

Thrombophilie-Risikofaktoren bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankung

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Marco Düber

aus Kirchen/Sieg

Gießen 2010

Aus dem interdisziplinären Schwerpunkt für Hämostaseologie
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH
Leitung: Prof. Dr. med. B. Kemkes-Matthes

Gutachterin: Prof. Dr. med. B. Kemkes-Matthes

Gutachter: Prof. Dr. med. A. Böning

Tag der Disputation: 17.12.2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 <i>Einführung in die Blutgerinnung</i>	1
1.1.1 Primärhämostase	3
1.1.2 Sekundärhämostase	3
1.1.3 Die Fibrinolyse	5
1.2 <i>Klassische Risikofaktoren arteriosklerotischer Erkrankungen</i>	6
1.2.2 Homocysteinämie	7
1.2.3 Hyperlipoproteinämie [Lp(a)]	8
1.2.4 Hypercholesterinämie	8
1.3 <i>Risikofaktoren venöser thromboembolischer Erkrankungen</i>	9
1.3.1 Antithrombin (AT)	9
1.3.2 Protein C (PC)	10
1.3.3 Protein S (PS)	10
1.3.4 Resistenz gegen aktiviertes Protein C (aPCR)	11
1.3.5 Faktor V Leiden Mutation	12
1.3.6 Prothrombin Polymorphismus	12
1.3.7 TAFI (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor)	13
1.4 <i>Protein Z (PZ)</i>	15
1.4.1 Biochemie des Protein Z	15
1.4.2 Biochemie des Protein Z-abhängigen Protease Inhibitors (ZPI)	16
1.4.3 Physiologie des Protein Z und des Protein Z-abhängigen Protease Inhibitors	17
1.4.4 Protein Z und Blutungsereignisse	18
1.4.5 Protein Z und Thrombose	19
1.5 <i>Periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK)</i>	20
1.5.1 Definition und Epidemiologie der pAVK	20
1.5.2 Pathophysiologie der pAVK	20
2 Ziel der Studie und Patientenkollektiv	23
2.1 <i>Ziel</i>	23
2.2 <i>Patienten</i>	23
2.2.1 Beschreibung	23
2.2.2 Ein-/Ausschlusskriterien	24
3 Probenaufbereitung und Methoden	25
3.1 <i>Blutentnahme und Probenaufbereitung</i>	25
3.2 <i>Methoden</i>	26

3.2.1 Klassische Risikofaktoren arteriosklerotischer Erkrankungen	26
3.2.2 Gerinnungsfaktoren	28
3.2.3 Thrombophiliediagnostik	29
3.2.4 Statistische Auswertung	33
4 Ergebnisse	35
4.1 <i>Klassische Risikofaktoren der pAVK</i>	35
4.1.1 HbA1c	35
4.1.2 Homocystein	36
4.1.3 Lipoprotein(a) [Lp(a)]	36
4.1.4 Cholesterin	37
4.2 <i>Risikofaktoren venöser thromboembolischer Erkrankungen</i>	38
4.2.1 Antithrombin (AT)	38
4.2.2 Protein C	40
4.2.3 Protein S	43
4.2.4 Resistenz gegen aktiviertes Protein C (aPCR)	45
4.2.5 Faktor V Leiden Mutation	46
4.2.6 Prothrombin Polymorphismus	46
4.2.7 TAFI (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor)	46
4.2.8 Protein Z	47
5 Diskussion	50
5.1 <i>Einfluss von Thrombophilie-Risikofaktoren bei Arteriosklerose</i>	50
5.2 <i>Protein Z und Arteriosklerose</i>	51
5.3 <i>Verbindung zwischen arteriellen und thromboembolischen Erkrankungen</i>	55
6. Zusammenfassung und Ausblick	58
7. Abstract	60
8. Abstract	62
Präsentation der Promotionsergebnisse:	64
Abbildungsverzeichnis	65
Literaturverzeichnis	66
Erklärung	89
Danksagung	90
Curriculum Vitae	91

1 Einleitung

Bisher wurden für die Entstehung venöser thromboembolischer Erkrankungen und Arteriosklerose unterschiedliche Ursachen postuliert [Tsai et al.,2002].

Da arteriell entstandene Thrombosen hauptsächlich aus Thrombozyten und im Gegensatz venöse Thromben überwiegend aus Erythrozyten und Fibrin bestehen, wurden beide Krankheitsbilder strikt von einander getrennt [Agnelli et al.,2006].

Während arterielle Thrombosen zum Großteil als Folge fortgeschrittener arteriosklerotischer Gefäßveränderungen zu verstehen sind und in Gefäßabschnitten mit hohem Blutgeschwindigkeitsfluss zu finden sind, entstehen venöse Thromben vermehrt in Gefäßen mit verringertem Blutfluss (Stase).

In der Vergangenheit wurden wesentliche Erkenntnisse zum Verständnis der Pathomechanismen venöser Thrombosen erzielt. Angeborene Risikofaktoren, wie Antithrombin, Protein C- und S-Mangel, Faktor V Leiden Mutation und Prothrombin Polymorphismus (G20210A), zählen zu den Veränderungen, die mit erhöhter Gerinnungsaktivierung einhergehen und mit der Manifestation von Thrombosen in Zusammenhang stehen.

Im Jahre 2003 haben wir erstmalig die Vermutung aufgestellt, dass thrombophile Risikofaktoren auch mit arteriellen Ereignissen in Zusammenhang stehen

[Düber et al.;2003].

1.1 Einführung in die Blutgerinnung

Blutgerinnung entsteht durch Zusammenspiel plasmatischer, zellulärer und vaskulärer Faktoren.

Die plasmatische Gerinnung wird von (bislang 15 bekannten) Proteinen gesteuert, den Gerinnungsfaktoren, die meist Enzymcharakter aufweisen.

Die im Plasma in inaktiver Form vorliegenden Proteine werden nach Initiation der Gerinnungskaskade durch den aktivierten Faktor der vorangegangenen Reaktion durch Proteolyse aktiviert.

Die Interaktion der einzelnen Komponenten ist strikt organisiert und kann besonders nach Verletzungen des Endothels um ein Vielfaches gesteigert werden.

Ebenso können pathologische Prozesse wie Autoimmunerkrankungen, Arteriosklerose oder maligne Geschehen zu einer Aktivierung des Gerinnungsvorganges führen.

Die an der Hämostase beteiligten Proteine werden unterteilt in:

1. Plasmaproteine (Enzyme, deren Co-Faktoren und Adhäsionsproteine)
2. Hormone und Gewebefaktoren
3. Membran-und Interzellularproteine

Viele dieser Proteine benötigen eine proteolytische Aktivierung, um ihre volle Aktivität zu erlangen.

Dies kann als Sicherungsmechanismus, der die ungewollte Triggerung des Systems verhindern soll, verstanden werden.

Die Abläufe der Gerinnungskaskade sind zumeist an Oberflächen, wie z.B. an aktivierten Thrombozyten oder direkt an das Endothel gebunden.

Die Endothelzellen des Gefäßsystems sind die metabolisch wirkenden Bestandteile der Gefäßwand.

Die Zahl der Thrombozyten und die Konzentration der Plasmaproteine, um den Gerinnungsprozess in Gang zu setzen, sind höher als benötigt.

Geringe Veränderungen einzelner Komponenten haben daher nur wenig Auswirkungen auf das Gesamtsystem.

Die Adhäsion der Komponenten am geschädigten Endothel führt zu einer lokalen Konzentrationssteigerung von Gerinnungsfaktoren an dem Ort, wo sie benötigt wird.

Permanent erhöhte Konzentrationen bzw. Aktivitäten einzelner Gerinnungsfaktoren werden als Risikofaktoren für thromboembolische Erkrankungen und arteriosklerotische Veränderungen angesehen.

Besonders hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang die Faktoren II, VII, VIII: c, Fibrinogen, von Willebrand -Faktor und die Inhibitoren der Fibrinolyse.

Zu den Risikofaktoren venöser thromboembolischer Erkrankungen zählen ebenfalls bestimmte Polymorphismen, wie z.B. die Faktor V Leiden Mutation.

Der eigentliche Prozess der Gerinnung ist in Phasen unterteilt. Das Zusammenwirken von Endothelwand, Thrombozyten und von Willebrand-Faktor wird als Primärhämostase bezeichnet, die Bildung des Fibringerinnsels, unter Mitwirkung der Gerinnungsfaktoren, wird Sekundärhämostase genannt [Brackmann,2003; Kolde 2004].

1.1.1 Primärhämostase

Durch Verletzung endothelialer Strukturen liegen negativ geladene Phospholipide frei, die Gerinnungsfaktoren als Adhäsionsfläche dienen.

Bedeutend ist hierbei der von Willebrand-Faktor (VWF). In Endothelzellen findet man VWF als Multimer in Vesikeln gespeichert, den Weibel-Palade-Körperchen. Die wichtigste Funktion des VWF ist die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten. Zusätzlich bindet der im Plasma gelöste VWF den Faktor VIII.

Es kommt zur Vasokonstriktion des betroffenen Gefäßabschnittes.

Die Veränderung des Gefäßtonus unterliegt unterschiedlichen Kontrollmechanismen; hervorzuheben ist die Regulation durch das Angiotensin/Renin-System und durch Stickoxide (NO).

Die Plättchenadhäsion wird durch den Kontakt von Blutplättchen mit subendothelialen Strukturen ausgelöst. Hier spielt besonders das Kollagen der extrazellulären Matrix eine wesentliche Rolle.

Die Plättchenaggregation ist der letzte Schritt der Primärhämostase. Der Prozess ist an die Thrombozyten-Adhäsion gekoppelt. Es handelt sich dabei um einen additiven Prozess, der nach der Thrombozytenaktivierung durch endotheliale Bestandteile (Kollagen, Thrombin) stattfindet [Brackmann,2003; Kolde 2004].

1.1.2 Sekundärhämostase

Im Blut befinden sich eine Anzahl von Plasmaproteinen, darunter Gerinnungsfaktoren und deren Inhibitoren, die in einem kontrolliert ablaufenden kaskadenartigen Prozess zur Thrombin- und anschließend zur Fibrinbildung führen.

Diese Vorgänge unterliegen proteolytischen Prozessen, die ähnlich auch in anderen Systemen, wie z.B. dem Komplementsystem oder dem Angiotensin/Renin-System zu finden sind.

Bei den Gerinnungsfaktoren handelt es sich, mit Ausnahme des Tissue Factors (TF), um Plasmaproteine, die eine proteolytische Umwandlung benötigen, um aktiviert zu werden.

Tissue Factor (TF) ist ein Membranprotein, das in hoher Konzentration im subendothelialen Raum und in nahezu allen Geweben nachweisbar ist, nicht jedoch intravaskulär und im Endothel.

Man unterscheidet zwei Wege der Gerinnungsaktivierung, die beide in einer gemeinsamen Endstrecke, der Konversion von Prothrombin zu Thrombin, enden. Beide Wege laufen nicht strikt getrennt voneinander ab, sondern zeigen an diversen Stellen Interaktionen (vgl. Abb.1) [Brackmann,2003; Kolde 2004].

Das extrinsische System

Der direkte Kontakt zwischen dem endothelialen Tissue Factor (TF) und Faktor VII (Prokonvertin) führt in Anwesenheit von Kalziumionen (Ca^{2+}) zu einem stabilen Komplex (TF/ F.VIIa-Komplex, extrinsischer Tenasekomplex) [Drake et al.,1989; Miserez und Jungi,1992; Ruf,1998; Müller-Berghaus und Pötzsch,1999].

Der TF/F.VIIa-Komplex (100.000 fach effizienter als F.VIIa alleine) ist das eigentliche Enzym und aktiviert die Faktoren IX und X 100 000- fach effizienter als F.VIIa alleine.

Das intrinsische System

Ausgelöst wird die Aktivierung des Faktors XII (Hagemann-Faktor) am verletzten Endothel oder an anionischen Oberflächen.

In Anwesenheit von High Molecular Weight Kininogen (HMWK), unter Mitwirkung von Faktor XIIa, wird Kallikrein aus Präkallikrein gebildet. Das gebildete Kallikrein unterstützt die Bildung von Faktor XIIa. HMWK wird in der Leber synthetisiert und u.a. in Thrombozyten und Endothelzellen gespeichert.

Faktor XIIa aktiviert F.XI zu F.XIa (Plasma-Thromboplastin-Antezedent).

Faktor XIa aktiviert F.IX zu F.IXa (Christmas-Faktor), Faktor IXa aktiviert in direkter Gegenwart von Faktor VIII (antihämophiler Faktor), Kalziumionen und Phospholipiden den Faktor X (Stuart-Prower-Faktor), der dann schließlich im Prothrombinasekomplex aus Faktor Va, Faktor Xa, Kalziumionen und Phospholipiden für die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin (Faktor IIa) verantwortlich ist.

Thrombin wandelt letztendlich Fibrinogen (Faktor I) in Fibrin um, das dann in den Thrombus eingebaut wird.

Gemeinsame Endstrecke

Die gemeinsame Endstrecke beginnt mit der Aktivierung von Faktor X durch den TF/F.VIIa-Komplex des extrinsischen Systems, oder den Tenasekomplex des intrinsischen Systems in Anwesenheit von Kalziumionen (Ca^{2+}).

Faktor Xa ist Teil des Prothrombinasekomplexes, der Faktor II (Prothrombin) zu Faktor IIa (Thrombin) aktiviert.

Thrombin aktiviert neben den Faktoren V, VII, XI und XIII auch die Prourokinase (scu-PA), Protein C und die Thrombozyten. Der daraus resultierende "Thrombin-Burst" führt zu einem besonders stabilen Fibringerinnsel, (Abb.1).

1.1.3 Die Fibrinolyse

Der Gegenspieler der Gerinnung ist die Fibrinolyse, die den gebildeten Fibrinpfropf wieder auflöst. Darüberhinaus ist die Fibrinolyse an weiteren Prozessen, wie beispielsweise der Angiogenese und der Tumormetastasierung, beteiligt.

Dem Plasmin kommt dabei eine Schlüsselrolle zu, da es Fibrin spalten kann.

Plasmin entsteht an der Fibrinoberfläche aus Plasminogen, hierzu wird ein Enzym benötigt, das die Reaktion katalysiert, der so genannte Gewebe-Plasminogen-Aktivator (t-PA).

Der t-PA wird unter anderem in Endothelzellen gebildet.

Erst seit kurzem bekannt ist ein Enzym, das in aktivierter Form in der Lage ist indirekt die Plasmin-Aktivierung zu verhindern und so die Auflösung des Thrombus unterbindet.

Wegen seiner Stimulierung durch Thrombin wurde es Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) genannt [Brackmann,2003; Kolde 2004].

Abb.1: Gerinnungsablauf

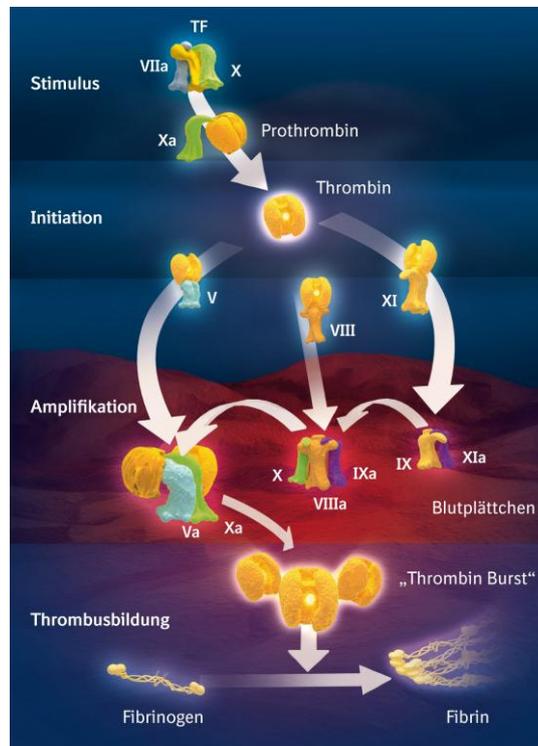


Abb. 1: Darstellung des Gerinnungsablaufes (Copyright: Boehringer Ingelheim, 2009)

1.2 Klassische Risikofaktoren arteriosklerotischer Erkrankungen

1.2.1 Diabetes mellitus

HbA1c lässt Rückschlüsse auf die Stoffwechselsituation des Diabetikers der vergangenen 8 Wochen zu.

Insbesondere der Typ 1 Diabetes (Synonym: insulin dependent diabetes mellitus IDDM) verursacht Stoffwechseleränderungen, die zur Hyperlipidämie führen können. Seit Einführung der Insulintherapie sind weniger die akuten Stoffwechsellentgleisungen, als vielmehr Sekundärkomplikationen für eine erhöhte Mortalität und eine erheblich eingeschränkte Lebensqualität verantwortlich. Ein normnaher eingestellter Blutzuckerspiegel erreicht eine Reduktion des Auftretens von Sekundärkomplikationen.

Anhaltende Hyperglykämie stimuliert die nichtenzymatische Glykosylierung, d.h. die Ankopplung von Glukosemolekülen an Glykoproteine, ohne Beteiligung eines Enzyms.

Nichtenzymatische Glykosylierung führt nicht nur zu Struktur- und Funktionsveränderungen der betroffenen Glykoproteine, sondern auch zu Verdickungen der Basalmembranen von Kapillaren und Arteriolen (diabetische Mikroangiopathie); die Folgen sind Lumenverengungen.

Erhöhte HbA1c-Werte sind Risikofaktoren für arteriosklerotische Umbauten des Gefäßsystems und als wesentlicher Risikofaktor der pAVK anzusehen. Eine unzureichende Blutzuckereinstellung der Patienten, kann einerseits durch eine schlecht eingestellte medikamentöse bzw. diätetische Therapie, andererseits auch durch mangelnde Compliance verursacht werden [Greten, 2000; Herold, 2000].

1.2.2 Homocysteinämie

Homocystein ist eine Aminosäure, die im Methionin-Stoffwechsel entsteht und deren Umsetzung direkt an den Vitamin-B-Stoffwechsel gebunden ist.

Homocystein entsteht als kurzzeitiges Zwischenprodukt aus der Aminosäure Methionin, das einen elementaren Grundbaustein im Metabolismus, die CH₃-Gruppe (Methyl-Gruppe) für nahezu alle Zellen des Körpers liefert. Homocystein wird normalerweise schnell mit Hilfe der Vitamine B₆ und B₁₂, sowie Folsäure, in Methionin zurück verwandelt, oder mit Hilfe von Vitamin B₆ zu Cystathionin weiter verstoffwechselt. Untersuchungen der letzten Jahre haben ergeben, dass jeder zweite bis dritte Patient mit Erkrankungen der Herzkranzgefäße mäßig bis stark erhöhte Homocysteinkonzentrationen im Blut aufweist.

Viel mehr Menschen sind von der erworbenen, sekundären Form der Hyperhomocysteinämie betroffen, als von der eher seltenen angeborenen, primären Form.

Homocystein hat einen schädigenden Einfluss auf das Gefäßendothel. Die Anlagerung des LDL (low density lipoprotein) wird dadurch begünstigt.

Ein erhöhter Homocystein-Plasmaspiegel ist als Risikofaktor für arteriosklerotische Veränderungen, pAVK und venöse Thrombembolien anzusehen.

Für den Abbau des Homocysteins ist ein Enzym, bekannt als MTHFR

(Methylentetrahydrofolatreduktase) verantwortlich.

Das Enzym kann in veränderter Form vorliegen, was als MTHFR-Mutation bezeichnet wird.

1.2.3 Hyperlipoproteinämie [Lp(a)]

Nach der Erstbeschreibung durch Berg 1963 ist Lipoprotein(a) [Lp(a)], gegenüber den übrigen kardiovaskulären Risikofaktoren, als unabhängiger Risikofaktor anerkannt.

Lp(a) enthält, im Gegensatz zum LDL (low density lipoprotein), ein kovalent gebundenes Apolipoprotein(a) [Apo(a)], das einem genetischen Polymorphismus unterliegt. Apo(a) ist eines der „klebrigsten“ Eiweiße des menschlichen Stoffwechsels.

Lp(a) weist eine hohe Strukturhomologie zum Plasminogen auf und konkurriert mit dem Plasminogen um freie Bindungsstellen an Endothelzellen; somit kommt dem Molekül eine antiplasminogene Wirkung zu.

Lp(a) Serumkonzentrationen sind hochgradig genetisch determiniert und zeigen innerhalb der Bevölkerung eine hohe Varianz.

Etwa 50% sind durch Polymorphismen des Apo(a) am Genlocus auf Chromosom 6 determiniert [Frank et al.,1988].

1.2.4 Hypercholesterinämie

Bei der Entstehung der Arteriosklerose spielt die Erhöhung des Cholesterin-Plasmaspiegels eine wesentliche Rolle. Hypercholesterinämie ist bedingt durch gesteigerte exogene Zufuhr in der Nahrung oder endogene metabolische Prozesse. Cholesterin dient als wesentlicher Baustein für den Aufbau zellulärer Membranen und als Ausgangsmolekül zur Bildung von Steroidhormonen und Gallensäuren. Bei der Mehrzahl der Patienten mit Hypercholesterinämie handelt es sich um polygene Hypercholesterinämien, durch das Zusammenspiel endogener (genetische Komponente) und exogener Faktoren (Ernährung, Übergewicht, Alkohol). Monogene Hypercholesterinämien findet man bei etwa 5% der Patienten mit primären (hereditären) Fettstoffwechselstörungen.

Polygene Hypercholesterinämien werden durch Ernährungsgewohnheiten gefördert; in den Industrienationen sind sie zur Volkskrankheit geworden.

Die derzeitige Theorie der Arterioskleroseentstehung bei Hypercholesterinämie postuliert, dass LDL-Cholesterine in hoher Konzentration zur Akkumulation im subendothelialen Raum führen und dort oxidiert werden.

Endothelzellen sezernieren Wachstumsfaktoren, wodurch Makrophagen über Scavenger-Rezeptoren, LDL aufnehmen und so zu Schaumzellen werden. Darüberhinaus kommt es zur Einwanderung glatter Muskelzellen in den subendothelialen Raum und zur Sezernierung extrazellulärer Matrix. Adhäsionsfaktoren führen zur Akkumulation von T-Lymphozyten und somit zu einer Entzündungsreaktion. Thrombozyten werden aktiviert, es kommt zur Aggregation und zur Ausbildung wandständiger Thromben. Man spricht nun von einem Atherom, wobei sich bei einem Einriss der fibrösen Atheromkappe Dentritus in das Lumen entleert und dadurch sekundär zur Thrombusbildung und Gefäßverschluss führt [Schwandt,1995].

Patienten mit Cholesterin-Spiegeln oberhalb der Referenzbereiche haben des Weiteren ein erhöhtes Risiko für tiefe Beinvenenthrombosen [Kawasaki et al.,1995; Mc Coll et al., 2000].

1.3 Risikofaktoren venöser thromboembolischer Erkrankungen

1.3.1 Antithrombin (AT)

Ein hereditärer Mangel an AT ist mit einem erhöhten Risiko für thromboembolische Komplikationen verbunden.

Es finden sich fast ausschließlich Patienten mit einem heterozygoten Antithrombin Mangel, bei denen die Aktivität des AT auf 50-60% der Norm vermindert ist. Eine homozygote Variante ist offensichtlich nicht mit dem Leben vereinbar.

Bei einer Vielzahl der Patienten sind Aktivität und Konzentration des AT gleichsinnig vermindert.

Eine Minderheit der Patienten synthetisiert ein abnormes Protein und fällt lediglich durch eine AT-Aktivitätsminderung auf.

1.3.2 Protein C (PC)

Aktiviertes Protein C (aPC) zählt zu den Gerinnungs-Inhibitoren. APC hemmt in vivo die Faktoren Va und VIIIa.

Hereditärer Protein C-Mangel wird zumeist autosomal dominant vererbt und ist mit einem erheblichen Risiko für Thrombembolien vergesellschaftet.

Klinischer Erstmanifestationszeitpunkt ist meist jenseits der Pubertät und bei mehr als 50% der Patienten ist ein auslösendes Ereignis (chirurgischer Eingriff, Trauma, Schwangerschaft etc.) vorhanden.

Ein homozygoter Mangel führt bereits im Neugeborenenalter zum dramatischen Krankheitsbild der Purpura fulminans oder massiven Thrombosen.

Protein C-Mangelzustände gehen einher mit Thrombophlebitis, tiefer Beinvenenthrombose und Lungenembolien. Heterozygote herabgesetzte Protein C Aktivität ist ein prädisponierender Faktor für Thrombosen, besonders dann, wenn gleichzeitig eine Faktor V Leiden Mutation vorliegt.

Zumeist liegt der Typ I vor, bei dem Aktivität und Konzentration gleichermaßen vermindert sind. Relativ selten ist der Typ II, bei dem ein abnormes Molekül synthetisiert wird.

1.3.3 Protein S (PS)

Protein S zählt ebenfalls zu den Vitamin K-abhängigen Proteinen, welche zum Grossteil in der Leber produziert werden und als Co-Faktor des aktivierten Protein C die Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa beschleunigt. Im Plasma ist Protein S überwiegend an das C4b-Bindungsprotein gebunden, während etwa 40% in freier Form vorliegt. Nur die freie Form des Protein S kann als Co-Faktor für aktiviertes Protein C dienen. Protein S selber weist keinen Enzymcharakter auf.

Ein Protein S-Mangel stellt einen Risikofaktor für thromboembolische Erkrankungen dar. Insbesondere der angeborene Protein S-Mangel geht mit einem deutlich erhöhten Thromboserisiko einher, vor allem, wenn zusätzliche Risikofaktoren, wie Operationen, septische Prozesse oder genetische Faktoren, die für eine Thrombophilie prädisponieren, additiv hinzukommen. Der äußerst seltene homozygote Protein S-Mangel manifestiert sich schon im

Neugeborenenalter als Purpura fulminans und rezidivierend auftretenden Thrombembolien, die mit dem Leben praktisch nicht vereinbar sind.

Protein S-Mangel lässt sich in 3 Typen einteilen:

- Typ I : Gesamtes und freies Antigen (Konzentration) sind erniedrigt, sowie herabgesetzte aPC Co-Faktor-Aktivität
- Typ II : Die Aktivität ist erniedrigt (herabgesetzte Cofaktor-Aktivität), freies und gesamtes Antigen liegen im Normbereich
- Typ III : Die Aktivität sowie das freie Antigen sind reduziert, das Gesamt-Antigen liegt im Normbereich, C4b-Bindungsprotein ist erhöht

[Rodger et al.,2004].

Liegt eine Erhöhung des C4b-Bindungsproteins vor, so wird die Cofaktor-Funktion von Protein S beeinträchtigt. Eine Erhöhung des C4b-Bindungsproteins findet man z.B. bei Entzündungsprozessen und führt zu einer Protein S-Verminderung, weil die freie, aktive Form des Proteins herabgesetzt ist.

1.3.4 Resistenz gegen aktiviertes Protein C (aPCR)

Die aPC-Resistenz ist der häufigste genetisch bedingte, autosomal dominant vererbte Risikofaktor für die Entstehung von Thrombosen.

Die Ursache für die aPC-Resistenz wird durch eine Mutation im Faktor V-Gen hervorgerufen. Dabei handelt es sich zu 95% um eine Mutation, die nach dem Ort ihrer Entdeckung, der holländischen Stadt Leiden, als Faktor V Leiden bezeichnet wird.

Die Funktion von aPC ist die Inaktivierung der prokoagulatorischen Faktoren Va und VIIIa, mittels proteolytischer Spaltung.

Die Bildung des mutierten Faktors V betrifft vor allem die Bindungsstelle des aPC und somit kommt es zu einer unzureichenden Inaktivierung des Faktors Va.

APC spaltet aktivierten Faktor V, sowie 3 Peptidbindungen, und zwar an den Arginin Bindungen 306, 506 und 679. Zunächst wird Arginin an Position 506 gespalten, dadurch werden die beiden anderen Spaltstellen für aPC zugänglich.

Liegt eine Faktor V Leiden Mutation vor, läuft die Spaltung an Position 506 etwa 10 mal langsamer ab. Schlussfolgernd kann Faktor Va nicht ausreichend inaktiviert werden, was wiederum eine erhöhte Gerinnungsfähigkeit des Blutes zur Folge hat [Bertina et al.,1994].

1.3.5 Faktor V Leiden Mutation

Die Faktor V Leiden Mutation ist in hoher Prävalenz (etwa 5% bei Gesunden) in der kaukasischen Rasse zu beobachten.

Der heterozygote Defekt geht mit einer 5-10 fachen Erhöhung des Risikos für thromboembolische Erkrankungen einher.

Ein homozygoter Defekttträger hat ein 50-100 fach erhöhtes Thromboserisiko.

Bei heterozygoten Trägern treten Thrombosen frühestens im Alter von 15-20 Jahren auf.

In einer gesunden Kontrollgruppe (n=128, 71 Frauen, 57 Männer, Durchschnittsalter 28+/- 6 Jahren), die in Zusammenarbeit des hämostaseologischen Labors der Medizinischen Klinik der Justus-Liebig-Universität Gießen und der angiologischen Abteilung der Medizinischen Klinik der Justus-Liebig-Universität Giessen erstellt wurde, fand man bei 10 Probanden eine heterozygote Faktor V Leiden Mutation (prozentuale Verteilung von 8%), homozygote Träger waren nicht darunter.

1994 konnten Bertina et al. zeigen, dass dem Defekt eine Punktmutation im Faktor V-Gen an der Position 1691 zugrunde liegt. Daraus folgt, dass an Position 506 des korrespondierenden Proteins, die Aminosäure Arginin durch Glutamin ersetzt wird.

1.3.6 Prothrombin Polymorphismus

1996 wurde von Poort und Mitarbeitern ein Polymorphismus im 3' –untranslatierten Teil des Prothrombingens beschrieben. Bei diesem Polymorphismus handelt es sich um einen Glutamin-Arginin Austausch an Position 20210 im 3'-untranslatierten Teil des Gens.

Die Genregion ist verantwortlich für die Regulation der Gen-Expression und wird nicht in Protein translatiert. Bei Vorhandensein der Mutation besteht eine erhöhte

Aktivität von Prothrombin (Faktor II), das als aktive Vorstufe des aktiven Thrombins gilt [Poort et al.,1996].

In Kollektiven von Thrombosepatienten findet man diese Mutation in 4-6% der Fälle.

Das Thromboserisiko heterozygoter Defekträger ist ca. 2-3 mal erhöht gegenüber Personen ohne Mutation.

Die homozygote Form ist mit schweren Thrombembolien vergesellschaftet.

Frühere Studien bei Patienten mit erstmalig aufgetretener tiefer Beinvenenthrombose zeigten eine Häufigkeit von 5,8-7,1 % im Gegensatz zur gesunden Kontrollgruppe, bei der die Prävalenz bei 1,6-1,8 % lag [Poort et al.,1996; Brown et al.,1997; Hillarp et al.,1997].

Heterozygote Defekträger haben ein 2,6–4,2-fach erhöhtes Risiko für Thrombosen [Poort et al.,1996].

Homozygote Mutationen sind weitaus seltener zu finden.

Kyrle PA et al. kamen in ihrer Arbeit aus dem Jahre 1998 zu dem Ergebnis, dass homozygoten Vorliegen des Prothrombin Polymorphismus (G20210A) mit schwerwiegenden thromboembolischen Komplikationen einhergeht, die phänotypisch allerdings weniger dramatisch erscheinen, als bei homozygotem Antithrombin (AT)-, Protein C- oder S-Mangel. Die Pathomechanismen, die bei Mutationsträgern zu Thrombosen führen, sind wahrscheinlich auf eine Thrombin-Erhöhung zurückzuführen [Kyrle et al.,1998].

1.3.7 TAFI (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor)

Der durch Thrombin aktivierte Fibrinolyse Inhibitor (TAFI) ist ein Plasmaprotein, das in der Lage ist, nach enzymatischer Umwandlung, die Fibrinolyse zu inhibieren.

TAFI ist eine Endopeptidase, die als Vorstufe, dem sogenannten proTAFI, im Plasma vorliegt.

Durch relativ hohe Thrombinkonzentrationen kann die Aktivierung zur aktiven TAFI-Form stattfinden. Protein S kann die TAFI-Aktivierung inhibieren.

Aktivierter TAFI schützt das Fibringerinnsel, indem es die Lysin-Bindungsstellen spaltet, die für die Ankopplung von Plasminogen notwendig sind.

Erhöhte TAFI-Plasmaspiegel, wie sie beispielsweise auch bei entzündlichen Prozessen zu finden sind, führen zu einem erhöhten Thromboserisiko durch gesteigerte intravaskuläre Koagulation.

TAFI spielt nicht nur bei Blutungsgeschehen und thromboembolischen Erkrankungen, sondern auch bei der Wundheilung und bei Entzündungen, eine wichtige Rolle [Bouma et al.,2003].

Hohe Thrombin-Konzentrationen führen zu hoher TAFIa-Aktivität (a=activated). TAFIa entfernt Lysin-Bestandteile des Fibrins, die unerlässlich für die Anbindung von t-PA, Plasminogen und Plasmin am Fibrinmolekül, sind. Fibrin verliert seine Fähigkeit als Co-Faktor bei der t-PA induzierten Plasminogen-Aktivierung, daraus resultiert eine verminderte Plasminaktivität, und das vorhandene Plasmin findet weniger Bindungsstellen am Fibrinmolekül. Somit zeichnet sich das Fibringerinnsel durch eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber der proteolytischen Spaltung durch Plasmin aus [Dempfle et al.,2007].

Van Tilburg et al. untersuchten in einer kontrollierten Fall-Kontroll-Studie 474 Patienten mit erstmals aufgetretener tiefer Beinvenenthrombose. Erhöhte TAFI-Aktivität scheint ein mäßiger Risikofaktor für das Auftreten venöser Thrombosen zu sein. Eine Verstärkung des Thromboserisikos durch erhöhte TAFI-Aktivitäten, assoziiert mit Faktor V Leiden Mutation, konnte nicht nachgewiesen werden, allerdings wurde vermutet, dass Interaktionen mit erhöhten Faktor VIII Konzentrationen existieren [Van Tilburg et al.,2000].

Folglich seien Veränderungen der TAFI-Aktivität, bei nachgewiesener aPC Resistenz, zu erwarten. Diese Hypothese diente als Grundlage für die Arbeit von Antovic et al., die das TAFI-Antigen (TAFI, TAFIa und die inaktive Form TAFIai) und die TAFI-Aktivität bei 17 weiblichen heterozygoten Faktor V Leiden-Trägern untersuchten und mit 13 gesunden Probanden verglichen. Es konnte keine signifikante TAFI-Antigendifferenz beobachtet werden, allerdings war die TAFI-Aktivität bei aPC Resistenz im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert.

Eine signifikante Verminderung der TAFI-Aktivität bei aPC-Resistenz, bei unveränderten TAFI-Antigen-Level, kann durch die Aktivierung von TAFI zu TAFIa erklärt werden. Antovic folgerte, dass erhöhte TAFIa Aktivitäten bei aPC-

Resistenz, aufgrund einer Faktor V Leiden Mutation, zur „Downregulation“ der Fibrinolyse führen und das Risiko für Thrombosen steigern [Antovic et al.,2002].

Chetaille et al. untersuchten 2000 die TAFI-Aktivitäten einer gesunden Probandengruppe. Sie fanden eine große Variationsbreite in dem Kollektiv, welche von 41% bis 259% reichte. Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen TAFI-Antigen und dem Alter weiblicher Probanden, die beim männlichen Geschlecht nicht nachweisbar war.

1.4 Protein Z (PZ)

1.4.1 Biochemie des Protein Z

Bovines Protein Z wurde erstmals im Jahre 1977 von Prowse und Esnouf beschrieben; 1984 gelang es Broze und Miletich menschliches Protein Z zu isolieren.

Protein Z, 62.000-kDa (Molekulargewicht), ist ein Vitamin K-abhängiges Protein, dessen Synthese zum Großteil in der Leber erfolgt. 1995 konnten bei Patienten mit chronisch aggressiver Hepatitis oder Leberzirrhose signifikant erniedrigte Protein Z-Plasmaspiegel beobachtet werden [Kemkes-Matthes et al.,1995].

Man fand eine signifikante Korrelation zwischen Protein Z-Antigen im Plasma und Serum-Cholinesterase, sowie zwischen Protein Z-Antigen, Präalbumin und anderen Vitamin K-abhängigen Gerinnungsproteinen.

Miletich und Broze gaben 1987 eine mittlere Protein Z-Plasmakonzentration von 2900 µg/l, ohne Altersabhängigkeit, bei gesunden Probanden über 18 Jahren, mit einer Halbwertszeit von 2,5 Tagen, an [Miletich et al.,1987]. Eine Studie mit 190 Patienten im Alter zwischen 5 Tagen und 40 Jahren, zeigte eine deutliche Altersabhängigkeit der Protein Z-Plasmakonzentration [Kemkes-Matthes et al.,2000].

Sejima et al. und Ichinose et al. gelang es 1990 die komplette Aminosäuresequenz des Proteins aufzuklären.

Humanes Protein Z besteht demnach aus 360 Aminosäuren, deren Sequenz eine starke Homologie zu anderen Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren, insbesondere zu den Faktoren VII, X, IX und den Proteinen C und S, aufweist.

Die N-terminale Region dieser Aminosäurenkette beinhaltet eine Vielzahl karboxylierter Glutamatreste, die maßgeblich für die Bindungskapazität an Phospholipidmembranen verantwortlich zu sein scheinen.

An diese N-terminale Region schließen sich 2 sogenannte EGF-Domänen an. Es handelt sich hierbei um Abschnitte, die starke Homologien mit dem menschlichen Epidermal Growth Factor aufweisen, und die direkt mit einer katalytisch wirksamen Domäne verbunden sind.

Die C-terminale Region scheint direkt die typischen katalytischen Eigenschaften von Serin-Proteasen aufzuweisen, jedoch fehlt das aktive Zentrum der Serin-Proteasen. Somit kann keine Aktivierung erfolgen, und Thrombin kann nicht an endothelialen Phospholipiden festgehalten werden.

Dadurch könnte der Abstrom aktivierten Thrombins aus der geschädigten Blutstrombahn in ähnlicher Weise verhindert werden, wie durch Thrombomodulin.

1.4.2 Biochemie des Protein Z-abhängigen Protease Inhibitors (ZPI)

In Anwesenheit von Phospholipiden und Kalziumionen dient Protein Z (PZ) als Co-Faktor für ein Plasmaprotein, welches Protein Z-abhängiger Protease Inhibitor (ZPI) genannt wird [Han et al.,1998].

ZPI cDNA weist 2.44 kb Länge auf und besitzt eine relativ lange 5'-Region (466nt), die wiederum 6 potentielle ATG Translations Start Codons besitzt.

In vitro Experimente konnten belegen, dass ATG(6) wesentlich für die Expression der rZPI in Ovarialzellkulturen chinesischer Hamster bedeutsam ist [Han et al.,1999].

Bildungsort des ZPI ist im wesentlichen die Leber [Han et al.,1999].

Im Citratplasma wurden mittlere ZPI-Konzentrationen von 1.0-1.6 µg/ml gemessen.

In Versuchen, in denen gereinigte Proteinkomponenten eingesetzt wurden, fand eine sehr schnelle Inaktivierung des Faktors Xa statt.

Broze et al. konnten in vitro zeigen, dass die prokoagulatorische Aktivität des Faktors Xa bereits deutlich herabgesetzt wird, wenn eine Inkubation mit PZ erfolgt.

Der inhibitorische Effekt korreliert positiv mit der Inkubationszeit und verlangt zwingend die Anwesenheit von Kalziumionen und Phospholipiden (Gehirn Cephalin vom Kaninchen).

Der Inaktivierungsprozess erfolgt komplexgebunden in einer Formation aus Xa-PZ-ZPI an einer phospholipidhaltigen Oberfläche.

1.4.3 Physiologie des Protein Z und des Protein Z-abhängigen Protease Inhibitors

Die physiologische Funktion von Protein Z (PZ) ist noch nicht vollständig geklärt.

Yin et al. konnten nachweisen, dass Protein Z mit Kalziumionen (Ca^{2+}) einen Komplex bildet, der zusammen mit aktiviertem Faktor X an Phospholipidoberflächen ankoppelt.

Diese Interaktion führt schließlich zur Inhibition der Aktivität des aktivierten Faktor X.

Der Protein Z-abhängige Protease Inhibitor (ZPI) ist für die Hemmung entscheidend und wurde in diesem Zusammenhang von Han et al beschrieben.

Protein Z zirkuliert im Plasma komplexgebunden an ZPI. In Anwesenheit von Phospholipiden und Kalziumionen verstärkt Protein Z die Wirkung von ZPI und die damit verbundene Inhibition des aktivierten Faktor X in etwa um das 1000-fache.

Abb.2: ZPI

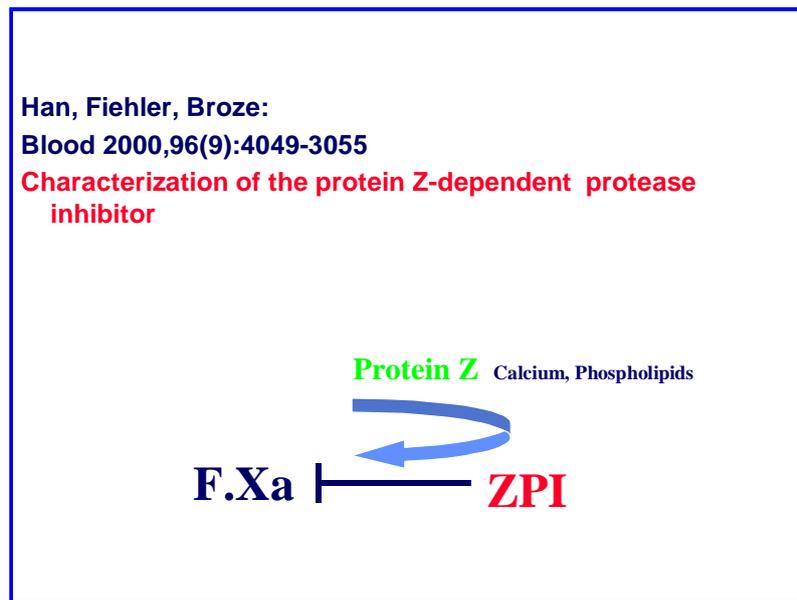


Abb. 2: Protein Z (PZ) und Protein Z-abhängiger Protease Inhibitor (ZPI)

1.4.4 Protein Z und Blutungsereignisse

1991 demonstrierten Hogg und Stenflo, dass Thrombin in Anwesenheit von Protein Z an Phospholipidoberflächen bindet, nicht aber in dessen Abwesenheit.

Erste klinische Studien zeigten, dass bei ca. $\frac{2}{3}$ aller Patienten mit Blutungsneigung unbekannter Genese, bei denen rezidivierende Blutungsereignisse auftraten, verminderte Protein Z-Plasmaspiegel nachgewiesen werden konnten [Kemkes-Matthes et al.,2000].

Typische klinische Erscheinungsformen bei Protein Z-Mangel sind Hämatomneigung, Blutungen nach operativen Eingriffen und Schnittverletzungen, sowie bei der Mehrzahl der Patienten ein positiver Rumpel-Leede-Test.

Protein Z-Werte bei Blutungspatienten lagen im Mittel bei 1.400 (\pm 610) $\mu\text{g/l}$, die der gesunden Vergleichspopulation im Mittel um 2.680 (\pm 490) $\mu\text{g/l}$ [Kemkes-Matthes et al.,2000].

In einer Studie an 48 Patienten mit Blutungsneigung, darunter 9 Patienten mit Blutungsereignissen bekannter Genese (z.B. Von Willebrand-Jürgens-Syndrom), fand man bei den Männern mit Blutungsneigung PZ-Plasmaspiegel unter 1500 $\mu\text{g/l}$. Eine Patientin mit schwerer Blutungsneigung unklarer Genese wies in der Studie den niedrigsten Protein Z-Wert (431 $\mu\text{g/l}$) auf [Ravi et al.,1998].

Patienten mit intraoperativen Blutungen hatten auffallend häufig erniedrigte PZ-Werte. In diversen Untersuchungen wurde geprüft, ob eine Korrelation zwischen präoperativer PZ-Konzentration und intraoperativem Blutverlust besteht.

Daten liegen von Tonsillektomien und Adenotomien [Kemkes Matthes et al.,2000], kieferchirurgischen Eingriffen [Kemkes-Matthes et al.,1999], sowie von kardiochirurgischen Eingriffen bei Kindern vor [Kemkes-Matthes et al.,1998].

Bei allen Untersuchungen konnte eine Abhängigkeit zwischen Blutungsausmaß und dem präoperativem PZ-Plasmaspiegel demonstriert werden.

Bei präoperativen PZ-Werten unter 1000 µg/l wurden signifikant mehr intraoperative Blutungen festgestellt, als bei Patienten mit PZ-Plasmaspiegeln über 2000 µg/l [Kemkes-Matthes et al.,2000].

1.4.5 Protein Z und Thrombose

Protein Z (PZ) kann Thrombin an der endothelialen Phospholipidoberfläche festhalten, folglich kann ein PZ-Mangelzustand zu Blutungsereignissen führen.

Darüber hinaus diffundiert Thrombin, das nicht am Ort der Endothelläsion festgehalten wird, ab und führt unter Umständen an anderer Stelle des Gefäßsystems zur Gerinnungsaktivierung und eventuell zur Thrombusbildung.

Yin et al. publizierten 1999 diesbezüglich erste Untersuchungsergebnisse bei Protein Z-Knock-out-Mäusen.

Protein Z-Knock-out-Mäuse zeigten keinerlei Auffälligkeiten bezüglich Wachstum und Entwicklung.

Jedoch waren Mäuse, die sowohl eine homozygote Faktor V Leiden Mutation, als auch einen homo- oder heterozygoten PZ-Mangel zeigten, nicht lebensfähig.

Des Weiteren gab es direkte Korrelationen zwischen dem Ausmaß von Blutung, vaskulärer Thrombose und Fibrinablagerung in der Leber bei homozygoten Faktor V Leiden-Mäusen und dem Protein Z-Genotyp.

Bezogen auf die Ergebnisse der Mäusestudien von Yin et al., konnten Kemkes-Matthes et al. zeigen, dass Patienten mit verminderten PZ-Werten, die darüber hinaus noch eine Faktor V Leiden Mutation aufweisen, ein erhöhtes Risiko haben an venösen thromboembolischen Komplikationen zu erkranken [Kemkes-Matthes et al.,2002].

In DNA-Sequenzierungen zeigten Matthes et al. 2004, dass bei Patienten, die im Protein Z-Gen eine R255H Aminosäuresubstitution und darüberhinaus eine Faktor V Leiden Mutation aufweisen, wesentlich häufiger thromboembolische Komplikationen auftreten, als bei Patienten ohne R255H Substitution.

1.5 Periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK)

1.5.1 Definition und Epidemiologie der pAVK

Es handelt sich um chronische, meist arteriosklerotisch bedingte Verschlüsse im Bereich der Becken- und Beinarterien.

Seltener finden sich entzündliche Ursachen.

Epidemiologisch sind ca. 2% aller Männer und 1,9% aller Frauen betroffen.

In der Bundesrepublik Deutschland werden schätzungsweise 35.000 Amputationen pro Jahr aufgrund von pAVK vorgenommen, dabei haben Patienten mit Diabetes mellitus ein 15-fach höheres Amputationsrisiko als Patienten ohne Diabetes mellitus.

Über 50% der pAVK-Patienten haben gleichzeitig eine koronare Herzkrankheit (KHK) und zerebrale Durchblutungsstörungen.

Die Lebenserwartung unbehandelter Patienten ist um etwa 10 Jahre geringer als bei Gesunden, 70% der Patienten versterben an koronarer Herzkrankheit.

Ätiologisch findet sich die pAVK sehr oft bei Patienten mit den Risikofaktoren Nikotinabusus, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Hyperlipoproteinämie, Hyperhomocysteinämie und Hyperfibrinogenämie.

Die Risikofaktoren führen zu arteriosklerotischen Umbauten an den Gefäßen, die nach Jahren zum Gefäßverschluss führen können [Greten, 2000].

1.5.2 Pathophysiologie der pAVK

Arteriosklerose ist die Hauptursache bei Entstehung der pAVK, die zuerst ohne klinische Symptomatik einhergeht.

Erst nach Jahren erreicht der Prozess ein Stadium, das zu einem langsam fortschreitenden oder akuten klinischen Krankheitsbild führen kann.

Das Bild ist abhängig von der Lokalisation der Arteriosklerose und dem Organbefall.

In der Aorta und den großen elastischen Gefäßen werden durch Arteriosklerose zwei pathophysiologische Erscheinungsformen hervorgerufen.

1. Plaqueruptur führt zur Ausbildung eines Abscheidungsthrombus.

Untersuchungen konnten zeigen, dass eine umschriebene Entzündung der Atheromkappe zu einer Auflockerung des Gewebes führt und zusammen mit mechanischen Faktoren eine Plaqueruptur auslösen kann.

Eine Abscheidungsthrombose der Aorta ist jedoch selten mit einer hämodynamisch wirksamen Lumeneinengung verbunden.

Klinische Komplikationen entstehen bei Verschleppung des thrombotischen Materials (aortoarterielle Thrombembolien) mit Ausbildung akuter Organinfarkte, beispielsweise hämorrhagische Mesenterialinfarkte oder anämische Nieren-oder Milzinfarkte.

2. Durch Arteriosklerose kommt es zunächst zur Schädigung der Intima. Nach Einriss der Intima wühlt sich Blut in die Media und bildet dort ein falsches Lumen. Weiter distal tritt dann das falsche Lumen oft wieder in das wahre Gefäßlumen ein. Durch die durch Arteriosklerose bedingte Diffusionsstörung der Media mit regressiven Mediaveränderungen resultiert eine Atrophie der glatten Muskulatur und eine Mediafibrose mit zunehmender Wandschwäche. Arteriosklerotische Aneurysmata findet man vorzugsweise in der Aorta abdominalis, zwischen den Nierenarterien und der Aortenbifurkation.

Arteriosklerose der mittelgrossen und kleinen muskulären Organarterien verursacht hämodynamisch wirksame Lumeneinengungen. Hieraus folgen schwerwiegende klinische Komplikationen, die häufig zum Tode führen.

In der Herzmuskulatur kommt es allerdings erst dann zu funktionellen Auswirkungen, wenn Stenosen 70-80% der Arterienquerschnitte verlegen.

Je nach Entwicklung der Stenosen unterscheidet man zwei Krankheitsbilder.

1. Die Stenose entwickelt sich langsam progredient durch Größenzunahme der Plaque. Daraus kann eine Organ- und Gewebshypoxie entstehen, die beispielsweise zu hypoxischem Muskelschmerz (Angina pectoris etc.), transitorischer ischämischer Attacke des Gehirns (TIA) oder bei Befall der Nierenarterien, zu einer renalen Hypertonie führt. In schweren Fällen kann sich in den Extremitätenarterien eine ischämische Hypoxidose mit Nekrose, die als Gangrän imponiert, entwickeln. Daraus resultiert oftmals eine Teilamputation der unteren Extremität (sog. Raucherbein). In einigen Fällen kann es zu einer Kollateralbildung kommen, die dann trotz schwerster Arteriosklerose zu einer ausreichenden Restversorgung mit sauerstoffreichem Blut führt. Kollateralbildung kann durch gezielte Belastung gefördert werden.
2. Im Gegensatz zum langsam progredienten Verlauf unterscheidet man klinisch dramatisch imponierende Krankheitsbilder, die sich aus einer Plaqueruptur als Abscheidungsthrombose oder durch Einblutung in das Atherom entwickeln. Es kommt zu einer plötzlichen, mehr oder weniger vollständigen Lumenverlegung mit resultierender akuter Ischämie des betroffenen Areals. Man findet anämische oder hämorrhagische Infarkte mit entsprechender klinischer Symptomatik, die für das entsprechende Organ (Herz, Niere, Gehirn) typisch sind [Böcker, Denk, Heitz, 1996; Crowther, 2005].

2 Ziel der Studie und Patientenkollektiv

2.1 Ziel

In den letzten Jahren wurde zunehmend in wissenschaftlichen Publikationen die Fragestellung fokussiert, ob arteriosklerotische und thromboembolische Erkrankungen einer gemeinsamen Ätiologie oder gemeinsamen Risikofaktoren zugrunde liegen.

Lange Zeit wurden in der Literatur beide Krankheitsbilder unabhängig von einander betrachtet.

2003 haben wir erstmalig die Hypothese aufgestellt, dass Thrombophilie Risikofaktoren auch in der Ätiologie arteriosklerotischer Erkrankungen eine Rolle spielen [Düber et al.;2003].

Wir haben daher 28 Patienten mit nachgewiesener pAVK sowohl auf die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren (Diabetes mellitus, Homocysteinämie, Dylipidämie), als auch auf Thrombophilie-Risikofaktoren untersucht, um zu untersuchen, ob Faktor V Leiden Mutation, Prothrombin Polymorphismus (G20210A), Protein C- und S-Mangel sowie Antithrombin-Verminderungen gehäuft bei Patienten mit pAVK nachzuweisen sind und somit eventuell in der Ätiologie der pAVK von Bedeutung sind.

Darüber hinaus haben wir bei unseren Patienten die Protein Z-Plasmaspiegel bestimmt, um Hinweise zu finden, ob Veränderungen von PZ, dessen physiologische Funktion noch nicht hinreichend geklärt ist, auch bei arteriosklerotischen Erkrankungen zu beobachten sind.

2.2 Patienten

2.2.1 Beschreibung

Insgesamt wurden 28 Patienten untersucht, die an pAVK der Fontaine-Stadien IIa / IIb litten.

Alle Patienten befanden sich zur Zeit der Studie in der Schwerpunktpraxis für Gefäßchirurgie und Phlebologie, Dr.med Christine Langer, Frankfurter Strasse 33, 35392 Gießen, oder der Medizinischen Klinik der Justus-Liebig-Universität Gießen, Klinikstrasse 36, 35392 Gießen in ambulanter Behandlung .

Das Kollektiv bestand aus 28 Patienten (10 Frauen, 18 Männer) mit einem durchschnittlichen Alter von 67 ± 12 Jahren (vgl. Abb. 3).

Abb. 3: Patienten mit pAVK

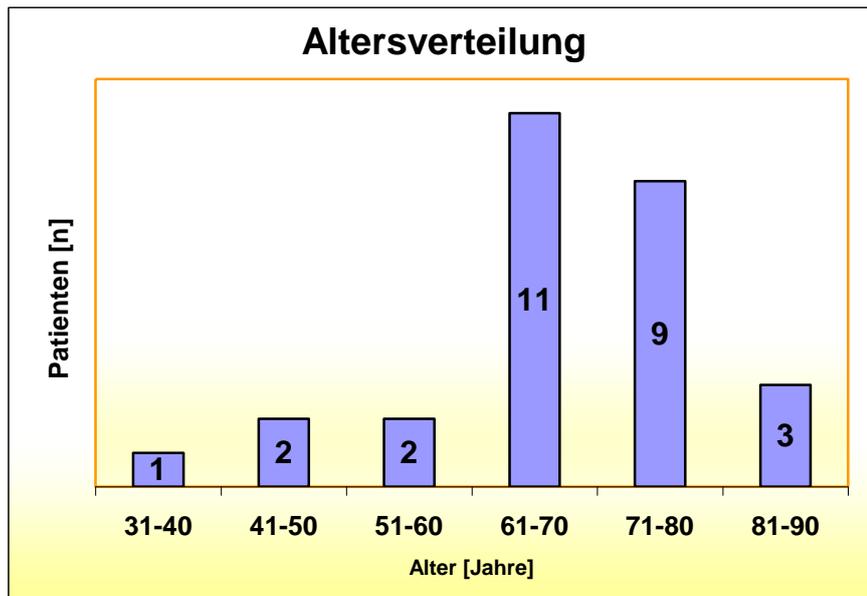


Abb. 3: Patienten mit pAVK (n=28), Altersverteilung

2.2.2 Ein-/Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien

Die Patienten, die in das Kollektiv aufgenommen wurden, mussten an einer gesicherten pAVK leiden, die bereits diagnostisch erfasst und stadienmäßig klassifiziert war.

Ausschlusskriterien

3 Patienten wurden zur Zeit der Blutentnahme mit Vitamin K-Antagonisten behandelt, somit konnten die Vitamin K-abhängigen Faktoren, inklusive Protein Z, in diesen Fällen nicht für die Studie genutzt werden.

3 Probenaufbereitung und Methoden

3.1 Blutentnahme und Probenaufbereitung

Ausgewählt wurden Patienten, die an peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) leiden. Nach einem kurzen Aufklärungsgespräch über die geplante Blutentnahme (BE), Zielsetzung der geplanten Studie und nach Unterschreiben des Aufklärungsbogens, erfolgte nach kurzem Venenstau eine Venenpunktion mit einem Butterfly-Punktionsbesteck in der Ellenbeuge bzw. auf dem Handrücken.

Um den physiologischen Gerinnungsvorgang zu unterbinden, wurde Citrat als Antikoagulanzen verwendet. Es wurden 9 Teile Blut und ein Teil Citrat behutsam vermischt, anschliessend mit einer Standardlaborzentrifuge bei 5000 Umdrehungen 15 Minuten zentrifugiert.

Um thrombozytenfreies Plasma zu erhalten, wurde der überstehende Plasmaanteil, mittels Eppendorf-Pipette®, abgehoben und in Zentrifugenröhrchen überführt.

Anschließend wurden die Proben erneut bei 5000 Umdrehungen 15 Minuten zentrifugiert.

Dann wurde das Plasma in Eppendorf-Hütchen zu 300 µl portioniert und bei minus 20 Grad Celsius tiefgefroren.

Mit Kalium-EDTA versetztes Vollblut für die molekularbiologische Diagnostik wurde bei minus 20 Grad Celsius tiefgefroren.

Des Weiteren wurde ein Natrium-Heparin-Röhrchen zur Bestimmung der klinisch chemischen Parameter und ein Natrium-Fluorid-Röhrchen zur Bestimmung von Lipoprotein (a) abgenommen.

Im hämostaseologischen Labor der Medizinischen Klinik der Justus-Liebig-Universität Gießen wurden folgende Parameter bestimmt: TPZ nach Quick, aPTT, Antithrombin, Proteine C, S und Z, aPC-Ratio, Faktor V Leiden Mutation, Prothrombin Polymorphismus, TAFI, Blutbild.

Die klinisch-chemischen Analysen erfolgten im Zentrallabor des Universitätsklinikums Gießen. Bestimmt wurden Natrium, Kalium, Kreatinin, Harnstoff, Triglyceride, Cholesterin, Cholinesterase, C-reaktives Protein (CRP).

3.2 Methoden

3.2.1 Klassische Risikofaktoren arteriosklerotischer Erkrankungen

3.2.1.1 HbA1c

Der Anteil des HbA1c am Gesamt-Hämoglobingehalt ist abhängig von der Glukosekonzentration der vergangenen 8 Wochen und dem Erythrozytenalter.

Testprinzip:

HbA1c wurde mit dem vollautomatisierten SystemVariant™ und Reagenzien der Firma Bio-Rad Laboratories mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC = high pressure liquid chromatography) bestimmt.

Grundlage der Methode ist die Ladungsveränderung des Hämoglobin-Moleküls durch N-terminale Modifikation mit Glukose. Die Trennung von glykolysiertem und nicht-glykolysiertem Hämoglobin erfolgte mit Mikrosäulentchnik.

3.2.1.2 Homocystein

Die Bestimmung des Homocysteins erfolgte mit dem IMX® System Homocystein der Firma ABBOTT Diagnostics Division, ABBOTT GmbH & Co.KG, Diagnostika, 65205 Wiesbaden.

Homocystein ist eine schwefelhaltige Aminosäure, die durch Demythelierung von Methionin intrazellulär gebildet wird. Der Großteil wird durch das Enzym Methionin-Synthetase zu Methionin remethyliert, der restliche Anteil wird irreversibel zu Cystein katabolisiert.

Testprinzip:

Zunächst wird oxidiertes, gebundenes Homocystein mittels Dithiothreitol-DDT- und Adenosin zu freiem Homocystein reduziert und dieses in einer enzymatischen Reaktion durch SAH-Hydrolase zu S-Adenosyl-L-Homocystein umgewandelt, damit chemisch einheitliches Homocystein vorliegt.

Fluoreszin markierte Tracer und Anti-S-Adenosyl-L-Homocystein Antikörper (monoklonal von Mäusen) werden der Probe zugegeben.

Das in der Probe vorhandene S-Adenosyl-L-Homocystein und der markierte Tracer konkurrieren um die Bindungsstellen der monoklonalen Antikörper.

Mittels einer optischen Messeinrichtung wird die Intensität des Fluoreszenzlichtes gemessen und mit einer vorher erstellten 4-Punkt-Kalibrationskurve ausgewertet.

Der Referenzbereich liegt normal unter 9 $\mu\text{mol/l}$, Werte zwischen 16-20 $\mu\text{mol/l}$ sprechen für leicht erhöhte Homocysteinspiegel, Werte $> 21 \mu\text{mol/l}$ weisen auf deutliche Erhöhung hin.

3.2.1.3 Lipoprotein (a) [Lp(a)]

Erhöhte Lp(a)-Plasmaspiegel (Werte grösser 20 mg/dl) haben wahrscheinlich atherogene Effekte. Zusätzliche Erhöhungen des LDL-Cholesterins scheinen diese Effekte additiv zu verstärken.

Testprinzip:

Bestimmt wurde Lp(a) mittels N Latex Lp(a) Reagenz der Firma Dade Behring Marburg GmbH.

Angewandt wird das Prinzip zur quantitativen Analytik von Lp(a) im humanen Plasma mittels Nephelometrie.

Prinzip der Methode ist die Agglutination Polystyrol-haltiger Partikel, die mit Antikörpern gegen Lp(a) beladen sind, mit dem in der Probe vorhandenen Lp(a).

Je nach Lp(a) Gehalt der Probe kann die Intensität des Streulichts im Nephelometer durch Standardmessung ermittelt werden.

Die Auswertung des Endergebnisses der Analyse erfolgt automatisch mit Hilfe einer Log-Funktion.

Referenzwerte gesunder Personen weisen eine asymmetrische Verteilung auf, bis zu Werten von über 100 mg/dl. Laut Standardliteratur der klinischen Chemie und der Laboratoriumsmedizin, erhöht sich das Arterioskleroserisiko bei Werten $> 20 \text{ mg/dl}$.

3.2.1.4 Cholesterin

Cholesterin wurde mit Hilfe des Multifunktionsanalyzers Hitachi™ und Reagenzien der Firma Boehringer Mannheim bestimmt.

Testprinzip:

Zunächst wird Cholesterin durch enzymatische Hydrolyse mittels Cholesterinesterase aus der veresterten Form freigesetzt. Daraus entstehen freies Cholesterin und freie Fettsäuren. Mit Hilfe von Cholesterin Oxidase wird unter Sauerstoffverbrauch das freie Cholesterin oxidiert, wobei Wasserstoffperoxid entsteht. Die Peroxidase-katalysierte Bildung eines Farbstoffes wird photometrisch bestimmt.

3.2.2 Gerinnungsfaktoren

3.2.1.1 Thromboplastinzeit (Quick-Wert)

Die Thromboplastinzeit (TPZ) wurde mit Thromborel S® der Firma Dade Behring Marburg GmbH im BCS (Behring-Coagulation-Systems) bestimmt. Dieser Test dient als schnelle und empfindliche Nachweismethode für Störungen im exogenen Schenkel der Gerinnungskaskade (Erfassung der Faktoren II,V,VII, X und des Fibrinogens).

Testprinzip:

Citratplasma wird bei 37 Grad Celsius inkubiert und mit Gewebsthromboplastin und Kalziumionen versetzt.

Gemessen wird die Zeit bis zur Bildung eines Fibringerinnsels und in Prozent Gerinnungsaktivität (Quick-Wert) mittels Bezugskurve, bzw. als standardisierte Internationale Normalisierte Ratio (INR) angegeben.

Der Referenzbereich liegt bei 70-130% der Norm.

3.2.1.2 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) wurde mit Pathrombin SL® der Firma Dade Behring Marburg GmbH im BCS (Behring-Coagulation-Systems) bestimmt.

Erfasst werden die Faktoren II, V, VII, VIII c, IX, X, Fibrinogen und die Kontaktfaktoren.

Testprinzip:

Inkubation von Citratplasma bei 37 Grad Celsius, Zugabe von Phospholipiden und einem Oberflächenaktivator (z.B. Kollagen) führen zur Aktivierung der Faktoren des intrinsischen (endogenen) Gerinnungssystems.

Durch Zugabe von Kalziumionen wird der Gerinnungsvorgang ausgelöst und die Zeit bis zur Entstehung des ersten Fibringerinnsels gemessen.

Der Referenzbereich liegt bei 26-36 s.

3.2.3 Thrombophiliediagnostik

3.2.3.1 Antithrombin (AT)

Antithrombin (AT) wurde mit Hilfe von Berichrom® der Firma Dade Behring Marburg GmbH mittels BCS (Behring-Coagulation-Systems) durchgeführt.

Testprinzip:

AT im Plasma hemmt im Überschuss vorliegendes Thrombin.

Die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch das im Reagenz enthaltene Heparin gesteigert.

Unter den vorgegebenen Bedingungen (hohe Verdünnung) reagiert Thrombin nahezu spezifisch mit AT. Die Restaktivität des Thrombins wird mit einem chromogenen Substrat gemessen und ist der AT-Aktivität umgekehrt proportional. Bestimmt wird die Extinktionszunahme bei 405 nm.

Der Referenzbereich liegt bei 70-130% der Norm.

3.2.3.2 Protein C (PC)

Protein C (PC) wurde bestimmt mit Hilfe des Berichrom® Protein C Testes der Firma Dade Behring Marburg GmbH.

In vivo inhibiert Protein C die Faktoren Va und VIIIa. Protein C zeigt hohe Affinität zu endothelialen Protein C Zell-Rezeptoren, die an Membranen von Endothelzellen nachweisbar sind. In Anwesenheit von Kalziumionen wird Protein C, nach Interaktion mit dem endothelialen Protein C Zell-Rezeptor, durch Thrombin aktiviert. Dazu muss Thrombin gleichzeitig an einen weiteren Zellmembran-Rezeptor binden, das Thrombomodulin.

Testprinzip:

Es handelt sich um einen kinetischen Test, Protein C im Patientenplasma wird mit einem spezifischen Schlangengiftaktivator aktiviert. Aktiviertes Protein C hemmt die Faktoren Va und VIIIa und verlängert dadurch die aPTT. Durch Zusatz eines Mangelplasmas, das ausser Protein C alle Gerinnungsfaktoren im Überschuss enthält, ist die Gerinnungszeit nur noch von der Protein C-Aktivität der Probe abhängig. Die Zeitdauer bis zur Gerinnungsbildung wird bei einer Extinktion bei 405 nm photometrisch gemessen.

Der Referenzbereich liegt bei 70-130% der Norm.

3.2.3.3 Protein S (PS)

Protein S (PS) wurde bestimmt mit Hilfe von Protein S-Reagenz der Firma Dade Behring Marburg GmbH.

Testprinzip:

Da aktiviertes Protein C (aPC) proteolytisch die Faktoren Va und VIIIa der Gerinnungskaskade spalten kann und Protein S (PS) als Cofaktor diesen Vorgang um ein Vielfaches beschleunigt, kommt es mit steigender Aktivität von PS im Plasma zu zunehmender Gerinnungszeit.

Durch Zugabe von Faktor X-Aktivator wird die Gerinnung auf der Stufe des Faktors X in Gang gesetzt. Faktor Xa bildet dann mit dem verbleibenden Faktor Va aus Prothrombin Thrombin, das schließlich Fibrinogen zu Fibrin umsetzt.

Die Gerinnungsbildung wird bei 405 nm photometrisch erfasst.

Der Referenzbereich liegt bei 70-130% der Norm.

3.2.3.4 Resistenz gegen aktiviertes Protein C (aPCR)

Die Bestimmung der Resistenz gegen aktiviertes Protein C (aPCR) erfolgte mit dem Coatest® APC™ Resistance V der Firma Chromogenix-Instrumentation Laboratory SpA,

20 128 Milano (Italy).

Dieses Testverfahren wird eingesetzt zur in vitro Bestimmung der Resistenz gegen aktiviertes Protein C (aPC), die durch die Faktor V Leiden Mutation bedingt wird.

Testprinzip:

Zur funktionellen Bestimmung der aPC-Resistenz wird Probenplasma mit V-DEF Plasma (stabilisiertes, lyophilisiertes humanes Plasma) mit niedriger Faktor V-Restaktivität und dem Heparinantagonisten Polybrene® vorverdünnt und für die vorgeschriebene Zeit mit aPTT Reagenz (gereinigte Phospholipide mit kolloidalem Kontaktaktivator) inkubiert.

Nach Zugabe von CaCl_2 (Kalziumchlorid, 0,025 mol/l in Tris Puffer mit 0,5 % Rinderalbumin) wird die Zeitdauer bis zum Eintreten der Fibrinbildung mit und ohne aPC gemessen.

Die aPC-Ratio wird bestimmt aus dem Quotienten der Gerinnungszeit aPC/ CaCl_2 und der Gerinnungszeit von CaCl_2 .

Bei Gesunden wird eine Ratio über 2,0 gefunden, eine Ratio zwischen 1,3 und 2,0 bei heterozygoten Defekträgern, eine Ratio unter 1,3 bei homozygoten Merkmalsträgern.

3.2.3.5 Faktor V Leiden Mutation und Prothrombin Polymorphismus

Die molekularbiologische Diagnostik auf Faktor V Leiden Mutation und Prothrombin Polymorphismus (G20210A) wurde mit dem ThromboType®*plus* Test der Firma Hain Lifescience durchgeführt.

Testprinzip:

Die molekulargenetische Charakterisierung der Position 1691 des menschlichen Faktor V-Gens und Prothrombin (Faktor II) Polymorphismus wird mittels DNA-STRIP®-Technologie (Thrombo Type® *plus* der Firma HAIN Lifescience) durchgeführt und ist eine halbautomatisierte Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Mit dem Verfahren werden heterozygote und homozygote Merkmalsträger identifiziert.

Mit einem DNA-Isolierungskit wird DNA aus dem Patientenmaterial isoliert. Die Amplifikation der spezifischen Gensequenz erfolgt mit Biotin-markierten Primern. Der Hybridisierungsprozess erfolgt nach folgendem Prinzip:

- Chemische Denaturierung der Amplifikationsprodukte
- Hybridisierung der Biotin-markierten einzelsträngigen Amplifikate

- Entfernung unspezifisch gebundener Amplifikate
- Zugabe eines Streptavidin/Alkalischen Phosphatase (AP)-Komplexes
- Alkalische Phosphatase (AP) vermittelte Farbreaktion

Positive Banden werden mittels einer Schablone visuell ausgewertet.

3.2.3.6 TAFI (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor)

ELISA-Komplettkit zur Bestimmung des TAFI (Antigen) im Plasma und anderen biologischen Flüssigkeiten mit Reagenzien der Firma Haemochrom Diagnostika GmbH. Testprinzip:

Die Proben werden in Mikrotiterplattenvertiefungen, die mit monoklonalen Antikörpern gegen TAFI beschichtet sind, inkubiert. Nach der Bindung des TAFI an die Capture Antikörper werden ungebundene Substanzen durch Waschen entfernt. Ein Peroxidase-konjugierter Detecting Antikörper wird hinzugefügt, der an den TAFI/Capture Antikörper-Komplex bindet. Nach einem Waschschrift reagiert zugegebenes Enzymsubstrat (TMB) mit dem Konjugat. Die Intensität der entstehenden Farbe ist dem Gehalt an TAFI (Antigen) in der Probe proportional.

3.2.3.7 Protein Z (PZ)

Protein Z wurde mit einem Enzyme Immunoassay (ELISA) der Firma Diagnostica Stago im Plasma bestimmt.

Testprinzip:

Eine Mikro-Elisa Platte ist mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen Protein Z versehen.

Protein Z bindet in einer Antigen-Antikörperreaktion an den entsprechenden Antikörper.

Ein weiterer monoklonaler Antikörper, markiert mit einer Peroxidase, bindet an ein weiteres Epitop des Protein Z.

Durch Zugabe des Substrates Orthophenylenediamin (OPD) kommt es zur Oxidation in Anwesenheit der Peroxidase. Nach Abstoppen dieser Reaktion kann eine Farbveränderung mittels Photometrie bei 492 nm gemessen werden.

Es besteht eine direkte Korrelation zwischen der gemessenen Extinktion und der Konzentration von Protein Z.

Referenzbereich: PZ-Plasma Werte < 1000 µg/l gelten als pathologisch niedrig.

3.2.4 Statistische Auswertung

Die Datenerfassung der Laborparameter erfolgte mit dem Programm EXCEL™ für Windows™ (Version Windows XP Professional) der Firma Microsoft mittels Personalcomputer.

Die Datendarstellung erfolgte deskriptiv mittels Median, Mittelwert und Standardabweichung.

Normal- und Referenzwerte wurden zum einen Standardlehrbüchern der klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin entnommen, zum anderen wurden laboreigene Referenzwerte herangezogen.

Da die von uns erhobenen Daten keine Normalverteilung (bezogen auf die Gesamtbevölkerung) aufweisen und Ausreißer den Mittelwert verzerren, wurden, zur Optimierung der Darstellung, die erhobenen Daten der Proteine C, S, Z und AT mit dem Programm SAS (Statistical Analysis System, V.9.13) als box and whisker plot dargestellt.

Box and whisker plot Darstellungen stellen die Spannweite der Verteilung dar, gebildet aus Maximum und Minimum.

Abb. 4: Box and whisker plot

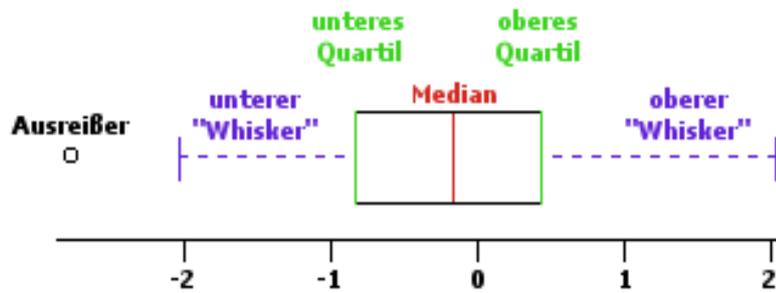


Abb. 4: Allgemeine Darstellung der Box and Whisker plot Präsentation

Die Darstellung erfasst, neben dem Median, das 1. und 3. Quartil und die beiden Extremwerte. Die beiden Quartile stellen die „box“ dar. Durch die Länge der Box kann der Interquartilsabstand (IQR Interquartil range) abgelesen werden. Dies kann als Maß für die Streuung der Daten verstanden werden. In der Box ist der Median eingezeichnet, anhand seiner Lage kann ein Eindruck der Verteilung der Daten gewonnen werden.

Die Länge der „Whisker“ kann maximal das 1,5-fache des Interquartilsabstandes ($1,5 \cdot \text{IQR}$) betragen. Werte, die darüber liegen, bezeichnet man als Ausreißer oder „Outlier“ und sind wie folgt definiert:

$$\begin{aligned} \text{Outlier:} & \quad \text{ab 3.Quartil} + 1,5 \cdot \text{IQR} \\ & \quad \text{ab 1.Quartil} - 1,5 \cdot \text{IQR} \end{aligned}$$

Statistische Beratung und Unterstützung erfolgte durch das Institut für Medizinische Informatik (Leiter: Prof. Dr. G. Weiler) der Justus-Liebig-Universität Gießen in Zusammenarbeit mit Frau Marion Mann.

Die deskriptive Darstellung der Proteine C, S und Z ist aufgrund der geringen Anzahl an Patienten ($n=4$) mit Faktor V Leiden Mutation mittels Box and Whisker Visualisierung an ihren statistischen Grenzen, jedoch ist mit dieser Darstellungsform ein Vergleich am besten möglich.

4 Ergebnisse

4.1 Klassische Risikofaktoren der pAVK

4.1.1 HbA1c

Der HbA1c-Mittelwert in unserem Patientenkollektiv (n=28) betrug 6,94%, (Referenzbereich 4-6% des Gesamthämoglobins), Median 6,7%, Standardabweichung 1,23.

Abb. 5: HbA1c

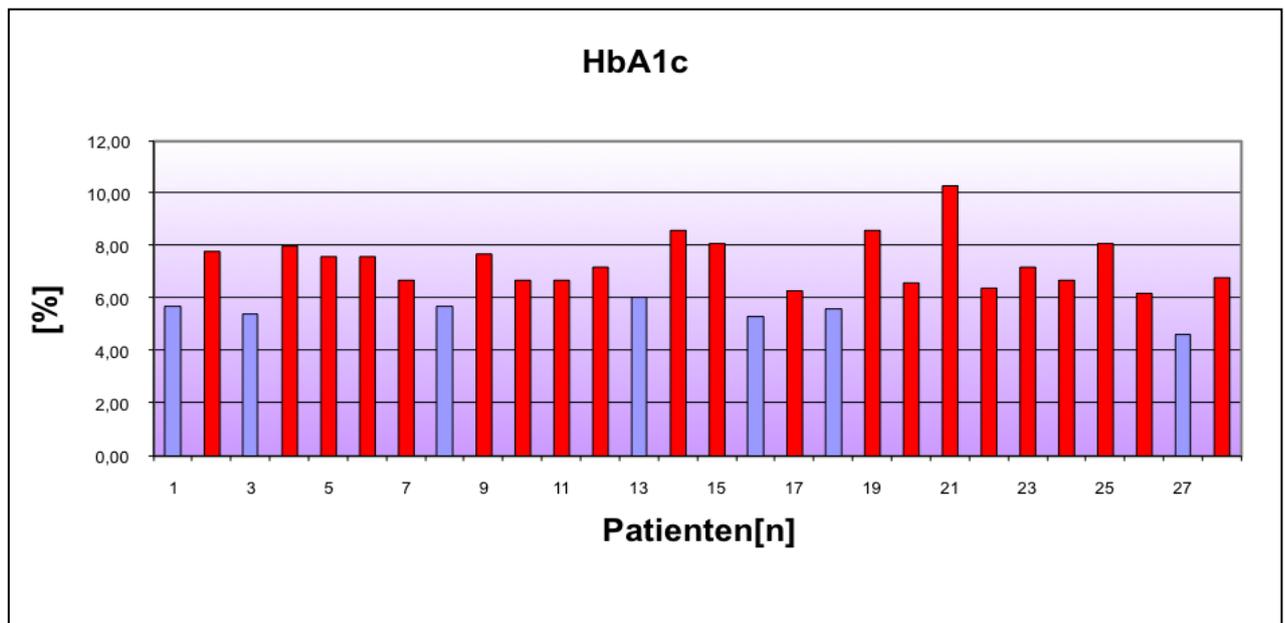


Abb. 5: Darstellung der HbA1c-Werte bei Patienten mit pAVK (n=28). Werte grösser 6% sind rot markiert.

4.1.2 Homocystein

Der Homocystein-Mittelwert bei Patienten mit pAVK (n=28) betrug 12,3 $\mu\text{mol/l}$, (Referenzbereich bei Gesunden 10-15 $\mu\text{mol/l}$), Median 11,9 $\mu\text{mol/l}$, Standardabweichung 3,61.

Abb. 6: Homocystein

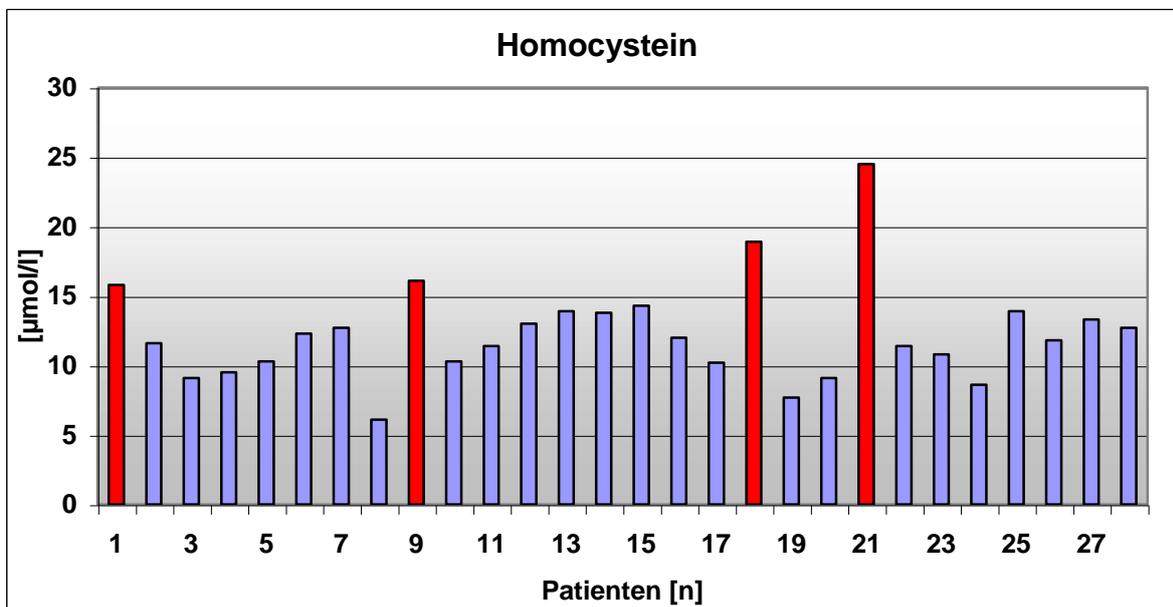


Abb. 6: Darstellung der Homocysteinwerte bei Patienten mit pAVK (n=28). Werte grösser 15 $\mu\text{mol/l}$ sind rot markiert.

4.1.3 Lipoprotein(a) [Lp(a)]

Der von uns bestimmte Mittelwert bei Patienten mit pAVK (n=28) betrug 28,75 mg/dl, (Werte grösser 20 mg/dl gelten als pathologisch), Median 12 mg/dl, Standardabweichung 31,59.

Anmerkung: Werte, die vom Institut für klinische Chemie als <10 mg/dl bestimmt wurden, wurden zur graphischen Präsentation und zur Berechnung der statistischen Parameter auf 10,0 mg/dl gesetzt .

Abb. 7: Lipoprotein(a) [Lp(a)]

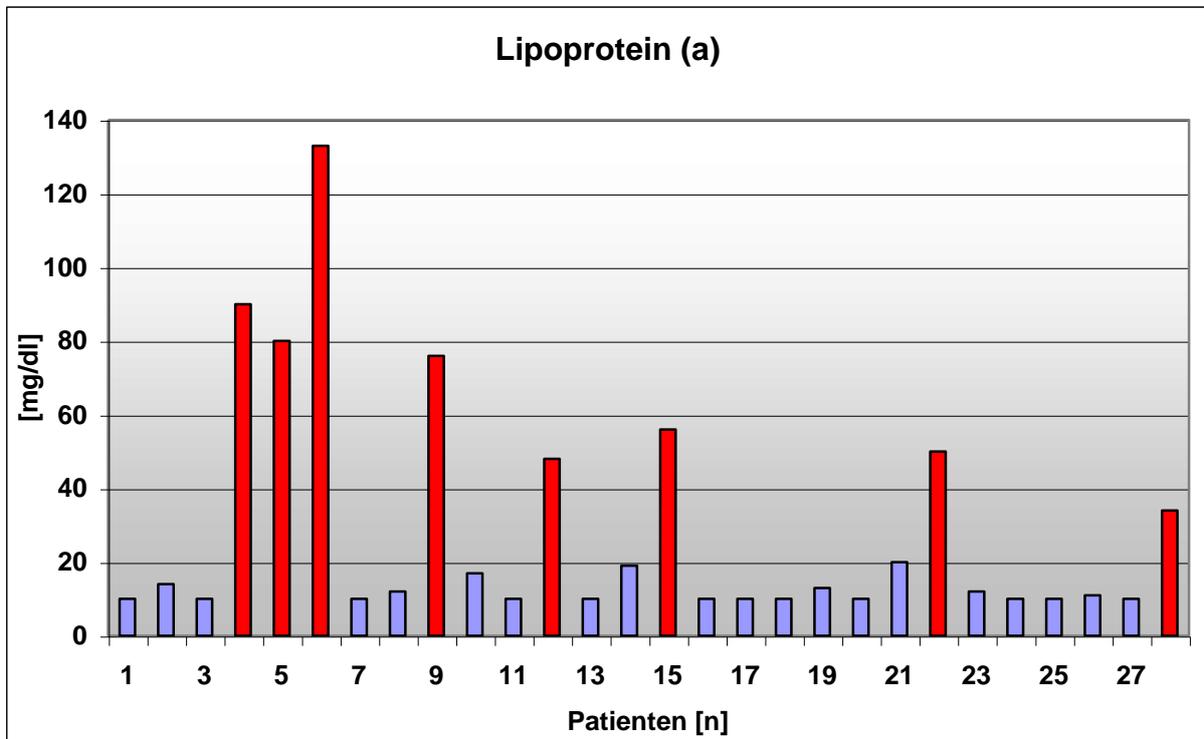


Abb. 7: Darstellung Lipoprotein (a) bei Patienten mit pAVK (n=28). Werte grösser 20 mg/dl sind rot markiert.

4.1.4 Cholesterin

Wir ermittelten in unserem Patientenkollektiv (n=28) einen Cholesterin-Mittelwert von 216,43 mg/dl, (Referenzbereich: Werte grösler 220 mg/dl gelten als pathologisch), Median 214 mg/dl, Standardabweichung 39,63.

Abb. 8: Cholesterin

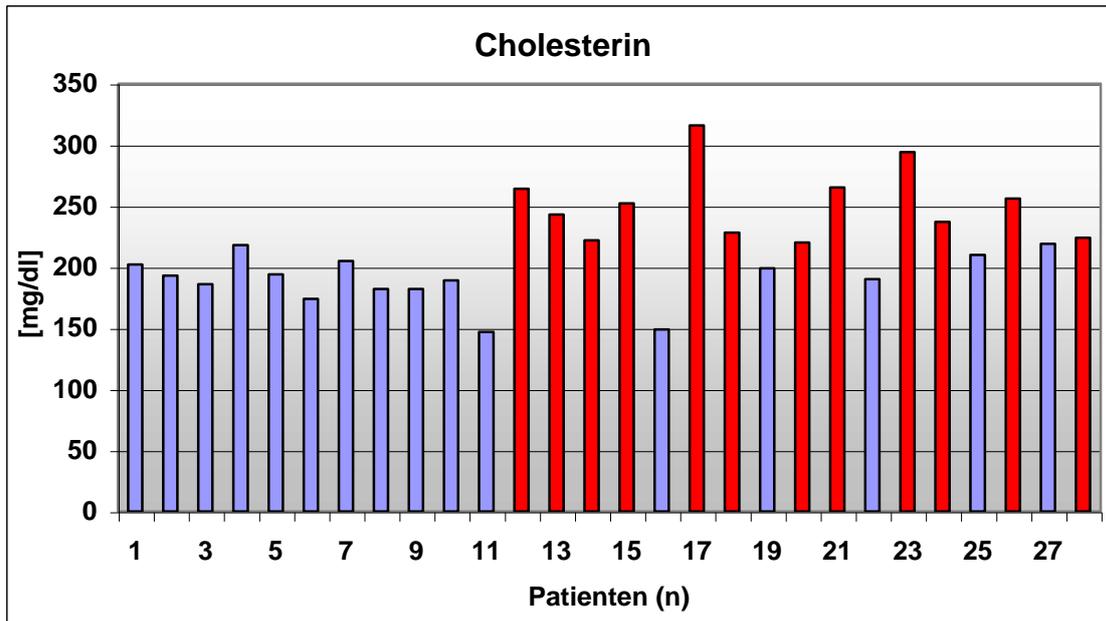


Abb. 8: Darstellung Cholesterin bei Patienten mit pAVK (n=28), Werte grösser 220 mg/dl sind rot markiert.

4.2 Risikofaktoren venöser thromboembolischer Erkrankungen

Folgend sind die Risikofaktoren venöser thromboembolischer Erkrankungen dargestellt.

4.2.1 Antithrombin (AT)

Der AT-Mittelwert bei Patienten mit pAVK (n=28) betrug 98,36% der Norm, (Referenzbereich 70-120% der Norm), Median 100% der Norm, Standardabweichung 14,74.

Abb. 9: Antithrombin (AT)

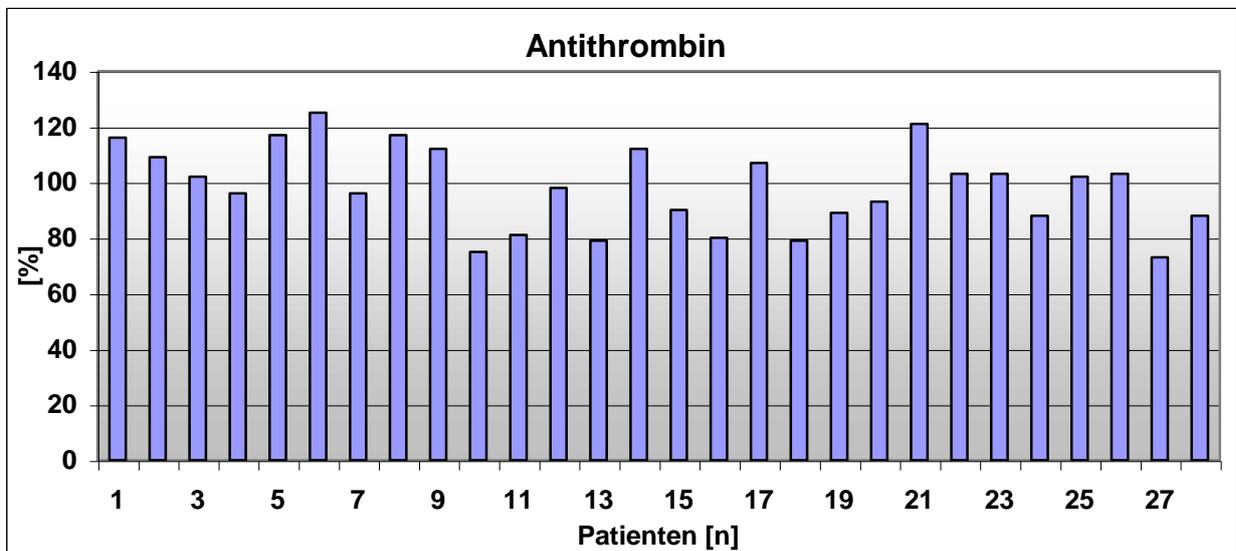


Abb. 9: Darstellung Antithrombin (AT) bei Patienten mit pAVK (n=28). Eine signifikante Aktivitätsminderung des AT konnte bei allen Patienten ausgeschlossen werden.

Abb. 10: Darstellung der AT als Box and Whisker Plot bezogen auf das Vorhandensein einer heterozygoten Faktor V Leiden Mutation.

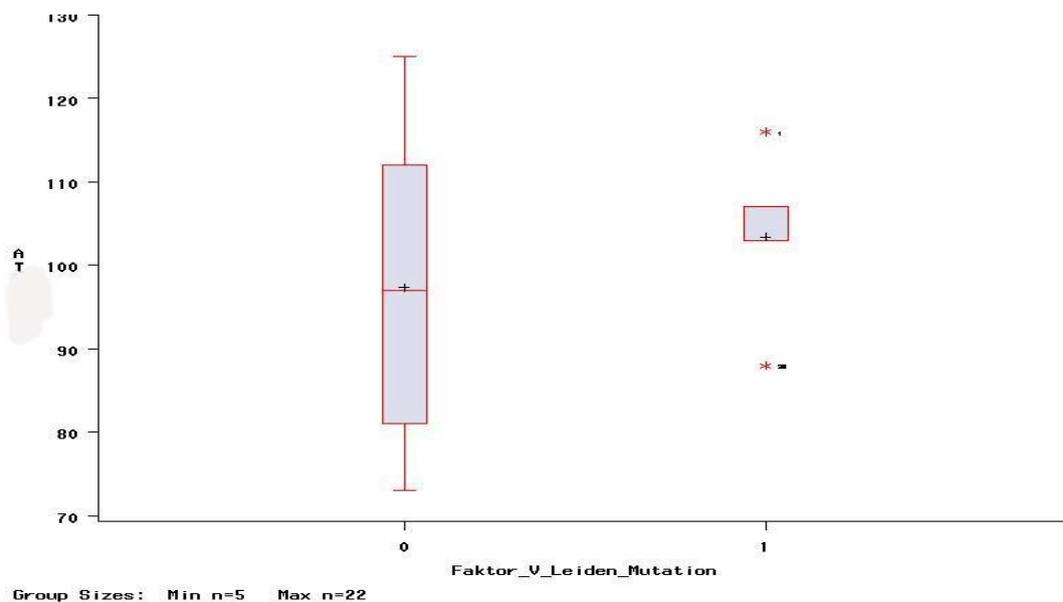


Abb. 10: Ergebnisse AT bei Patienten mit pAVK (n=28) als Box and Whisker Plot.

Beim Nachweis einer Faktor V Leiden Mutation (Mutationsträger=1) zeigen sich deutliche „outlier“ und eine wesentlich geringere Spannweite als ohne Faktor V Leiden Mutation (ohne Mutation=0). Deutliche outlier nach oben

(3.Quartil+1,5*Interquartilsabstand (IQR)) und unten (1.Quartil-1,5*IQR) bei Faktor V Leiden Mutation.

Bei fehlender Faktor V Leiden Mutation auffallende Dispersion der Messwerte.

Bei Vorliegen einer heterozygoten Faktor V Leiden Mutation scheinen sich die Konzentrationen auf einen kleineren Verteilungsbereich zu konzentrieren.

4.2.2 Protein C

Bei 3 Patienten wurden die Vitamin K- abhängigen Faktoren nicht für die Studie verwertet, da die Patienten zur Zeit der Blutentnahme unter oraler Antikoagulation mit Vitamin K-Antagonisten standen.

Bei einem Patienten liegt kein Protein C-Wert vor, da aufgrund eines Abnahmefehlers die Bestimmung nicht durchgeführt werden konnte.

Protein C Werte, die vom Labor als > 130% der Norm ermittelt wurden, sind zur statistischen Berechnung auf 130% der Norm gesetzt worden.

Der PC-Mittelwert betrug bei Patienten mit pAVK (n=24) 111,21% der Norm, (Referenzbereich 65-140% der Norm), Median 114% der Norm, Standardabweichung 19.

Abb. 11: Protein C

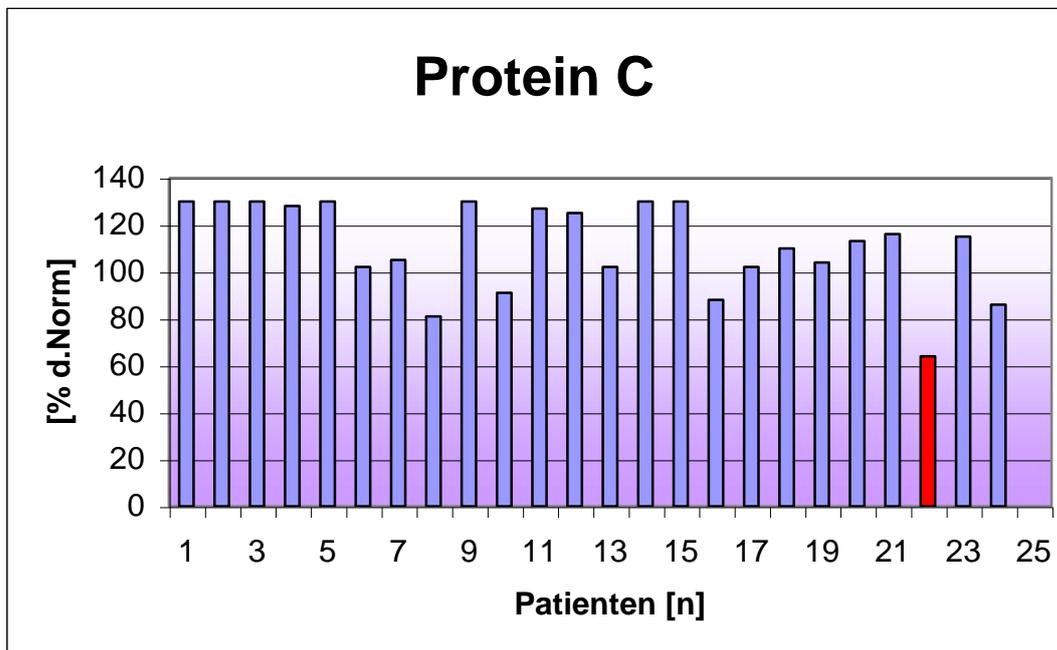


Abb. 11: Darstellung Protein C bei Patienten mit pAVK (n=24), Werte <70% der Norm sind rot markiert.

Abb. 12: Protein C, bezogen auf das Vorhandensein einer heterozygoten Faktor V Leiden Mutation dargestellt, als box and whisker plot.

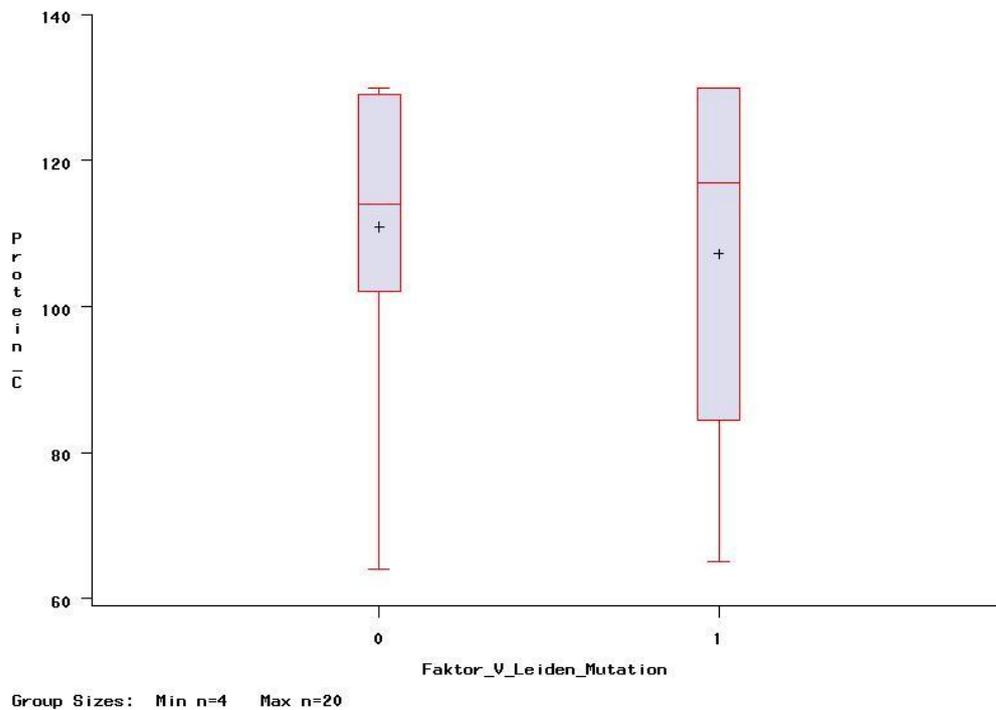


Abb. 12: Protein C bei Patienten mit pAVK (n=24) als box and whisker Darstellung.

Bei positivem Faktor V Leiden Nachweis (box mit 1 gekennzeichnet) zeigt sich ein deutlich größerer Interquartilsabstand. 50% der Patienten haben eine größere Variabilität. Das Maximum fällt mit dem 3. Quartil zusammen.

Die Streuung ist bei nachgewiesener, wie auch bei fehlender Faktor V Leiden Mutation in etwa gleich.

Bei nachgewiesener Faktor V Leiden Mutation etwas größere Spannweite der Protein C-Werte.

4.2.3 Protein S

Bei 3 Patienten konnten die Protein S-Aktivitäten nicht verwertet werden, da sie zur Zeit der Blutentnahme mit Vitamin K-Antagonisten behandelt wurden.

Aufgrund eines Entnahmefehlers liegt bei einem Patienten kein Protein S-Wert vor. Protein S-Aktivitäten, die vom Labor > 130% der Norm ermittelt wurden, sind zur statistischen Berechnung auf 130% der Norm gesetzt worden.

Der PS-Mittelwert in unserem Patientenkollektiv (n=24) betrug 102% der Norm, (Referenzbereich 69-130% der Norm bei Männern, 58-114% bei Frauen), Median 115% der Norm, Standardabweichung 26,57.

Abb. 13: Protein S

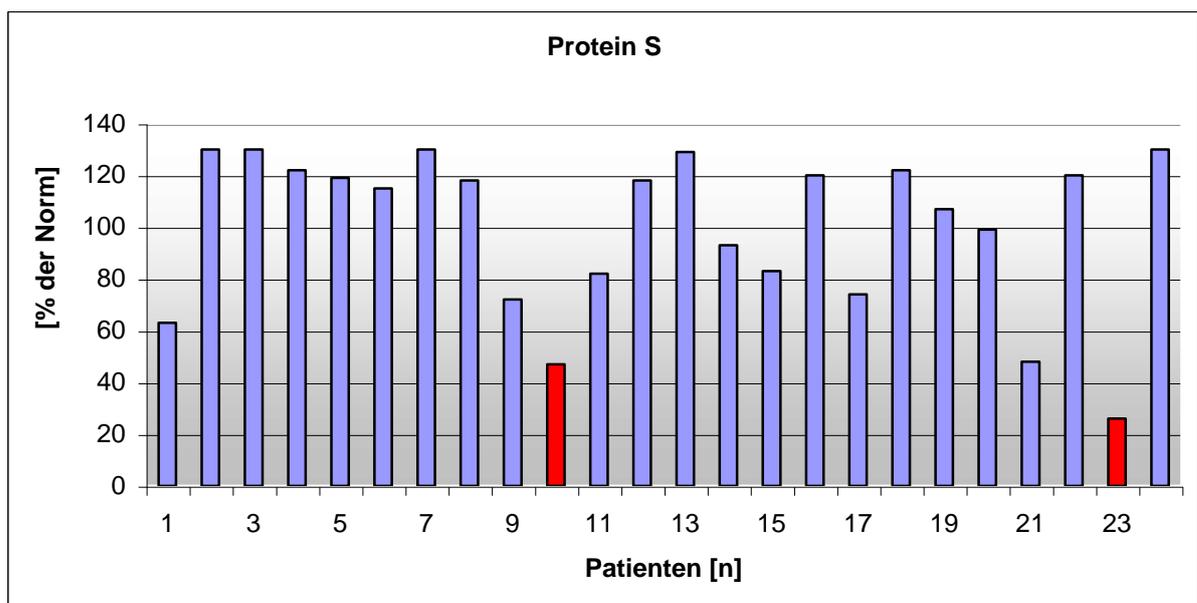


Abb. 13: Darstellung Protein S bei Patienten mit pAVK (n= 24), pathologische Aktivitäten sind rot markiert.

Abb. 14: Protein S, bezogen auf das Vorhandensein einer heterozygoten Faktor V Leiden Mutation, dargestellt als box and whisker plot.

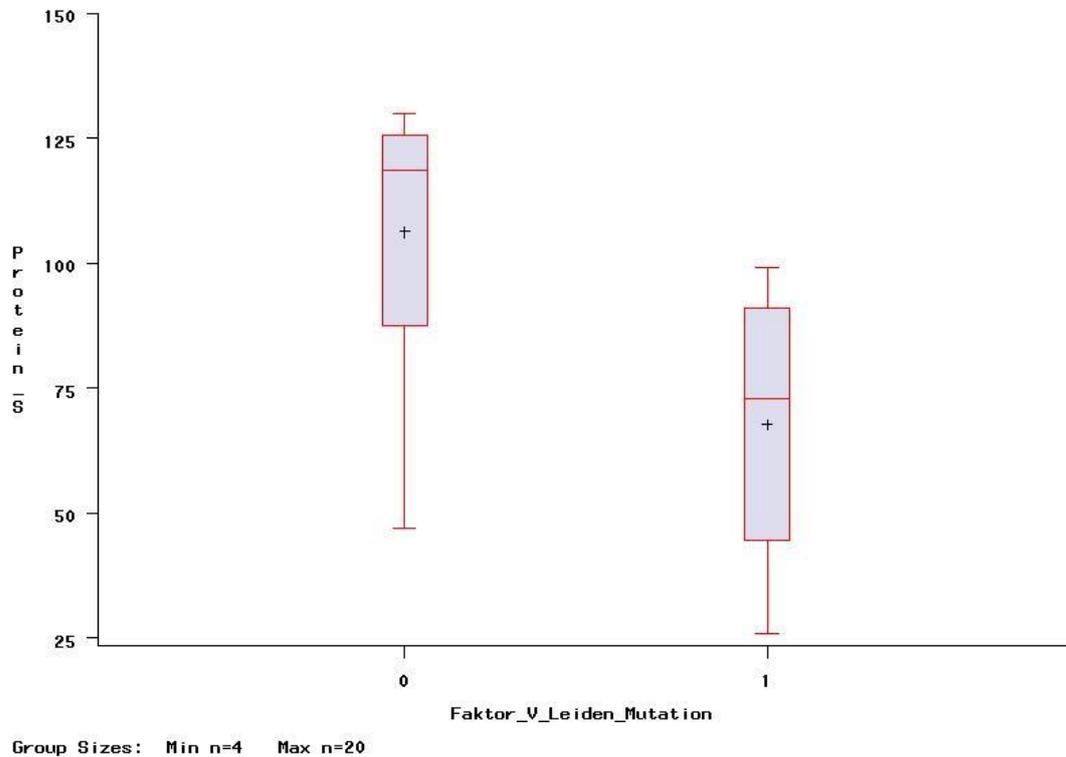


Abb. 14: Protein S-Verteilung bei Patienten mit pAVK (n=24) als box and whisker Darstellung.

Beide plots zeigen keine Überlappung, Patienten mit vorhandener Faktor V Leiden Mutation (box mit 1 gekennzeichnet) zeigen tendenziell niedrigere Protein S-Werte, die Gesamtverteilung weist ein deutlich tieferes Niveau aller Lageparameter (Minimum, Maximum, Mittelwert, Median, 1. und 3. Quartil) auf. Aufgrund der geringen Patientenzahl (n=4) ist nicht zu sagen, ob dieser Effekt systematisch oder zufällig ist, jedoch ist er in der Stichprobe auffallend. Die Streuung der Messwerte ist in beiden Fällen etwa gleichwertig.

4.2.4 Resistenz gegen aktiviertes Protein C (aPCR)

Bei Gesunden wird eine Ratio über 2,0 gefunden, eine Ratio zwischen 1,3 und 2,0 bei heterozygoten Defekträgern, eine Ratio unter 1,3 bei homozygoten Trägern.

In unserer Studie fanden wir bei allen heterozygoten Faktor V Leiden-Trägern eine aPC Ratio unter 2,0.

Bei einem Patienten liegt aufgrund eines Abnahmefehlers kein Wert vor. Als Mittelwert bei Patienten mit pAVK (n=27) ermittelten wir eine Ratio von 2,3, Median 2,4, Standardabweichung 0,29.

Abb. 15: aPC-Resistenz

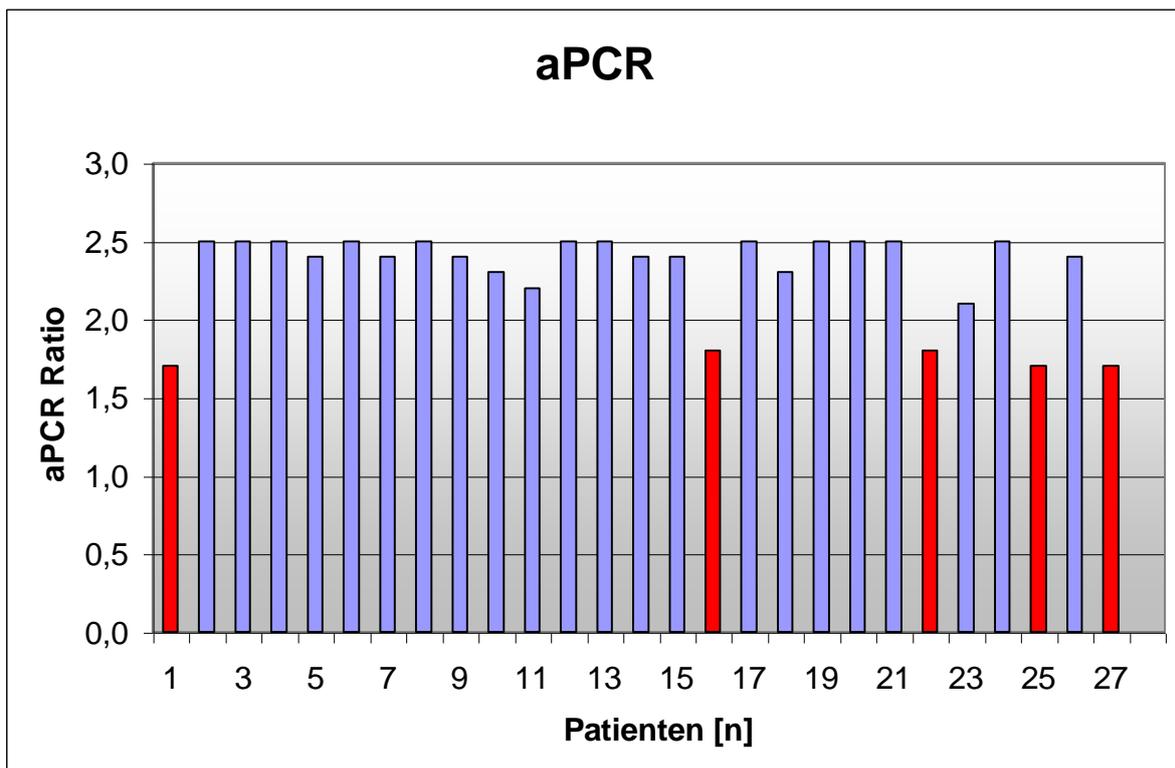


Abb. 15: Darstellung der aPC-Resistenz bei Patienten mit pAVK (n=27), Ratio ausserhalb des Referenzbereiches sind rot dargestellt.

4.2.5 Faktor V Leiden Mutation

Wir konnten bei 5 Patienten mit pAVK (n=28) eine heterozygote Faktor V Leiden Mutation nachweisen, dies entspricht einer prozentualen Verteilung von 18%, homozygote Defekträger fanden wir nicht.

Abb. 16: Faktor V Leiden Mutation

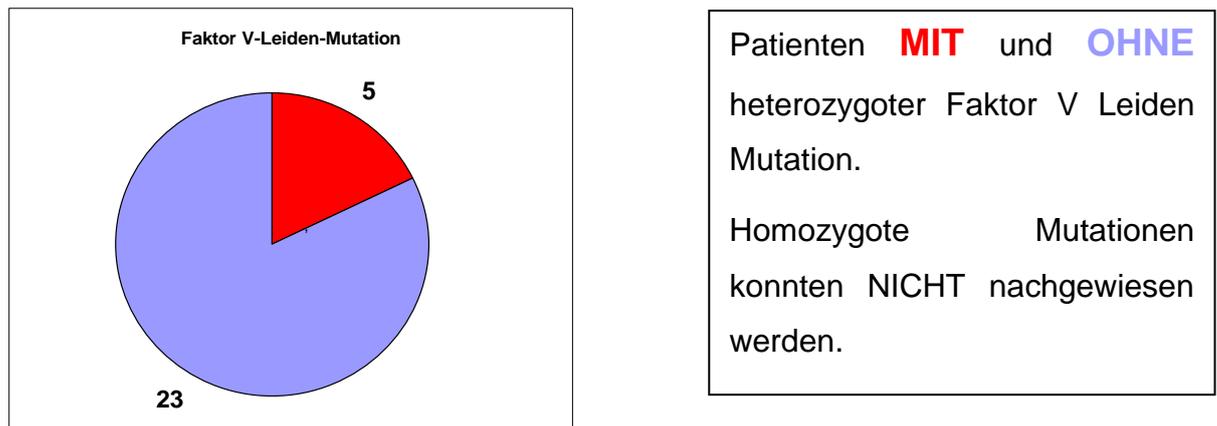


Abb. 16: Darstellung der Faktor V Leiden Mutation bei Patienten mit pAVK. Bei 5 Probanden (n=5) konnte eine heterozygote Faktor V Leiden Mutation nachgewiesen werden.

4.2.6 Prothrombin Polymorphismus

Bei den untersuchten Patienten mit pAVK (n=28) konnte kein Prothrombin Polymorphismus nachgewiesen werden.

4.2.7 TAFI (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor)

Bei einem Patienten konnte aufgrund eines Abnahmefehlers die TAFI-Bestimmung nicht durchgeführt werden.

In unserem Patientenkollektiv (n=27) fanden sich ausschließlich TAFI-Aktivitäten innerhalb der Variationsbreite der gesunden untersuchten Population, (Variationsbreite Gesunder 41-259%).

Abb. 17: TAFI

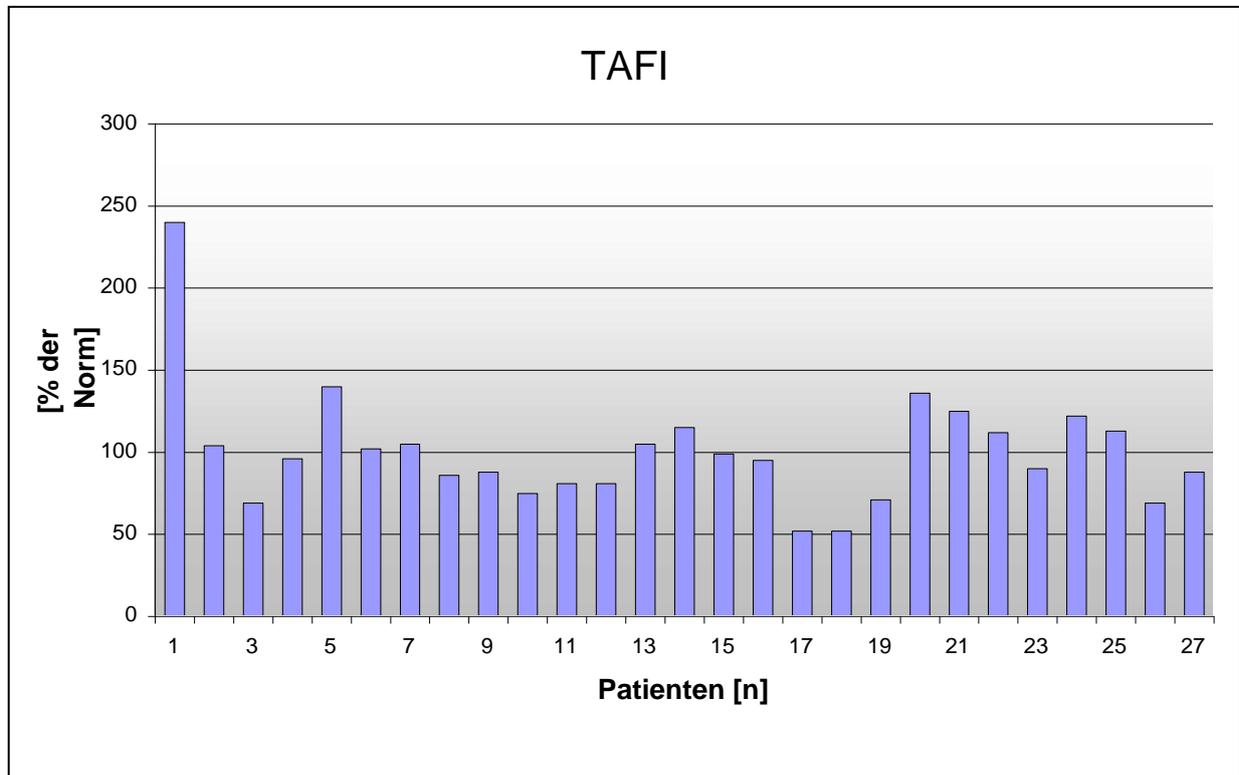


Abb. 17: Darstellung TAFI bei Patienten mit pAVK (n=27), alle untersuchten TAFI-Aktivitäten lagen innerhalb der Variationsbreite gesunder Untersucher.

4.2.8 Protein Z

3 Patienten standen unter Therapie mit Vitamin K-Antagonisten, die Bestimmungen konnten nicht verwertet werden.

Bei einem Patienten konnte PZ aufgrund eines Abnahmefehlers nicht bestimmt werden.

Protein Z-Werte unter 1000 µg/l gelten als pathologisch.

Protein Z-Werte einer gesunden Kontrollgruppe (n=128, 71 Frauen, 57 Männer, Durchschnittsalter von 28+/- 6 Jahren), die in Zusammenarbeit des hämostaseologischen Labors der Medizinischen Klinik der Justus-Liebig-Universität Gießen und der angiologischen Abteilung der Medizinischen Klinik der Justus-

Liebig-Universität Gießen ermittelt wurden, lieferten folgende statistischen Parameter: Mittelwert 1664 $\mu\text{g/l}$, Standardabweichung 591,6, Median 1671 $\mu\text{g/l}$.

Der PZ-Mittelwert bei unseren Patienten mit pAVK (n=24) betrug 1557,78 $\mu\text{g/l}$, Median 1520,2 $\mu\text{g/l}$, Standardabweichung 721,21.

Abb. 18: Protein Z

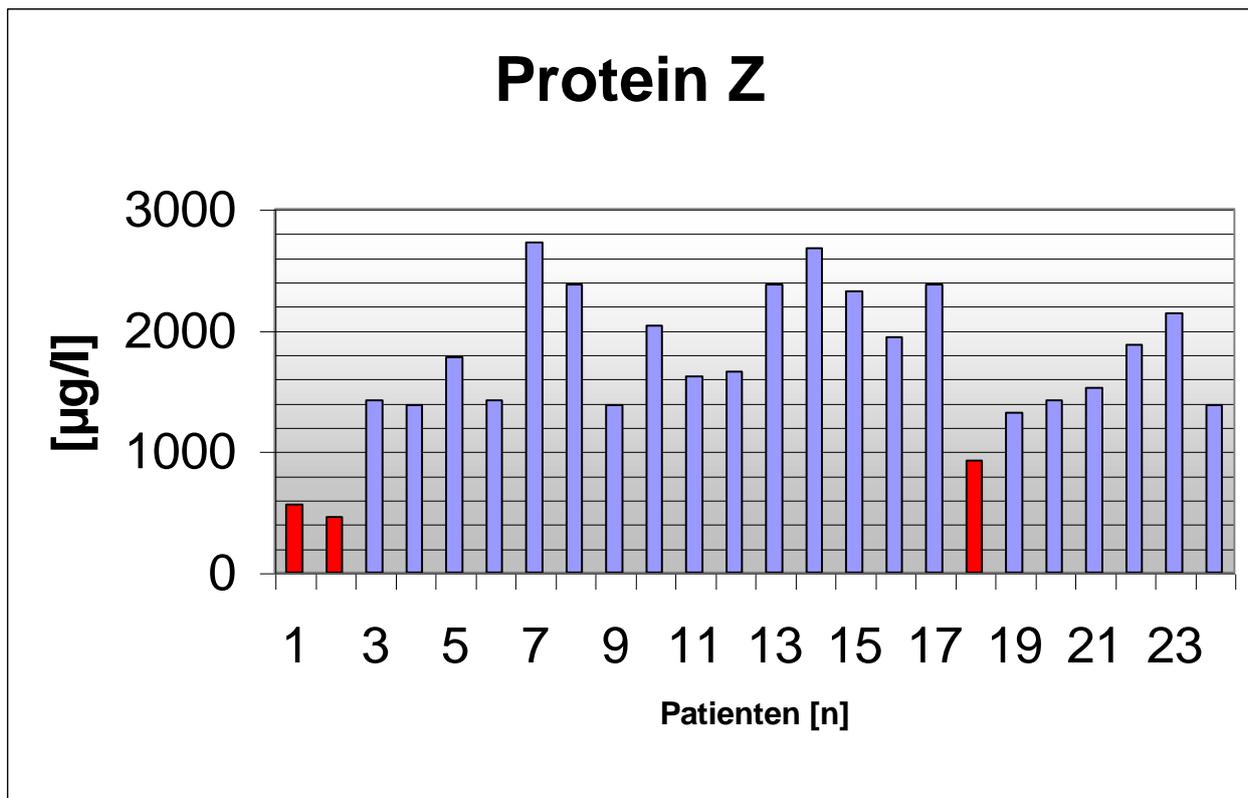


Abb. 18: Darstellung Protein Z bei Patienten mit pAVK (n=24), Messwerte <1000 $\mu\text{g/l}$ sind rot dargestellt.

Abb. 19: Protein Z-Werte bei nachgewiesener Faktor V Leiden Mutation als box and whisker plot

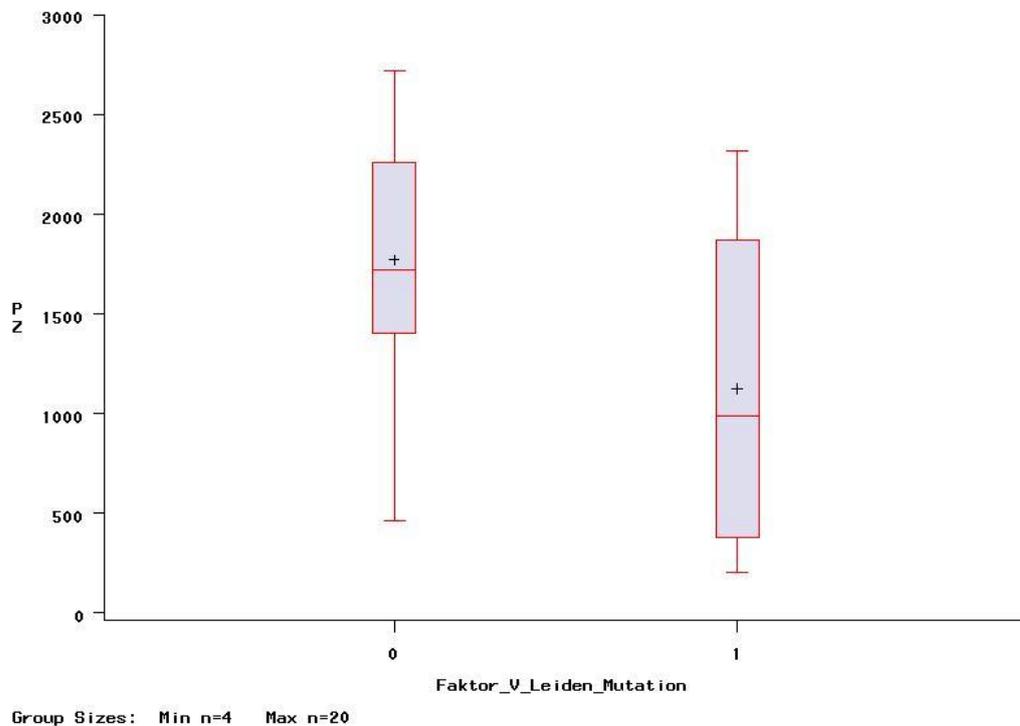


Abb.19: Protein Z als Box and Whisker Darstellung bei Patienten mit pAVK (n=24).

75% der Patienten mit positiver Faktor V Leiden Mutation (box mit 1 gekennzeichnet) haben Protein Z-Plasmaspiegel unter 2000 µg/l. Die gesamte Verteilung schiebt sich nach unten über sämtliche Lageparameter (Median, Mittelwert, 1. und 3. Quartil, Minimum, Maximum).

Bei Patienten ohne Faktor V Leiden Mutation (ohne Mutation=0) sind 75% der gemessenen Konzentrationen kleiner als 2500 µg/dl.

5 Diskussion

Arteriosklerose geht einher mit Aktivierung von Thrombozyten und plasmatischer Gerinnung, sowie einem erhöhten Fibrin-Turnover [Libby et al.,2000; Holvoet et al.,1997; Drouet et al.,1998; Sueishi et al.,1998; FitzGerald et al.,1997; Koenig et al.,2001].

Klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren sind Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie, Hypercholesterinämie, Hyperhomocysteinämie und konnten auch bei Patienten mit pAVK gehäuft nachgewiesen werden (Abb.: 5-8).

In den letzten Jahren beschäftigten sich Arbeitsgruppen vermehrt mit der Fragestellung, ob zwischen venösen thromboembolischen Erkrankungen und arteriellen Ereignissen gemeinsame Ursachen oder Verbindungen bestehen.

Unsere Studie hat 2003 erstmals die Frage gestellt, ob Risikofaktoren venöser thromboembolischer Erkrankungen, wie Faktor V Leiden Mutation, Verminderung der Proteine C, S, Z, Antithrombin-Mangel und Prothrombin Polymorphismus auch bei Patienten mit arteriosklerotischen Erkrankungen Einfluss haben [Düber et al.,2003].

5.1 Einfluss von Thrombophilie-Risikofaktoren bei Arteriosklerose

Unsere Hypothese, dass Faktor V Leiden auch bei Patienten mit arteriosklerotischen Erkrankungen eine Rolle spielt, basiert auf der hohen Prävalenz der Mutation bei den untersuchten Patienten. Immerhin konnten wir in 5 Fällen eine heterozygote Faktor V Leiden Mutation feststellen, dies entspricht 18%.

Andere Thrombophilie-Risikofaktoren, wie Verminderung der Proteine C und S, Antithrombinmangel, sowie Prothrombin Polymorphismus (G20210A) konnten nicht vermehrt nachgewiesen werden und scheinen vermutlich keine Rolle bei den arteriosklerotischen Erkrankungen zu spielen.

Eine Studie aus dem Jahre 2006 untersuchte den Einfluss genetischer Mutationen (Prothrombin Polymorphismus (G20210A), Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) Polymorphismus und Faktor V Leiden) auf die Pathogenese arterieller Thrombosen. Signifikante Auffälligkeiten ergaben sich lediglich für Faktor V Leiden Mutationen (odds ratio 7.11; 95% Konfidenzintervall: 1.55-32.73) [De Paula et al., 2006].

Foley PW et al. konnten in ihrer Arbeit an 45 Patienten mit pAVK eine Faktor V Leiden Mutation -Häufigkeit von 17,8 % nachweisen, verglichen mit der britischen Normalbevölkerung (Prävalenz Faktor V Leiden Mutation etwa 3,5%) [Foley et al., 1997].

Gurlertop HY et al., untersuchten den Zusammenhang zwischen Faktor V Leiden Mutation und koronarer Herzkrankheit (KHK) in der nordöstlichen Türkei. 78 Patienten mit und ohne angiographisch gesicherter KHK wurden auf Faktor V Leiden gescreent. Bei 10% der Patienten mit KHK wurde die Mutation nachgewiesen, kein Defekt wurde in der gesunden Kontrollgruppe gefunden. Somit kam die Untersuchung zu dem Ergebnis, dass Faktor V Leiden Mutation ein wichtiger Risikofaktor bei KHK ist [Gurlertop et al., 2007].

Bei Faktor V Leiden Mutations-Träger scheinen sich Antithrombin-Konzentrationen auf einen kleineren Verteilungsbereich zu beschränken (vgl. Abb.10). Ebenso scheinen Protein S-Werte bei positiver Faktor V Leiden Mutation tendenziell niedriger zu sein (vgl.: Abb.14). Ob dieser Effekt systemisch oder zufällig ist, lässt sich an unseren Daten nicht sagen, allerdings ist er in der Stichprobe auffallend. Die Bedeutung von Faktor V Leiden für die Ätiologie oder Progredienz der pAVK lässt sich anhand unserer Datenlage nicht beurteilen, jedoch ist in unserer Stichprobe die Häufigkeit der Mutation auffallend und somit sicherlich auch zukünftig Gegenstand weiterer Studien.

5.2 Protein Z und Arteriosklerose

Wir haben 2003 darüber hinaus die Protein Z-Plasmaspiegel unserer Patienten bestimmt.

In der Vergangenheit wurde in Studien die PZ-Expression in Gefäßsegmenten von Patienten mit arteriosklerotischen Veränderungen (mit und ohne den Risikofaktor

Diabetes mellitus) untersucht und festgestellt, dass mikrovaskuläre Endothelzellen, im massiv vergrößerten Subendothelialraum arteriosklerotischer Gefäße, PZ exprimierten, während bei Kontrollgefäßen keine PZ-Expression in der Intima nachweisbar war [Greten et al.,1998].

Fedi et al. bestimmten bei Patienten mit akutem koronarem Syndrom die PZ-Plasmaspiegel, verglichen diese mit einer gesunden Kontrollgruppe und fanden heraus, dass der PZ-Mittelwert bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom niedriger war, als bei der Kontrollgruppe. Sie schlussfolgerten, dass PZ eine Rolle bei arteriellen Thrombosen spielt [Fedi et al.,2003].

Sofi et al. bestimmten PZ-Plasmaspiegel bei Patienten mit klinisch gesicherter pAVK. Beim Vergleich mit der Kontrollgruppe fanden sie bei Patienten mit pAVK signifikante PZ-Verminderungen [Sofi et al.,2007].

Die physiologische Funktion von PZ ist nicht hinreichend geklärt, bezogen auf die Arbeit von Kemkes-Matthes et al. scheinen erniedrigte PZ-Plasmaspiegel mit Blutungsereignissen unklarer Genese einherzugehen. Weitere Studien assoziierten verminderte PZ-Werte mit thromboembolischen Komplikationen [Kemkes-Matthes et al.,2000; Yin et al.,1999].

Matthes et al. konnten später in ersten Untersuchungen am Menschen zeigen, dass PZ-Plasmavermindierungen eine wesentliche Rolle bei Thrombophiliepatienten spielen, da die PZ-Verminderung mit einem frühzeitigem Auftreten thromboembolischer Erkrankungen bei Faktor V Leiden-Trägern korreliert.

Genetische Veränderungen der Protein Z-Struktur wurden nachgewiesen und führten, im Zusammenhang mit Faktor V Leiden Mutationen, zu einem gehäuften Auftreten thromboembolischer Ereignisse [Kemkes-Matthes et al.,2004].

Sofi et al. untersuchten in ihrer Arbeit das Protein Z-ZPI-System bei Patienten mit klinischen Symptomen der peripheren arteriellen Verschlusskrankung.

95 Patienten (73 Männer, 22 Frauen), durchschnittliches Lebensalter von 73 Jahren, mit Symptomen oder Anzeichen einer pAVK. Im Gegensatz zu unserer Studie wurden Patienten mit Faktor V Leiden Mutation ausgeschlossen. PZ-Antigen, ZPI-Antigen und ZPI-Aktivität wurden mittels statistischer Berechnung

normalisiert, mit der Annahme, dass die mittleren Werte von PZ/ZPI der gesunden Kontrollgruppe 100% betragen.

PZ-Antigen, ZPI-Antigen und ZPI-Aktivität waren signifikant erniedrigt bei arterieller Verschlusskrankung [PZ-Antigen 72,5% (3,8-123,7%); ZPI-Antigen 86,1% (25,1-149,5%); ZPI-Aktivität 83,5% (21,1-135,2%)], verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe [PZ-Antigen 90,7% (32,1-203,2%); ZPI-Antigen 93,2% (48,9-171,3%); ZPI-Aktivität 97,2% (50,5-175,5%)].

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen PZ und ZPI-Antigen und AVK zu untersuchen, wurde die gesamte Studienpopulation in Tertile unterteilt. Ein erhöhtes Risiko für arterielle Verschlusskrankungen wurde bei Patienten im unteren Tertilbereich nachgewiesen [Sofi et al., 2009].

Wir konnten 2003 bei 12% der untersuchten Patienten mit nachgewiesener pAVK PZ-Werte unter 1000 µg/l nachweisen und haben erstmalig den Verdacht geäußert, dass erniedrigte PZ-Plasmaspiegel auch bei den arteriosklerotischen Erkrankungen eine Rolle spielen.

Betrachtet man die PZ-Verteilung unserer Patienten als box and whisker Darstellung (Abb.:19), so findet man bei Faktor V Leiden-Träger scheinbar niedrigere PZ-Werte.

In einem Fall fanden wir eine heterozygote Faktor V Leiden Mutation und einen zusätzlichen PZ-Mangel (560 µg/l). Die Patientin fiel durch einen besonders klinisch dramatischen Verlauf der arteriosklerotischen Erkrankung auf, mit wiederholt auftretenden thromboembolischen Ereignissen.

Basierend auf die Ergebnisse von Kemkes-Matthes et al. könnte vermutet werden, dass bei bestehender Faktor V Leiden Mutation der Phänotyp durch PZ-Mangel beeinflusst wird und somit das klinische Bild mitbestimmt.

Sofi und Mitarbeiter haben die Assoziation zwischen PZ-ZPI-Parametern und dem klinischen Ausprägungsgrad der AVK untersucht. Mit sinkenden PZ-ZPI-Spiegeln zeigten sich signifikante Hinweise auf eine zunehmende klinische Ausprägung der AVK (definiert nach der Stadieneinteilung nach Fontaine) [Sofi et al.,2009].

Im Gegensatz zu unserer Arbeit wurden in dieser Studie Faktor V Leiden Mutationen ausgeschlossen. Die Ergebnisse von Sofi implizieren folglich, dass Veränderungen des PZ-ZPI-Systems, scheinbar unabhängig von anderen

Thrombophilie-Risikofaktoren, maßgeblich mit arteriosklerotischen Veränderungen in Zusammenhang zu bringen sind.

Es ist denkbar, dass PZ-und auch ZPI-Mangel die Progression arteriosklerotischer Gefäßveränderungen fördern, da mikrovaskuläre Endothelzellen, im vergrößerten Subendothelialraum arteriosklerotischer Gefäße, PZ exprimieren [Greten et al.,1998].

Prospektive Studien, die den Einfluss verminderter PZ-und ZPI-Werte auf thrombotische Komplikationen bei der Arteriosklerose untersuchten, lieferten bisher keinen statistisch signifikanten Zusammenhang [Morange et al,2004; Refaai et al.,2006].

Bei Patienten mit ausgedehnten arteriosklerotischen Gefäßveränderungen, könnte eine PZ-oder auch ZPI-Verminderung, als Folge persistierender Koagulation, erworben werden

[De Buyzere et al.,1993; Reininger et al.,1996].

Andere Studienergebnisse zeigten eine positive Korrelation zwischen PZ und bestimmter Cytokine im Rahmen entzündlicher Prozesse [Fedi et al.,2003; Cesari et al.,2007; Ramsay et al.,2005].

McQuillan et al. demonstrierten in ihrer Arbeit, dass erhöhte PZ-Werte während der Akutphase von Schlaganfällen auftreten, jedoch in der Rekonvaleszenzphase (nach etwa 3 Monaten) keine signifikante PZ-Erhöhung, verglichen mit einer randomisierten Kontrollgruppe, nachweisbar war [McQuillan et al.,2003].

Da es sich bei der pAVK um einen chronisch progredient verlaufenden Prozess handelt und, im Gegensatz zu den akuten bzw. subakuten entzündlichen Veränderungen, andere Cytokine und Entzündungsmediatoren von Bedeutung sind, ist PZ vermutlich von den jeweils vorrangig beteiligten Mediatoren abhängig.

Die kontroversen Studienergebnisse über den Einfluss von PZ auf die Entstehung thromboembolischer Erkrankungen zeigen, dass die Rolle von PZ noch unzureichend geklärt ist.

Genetische Faktoren scheinen eine wesentliche Determinante darzustellen, die unter anderem auch die breite Verteilung innerhalb der Normalpopulation erklärt [Vasse et al.,2002].

Somit wäre auch denkbar, dass einige Polymorphismen (G79A GG Genotyp) protektiv wirkend gegenüber Schlaganfällen sind [Staton et al.,2005] und in Zusammenhang mit PZ-Plasmaspiegeln stehen; Träger der seltenen G79A-Variante scheinen erniedrigte PZ-Werte zu haben [Santacroce et al.,2004].

5.3 Verbindung zwischen arteriellen und thromboembolischen Erkrankungen

Klassische Risikofaktoren venöser thromboembolischer Komplikationen sind maligne Erkrankungen, postoperative Zustände, Immobilität, Frakturen, Schwangerschaft und Östrogene [Prandoni et al.,1999; Kearon et al.,2000; Heit et al.,2002].

Darüber hinaus spielen angeborene und erworbene Defekte des Gerinnungssystems eine große Rolle bei der Entstehung venöser thromboembolischer Erkrankungen [Prandoni et al.;1999; Kearon et al.,2000; Heit et al, 2002; Bauer et al., 2001; Lensing et al.,1999].

Bezüglich der Kopplung von arteriellen und venösen Thrombose Risiko finden sich in der Literatur Hinweise, dass Lebensalter, periphere arterielle Verschlusskrankung, Hyperlipidämie und arterielle Hypertonie mit einem erhöhten Risiko venöser thromboembolischer Erkrankungen vergesellschaftet sind [Anderson et al.,1991; Nordstrom et al.,1992; Cogo et al.,1994; Libertiny et al.,1999; Goldhaber et al.,1997; Vaya et al.,2002].

In diesem Zusammenhang sind Ergebnisse neuerer Studien interessant, die zeigen konnten, dass durch medikamentöse Anwendung von Statinen das Risiko venöser thromboembolischer Komplikationen gesenkt werden konnte [Ray et al.,2001; Grady et al.,2000].

2003 untersuchten Prandoni und Mitarbeiter sonographisch die Karotiden von 299 Patienten mit bekannter tiefer Beinvenenthrombose. Die Probanden zeigten keine klinische Symptomatik arteriosklerotischer Erkrankungen. Die Ergebnisse wurden mit 150 Kontrollprobanden verglichen.

Dabei wurden Patienten mit sekundären Thrombosen (Nachweis von malignen Erkrankungen, operativen Eingriffen, Immobilität, Frakturen, Schwangerschaft und Östrogensubstitution) von primären Thrombosen (alle anderen) unterschieden.

47,1% der Patienten mit primären Thrombosen (95% Konfidenzintervall: 39,1-55,0), 27,4% der Patienten mit sekundären Thrombosen (95% Konfidenzintervall, 20,2-34,6) und 32,0% der Kontrollprobanden (95% Konfidenzintervall 24,5-39,5) wiesen sonographisch zumindest einen arteriosklerotischen Gefäßplaque der Karotiden auf.

Patienten mit primären Thrombosen hatten ein deutlich höheres Risiko für arteriosklerotische Wandveränderungen der Karotiden, als Patienten mit sekundären Thrombosen und der Kontrollgruppe.

Die Studie kam zum dem Ergebnis, dass Arteriosklerose venöse Thrombembolien verursacht, oder zumindest beide Erkrankungen gemeinsame Risikofaktoren aufweisen. [Prandoni et al.,2003].

Toft Sörensen et al. untersuchten in einer Kohortenstudie die Risiken eines Myokardinfarktes und apoplektischen Insultes bei Patienten mit bekannter tiefer Beinvenenthrombose, Lungenembolie und gesunden Probanden.

Patienten mit tiefer Beinvenenthrombose hatten ein relatives Risiko von 1,60 einen Myokardinfarkt zu erleiden (95% Konfidenzintervall 1,35-1,91), das relative Risiko für einen Apoplex lag bei 2,19 (95% Konfidenzintervall 1,85-2,60), im ersten Jahr nach dem thrombotischen Ereignis. Patienten mit Lungenembolie wiesen im ersten Jahr ein relatives Risiko von 2,60 (95% Konfidenzintervall 2,14-3,14) für einen Myokardinfarkt und 2,93 (95% Konfidenzintervall 2,34-3,66) für einen Apoplex auf.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Prandoni zeigen die Daten von Sörensen nicht nur ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse bei primären Thrombosen, sondern auch bei den sekundären venösen thromboembolischen Geschehen im Rahmen von Schwangerschaft, operativen Eingriffen oder anderen prädisponierenden Bedingungen. (Östrogensubstitutionstherapie und orale Antikonzeption wurden nicht eingeschlossen, im Gegensatz zu der Studie von Prandoni).

Beide Ergebnisse zeigen, dass aller Wahrscheinlichkeit nach Verbindungen zwischen venösen thromboembolischen Erkrankungen und arteriellen Thrombosen bestehen [Sörensen et al.,2007].

Der zugrunde liegende Mechanismus bleibt nach wie vor unklar, basierend auf den Ergebnissen von Toft Sörensen et al. scheint es nicht plausibel, dass venöse thromboembolische Erkrankungen alleine kardiovaskuläre Ereignisse, wie Myokardinfarkt oder Apoplex, verursachen. Allerdings könnte die Verbindung in gemeinsamen Risikofaktoren, der Ätiologie oder in Beidem zu finden sein [Goon et al.,2006].

Unsere Daten lassen vermuten, dass Faktor V Leiden Mutationen gehäuft bei Patienten mit pAVK nachweisbar sind und eventuell in der Ätiologie oder Progredienz der Erkrankung von Bedeutung sein könnten, während Veränderungen anderer Thrombophilie-Risikofaktoren nicht beobachtet werden konnten.

Die Hypothese, dass zwischen arteriellen und venösen Komplikationen gemeinsame Vernetzungen bestehen, bietet neue Richtungen für weitere Forschungen, die sowohl das pathophysiologische Verständnis, wie auch die therapeutischen Behandlungsmöglichkeiten, erweitern könnten.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Lange Zeit wurde in der Literatur postuliert, dass für die Entstehung venöser thromboembolischer Erkrankungen und arterieller Ereignisse unterschiedliche Ursachen vorliegen und somit beide Erkrankungen voneinander zu trennen sind.

In den letzten Jahren wurde diese Hypothese zunehmend hinterfragt und Studien beschäftigten sich mit der Frage, ob beide Erkrankungen gemeinsame Risikofaktoren oder ätiologische Gemeinsamkeiten haben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben wir im Jahre 2003 Patienten mit pAVK auf kardiovaskuläre und venöse Thrombophilie-Risikofaktoren untersucht und erstmalig die Hypothese aufgestellt, dass Thrombophilie-Risikofaktoren auch bei arteriosklerotischen Erkrankungen eine Rolle spielen könnten [Düber et al.,2003].

Neben den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren der Arteriosklerose (Diabetes mellitus, Dyslipidämie) konnten wir die heterozygote Faktor V Leiden Mutation bei unseren Patienten nachweisen. Andere Thrombophilie-Risikofaktoren, wie Verminderung der Proteine C und S, Antithrombinmangel, sowie Prothrombin Polymorphismus (G20210A) konnten nicht nachgewiesen werden.

Nachfolgende Studien lieferten kontroverse Ergebnisse bezüglich des Einflusses von Thrombophilie-Risikofaktoren bei arteriosklerotischen Komplikationen.

Die Studie von Prandoni konnte 2003 zeigen, dass Arteriosklerose venöse thromboembolische Komplikationen verursachen kann, oder dass bei beiden Erkrankungen gemeinsame Risikofaktoren vorliegen.

Basierend auf diesen Ergebnissen könnten sich daraus neue Therapieprinzipien bei der Behandlung thrombotischer Erkrankungen ergeben, so gibt es erste Hinweise, dass der Einsatz von Statinen protektiv wirksam gegen venöse Thrombembolien ist [Ray et al.,2001].

Aktuell laufen weitere Studien, die den Einsatz von Acetylsalicylsäure bei der Sekundärprävention thromboembolischer Erkrankungen untersuchen. Andere Arbeiten beschäftigen sich aktuell mit der Frage, ob bereits bestehende PZ/ZPI-Verminderungen arteriosklerotische Erkrankungen verursachen, oder deren Progression beeinflussen.

Die Assoziation zwischen venösen und arteriellen Thrombembolien könnte in Zukunft klinische Relevanz erlangen und zu neuen Behandlungsstrategien führen.

7. Abstract

Objective

The aim of our study was to find out, whether “venous” thrombophilic risk factors such as Factor V Leiden mutation, protein C-, protein S- and antithrombin deficiency as well as Prothrombin polymorphism and increased plasma levels of homocysteine or lipoprotein (a) also play a role in peripheral arterial occlusive disease.

Patients

In total, 28 patients (10 female, 18 male, average age 67 ± 12 years) were examined.

All patients were suffering from peripheral arterial occlusive disease stadium IIa/IIb.

3 / 28 patients were under oral anticoagulant treatment.

Methods

In addition to routine tests, the following parameters were measured: HbA1C, lipoprotein (a), homocysteine, antithrombin, aPC ratio, proteins C, S and Z, Factor V Leiden Mutation and Prothrombin polymorphism (G20210A).

Results

1. 21 / 28 patients presented with increased HbA1C levels.
2. Elevation of lipoprotein (a) up to 133 mg/dl was detected in 8 / 28 patients.
3. 5 / 28 patients (18%) presented with heterozygous Factor V Leiden mutation. One out of those patients additionally had diminished protein Z level (560 $\mu\text{g/l}$).
4. Elevated homocysteine plasma levels (15 $\mu\text{mol/l}$) were found in 4 / 28 patients.

5. In 1 / 25 patients diminution of protein C (64 % of normal), in another patient diminution of protein S (47 % of normal) was detected.
6. Antithrombin deficiency and Prothrombin polymorphism were excluded in all patients examined.

Conclusion

Beside well known risk factors of arterial occlusive disease like elevations of HbA1C and lipoprotein (a), Factor V Leiden mutation was frequently found in our patients - indicating, that Factor V Leiden mutation is a risk factor not only for venous, but also for arterial thrombotic complications. Other "venous" thromboembolic risk factors like protein C-, protein S- or antithrombin-deficiency as well as Prothrombin polymorphism do not seem to play an important role in arterial occlusive disease.

8. Abstract

Einleitung

Ziel der vorliegenden Studie war es herauszufinden, ob Risikofaktoren venöser thromboembolischer Erkrankungen, wie Faktor V Leiden Mutation, Verminderung der Proteine C und S, Antithrombinmangel, sowie Prothrombin Polymorphismus (G20210A) und erhöhte Homocystein und Lipoproteinwerte auch bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankung eine Rolle spielen.

Patienten

Untersucht wurden 28 Patienten (10 Frauen, 18 Männer, Durchschnittsalter 67 ± 12 Jahre). Alle litten an einer gesicherten peripheren arteriellen Verschlusskrankung Stadium IIa/IIb.

3 / 28 Patienten standen zur Zeit der Blutentnahme unter oraler Antikoagulation.

Methode

Neben Routineparametern wurden folgende Bestimmungen durchgeführt: HbA1c, Lipoprotein (a), Homocystein, Antithrombin, aPC Ratio, Proteine C, S und Z, Faktor V Leiden Mutation und Prothrombin Polymorphismus (G20210A).

Ergebnisse

1. 21 / 28 Patienten hatten erhöhte HbA1c-Werte.
2. 8 / 28 Patienten hatten erhöhte Lipoprotein (a)-Plasmaspiegel.
3. 5 / 28 Patienten (18%) hatten eine heterozygote Faktor V Leiden Mutation, darunter wies ein Patient einen zusätzlichen Protein Z-Mangel ($560 \mu\text{g/l}$) auf.
4. Erhöhte Homocystein-Plasmaspiegel ($>15 \mu\text{mol/l}$) wurden bei 4 / 28 Patienten gefunden.
5. Ein Patient hatte eine Protein C-Verminderung (64% der Norm), ein weiterer eine Protein S-Verminderung (47% der Norm).

6. Antithrombinmangel und Prothrombin Polymorphismus konnten bei allen Untersuchten ausgeschlossen werden.

Zusammenfassung

Neben bekannten Risikofaktoren der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, wie erhöhte HbA1c-Werte und Lipoprotein-Plasmaspiegel fanden wir bei 18 % der Patienten eine Faktor V Leiden Mutation. Dies könnte ein Hinweis sein, dass Faktor V Leiden Mutationen nicht nur bei den venösen thromboembolischen Erkrankungen, sondern auch bei den arteriellen Verschlusskrankungen relevant sind.

Weitere venöse thromboembolische Risikofaktoren wie Protein C-; S und Antithrombinmangel, sowie Prothrombin Polymorphismus (G20210A) konnten nicht nachgewiesen werden.

Präsentation der Promotionsergebnisse:

2003 Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung Basel

2003 Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin Wiesbaden

2004 Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung Hamburg

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung des Gerinnungsablaufes (Copyright: Boehringer Ingelheim, 2009)	6
Abb. 2: Protein Z (PZ) und Protein Z-abhängiger Protease Inhibitor (ZPI)	18
Abb. 3: Patienten mit pAVK (n=28), Altersverteilung	24
Abb. 4: Allgemeine Darstellung der Box and Whisker plot Präsentation	34
Abb. 5: Darstellung der HbA1c-Werte	35
Abb. 6: Darstellung der Homocysteinwerte	36
Abb. 7: Darstellung Lipoprotein (a)	37
Abb. 8: Darstellung Cholesterin	38
Abb. 9: Darstellung Antithrombin (AT)	39
Abb. 10: Ergebnisse AT	39
Abb. 11: Darstellung Protein C	41
Abb. 12: Protein C	42
Abb. 13: Darstellung Protein S	43
Abb. 14: Protein S-Verteilung	44
Abb. 15: Darstellung der aPC-Resistenz	45
Abb. 16: Darstellung der Faktor V Leiden Mutation	46
Abb. 17: Darstellung TAFI	47
Abb. 18: Darstellung Protein Z	48
Abb. 19: Protein Z als Box and Whisker Darstellung	49

Literaturverzeichnis

AGENO, W., BECATTINI, C., BRIGHTON, T., SELBY, R., KAMPHUISEN, P.W.

Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism- a meta-analysis-
Circulation. 2008; 117:93-102

AGNELLI, G., BECATTINI, C.

Venous thromboembolism and atherosclerosis: common denominators or different
diseases?

J Thromb Haemost. 2006; 4:1886-1890

ANDERSON, F.A. JR., WHEELER, H.B., GOLDBERG, R.J., HOSMER, D.W.,
PATWARDHAN, N.A., JOVANOVIC, B., FORCIER, A., DALEN J.E.

A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of
deep vein thrombosis and pulmonary embolism: the Worcester DVT Study.

Arch Intern Med. 1991; 151:933-938

ANTOVIC, J.P, BLOMBACK, M.

Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor antigen and TAFI activity in patients with
APC resistance caused by factor V Leiden mutation.

Thromb Res. 2002 ; 106(1):59-62

BAUER, K.A.

The thrombophilias: well-defined risk factors with uncertain therapeutic implications.

Ann Intern Med. 2001; 135:367-373

BERG, K.

A new serum type system in man: The Lp system.

Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 1963; 59:369-382

BERTINA, R.M., KOELEMANN, B.P.C., KOSTER, T., ROSENDAAL, F.R., DIRVEN, R.J., DE RONDE, H., VAN DER VELDEN, P.A., REITSMA, P.A.

Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C.

Nature. 1994; 369; 64-67

BOERSMA, E., MERCADO, N., POLDERMANS, D., GARDIEN, M., VOS, J., SIMOONS, M.L.

Acute myocardial infarction.

Lancet. 2003; 361:847-858

BOUMA, B.N., MOSNIER, L.O.

Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) at the interface between coagulation and fibrinolysis.

Pathophysiol. Haemost. Thromb. 2003;33:375-381

BRACKMANN, H.H., SCHWAAB, R., OLDENBURG J., SCHRAMM, W.

Klinische Anwendung plasmatischer und rekombinanter Gerinnungsfaktoren

Uni-Med Verlag AG, 1. Auflage, 2003, pp 16-20

BROWN, K., LUDDINGTON, R., WILLIAMSON, D., BAKER, P., BAGLIN, T.

Risk of venous thromboembolism associated with a G to A transition at position 20210 in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene.

British Journal of Haematology. 1997; 98(4):907-909

BROZE, G.J., MILETICH, J.P.

Human Protein Z.

Journal of Clinical Investigation. 1984, 73:933-938

BÖCKER, W., DENK, H., HEITZ, P.U.

Pathologie.

Urban und Schwarzenberg, 1997; pp 437-445

CESARI, F., GORI, A.M., FEDI, S., ABBATE, R., GENSINI, G.F., SOFI, F.

Modifications of protein Z and interleukin-6 during the acute phase of coronary artery disease.

Blood. Coagul. Fibrinolysis. 2007 ;18: 85-86

CHETAILLE, P., ALESSI, M.C., KOUASSI, D., MORANGE, P.E., JUHAN-VAGUE, I.

Plasma TAFI antigen variation in healthy subjects.

Thromb. Haemost. 2000; 83:902-905

COGO, A., BERNARDI, E., PRANDONI, P., GIROLAMI, B., NOVENTA, F., SIMIONI, P., GIROLAMI, A.

Acquired risk factors for deep-vein thrombosis in symptomatic outpatients.

Arch Intern Med. 1994; 154:164-168

COLWELL, J.A., NESTO, R.W.

The platelet in diabetes: focus on prevention of ischemic events.

Diabetes Care. 2003; 26:2181-2188

CROWTHER, M.

Pathogenesis of Atherosclerosis.

Hematology. 2005; 436

DE PAULA, S., RIBEIRO, D., CARVALHO, M., CARDOSO, J., DUSSE, L.,
FERNANDES, A.

Factor V Leiden and increased risk for arterial thrombotic disease in young
Brazilian patients.

Blood Coag Fibrinol. 2006; 17(4):271-5

DEGUCHI, H., PECHENIUUK, N.M., ELIAS, D.J., AVERELL, P.M., GRIFFIN, J.H.

High-density lipoprotein deficiency and dyslipoproteinemia associated with venous
thrombosis in men.

Circulation. 2005; 112:893-899

DE BUYZERE, M., PHILIPPE, J., DUPREZ, D., BAELE, G., CLEMENT, D.L.

Coagulation system activation and increase of D-dimer levels in peripheral arterial
occlusive disease.

American Journal of Hematology. 1993; 43: 91-94

DEMPFLE, C.E.

The TAFI system. The new role of fibrinolysis.

Haemostaseologie. 2007; 4:278-281

DOGGEN, C.J.M., SMITH, N.L., LEMAITRE, R.N., HECKBERT, S.R.,
ROOSENDAAL, F.R., PSATY, B.M.

Serum lipid levels and the risk of venous thrombosis.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004; 24:1970-1975

DRAKE, T.A., MORRISEY, J.H., EDGINTON, T.S.

Selective cellular expression of tissue factor in human tissues: implications for disorders of hemostasis and thrombosis.

Am J Pathol. 1989; 134:1087-1097

DROUET, L., MAZOYER, E., BAL DIT SOLLIER, C., HAINAUD, P., RIPOLL, L.

Participation des mecanismes de la thrombose et de l'hémostase aux étapes initiales de l'athérosclérose.

Arch Mal Cœur Vaiss. 1998; 91(Special V):41-51

DUNCAN, B.B., SCHMIDT, M.I., CHAMBLESS, L.E., FOLSOM, A.R., CARPENTER, M., HEISS, G.

Fibrinogen, other putative markers of inflammation, and weight gain in middle-aged adults: the ARIC study: Atherosclerosis Risk in Communities.

Obes Res. 2000; 8:279-286

DÜBER, M., LANGER, C., GREBE, M., KEMKES-MATTHES, B., MATTHES, KJ.

Protein Z and thrombophilic risk factors in patients with arterial occlusive disease.

Annals of Hematology, Supplement 1 to Volume 82, 2003

EICHINGER, S., PECHENIUK, N.M., HRON, G., DEGUCHI, H., SCHEMPER, M., KYRLE, P.A., GRIFFIN, J.H.

High-density lipoprotein and the risk of recurrent venous thromboembolism.

Circulation. 2007; 115:1609-1614

ENGLYST, N.A., TAUBE, J.M., AITMAN, T.J., BAGLIN, T.P., BYRNE, C.D.

A novel role for CD36 in VLDL-enhanced platelet activation.

Diabetes. 2003; 52:1248-1255

FEDI, S., SOFI, F., BROGI, D., TELLINI, I., CESARI, F., SESTINI, I., GAZZINI, A., COMEGLIO, M., ABBATE, R., GENSINI, G.F.

Low protein Z plasma levels are independently associated with acute coronary syndromes.

Thromb Haemost. 2003; 90: 1173-1178.

FITZGERALD, G.A., TIGGES, J., BARRY, P., LAWSON, J.A.

Markers of platelet activation and oxidant stress in atherothrombotic disease.

Thromb Haemost. 1997; 78:280-284

FRANK, S.L., KLISAK I., SPARKES, R.S., MOHANDAS, T., TOMLINSON, J.E.,
MCLEAN, J.W., LAWN, R.M., LUSIS, A.J.

The apolipoprotein(a) gene resides on human chromosome 6q26-27, in close
proximity to the homologous gene for plasminogen.

Hum Genet. 1988 Aug; 79(4):352-356

FOLEY, P.W., IRVINE, C.D., STANDEN, G.R., MORSE, C., SMITH, F.T.,
MCGRATH, C., BAIRD, R.N., LAMONT, P.M.

Activated protein C resistance, factor V Leiden and peripheral vascular disease.

Cardiovasc Surg. 1997 Apr;5(2): 157-160

GOLDHABER, S.Z., GRODSTEIN, F., STAMPFER, M.J., MANSON, J.E.,
COLDITZ, G.A., SPEIZER, F.E., WILLETT, W.C., HENNEKENS, C.H.

A prospective study of risk factors for pulmonary embolism in woman.

JAMA.1997; 277:642-645

GOON, P.K, LIP, G.Y.

Arterial disease and venous thromboembolism: a modern paradigm?

Thromb Haemost. 2006; 96:111-112

GRADY, D., WENGER, N.K., HERRINGTON, D., KHAN, S., FURBERG, C.,
HUNNINGHAKE, D., VITTINGHOFF, E., HULLEY, S.

Postmenopausal hormone therapy increases risk for venous thromboembolic
disease: the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study.

Ann Intern Med. 2000; 132:689-696

GRETEN, H.

Innere Medizin

10.Auflage, Thieme Verlag. 2000; pp 604-608; 284-289

GRETEN, J., KREIS, I., LILIENSIEK, B., ALLENBERG, J., AMIRAL, J., ZIEGLER,
R., NAWROTH, P.P.

Localisation of protein Z in vascular lesions of patients with arteriosclerosis

Vasa.1998 Aug; 27(3):144-148

GURLERTOP, H.Y., GUNDOGDU, F., PIRIM, I., ISLAMOGLU, Y., EGERCİ, N.,
SEVIMLI, S., ERDEM, F., SENOCAK, H.

Association between factor V leiden mutation and coronary artery disease in the
northeast region of Turkey.

Blood Coagul Fibrinolysis. 2007 Dec;18 (8): 719-722

HAN, X., FIEHLER, R., BROZE, G.J. JR.

Isolation of Protein Z-dependent plasma protease inhibitor.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 August 4; 95(16): 9250–9255

HAN, X., HUANG, Z.F., FIEHLER, R., BROZE, G.J. JR.

The protein Z-dependent protease inhibitor is a serpin.

Biochemistry 1999 Aug 24; 38(34):11073-11078

HEIT, J.

Venous thromboembolism epidemiology: implications for prevention and management.

Semin Thromb Hemost. 2002; 28:Suppl 2:3-13

HEROLD G.

Innere Medizin

Verlag Arzt und Information, 2000; pp 560-565

HILLARP, A., ZOLLER, B., SVENSSON, P.J., DAHLBACK, B.

The 20210 A allele of the prothrombin gene is a common risk factor among swedish outpatients with verified deep venous thrombosis.

Thromb Haemost. 1997; 78(3):990-992

HOGG, P.J., STENFLO, J.

Interaction of vitamin-K-dependent protein Z with thrombin.

J. Biol Chem. 1991; 266:10953-10958

HOLVOET, P., COLLEN, D.

Thrombosis and atherosclerosis.

Curr Opin Lipidol. 1997; 87:320-328

ICHINOSE, A., TAKEYA, H., ESPLING, E., IWANAGA, S., KISIEL, W., DAVIE, E.W.

Amino acid sequence of human protein Z, a vitamin K-dependent plasma glycoprotein.

Biochem Biophys Res Comm. 1990; 172(3):1139-1144

KAWASAKI, T., KAMBAYASHI, J., SAKON, M.

Hyperlipidemia: a novel etiologic factor in deep vein thrombosis.

Thrombosis research. 1995; 79:147-151

KEARON, C., SALZMAN, E.W., HIRSH, J.

Epidemiology, pathogenesis, and natural history of venous thrombosis: basic principles & clinical practice.

4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Witkins, 2000:1153-78

KEMKES-MATTHES, B., MATTHES, K.J.

Protein Z, a new hemostatic factor in liver diseases.

Haemostasis. 1995; 25:312-316

KEMKES-MATTHES, B., MATTHES, K.J.

Protein Z, „die gelben Hefte“

Jg.XL, Heft 3 p. 2000; p 102,100-105

KEMKES-MATTHES, B., HAMMERMANN, H., RETTIG-GAMMLER, A.,
WOZNIAK, G., MATTHES, K.J.

Age-dependency of protein Z concentration.

Ann Hematol. 2000; 79:99

KEMKES-MATTHES, B., HAMMERMANN, H., GLANZ, H., MATTHES, K.J.

Correlation between blood loss and protein Z levels in tonsillectomy and adenotomy.

Ann Hematol. 2000; 79(I):A63

KEMKES-MATTHES, B., RETTIG-GAMMLER, A., HOERSTER, W., MATTHES, K.J.

Plasma- Protein Z-Verminderung- Perioperatives Blutungsrisiko bei kieferchirurgischen Eingriffen.

In: Scharrer I., Schramm W. (Hrsg.).

Hämophilie-Symposium 1997,Hamburg: Springer 1999; 468-70

KEMKES-MATTHES, B., WOZNIAK, G., BAUER, J., MATTHES, K.J.

Protein Z in cardia surgery.

Ann Hematol. 1998; 76:A84

KEMKES-MATTHES, B., NEES, M., KUHNEL, G., MATZDORFF, A., MATTHES, K.J.

Protein Z influences the prothrombotic phenotype in factor V Leiden patients.

Thromb Res. 2002; 106:183-185

KEMKES-MATTHES, B., MATTHES, K.J., SOURI, M., KOSEKI-KUNO, S.,

ICHINOSE, A.

R255h amino acid substitution of protein Z identified patients with factor V leiden mutation.

2004 Blackwell Publishing Ltd.

British Journal of Haematology. 2004; 128,248-252

KOENIG, W., ROTHENBACHER, D., HOFFMEISTER, A., GRIESSHAMMER, M.,
BRENNER, H.

Plasma fibrin D-dimer levels and risk of stable coronary artery disease: results of a
large case-control study.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001; 21:1701-1705

KOLDE, H.J.

Haemostasis 2nd, edition 2004, pp 2-3; 6-8; 12-15; 20-30; 42-46; 47-50

Pentapharm Ltd.,Basel/Switzerland

KYRLE, P.A., EICHINGER, S.

Deep vein thrombosis.

Lancet. 2005 ;365:1163-1174

KYRLE, P.A., MANNHALTER, C., BÉGUIN, C., STÜMPFLEN, A., HIRSCHL, M.,
WELTERMANN, A., STAIN, M., BRENNER, B., SPEISER, W., PABINGER, I.,
LECHNER, K., EICHINGER, S.

Clinical studies and thrombin generation in patients homozygous or heterozygous
for the G20210A mutation in the prothrombin gene.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998;18:1287-1291

LENSING, A.W.A, PRANDONI, P., PRINS, M.H., BULLER, H.R.

Deep-vein thrombosis.

Lancet. 1999; 353:479-85

LIBBY, P.

Multiple mechanisms of thrombosis complicating atherosclerotic plaques.

Clin Cardiol. 2000; 23:3-7

LIBBY, P., SIMON, D.I.

Thrombosis and atherosclerosis

In: Colman, R.W., Hirsh, J., Marder, V.J., Clowes, A.W., George, J.N.,

Eds. Hemostasis and thrombosis: basic principles & clinical practice. 4th ed.

Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000; 743-752

LIBERTINY, G., HANDS, L.

Deep venous thrombosis in peripheral vascular disease.

Br J Surg. 1999; 86:907-910

LOWE, G.D.O.

Arterial disease and venous thrombosis: are they related, and if so, what should we do about it?

J Thromb haemost. 2006; 4:1882-1885

MCCOLL, M.D., SATTAR, N., ELLISON, J., TAIT, R.C., WALKER, I.D.,
PACKARD, C.J., GREER, I.A.

Lipoprotein (a), cholesterol and triglycerides in woman with venous thromboembolism.

Blood Coagul Fibrinolysis. 2000; 11:225-229

MCQUILLAN, A.M., EIKELBOOM, J.W., HANKEY, G.J., BAKER, R., THOM, J.,
STATON, J., YI, Q., COLE V.

Protein Z in ischaemic stroke and its etiologic subtypes.

Stroke. 2003 Oct; 34(10):2415-2419

MILETICH, J.P., BROZE, G.J.

Human plasma protein Z antigen: Range in normal subjects and effect of warfarin
therapy.

Blood, vol. 69. 1987; 1580-1586

MISEREZ, R., JUNGI, T.W.

LPS-induced, but not interferon-gamma-procoagulant activity of suspended human
macrophages is followed by a refractory state of low procoagulant expression.

Thromb Res. 1992; 65:733

MORANGE, P.E., JUHAN-VAGUE, I.

The PRIME study group. Protein Z plasma levels are not associated with the risk of
coronary heart disease: the PRIME study.

J Thromb Haemost. 2004; 2:2050-2051

MÜLLER-BERGHAUS, G., PÖTZSCH, B.

Hämostaseologie.

Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1999

NORDSTROM, M., LINDBLAD, B., BERGQVIST, D., KJELLSTROM, T.

A prospective study of the incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population.

J Intern Med. 1992; 232:155-160

POORT, S.R., ROOSENDAAL F., REITSMA, P., BERTINA, R.M.

A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated prothrombin levels and an increase in venous thrombosis.

Blood 88.1996; 3698-3703

PRANDONI, P., BILORA, F., MARCHIORI, A., BERNARDI, E., PETROBELLI, F., LENSING, A.W.A., PRINS, M.H., GIROLAMI, A.

An association between atherosclerosis and venous thrombosis.

N Engl J Med. 2003; 348:1435-1441

PRANDONI, P., TEN CATE, J.W.

Epidemiology, risk factors, and natural history of venous thromboembolism.

In: Oudkerk, M., van Beek, E.J.R., ten Cate, J.W,

Eds. Pulmonary embolism. Berlin, Germany: Blackwell Science. 1999; 2-32

PROWSE, CV., ESNOUF, M.P.

The isolation of a new warfarin-sensitive protein from bovine plasma.

Biochem. Soc.Trans.1977; 5: 255-256

RAMSAY, J.E., STEWART, F., FRIEL, H., WALKER, I.D., GREER, I.A., MCCOLL, M.D.

Protein Z in pregnancy: exaggerated rise in obese woman.

J Thromb Haemost. 2005; 3: 2584-2586

RAVI, S., MAURON, T., LÄMMLE, B., WUILLEMIN, W.

Protein Z in healthy human individuals and in patients with a bleeding tendency.

Brit. J. Haematol. 1998; 102:1219-1223

RAY, J.G.

Hyperhomocysteinemia: no longer a consideration in the management of venous thromboembolism.

Curr Opin Pulm Med. 2008 Sep;14(5):369-373

RAY, J.G., KEARON, C., YI, Q., SHERIDAN, P., LONN, E.

Heart outcomes prevention evaluation 2 (HOPE-2) investigators.

Ann Intern Med. 2007 Jun 5; 146(11):761-767

RAY, J.G., KEARON, C., YI, Q., SHERIDAN, P., LONN, E.

Heart outcomes prevention evaluation 2 (HOPE-2) investigators, homocysteine-lowering therapy and risk for venous thromboembolism: a randomized trial.

Ann Intern Med. 2007 Jun 5; 146(11):122

RAY, J.G., MAMDANI, M., TSUYUKI, R.T., ANDERSON, D.R., YEO, E.L., LAUPACIS, A.

Use of statins and the subsequent development of deep vein thrombosis.

Arch Intern Med. 2001;161:1405-1410

REFAAI, M.A., A.H.N., C., LU, L., WU, K., BROZE, G.J. JR.

Protein Z and ZPI levels and cardiovascular events.

J Thromb Haemost. 2006; 4: 1628-1629

REININGER, C.B., GRAF, J., REININGER, A., SPANNAGI, M., STECKMEIER, B., SCHWEIBERER, L.

Increased platelet and coagulatory activity indicate ongoing thrombogenesis in peripheral arterial disease.

Thromb Res. 1996; 82: 523-532

RODGER, M.A., CARRIER, M., GERVAIS, M., ROCK, G.

Normal functional protein S activity does not exclude protein S deficiency.

Pathophysiol Haemost Thromb. 2004; 33(4):202-205

RUF, W.

The interaction of the activated factor VII with tissue factor: insight into the mechanism of cofactor-mediated activation of activated factor VII.

Blood Coag Fibrinol. 1998; 9:73-78

SANTACROCE, R., CAPPUCCI, F., DI PERNA, P., SESSA, F., MARGAGLIONE, M.

Protein Z gene polymorphisms are associated with protein Z plasma levels.

J Thromb Haemost. 2004; 2:1197-1199

SEJIMA, H., HAYASHI, T., DEYASHIKI, Y., NISHIOKA, J., SUZUKI, K.

Primary structure of vitamin K dependent human protein Z.

Biochem Biophys Res Comm. 1990; 71:661-668

SCHWANDT, P., RICHTER W.

Handbuch der Fettstoffwechselstörungen.

Stuttgart, New York, Schattauer Verl.1995

SOFI, F., CESARI, F., PRATESI, G., CELLAI, A.P., PULLI, R., PRATESI, C., GENSINI, G.F., ABBATE, R., FEDI, S.

Low protein Z levels in patients with peripheral arterial disease.

Thromb Haemost. 2007 Nov; 98(5):1114-1117

SOFI, F., CESARI, F., TU, Y., PRATESI, G., PULLI, R., PRATESI, C., GENSINI, G.F., ABBATE, R., BROZE, G.J. JR.

Protein Z-dependent protease inhibitor and protein Z in peripheral arterial disease patients.

Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2009; 7:731-735

SÖRENSEN, H.T., HORVATH-PUHO, E., PEDERSEN, L., BARON, J.A., PRANDONI, P.

Venous thromboembolism and subsequent hospitalisation due to acute arterial cardiovascular events: a 20-year cohort study.

Lancet. 2007; 370:1773-1779

STATON, J., SAYER, M., HANKEY, G.J., COLE, V., THOM, J., EIKELBOOM, J.W.

Protein Z gene polymorphisms, protein Z concentrations, and ischemic stroke

Stroke. 2005; 36:1123

SUEISHI, L., ICHIKAWA, K., KATO, K., NAKAGAWA, K., CHEN, YX.

Atherosclerosis: coagulation and fibrinolysis.

Semin Thromb Hemost. 1998; 24:255-260

TSAI, A.W., CUSHMANN, M., ROSAMOND, W.D., HECKBERT, S.R., POLAK, J.F., FOLSOM, A.R.

Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism incidence: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology.

Arch Intern Med. 2002; 162:1182-1189

UELAND, P.M., REFSUM, H.

Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease, and drug therapy.

J. Lab. Clin. Med. 1989; 114:473-501

VAN TILBURG, N.H., ROSENDAAL, F.R., BERTINA, R.M.

Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis.

Blood. 2000; 95: 2855-2859

VASSE, M., DENOYELLE, C., LEGRAND, E., VANNIER, J.P., SORIA, C.

Weak regulation of protein Z biosynthesis by inflammatory cytokines.

Thromb Haemost. 2002; 87:350-351

VAYA, A., MIRA, Y., FERRANDO, F., CONTRERAS M.T., ESTELLES, A.,
ESPANA, F., CORELLA, D., AZNAR, J.

Hyperlipidaemia and venous thromboembolism in patients lacking thrombophilic
risk factors.

Br J Haematol. 2002; 118:225-229

YIN, Z.F., HUANG, Z.F., CUI, J., FIEHLER, R., LASKY, N., GINSBURG, D.,
BROZE, G.J. JR.

Prothrombotic phenotype of protein Z deficiency.

Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97(12):6734-6738

YIN, F., HUANG, Z.F., CUI, J., FIEHLER, R.W., LASKY, N., GINSBURG, D.,
BROZE, G.J. JR.

Prothrombotic phenotype of protein Z deficiency.

Blood. 1999; 94, Suppl.1, Abstract No 1632

WARLOW, C., SUDLOW, C., DENNIS, M., WARDLAW, J., SANDERCOCK, P.

Stroke.

Lancet. 2003; 362:1211-1224

Erklärung

„ Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Danksagung

Ich möchte allen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben, herzlich danken.

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Kemkes-Matthes für die Bereitstellung des Promotionsthemas und die umfangreiche Unterstützung und Betreuung.

Ebenso Frau Margaretha Nees , die mich zu jeder Zeit bei der Anfertigung der Arbeit unterstützt hat.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. med. Grebe und den Mitarbeitern der angiologischen Abteilung der Justus-Liebig-Universität Gießen, sowie Frau Dr. Christine Langer, Ärztin für Chirurgie , Gefäßchirurgie, Phlebologie Frankfurter Straße 33, 35392 Gießen und Herrn Jotinder Korinth bei der Patientenauswahl.

Ferner danke ich herzlich Frau M. Mann vom Zentrum für medizinische Informatik für die umfangreiche statistische Beratung.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**