Mikropartikel können aus unterschiedlichen Zelltypen hervorgehen. Hierzu gehören vor allem Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten und endotheliale Zellen. Vermutlich aufgrund der speziellen Plasmamembranaktivität und Zelladhäsion am Endothel (Reininger et al.,

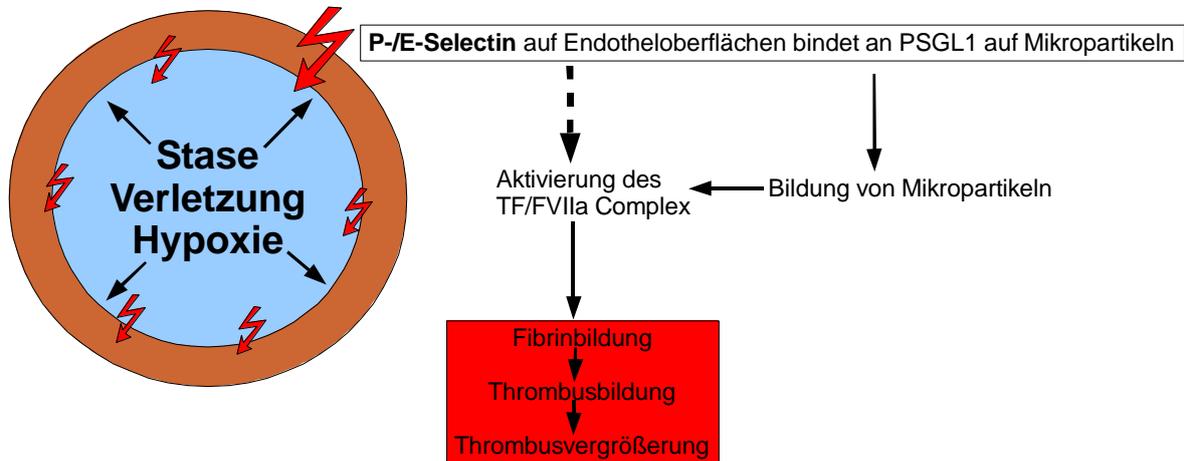
2006) ist der Anteil an zirkulierenden Mikropartikeln mit thrombozytärem Ursprung im Blut beim Gesunden mit 70-90% am größten. Ihr Beitrag zur Gesamtmenge der Mikropartikel hängt aber von pathologischen Veränderungen ab und u.a. mit dem Ausmaß an zellulärer Schädigung zusammen. Bei gesunden Individuen zirkulieren nur geringe Mengen an Mikropartikeln im Blut (Berckmans et al., 2001). Ihre Zahl nimmt unter bestimmten pathologischen Veränderungen zu, wobei ihr zellulärer Ursprung für die jeweilige Krankheit charakteristisch ist. Thrombozytäre Mikropartikel sind bei Myokardinfarkt (Mallat et al., 2000), Hypertension (Preston et al., 2003), Diabetes (Nomura et al., 1995) und Malignomen erhöht. Die Zahl der endothelialen Mikropartikel erhöht sich beim akuten Koronarsyndrom (Mallat et al., 2000) und Diabetis mellitus Typ I (Sabatier et al., 2002). Bei Diabetikern sind auch Mikropartikel mit leukozytärem Ursprung im Vergleich zu Gesunden erhöht (Sabatier et al., 2002).

Die Bedeutung von Tissue Factor und Mikropartikeln bei thrombotischen Ereignissen konnte in den letzten Jahren immer mehr geklärt werden. Falati et al. wiesen 2002 erstmals mit Hilfe intravaskulärer Fluoreszenzmikroskopie eine Beteiligung von TF bei der arteriellen Thrombusentstehung *in vivo* nach (Falati et al., 2002). Es folgten weitere Studien, die das Model der arteriellen Thrombusentstehung unterstützen. Dabei wird dem TF im Bereich der verletzten Gefäßwand eine wichtige Rolle bei ihrer Initiierung bescheinigt. Die durch subendothelialen TF hervorgerufene Thrombinbildung führt zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Thrombozyten in das Thrombusgebiet. Im weiteren Verlauf reichert sich durch Interaktion von P-Selectin und PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand-1) im Blut zirkulierender mikropartikel-gebundener TF (MP-TF) an und begünstigt eine verstärkte Fibrinbildung, die wiederum eine Thrombusvergrößerung zu Folge hat. MP-TF stellt auf diese Weise einen Großteil des im arteriellen Thrombus befindlichen TF (Chou et al., 2004). Zusätzlich konnte in Studien zur venösen Thrombose gezeigt werden, dass eine TF-Inhibition die Thrombusgröße nach dem Auslösen der Blutgerinnung in Jugularvenen negativ beeinflusst (Himber et al., 2003). Ein Anstieg an thrombozytären Mikropartikeln bedingt wiederum eine Größenzunahme (Ramacciotti et al., 2009). Im Rahmen klinischer Untersuchungen konnten erhöhte MP-Werte bei TVT Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erhoben werden (Rectenwald et al., 2005).

Das prokoagulatorische Potential von Mikropartikeln beruht auf einer Vielzahl von verschiedenen Mechanismen, die die Thrombose initiieren und zusätzlich verstärken können. Als ein Zeichen ihrer prothrombotischen Eigenschaft können MPs bei Mäusen mit Hämophilie A die verlängerten Blutungszeiten normalisieren (Hrachovinova et al., 2003). Membrangebundener TF und anionische Phospholipide, die sich auf der Mikropartikeloberfläche präsentieren, tragen zu diesen Eigenschaften bei (Lechner and Weltermann, 2008), ebenso auch der P-Selectin-Rezeptor PSGL-1, der von Leukozyten und Thrombozyten gebildet wird und auf den daraus entstehenden Mikropartikeln präsentiert wird. P-Selectin, das zur Familie der Zelladhäsionsmoleküle gehört, ist u.a. für das Leukozytenrollen am Gefäßendothel *in vivo* verantwortlich (Mayadas et al., 1993). Venöse Stase und Ischämie verursachen an Gefäßendothelzellen eine Hochregulation von P-Selectin, welches im Tiermodell zu einer Mikropartikeladhäsion durch PSGL-1 im Stasebereich führt und die Thrombusgenese begünstigt (Myers et al., 2003; Myers and Wakefield, 2005; Polgar et al., 2005). Die P-Selectin/PSGL-1-Interaktion führt durch Zelladhäsion weiterhin zu einer verstärkten Produktion von Mikropartikeln mit monozytärem, thrombozytärem und endothelialeem Ursprung (Hartwell et al., 1998). Aber auch ohne die Beteiligung von Endothelzellen sind durch P-Selectin stimulierte Blutzellen zur Mikropartikelbildung fähig (Hrachovinova et al., 2003). Da dieselben Mikropartikel neben TF auch das negativ geladene Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche exprimieren können, welches die katalytische Aktivität der Verbindung von Tissue Factor und Faktor VIIa nochmals erhöht, kann es zu einer weiteren Aktivierung der Thrombusbildung kommen.

Zusammen führen die beschriebenen Abläufe, wie in **Abbildung 3** verdeutlicht, zur Thrombusentstehung und einer weiteren Thrombusvergrößerung (Deregibus et al., 2007). Weiter verdeutlicht wird dieser Zusammenhang durch Studien an P-Selectin *knock out* Mäusen, in denen Thromben eine verminderte TF- und Fibrin-Anreicherung verglichen mit der von *Wildtyp* Mäusen zeigten (Sullivan et al., 2003).

Abbildung 3: Thrombusentstehung und Vergrößerung bei P/E-Selectin Expression auf Endotheloberflächen in venösen Gefäßen durch Stase, Verletzung und Hypoxie. Modifiziert nach Myers et al., 2003.



1.3.4 Antikoagulatorische Mechanismen

Gerinnungsfördernde und gerinnungshemmende Faktoren stehen in einem ständigen Gleichgewicht. Gleichzeitig mit dem Start der Gerinnung werden auch antikoagulatorische Prozesse ausgelöst. Von besonderer Bedeutung ist die Möglichkeit einer direkten Neutralisierung von aktivierten Gerinnungsfaktoren, z.B. durch Antithrombin, Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) und das Thrombomodulin/Protein-C/Protein-S-System.

Antithrombin ist der wichtigste physiologische Inhibitor der aktivierten Gerinnungsfaktoren, vor allem von Thrombin und Faktor Xa. Antithrombin interagiert mit den Serinproteasen und bildet einen kovalenten stabilen 1:1-Komplex, der in kurzer Zeit eliminiert wird. Besonders wichtig ist Antithrombin in Bezug auf die Antikoagulation durch Heparin, die eine der wichtigsten Therapieprinzipien bei akuten Gefäßverschlüssen und der Prophylaxe von venösen Thrombosen ist.

Ein weiteres wichtiges Inhibitorsystem ist das Protein-C/Protein-S-System. Protein C ist ein Vitamin K-abhängiges Protein, das erst nach Bindung an den Endothelzellrezeptor Thrombomodulin durch Thrombin in die aktivierte Form

überführt wird. Das aktivierte Protein C (APC) ist in der Lage die Faktoren Va und VIIIa proteolytisch zu inaktivieren. Dabei fungiert Protein S als Cofaktor.

Auch Tissue Factor Pathway Inhibitor 1 (TFPI) wird eine entscheidende Rolle bei der Antikoagulation zugewiesen. TFPI moduliert die Wirkung von TF hinsichtlich der Auslösung der Koagulation (Sandset, 1996), hat aber auch Auswirkungen auf die Embryogenese im Tiermodell (Huang et al., 1997). Es konnte bei *in vivo* Studien belegt werden, dass niedrige TFPI-Serumwerte einen Risikofaktor für venöse und arterielle Thrombosen darstellen (Dahm et al., 2003; Morange et al., 2004). Im Tiermodell konnte durch die Gabe von rekombinantem TFPI nach mechanisch provoziertem Insult in der. A. Carotis bei Schweinen eine Reduktion der TF-Expression, der FXa-Aktivität sowie eine abgeschwächte Thrombusbildung nachgewiesen werden (St Pierre et al., 1999).

1.3.5 Zusammenhang zwischen Inflammation und Thrombose

Die Vermittlung zwischen entzündlichen Veränderungen und Koagulation verläuft in beiden Richtungen, denn auch die Blutgerinnung hat einen Einfluss auf die Entzündungsaktivität.

Der Zusammenhang zwischen Inflammation und der Bildung von arteriellen Thrombosen wurde in den vergangenen Jahren von zahlreichen Studien belegt. So sind z.B. erhöhte Plasmawerte von C-reaktivem Protein (CRP) und Cytokinen sowie eine Aktivierung der Akute-Phase-Reaktion prädiktive Marker für einen Myokardinfarkt oder Schlaganfall (Ridker et al., 1997). Im Besonderen wurde in artherosklerotischen Arterien vermehrt Interleukin-6 (IL-6) nachgewiesen und erhöhte IL-6 Plasmawerte sind mit einem gesteigerten Risiko für Herz-Kreislauf-erkrankungen verbunden (Ridker et al., 2000; Seino et al., 1994).

Eine weitere Verbindung zwischen der arteriellen Thrombose und einer Entzündungsreaktion konnte am aktivierten Gefäßendothel nachgewiesen werden. Die Endothelaktivierung kann dabei beispielsweise durch atherosklerotische Prozesse ausgelöst werden. Aufgrund ihrer Aktivierung exprimieren Endothelzellen von Willebrand Faktor (VWF) und P-Selectin, die zusammen in Weibel-Palade-

Körperchen im Zellinneren gespeichert werden (Wagner, 1993). Diese Moleküle sind verantwortlich für die Adhäsion von Leukozyten und Plättchen an der Gefäßwand (Andre et al., 2000). Leukozyten und Thrombozyten interagieren hierbei in einem hohen Maße miteinander und induzieren sowohl inflammatorische als auch prokoagulatorische Mechanismen (Wagner and Burger, 2003). Die arterielle Thromboembolie und ein zusätzlicher Entzündungsprozess sind bei ihrer Entstehung auf diese Weise direkt miteinander verbunden.

Es ist weiterhin bekannt, dass Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) eine vermehrte Expression von TF in kardiovaskulären Zellen auslösen können (Kirchhofer et al., 1994; Salom et al., 1998; Schechter et al., 2000). In einer klinischen Studie korrelierten bei Patienten mit Carotisstenosierungen die Konzentrationen von TNF- α und IL-6 mit der TF-Protein-Konzentration im Blut (Furumoto et al., 2002). TNF- α , IL-1 β , and IL-6 führen zusätzlich zu erhöhten Konzentrationen an Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI)-1, welches eine verringerte Fibrinolyseaktivität zur Folge hat (Menges et al., 2001). Der durch Zytokine vermittelte prokoagulatorische und antifibrinolytische Einfluss ist u.a. ein wichtiger Faktor bei der Entstehung der disseminierten intravasalen Koagulopathie.

Es gibt Anzeichen, dass entzündliche Veränderungen auch bei der venösen Thromboembolie (VT) in einem engen Zusammenhang stehen (Fox and Kahn, 2005). In tierexperimentellen Versuchsreihen konnte eine Entzündungsreaktion in der Wand venöser Gefäße nachgewiesen werden, die eine Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und eine verstärkte Expression von Selektinen, Cytokinen und zellulären Adhäsionsmolekülen beinhaltet (Chooi and Gallus, 1989; Wakefield et al., 1993; Wakefield et al., 1997). Downing et al. konnte nach Thromboseinduktion am Tiermodell auch eine Überexpression von Interleukin-10 (IL-10), einem antiinflammatorischen Zytokin, nachweisen (Downing et al., 1998).

Neben dem Nachweis von lokalen inflammatorischen Prozessen im Thrombusgebiet lässt sich bei Patienten mit venösen Thrombosen eine systemische inflammatorische Immunantwort nachweisen. Die wichtigsten Vermittler einer entzündungsbedingten Aktivierung sind pro-inflammatorische Zytokine. Johnson et al. konnten 1996 in

koaguliertem humanen Vollblut erhöhte IL-6 und IL-8 Werte nachweisen und in weitergehenden Studien wurde dies im Speziellen auf eine Stimulation von Blutmonozyten und Endothelzellen durch Faktor Xa, Thrombin, Fibrin und Lipopolysacchariden zurückgeführt (Johnson et al., 1996; Johnson et al., 1998; Sower et al., 1995). Bei klinischen Untersuchungen konnten sowohl erhöhte Plasmakonzentrationen der Entzündungsmarker Interleukin-6, Interleukin-8, und MCP-1 (Monocyte chemoattractive protein-1) bei Patienten mit TVT-Rezidiv (van Aken et al., 2000) als auch gesteigerte Interleukin-8 Konzentrationen bei Patienten mit einem erstmaligen thrombotischen Ereignis nachgewiesen werden (van Aken et al., 2002).

Systemische Inflammation bewirkt aber ihrerseits auch wiederum eine vermehrte Hyperkoagulabilität des Blutes. In ersten Laborstudien konnten Cermak et al. 1993 zeigen, dass Monozyten, die sechs Stunden mit hochkonzentriertem humanen CRP inkubiert wurden, aufgrund einer erhöhten TF-Expression eine höhere prokoagulatorische Aktivität besitzen (Cermak et al., 1993). Auch andere Entzündungsmediatoren wie Endotoxin, Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) induzieren die TF-Expression auf Monozyten bzw. Makrophagen (Esmon, 2003).

Zusätzlich werden entzündliche Prozesse als Risikofaktoren für Thrombosen diskutiert. Für die arterielle Thrombose konnte ein erhöhtes Risiko in Patientengruppen mit fortgeschrittenem Lebensalter, vermutlich aufgrund verstärkt auftretender systemischer Entzündungsprozesse mit erhöhten IL-6 und CRP-Werten, nachgewiesen werden (Esmon, 2009). Diese relativ moderaten Veränderungen über einen längeren Zeitraum haben aber anscheinend nur einen begrenzten Einfluss auf das venöse Thromboserisiko (Tsai et al., 2002), während akute Infektionen das Risiko für venöse Thromboembolien deutlich erhöhen (Smeeth et al., 2006).

Entzündungsparameter als prädiktive Werte für eine mögliche venöse Thromboembolie heranzuziehen war bisher nicht erfolgreich. In prospektiven Studien wurde die Korrelation von CRP-Plasmakonzentrationen mit dem Auftreten einer VT untersucht. In keiner Studie konnte bisher ein eindeutig positiver Zusammenhang

festgestellt werden, der ein erhöhtes Thromboserisiko durch Akute-Phase-Proteine, wie CRP, nahelegen würde (Ridker et al., 1997; Tsai et al., 2002).

Bisher konnte allerdings nicht vollständig geklärt werden, ob entzündliche Veränderungen nur eine Reaktion auf ein thrombotisches Ereignis sind oder auch einen Teil zu dessen Ursprung beitragen. Es gibt aber Hinweise, dass die inflammatorische Reaktion auf eine VT im Vordergrund steht. So konnten z.B. die höchsten Zytokinkonzentrationen bei Thrombosepatienten am Aufnahmetag gemessen werden. Im Verlauf gingen die Entzündungsparameter über die nächsten Tage zurück (Roumen-Klappe et al., 2002). Vor allem bei der Auflösung von venösen Thromben ist eine Leukozyteninvasion in das Thrombusgebiet nach dem thrombotischen Ereignis mit begleitender entzündlicher Reaktion von Bedeutung (Wakefield et al., 1995).

Eine weitere Verbindung zwischen Inflammation und Hyperkoagulabilität könnte das bereits beschriebene P-Selectin darstellen (siehe oben). Es hat neben seiner prokoagulatorischen Wirkung zusammen mit weiteren Selectinen wie E-Selectin noch zusätzliche entzündungsvermittelnde Eigenschaften. Selectine werden auf aktivierten Endothelzellen exprimiert und sind in der Lage durch Adhäsion mit PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) auf Leukozyten die entzündliche Reaktion einer Thrombose auszulösen (Myers and Wakefield, 2005). Die Tatsache, dass PSGL Moleküle, die sowohl eine Adhäsionsfunktion für Leukozyten als auch für Thrombozyten besitzen, im Gefäßendothel in den selben Organellen gespeichert und damit auch gleichzeitig sezerniert werden, könnte einen weiteren Hinweis auf den engen Zusammenhang von Hämostase und Inflammation geben (Polgar et al., 2005). Im Tiermodell konnte durch eine Inhibition des PSGL-1 Rezeptors oder PSGL-Rezeptor-Antikörper eine signifikante Reduzierung der Entzündung im Thrombusgebiet und der venösen Gefäßwand, eine verminderte Cytokinexpression am Endothel und eine begünstigte Thrombusauflösung erreicht werden (Downing et al., 1997; Wakefield et al., 2000). Weitere Studien belegten eine signifikante Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen PSGL-Antikörpern und VT sowie PSGL-Antikörpern und spontaner Rekanalisation (Myers et al., 2001).

1.4 Diagnostik der venösen Thrombose

1.4.1 Einführung

Der klinische Verdacht auf eine Beinvenenthrombose entsteht bei allen neu aufgetretenen einseitigen Beinbeschwerden wie Schwellung, Verfärbung, Dysästhesie oder Schmerzen. Beidseitige oder länger bestehende Beschwerden sollten zunächst in anderer Richtung abgeklärt werden, ebenso eine orthopädische oder neurologische Beschwerdeschilderung. Es gibt keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Lokalisation und dem Ausmaß der Thrombose. Im Falle eines Verdachts auf eine TVT ist außerdem zu beachten, dass nur bei weniger als der Hälfte der Patienten tatsächlich eine Venenthrombose nachgewiesen werden kann (Birdwell et al., 1998; Huisman et al., 1986). Zu den Differenzialdiagnosen der TVT zählen vor allem muskuloskeletale Veränderungen, eine venöse Insuffizienz und Erkrankungen des lymphatischen Systems der unteren Extremität (Hull et al., 1981). Wichtige Risikofaktoren der TVT sollten bei allen Patienten erfragt werden. Diese beinhalten Immobilisation, kürzlich erfolgte Operationen, Übergewicht, Traumata der unteren Extremität, maligne Erkrankungen, Hormonersatztherapie oder eine Einnahme von Kontrazeptiva, Schwangerschaft, Schlaganfall und zurückliegende Venenthrombosen.

1.4.2 Diagnostische Methoden

Kompressionssonographie:

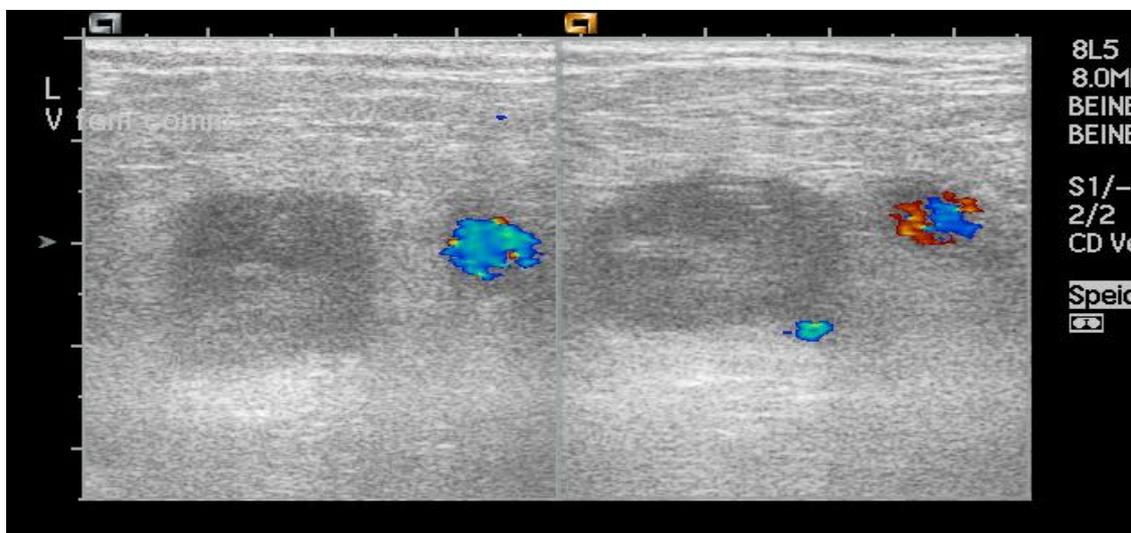
Die Kompressionssonographie stellt das wichtigste bildgebende Verfahren zum Ausschluss oder Nachweis einer TVT dar. Eine Beinvene lässt sich normalerweise durch Andruck der Ultraschallsonde vollständig komprimieren. Die fehlende Komprimierbarkeit eines Venenabschnitts im Querschnitt ist das wichtigste Zeichen einer Thrombose (Abbildung 4). Die Sensitivität und die Spezifität dieses Verfahrens liegt im Bereich der Femoral- und Poplitealvene bei ca. 97% (Habscheid et al., 1990; Lensing et al., 1989). Bei weiter distal gelegenen Thrombosen können unter optimalen Bedingungen ähnlich gute Ergebnisse erzielt werden (Lensing et al., 1989; Mattos et al., 1992). Bei einem suspekten Befund kann die erneute

Ultraschalluntersuchung nach einer Woche helfen eine Venenthrombose sicher auszuschließen (Cogo et al., 1998).

Ein abnormaler venöser Blutfluss in der farbkodierten Duplexsonographie und das Vorhandensein von echogenen intravasalen Formationen gelten als weitere Anhaltspunkte einer TVT, wobei diese weitaus weniger spezifisch und sensitiv sind als die Kompressionsuntersuchung.

Um die Lokalisation und das Ausmaß der Thrombose zu beschreiben, hat sich die Einteilung des tiefen Beinvenensystems in vier Etagen bewährt. Die 1. Etage stellen die tiefen Unterschenkelvenen dar, die 2. Etage die V. poplitea, die 3. Etage die V. femoralis und die 4. Etage die V. iliaca. Bei aufsteigenden Thrombosen wird deshalb der Begriff 2-, 3- und 4-Etagenthrombosen verwendet.

Abbildung 2: Thrombose in gedoppelter Vena femoralis communis im linken Bild ohne und im rechten Bild mit Kompression (farbkodierte Duplexsonographie). Die Vene ist nicht komprimierbar und zeigt einen echoreichen Thrombus im Venenlumen.



Phlebographie und weitere bildgebende Verfahren:

Bei der Phlebographie können die peripheren Beinvenen mittels Injektion eines röntgendichten Kontrastmittels unter Durchleuchtung dargestellt werden. Die Phlebographie wird mit einer nahezu 100%igen Sensitivität und Spezifität nach wie

vor als sicherstes Werkzeug zur Diagnose einer DVT betrachtet (Gaitini, 2007). Die Phlebographie bietet zur Abklärung von Thrombosen in kleinkalibrigen, verzweigten Gefäßen Vorteile gegenüber nicht-invasiven Verfahren, wird aber aufgrund der Strahlen- sowie Kontrastmittelbelastung nicht mehr als Routinetest durchgeführt.

Ileocavale Thrombosen können auch mittels CT- und MR-Venographie dargestellt werden (Salcuni et al., 1996). Mittels MR-Venographie kann zudem eine akute von einer chronischen venösen Thrombose unterschieden werden (Yoshizako et al., 1996).

D-Dimere:

Als weiteres Anzeichen gilt ein erhöhter D-Dimer-Wert. D-Dimere entstehen als Endprodukt bei der Proteolyse von Fibrinmonomeren und –polymeren (Abbildung 2) und stellen einen Plasmamarker für den Fibrinumsatz *in vivo* dar (Lip and Lowe, 1995). Sie sind allerdings für den Nachweis einer venösen Thromboembolie nicht spezifisch, da sie auch bei arteriellen Thromboembolien in Form eines akuten Koronarsyndroms oder Schlaganfalls aber auch bei nicht thrombotischen Krankheiten wie Operationen, Blutungen, Tumoren, Traumata und Schwangerschaft erhöht sein können (Raimondi et al., 1993). Aufgrund der hohen Sensitivität und dem hohen negativ prädiktiven Wert, ist die D-Dimer Bestimmung für den Ausschluss einer Phlebothrombose hilfreich (Righini et al., 2008).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die genauen Mechanismen der venösen Thrombusentstehung sind noch nicht bis ins Letzte verstanden. Insbesondere der Einfluss zirkulierender TF-tragender Mikropartikel auf die Pathophysiologie der Thrombose bedarf genauerer Untersuchungen.

In dieser Arbeit sollte in einem klinischen Studienrahmen der Frage nachgegangen werden, ob erhöhte Aktivitäten von zirkulierendem Tissue Faktor oder Mikropartikeln bei Patienten mit einer tiefen Venenthrombose (TVT) nachzuweisen sind. Dies sollte mithilfe verschiedener hämatologischer Nachweismethoden durchgeführt werden. Zusätzlich sollte durch die Untersuchung von Gerinnungsparametern und Entzündungsmarkern ein Hinweis auf weitere mögliche Funktionen des Tissue Factor Proteins *in vivo* gefunden werden.

Sollten bei Patienten mit venösen Thrombembolien erhöhte Plasmaspiegel TF-tragender Mikropartikel nachzuweisen sein, könnten diese Parameter auch als wichtige Entscheidungskriterien für die Durchführung einer vorübergehenden oder auch dauerhaften prophylaktischen Antikoagulation als Primärprävention bei noch nicht erkrankten Risikopatienten genutzt werden.

2 Studienaufbau

2.1 Studienpopulation und Einschlusskriterien

Die Studienpopulation umfasste 48 Patienten mit einem akuten venösen thrombotischem Ereignis aus dem Gefäßzentrum am Klinikum rechts der Isar (München). Die Blutproben wurden nach Prüfung der Ein- und Ausschlusskriterien unmittelbar nach eigenhändigem dopplersonographischem Nachweis einer venösen Thrombose im Gefäßzentrum des Klinikums rechts der Isar durch periphervenöse Blutabnahme in die dafür vorbereiteten Röhrchen gewonnen. Alle Studienpatienten erteilten nach einer ausführlichen Aufklärung ihre schriftliche Einverständniserklärung für eine Blutentnahme und deren anschließende Untersuchung. Das Studienprotokoll wurde im Voraus von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München genehmigt.

2.2 Ausschlusskriterien

Patienten, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme mit antikoagulatorischer Medikation oder Thrombozytenaggregationshemmern behandelt wurden, konnten aufgrund einer möglichen Beeinflussung des Studienergebnisses nicht an der Studie teilnehmen.

2.3 Kontrollgruppe

23 Patienten, bei denen sich der Verdacht auf ein thrombotisches Ereignis nach eingehender klinischer Diagnostik nicht bestätigte sowie gesunde Probanden, konnten in die Kontrollgruppe eingeschlossen werden.

2.4 Studiendesign

Da nicht modifizierend in das Geschehen eingegriffen und die Blutplasmawerte aller Patienten nur zu einem einzigen Zeitpunkt untersucht wurden, handelt es sich in der vorliegenden Arbeit um eine prospektive, beobachtende, transversale Studie.

3 Material und Methoden

3.1 Anamnese und Diagnostik

Zur genauen Bestimmung der gegebenen Ein- und Ausschlusskriterien der Studienpopulation wurde eine ausführliche Anamnese erhoben und die Patienten bezüglich ihres Thromboserisikoprofils befragt.

Die dopplersonographische Diagnostik erfolgte durch den Autor im Gefäßzentrum am Klinikum rechts der Isar (München). Hierbei wurde die Lokalisation und Ausdehnung der Thrombose jedes Patienten eindeutig dokumentiert.

3.2 Probengewinnung

Die venösen Blutproben wurden unmittelbar nach dopplersonographischer Diagnostik aus der Cubitalvene mithilfe einer Butterfly-Kanüle entnommen (1x EDTA-Blut, 1x Serum-Monovette, 1x Citrat-Blut).

Zeitnah zur Entnahme wurde das für die Zytokinbestimmung benötigte Serummaterial weiter bearbeitet. Nach dem Abzentrifugieren (3000 U/min, 10min, bei Raumtemperatur) wurde das aliquote Plasma bis zur weiteren Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA im Gefrierschrank bei mindestens -20 °C aufbewahrt.

Für die Bestimmung der prokoagulatorischen Aktivität der Mikroartikel wurde das Citratplasma innerhalb von 2 Stunden nach Blutabnahme bei Raumtemperatur weiter bearbeitet. Zur Isolierung von TF-haltigen Mikropartikeln wurde das Blutröhrchen zuerst bei 1000 U/min für 10 min ohne Bremse zentrifugiert. In einem weiteren Schritt wurde der verbleibende Überstand, das plättchenreiche Plasma (PRP), danach als Aliquot vorsichtig jeweils in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und bei 13000 U/min für 10 min zentrifugiert. Der erhaltene Überstand, das nun plättchenfreie Plasma, wurde wiederum in Aliquote aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

Für die Thrombophiliediagnostik wurden von jedem Patienten zwei Citratmonovetten direkt in das Institut für klinische Chemie im Klinikum rechts der Isar geschickt. Dort

erfolgte die Untersuchung auf angeborene und erworbene Gerinnungsdefekte, welche den Nachweis einer Faktor-V-Leiden- oder Prothrombin-20210A-Mutation, eines Antithrombin III- sowie Protein-C- und S-Mangels, eines Lupus-Antikoagulans sowie eines erhöhten Faktor VIII ermöglichte.

3.3 Grundlagen des Verfahrens zur Bestimmung der prokoagulatorischen Tissue Faktor Aktivität

Die funktionelle Aktivität des TF-Proteins lässt sich aus der Bildung des aktivierten Faktor Xa (FXa) bestimmen. Wie aus Abbildung 2 (S. 7) ersichtlich, spaltet der TF/FVIIa Komplex FX entweder direkt oder indirekt über eine FIX-Aktivierung. Der hier verwendete FXa-Generation-Assay (American Diagnostica) beruht auf der direkten Aktivierung von FX und wurde in An- und Abwesenheit von 100 µg/ml Kaninchen-anti-TFPI-1-IgG (Dr. W. Ruf, LaJolla, USA) oder nicht-immunen Kaninchen-IgG-Antikörpern (Sigma) durchgeführt.

Die Menge an gebildetem FXa wird durch seine Fähigkeit, hoch spezifisch das Substrat Spectrocyme® Xa zu spalten, nachgewiesen. Spectrocyme® Xa ist ein chromogenes Substrat bei dessen Spaltung ParaNitroaniline (pNA), ein gelblicher Farbstoff gebildet wird (Abbildung 5, S. 25). Je mehr Substrat umgesetzt wird, desto höher wird dabei die optische Dichte des Ansatzes. Die enzymatische Aktivität von Tissue Faktor konnte also durch die Messung des Anstieges der Lichtabsorption (optische Dichte) von pNA bei 405 nm über einen bestimmten Zeitraum mit Hilfe eines Photometer/ELISA-Plattenlesegerätes gemessen werden. Lag das Substrat Spectrocyme® FX im Überschuss vor, war dieser Absorptionsanstieg proportional zur FXa Bildung und somit auch zur TF-Enzymaktivität. Die genaue TF-Aktivität der untersuchten Proben konnte dann an einer zuvor erstellten Standardkurve abgelesen werden.

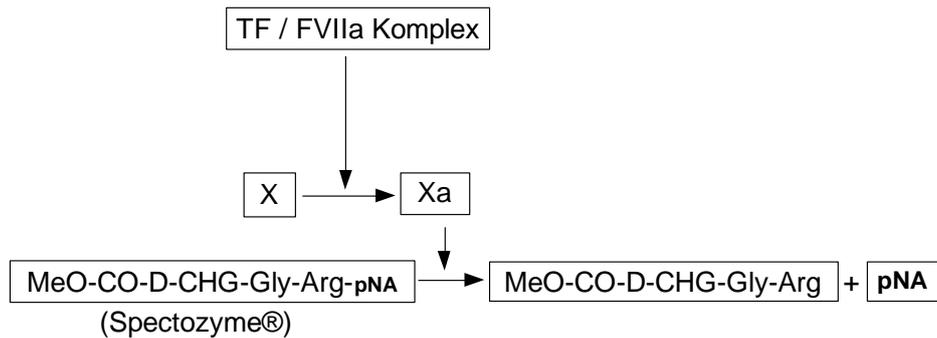


Abbildung 5: Spectrozyme® Xa ist ein chromogenes Substrat mit dem Farbstoff para-Nitroanilin (pNA) in gebundener Form. Aktivierter Faktor Xa besitzt die Fähigkeit, pNA abzuspalten. Es kommt zu einer Gelbfärbung und Anstieg der Lichtabsorption.

3.4 Messung der prokoagulatorischen Tissue Factor-Aktivität im Blutplasma

Zur Bestimmung der prokoagulatorischen TF-Aktivität im Patientenplasma wurde der ANTICHROME® TF activity Kit (American Diagnostica) verwendet.

Im einem ersten Schritt wurde dazu 50 µl Pufferlösung (pH 8,4), 25 µl Patientenplasma, 25 µl FVIIa-Lösung und 25 µl FX-Lösung für 15 min bei 37 °C inkubiert. Dem Ansatz wurden daraufhin das Spectrozyme® Xa-Substrat hinzugegeben und für weitere 20 min bei 37 °C inkubiert. Die enzymatische Reaktion begann sofort nach der Zugabe von Spectrozyme® Xa mit der Freisetzung von p-Nitroanillin (pNA) als Chromophor durch Faktor Xa. Die Reaktion wurde nach 20 min durch die Zugabe von Eisessig gestoppt. Anschließend erfolgte die photometrische Messung des Anstiegs der optischen Dichte im ELISA-Lesegerät. Dies stellt ein Maß für die Umsetzung von Faktor X zu Xa durch den TF/Faktor VIIa Komplex dar. Zur Umrechnung des Anstieges der optischen Dichte in TF-Aktivitäts-Units, wurde eine zuvor erstellte Standardkurve benutzt. Die Standardkurve wurde durch Messung des Anstieges der optischen Dichte der jeweiligen Standardproben erstellt, wobei die Aktivität von einem Pikogramm lipidiertem, rekombinantem Tissue Faktor als eine TF-Aktivitäts-Unit definiert wurde.

3.5 Messung der mikropartikelassozierten prokoagulatorischen Aktivität

Die Mikropartikel assoziierte prokoagulatorische Aktivität im Patientenplasma wurde mithilfe des ANTICHROME® Micropartikel activity Kit (American Diagnostica) gemessen. Bei diesem Verfahren wird die FXa-Bildung nach dem Abfangen von Mikropartikeln durch Antikörperbindung mittels biotinyliertem AnnexinV gemessen, ohne zusätzliches Hinzufügen von Phospholipiden.

Für den Versuchsansatz wurde das zuvor bei -80 °C aufbewahrte, plättchenfreie Plasma für 15 min bei 37 °C aufgetaut. Dieses Plasma wurde mit Calcium, Faktor Xa und Thrombininhibitoren versetzt und in einer Mikro-ELISA-Platte, die mit Streptavidin und biotinyliertem AnnexinV beschichtet war, bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Nach fünfmaligem Auswaschen der Vertiefungen der Mikro-ELISA-Platte mit dem Kit beiliegenden Waschlösung wurde dem Ansatz gereinigtes humanes Prothrombin zugefügt und daraufhin für weitere 10 min bei 37 °C inkubiert. Im Folgenden bildete sich aus Prothrombin das als Serinprotease wirksame Thrombin, das durch die Zugabe eines Thrombin-spezifischen chromogenen Substrats quantifiziert werden konnte. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 2% Zitronensäure beendet. Anschließend wurde nach weiteren 10 min, in denen sich die Farbe stabilisierte, der Anstieg der optischen Dichte mit einer Lichtwellenlänge von 405 nm (A405) gemessen. Im Abgleich mit einer gleichzeitig erstellten Standardkurve konnte die prokoagulatorische Aktivität von Mikropartikeln bestimmt werden.

3.6 Quantifizierung von zirkulierendem Tissue Factor-Antigen

Um die genaue Konzentration von TF-Protein in den Zellysaten zu bestimmen, wurde ein IMUBIND® Tissue Faktor ELISA Kit (American Diagnostic GmbH, Pfungstadt, Deutschland) verwendet. Dieses enthielt eine 96-Lochplatte, die am Boden mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanen Tissue Faktor beschichtet war. Die zur Messung verwendeten aufgetauten Plasmaaliquote wurden in die Platte gegeben. Nach Inkubation kam es zur Bindung von humanem TF am Boden der Platte. Anschließend erfolgte die Zugabe eines zweiten, spezifisch gegen TF gerichteten Detektionsantikörpers, welcher nach Hinzufügen eines Enzym-Konjugats einen Antikörper-Enzymkomplex bildete. Überschüssige ungebundene Antikörper wurden durch mehrfaches Waschen der Platte mit Aqua dest. entfernt. Nach Zugabe des Substrates Tetra-Methylbenzidin kam es zu dessen peroxidaseabhängiger Spaltung. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 molarer Schwefelsäure gestoppt. Dies führte zu einer Gelbfärbung der Lösung, die mit dem Photometer bei 450 nm gemessen werden konnte. Die Intensität der Farbe war dabei der Konzentration des entstandenen Produkts und damit auch der Konzentration des zu bestimmenden TF-Antigens in der Probe proportional. Anhand einer Standardkurve, die für jeden Versuch für den Bereich von 0 pg/ml bis 1000 pg/ml erstellt wurde, konnte dann der genaue Proteingehalt im Blutplasma bestimmt werden. Die Nachweisgrenze lag bei ca. 10 pg/ml TF-Protein.

3.7 Plasmakonzentrationsbestimmung von Prothrombinfragment F1+2

Zur Bestimmung von Human-Prothrombinfragment F1+2 wurde der Enzymimmunoassay Enzygnost F1+2 micro der Firma Behring AG (Marburg, Deutschland) verwendet. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurde nach Vorlage von 50µl Probenpuffer F1+2 entweder 50 µl Standard, Kontrolle oder Probe pipettiert. Bei der ersten Immunreaktion bindet der fixierte Kaninchen-Antikörper gegen F1+2 das in der Probe vorhandene humane F1+2-Antigen. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurden alle Vertiefungen abgesaugt und mit 0,3 ml verdünnter

Waschlösung (Tween-haltige 90 mM Phosphatpufferlösung) zweimal gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Konjugatlösung (Anti-Human-Prothrombin, POD-Konjugat) zugegeben und bei 37°C für 15 min inkubiert. In dieser zweiten Immunreaktion bildete der peroxidasekonjugierte Antikörper gegen Human-Prothrombin aufgrund freier F1+2-Determinanten mit dem fixierten Antigen-Antikörper-Komplex einen Sandwich-Komplex. Die überschüssigen enzymkonjugierten Antikörper wurden ausgewaschen (dreimal mit 0,3 ml verdünnter Waschlösung). Nach dem Waschvorgang erfolgte die Zugabe von 100 µl Chromogen-Puffer/Substrat-Lösung (o-Phenylendiamin-dihydrochlorid und Wasserstoffperoxid). Nach weiteren 15 min Inkubationszeit unter Lichtschutz bei 20 bis 25 °C wurde die Reaktion mit 100 µl 0,5 N Schwefelsäure abgestoppt. Die Extinktion des entstandenen Farbstoffes wurde innerhalb einer Stunde gegen destilliertes Wasser bei einer Wellenlänge von 492 nm photometrisch gemessen. Anhand der berechneten Extinktionsmittelwerte der Standards konnte der F1+2-Gehalt der Proben ermittelt werden.

3.8 Konzentrationsbestimmung der Entzündungsmediatoren

Zur Bestimmung der Konzentration von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 wurde mit dem Human Inflammation - Cytometric Bead Array (CBA) (Becton-Dickinson, San Jose, USA) ein Verfahren genutzt, das die Durchflusszytometrie mit Fluoreszenzdetektion und einen enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (Enzymelinked Immuno Sorbent Essay, ELISA) miteinander verbindet. Dabei lassen sich in einer Probe multiple Zytokine bestimmen. Dabei wurde im ersten Schritt die Probe zu einem monoklonalen Antikörper gegen das jeweilige Interleukin pipettiert und in einem zweiten Schritt nach Zugabe eines enzymmarkierten polyklonalen Antikörpers ein Sandwichkomplex ausgebildet. Mit Zugabe einer chromogenen Lösung wurde ein enzymabhängiger Farbwechsel erreicht, dessen Absorption bei 450 nm mittels Glasfaseroptik gemessen werden kann. Die Farbintensität ist dabei proportional der in der Probe gebundenen Antikörper und somit der Interleukinmenge. Der Human Inflammation-CBA basiert auf sechs Bead

Populationen mit unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten. Nach Inkubation der Proben mit Fluoreszenz-Farbstoff (Phycoerythrin)-konjugierten Detektionsantikörpern bildeten sich Sandwich-Komplexe zwischen den Capture- Antikörpern, den Zytokinen und den Detektions-Antikörpern aus. Die gemischten Bead Populationen konnten im Durchflusszytometer im Fluoreszenzkanal FL-3 diskriminiert werden, während die Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzkanal FL-2 die Menge der jeweiligen Zytokine widerspiegelte. Zusammen mit einer Eichreihe konnten so die Zytokin-Konzentrationen im Kultur-Überstand berechnet werden. Die Auswertung am Computer erfolgte mit Hilfe der Becton Dickinson Cell Quest- und CBA-Software.

Tabelle 1: Detektionsgrenzen der Zytokine:

Zytokin	Detektionsgrenzen (pg/ml)
IL-1 β	7,2 pg/ml
IL-6	2,5 pg/ml
IL-8	3,6 pg/ml
IL-10	3,3 pg/ml
IL-12	1,9 pg/ml
TNF α	3,7 pg/ml

3.9 Weitere Labordiagnostik

Die Bestimmung des Differentialblutbildes sowie der Serumkonzentrationen von C-reaktivem Protein (CRP), D-Dimer und Fibrinogen wurde in der Routinediagnostik am Institut für Klinische Chemie des Klinikums München RDI bestimmt. Weiterhin wurde bei jedem Patienten nach dessen Einwilligung eine umfassende Thrombophiliediagnostik durchgeführt. Hierzu wurden das Vorliegen von Faktor-V-Leiden, Prothrombin-20210A-Mutation, Antithrombin III-Mangel, Lupus - Antikoagulans, erhöhtem Faktor VIII, Protein-C-Mangel und Protein-S-Mangel analysiert.

3.10 Statistische Auswertung

Die deskriptive Auswertung der Studienergebnisse erfolgte durch die Berechnung der Mittelwerte (MEAN) sowie der Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Zur Bestimmung der Unterschiede zwischen den Patienten- und Kontrollgruppen wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben angewendet. Zur Beschreibung von Zusammenhängen diente sowohl die Korrelations- als auch die lineare Regressionsanalyse. Entsprechend der Annahme, dass es sich bei den Werten um nicht parametrische Verteilungen handelt, wurde der Spearman-Korrelationskoeffizient verwendet. Beim Prüfen von Zusammenhängen wurde der p-Wert immer unter einer zweiseitigen Fragestellung betrachtet. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

Software:

Alle graphischen Darstellungen und statistischen Auswertungen sind mit dem Softwareprogramm SPSS für Windows, Version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) ausgeführt worden.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Insgesamt wurden 48 Thrombosepatienten und 23 Kontrollpersonen in die Studie eingeschlossen. Die Patientenparameter und Blutplasmawerte der TVT Patienten sind zusammen mit den Ergebnissen der Thrombophiliediagnostik in Tabelle 2 dargestellt. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug zum Zeitpunkt der TVT 58 Jahre und in der Kontrollgruppe 54 Jahre. In beiden Gruppen war der Anteil an Männern zu Frauen annähernd 1:1.

Das Ausmaß der Thrombose konnte mithilfe doppler-sonografischer Untersuchung genau bestimmt werden. Bei 43 Patienten (90%) konnte eine Thrombose der unteren Extremität diagnostiziert werden, während fünf Patienten (10%) an einer Armvenenthrombose litten. Die Ausdehnung an der unteren Extremität zeigte sich zu 10% als isolierte Muskelvenenthrombose, zu 69% bis popliteal und zu 44% bis in den Iliacofemoralbereich. Es waren dabei Mehretagenthrombosen möglich, so dass sich die einzelnen Anteile zu mehr als 100% addieren. Bei acht Patienten wurde eine Lungenarterienembolie diagnostiziert, wobei bei drei dieser Patienten eindeutig eine Venenthrombose der unteren Extremität nachgewiesen werden konnte. In 15% der Fälle wurde die VT aufgrund der Patientenanamnese als Rezidiv gewertet.

Bei 27 Patienten (56%) konnten ein oder mehrere prädisponierende Faktoren für eine TVT nachgewiesen werden. 21 Patienten (44%) erlitten eine idiopathische Thrombose. Etwa ein Viertel der Patienten mit Risikofaktoren hatten einen kürzlich durchgeführten operativen Eingriff vorzuweisen, ein Viertel der Risikopatienten präsentierte sich mit einer zusätzlichen malignen Erkrankung, bei einem weiteren Viertel war eine vorangegangene Immobilisation zu erfragen.

48% (n=23) der TVT Patienten wurden positiv auf mindestens einen Thrombophilie marker getestet (Tabelle 2). Unter den gefundenen Markern waren Antithrombin III Mangel, Prothrombin 20210A Mutation, Lupus-Antikoagulans, erhöhter Factor VIII, Protein C Mangel und Faktor V Leiden Mutation. Bei den

meisten davon konnte nur ein prädisponierender Marker festgestellt werden, während drei Patienten mehr als einen Gerinnungsdefekt aufwiesen.

Tabelle 2: Patientenparameter und Blutplasmawerte bei TVT Patienten

Parameter	TVT (n=48)	Referenzwerte
Alter	57,5 ±17,0	
Geschlecht (Männlich)	25 (52%)	
Lokalisation der Thrombose:		
Venenthrombose der unteren Extremität	43 (90%)	
<i>Iliaco-femoralvenenthrombose</i>	21 (44%)	
<i>Poplitealvenenthrombose</i>	33 (69%)	
<i>Isolierte Muskelvenenthrombose</i>	5 (10%)	
Venenthrombose der oberen Extremität	5 (10%)	
Lungenembolie	8 (17%)	
Prädisponierende Faktoren:		
Malignomdiagnose 5 Jahre vor VT	10 (21%)	
Operativer Eingriff innerhalb 30 Tage vor VT	11 (23%)	
Immobilisation innerhalb 30 Tage vor VT	13 (27%)	
Aktuelle Östrogentherapie	4 (8%)	
Übergewicht	4 (8%)	
Postpartum	0 (0%)	
TVT Rezidiv	7 (15%)	
Thrombophilie-Diagnostik:		
Faktor-V-Leiden, n (%)	9 (19%)	
Prothrombin 20210A Mutation, n (%)	2 (4%)	
Lupus-Antikoagulans, n (%)	6 (12%)	
Erhöhter Faktor VIII, n (%)	8 (17%)	
Protein-C-Mangel, n (%)	2 (4%)	
Protein-S-Mangel, n (%)	0 (0%)	
Antithrombin III-Mangel, n (%)	1 (2%)	
Blutplasma-Werte:		
Fibrinogen [mg/dl]	469.5 ±21,7	200-450
D-Dimer [µg/l]	1367.6 ±482,1	<500
Leukozyten [G/l]	8.5 ±0,5	4,0-9,0
Thrombozyten [G/l]	219.2 ±16,8	150-450
Thrombinzeit [sec]	33.6 ±11,0	14-21
aPTT [sec]	32.4 ±1,8	26-37
INR	1.1 ±0,1	
CRP [mg/dl]	4.0 ±0,6	<0.5

4.2 Ergebnisse der Gerinnungsdiagnostik

Bei der Bestimmung der Plasmakonzentrationen des Prothrombinfragments F1+2 konnte eine signifikante Erhöhung in der Thrombosegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Tabelle 3). In der TVT-Gruppe lagen die Mittelwerte bei 310.5 ± 42.9 nmol, während in der gesunden Patientenpopulation nur etwa halb so hohe Werte von 163.6 ± 104 nmol ermittelt wurden. Die D-Dimere lagen in der TVT-Gruppe mit 1367.6 ± 482.1 µg/l im Mittel deutlich über dem Referenzwert von 500 µg/l (Tabelle 2).

Obwohl eine Aktivierung der plasmatischen Gerinnung hierdurch indirekt nachgewiesen werden konnte, wurden keine Unterschiede in der Antigenkonzentration und Aktivität von zirkulierendem TF gemessen. TF-Antigen konnte nur bei 3 TVT-Patienten mit Maximalwerten von 375 pg/ml nachgewiesen werden. Gleichzeitig waren die TF-Plasmaaktivitäten jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht erhöht. Eine weitere Aktivitätserhöhung nach Inhibition mit endogenem TFPI konnte nicht beobachtet werden (0.37 ± 0.2 pg/ml) vs. 0.43 ± 0.2 pg/ml). Ebenso zeigte die Mikropartikel-assoziierte TF-Aktivität zwischen TVT-Patienten (6.2 ± 0.6 nM) und Kontroll-Patienten (5.2 ± 3.1 nM) keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 3).

4.3 Ergebnisse der Zytokindiagnostik

Neben der Messung von Gerinnungsparametern wurden die Plasmakonzentrationen einiger, für eine Entzündungsreaktion wichtige Zytokine analysiert. Bei TVT Patienten waren deutlich erhöhte Konzentrationen der Entzündungsmarker IL-6 und IL-8 im Vergleich zur Kontrollgruppe nachzuweisen (Tabelle 3). Im Mittel lagen die Konzentrationen für IL-6 bei 9.6 ± 1.5 pg/ml und IL-8 bei 11.9 ± 2.2 in der TVT-Gruppe. Die erhöhten Plasma CRP-Werte unterstreichen eine entzündliche Reaktion bei Patienten mit TVT. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Analyse der weiterhin

gemessenen Entzündungsmarker IL-1- β , IL-10, IL-12 und TNF- α kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Zwischen den erhöhten Zytokinkonzentrationen IL-6 und IL-8 wie auch den F1+2 Werten konnte mithilfe einer multivariaten Datenanalyse keine Korrelation mit dem Ausmaß der venösen Thrombose, den Risikofaktoren und dem Auftreten von Symptomen festgestellt werden. Bei der statistischen Analyse von TF-Aktivitäten, den IL-6-, IL-8- und F1+2-Werten konnten ebenfalls keine Abhängigkeiten untereinander nachgewiesen werden.

Tabelle 3: Gerinnungsparameter und Zytokinkonzentrationen in der Studien- und Kontrollgruppe

Parameter	TVT (n=48)	Kontrollen (n=23)	p
Prothrombin Fragment F1+2 [nmol]	310.5 \pm 42.9	163.6 \pm 104	< 0.005
TF Antigen [pg/ml]	18.9 \pm 11.0	0.0 \pm 0.1	n.s.
TF-Aktivität [pM]	0.37 \pm 0.2	0.36 \pm 0.99	n.s.
TF-Aktivität+anti-TFPI mAB [pM]	0.43 \pm 0.2	0.14 \pm 0.28	n.s.
Micropartikel-Aktivität [nM]	6.2 \pm 0.6	5.2 \pm 3.1	n.s.
IL-1 β [pg/ml]	1.4 \pm 0.2	28.0 \pm 54.7	n.s.
IL-6 [pg/ml]	9.6 \pm 1.5	1.7 \pm 4.2	< 0.005
IL-8 [pg/ml]	11.9 \pm 2.2	3.2 \pm 4.2	< 0.005
IL-10 [pg/ml]	2.1 \pm 0.4	0.8 \pm 1.7	n.s.
IL-12 [pg/ml]	1.7 \pm 0.2	2.1 \pm 2.6	n.s.
TNF- α [pg/ml]	1.7 \pm 0.2	1.9 \pm 2.2	n.s.

(n.s. = nicht signifikant)

5 Diskussion

5.1 Einleitung

Die Ergebnisse der durchgeführten klinischen Studie zeigen, dass die Plasmaaktivität von freiem sowie MP-gebundenem TF bei einem Patientenkollektiv mit akuter venöser Thrombose, im Vergleich zu einer thrombosefreien Patientengruppe, nicht erhöht ist. Ein Zusammenhang der prokoagulatorischen Aktivität von TF mit Inflammation und der Ausdehnung der Thrombose ließ sich ebenfalls nicht nachweisen. Thrombosepatienten sind bisher nicht im gleichen Rahmen mit den hier angewendeten TF-Aktivitäts Assays untersucht worden. Dem gegenüber konnte eine verstärkte systemische Inflammation, insbesondere erhöhte Konzentrationen von IL-6 und IL-8, bei Patienten mit thromboembolischen Ereignissen bestätigt werden, wie schon in anderen Arbeiten beschrieben (Fox and Kahn, 2005; van Aken et al., 2000).

5.2 Beurteilung der Tissue Factor-Aktivität bei akuter venöser Thromboembolie

Welche genauen Prozesse für die Entstehung einer VT verantwortlich sind, ist bisher nicht ausreichend untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals in einer klinisch monozentrischen Studie die prokoagulatorische Aktivität von zirkulierendem Tissue Factor in einer unselektierten Population mit thromboembolischen Ereignissen untersucht. Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen wiesen bisherige Studien auf erhöhte Konzentrationen an Plasma TF-Antigen (Smith et al., 1999; Vieira et al., 2007) sowie eine erhöhte Anzahl an Mikropartikeln bei Patienten mit einer TVT hin (Ay et al., 2009). Die abweichenden Resultate sind möglicherweise eine Folge methodischer Unterschiede (Butenas et al., 2005). Bisher fehlen standardisierte Testverfahren in der klinischen Diagnostik, die eine verbesserte Vergleichbarkeit von Daten ermöglichen würden. Bei der in dieser Studie verwendeten Mikropartikelquantifizierung mittels TF Aktivitäts Assays wird aktuell eine höhere Sensitivität und Reproduzierbarkeit im Vergleich zu den bisherigen Verfahren angenommen (Lechner and Weltermann, 2008). Tierexperimentelle

Studien konnten die Anwesenheit von TF-Antigen eingebettet in Blutgerinnseln und an Leukozyten nachweisen (Hoffman et al., 2006; Zhou et al., 2009), ebenso erfolgte der Nachweis von TF-Aktivität und TF-Antigen in venösem Thrombusmaterial von thrombektomierten Patienten (Himber et al., 2002). Diese Ergebnisse wiesen aber noch nicht auf die genauen Quellen des zirkulierenden TF hin, da mittels Antigen Methoden ebenfalls der alternativ gespleißte TF (asTF) bestimmt wird (Bogdanov et al., 2006). Diese lösliche TF-Form trägt nicht in signifikantem Umfang zur prokoagulatorischen Aktivität von TF bei, spielt aber bei der Angiogenese eine wichtige Rolle (van den Berg et al., 2009). Es liegen jedoch auch Daten vor, die auf eine ‚Decryption‘ der TF-Expression auf MPs hinweisen, welche durch das Auftauen der Proben zustande kommen kann (Lechner and Weltermann, 2008). Auch unsere MP-Proben wurden zur weiteren Analyse wieder aufgetaut, wobei dieser Schritt bei allen Proben der Studien- und Kontrollgruppe in gleicher Weise erfolgte.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit stellen nach dem heutigen Kenntnisstand unter Verwendung des FXa-Generation Assay vermutlich mit einer höheren Genauigkeit die funktionellen Eigenschaften und das thrombogene Potential von zirkulierendem TF-Protein dar, als die alleinige Bestimmung von Antigenkonzentrationen oder Quantifizierung von Mikropartikeln.

In der vorliegenden Arbeit konnte keine erhöhte TF-Aktivität bei akuten venösen Thrombosen nachgewiesen werden. Außerdem ergab sich kein Anhalt für eine Beteiligung von zirkulierendem TF und TF präsentierenden MPs an der Entstehung einer venösen Thrombose. In die Beurteilung der Daten sind aber auch eventuelle Unterschiede in der TF-Aktivität, vor allem in Bezug auf prothrombotische Effekte (Bach, 2006) und das relativ lokalisierte Geschehen einer venösen Thrombose in Mikrokompartimenten der Blutzirkulation einzubeziehen. Beide Phänomene könnten Tissue Factor einem möglichen Nachweis im Blutplasma entzogen haben. Zusätzlich könnten die Einflüsse von zellulären Blutbestandteilen und des Endothels zu einer nicht nachzuweisenden Aktivitätsveränderung von TF im gesamten Blutplasma geführt haben.

Die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems konnte bei den untersuchten TVT-Patienten durch eine fast auf das Doppelt erhöhte Prothrombinfragment-Konzentration (F1+2) im Blutplasma indirekt nachgewiesen werden. In experimentellen und klinischen Studien wurde gezeigt, dass die F1+2 Konzentration mit der FVII Aktivität korreliert (MacCallum et al., 2000) und der Tissue Factor/FVIIa Komplex der Aktivierung des Gerinnungssystems zugrunde liegt (Miller et al., 1991). Unsere Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass eine Thrombinbildung im Rahmen der venösen Thrombose stattfindet, allerdings bleibt ein Nachweis erhöhter Aktivität des Tissue Faktors aus bisher nicht abschließend einzugrenzenden Gründen aus. Eine mögliche Erklärung wäre eine relativ kurze Halbwertszeit der TF-Aktivität im Blutplasma *in vivo*. In tierexperimentellen Studien sank die TF-Aktivität innerhalb von 24 Stunden wieder auf das Ausgangsniveau ab (Taubman et al., 1993). Die tatsächliche Diagnosestellung einer Thrombose erfolgt aber meist erst nach mehreren Tagen im Zusammenhang mit dem Ausbleiben einer Besserung der klinischen Symptome. Insofern können wir nicht ausschließen, dass nach dieser Latenz auch in unserem Studienablauf keine erhöhte TF-Aktivität mehr nachweisbar war.

Bidot et al. konnten in einer aktuellen Studie eine erhöhte MP-assoziierte Thrombinbildungsaktivität bei Patienten mit rezidivierenden Thrombosen im Vergleich zu Kontrollen nachweisen (Bidot et al., 2008). Neben der Bestimmung der Gesamt-Thrombinbildung wurden die Mikropartikel im Unterschied zu der hier angewendeten Methode durch Hochgeschwindigkeitszentrifugation isoliert und nicht mithilfe von Antikörperbindung. Dies könnte schon in der Versuchsvorbereitung zu einer *ex vivo* Aktivierung und ungewollter Veränderung der Mikropartikeleigenschaften geführt haben.

Bisher erhärtet eine weitere Studie die Annahme, dass TVTs auch ohne eine erhöhte TF-Aktivität entstehen können. Entsprechend unserer erhobenen Daten beobachteten Tesselaar et al. 2007 keinen signifikanten Unterschied der MP-assoziierten TF-Aktivität zwischen Patienten mit idiopathischen Thrombosen und Gesunden aus einer Kontrollgruppe. Dabei benutzten sie einen Test, bei dem negativ geladene Phospholipide dem System zugeführt wurden und allein der TF- Anteil der

MPs für das Ergebnis ausschlaggebend war (Tesselaar et al., 2007). Andererseits fanden sie bei Patienten mit TVT und einem zusätzlichen Tumorleiden eine signifikant höhere MP-assoziierte TF-Aktivität im Vergleich zur gesunden Studienpopulation (Tesselaar et al., 2009). Dieser Zusammenhang bestand jedoch nicht bei Patienten mit idiopathischer TVT sowie einer Patientengruppe mit metastasiertem Tumorleiden, die eine TVT während einer chemotherapeutischen Behandlung entwickelten.

Obwohl die Pathomechanismen der koronaren Atherothrombose vermehrt Anhalt für eine Beteiligung von zirkulierendem TF geben (Huisse et al., 2009; Morel et al., 2009; Steppich et al., 2009), weisen unsere Daten auf eine nur untergeordnete Rolle von zirkulierendem TF/TF+MPs bei VTs hin.

Es stellt sich außerdem die Frage, ob die TF-Aktivität als prognostischer Marker bei VT-Patienten von Bedeutung sein könnte. Bisher ist ein Vergleich von TF-Konzentrationen und Aktivitäten ohne eine internationale standardisierte Methode aber nicht möglich. Es gibt bisher ebenfalls keine prospektiven Studien, die TF-Konzentrationen als einen Marker für das Thromboserisiko belegen würden, obwohl bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen, entzündlichen Veränderungen oder Malignomen erhöhte MP-TF Konzentrationen dokumentiert worden sind (Key, 2010).

Venöse Thrombosen sind multifaktorielle Ereignisse (Vogel, 1994). Obwohl unsere Ergebnisse bestätigen, dass die plasmatische Gerinnungskaskade über eine Thrombinaktivierung erfolgt, kann eine eindeutige Theorie zur Initiierung der VT, aufgrund des derzeitigen Kenntnisstands in der Hämostaseologie, daraus nicht abgeleitet werden.

5.3 Zusammenhang von Inflammation, Thrombose und Tissue Factor

In großen klinischen Studien konnten erhöhte Werte von IL-6 und IL-8 bei venösen Thromboembolien nachgewiesen werden (Fox and Kahn, 2005; van Aken et al., 2000). Unsere Daten können diesen Zusammenhang durch den Nachweis erhöhter

Zytokinkonzentrationen von IL-6 und IL-8 im Blutplasma von Thrombosepatienten bestätigen.

IL-6 gilt als eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine, die für die Sekretion von Akute-Phase-Proteinen in Hepatozyten, wie Fibrinogen, CRP und Albumin verantwortlich sind (Baumann and Gauldie, 1990). Es vermittelt zusammen mit IL-8 auch prokoagulatorischen Prozesse auf Monozyten (Neumann et al., 1997; Ott et al., 1998). IL-8 wird von verschiedenen Zelltypen produziert u.a. von Endothelzellen, Monozyten, Neutrophilen und Fibroblasten (Hoch et al., 1996). Die proinflammatorische Zytokine IL-1 β und TNF- α können die IL-8-Synthese stimulieren (Baggiolini et al., 1994). Koaguliertes Blut induziert *in vitro* die Produktion von IL-8 (Johnson et al., 1998). Auch Faktor Xa, Thrombin und Fibrin lösen durch die Aktivierung von Endothelzellen die Freisetzung von IL-6 und IL-8 aus (Sower et al., 1995; van der Poll et al., 2001)

Bisherige Hinweise für eine *in vivo* Stimulation von Entzündungsprozessen durch Gerinnungsfaktoren ergaben sich nach Infusion von rekombinantem Faktor VIIa bei gesunden Personen. Es zeigten sich im zeitlichen Verlauf drei- bis vierfach erhöhte Plasmawerte für die Zytokine IL-6 und IL-8 (de Jonge et al., 2003).

Die in unseren Daten beobachteten Veränderungen der Entzündungsmarker zeigten jedoch weder eine Korrelation mit der klinische Charakteristik noch der Thrombinbildung, so dass eine eindeutige Assoziation zwischen Inflammation und venöser Thrombose nicht zu bestätigen ist.

Zum Zeitpunkt der Diagnose einer venösen Thrombose lassen die nachgewiesenen inflammatorischen Prozesse bei einmaliger Bestimmung der Entzündungsparameter keine Rückschlüsse zu, ob sie Auslöser der Thrombose sind oder als Reaktion auf das thrombotische Ereignis entstehen. Hierfür wäre eine Verlaufsmessung der inflammatorischen Parameter sinnvoll. So beobachteten Roumen-Klappe et al. die Konzentrationen von inflammatorischen Markern in einer klinischen Studie ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung über fünf Tage. Hierbei erhärtete sich der Verdacht, dass der Thrombose eine reaktive Entzündung folgt, da die Interleukin-

Konzentrationen nach der ersten Bestimmung kontinuierlich abfielen und keine signifikanten Unterschiede zwischen idiopathischen und sekundären Thrombosen festzustellen waren (Roumen-Klappe et al., 2002).

Bei Betrachtung unserer Ergebnisse ist außerdem keine Korrelation zwischen den inflammatorischen Markern und den TF-Aktivitäten festzustellen. Es sind jedoch weitere Mechanismen für eine Thrombusentstehung vorstellbar: So führen venöse Stase und Ischämien zu lokalisierter Hochregulation von P-Selectin, welches MP im Bereich der Thrombose bindet, die wiederum prothrombotischen TF auf ihrer Oberfläche exprimieren (Wakefield et al., 2008). Eine nähere Betrachtung der Adhäsionseigenschaften des Gefäßendothels durch P-Selectin in der frühen Thrombusentstehung konnten bei den im Rahmen der Studie durchgeführten Untersuchungen nicht berücksichtigt werden, da es sich hierbei um direkt im Thrombusgebiet lokalisierte Prozesse handelt.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Erhöhung von IL-6- und IL-8-Konzentrationen im Blutplasma wäre aber mit der gleichzeitigen Adhäsion und Aktivierung von Leukozyten im Thrombusbereich durch eine P-Selectin/PSGL-1 Verbindung erklärbar. Studien konnten belegen, dass TF zusätzlich durch aktivierte MPs mit PSGL-1 Rezeptoren in das Thrombusgebiet gelotst wird (Day et al., 2005), genauso wie Thrombozyten und Leukozyten (Furie et al., 2001; Kirchhofer et al., 1995). Zusätzlich kommt es durch Leukozyten-Thrombozyten Interaktion zur Bildung von TF (Celi et al., 1994). Die Literaturergebnisse untermauern insgesamt den zentralen Zusammenhang von Inflammation und Thrombogenese (Walenga et al., 2000) mit gleichzeitiger Interaktion von MP-TF in prokoagulativen und inflammatorischen Prozessen. Es handelt sich aber bei allen Prozessen um ein weitgehend lokalisiertes Geschehen. So ist es vorstellbar, dass sich, wie in unseren Ergebnissen, keine generalisiert erhöhte TF-Aktivität nachweisen lässt.

Weitere sowohl klinische als auch experimentelle Erkenntnisse werden notwendig sein, um den Zusammenhang von zirkulierendem TF und venösen Thrombosen umfassend zu verstehen und seine Bedeutung bei der Thrombusentstehung besser beurteilen zu können. Nach den vorliegenden Ergebnissen wird eine tragende Rolle

in Bezug auf die venöse Thrombusbildung unwahrscheinlicher, sie ist aber, wie in der Diskussion dargestellt, auch nicht auszuschließen.

5.4 Limitierung

Im Vergleich zum Patientenkollektiv von 48 Patienten muss betont werden, daß die Kontrollgruppe mit 23 Patienten relativ klein ist. Zusätzlich sind die einzelnen TVT Patienten, die in die Studie aufgenommen wurden, bei der statistischen Auswertung in Anbetracht der resultierenden sehr kleinen Untergruppen nicht weiter bezüglich ihrer Grunderkrankung und ihren spezifischen Risiken aufgeteilt worden.

6 Zusammenfassung

Martin Hassenpflug

Tissue Faktor Aktivität bei Patienten mit akuter venöser Thrombose

Die venöse Thromboembolie ist eine der häufigsten multifaktoriell bedingten Erkrankungen mit teilweise letalen Folgen beim Auftreten von Lungenarterienembolien.

Diese Arbeit widmet sich der prokoagulatorischen Aktivität von Tissue Factor und der begleitenden inflammatorischen Reaktion im Blutplasma von Patienten mit venösen Thromboembolien.

Tissue Factor ist ein transmembranes Glykoprotein welches unter physiologischen Bedingungen vor allem in der Adventitia von Gefäßwänden vorkommt. Er stellt den wichtigsten Auslöser der extrinsischen Gerinnungskaskade dar. Hinweise für Bedeutung von Tissue Factor konnten bisher vor allem für die koronare Herzerkrankung mit ihren atherosklerotischen Gefäßwandläsionen gefunden werden. Die Kenntnisse über eine Tissue Factor-Beteiligung bei der Blutgerinnung bei intaktem Endothel wie bei einer venösen Thrombose sind bisher jedoch begrenzt. Es ist allerdings nachgewiesen, dass Tissue Faktor im Blutplasma zirkulieren kann, wobei er zu einem großen Teil an Mikropartikel gebunden ist. Eine Beurteilung der Plasmakonzentrationen von mikropartikelgebundenem-Tissue Faktor und freiem Tissue Faktor könnte daher Aufschluss über ihre Beteiligung bei der venösen Thrombose geben.

In der vorliegenden Studie wurden bei 48 Patienten direkt nach der Diagnosestellung einer akuten VT sowie bei 23 Kontrollpatienten einmalig Vollblutproben entnommen. MP-TF und freier TF wurde im Patientenplasma mit TF-Aktivitäts-Assays untersucht.

Die Gerinnungsaktivität von zirkulierendem TF und MP-TF war bei Patienten mit tiefer Venenthrombose im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nicht erhöht. Im Gegensatz dazu zeigte sich ein signifikanter Anstieg von Il-6 und Il-8 sowie der Prothrombinfragmente F1 und F2 (F1+F2) im Plasma der Patienten mit einer VT. Die erhöhten Werte von Il-6, Il-8 und F1+F2 korrelierten weder mit der Thrombinbildung oder der klinischen Präsentation der venösen Thrombose. Die im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhten Zytokinkonzentrationen gaben aber einen Hinweis auf eine Leukozytenaktivierung im Thrombusbereich, welche durch eine P-Selectin/PSGL-1 Verbindung erklärbar ist.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen eine tragende Rolle von zirkulierendem TF in Bezug auf die venöse Thrombusbildung unwahrscheinlicher werden.

7 Abkürzungsverzeichnis

a	Aktiviert
AS	Aminosäuren
°C	Grad Celcius
CBA	Cytometric Bead Array
cDNA	Desoxyribonukleinsäure
CRP	C-reaktives Protein
Elisa	Enzyme-linked immunosorbent assay
F1+2	Prothrombinfragment F1+2
FX	Faktor 10
INR	International Normalized Ratio
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
LAE	Lungenarterienembolie
MCP-1	Monocyte chemoattractive protein-1
min	Minuten
MP	Mikropartikel
MP-TF	Mikropartikel gebundener Tissue Factor
PCR	Polimerase Kettenreaktion
pNA	p-Nitroanilide
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
RNA	Ribonukleinsäure
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha
TVT	Tiefe Beinvenenthrombose
U/min	Umdrehungen pro Minute
VT	Venöse Thromboembolie

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Klassische Einteilung der Gerinnungskaskade in ein intrinsisches und ein extrinsisches System.....	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Thrombusbildung bei intaktem Gefäßendothel. Nähere Erläuterungen im Text.	7
Abbildung 3: Thrombusentstehung und Vergrößerung bei P/E-Selectin Expression auf Endotheloberfläche in venösen Gefäßen durch Stase, Verletzung und Hypoxie. Modifiziert nach Myers et al., 2003.....	13
Abbildung 4: Thrombose in gedoppelter Vena femoralis communis im linken Bild ohne und im rechten Bild mit Kompression (farbkodierte Duplexsonographie). Es ist deutlich die fehlende komprimierbarkeit der Vene mit einem echoreichen Thrombus im Venenlumen zu erkennen.	19
Abbildung 5: Spectrocyme® Xa ist ein chromogenes Substrat mit dem Farbstoff para-Nitroanilin (pNA) in gebundener Form. Aktivierter Faktor Xa besitzt die Fähigkeit pNA abspalten. Es kommt zu einer Gelbfärbung und Anstieg der Lichtabsorption.....	25
Tabelle 1: Detektionsgrenzen der Zytokine:	29
Tabelle 2: Patientenparameter und Blutplasmawerte bei TVT Patienten	32
Tabelle 3: Gerinnungsparameter und Zytokinkonzentrationen in der Studien- und Kontrollgruppe.....	34

9 Literaturangaben

- Andersen, H., Greenberg, D.L., Fujikawa, K., Xu, W., Chung, D.W., Davie, E.W., 1999, Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11189-11193.
- Andre, P., Denis, C.V., Ware, J., Saffaripour, S., Hynes, R.O., Ruggeri, Z.M., Wagner, D.D., 2000, Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. *Blood* 96, 3322-3328.
- Aronson, D.L., Stevan, L., Ball, A.P., Franza, B.R., Jr., Finlayson, J.S., 1977, Generation of the combined prothrombin activation peptide (F1-2) during the clotting of blood and plasma. *J Clin Invest* 60, 1410-1418.
- Ay, C., Freyssinet, J.M., Sailer, T., Vormittag, R., Pabinger, I., 2009, Circulating procoagulant microparticles in patients with venous thromboembolism. *Thromb Res* 123, 724-726.
- Bach, R.R., 2006, Tissue factor encryption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 456-461.
- Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B., 1994, Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55, 97-179.
- Baigent, C., Blackwell, L., Collins, R., Emberson, J., Godwin, J., Peto, R., Buring, J., Hennekens, C., Kearney, P., Meade, T., Patrono, C., Roncaglioni, M.C., Zanchetti, A., 2009, Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet* 373, 1849-1860.
- Baumann, H., Gauldie, J., 1990, Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. *Mol Biol Med* 7, 147-159.
- Berckmans, R.J., Neuwland, R., Boing, A.N., Romijn, F.P., Hack, C.E., Sturk, A., 2001, Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* 85, 639-646.
- Bidot, L., Jy, W., Bidot, C., Jr., Jimenez, J.J., Fontana, V., Horstman, L.L., Ahn, Y.S., 2008, Microparticle-mediated thrombin generation assay: increased activity in patients with recurrent thrombosis. *J Thromb Haemost* 6, 913-919.
- Birdwell, B.G., Raskob, G.E., Whitsett, T.L., Durica, S.S., Comp, P.C., George, J.N., Tittle, T.L., McKee, P.A., 1998, The clinical validity of normal compression ultrasonography in outpatients suspected of having deep venous thrombosis. *Ann Intern Med* 128, 1-7.

- Bogdanov, V.Y., Balasubramanian, V., Hathcock, J., Vele, O., Lieb, M., Nemerson, Y., 2003, Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med* 9, 458-462.
- Bogdanov, V.Y., Kirk, R.I., Miller, C., Hathcock, J.J., Vele, S., Gazdoui, M., Nemerson, Y., Taubman, M.B., 2006, Identification and characterization of murine alternatively spliced tissue factor. *J Thromb Haemost* 4, 158-167.
- Bruhn, H.D., Hach-Wunderle, V., Schambeck C.M., *Hämostaseologie für die Praxis*, 2007, Schattauer
- Bugge, T.H., Xiao, Q., Kombrinck, K.W., Flick, M.J., Holmback, K., Danton, M.J., Colbert, M.C., Witte, D.P., Fujikawa, K., Davie, E.W., Degen, J.L., 1996, Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6258-6263.
- Bulger, C.M., Jacobs, C., Patel, N.H., 2004, Epidemiology of acute deep vein thrombosis. *Tech Vasc Interv Radiol* 7, 50-54.
- Butenas, S., Bouchard, B.A., Brummel-Ziedins, K.E., Parhami-Seren, B., Mann, K.G., 2005, Tissue factor activity in whole blood. *Blood* 105, 2764-2770.
- Carmeliet, P., Mackman, N., Moons, L., Luther, T., Gressens, P., Van Vlaenderen, I., Demunck, H., Kasper, M., Breier, G., Evrard, P., Muller, M., Risau, W., Edgington, T., Collen, D., 1996, Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 383, 73-75.
- Celi, A., Pellegrini, G., Lorenzet, R., De Blasi, A., Ready, N., Furie, B.C., Furie, B., 1994, P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8767-8771.
- Cermak, J., Key, N.S., Bach, R.R., Balla, J., Jacob, H.S., Vercellotti, G.M., 1993, C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. *Blood* 82, 513-520.
- Chen, J., Bierhaus, A., Schiekofer, S., Andrassy, M., Chen, B., Stern, D.M., Nawroth, P.P., 2001, Tissue factor--a receptor involved in the control of cellular properties, including angiogenesis. *Thromb Haemost* 86, 334-345.
- Cho, J., Furie, B.C., Coughlin, S.R., Furie, B., 2008, A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. *J Clin Invest* 118, 1123-1131.
- Chooi, C.C., Gallus, A.S., 1989, Acute phase reaction, fibrinogen level and thrombus size. *Thromb Res* 53, 493-501.

- Chou, J., Mackman, N., Merrill-Skoloff, G., Pedersen, B., Furie, B.C., Furie, B., 2004, Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood* 104, 3190-3197.
- Cogo, A., Lensing, A.W., Koopman, M.M., Piovella, F., Siragusa, S., Wells, P.S., Villalta, S., Buller, H.R., Turpie, A.G., Prandoni, P., 1998, Compression ultrasonography for diagnostic management of patients with clinically suspected deep vein thrombosis: prospective cohort study. *BMJ* 316, 17-20.
- Cohen, A.T., Agnelli, G., Anderson, F.A., Arcelus, J.I., Bergqvist, D., Brecht, J.G., Greer, I.A., Heit, J.A., Hutchinson, J.L., Kakkar, A.K., Mottier, D., Oger, E., Samama, M.M., Spannagl, M., 2007, Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost* 98, 756-764.
- Contrino, J., Hair, G., Kreuzer, D.L., Rickles, F.R., 1996, In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nat Med* 2, 209-215.
- Courtney, J.M., Forbes, C.D., 1994, Thrombosis on foreign surfaces. *Br Med Bull* 50, 966-981.
- Cui, M.Z., Parry, G.C., Oeth, P., Larson, H., Smith, M., Huang, R.P., Adamson, E.D., Mackman, N., 1996, Transcriptional regulation of the tissue factor gene in human epithelial cells is mediated by Sp1 and EGR-1. *J Biol Chem* 271, 2731-2739.
- Dahm, A., Van Hylckama Vlieg, A., Bendz, B., Rosendaal, F., Bertina, R.M., Sandset, P.M., 2003, Low levels of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) increase the risk of venous thrombosis. *Blood* 101, 4387-4392.
- Davie, E.W., Ratnoff, O.D., 1964, Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*; 145:1310-1312.
- Day, S.M., Reeve, J.L., Pedersen, B., Farris, D.M., Myers, D.D., Im, M., Wakefield, T.W., Mackman, N., Fay, W.P., 2005, Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from the blood vessel wall. *Blood* 105, 192-198.
- de Jonge, E., Friederich, P.W., Vlasuk, G.P., Rote, W.E., Vroom, M.B., Levi, M., van der Poll, T., 2003, Activation of coagulation by administration of recombinant factor VIIa elicits interleukin 6 (IL-6) and IL-8 release in healthy human subjects. *Clin Diagn Lab Immunol* 10, 495-497.
- Deregibus, M.C., Cantaluppi, V., Calogero, R., Lo Iacono, M., Tetta, C., Biancone, L., Bruno, S., Bussolati, B., Camussi, G., 2007, Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 110, 2440-2448.

- Downing, L.J., Strieter, R.M., Kadell, A.M., Wilke, C.A., Austin, J.C., Hare, B.D., Burdick, M.D., Greenfield, L.J., Wakefield, T.W., 1998, IL-10 regulates thrombus-induced vein wall inflammation and thrombosis. *J Immunol* 161, 1471-1476.
- Downing, L.J., Wakefield, T.W., Strieter, R.M., Prince, M.R., Londy, F.J., Fowlkes, J.B., Hulin, M.S., Kadell, A.M., Wilke, C.A., Brown, S.L., Wroblewski, S.K., Burdick, M.D., Anderson, D.C., Greenfield, L.J., 1997, Anti-P-selectin antibody decreases inflammation and thrombus formation in venous thrombosis. *J Vasc Surg* 25, 816-827; discussion 828.
- Drake, T.A., Morrissey, J.H., Edgington, T.S., 1989, Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 134, 1087-1097.
- Dubois, C., Panicot-Dubois, L., Gainor, J.F., Furie, B.C., Furie, B., 2007, Thrombin-initiated platelet activation in vivo is vWF independent during thrombus formation in a laser injury model. *J Clin Invest* 117, 953-960.
- Dubois, C., Panicot-Dubois, L., Merrill-Skoloff, G., Furie, B., Furie, B.C., 2006, Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood* 107, 3902-3906.
- Edgington, T.S., Mackman, N., Brand, K., Ruf, W., 1991, The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost* 66, 67-79.
- Eilertsen, K.E., Osterud, B., 2004, Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis* 15, 521-538.
- Esmon, C.T., 2003, Inflammation and thrombosis. *J Thromb Haemost* 1, 1343-1348.
- Esmon, C.T., 2009, Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. *Blood Rev* 23, 225-229.
- Falati, S., Gross, P., Merrill-Skoloff, G., Furie, B.C., Furie, B., 2002, Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nat Med* 8, 1175-1181.
- Fernandez, P.M., Rickles, F.R., 2002, Tissue factor and angiogenesis in cancer. *Curr Opin Hematol* 9, 401-406.
- Fox, E.A., Kahn, S.R., 2005, The relationship between inflammation and venous thrombosis. A systematic review of clinical studies. *Thromb Haemost* 94, 362-365.
- Furie, B., Furie, B.C., 2008, Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 359, 938-949.

- Furie, B., Furie, B.C., Flaumenhaft, R., 2001, A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb Haemost* 86, 214-221.
- Furumoto, T., Fujii, S., Saito, N., Mikami, T., Kitabatake, A., 2002, Relationships between brachial artery flow mediated dilation and carotid artery intima-media thickness in patients with suspected coronary artery disease. *Jpn Heart J* 43, 117-125.
- Gaitini, D., 2007, Multimodality imaging of the peripheral venous system. *Int J Biomed Imaging* 2007, 54616.
- Giesen, P.L., Rauch, U., Bohrmann, B., Kling, D., Roque, M., Fallon, J.T., Badimon, J.J., Himber, J., Riederer, M.A., Nemerson, Y., 1999, Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2311-2315.
- Girolami, A., Prandoni, P., Simioni, P., Girolami, B., Scarano, L., Zanon, E., 1995, The pathogenesis of venous thromboembolism. *Haematologica* 80, 25-35.
- Habscheid, W., Hohmann, M., Wilhelm, T., Epping, J., 1990, Real-time ultrasound in the diagnosis of acute deep venous thrombosis of the lower extremity. *Angiology* 41, 599-608.
- Hartwell, D.W., Mayadas, T.N., Berger, G., Frenette, P.S., Rayburn, H., Hynes, R.O., Wagner, D.D., 1998, Role of P-selectin cytoplasmic domain in granular targeting in vivo and in early inflammatory responses. *J Cell Biol* 143, 1129-1141.
- Heit, J.A., 2005, Cancer and venous thromboembolism: scope of the problem. *Cancer Control* 12 Suppl 1, 5-10.
- Himber, J., Kling, D., Fallon, J.T., Nemerson, Y., Riederer, M.A., 2002, In situ localization of tissue factor in human thrombi. *Blood* 99, 4249-4250.
- Himber, J., Wohlgensinger, C., Roux, S., Damico, L.A., Fallon, J.T., Kirchhofer, D., Nemerson, Y., Riederer, M.A., 2003, Inhibition of tissue factor limits the growth of venous thrombus in the rabbit. *J Thromb Haemost* 1, 889-895.
- Hoch, R.C., Schraufstatter, I.U., Cochrane, C.G., 1996, In vivo, in vitro, and molecular aspects of interleukin-8 and the interleukin-8 receptors. *J Lab Clin Med* 128, 134-145.
- Hoffman, M., Whinna, H.C., Monroe, D.M., 2006, Circulating tissue factor accumulates in thrombi, but not in hemostatic plugs. *J Thromb Haemost* 4, 2092-2093.

- Hrachovinova, I., Cambien, B., Hafezi-Moghadam, A., Kappelmayer, J., Camphausen, R.T., Widom, A., Xia, L., Kazazian, H.H., Jr., Schaub, R.G., McEver, R.P., Wagner, D.D., 2003, Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A. *Nat Med* 9, 1020-1025.
- Huang, Z.F., Higuchi, D., Lasky, N., Broze, G.J., Jr., 1997, Tissue factor pathway inhibitor gene disruption produces intrauterine lethality in mice. *Blood* 90, 944-951.
- Huisman, M.V., Buller, H.R., ten Cate, J.W., Vreeken, J., 1986, Serial impedance plethysmography for suspected deep venous thrombosis in outpatients. The Amsterdam General Practitioner Study. *N Engl J Med* 314, 823-828.
- Huisse, M.G., Ajzenberg, N., Feldman, L., Guillin, M.C., Steg, P.G., 2009, Microparticle-linked tissue factor activity and increased thrombin activity play a potential role in fibrinolysis failure in ST-segment elevation myocardial infarction. *Thromb Haemost* 101, 734-740.
- Hull, R., Hirsh, J., Sackett, D.L., Taylor, D.W., Carter, C., Turpie, A.G., Powers, P., Gent, M., 1981, Clinical validity of a negative venogram in patients with clinically suspected venous thrombosis. *Circulation* 64, 622-625.
- Hull, R.D., Raskob, G.E., Hirsh, J., 1986, Prophylaxis of venous thromboembolism. An overview. *Chest* 89, 374S-383S.
- Johnson, K., Aarden, L., Choi, Y., De Groot, E., Creasey, A., 1996, The proinflammatory cytokine response to coagulation and endotoxin in whole blood. *Blood* 87, 5051-5060.
- Johnson, K., Choi, Y., DeGroot, E., Samuels, I., Creasey, A., Aarden, L., 1998, Potential mechanisms for a proinflammatory vascular cytokine response to coagulation activation. *J Immunol* 160, 5130-5135.
- Kahn, S.R., Shrier, I., Julian, J.A., Ducruet, T., Arsenault, L., Miron, M.J., Roussin, A., Desmarais, S., Joyal, F., Kassis, J., Solymoss, S., Desjardins, L., Lamping, D.L., Johri, M., Ginsberg, J.S., 2008, Determinants and time course of the postthrombotic syndrome after acute deep venous thrombosis. *Ann Intern Med* 149, 698-707.
- Kakkar, A.K., Lemoine, N.R., Scully, M.F., Tebbutt, S., Williamson, R.C., 1995, Tissue factor expression correlates with histological grade in human pancreatic cancer. *Br J Surg* 82, 1101-1104.
- Key, N.S., 2010, Analysis of tissue factor positive microparticles. *Thromb Res*.

- Kirchhofer, D., Tschopp, T.B., Hadvary, P., Baumgartner, H.R., 1994, Endothelial cells stimulated with tumor necrosis factor-alpha express varying amounts of tissue factor resulting in inhomogenous fibrin deposition in a native blood flow system. Effects of thrombin inhibitors. *J Clin Invest* 93, 2073-2083.
- Kirchhofer, D., Tschopp, T.B., Steiner, B., Baumgartner, H.R., 1995, Role of collagen-adherent platelets in mediating fibrin formation in flowing whole blood. *Blood* 86, 3815-3822.
- Koyama, T., Nishida, K., Ohdama, S., Sawada, M., Murakami, N., Hirosawa, S., Kuriyama, R., Matsuzawa, K., Hasegawa, R., Aoki, N., 1994, Determination of plasma tissue factor antigen and its clinical significance. *Br J Haematol* 87, 343-347.
- Kunzelmann-Marche, C., Satta, N., Toti, F., Zhang, Y., Nawroth, P.P., Morrissey, J.H., Freyssinet, J.M., 2000, The influence exerted by a restricted phospholipid microenvironment on the expression of tissue factor activity at the cell plasma membrane surface. *Thromb Haemost* 83, 282-289.
- Lammle, B., Wuillemin, W.A., Huber, I., Krauskopf, M., Zurcher, C., Pflugshaupt, R., Furlan, M., 1991, Thromboembolism and bleeding tendency in congenital factor XII deficiency--a study on 74 subjects from 14 Swiss families. *Thromb Haemost* 65, 117-121.
- Laporte, S., Mismetti, P., Decousus, H., Uresandi, F., Otero, R., Lobo, J.L., Monreal, M., 2008, Clinical predictors for fatal pulmonary embolism in 15,520 patients with venous thromboembolism: findings from the Registro Informatizado de la Enfermedad TromboEmbolica venosa (RIETE) Registry. *Circulation* 117, 1711-1716.
- Lechner, D., Weltermann, A., 2008, Circulating tissue factor-exposing microparticles. *Thromb Res* 122 Suppl 1, S47-54.
- Lensing, A.W., Prandoni, P., Brandjes, D., Huisman, P.M., Vigo, M., Tomasella, G., Krekt, J., Wouter Ten Cate, J., Huisman, M.V., Buller, H.R., 1989, Detection of deep-vein thrombosis by real-time B-mode ultrasonography. *N Engl J Med* 320, 342-345.
- Lignitz, E., Lignitz, G., Puschel, K., 1995, [Lung embolism as the cause of death in legal medicine]. *Versicherungsmedizin* 47, 203-207.
- Lip, G.Y., Lowe, G.D., 1995, Fibrin D-dimer: a useful clinical marker of thrombogenesis? *Clin Sci (Lond)* 89, 205-214.
- Lopez, J.A., Kearon, C., Lee, A.Y., 2004, Deep venous thrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 439-456.

- Lund, F., Diener, L., Ericsson, J.L., 1969, Postmortem intraosseous phlebography as an aid in studies of venous thromboembolism. With application on a geriatric clientele. *Angiology* 20, 155-176.
- MacCallum, P.K., Cooper, J.A., Martin, J., Howarth, D.J., Meade, T.W., Miller, G.J., 2000, Haemostatic and lipid determinants of prothrombin fragment F1.2 and D-dimer in plasma. *Thromb Haemost* 83, 421-426.
- MacFarlane, R.G., 1964, An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*; 202: 498-499.
- Mallat, Z., Benamer, H., Hugel, B., Benessiano, J., Steg, P.G., Freyssinet, J.M., Tedgui, A., 2000, Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 101, 841-843.
- Mangin, P., Yap, C.L., Nonne, C., Sturgeon, S.A., Goncalves, I., Yuan, Y., Schoenwaelder, S.M., Wright, C.E., Lanza, F., Jackson, S.P., 2006, Thrombin overcomes the thrombosis defect associated with platelet GPVI/FcRgamma deficiency. *Blood* 107, 4346-4353.
- Marshall, M., 1986, [Significance of deep venous thrombosis in surgical patients]. *Med Klin Suppl* 3, 11-13.
- Mattos, M.A., Londrey, G.L., Leutz, D.W., Hodgson, K.J., Ramsey, D.E., Barkmeier, L.D., Stauffer, E.S., Spadone, D.P., Sumner, D.S., 1992, Color-flow duplex scanning for the surveillance and diagnosis of acute deep venous thrombosis. *J Vasc Surg* 15, 366-375; discussion 375-366.
- Mayadas, T.N., Johnson, R.C., Rayburn, H., Hynes, R.O., Wagner, D.D., 1993, Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* 74, 541-554.
- Menges, T., Hermans, P.W., Little, S.G., Langefeld, T., Boning, O., Engel, J., Sluijter, M., de Groot, R., Hempelmann, G., 2001, Plasminogen-activator-inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism and prognosis of severely injured patients. *Lancet* 357, 1096-1097.
- Miller, G.J., Wilkes, H.C., Meade, T.W., Bauer, K.A., Barzegar, S., Rosenberg, R.D., 1991, Haemostatic changes that constitute the hypercoagulable state. *Lancet* 338, 1079.
- Morange, P.E., Bickel, C., Nicaud, V., Schnabel, R., Rupprecht, H.J., Peetz, D., Lackner, K.J., Cambien, F., Blankenberg, S., Tiret, L., 2006, Haemostatic factors and the risk of cardiovascular death in patients with coronary artery disease: the AtheroGene study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 2793-2799.

- Morange, P.E., Simon, C., Alessi, M.C., Luc, G., Arveiler, D., Ferrieres, J., Amouyel, P., Evans, A., Ducimetiere, P., Juhan-Vague, I., 2004, Endothelial cell markers and the risk of coronary heart disease: the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME) study. *Circulation* 109, 1343-1348.
- Morel, O., Pereira, B., Averous, G., Faure, A., Jesel, L., Germain, P., Grunebaum, L., Ohlmann, P., Freyssinet, J.M., Bareiss, P., Toti, F., 2009, Increased levels of procoagulant tissue factor-bearing microparticles within the occluded coronary artery of patients with ST-segment elevation myocardial infarction: role of endothelial damage and leukocyte activation. *Atherosclerosis* 204, 636-641.
- Morrissey, J.H., 2001, Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb Haemost* 86, 66-74.
- Morrissey, J.H., Macik, B.G., Neuenschwander, P.F., Comp, P.C., 1993, Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood* 81, 734-744.
- Myers, D.D., Hawley, A.E., Farris, D.M., Wroblewski, S.K., Thanaporn, P., Schaub, R.G., Wagner, D.D., Kumar, A., Wakefield, T.W., 2003, P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis. *J Vasc Surg* 38, 1075-1089.
- Myers, D.D., Jr., Schaub, R., Wroblewski, S.K., Londy, F.J., 3rd, Fex, B.A., Chapman, A.M., Greenfield, L.J., Wakefield, T.W., 2001, P-selectin antagonism causes dose-dependent venous thrombosis inhibition. *Thromb Haemost* 85, 423-429.
- Myers, D.D., Wakefield, T.W., 2005, Inflammation-dependent thrombosis. *Front Biosci* 10, 2750-2757.
- Nakagawa, K., Zhang, Y., Tsuji, H., Yoshizumi, M., Kasahara, T., Nishimura, H., Nawroth, P.P., Nakagawa, M., 1998, The angiogenic effect of tissue factor on tumors and wounds. *Semin Thromb Hemost* 24, 207-210.
- Neumann, F.J., Ott, I., Marx, N., Luther, T., Kenngott, S., Gawaz, M., Kotzsch, M., Schomig, A., 1997, Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 3399-3405.
- Nomura, S., Suzuki, M., Katsura, K., Xie, G.L., Miyazaki, Y., Miyake, T., Kido, H., Kagawa, H., Fukuhara, S., 1995, Platelet-derived microparticles may influence the development of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 116, 235-240.
- Osterud, B., 1997, Tissue factor: a complex biological role. *Thromb Haemost* 78, 755-758.

- Osterud, B., 2001, The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor. *Semin Hematol* 38, 2-5.
- Osterud, B., 2010, Tissue factor expression in blood cells. *Thromb Res.* 125, 31-34
- Ott, I., Neumann, F.J., Kenngott, S., Gawaz, M., Schomig, A., 1998, Procoagulant inflammatory responses of monocytes after direct balloon angioplasty in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 82, 938-942.
- Patrono, C., 2001, Aspirin: new cardiovascular uses for an old drug. *Am J Med* 110, 62S-65S.
- Patrono, C., Collier, B., Dalen, J.E., Fuster, V., Gent, M., Harker, L.A., Hirsh, J., Roth, G., 1998, Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects. *Chest* 114, 470S-488S.
- Piccioli, A., Prandoni, P., 2001, Idiopathic venous thromboembolism as a first manifestation of cancer. *Haemostasis* 31 Suppl 1, 37-39.
- Polgar, J., Matuskova, J., Wagner, D.D., 2005, The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb Haemost* 3, 1590-1596.
- Prandoni, P., Lensing, A.W., Cogo, A., Cuppini, S., Villalta, S., Carta, M., Cattelan, A.M., Polistena, P., Bernardi, E., Prins, M.H., 1996, The long-term clinical course of acute deep venous thrombosis. *Ann Intern Med* 125, 1-7.
- Preston, R.A., Jy, W., Jimenez, J.J., Mauro, L.M., Horstman, L.L., Valle, M., Aime, G., Ahn, Y.S., 2003, Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension* 41, 211-217.
- Raimondi, P., Bongard, O., de Moerloose, P., Reber, G., Waldvogel, F., Bounameaux, H., 1993, D-dimer plasma concentration in various clinical conditions: implication for the use of this test in the diagnostic approach of venous thromboembolism. *Thromb Res* 69, 125-130.
- Ramacciotti, E., Hawley, A.E., Farris, D.M., Ballard, N.E., Wroblewski, S.K., Myers, D.D., Jr., Henke, P.K., Wakefield, T.W., 2009, Leukocyte- and platelet-derived microparticles correlate with thrombus weight and tissue factor activity in an experimental mouse model of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 101, 748-754.
- Rectenwald, J.E., Myers, D.D., Jr., Hawley, A.E., Longo, C., Henke, P.K., Guire, K.E., Schmaier, A.H., Wakefield, T.W., 2005, D-dimer, P-selectin, and microparticles: novel markers to predict deep venous thrombosis. A pilot study. *Thromb Haemost* 94, 1312-1317.

- Reinhardt, C., von Bruhl, M.L., Manukyan, D., Grahl, L., Lorenz, M., Altmann, B., Dlugai, S., Hess, S., Konrad, I., Orschielt, L., Mackman, N., Ruddock, L., Massberg, S., Engelmann, B., 2008, Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *J Clin Invest* 118, 1110-1122.
- Reininger, A.J., Heijnen, H.F., Schumann, H., Specht, H.M., Schramm, W., Ruggeri, Z.M., 2006, Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood* 107, 3537-3545.
- Rickles, F.R., Hair, G.A., Zeff, R.A., Lee, E., Bona, R.D., 1995, Tissue factor expression in human leukocytes and tumor cells. *Thromb Haemost* 74, 391-395.
- Ridker, P.M., Cushman, M., Stampfer, M.J., Tracy, R.P., Hennekens, C.H., 1997, Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 336, 973-979.
- Ridker, P.M., Rifai, N., Stampfer, M.J., Hennekens, C.H., 2000, Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 101, 1767-1772.
- Righini, M., Perrier, A., De Moerloose, P., Bounameaux, H., 2008, D-Dimer for venous thromboembolism diagnosis: 20 years later. *J Thromb Haemost* 6, 1059-1071.
- Rosendaal, F.R., 1999, Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 353, 1167-1173.
- Roumen-Klappe, E.M., den Heijer, M., van Uum, S.H., van der Ven-Jongekrijg, J., van der Graaf, F., Wollersheim, H., 2002, Inflammatory response in the acute phase of deep vein thrombosis. *J Vasc Surg* 35, 701-706.
- Ruf, W., Rehemtulla, A., Morrissey, J.H., Edgington, T.S., 1991, Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function. *J Biol Chem* 266, 16256.
- Sabatier, F., Darmon, P., Hugel, B., Combes, V., Sanmarco, M., Velut, J.G., Arnoux, D., Charpiot, P., Freyssinet, J.M., Oliver, C., Sampol, J., Dignat-George, F., 2002, Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 51, 2840-2845.
- Salcuni, M., Fiorentino, P., Pedicelli, A., Di Stasi, C., 1996, Diagnostic imaging in deep vein thrombosis of the limbs. *Rays* 21, 328-339.
- Salom, R.N., Maguire, J.A., Hancock, W.W., 1998, Endothelial activation and cytokine expression in human acute cardiac allograft rejection. *Pathology* 30, 24-29.

- Sandset, P.M., 1996, Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)--an update. *Haemostasis* 26 Suppl 4, 154-165.
- Schechter, A.D., Spirn, B., Rossikhina, M., Giesen, P.L., Bogdanov, V., Fallon, J.T., Fisher, E.A., Schnapp, L.M., Nemerson, Y., Taubman, M.B., 2000, Release of active tissue factor by human arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 87, 126-132.
- Seino, Y., Ikeda, U., Ikeda, M., Yamamoto, K., Misawa, Y., Hasegawa, T., Kano, S., Shimada, K., 1994, Interleukin 6 gene transcripts are expressed in human atherosclerotic lesions. *Cytokine* 6, 87-91.
- Sevitt, S., 1974, The structure and growth of valve-pocket thrombi in femoral veins. *J Clin Pathol* 27, 517-528.
- Siegbahn, A., 2000, Cellular consequences upon factor VIIa binding to tissue factor. *Haemostasis* 30 Suppl 2, 41-47.
- Smeeth, L., Cook, C., Thomas, S., Hall, A.J., Hubbard, R., Vallance, P., 2006, Risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism after acute infection in a community setting. *Lancet* 367, 1075-1079.
- Smith, A., Quarmby, J.W., Collins, M., Lockhart, S.M., Burnand, K.G., 1999, Changes in the levels of soluble adhesion molecules and coagulation factors in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Haemost* 82, 1593-1599.
- Sower, L.E., Froelich, C.J., Carney, D.H., Fenton, J.W., 2nd, Klimpel, G.R., 1995, Thrombin induces IL-6 production in fibroblasts and epithelial cells. Evidence for the involvement of the seven-transmembrane domain (STD) receptor for alpha-thrombin. *J Immunol* 155, 895-901.
- St Pierre, J., Yang, L.Y., Tamirisa, K., Scherrer, D., De Ciechi, P., Eisenberg, P., Tolunay, E., Abendschein, D., 1999, Tissue factor pathway inhibitor attenuates procoagulant activity and upregulation of tissue factor at the site of balloon-induced arterial injury in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 2263-2268.
- Stamatakis, J.D., Kakkar, V.V., Sagar, S., Lawrence, D., Nairn, D., Bentley, P.G., 1977, Femoral vein thrombosis and total hip replacement. *Br Med J* 2, 223-225.
- Steppich, B.A., Braun, S.L., Stein, A., Demetz, G., Groha, P., Schomig, A., von Beckerath, N., Kastrati, A., Ott, I., 2009, Plasma TF activity predicts cardiovascular mortality in patients with acute myocardial infarction. *Thromb J* 7, 11.

- Sullivan, V.V., Hawley, A.E., Farris, D.M., Knipp, B.S., Varga, A.J., Wroblewski, S.K., Thanapron, P., Eagleton, M.J., Myers, D.D., Fowlkes, J.B., Wakefield, T.W., 2003, Decrease in fibrin content of venous thrombi in selectin-deficient mice. *J Surg Res* 109, 1-7.
- Taubman, M.B., Marmur, J.D., Rosenfield, C.L., Guha, A., Nichtberger, S., Nemerson, Y., 1993, Agonist-mediated tissue factor expression in cultured vascular smooth muscle cells. Role of Ca²⁺ mobilization and protein kinase C activation. *J Clin Invest* 91, 547-552.
- Tesselaar, M.E., Romijn, F.P., van der Linden, I.K., Bertina, R.M., Osanto, S., 2009, Microparticle-associated tissue factor activity in cancer patients with and without thrombosis. *J Thromb Haemost* 7, 1421-1423.
- Tesselaar, M.E., Romijn, F.P., Van Der Linden, I.K., Prins, F.A., Bertina, R.M., Osanto, S., 2007, Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost* 5, 520-527.
- Toomey, J.R., Kratzer, K.E., Lasky, N.M., Stanton, J.J., Broze, G.J., Jr., 1996, Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood* 88, 1583-1587.
- Tsai, A.W., Cushman, M., Rosamond, W.D., Heckbert, S.R., Tracy, R.P., Aleksic, N., Folsom, A.R., 2002, Coagulation factors, inflammation markers, and venous thromboembolism: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology (LITE). *Am J Med* 113, 636-642.
- van Aken, B.E., den Heijer, M., Bos, G.M., van Deventer, S.J., Reitsma, P.H., 2000, Recurrent venous thrombosis and markers of inflammation. *Thromb Haemost* 83, 536-539.
- van Aken, B.E., Reitsma, P.H., Rosendaal, F.R., 2002, Interleukin 8 and venous thrombosis: evidence for a role of inflammation in thrombosis. *Br J Haematol* 116, 173-177.
- van den Berg, Y.W., van den Hengel, L.G., Myers, H.R., Ayachi, O., Jordanova, E., Ruf, W., Spek, C.A., Reitsma, P.H., Bogdanov, V.Y., Versteeg, H.H., 2009, Alternatively spliced tissue factor induces angiogenesis through integrin ligation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19497-19502.
- van der Poll, T., de Jonge, E., Levi, M., 2001, Regulatory role of cytokines in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost* 27, 639-651.
- Vieira, L.M., Dusse, L.M., Fernandes, A.P., Martins-Filho, O.A., de Bastos, M., Ferreira, M.F., Cooper, A.J., Lwaleed, B.A., Carvalho, M.G., 2007, Monocytes and plasma tissue factor levels in normal individuals and patients with deep venous thrombosis of the lower limbs: potential diagnostic tools? *Thromb Res* 119, 157-165.

- Virchow, R., 1856, Phlogose und Thrombose im Gefä system. Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medizin. Frankfurt, Germany: Staatsdruckerei.
- Vogel, G., 1994, Thrombophilie als klinisches Problem. *Fol Hämatol Leipzig* 4, 392-406.
- Vrana, J.A., Stang, M.T., Grande, J.P., Getz, M.J., 1996, Expression of tissue factor in tumor stroma correlates with progression to invasive human breast cancer: paracrine regulation by carcinoma cell-derived members of the transforming growth factor beta family. *Cancer Res* 56, 5063-5070.
- Wagner, D.D., 1993, The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-selectin. *Thromb Haemost* 70, 105-110.
- Wagner, D.D., Burger, P.C., 2003, Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 2131-2137.
- Wakefield, T.W., Greenfield, L.J., Rolfe, M.W., DeLucia, A., 3rd, Strieter, R.M., Abrams, G.D., Kunkel, S.L., Esmon, C.T., Wroblewski, S.K., Kadell, A.M., et al., 1993, Inflammatory and procoagulant mediator interactions in an experimental baboon model of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 69, 164-172.
- Wakefield, T.W., Myers, D.D., Henke, P.K., 2008, Mechanisms of venous thrombosis and resolution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 387-391.
- Wakefield, T.W., Strieter, R.M., Prince, M.R., Downing, L.J., Greenfield, L.J., 1997, Pathogenesis of venous thrombosis: a new insight. *Cardiovasc Surg* 5, 6-15.
- Wakefield, T.W., Strieter, R.M., Schaub, R., Myers, D.D., Prince, M.R., Wroblewski, S.K., Londy, F.J., Kadell, A.M., Brown, S.L., Henke, P.K., Greenfield, L.J., 2000, Venous thrombosis prophylaxis by inflammatory inhibition without anticoagulation therapy. *J Vasc Surg* 31, 309-324.
- Wakefield, T.W., Strieter, R.M., Wilke, C.A., Kadell, A.M., Wroblewski, S.K., Burdick, M.D., Schmidt, R., Kunkel, S.L., Greenfield, L.J., 1995, Venous thrombosis-associated inflammation and attenuation with neutralizing antibodies to cytokines and adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 258-268.
- Walenga, J.M., Jeske, W.P., Messmore, H.L., 2000, Mechanisms of venous and arterial thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Thrombolysis* 10 Suppl 1, 13-20.
- White, R.H., 2003, The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation* 107, I4-8.

- Yoshizako, T., Sugimura, K., Kawamitsu, H., Yoshikawa, K., 1996, Two-dimensional time-of-flight MR venography: assessment with detection of chronic deep venous thrombosis in combination with magnetization transfer contrast. *J Comput Assist Tomogr* 20, 957-964.
- Zhou, J., May, L., Liao, P., Gross, P.L., Weitz, J.I., 2009, Inferior vena cava ligation rapidly induces tissue factor expression and venous thrombosis in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 863-869.
- Zhu, T., Martinez, I., Emmerich, J., 2009, Venous thromboembolism: risk factors for recurrence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 298-310.

10 Teilveröffentlichung

Vasa. 2011 Mar;40(2):117-22.

Steppich BA, **Hassenpflug M**, Braun SL, Schömig K, von Beckerath O, von Beckerath N, Eckstein HH, Ott I.

Circulating Tissue Factor and Microparticles are not Increased in Patients with Deep Vein Thrombosis.

11 Lebenslauf

Name: Jörg Martin Hassenpflug
 Geboren am: 16.09.1981
 Geburtsort: Kiel
 Staatsbürgerschaft: deutsch
 Familienstand: verheiratet

Schule
 GYMNASIUM KRONSHAGEN 1992-2001
Kronshagen, Schleswig-Holstein

Hochschule
 VORKLINISCHER STUDIENABSCHNITT 2003-2005
LMU München
 KLINISCHER STUDIENABSCHNITT 2005–2009
TU München
 07.12.2009: 2.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr 02/2008-01/2009

1. Terial Innere Medizin:
 1. Hälfte: Kardiologische Intensivstation 3/10, *Klinikum München RDI*
 2. Hälfte: Gastrolenterologische Intensivstation 2/11, *Klinikum München RDI*

2. Terial Chirurgie:
 1. Hälfte: Abdominalchirurgie, *Klinikum München RDI*
 2. Hälfte: Herzchirurgie, *Herzzentrum München*

3. Terial Wahlfach Orthopädie:
 Orthopädie, *Royal Infirmary, University of Edinburgh (Schottland)*

seit 05/2010 Assistenzarzt für Kardiologie im Klinikum Bogenhausen
 Engelschalkinger Straße 77, 81925 München

12 Danksagung

Meinen größten Dank möchte ich meiner Mentorin Frau Prof. Dr. Ilka Ott aussprechen für die Überlassung des Themas, die große Hilfsbereitschaft im praktischen Teil der Arbeit, die Anleitung zur klinischen Angiologie im Gefäßzentrum und für die Ausarbeitung dieser Dissertation.

Bedanken möchte ich mich bei allen Ärzten und Mitarbeitern des Gefäßzentrums am Klinikum rechts der Isar München, die mich bei der Organisation und bei der Rekrutierung von Patienten sehr freundlich unterstützten.

Darüber hinaus danke ich meiner Familie, insbesondere meiner Ehefrau Sarah für ihre Geduld und ihre liebevolle Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.