

Meinem Freund

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1. Venöse Thromboembolie	3
1.2. Grundlagen der Hämostase	5
1.2.1. Das plasmatische Gerinnungssystem - die Aktivierung	7
1.2.2. Das plasmatische Gerinnungssystem - die Inhibitoren.....	9
1.2.3. Das Fibrinolyseesystem.....	10
1.2.4. Die Rolle des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 in der Hämostase.....	12
1.3. Thrombophilie.....	14
1.3.1. Definition und Bedeutung	14
1.3.2. Thrombophile Risikofaktoren im Hämostasesystem.....	15
1.3.3. Thrombophile Risikofaktoren im Fibrinolyseesystem	18
1.3.4. Labordiagnostisch fassbare VTE-Rezidivrisikofaktoren.....	20
1.4. Fragestellungen dieser Arbeit	20
2. Material und Methoden	22
2.1. Untersuchte Studienkollektive	22
2.2. Probensammlung.....	23
2.3. Übersicht der untersuchten Parameter	23
2.4. Hämostaseologische Tests	24
2.5. Molekularbiologische Untersuchungsmethoden.....	25
2.6. Statistische Auswertungen	26
3. Ergebnisse	28
3.1. Demographische Charakteristika der Studienpopulation.....	28
3.2. Beziehung zwischen PAI-1 4G/5G Genotyp und PAI-1 Aktivität	30
3.3. Assoziation der PAI-1 Aktivität sowie weiterer hämostaseologischer Parameter mit der VTE.....	37
3.4. Assoziation von PAI-1 Aktivität und VTE-Risiko	39
3.5. PAI-1 4G/5G Genotyp, Faktor V Leiden, der Prothrombin Variante G20210A und VTE-Risiko	40
3.6. PAI-1 4G/5G Genotyp und klinische Charakteristika der VTE	41
4. Diskussion	43
4.1. Demographische Daten	43
4.2. Einfluss des PAI-1 4G/5G Genotyps auf die PAI-1 Aktivität	44
4.3. PAI-1 4G/5G Genotyp und VTE	47
4.4. Kritische Betrachtung von PAI-1 als thrombophiler Risikofaktor	50
4.5. Limitationen der Studie.....	51
5. Zusammenfassung	53
6. Literaturverzeichnis	55
7. Anhang	62
7.1. Abkürzungsverzeichnis.....	62
7.2. Selbständigkeitserklärung	63
7.3. Lebenslauf.....	64
7.4. Danksagung.....	65

1. Einleitung

1.1. Venöse Thromboembolie

Der Begriff der venösen Thromboembolie (VTE) fasst die tiefe Beinvenenthrombose und/oder die Lungenarterienembolie als ätiologisch verwandte Entitäten zusammen.

Mit einer durchschnittlichen Inzidenz von 1/1000 pro Jahr stellen die VTE ein häufiges Krankheitsbild dar, das in 10-15% der Fälle von klinisch stummen oder klinisch manifesten Lungenembolien begleitet wird.¹⁻⁴ Im längerfristigen Verlauf ist es oft von anhaltender Morbidität aufgrund der chronisch venösen Insuffizienz bzw. des Cor pulmonale geprägt.⁴ Berücksichtigt man die demographische Entwicklung, so unterstreicht die Tatsache, dass die jährliche Inzidenz von VTE mit zunehmendem Alter dramatisch ansteigt (< 20 Jahre: 1/100.000; 20-40: 1/10.000; 41-75 Jahre: 1/1.000; > 75 Jahre: 1/100), den gesellschaftlichen Stellenwert dieser Erkrankung.⁵

Die Virchow-Trias zur Thrombogenese hat auch heute Gültigkeit (Abbildung 1). Bei dem zur manifesten Thrombose führenden multifaktoriellen Prozess spielen Störungen des Blutflusses, insbesondere im venösen Bereich neben der veränderten Blutzusammensetzung („Hyperkoagulabilität“) und Gefäßintegrität eine besondere Rolle.⁶ Dies spiegelt sich auch in den bekannten Risikofaktoren der venösen Thromboembolien wider.^{7,8}

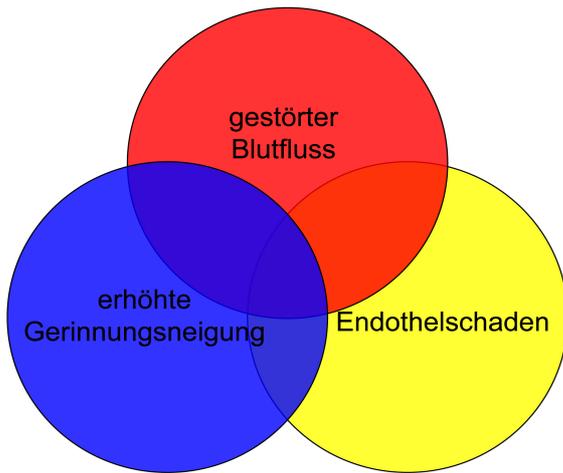


Abbildung 1. Hauptursachen der venösen Thromboembolie (VTE): Endothelschaden, veränderte Blutzusammensetzung und Störungen des Blutflusses (Virchow-Trias).

Zu den erworbenen Risikofaktoren zählen u.a. die Immobilität, Operationen, maligne Erkrankungen und Antiphospholipid-Antikörper.⁹⁻¹¹ Etablierte hereditäre Risikofaktoren der VTE sind der Mangel an Antithrombin, Protein C und S, der Faktor V Leiden und die Prothrombin Variante G20210A.^{2,7,12} Während mit fortschreitendem Alter bereits kleine expositionelle Trigger ausreichen, um eine VTE auszulösen, tritt bei jungen Individuen die Notwendigkeit einer dispositionellen Komponente stärker in den Vordergrund.^{13,14} Allerdings ist in einem erheblichen Teil der VTE kein Risikofaktor nachweisbar, wobei hier andere, bislang nicht eindeutig charakterisierte Faktoren (z.B. Fibrinolyse, Entzündung) eine wichtige Rolle spielen könnten.¹⁵

Die VTE ist eine chronische, rezidivierende Erkrankung, wobei für die Rezidive eine Letalität von 5-9% beschrieben wird.¹⁶ Das Rezidivrisiko wird im Wesentlichen durch klinische Charakteristika und einige labordiagnostische Risikofaktoren bestimmt.¹⁷ Zur Einschätzung des Rezidivrisikos der venösen Thromboembolie haben derzeit klinische Kriterien die bessere Aussagekraft.¹⁷⁻²⁰ So weist die Gruppe der spontanen VTE, für die kein äußerer Auslöser (z.B. Trauma, Operation) erkennbar ist, ein besonders hohes Rezidivrisiko in der Größenordnung von 30-40% auf.^{17,19,21,22} Labordiagnostisch sind zum jetzigen Zeitpunkt nur wenige Parameter bzw. Konstellationen mit einem gesichert erhöhten Rezidivrisiko verbunden. Hierzu gehören die Inhibitormangel-Zustände (Antithrombin, Protein C und S), das Phospholipidantikörpersyndrom, der homozygote Faktor V Leiden oder die Doppelt-Heterozygotie für Faktor V Leiden und

Prothrombin Variante G20210A.²³⁻²⁶ Allerdings erleiden 60-70% der spontanen venösen Thromboembolien kein Rezidiv.^{19,20} Aktuell werden Strategien getestet, nach denen ein Wiederanstieg der D-Dimer nach Beenden der initialen Antikoagulation als Prädiktor für ein späteres Rezidiv verwendet werden kann.²⁷⁻²⁹ Viele Studien belegen ein bei Männern im Vergleich zu Frauen erhöhtes Rezidivthromboserisiko nach spontaner Erst-VTE.³⁰⁻³³ Allerdings ist noch unklar, welche Bedeutung das männliche Geschlecht ursächlich für das Rezidivthromboserisiko hat.⁸ Mit Hilfe all dieser Informationen ist auch heute eine ausreichende Eingrenzung des Patientenkreises, der ein Rezidiv entwickeln wird, nicht möglich.

In der neuen S2-Leitlinie zur Therapie der spontanen venösen Thromboembolien sind folgende Empfehlungen der 8. ACCP-Konsensus-Konferenz für Deutschland übernommen worden: 3 Monate Antikoagulation bei distaler Thrombose, > 3 Monate bis zeitlich unbegrenzt bei proximaler Thrombose oder Lungenembolie und beim Rezidiv zeitlich unbegrenzt.³⁴ Bei Patienten mit einer spontanen VTE ist, wie bereits erwähnt, lediglich in ca. 30-40% der Fälle mit einem Rezidiv zu rechnen.¹⁸⁻²⁰ Die Empfehlung für eine langfristige Antikoagulation der Teilpatienten mit spontaner VTE führt daher vermutlich in einem beträchtlichen Teil der Fälle zu einer überflüssigen Behandlung und einer damit verbundenen Gefährdung durch die Antikoagulation.

Daher wären differenzierende Rezidivrisikomarker sehr hilfreich, die eine bessere Risikostratifizierung der venösen Thromboembolie ermöglichen.

1.2. Grundlagen der Hämostase

Der Begriff Hämostase subsumiert alle Reaktionen, die zu einer effektiven und angemessenen Blutstillung beitragen. Dies umfasst sowohl das Hämostasesystem im engeren Sinne (thrombozytäres und plasmatisches Gerinnungssystem, Fibrinolysesystem), als auch die Gefäßwand, die durch eine Vasokonstriktion die Blutzirkulation drosselt und so einem Blutverlust entgegen wirkt.

Unter primärer Hämostase versteht man das sofortige Abdichten der Verletzungsstelle des Gefäßes, was durch das Zusammenspiel von Vasokonstriktion sowie Plättchenadhäsion und –aggregation erreicht wird.³⁵ Die Thrombozyten benötigen für die Adhäsion den von-Willebrand-Faktor, dessen Bindungsstellen für den thrombozytären Rezeptor (Glykoproteinkomplex GpIb/IX) nur unter Bedingungen mit hohen Scherkräften zugänglich sind, so dass Thrombozyten vor allen Dingen im arteriellen Gefäßsystem eine Rolle für die Hämostase spielen. Zur

dauerhaften Blutstillung, insbesondere größerer Verletzungen, bedarf es zusätzlich der Fibrinbildung im Rahmen der plasmatischen Gerinnung. Die plasmatische Gerinnung läuft vor allem auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten und Endothelzellen. Es sind weiterhin Gerinnungsinhibitoren und das Fibrinolyse-System notwendig, um eine überschießende Gerinnung zu kontrollieren sowie eine Auflösung des Gerinnsels zu gewährleisten. Das Wechselspiel zwischen Aktivatoren und Inhibitoren stellt unter physiologischen Bedingungen ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den Systemen her.³⁶ Diese Zusammenhänge sind in den Abbildungen 2, 3, 4 und 5 dargestellt.

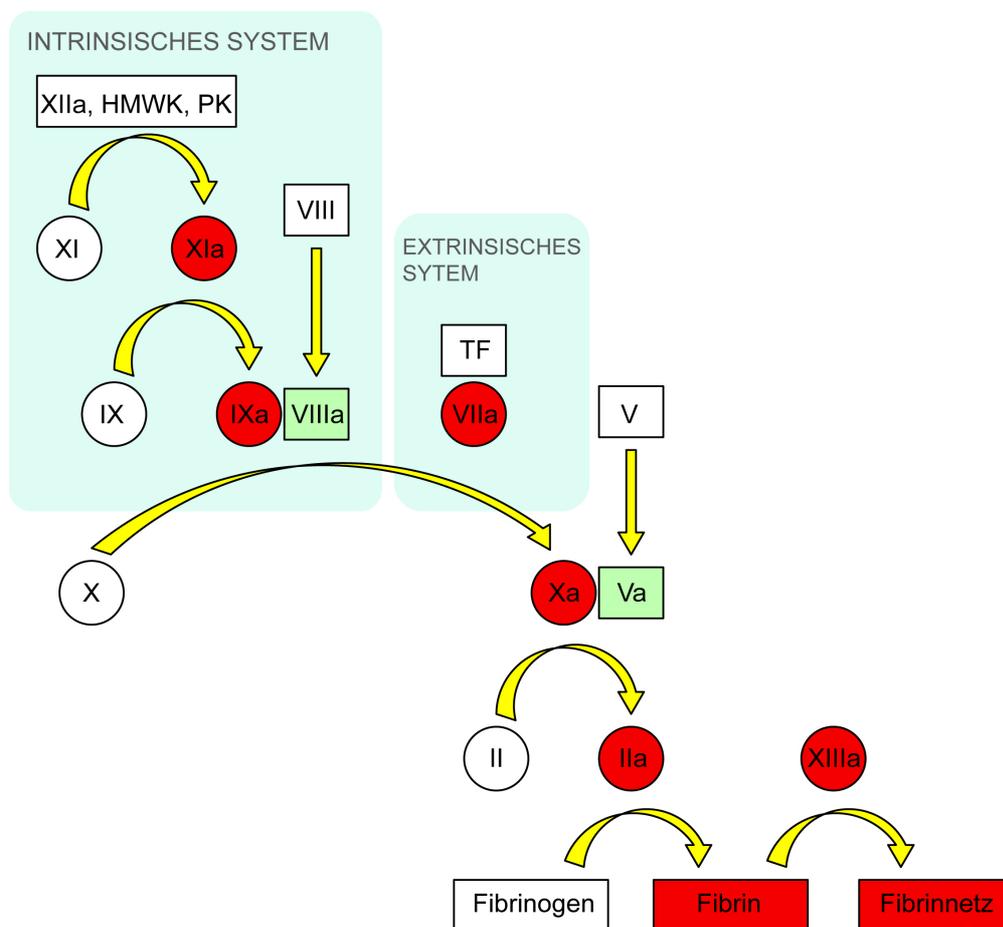


Abbildung 2. Schematische Darstellung des plasmatischen Gerinnungssystems (intrinsisches und extrinsisches System). Aktivierte Faktoren sind rot markiert. *Extrinsischer Weg:* Der Gewebefaktor (TF) bildet einen Komplex mit dem aktivierten Faktor VII (VIIa), dieser führt zur Aktivierung von Faktor X. *Intrinsischer Weg:* Faktor XII bildet mit Präkallikrein (PK) und hochmolekularem Kininogen (HMWK) das Kontaktphasensystem. Der aktivierte Faktor XII wandelt Faktor XI zu Faktor XIa um. Faktor XIa aktiviert wiederum Faktor IX, und

der Komplex aus Faktor IXa und Faktor VIIIa aktiviert Faktor X. *Gemeinsame Endstrecke*: Der aktivierte Faktor X (Xa) wandelt Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (Faktor IIa) um. Thrombin spaltet aus dem langkettigen Fibrinogenmolekül zunächst lösliche Fibrinmonomere ab. Unter Einwirkung von Faktor XIIIa werden kovalente Bindungen zwischen benachbarten Monomeren gebildet. Somit wird der Thrombus stabilisiert.

1.2.1. Das plasmatische Gerinnungssystem - die Aktivierung

Die Hauptaufgabe des plasmatischen Gerinnungssystem besteht in der Vernetzung und Stabilisierung des Thrombozytengerinnsels mit Hilfe eines vernetzten Polymers aus Fibrin, um einen dauerhaften Verschluss der Gefäßläsion zu gewährleisten. Dies wird durch eine Kaskade von Gerinnungsfaktoren ermöglicht, die letztendlich zur Bildung von Thrombin führt, welches Fibrinogen in Fibrin umwandelt. Die plasmatische Gerinnung lässt sich in das Intrinsic- und Extrinsic-System unterteilen, obwohl in vivo aufgrund der verschiedenen Querverbindungen beider Systeme diese Trennung nach heutigem Kenntnisstand nicht existiert.^{37,38}

Die Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade erfolgt durch die Freisetzung des Gewebefaktors (Tissue Factor, TF) (*extrinsischer Weg*). An TF bindet sich der aktivierte Faktor VII, der bereits in geringer Menge in voraktivierter Form zirkuliert. Der Komplex aus TF und Faktor VIIa aktiviert weiterhin Faktor VII zu Faktor VIIa, Faktor X zu Faktor Xa und Faktor IX zu Faktor IXa, welcher zusammen mit dem aktivierten Faktor VIII zusätzlich Faktor X zu Faktor Xa umwandelt (Abbildung 2).³⁸

Die Gerinnungskaskade kann außerdem über Faktor XII aktiviert werden (*intrinsic Weg*). Faktor XII bildet mit Präkallikrein und hochmolekularem Kininogen das Kontaktphasensystem. Diese Faktoren werden an negativ geladenen Oberflächen aktiviert. Der aktivierte Faktor XII wandelt in einer calciumabhängigen Reaktion Faktor XI zu Faktor XIa um. Faktor XIa aktiviert wiederum Faktor IX, und der Komplex aus Faktor IXa und Faktor VIIIa aktiviert Faktor X. Faktor VIII ist hierbei ein Kofaktor, der diese Reaktionen beschleunigt. Faktor VIII zirkuliert physiologischerweise als Komplex mit von-Willebrand-Faktor (VWF). Um seine Funktion als Kofaktor wahrnehmen zu können, muss Faktor VIII aus dem Komplex mit dem VWF herausgelöst werden, was durch Aktivierung und Spaltung des Faktors VIII durch Thrombin geschieht (Abbildung 2).³⁶

Der aktivierte Faktor X (Faktor Xa) wandelt Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (Faktor IIa) um. Die am Anfang der Gerinnungsaktivierung gebildete Menge an Thrombin ist viel zu gering, um größere Mengen Fibrinogen in Fibrin zu spalten. Sie reicht aber aus, um die Thrombozyten

zu aktivieren, die wiederum TF exprimieren können. Im Sinne einer positiven Rückkopplung aktiviert Thrombin Faktor V zu Faktor Va, Faktor VIII zu Faktor VIIIa und Faktor XI zu Faktor XIa. Dadurch wird die Reaktion der Gerinnungskaskade um den Faktor 1000 amplifiziert. Der Faktor Xa/Va Komplex aktiviert große Mengen an Prothrombin, was zu einem "Thrombin burst" führt (Abbildung 3).³⁹

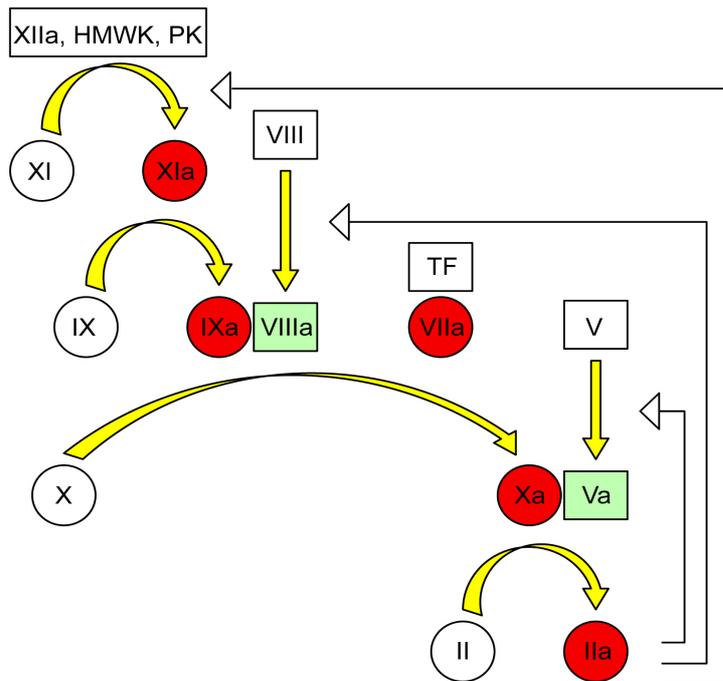


Abbildung 3. Schematische Darstellung „Thrombin burst“ (aktivierte Faktoren rot markiert). Thrombin (IIa) aktiviert Faktor V zu Faktor Va, Faktor VIII zu Faktor VIIIa und Faktor XI zu Faktor XIa. Der Xa/Va Komplex aktiviert große Mengen an Prothrombin, was zu einem "Thrombin burst" führt.

Die plasmatischen Gerinnungsfaktoren sind Glykoproteine und weisen sehr unterschiedliche Konzentrationen und Halbwertszeiten auf. Faktor IIa, Faktor IXa, Faktor Xa und Faktor XIa liegen als inaktive Proenzyme im Blut vor und werden im Verlauf der Gerinnungsaktivierung in ihre aktive Form überführt. Die Faktoren II, VII, IX und X werden in der Leber synthetisiert und müssen carboxyliert werden. Dieser Schritt ist Vitamin-K-abhängig, und die Bindung dieser Gerinnungsfaktoren an Endothelzellen und Thrombozyten wird über das Calcium vermittelt.³⁶

Die Geschwindigkeit der Gerinnungskaskade ist abhängig von der Aktivierung des Faktors X im Verhältnis zu Faktor Xa und von der Konzentration der Gerinnungsfaktoren auf der Oberfläche aktivierter Zellen.³⁶

1.2.2. Das plasmatische Gerinnungssystem - die Inhibitoren

Zu den wichtigsten Inhibitoren des plasmatischen Gerinnungssystems zählen Antithrombin (AT), Protein C (PC) und Protein S (PS) (Abbildung 4).

Die Oberfläche von Endothelzellen ist für die inhibitorische Wirkung des plasmatischen Gerinnungssystems von großer Bedeutung.³⁶ Als Kofaktor für Thrombin ist Thrombomodulin der wichtigste Rezeptor auf der Endothelzelle, durch den die Thrombinwirkung fundamental verändert wird. Nach Bindung an Thrombomodulin verändert Thrombin seine Spezifität.⁴⁰ Es ist ausschließlich nicht mehr gerinnungsaktivierend wirksam und aktiviert zusammen mit dem endothelialen Protein-C-Rezeptor (EPCR) das inhibitorische System über das Protein C.⁴¹ Aktiviertes Protein C (aPC) bildet einen Komplex mit dem Kofaktor Protein S und inaktiviert dann die Gerinnungsfaktoren Faktor Va und Faktor VIIa.³⁶ Zusammen mit dem Protein S spaltet APC den Faktor Va an den Positionen Arg 506, Arg 306 und Arg 679 (Abbildung 7).⁴² Auch beim häufigsten hereditären VTE-Risikofaktor, dem Faktor V Leiden, ist dieser Inaktivierungsschritt durch eine Veränderung der zentralen Schnittstelle gestört.⁴³

Antithrombin wird in der Leber synthetisiert und inhibiert vorzugsweise Faktor Xa und Thrombin (Faktor IIa). Die Geschwindigkeit der Reaktion von Antithrombin wird therapeutisch durch Heparin erheblich gesteigert.

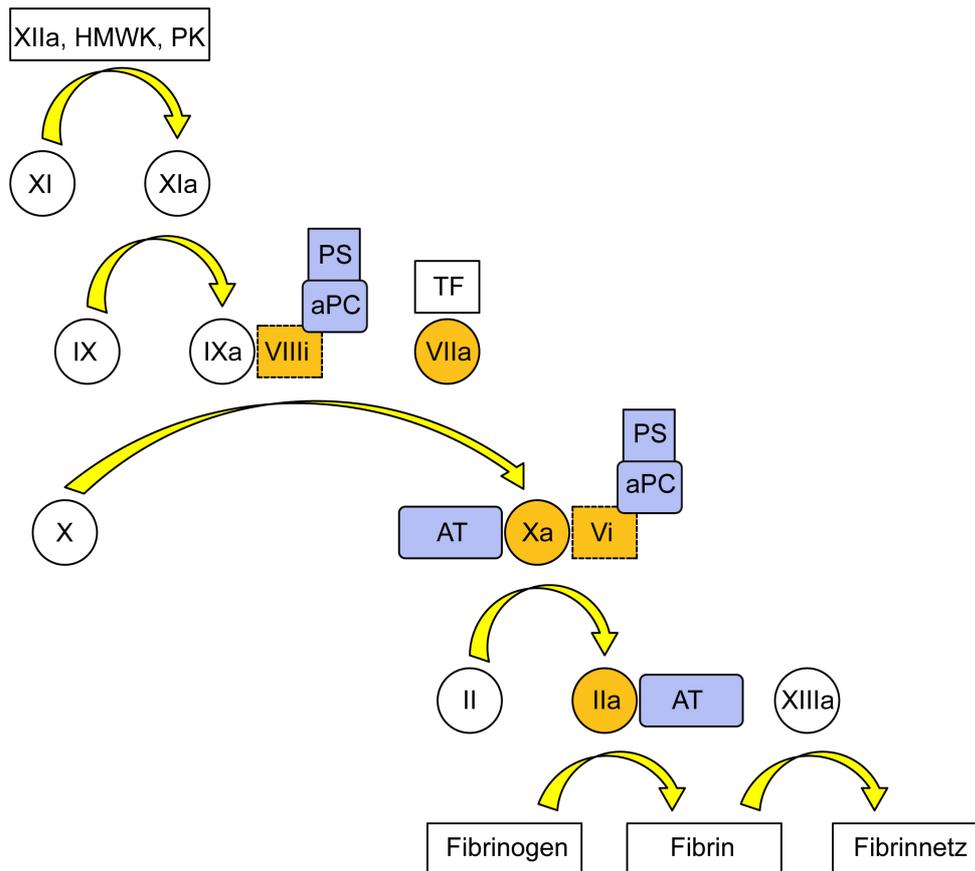


Abbildung 4. Darstellung der plasmatischen Gerinnungsinhibitoren (Inhibitoren blau markiert). Aktiviertes Protein C (aPC) bildet einen Komplex mit dem Kofaktor Protein S (PS) und inaktiviert dann die Gerinnungsfaktoren Faktor Va (Vi) und Faktor VIIIa (VIIIi). Antithrombin (AT) inhibiert vorzugsweise Faktor Xa und Thrombin (Faktor IIa).

1.2.3. Das Fibrinolyse-System

Die Fibrinolyse stellt einen Mechanismus zur Begrenzung der Gerinnungsbildung dar. Analog zum Gerinnungsgeschehen gibt es ineinander greifende Phasen der Initiierung, Amplifikation und Kontrolle.³⁸ Das letztendlich wirksame Enzym der Fibrinolyse ist Plasmin. Es entsteht aus Plasminogen, das in der Leber synthetisiert wird. Plasmin bindet an Fibrin und spaltet es in definierte Fibrindeggradationsprodukte (Abbildung 5).^{35,38}

Parallel zur Bildung des Fibrins wird die Auflösung des Fibrinnetzes initiiert. Plasminogen wird vor allem durch den von Endothelzellen sezernierten Tissue Type Plasminogen Aktivator (t-PA) aktiviert. Der entstehende Enzymkomplex aus t-PA, Plasminogen und Fibrin, das in diesem Fall auch als Kofaktor eine Rolle spielt, führt zur weiteren Generierung von Plasmin.³⁸ Nach der

Bindung an Fibrin wird die Aktivität von t-PA um das ca. 1000-fache gesteigert.³⁶ Weitere Aktivatoren von Plasmin sind Urokinase und Kallikrein. Urokinase liegt im Plasma in niedrigerer Konzentration vor als t-PA, sie spaltet Plasminogen an den gleichen Stellen wie t-PA. (Abbildung 5).

Zu den zwei Hauptinhibitoren der Fibrinolyse gehören Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) und α_2 -Antiplasmin (α_2 AP). α_2 -Antiplasmin wird in der Leber synthetisiert und inhibiert Plasmin in einer Sofortreaktion durch Bildung eines stabilen Komplexes.³⁶ Desweiteren wird α_2 -Antiplasmin in quervernetztes Fibrin unter Beteiligung von aktiviertem Faktor XIII kovalent eingebunden. Es blockiert die Adsorption von Plasminogen an Fibrin und reduziert damit das im Fibringerinnsel verfügbare Plasminogen. t-PA und Urokinase werden durch den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 gehemmt. Auf die Rolle von PAI-1 in der Hämostase wird im Abschnitt 1.2.4 detailliert eingegangen.

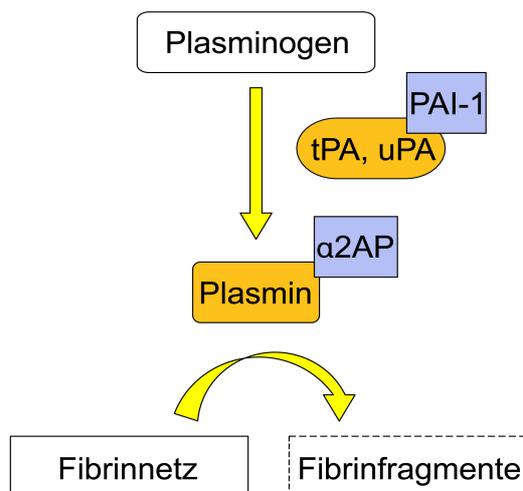


Abbildung 5. Aktivierung und Hemmung der Fibrinolyse (Inhibitoren blau markiert). Plasminogen wird durch Tissue Type Plasminogen Aktivator (t-PA) oder Urokinase (u-PA) aktiviert. Der entstehende Enzymkomplex aus t-PA, Plasminogen und Fibrin führt zur weiteren Generierung von Plasmin. Plasmin bindet an Fibrin und spaltet es in definierte Fibrindegradationsprodukte. α_2 -Antiplasmin (α_2 AP) inhibiert Plasmin in einer Sofortreaktion

durch Bildung eines stabilen Komplexes. t-PA und Urokinase werden durch den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) gehemmt.

1.2.4. Die Rolle des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 in der Hämostase

Der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) gehört zu den wichtigsten Inhibitoren des Fibrinolyse-Systems. PAI-1 übernimmt eine entscheidende Kontrollfunktion der fibrinolytischen Gerinnungskaskade. Während der intravasalen Fibrinolyse erfolgt die Umwandlung des inaktiven Plasminogens in das aktive Plasmin durch den gewebspezifischen Plasminogen-Aktivator (t-PA) und die Urokinase. Die Hauptfunktion des PAI-1 besteht in der Hemmung von t-PA und der Urokinase (Abbildung 5). PAI-1 bildet mit beiden Fibrinolyse-Aktivatoren einen stabilen 1:1 Komplex, der aus der Zirkulation über die Leberzellen aufgenommen und abgebaut wird.⁴⁴ Somit spielt PAI-1 eine regulierende Rolle bei der Fibrinolyse durch die Kontrolle der Konzentration von t-PA und Urokinase. Das Gleichgewicht zwischen Plasminogenaktivatoren und Inhibitoren ist der entscheidende Faktor für den Aktivierungsstatus des Fibrinolyse-Systems.⁴⁵

Der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 47 000 Dalton.⁴⁵ PAI-1 wird von den Endothelzellen produziert und ins Blut sezerniert. Es ist auch in Thrombozyten, Leberzellen und Adipozyten in höherer Konzentration nachweisbar.^{38,46,47} Die Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 Synthese wird durch eine Reihe von Entzündungsmediatoren, z.B. Endotoxin, Interleukin-1, Tumornekrosefaktor, sowie Fibroblast Growth Factor und Angiotensin II stimuliert.^{46,47} Die instabile aktive Form des PAI-1 wird in seine inaktive Form in wenigen Minuten spontan umgewandelt.⁴⁷ Durch Bindung an Vitronectin wird PAI-1 in aktiver Form im Plasma stabilisiert.⁴⁵⁻⁴⁷

Seit der Entdeckung von PAI-1 durch van Mourik et al. 1984 sind viele Studien durchgeführt worden, um PAI-1 Funktionen sowohl in vivo als auch in vitro aufzuklären.⁴⁸ Aufgrund seiner Multifunktionalität ist PAI-1 eine Komponente in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen (Abbildung 6).

Die PAI-1 Plasmakonzentration wird sowohl von Umweltfaktoren als auch vom jeweiligen genetischen Hintergrund beeinflusst. Auf den genetischen Hintergrund wird im Abschnitt 1.3.3 detailliert eingegangen. Ein Zusammenhang zwischen der PAI-1 Plasmakonzentration und dem *metabolischen Syndrom* wurde zum ersten Mal von Vague et al. 1986 beschrieben.⁴⁹ Die PAI-1 Plasmakonzentration korreliert eng mit der Triglyceridkonzentration und der Insulinresistenz.⁴⁷ PAI-1 ist bei Patienten mit metabolischem Syndrom, sowie bei Patienten mit Diabetes mellitus

Typ 2⁵⁰ erhöht und spielt dadurch eine große Rolle in der Pathophysiologie der Atherothrombose und Insulinresistenz.⁵⁰⁻⁵³ Die Mechanismen der Überexpression von PAI-1 bei metabolischem Syndrom sind komplex und die Kausalität muss noch geklärt werden.^{54,55}

Im Rahmen von *Akute-Phase-Reaktionen* (z.B. Schwangerschaft oder postoperative Phase) kann es zu einer vermehrten Freisetzung von PAI-1 aus Endothelzellen durch die Stimulierung der Entzündungsmediatoren kommen. PAI-1 scheint auch eine wichtige Rolle in akuten und chronisch entzündlichen Erkrankungen der Lunge zu spielen.⁴⁷

Bei mehreren *malignen Prozessen* wird ein PAI-1 Einfluss auf Pathogenese und Prognose des Tumorprozesses beobachtet.^{47,56,57}

Aufgrund seiner physiologischen Funktion kann ein PAI-1 Mangel oder eine vermehrte PAI-1 Aktivität theoretisch zu einer Blutungsneigung bzw. zu einer Thromboseneigung führen.⁴⁶ So sind seltene Fälle beschrieben, in denen ein PAI-1 Mangel nach Trauma oder nach Operationen zur Blutungsneigung führt.⁵⁸ Viel häufiger wird aber die PAI-1 Erhöhung mit arteriellen Thromboembolien in der Verbindung gebracht.^{53,59-61}

Für die venösen Thromboembolien ist die Datenlage besonders widersprüchlich. Viele Studien zeigen keinen Einfluss von PAI-1 Aktivität oder Konzentration auf venöse Thromboembolien.^{62,63} Es gibt aber (sehr wohl) andere Untersuchungen, die eine Verbindung zwischen PAI-1 Erhöhung und VTE zeigen.⁶⁴⁻⁶⁶

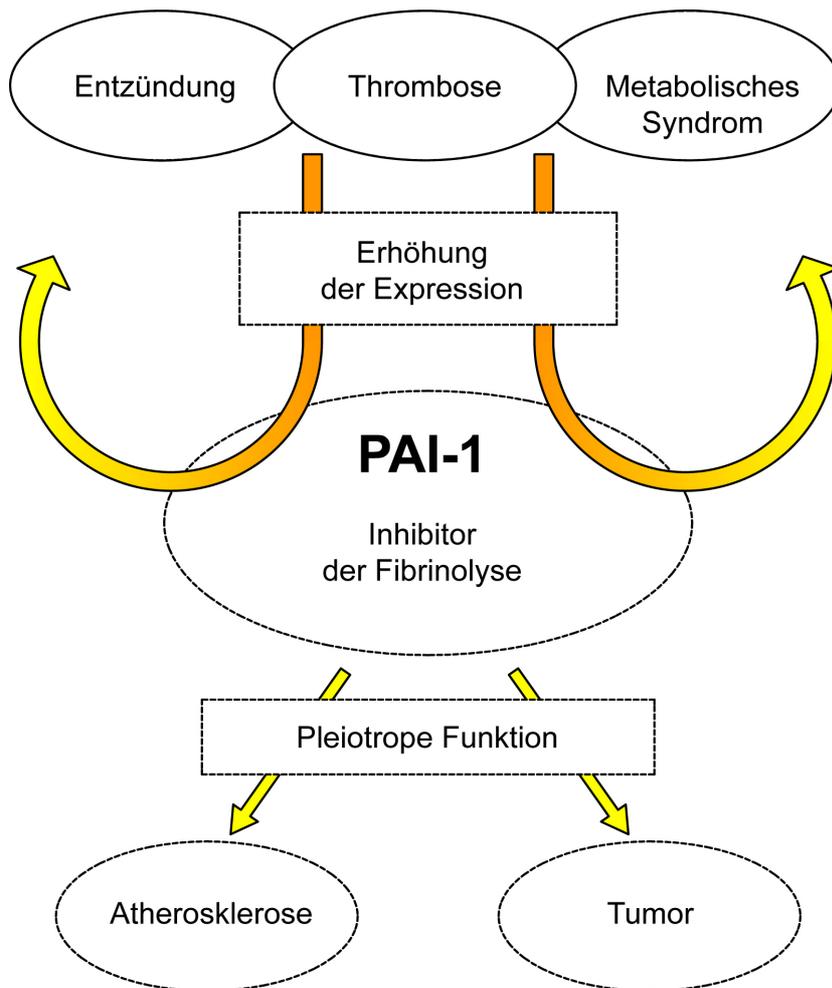


Abbildung 6. Pleiotrope Funktion von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) (nach Iwaki et al. 2012). PAI-1 spielt eine wichtige Rolle sowohl in der Hemmung der Fibrinolyse als auch in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen, wie z.B. Tumorerkrankungen, Atherosklerose, metabolisches Syndrom und entzündliche Erkrankungen.

1.3. Thrombophilie

1.3.1. Definition und Bedeutung

Thrombophilie ist die genetisch bedingte oder erworbene Neigung zu Thrombosen und/oder Embolien.⁶⁷ Zu den wichtigsten genetisch determinierten Risikofaktoren zählen der Antithrombinmangel, der Protein-C- und S-Mangel, der Faktor V Leiden und die Prothrombin Variante G20210A.^{4,68} Operationen, Trauma und Antiphospholipid-Antikörper gehören zu den bedeutsamen erworbenen Risikofaktoren.^{8,10,67,68} Eine persistierende Erhöhung des Faktor VIII

zählt seit einigen Jahren ebenfalls zu den gut belegten Risikofaktoren der VTE.⁶⁹⁻⁷² Die molekularen Ursachen der Faktor VIII Erhöhung sind bisher allerdings unklar, auch wenn es hierfür ebenfalls einen genetischen Hintergrund zu geben scheint.⁷³ Neben den aufgezählten thrombophilen Diathesen gibt es noch andere Veränderungen, die mit einer erhöhten Thromboseneigung in Zusammenhang stehen, z.B. der Mangel an Plasminogen, persistierende Erhöhungen der Faktoren IX, XI und Fibrinogen.^{1,67} Die Assoziation mit einer Thromboseneigung wird bei diesen Parametern entweder kontrovers diskutiert oder ihr prädiktiver Wert ist im Einzelfall gering.

Auf eine Vielzahl weiterhin diskutierter VTE-Risikofaktoren (z.B. Hyperhomozysteinämie, MTHFR-Variante, ACE- und t-PA-Genotypen) wird in diesem Zusammenhang nicht im Detail eingegangen.

1.3.2. Thrombophile Risikofaktoren im Hämostasesystem

Der Inhibitorenmangel (Abbildung 4)

Ein Mangel an Antithrombin, Protein C oder Protein S findet man bei weniger als 1% der (allgemeinen) Bevölkerung.⁷⁴⁻⁷⁶ Der Inhibitorenmangel ist mit einem stark erhöhten Thromboserisiko verbunden und wird daher mit einer höheren Frequenz bei Patienten mit Thrombosen gefunden.

Der Antithrombin-Mangel wurde erstmalig Mitte der 1960er Jahre von Egeberg beschrieben.⁷⁷ Der hereditäre Antithrombinmangel wird autosomal dominant vererbt und tritt nur in heterozygoter Form.⁷⁸ Homozygote Merkmalsträger sind nicht lebensfähig. Es werden 2 Formen des Antithrombinmangels unterschieden: *Typ I*: Aktivitäts- und Antigenwerte sind vermindert; *Typ II*: normaler Antigen Spiegel bei reduzierter Aktivität des Antithrombins.

Ein Zusammenhang zwischen einem hereditären *Protein C-Mangel* und Thrombosen wurde zum ersten Mal von Griffin et al. Anfang der 1980er Jahre beschrieben.⁷⁹ Ähnlich dem Antithrombinmangel wird beim Protein C-Mangel ebenfalls zwischen einem Typ I (verminderte Aktivität und Antigen) und einem Typ II (verminderte Aktivität) unterschieden.

Der Kofaktor im APC-System, das Protein S, zirkuliert zu 40% in freier Form im Plasma. Ausschließlich freies Protein S ist aktiv.⁶⁷ Beim *Protein S-Mangel* werden 3 Typen beschrieben: *Typ I*: sowohl die Aktivität als auch der gesamte Protein S-Gehalt sind vermindert; *Typ II*: nur die Aktivität ist vermindert; *Typ III*: die Aktivität und der Gehalt an freiem Protein S sind herabgesetzt.

Das Lebenszeitrisiko für VTE bei Anithrombin-, Protein C- oder Protein S-Mangel liegt bei ca. 60-70%.⁸⁰ Homozygote Träger für Protein C- und S-Mangel sind extrem selten. Dieser Zustand führt zu einer lebensbedrohlichen Thromboseneigung (Purpura fulminans) kurz nach der Geburt.^{81,82}

Antithrombin-, Protein C- und Protein S-Mangel-Zustände können auch im Rahmen von Leber- und Nierenerkrankungen erworben werden, bzw. iatrogen unter einer oralen Antikoagulationstherapie (Protein C, Protein S) auftreten. Ein erworbener Protein S-Mangel tritt häufig in der Schwangerschaft oder unter der Einnahme hormonaler Kontrazeptiva auf.

Der Faktor V Leiden bzw. die APC-Resistenz

Als Ursache einer Thromboseneigung wurde erstmals 1993 von Dahlbäck et al. eine Resistenz gegenüber aktiviertem Protein C beschrieben.⁸³ Er untersuchte hierzu Familien mit mehreren thromboembolischen Ereignissen, bei denen kein Inhibitorenmangel nachweisbar war. In diesen Fällen stellte er gehäuft eine Resistenz von Faktor V gegenüber der Wirkung vom aktivierten Protein C fest.⁸⁴ In nahezu allen Fällen ist diese Resistenz durch eine G1691A-Punktmutation in Exon 10 des Faktor V-Gens bedingt. Wie sich in weiteren Untersuchungen herausstellte, wird hier eine wichtige Protein C-Spaltungsstelle im aktivierten Faktor V so verändert, dass Faktor Va nur verzögert durch aktiviertes Protein C gespalten werden kann (Abbildung 7).⁸⁵ Die prokoagulatorische Wirkung ist dadurch verlängert bzw. verstärkt, und die Inaktivierung ist verzögert. Die Mutation wird nach ihrem Entdeckungsort, dem niederländischen Ort Leiden, benannt. Der Erbgang ist autosomal dominant.⁸⁴ Eine heterozygote Faktor V Leiden-Mutation ist mit einem 3- bis 8-fach erhöhtem Thromboserisiko assoziiert, bei Homozygotie steigt das Risiko auf das bis zu 50-80-fache der allgemeinen Bevölkerung an.^{7,86} Die höchste Prävalenz der Faktor V Leiden-Variante von bis zu 5% wurde für die Bevölkerung kaukasischer Abstammung beschrieben.⁸⁷ In der Gruppe der Patienten mit Thrombophilie findet man der Faktor V Leiden mit einer Häufigkeit von circa 30-40%.⁸⁶ Somit stellt der Faktor V Leiden bei Patienten mit venösen Thromboembolien den häufigsten, bislang bekanntesten hereditären Defekt dar.

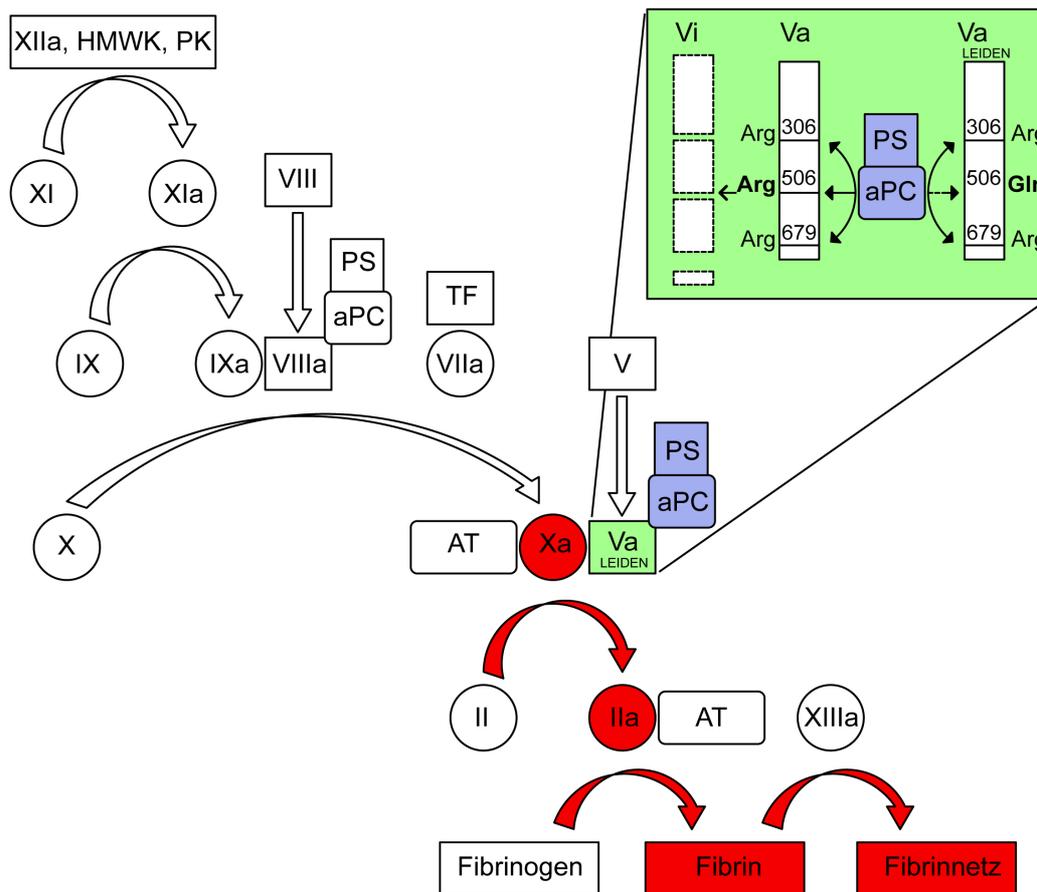


Abbildung 7. Mechanismus der APC-Resistenz. Zusammen mit Protein S (PS) spaltet aktiviertes Protein C (aPC) den Faktor Va (Vi) an den Positionen Arg 506, Arg 306 und Arg 679. Der Faktor V Leiden entsteht durch eine Punktmutation des Gens, wobei ein Austausch der Aminosäure Arginin (Arg) durch Glutamin (Gln) an Position 506 vorliegt. Dies führt zur Verzögerung der Spaltung des Faktor Va, da das Bindungsmotiv für aPC verändert wurde. Hierdurch wird die Halbwertszeit des aktivierten Faktor V verlängert.

Prothrombin G20210A

1996 wurde von Poort et al. eine Mutation in Prothrombingen beschrieben.⁸⁸ Es handelt sich dabei um eine Punktmutation in der 3'-untranslatierten Region des Gens, wobei ein Austausch der Base Guanin durch Adenin an Position 20210 vorliegt. Dieser ist mit erhöhten Prothrombinspiegeln und damit einer verstärkten Prothrombinaktivität assoziiert.^{88,89} Hierdurch wird eine vermehrte Thrombingenerierung gefördert und zugleich die Inaktivierung von Faktor Va durch aktiviertes Protein C beeinträchtigt.^{90,91} Dies wiederum wird mit als Ursache für ein erhöhtes Risiko für venöse Thromboembolien sowie möglicherweise auch für zerebrale

Venenthrombosen und Myokardinfarkte angesehen.⁹²⁻⁹⁴ Die Prothrombin G20210A Variante ist bei 2% der Normalbevölkerung und 6-18% der Patienten mit venösen Thromboembolien nachweisbar.^{88,95,96} Das Thromboserisiko ist bei Trägern der Prothrombin G20210A Variante im Vergleich zum Normalkollektiv um etwa das 3-fache erhöht.^{88,97} Wenn die Prothrombin G20210A Variante mit anderer genetischen Variante wie z.B. dem Faktor V Leiden kombiniert ist, wird das Risiko für Thrombosen deutlich gesteigert, und diese Patienten sind nachweislich früher betroffen und durch Rezidive besonders gefährdet.⁹⁸

1.3.3. Thrombophile Risikofaktoren im Fibrinolyse-System

Während verschiedene Arbeiten auch im fibrinolytischen System thrombophile Risikofaktoren beschreiben, ist die Datenlage hierbei - verglichen mit den oben beschriebenen im hämostatischen System - deutlich stärker kontrovers.⁵⁴

Die bekanntesten thrombophilen Risikofaktoren im Fibrinolyse-System sind die Varianten Tissue Type Plasminogen Aktivator (t-PA) Intron h Insertion/Deletion und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G.¹² Wegen der Fokussierung dieser Arbeit auf die PAI-1 4G/5G Variante soll diese hier ausschließlich weitere Erwähnung finden.

PAI-1 4G/5G

Das humane PAI-1 Gen ist auf dem Chromosom 7 lokalisiert und enthält neun Exone und acht Introne.^{47,99} Der PAI-1 Genpromotor enthält an Position 675 nach der Initiationsstelle eine 4G/5G-Insertion bzw. -Deletion als Polymorphismus, dadurch liegen 4 oder 5 Guaninbasen vor (Abbildung 8). Der PAI-1 4G/5G Polymorphismus ist mit einer differentiellen Proteinexpression verbunden. Eine erhöhte Gentranskription ist mit dem 4G Allel assoziiert. In diesem Fall bindet in dieser Region lediglich ein Transkriptionsaktivator, während beim 5G Allel zusätzlich ein Repressorprotein gebunden wird.¹⁰⁰ Viele Studien zeigten, dass homozygote Träger des 4G Allels eine circa 25% höhere PAI-1 Plasmakonzentrationen als homozygote Träger des 5G Allels aufweisen.¹⁰¹⁻¹⁰⁴

Der PAI-1 4G/5G Polymorphismus ist in einer Vielzahl klinischer Arbeiten beschrieben worden, sowohl in Zusammenhang mit arteriellen^{60,105-107} als auch venösen Thrombosen, ohne dass jedoch eine abschließende Risikobewertung möglich ist. In mehreren Studien wurde die PAI-1 Variante 4G in Verbindung mit venösen Thromboembolien gebracht.^{62,108-113} Segui et al. fanden heraus, dass das Vorhandensein der PAI-1 4G Variante in Anwesenheit von anderen genetischen

Risikofaktoren das Thromboserisiko erhöht.¹⁰⁸ Das wurde in weiteren Untersuchungen von Akar et al. 2000, von Barcellona et al. 2003 und in einer Metaanalyse von Tsantes et al. bestätigt.^{109,112,113} In vielen anderen Studien wurde kein Zusammenhang zwischen der PAI-1 4G/5G Variante und venösen Thromboserisiko festgestellt.^{62,110,114,115} Die Datenlage zur Bedeutung von PAI-1 4G/5G Polymorphismus für venöse Thromboembolie ist daher widersprüchlich und uneinheitlich.

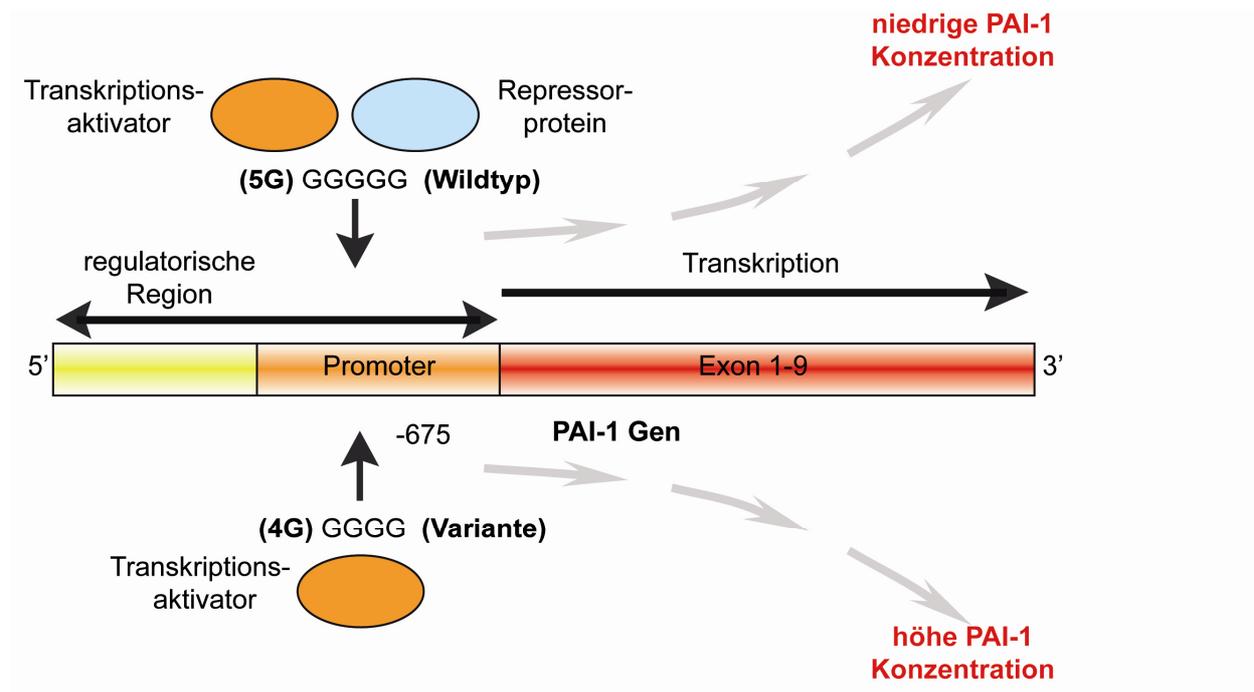


Abbildung 8. Organisation des PAI-1 Gens und funktionelle Bedeutung des PAI-1 4G/5G Genotyps (nach Kohler und Grant, 2000). Der PAI-1 Genpromotor enthält an Position 675 vor der Initiationsstelle eine 4G/5G-Insertion bzw. -Deletion als Polymorphismus. Der PAI-1 4G/5G Polymorphismus ist mit einer differentiellen Proteinexpression verbunden. Während beim 4G Allel ein Transkriptionsaktivator gebunden wird, kann beim 5G Allel zusätzlich ein Repressorprotein gebunden werden.

1.3.4. Labordiagnostisch fassbare VTE-Rezidivrisikofaktoren

Zum jetzigen Zeitpunkt sind nur wenige labordiagnostisch fassbare Parameter bzw. Konstellationen mit einem gesichert erhöhten Rezidivrisiko der VTE verbunden.

Zu den wichtigsten genetisch determinierten Risikofaktoren zählen Inhibitormangel-Zustände (Antithrombin, Protein C und S), der homozygote Faktor V Leiden, die Homozygotie für Prothrombin Variante G20210A oder Doppelt-Heterozygotie für Faktor V Leiden und die Prothrombin Variante G20210A.^{23,24} Darüber hinaus ist bekannt, dass Patienten mit einem gesicherten Phospholipidantikörpersyndrom ein deutlich erhöhtes Rezidivthromboserisiko aufweisen.^{25,26,34} Es war besonders erhöht bei Patienten, bei denen die orale Antikoagulation beendet worden war.³⁴ Aktuell laufen viele Studien, die einen Wiederanstieg der D-Dimer nach dem Beenden der initialen Antikoagulation als Prädiktor für ein späteres Rezidiv untersuchen.²⁷⁻²⁹ Hierbei muss beachtet werden, dass die D-Dimer Kontrolle nur bei Patienten mit spontaner VTE einen Stellenwert bei der Einschätzung des Rezidivrisikos zu haben scheint.³⁴

1.4. Fragestellungen dieser Arbeit

Die venöse Thromboembolie bleibt trotz Fortschritten in Diagnose und Therapie eine bedeutende Ursache für Morbidität und Mortalität.¹¹⁶ Eine Vielzahl an Risikofaktoren für venöse Thromboembolien ist heute bekannt. So werden, wie bereits oben erläutert, die Prothrombin Variante G20210A, der Faktor V Leiden, der Protein C/S- bzw. Antithrombinmangel für ein erhöhtes Thromboserisiko verantwortlich gemacht.

Die Beziehung zwischen dem fibrinolytischem System und VTE ist derzeit deutlich weniger eindeutig belegt. Daher wird im Rahmen dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen der venösen Thromboembolie und dem PAI-1 4G/5G Polymorphismus bzw. der PAI-1 Aktivität untersucht.

Es ergeben sich für diese Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Besteht im von uns untersuchten Kollektiv ein Zusammenhang zwischen PAI-1 4G/5G Genotyp und PAI-1 Aktivität und der VTE?
2. Ist eine erhöhte PAI-1 Aktivität als unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung der VTE nachweisbar?
3. Ist ein PAI-1 4G/5G Genotyp als unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung der VTE nachweisbar?

4. Besteht ein Zusammenhang zwischen einer PAI-1 Aktivität bzw. PAI-1 4G/5G Genotyp und idiopatischer vs. sekundärer VTE?
5. Liegt eine Korrelation zwischen dem Rezidivrisiko der venösen Thromboembolien und PAI-1 Aktivität bzw. PAI-1 4G/5G Genotyp vor?

Neben diesen primären Fragestellungen wird außerdem das Verhalten der D-Dimer, von Faktor VIII und Fibrinogen charakterisiert.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchte Studienkollektive

Die Beziehung zwischen PAI-1 Aktivität und klinischen Charakteristika wurden in einer VTE case-only Studie untersucht. Der Einfluss des PAI-1 4G/5G Genotyps auf die VTE wurde in einer case-control Studie betrachtet.

Patientenkollektiv

In der hämostaseologischen Ambulanz des Instituts für Transfusionsmedizin wurden konsekutiv Patienten im Rahmen einer retrospektiven case-only Studie in Zeitraum von 2005-2006 untersucht. Es wurden 551 konsekutive Patienten mit VTE und 595 ohne VTE in die Untersuchungen einbezogen. Die klinischen Daten dieser Patienten wurden retrospektiv erhoben, die labordiagnostische Charakterisierung erfolgte zum Zeitpunkt der Vorstellung. Da während der Schwangerschaft Erhöhungen von Faktor VIII, D-Dimeren, Fibrinogen und PAI-1 physiologisch sind, wurden aus dem Gesamtkollektiv alle Schwangeren ausgeschlossen. Die Patienten mit venösen Thromboembolien hatten anamnestisch einmalige oder rezidivierende thromboembolischen Ereignisse. Die Thromboselokalisation schloss tiefe venöse Thrombosen der unteren Extremität (TVT) und/oder Lungenembolien (LE) ein. Die Patientengruppe mit VTE wurde in vier Gruppen unterteilt: spontan (ohne äußeren Auslöser) versus nicht spontan, sowie rezidivierende versus nicht rezidivierende VTE. Als Auslöser wurden nur in der Literatur einheitlich verwendete expositionelle Risikofaktoren berücksichtigt: Operation, Trauma, Fraktur, Immobilisation in den vorausgegangenen 12 Wochen.¹¹ Sowohl Orale Kontrazeptiva als auch Flugreisen waren in mehreren verschiedenen Studien kein Ausschlusskriterium für die Definition spontaner VTE.¹¹ In der Patientengruppe ohne VTE wurden Patienten ohne anamnestische und klinische Hinweise auf thromboembolische Erkrankung eingeschlossen.

Kontrollkollektiv (für Untersuchungen zum PAI-1 4G/5G Genotyp)

265 gesunde konsekutive Kontrollpersonen wurden 2004 aus dem Kollektiv von Blutspendern der Charite untersucht. Die Kontrollpersonen wurden im Rahmen einer Blutspende auf die Möglichkeit der zusätzlichen Untersuchung hingewiesen, aufgeklärt und das Einverständnis

eingeholt. Eingeschlossen wurden nur die Personen, die an diesem Tag zur Blutspende zugelassen wurden und die folgenden Einschlusskriterien erfüllten: Alter zwischen 18 und 68 Jahren, in der Vorgeschichte keine venöse Thromboembolie, keine Tumorleiden, keine akuten und chronischen Erkrankungen (s. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten 2005, mit Richtlinienanpassung 2010).

2.2. Probensammlung

Bei der Vorstellung in der Gerinnungsambulanz wurde den Patienten mit einer großlumigen Kanüle EDTA- und Citrat-Blut entnommen. Nach der Punktion wurde die Stauung rasch gelöst, um eine iatrogene Aktivierung der Gerinnung zu vermeiden. Zuerst wurden EDTA-Röhrchen, dann die Citrat-Röhrchen gefüllt. Das Blut wurde sogleich gründlich mit der Citratlösung gemischt, um eine Gerinnungsaktivierung zu verhindern. Die Proben wurden innerhalb von 2-4 Stunden in das Labor gebracht und analysiert.

Die PAI-1 Aktivität weist starke tageszeitliche Schwankungen auf, deswegen wurden die Proben immer bis 10.00 Uhr abgenommen.

2.3. Übersicht der untersuchten Parameter

Parameter	Verfahren	Probenmaterial	Reagenz
PAI-1	chromogen	Citrat-Plasma	Berichrom PAI Testkit (Dade Behring)
PAI-1 4G/5G	PCR	EDTA-Vollblut	In House PCR, GenoM6 (Genovision, USA) ¹¹⁷
Faktor VIIIc	chromogen	Citrat-Plasma	Faktor VIII Chromogen Testkit (Dade Behring)
D-Dimer	immunturbidmetrisch	Citrat-Plasma	Innovance D-Dimer Kit (Dade Behring)
Fibrinogen	koagulometrisch	Citrat-Plasma	Multifibren U

PAI-1: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1

2.4. Hämostaseologische Teste

Chromogene Analytik

Die PAI-1 Aktivität wurde mit dem Fibrinolysis Parameter Assay (FIPA) bestimmt. Das Prinzip der Methode besteht darin, dass PAI in der Probe Urokinase inaktiviert. Anhand der Umwandlung von Plasminogen in Plasmin wird die Restaktivität der Urokinase bestimmt. Das entstandene Plasmin wird über die Spaltung eines chromogenen Substrats bei 405 nm gemessen.

Verwendete Reagenzien: Berichrom PAI Test Kit Dade Behring Marburg/Deutschland

Normalbereich: 0,3-3,5 U/ml

Gerät: BSC System/Dade Behring

Zur chromogenen Erfassung der Faktor VIII Aktivität wird zunächst Faktor VIII durch Thrombin aktiviert. Der aktivierter Faktor VIII (F VIIIa) beschleunigt dann die Umwandlung von Faktor X zu Faktor Xa in Gegenwart von aktiviertem Faktor IX, Phospholipiden und Calciumionen. Die Faktor Xa-Aktivität wird durch Hydrolyse eines Faktor Xa-spezifischen p-Nitroanilid-Substrates (pNA) gemessen. Die Menge des freigesetzten pNA, gemessen bei 405 nm, ist proportional zur Faktor Xa-Aktivität, folglich zur Faktor VIII-Aktivität der Probe.

Verwendete Reagenzien: Faktor VIII Chromogen Testkit Dade Behring Marburg/Deutschland

Normalbereich: 50-175 %

Gerät: BSC System/Dade Behring

Koagulometrische Analytik

Die Fibrinogen Quantifizierung erfolgte nach Modifikation der Methode nach Clauss. Citrat-Plasma wird mit einem großen Überschuss an Thrombin zur Gerinnung gebracht. Die Gerinnungszeit hängt hierbei weitgehend vom Fibrinogengehalt der Probe ab.

Verwendete Reagenzien: Multifibren U Dade Behring Marburg/Deutschland

Normalbereich: 1,5-4,5 g/l

Gerät: BSC System/Dade Behring

Immunologische Analytik

Die Bestimmung der D-Dimer Konzentration erfolgte mit einem partikelverstärkten, immunturbidmetrischen Test. Polystyrolpartikel, die kovalent mit einem monoklonalen Antikörper (8D3) beladen sind, aggregieren, wenn sie mit D-Dimer enthaltenden Proben gemischt werden. Die Detektion erfolgt immunturbidmetrisch. Dadurch wird die Quantifizierung von D-Dimer in Humanplasma ermöglicht.

Verwendete Reagenzien: Innovance D-Dimer Kit Dade Behring Marburg/Deutschland

Normalbereich: 50-200 µg/l

Gerät: BSC System/Dade Behring

2.5. Molekularbiologische Untersuchungsmethoden

Isolierung der genomischen DNA

DNA Proben wurden von 551 Patienten mit VTE und 265 Kontrollpersonen gewonnen. Genomische DNA wurde aus EDTA-Blut mittels eines kommerziell verfügbaren DNA Isolierungs-Kits (GenoM6 von Genovision, USA) isoliert.¹¹⁷ Die DNA-Konzentration lag jeweils bei ca. 50 ng/µl.

Alle Primer wurden synthetisiert und gereinigt durch TIB-MOLBIOL (Berlin). Die PCR wurde mit einem Gesamtvolumen von 10 µl, bestehend aus 5 µl Primermix und 5 µl Mastermix, wie unten beschrieben, durchgeführt.

Primer-Mixe und Komponenten des PCR Assays

Die allelspezifischen Sense (S) und Antisense (AS) Primer wurden mit einer End-Konzentration von 1,25 µmol/l in einem Volumen von 5 µl vorgelegt. Die Endkonzentrationen des Primers für die Co-Amplifikation der internen Kontrolle (HGF) waren jeweils 0,25 µmol/l für S und AS. Die Endkonzentrationen der weiteren Bestandteile der Amplifikationsreaktionen waren: PCR-Puffer (Perkin Elmer), PCR-Puffer G (Invitrogen), dNTP (10 mM; Perkin Elmer), Glycerin (5%; Sigma), Kresolrot (1%; Sigma), DNA (100 ng/µl) und Platinum Taq DNA Polymerase (5 IU/µl, Invitrogen).

Die allelspezifischen Primer werden zunächst auf eine Konzentration von 100 µM mit ddH₂O eingestellt. Die Primermixe werden mit dem Hydra II Abfüllautomaten aliquotiert.

PCR Amplifikation und Gelelektrophorese

Die Amplifizierung der Faktoren wurde in drei Schritten in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 9600 oder 9700) durchgeführt. Auf einen Denaturierungsschritt (96°C, 2 min) folgten 10 weitere Zyklen mit Denaturierung (96°C, 15 sec) und Hybridisierung (65°C, 60 sec), und abschließende 20 Zyklen mit Denaturierung (96°C, 10 sec), Hybridisierung (61°C, 50 sec) und DNA – Extension (72°C, 30 sec). Zehn-Mikroliter Proben der PCR Produkte wurden in einem 25%-igen Agarosegel mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid elektrophoretisch (Zielparameter: 200 mA, Laufzeit: 32 min) aufgetrennt und die Bandenmuster unter UV-Licht dargestellt und fotografisch für die Auswertung festgehalten.

2.6. Statistische Auswertungen

Die statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe der Statistica (Software StatSoft Inc.) Version 7. Zunächst wurden die Populationscharakteristika des Gesamtkollektivs dargestellt. Die Patienten wurden hinsichtlich ihrer klinischen Risikofaktoren in verschiedene Untergruppen aufgeteilt: Patienten mit spontanen/nicht spontanen bzw. rezidivierenden/nicht rezidivierenden VTE.

Bei der Testung auf Normalverteilung konnte diese weder für die Kovariable Alter, noch für den BMI in einem der Kollektive gezeigt werden, die mit dem Kolmogorov–Smirnov Test berechneten p –Werte lagen bei < 0,001. Daher erfolgt die Angabe der Daten als Perzentilen (Quartilen) mit dem jeweiligen Median. Die Berechnung der Signifikanzniveaus erfolgte mit dem nicht parametrischen Mann–Whitney U Test und Kruskal-Wallis-Test.

Für die Bestimmung des Risikos wurde die Odds-Ratio (OR) bestimmt. Zur Angabe von Odds wird die Zahl der Ereignisse dividiert durch die Zahl der Nicht-Ereignisse (Tabelle 1).¹¹⁸ Es gilt dann Odds Ratio = ad/bc.

Tabelle 1.

	Mit Risikofaktor	ohne Risikofaktor
Krank	a	b
Gesund	c	d

Ist $OR = 1$, so sind die Erkrankungschancen unter Exposition und Nicht-Exposition gleich. Wird $OR > 1$, so ist die Erkrankungschance unter Exposition größer als unter Nicht-Exposition. Im Falle, dass $OR < 1$, ist die Situation einer Protektion gegeben. Die Odds Ratio wurden immer mit 95% Konfidenzintervallen angegeben. Wenn diese Intervalle den Wert „1“ nicht umfassen, wird das Ergebnis als signifikant bezeichnet.

Die angegebenen Signifikanzen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) ermittelt.

Bei statistischen Analysen in Bezug auf den PAI-1 4G/5G Genotyp wurde entweder der Trägerstatus (4G-Variantenträger vs. 5G/5G-Wildtyp) oder aber die Anzahl der 4G-Allele (5G/5G-Wildtyp vs. 4G heterozygot vs. 4G homozygot) mit den betrachteten Zielgrößen in Beziehung gesetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Demographische Charakteristika der Studienpopulation

Insgesamt wurden 1411 Individuen in die Untersuchungen einbezogen. Es wurden 551 Patienten mit tiefer Venenthrombose (TVT) und/oder Lungenembolie (LE) und 595 ohne venöse Thromboembolie (non VTE) untersucht. Das Kontrollkollektiv umfasste 265 gesunde Blutspender.

Um den Einfluss der PAI-1 Aktivität und anderer Laborparameter (Faktor VIII, D-Dimer, Fibrinogen) auf klinische Charakteristika detailliert zu betrachten, wurde die Gesamtgruppe mit venösen Thromboembolien in spontane/nicht spontane bzw. rezidivierende/nicht rezidivierende Ereignisse aufgeteilt.

Die demografischen Daten sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2. Demographische Daten

	<u>VTE</u>					<u>non VTE</u>	<u>Kontrolle</u>
	insgesamt (n=551)	spontan (n=332)	nicht spontan (n=219)	rezidivierend (n=119)	nicht rezidivierend (n=432)	(n=595)	(n=265)
n (%)							
<hr/>							
Geschlecht, n (%)							
weiblich	357 (65)	220 (66)	137 (63)	73 (61)	284 (66)	446 (75)	171 (65)
männlich	194 (35)	112 (34)	82 (37)	46 (39)	148 (34)	149 (25)	95 (35)
Alter, median (IQR)	48 (38-61)	50 (39-63)	46 (38-55)	54 (44-62)	46 (36-59)	40 (26-51)	38 (29-49)
BMI, median (IQR)	26 (24-30)	26 (24-30)	26 (23-30)	26 (23-39)	26 (24-31)	24 (21-27)	24 (22-27)

VTE: venöse Thromboembolie; BMI: Body Mass Index; IQR: Interquartile Range (25.-75. Perzentile)

Die Patientengruppe mit VTE bestand aus 357 Frauen und 194 Männern. Auch in der nicht VTE-Gruppe überwogen die Patientinnen (446 Frauen, 149 Männer). Das Medianalter der Patienten mit VTE lag bei 48 Jahren, ohne VTE bei 40 Jahren ($p < 0,001$) und in der Kontrollgruppe bei 38 Jahren ($p < 0,001$). Die Patienten mit VTE hatten einen signifikant höheren BMI im Vergleich zur Patientengruppe ohne VTE ($p < 0,001$) und der Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Die Datenlage untermauert die Vermutung, dass diese Ergebnisse selektionsbedingt sind.

3.2. Beziehung zwischen PAI-1 4G/5G Genotyp und PAI-1 Aktivität

Da die PAI-1 Plasmakonzentration sowohl von Umweltfaktoren als auch dem genetischen Hintergrund beeinflusst werden, wurde die Auswirkung des PAI-1 4G/5G Genotyps auf die PAI-1 Aktivität untersucht. Bei der graphischen Darstellung wurden Boxplots verwendet. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 9, 9a, 9b, 9c und 10 dargestellt.

In einem Boxplot werden graphisch die 25% und 75% Quantile als untere und obere Begrenzung des Boxplots dargestellt. Ein Boxplot ermöglicht die Darstellung der Auswirkung des PAI-1 4G/5G Genotyps auf PAI-1 Aktivität innerhalb eines Gesamtkollektives und vor allem die Gegenüberstellung der Subgruppen. Es wurde entweder der Trägerstatus (4G-Variantenträger vs. 5G/5G-Wildtyp) oder aber die Anzahl der 4G-Allele (5G/5G-Wildtyp vs. 4G heterozygot vs. 4G homozygot) mit den betrachteten Zielgrößen in Beziehung gesetzt.

Bei der Analyse der Abhängigkeit der PAI-1 Aktivität vom PAI-1 4G/5G Genotyp in der Gesamtgruppe (VTE und non VTE, 1146 Individuen) fand man zunächst bei einer allelzahlbezogenen Betrachtung keine signifikante Beziehung (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,09$; Abbildung 9).

Bei einer Gegenüberdarstellung von PAI-1 5G/5G vs. PAI-1 4G-Träger zeigte sich eine signifikante Erhöhung der PAI-1 Aktivität bei 4G-Trägern (Mann-Whitney-U Test, $p = 0,027$; Abbildung 9a).

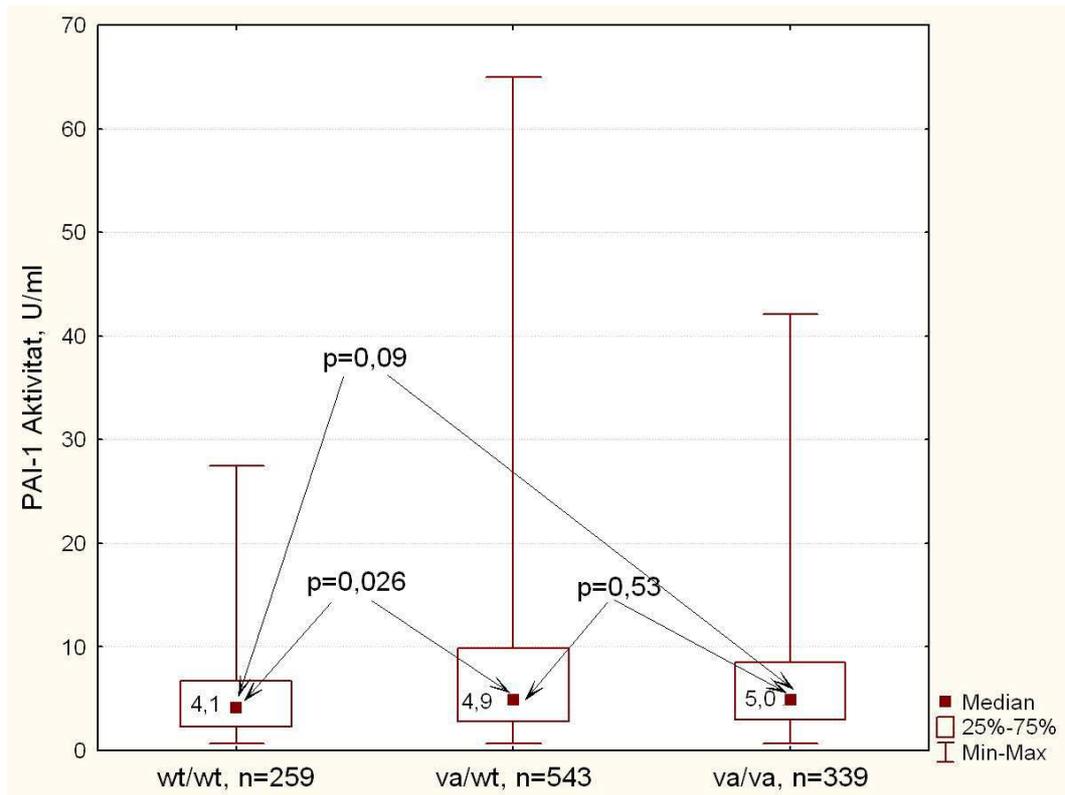


Abbildung 9. Abhängigkeit der PAI-1 Aktivität vom PAI-1 4G/5G Genotyp im Gesamtkollektiv (VTE und non VTE). Im Gesamtkollektiv zeigte sich eine signifikante Erhöhung der PAI-1 Aktivität bei Heterozygotie 4G/5G (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,026$), während bei Homozygotie für 4G keine signifikante Beziehung erkennbar war (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,09$).

(wt/wt: 5G/5G-Wildtyp, va/wt: heterozygote 4G/5G Variante, va/va: homozygote 4G/4G Variante)

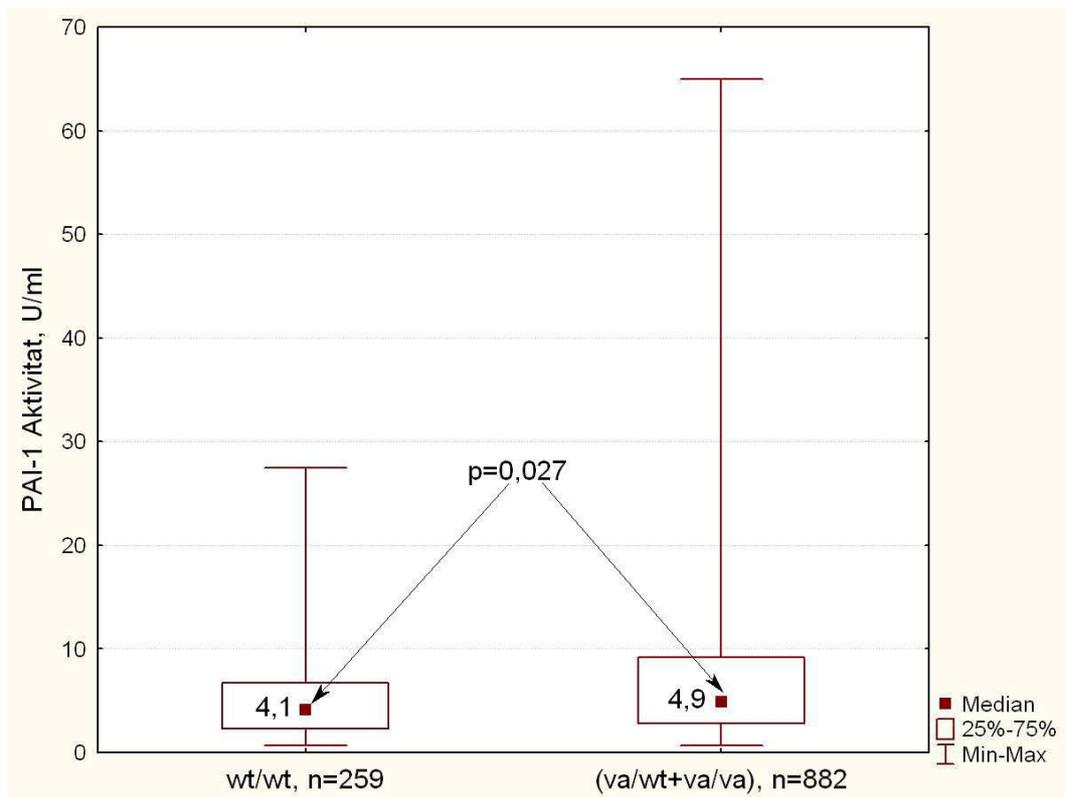


Abbildung 9a. Abhängigkeit der PAI-1 Aktivität vom PAI-1 4G/5G Genotyp (4G-Allel) im Gesamtkollektiv (VTE und non VTE). 4G-Träger wiesen im Gesamtkollektiv eine signifikante Erhöhung der PAI-1 Aktivität auf (Mann-Whitney-U Test, $p=0,027$).

(wt/wt: 5G/5G-Wildtyp, va/wt: heterozygote 4G/5G Variante, va/va: homozygote 4G/4G Variante)

Bei der Untersuchung der Abhängigkeit der PAI-1 Aktivität vom PAI-1 4G/5G Genotyp in der VTE-Gruppe zeigte sich bei einer allelzahlbezogenen Betrachtung eine Beziehung, die das Signifikanzniveau von $p<0,05$ erreichte (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,046$; Abbildung 9b).

Bei einer Gegenüberdarstellung von PAI-1 5G/5G vs. PAI-1 4G-Träger war keine signifikante Erhöhung der PAI-1 Aktivität bei 4G-Trägern erkennbar (Mann-Whitney-U Test, $p=0,10$; Abbildung 9c). Insgesamt war der Unterschied der medianen PAI-1 Aktivität in Abhängigkeit vom PAI-1 4G/5G Genotyp zahlenmäßig stärker bei der VTE-Gruppe als im Gesamtkollektiv (VTE und non VTE) ausgeprägt.

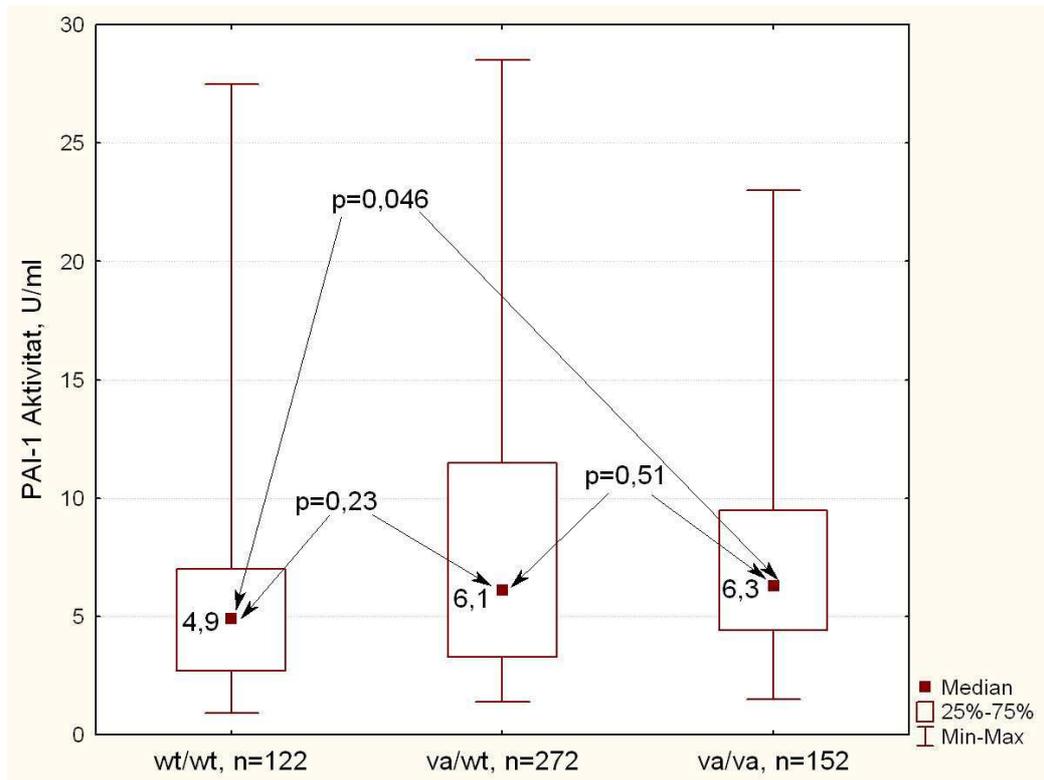


Abbildung 9b. Abhängigkeit der PAI-1 Aktivität vom PAI-1 4G/5G Genotyp im VTE-Kollektiv. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der PAI-1 Aktivität in Abhängigkeit vom PAI-1 4G/5G Genotyp (homozygote 4G/4G Variante) in der VTE-Gruppe (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,046$).

(wt/wt: 5G/5G-Wildtyp, va/wt: heterozygote 4G/5G Variante, va/va: homozygote 4G/4G Variante).

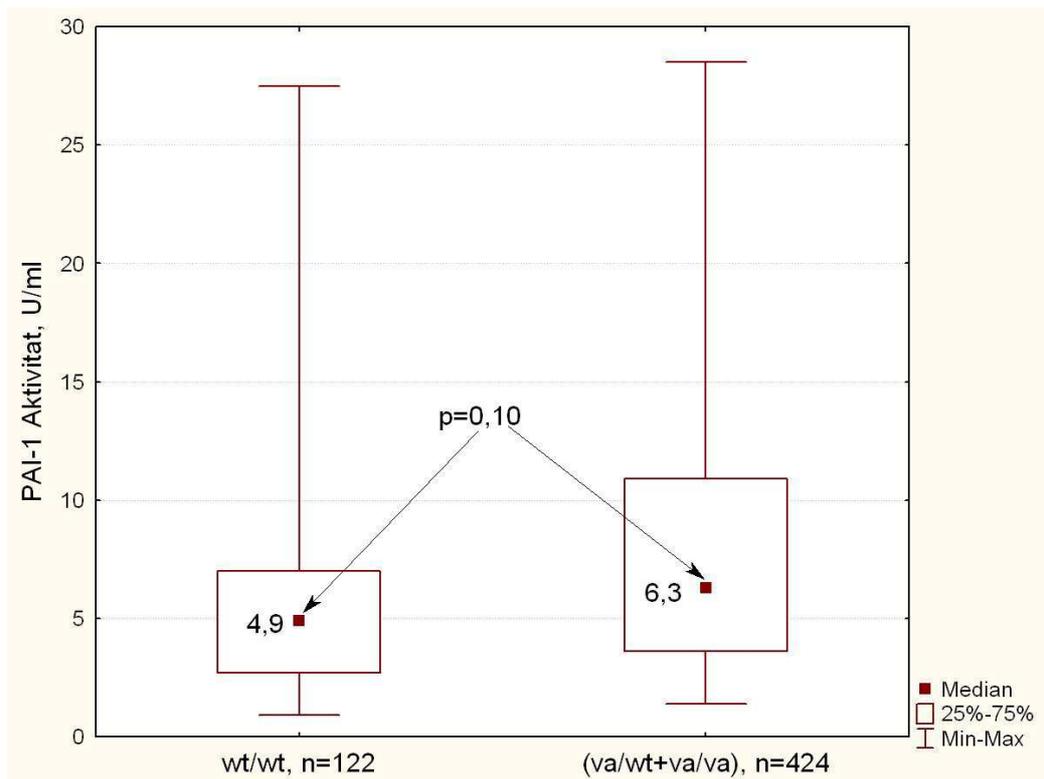


Abbildung 9c. Abhängigkeit der PAI-1 Aktivität vom PAI-1 4G/5G Genotyp (4G-Allel) im VTE-Kollektiv. Die PAI-1 Aktivität bei 4G-Trägern im Patientenkollektiv mit VTE zeigte eine Tendenz zu höheren Werten, erreichte jedoch keine statistisch signifikant höheren Werte (Mann-Whitney-U Test, $p=0,10$).

(wt/wt: 5G/5G-Wildtyp, va/wt: heterozygote 4G/5G Variante, va/va: homozygote 4G/4G Variante).

In einer Betrachtung der einzelnen PAI-1 Genotypen im Vergleich zwischen non VTE- und VTE-Patienten zeigte sich ein mit der 4G-Kopiezahl zunehmender Unterschied zwischen der PAI-1 Aktivität im non VTE und VTE Kollektiv (Abbildung 10). Während sich bei Wildtyp die PAI-1 Aktivität in der non VTE-Gruppe mit 3,5 U/ml Medianwert zeigte, ist die PAI-1 Aktivität mit 4,9 U/ml höher in der VTE-Gruppe, aber es stellte keinen signifikanten Unterschied dar (Mann-Whitney-U Test, $p=0,06$). Bei heterozygoter 4G/5G Variante zeigte sich eine signifikante Erhöhung der PAI-1 Aktivität in der VTE-Gruppe vs. non VTE ($p=0,028$). Beim Vergleich zwischen non VTE- und VTE-Gruppe bei homozygoter 4G/4G Variante wurde hochsignifikanter Unterschied der PAI-1 Aktivität nachgewiesen ($p<0,001$).

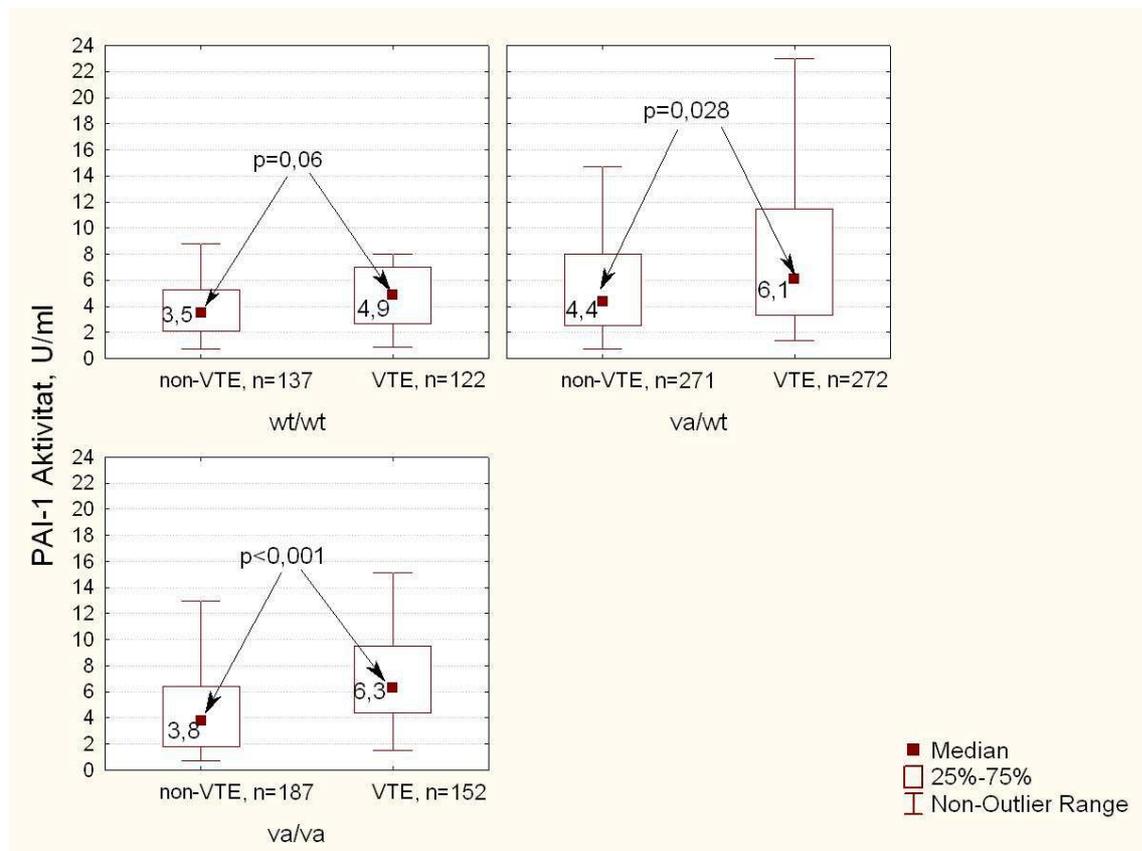


Abbildung 10. Abhängigkeit der PAI-1 Aktivität vom PAI-1 4G/5G Genotyp in den Subgruppen: VTE vs. non VTE. Beim 5G/5G-Genotyp zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der PAI-1 Aktivität zwischen beiden Patienten-Gruppen (Mann-Whitney-U Test, $p=0,06$), mit jedem weiteren 4G-Allel nahm der Unterschied der PAI-1 Aktivitäten zwischen VTE und non VTE Patienten jedoch signifikant zu (Mann-Whitney-U Test, $p=0,028$ beim 4G/5G-Genotyp, $p<0,001$ beim 4G/4G-Genotyp).
(wt/wt: 5G/5G-Wildtyp, va/wt: heterozygote 4G/5G Variante, va/va: homozygote 4G/4G Variante)

Bei der Analyse der Abhängigkeit der PAI-1 Aktivität vom PAI-1 4G/5G Genotyp in den verschiedenen VTE-Untergruppen war eine signifikant höhere PAI-1 Aktivität bei 4G-Trägern im Vergleich zum Wildtyp in der Patientengruppe mit spontaner VTE erkennbar (Mann-Whitney-U Test, $p=0,028$; Abbildung 11). Eine weitere Subgruppierung in spontane VTE mit bzw. ohne Rezidiv war wegen der Fallzahl nicht möglich.

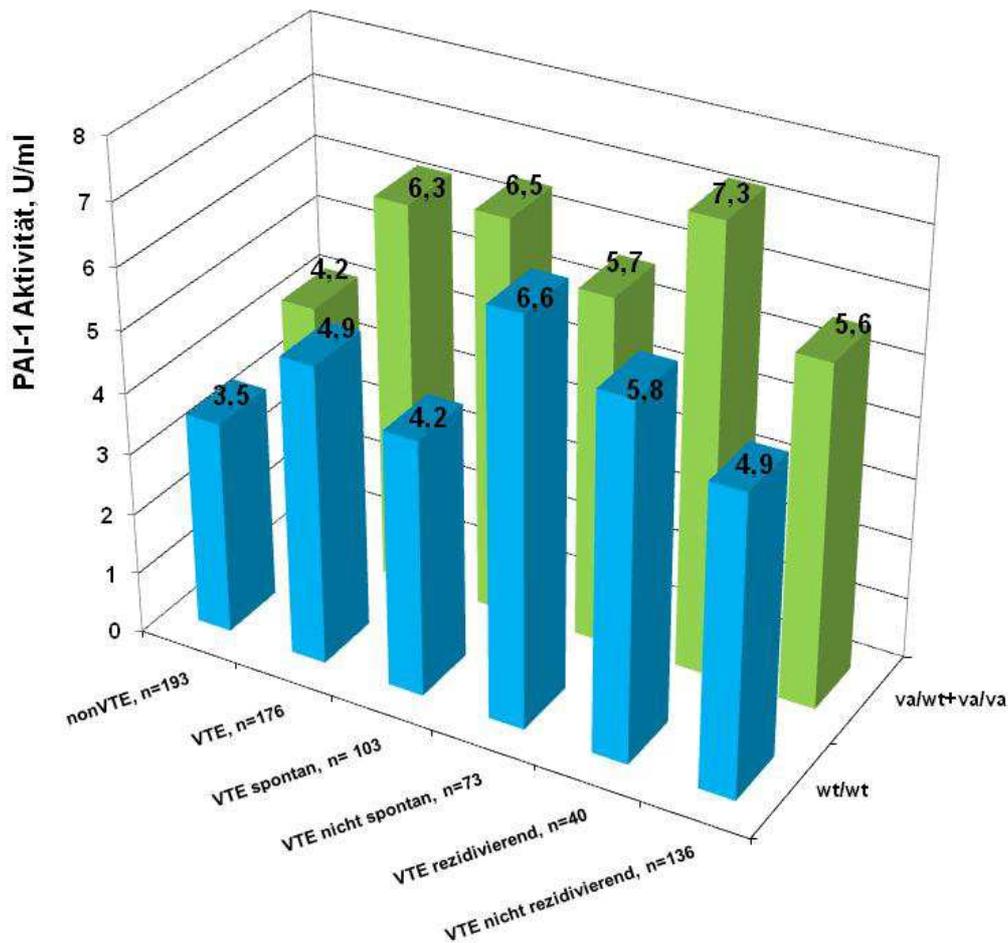


Abbildung 11. Abhängigkeit der PAI-1 Aktivität vom PAI-1 4G/5G Genotyp in verschiedenen Patientengruppen. Es kann gezeigt werden, dass es eine signifikant höhere PAI-1 Aktivität bei 4G-Trägern im Vergleich zum Wildtyp nur in der Patientengruppe mit spontaner VTE erkennbar war (Mann-Whitney-U Test, $p=0,028$).

(wt/wt: 5G/5G-Wildtyp, va/wt: heterozygote 4G/5G Variante, va/va: homozygote 4G/4G Variante)

Bei weiterer Substratifizierung des VTE-Kollektivs in Patientengruppen ohne bekannten genetisch determinierten Risikofaktoren (Faktor V Leiden, Prothrombin G20210A Variante) zeigte sich keine signifikante Erhöhung der PAI-1 Aktivität in Abhängigkeit vom PAI-1 4G/5G Genotyp (Mann-Whitney-U Test, Tabelle 3).

Eine weitere Subgruppierung in Patientengruppen, die für Faktor V Leiden bzw. die Prothrombin G20210A Variante negativ sind, mit bzw. ohne Rezidiv war wegen der geringen Fallzahl nicht möglich.

Tabelle 3. Abhängigkeit der PAI-1 Aktivität im Median vom PAI-1 4G/5G Genotyp in Patientengruppen, die für Faktor V Leiden bzw. Prothrombin G20210A Variante negativ sind; (wt/wt: 5G/5G-Wildtyp, va/wt: heterozygote 4G/5G Variante, va/va: homozygote 4G/4G Variante).

PAI-1 4G/5G

VTE n	wt/wt	va/wt	va/va	Mann-Whitney-U Test		
	1	2	3	1-2	2-3	1-3
Faktor V Leiden (-)	6,6 (4,3-7,6) n=19	7,3 (3,7-13,8) n=64	6,6 (4,6-9,5) n=37	0,54	0,72	0,43
Prothrombin G20210A (-)	4,9 (2,7-7,0) n=29	5,7 (3,1-10,5) n=84	6,2 (4,4-8,7) n=53	0,35	0,42	0,07

Median (IQR, 25.-75. Perzentile); wt/wt: 5G/5G-Wildtyp, va/wt: heterozygote 4G/5G Variante, va/va: homozygote 4G/4G Variante; (-): Wildtyp.

3.3. Assoziation der PAI-1 Aktivität sowie weiterer hämostaseologischer Parameter mit der VTE

Bei einer Untersuchung der PAI-1 Aktivität sowie weiterer Laborparameter (Tabelle 4) im Vergleich zwischen VTE und non VTE-Patienten zeigte sich, dass sich die VTE-Patienten durch signifikant höhere Aktivität für Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 und Faktor VIII im Vergleich zu non VTE-Patienten auszeichneten ($p < 0,001$).

Hinsichtlich der D-Dimer und Fibrinogenkonzentration waren keine Unterschiede zwischen den Patientengruppen nachweisbar.

Tabelle 4. Aktivitäten bzw. Konzentrationen von PAI-1, Faktor VIII, D-Dimer und Fibrinogen im Vergleich zwischen VTE- und non VTE-Gruppe

Parameter	VTE (n=551)	non VTE (n=595)	Mann-Whitney-U Test P-Wert
PAI-1 Aktivität (U/ml)	6,0 (3,6-9,9)	4,0 (2,2-7,2)	<0,001
Faktor VIII (%)	178 (143-211)	147 (117-180)	<0,001

D-Dimer (µg/l)	121 (71-179)	130 (80-203)	0,07
Fibrinogen (g/l)	3,0 (2,7-3,8)	3,0 (2,6-3,7)	0,06

Median (IQR, 25.-75. Perzentile)

Im Folgenden wurde der Einfluss der beschriebenen Parameter auf die Genese (spontan/nicht spontan) und das Rezidivrisiko der venösen Thromboembolien untersucht. Beim Vergleich der VTE-Gruppe, spontan vs. nicht spontan (Tabelle 5) zeigte sich lediglich ein signifikanter Unterschied in der Faktor VIII Aktivität (Median 180% vs. 172%, $p = 0,03$).

Tabelle 5. Aktivitäten bzw. Konzentrationen von PAI-1, Faktor VIII, D-Dimer und Fibrinogen im Vergleich zwischen den VTE-Gruppen (spontan/nicht spontan)

Parameter	VTE spontan (n=332)	VTE nicht spontan (n=219)	Mann-Whitney-U Test P-Wert
PAI-1 Aktivität (U/ml)	6,3 (3,7-10,1)	5,9 (3,6-9,8)	0,92
Faktor VIII (%)	180 (150-215)	172 (138-204)	0,030
D-Dimer (µg/l)	120 (78-177)	122 (63-181)	0,90
Fibrinogen (g/l)	3,2 (2,7-4,0)	3,0 (2,7-3,7)	0,13

Median (IQR, 25.-75. Perzentile)

Das gleiche Bild (Tabelle 6) findet man beim Vergleich zwischen den VTE-Gruppen (rezidivierend vs. nicht rezidivierend): Faktor VIII (Median 186% vs. 176%, $p = 0,012$).

Tabelle 6. Aktivitäten bzw. Konzentrationen von PAI-1, Faktor VIII, D-Dimer und Fibrinogen im Vergleich zwischen den VTE-Gruppen (rezidivierend/nicht rezidivierend)

Parameter	VTE rezidivierend (n=119)	VTE nicht rezidivierend (n=432)	Mann-Whitney-U Test P-Wert
PAI-1 Aktivität (U/ml)	6,8 (4,8-10,0)	5,5 (3,6-9,9)	0,19
Faktor VIII (%)	186 (156-225)	176 (141-208)	0,012
D-Dimer (µg/l)	120 (70-165)	123 (70-182)	0,52

Fibrinogen (g/l)	3,1 (2,7-4,0)	3,0 (2,7-3,8)	0,44
Median (IQR, 25.-75. Perzentile)			

Beim Vergleich der Subgruppen (spontan vs. nicht spontan, rezidivierend vs. nicht rezidivierend) fanden sich keine signifikanten Abweichungen bezüglich PAI-1 Aktivität, D-Dimer und Fibrinogen.

3.4. Assoziation von PAI-1 Aktivität und VTE-Risiko

Zwischen der PAI-1 Aktivität und dem Alter der untersuchten Patienten zeigte sich eine schwach positive Korrelation ($r = 0,28$, $p < 0,001$). Die Korrelation zwischen der PAI-1 Aktivität und dem BMI der untersuchten Patienten war relativ stark ausgeprägt ($r = 0,40$, $p < 0,001$).

Um den Einfluss des PAI-1 möglichst isoliert zu beschreiben, wurde korrigierte Berechnungen bezüglich des Alters und des BMI durchgeführt. Die Berechnung erfolgte mit einer binär logistischen Regression, da die abhängige Variable binär verteilt ist (VTE ja/nein) (Tabelle 7). Es zeigte sich eine negative Assoziation erhöhter PAI-1 Aktivität mit dem Auftreten der VTE, die unabhängig von Alter und BMI war.

Tabelle 7. Ergebnisse der binär logistischen Regression bzgl. einer stattgehabten VTE als abhängige Variable.

	Regressions- koeffizient B	Standardfehler	P-Wert
Alter	0,006	0,002	0,000
BMI	0,013	0,005	0,011
PAI-1 Aktivität	-0,001	0,004	0,853
Konstante	-0,120	0,126	0,341

3.5. PAI-1 4G/5G Genotyp, Faktor V Leiden, der Prothrombin Variante G20210A und VTE-Risiko

Es wurden die Häufigkeit des PAI-1 4G/5G Genotyps, Faktor V Leiden, der Prothrombin Variante G20210A und deren Kombinationen bei 551 VTE Patienten und 265 Kontrollen untersucht (Tabelle 8).

Hinsichtlich der Genotyp-Verteilung zwischen VTE-Patienten und Gesunden der Kontrollgruppe bestanden weder bei einer allelzahlbezogenen Betrachtung noch bei einer Untersuchung des 4G-Trägerstatus eine relevante Abweichung zwischen Patienten und Kontrollgruppe (Tabelle 8). 157 Patienten (28,5%) waren Träger des genetischen Polymorphismus für Faktor V Leiden (G1691A, Faktor V Leiden), verglichen mit 22 Personen (8,3%) im Kontrollkollektiv. Die Odds Ratio (95% CI) war mit 4,65 (2,90-7,47) signifikant von 1 verschieden. Die Prothrombin Variante G20210A war mit 27 Patienten (4,9%) gegenüber 10 Kontrollpersonen tendenziell häufiger (Odds Ratio 1,31 (0,63-2,76)), aber nicht signifikant. Dies ist möglicherweise auf die kleinere Fallzahl zurückzuführen.

Der Prozentsatz von Patienten mit Faktor V Leiden und PAI-1 4G/5G oder 4G/4G Genotyp war mit 28,4% im Vergleich zu 8,7% vom Kontrollkollektiv deutlich verschieden, aber ähnlich wie die Frequenzen für Faktor V Leiden allein. In analoger Weise war kein Unterschied in der Kombination mit Prothrombin Variante G20210A erkennbar (Tabelle 8). Infolgedessen ist PAI-1 4G/5G Genotyp kein signifikanter zusätzlicher Risikofaktor für VTE.

Tabelle 8. Häufigkeit und Odds-Ratio des PAI-1 4G/5G Genotyps, Faktor V Leiden, der Prothrombin Variante G20210A und deren Kombinationen bei 551 VTE Patienten und 265 Kontrollen. Berücksichtigung der heterozygoten (1) und der homozygoten (2) Variante.

	VTE n (%)	Kontrolle n (%)	Odds- Ratio	95% CI	p
Gesamtzahl	551 (100)	265 (100)			
PAI-1 4G/5G 1	277 (50,3)	131 (49,4)	0,99	0,68-1,44	0,95
PAI-1 4G/5G 2	152 (27,6)	77 (29,1)	0,92	0,61-1,40	0,70
PAI-1 4G/5G (1+2)	429 (77,9)	208 (78,4)	0,96	0,68-1,37	0,84

FV Leiden (1+2)	157 (28,5)	22 (8,3)	4,65	2,90-7,47	<0,001
Prothrombin					
G20210A (1+2)	27 (4,9)	10 (3,8)	1,31	0,63-2,76	0,47
FV Leiden (1+2) +					
PAI-1 4G/5G (1+2)	122 (28,4)	18 (8,7)	4,19	2,48-7,10	<0,001
Prothrombin					
G20210A (1+2) +					
PAI-1 4G/5G (1+2)	18 (4,2)	8 (3,9)	1,09	0,47-2,56	0,83

3.6. PAI-1 4G/5G Genotyp und klinische Charakteristika der VTE

Trotz der signifikanten Differenz in der PAI-1 Aktivität zwischen Patienten mit spontanen und nicht spontanen VTE hatte der PAI-1 4G/5G Genotyp selbst keinen Einfluss auf die klinische Charakteristika der venösen Thromboembolien (Tabelle 9 und 10). Die PAI-1 4G/4G Variante wurde bei 26,81% der Patienten mit spontanen VTE und bei 28,77% der Patienten mit nicht spontanen VTE nachgewiesen ($p=0,73$).

Tabelle 9. PAI-1 4G/5G Genotyp bei spontanen bzw. nicht spontanen VTE

VTE	PAI-1 4G/5G			Gesamt
	wt/wt	va/wt	va/va	
n (%)				
spontan	77 (23,19)	166 (50,00)	89 (26,81)	332 (100,0)
nicht spontan	45 (20,55)	111 (50,68)	63 (28,77)	219 (100,0)
Gesamt	122	277	152	551

Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) $p=0,73$

wt/wt: 5G/5G-Wildtyp, va/wt: heterozygote 4G/5G Variante, va/va: homozygote 4G/4G Variante

In analoger Weise waren keine signifikante Unterschiede in der Genotyp-Verteilung zwischen VTE-Gruppen nachweisbar (rezidivierend/nicht rezidivierend, Tabelle 10).

Tabelle 10. PAI-1 4G/5G Genotyp bei rezidivierender bzw. nicht rezidivierender VTE

VTE	PAI-1 4G/5G			Gesamt
	wt/wt	va/wt	va/va	
n (%)				
rezidivierend	23 (19,33)	61 (51,26)	35 (29,41)	119 (100,0)
nicht rezidivierend	99 (22,92)	216 (50,00)	117 (27,08)	432 (100,0)
Gesamt	122	277	152	551

Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) p=0,68

wt/wt: 5G/5G-Wildtyp, va/wt: heterozygote 4G/5G Variante, va/va: homozygote 4G/4G Variante

4. Diskussion

Die Venöse Thromboembolie ist eine chronisch-rezidivierende multifaktorielle Erkrankung, die mit zunehmendem Alter in ihrer Häufigkeit dramatisch ansteigt. Die VTE lässt sich anhand klinisch oder labordiagnostisch fassbarer Parameter in Subgruppen unterteilen. Entscheidend für das Auftreten der VTE ist die bislang nicht ausreichend charakterisierbare Wechselwirkung zwischen dem genetischen Hintergrund (Disposition) und Umweltfaktoren (Exposition) über das Krankheitsbild der VTE. Ein wichtiger Aspekt der aktuellen wissenschaftlichen Bemühungen auf diesem Gebiet ist die Entwicklung pathogenetischer Modelle, die eine Aussage zum Erkrankungsrisiko sowie zum zukünftigen Verlauf erlauben.

Eine große Herausforderung im Zusammenhang mit der Behandlung von VTE stellt die Subgruppe der spontanen Ereignisse dar, d.h. solche Ereignisse, für die kein expositioneller Risikofaktor (z.B. Trauma, Operation) erkennbar ist und die durch ein besonders hohes Rezidivrisiko von ca. 30-40% kompliziert wird.^{17,19} Für diese Subgruppe ist eine adäquate Sekundärprävention von zentraler Bedeutung. Allerdings ist bei den derzeitigen Strategien, die bei ausgeprägter initialer VTE spontaner Genese eine Langzeitantikoagulation empfehlen das behandlungsbedingte Blutungsrisiko zu berücksichtigen, dass bei 30-40%igem Rezidivrisiko auch 60-70% der Patienten betreffen kann, die auch ohne Antikoagulation kein Rezidiv erleiden würden.³⁴ Daher sind Maßnahmen für eine Individualisierung von Therapie und Prävention sowie eine Verbesserung der Strategien einer Risikostratifizierung der venösen Thromboembolie von großer klinischer und auch wirtschaftlicher Relevanz.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Beantwortung der Frage, ob und in welchem Ausmaß die PAI-1 Aktivität bzw. PAI-1 4G/5G Genotyp zwischen einem VTE-Kollektiv einerseits und einer non VTE- bzw. einer gesunden Kontrollgruppe divergiert. Ein wichtiger weiterer Aspekt dieser Arbeit ist die Untersuchung, ob eine Korrelation zwischen dem klinischen VTE-Charakteristika und der PAI-1 Aktivität bzw. dem PAI-1 4G/5G Genotyp besteht.

4.1. Demographische Daten

In die Untersuchungen wurden insgesamt 1411 Individuen einbezogen, darunter waren 551 Patienten mit venösen Thromboembolien. Die Daten der 551 Patienten wurden weiter unterteilt, um auch ein Bild der Verteilung innerhalb klinisch distinkter Subgruppen zu erhalten.

Beim Vergleich der demographischen Daten der Patientengruppen mit VTE und ohne VTE zeigten sich (verschiedene) Unterschiede. In der Patientengruppe mit VTE (357 Frauen und 194 Männer) und in der non VTE-Gruppe überwogen jeweils Frauen (446 Frauen und 149 Männer). Das Alter der Patienten mit VTE lag im Median bei 48 Jahren und war damit im Vergleich zur non VTE-Gruppe (40 Jahren) signifikant höher ($p < 0,001$). Bezüglich des BMI zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$).

Um diese potentiellen Störfaktoren zu berücksichtigen, wurden sie in die entsprechenden Regressionsmodelle integriert (siehe Abschnitt 3.4).

4.2. Einfluss des PAI-1 4G/5G Genotyps auf die PAI-1 Aktivität

Zunächst war es zu prüfen, ob im von mir untersuchten Kollektiv ein Zusammenhang zwischen dem PAI-1 4G/5G Genotyp und der PAI-1 Aktivität besteht.

In dem Gesamtkollektiv bestehend aus VTE- und non VTE-Patienten war die Beziehung zwischen PAI-1 4G/5G Genotyp und PAI-1 Aktivität nur relativ schwach ausgeprägt (Abbildungen 9 und 9a). Bei einer allelzahlbezogenen Betrachtung zeigte sich eine signifikante Erhöhung der PAI-1 Aktivität bei Heterozygotie 4G/5G ($p = 0,026$), während bei Homozygotie für 4G keine signifikante Beziehung erkennbar war ($p = 0,09$). Dies ist möglicherweise auf die kleinere Fallzahl bei Betrachtung der 4G-Homozygoten zurückzuführen. Bei einer Gegenüberdarstellung von PAI-1 5G/5G vs. 4G-Träger (Heterozygotie oder Homozygotie für 4G) zeigte sich eine signifikante Erhöhung der PAI-1 Aktivität bei 4G-Trägern ($p = 0,027$). Aufgrund mehrerer Studien ist mittlerweile gut dokumentiert, dass das 4G-Allel des PAI-1 Polymorphismus zu einer verstärkten PAI-1-Expression führt, was zu einer verminderten Plasminaktivität und Fibrinolyseaktivität und folglich potentiell zu einem gesteigerten Thromboserisiko führt.^{101-103,119,120} Burzotta et al. fanden etwa eine 25% höhere PAI-1 Plasmakonzentration bei Individuen mit dem 4G/4G Genotyp verglichen mit Personen mit dem 5G/5G Genotyp (Wildtyp).¹⁰² Der Hintergrund ist dabei, dass der PAI-1 4G/5G Genotyp mit einer differentiellen Proteinexpression verbunden ist. 4G Allel bindet lediglich ein Transkriptionsaktivator, während beim 5G Allel zusätzlich ein Repressorprotein gebunden wird.¹⁰⁰

Der Unterschied der medianen PAI-1 Aktivität in Abhängigkeit vom PAI-1 4G/5G Genotyp war zahlenmäßig stärker bei der VTE-Gruppe ausgeprägt (Abbildungen 9b und 9c). Dies könnte ein

Hinweis auf weitere dispositionelle und/oder expositionelle Trigger sein, die das Auftreten von VTE und von PAI-1 Synthesesteigerung begünstigen.

Beim Vergleich der PAI-1 Aktivitäten zwischen den zwei Patientengruppen mit und ohne VTE ließen sich signifikante Unterschiede nachweisen (Tabelle 3). Nicht nur die PAI-1 Aktivität lag im Median 1,5-mal höher in dem Patientenkollektiv mit VTE ($p < 0,001$), Faktor VIII war im Vergleich zur non VTE-Gruppe ebenfalls erhöht ($p < 0,001$). Die Ergebnisse zeigen, dass bei der isolierten Betrachtung die PAI-1 Aktivität bei VTE-Patienten im Vergleich zu non VTE-Patienten signifikant höher war. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf mögliche Beziehung zwischen PAI-1 Aktivität und VTE sein. Da im Regelfall die Vorstellung der VTE-Patienten und damit die PAI-1 Aktivität in dieser Patientengruppe einige Monate nach dem initialen VTE-Ereignis erfolgte, ist ein Bias durch eine Akute-Phase-Reaktion als Ursache der vorliegenden Untersuchungsergebnisse zwar nicht ausgeschlossen aber unwahrscheinlich.

Bezogen auf die PAI-1 Aktivität sollte festgestellt werden, welche möglichen äußeren Einflüsse von Relevanz sind. Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der PAI-1 Aktivität und dem Alter ($r = 0,28$, $p < 0,001$) bzw. dem Body Mass Index (BMI) ($r = 0,40$, $p < 0,001$) der untersuchten Patienten. Diese Daten stehen im Einklang mit bereits publizierten Untersuchungsergebnissen.^{62,108,121} Um den Einfluss des PAI-1 möglichst unabhängig von potentiellen Confoundern zu beschreiben, führten wir für Alter und BMI korrigierte statistische Berechnungen durch ($p = 0,853$, Tabelle 6). Die Verteilung von Confoundern (BMI, Alter) zwischen VTE- und non VTE-Gruppe fiel signifikant unterschiedlich aus. Durch viele Einflussfaktoren (Übergewicht, Diabetes mellitus, Akut-Phase-Reaktion etc.), die im non VTE-Kollektiv im Vergleich zu einer gesunden Population überrepräsentiert sein können, könnte möglicherweise eine Beziehung zwischen PAI-1 Aktivität und VTE (VTE vs. non VTE) so überlagert sein, dass sie im verwendeten logistischen Regressionsmodell nicht mehr erfasst werden kann. Hier wären weitere Studien von Interesse, die hinsichtlich BMI/Alter besser gematcht sind.

Ausgehend von den beschriebenen Ergebnissen kommen zwei interessante Aspekte zusammen. Zum einen war der Einfluss des PAI-1 Genotyps auf die PAI-1 Aktivität deutlich stärker im VTE- als im non VTE-Kollektiv. Im VTE-Kollektiv war die PAI-1 Aktivität auch unabhängig vom Genotyp signifikant höher als im non VTE-Kollektiv (Abbildung 10). Bemerkenswerter Weise war der Unterschied in der PAI-1 Aktivität zwischen VTE und non VTE in Abhängigkeit vom PAI-1 Genotyp unterschiedlich stark ausgeprägt. Während beim 5G/5G-Genotyp nur ein geringfügiger Unterschied zwischen beiden Gruppen bestand ($p = 0,06$), vergrößerte sich dieser

mit jedem weiteren 4G-Allel ($p=0,028$ beim 4G/5G-Genotyp, $p<0,001$ beim 4G/4G-Genotyp; Abbildung 10). Das könnte ein Hinweis auf weitere dispositionelle und/oder expositionelle Trigger sein, die das Auftreten von VTE und von PAI-1 Synthesesteigerung begünstigen.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit kleineren case-control Studien, in denen man die Assoziation der PAI-1 Aktivität bei Patienten mit VTE mit dem homozygoten PAI-1 4G/4G Genotyp fand.^{114,122} Auch Stegnar et al. zeigten in einem größeren Patientenkollektiv ($n=158$) eine signifikante Erhöhung der PAI-1 Aktivität bei Vorhandensein der PAI-1 4G Variante ($p=0,006$),¹²¹ genauso wie eine Arbeitsgruppe aus Spanien ($n=190$, $p<0,01$).¹⁰⁸

Bei einer weiteren Substratifizierung des VTE-Kollektivs in Patientengruppen ohne bekannten genetisch determinierten Risikofaktoren (Faktor V Leiden, Prothrombin G20210A Variante) zeigte sich keine signifikante Erhöhung der PAI-1 Aktivität in Abhängigkeit vom PAI-1 4G/5G Genotyp (Tabelle 3). Eine weitere Subgruppierung in Patientengruppen mit bzw. ohne Rezidiv, die keine bedeutsame thrombophile Risikofaktoren (Faktor V Leiden bzw. Prothrombin G20210A Variante) hatten, war wegen der Fallzahl nicht möglich. Es scheint daher eine Beziehung zwischen PAI-1 4G/5G Genotyp und PAI-1 Aktivität bei VTE-Patienten mit thrombophilen Defekten zu geben.^{108,111} Aufgrund der relativ kleinen Fallzahl, die dieser Arbeit zugrunde liegt, weist eine stratifizierte Auswertung dieser Beziehung nur eine geringe statistische Power auf.

Aus den eigenen und in der Literatur dokumentierten Daten mit einer deutlich stärkeren Beziehung zwischen PAI-1 4G/5G Genotyp und PAI-1 Aktivität bei VTE-Patienten, verglichen mit non VTE-Patienten, kann geschlussfolgert werden, dass eine Beziehung zwischen PAI-1 Genotyp, PAI-1 Aktivität und der venösen Thromboembolie besteht. Daraus kann man einen möglichen Ansatz für weitere Studien ableiten. Es wären PAI-1 Aktivität Cut-Offs zu definieren und die in Kombination mit PAI-1 4G/5G Genotyp hinsichtlich ihrer Beziehung zur VTE zu untersuchen.

Darüber hinaus wurde die PAI-1 Genotyp-Aktivitäts-Beziehung in der Gruppe der spontanen VTE beobachtet. Es zeigte sich eine signifikant höhere PAI-1 Aktivität bei 4G-Trägern im Vergleich zum Wildtyp in der Patientengruppe mit spontaner VTE ($p=0,028$; Abbildung 11). Im Vergleich zu den anderen klinisch definierten VTE-Subgruppen war dieser Unterschied nicht zu beobachten. Auch hieraus könnte eine Bedeutung von PAI-1 Genotyp und PAI-1 Aktivität für die Genese der spontanen VTE abgeleitet werden. Dies ist von besonderem Interesse, da spontane VTE per definitionem keinem bekannten expositionellen Auslöser folgt und bislang

nicht ausreichend durch dispositionelle Faktoren charakterisiert werden kann. Aufgrund des hohen Rezidivrisikos ist die Gruppe der spontanen VTE von besonderem Interesse. Eine relevante weitere Subgruppierung in spontane VTE mit bzw. ohne Rezidiv war wegen der Fallzahl nicht möglich. Hier wären aktuelle und größere prospektive Studien von Interesse.

4.3. PAI-1 4G/5G Genotyp und VTE

Zwischen dem VTE- (n=551) und dem gesunden Kontrollkollektiv (n=265) zeigte sich kein relevanter Unterschied in der Verteilung des PAI-1 4G/5G Genotyps, weder bei einer allelzahlbezogenen Betrachtung noch bei einer Untersuchung des 4G-Trägerstatus (Tabelle 8). Die bekannten genetischen Risikofaktoren (Faktor V Leiden, Prothrombin Variante G20210A) traten im Patientenkollektiv signifikant häufiger auf als in der Kontrollgruppe. Die Häufigkeiten des Faktor V Leiden und der Prothrombin Variante G20210A im Kontrollkollektiv waren mit 8,3% bzw. 3,8%. Im Patientenkollektiv ließ sich Faktor V Leiden in 28,5% und Prothrombin Variante G20210A in 4,9% der Fälle nachweisen. Diese Häufigkeiten stehen im Einklang mit den Angaben in der Literatur.¹²³

In der Literatur fallen unterschiedliche Ergebnisse in der Prävalenz des PAI-1 4G/5G Polymorphismus (4G Allelfrequenz) auf. Akther et al. untersuchten eine indische Population mit VTE und fanden einen signifikanten Unterschied der PAI-1 4G Allelfrequenz zu einem Kontrollkollektiv (68% vs. 52%, Odds Ratio 1,99).¹²⁴ Hooper et al. fanden in einer afro-amerikanischen Population keinen Zusammenhang zwischen PAI 4G/5G Polymorphismus und VTE, die PAI-1 4G Allelfrequenz lag mit 25% unter der Häufigkeit der Kaukasier.¹²⁵ Francis (2002) fasste in seiner Arbeit verschiedene Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen PAI 4G/5G Polymorphismus und venösen Thromboembolien zusammen.⁴⁶ In einer von den ersten und größten Untersuchungen von Ridker et al. wurden bei 14916 Männern der PAI-1 4G/5G Polymorphismus untersucht und prospektiv über etwa 8 Jahre verfolgt.¹¹⁵ Dabei wurde keine Assoziation zwischen PAI-1 4G/5G Genotyp und Thromboseereignissen gefunden. In darauf folgenden Studien aus Frankreich, der USA und der Türkei wurde ebenfalls kein Zusammenhang zwischen dem PAI-1 4G/5G Genotyp und VTE gefunden.^{62,110,126} Diese Daten stehen im Einklang mit meinen Untersuchungsergebnissen.

Der Prozentsatz von Patienten mit Faktor V Leiden und PAI-1 4G/5G oder 4G/4G Genotyp war mit 28,4% im Vergleich zu 8,7% vom Kontrollkollektiv deutlich verschieden (Odds Ratio 4,19 (95% CI: 2,48-7,10); p<0,001), jedoch ähnlich wie die Frequenzen für Faktor V Leiden allein (Odds Ratio 4,65 (95% CI: 2,90-7,47); p<0,001). In analoger Weise ergab sich kein Unterschied

in der Kombination mit Prothrombin Variante G20210A (Tabelle 8). Dies ist möglicherweise auf die kleinere Fallzahl bei Betrachtung der Kombinationen zurückzuführen. Es muss beachtet werden, dass mit kleinerer Patientenzahl bei der Subgruppenanalytik die Aussagekraft der Ergebnissen abnimmt, und die Kombination der Risikofaktoren seltener auftritt.

Andererseits gibt es aber auch Untersuchungen, die im Widerspruch zu diesen Ergebnissen stehen (Tabelle 11). In einer Studie aus Italien (Barcellona et al.) lag die Häufigkeit des PAI-1 4G/5G Genotyps in der Patientengruppe bei 84%, in der Kontrollgruppe bei 79%. Es ergab sich eine schwache Assoziation mit einer Odds Ratio von 1,4 (95% CI: 1,0-2,1; p=0,04).¹⁰⁹ Für die Kombination des 4G Allels mit der Prothrombin G20210A Variante ermittelte diese Arbeitsgruppe eine Odds Ratio von 6,1 (95% CI: 3,2 -11,4; p<0,001). Auch in der Arbeitsgruppe von Segui et al. zeigte sich eine Interaktion des PAI-1 4G/5G Genotyps mit anderen thrombophilen Risikofaktoren (z.B. Faktor V Leiden, Prothrombin G20210A Variante), die zu einer deutlich stärkeren Assoziation mit der VTE führte.¹⁰⁸ Bei der Arbeit von Segui et al. stützen sich diese Ergebnisse aufgrund der Subgruppenanalytik auf nur sehr kleine Fallzahlen, so dass die False-Positive-Reporting-Probability sehr hoch ist. In einer Meta-Analyse aus dem Jahr 2006 zeigte sich eine Assoziation zwischen dem PAI-1 4G/5G Genotyp und dem Thromboserisiko bei Patienten mit anderen thrombophilen Risikofaktoren (z.B. Faktor V Leiden, Prothrombin G20210A Variante).¹¹² In der relativ aktuellen Meta-Analyse aus dem Jahr 2008 wurde, zusammen mit etablierten thrombophilen Risikofaktoren, der PAI-1 4G/5G Genotyp untersucht und eine hochsignifikante Assoziation mit einer Odds Ratio von 1,6 (95% CI: 1,2-2,1; p=0,0008) festgestellt.¹²⁷

Tabelle 11. Beziehung zwischen PAI-1 4G-Trägerstatus und VTE

Referenz	Population aus	Anzahl Patienten/Kontrolle	Odds –Ratio, p
Segui et al, 2000	Spanien	190/152	0,9 (0,5-1,5), n.s.
Barcellona et al, 2003	Italien	402/466	1,4(1,0-2,1), p=0,04
Tsantes et al, 2006	Meta-Analyse	2.644/3.739	1,8 (1,3-2,5)*
Gohil et al, 2008	Meta-Analyse	120.000/180.000	1,6 (1,2-2,1)

n.s.: nicht signifikant (p>0,05)

* in Kombination mit anderen thrombophilen Defekten

Nachfolgend wurde der Einfluss des PAI 4G/5G Genotyps auf die klinischen Charakteristika der venösen Thromboembolien untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede

zwischen spontanen und nicht spontanen VTE ($p=0,73$, Tabelle 9). Die derzeitige Datenlage zu diesem Befund ist heterogen. Grubic et al. zeigte Mitte 1990er Jahre keinen Einfluss des PAI 4G/5G Genotyps auf die klinischen Charakteristika der VTE, wobei das untersuchte Patientenkollektiv allerdings klein war ($n=83$).¹¹⁴ Eine Arbeitsgruppe aus der Türkei zeigte bei einem größeren Patientenkollektiv ($n=200$) das gleiche Ergebnis.¹¹⁰ In einer Arbeit aus Italien (Sartori et al.) wurden 149 Patienten mit VTE und anderen thrombophilen Defekten (Faktor V Leiden, Prothrombin G20210A Variante u.a.) mit 98 Kontrollen verglichen.¹¹¹ Hier fanden die Autoren einen Zusammenhang zwischen dem PAI 4G/5G Genotyp und spontanen VTE (Odds Ratio 3,1 (95% CI: 1,3-7,6)).

In analoger Weise ergaben sich ebenfalls keine Unterschiede hinsichtlich der Verteilung des PAI-1 4G/5G Polymorphismus in der VTE-Gruppe, rezidivierend vs. nicht rezidivierend ($p=0,68$, Tabelle 10). Über Assoziationen zwischen dem PAI 4G/5G Polymorphismus und dem VTE-Rezidivrisiko gibt es in der Literatur ebenfalls wenige und widersprüchliche Untersuchungen. Auch die Arbeitsgruppe von Grubic zeigte keinen Zusammenhang zwischen dem PAI 4G/5G Polymorphismus und dem Rezidivrisiko.¹¹⁴ Stegnar et al. fanden eine Assoziation zwischen PAI-1 4G/5G Genotyp und PAI-1 Aktivität bei Patienten mit venösen Thromboembolien, aber keinen Zusammenhang hinsichtlich der klinischen Charakteristika der VTE.¹²¹ Dies unterstützen andere Studien.^{62,110} Sartori et al. zeigten eine höhere Prävalenz des 4G Allels bei Patienten mit rezidivierenden Thrombosen, sowohl in der Patientengruppe mit anderen thrombophilen Risikofaktoren als auch bei Patienten mit spontanen thromboembolischen Ereignissen. In einer prospektiven Studie aus Portugal wurde gezeigt, dass das Rezidivrisiko bei jungen Patienten (Alter: unter 40 Jahren) mit venösen Thrombosen nicht im Zusammenhang mit dem PAI-1 4G/5G Genotyp steht.¹²⁸ Das Patientenkollektiv war allerdings klein ($n=87$). Insgesamt haben die Untersuchungen aufgrund geringer Fallzahlen eine unzureichende statistische Aussagekraft.

Auf der Basis der vorliegenden Ergebnissen kann man den Schluss ziehen, dass der PAI-1 4G/5G Polymorphismus wahrscheinlich kein ausschlaggebender Risikofaktor für die VTE darstellt. In größeren Meta-Analysen wurde eine schwache Assoziation zwischen PAI-1 4G/5G Genotyp und VTE beschrieben.^{112,127} In Zusammenhang mit anderen thrombophilen Risikofaktoren kann die PAI-1 4G/4G Variante eine Rolle in der Entstehung der VTE spielen.¹¹²

Inwieweit die Kombination von PAI-1 4G/5G Polymorphismus und PAI-1 Aktivität in Beziehung zu klinischen Charakteristika der VTE steht, kann aufgrund der bislang vorliegenden

Daten noch nicht entschieden werden. Es liegt aber nahe, dass sowohl PAI-1 4G/5G Genotyp als auch PAI-1 Aktivität in weiteren Untersuchungen Berücksichtigung finden sollten.

4.4. Kritische Betrachtung von PAI-1 als thrombophiler Risikofaktor

Gegenstand aktueller klinischer Studien ist die Bedeutung labordiagnostischer Marker und Strategien zur Einschätzung des Rezidivrisikos für venöse Thromboembolie.^{11,30,34,129,130} Molekulargenetische Marker haben in diesem Zusammenhang den Vorteil, dass sie von Störeinflüssen weitgehend unabhängig sind. Laborchemische Parameter wiederum unterliegen verschiedenen Störeinflüssen. Ein gutes Beispiel dafür ist die Bestimmung der PAI-1 Aktivität. Hierbei müssen standardisierte Blutabnahmebedingungen eingehalten werden (s. Abschnitt 2.2). PAI-1 weist starke tageszeitliche Schwankungen auf. Im Rahmen der Akut-Phase-Reaktion oder auch bei zu langer Stauung vor der Blutentnahme kann es zu einer vermehrten Freisetzung von PAI-1 aus Endothelzellen kommen. Bei verschiedenen Erkrankungen (z.B. metabolisches Syndrom, Tumorerkrankungen, koronare Herzerkrankung und chronischen Entzündungen) ist Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 ein Teil der Pathogenese und weist erhöhte Werte auf. Es gibt Hinweise, dass unter Östrogeneinfluss PAI-1 niedrigere Werte aufweist.^{45,131} Im Unterschied zu den Genpolymorphismen stellen die biochemischen Laborparameter eine Momentaufnahme des Gesamtprozesses dar.

Wegen der komplexen Genese der VTE stehen derzeit keine prädiktiven Modelle zum Erstereignis bzw. Rezidivrisiko zur Verfügung. Während sich der Mangel an Antithrombin, Protein-C und S, der Faktor V Leiden und die Prothrombin Variante G20210A als VTE-Risikofaktoren eindeutig erwiesen haben, ist der Stellenwert von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 für die VTE weniger deutlich. Außerdem liegen bei vielen Patienten zusätzliche erworbene Risikofaktoren vor (Entzündungen, Tumoren, orale Kontrazeptiva), so dass die Kombination von mehreren Risikofaktoren damit durchaus üblich ist. Die erworbenen Risikofaktoren können zum individuell unterschiedlichen Erkrankungsrisiko beitragen.

Im Falle der PAI-1, der sowohl von Umweltfaktoren als auch vom jeweiligen genetischen Hintergrund beeinflusst wird, scheint die Gen-Umwelt Interaktion in Hinblick auf die Entwicklung der VTE von Bedeutung zu sein.

Die bisher gemachten klinischen Untersuchungen zeigen widersprüchliche Ergebnisse. Die widersprüchlichen Forschungsergebnisse können z.B. durch die unterschiedlichen Erhebungs- und Selektionskriterien sowie die unterschiedlichsten Fallzahlen bedingt sein. In schon

erwähnten Meta-Analysen zeigten die Autoren eine schwache Assoziation zwischen dem PAI-1 4G/5G Genotyp und der VTE^{112,127} im Vergleich zu anderen Studien mit kleineren Untersuchungskollektiven.^{62,110,126,132}

Neben den erwähnten Schwierigkeiten bei dieser Studie spielt das Patientenalter eine Rolle. Dadurch wird die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Während mit fortschreitendem Alter bereits kleine expositionelle Trigger ausreichen, um eine VTE auszulösen, tritt bei jungen Individuen die Notwendigkeit einer dispositionellen Komponente stärker in den Vordergrund.^{13,14}

Aufgrund des retrospektiven Studiendesigns standen die expositionelle Risikofaktoren nicht im Vordergrund dieser Arbeit. Deshalb konnte dieser Aspekt nicht ausreichend beachtet werden. Hierzu zählen z.B. Begleiterkrankungen (Tumoren), Medikamenteneinnahme (orale Kontrazeptiva) etc. Hier wären prospektive Studien von Interesse.

Zusammenfassend scheint der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 aufgrund seiner Rolle in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen nicht als zuverlässiger Screening-Marker zur Identifikation eines gesteigerten Thromboserisikos zu sein. Der PAI-1 4G/5G Genotyp in Zusammenhang mit der Erhöhung der PAI-1 Aktivität kann eine Rolle in der Entstehung der VTE spielen.

4.5. Limitationen der Studie

Studiendesign

Es handelt sich um eine retro- und nicht um eine prospektive Studie. Grundsätzlich sind retrospektive Studien mit verminderter Datenqualität behaftet. Es betrifft vor allem die Subgruppen-Analyse der VTE, die durch unvollständige oder fehlerhafte Anamneseerhebung verfälscht sein kann. Probleme bei dem retrospektiven Studiendesign treten auch in der Erfassung von Rezidiven auf. Dies zeigt sich unter anderem, dass eine relevante Subgruppierung der spontanen VTE mit bzw. ohne Rezidiv wegen der geringen Fallzahl nicht möglich war.

Patientenkollektiv

Die Beziehung zwischen PAI-1 Aktivität und klinischen Charakteristika wurden in einer case-only Studie untersucht. Insgesamt wurden 551 Patienten mit tiefer Venenthrombose und/oder Lungenembolie und 595 ohne VTE analysiert. Die Verteilung von Confoundern (BMI, Alter) zwischen VTE- und non VTE-Gruppe fiel signifikant unterschiedlich aus. Viele Einflussfaktoren (Übergewicht, Diabetes mellitus, Akut-Phase-Reaktion etc.) können im non VTE-Kollektiv im Vergleich zu einer gesunden Population überrepräsentiert sein. Hier wären prospektive case-control Studien von Interesse.

Präanalytik

Eine weitere Limitation der Studie besteht aus der Präanalytik. Die mit biochemischen Methoden untersuchten Risikofaktoren unterliegen präanalytischen Störeinflüssen. Beispielsweise ist die Bestimmung von Fibrinolyseparametern an streng standardisierte Blutabnahmebedingungen gebunden. Außerdem weist die PAI-1 Aktivität starke tageszeitliche Schwankungen auf. Im Rahmen der Akut-Phase-Reaktion oder auch bei zu langer Stauung vor der Blutentnahme kann es zu einer vermehrten Freisetzung von PAI-1 aus Endothelzellen kommen. Bei verschiedenen Erkrankungen (z.B. metabolisches Syndrom, Tumorerkrankungen, koronare Herzerkrankung und chronischen Entzündungen) ist Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 weist erhöhte Werte auf. Somit stellen die biochemischen Laborparameter lediglich eine Momentaufnahme des Gesamtprozesses dar.

5. Zusammenfassung

Die Venöse Thromboembolie (VTE) ist eine chronisch-rezidivierende, multifaktorielle Erkrankung mit expositionellen und dispositionellen Risikofaktoren. Zu den etablierten genetisch determinierten Risikofaktoren zählen der Mangel an Antithrombin, Protein-C und S, der Faktor V Leiden und die Prothrombin Variante G20210A. Der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G Polymorphismus und sein korrespondierender Plasmaspiegel (PAI-1 Aktivität) gehören zu den noch kontrovers diskutierten Risikofaktoren der VTE, wobei in einer Metaanalyse aus dem Jahr 2008 eine zumindest schwache Assoziation zwischen dem PAI-1 Genotyp und der VTE naheliegt.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Beantwortung der Frage, ob und in welchem Ausmaß die PAI-1 Aktivität bzw. PAI-1 4G/5G Genotyp zwischen einem VTE-Kollektiv einerseits und einer non VTE- bzw. einer gesunden Kontrollgruppe divergiert. Ein wichtiger weiterer Aspekt dieser Arbeit ist die Untersuchung, ob eine Korrelation zwischen dem klinischen VTE-Charakteristika und der PAI-1 Aktivität bzw. dem PAI-1 4G/5G Genotyp besteht.

Es wurde das Design der retrospektiven case-only und case-control Studien gewählt. Die Beziehung zwischen PAI-1 Aktivität und klinischen Charakteristika wurden in einer case-only Studie untersucht. Der Einfluss des PAI-1 4G/5G Genotyps auf VTE wurde in einer case-control Studie betrachtet. Insgesamt wurden 1411 Individuen in die Untersuchungen einbezogen. Es wurden 551 Patienten mit tiefer Venenthrombose (TVT) und/oder Lungenembolie (LE) und 595 ohne venöse Thromboembolie (non VTE) untersucht. Das Kontrollkollektiv umfasste 265 Blutspender. Die Gesamtgruppe mit venösen Thromboembolien wurde in spontane/nicht spontane bzw. rezidivierende/nicht rezidivierende Ereignisse aufgeteilt.

In dem Gesamtkollektiv, bestehend aus VTE- und non VTE-Patienten, war die Beziehung zwischen PAI-1 4G/5G Genotyp und PAI-1 Aktivität nur relativ schwach ausgeprägt. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der PAI-1 Aktivität bei 4G-Trägern ($p=0,027$). Bei der VTE-Gruppe war der Unterschied der medianen PAI-1 Aktivität in Abhängigkeit vom PAI-1 4G/5G Genotyp zahlenmäßig stärker ausgeprägt. Bei der isolierten Betrachtung war die PAI-1 Aktivität bei VTE-Patienten im Vergleich zu non VTE-Patienten signifikant höher ($p<0,001$). Unter Berücksichtigung der möglicherweise beeinflussenden Störgrößen wie BMI oder ein höheres Lebensalter wurde jedoch keine Assoziation zwischen der PAI-1 Aktivität und der VTE beobachtet.

In einer Betrachtung der einzelnen PAI-1 Genotypen im Vergleich zwischen non VTE- und VTE-Patienten zeigte sich ein mit der 4G-Kopiezahl zunehmender Unterschied zwischen der PAI-1 Aktivität im non VTE und VTE Kollektiv. Beim Vergleich zwischen non VTE- und VTE-Gruppe bei homozygoter 4G/4G Variante wurde hochsignifikanter Unterschied der PAI-1 Aktivität nachgewiesen ($p < 0,001$). Bemerkenswerter Weise war eine signifikant höhere PAI-1 Aktivität bei 4G-Trägern im Vergleich zum Wildtyp in der Patientengruppe mit spontaner VTE beim Vergleich der PAI-1 Aktivität vom PAI-1 4G/5G Genotyp in den verschiedenen VTE-Subgruppen nachweisbar ($p = 0,028$).

Ein weiteres Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass es keinen relevanten Unterschied in der Verteilung des PAI-1 4G/5G Genotyps zwischen dem VTE- ($n = 551$) und gesunden Kontrollkollektiv ($n = 265$) gibt, weder bei einer allelzahlbezogenen Betrachtung noch bei einer Untersuchung des 4G-Trägerstatus.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass eine Korrelation zwischen der PAI-1 Aktivität und dem PAI-1 4G/5G Genotyp besteht. Aus den eigenen und in der Literatur dokumentierten Daten kann geschlussfolgert werden, dass eine Beziehung zwischen PAI-1 4G/5G Genotyp und PAI-1 Aktivität bei VTE-Patienten, verglichen mit non VTE-Patienten besteht. Daraus kann man einen möglichen Ansatz für weitere Studien ableiten. Es wären PAI-1 Aktivität Cut-Offs zu definieren und die in Kombination mit PAI-1 4G/5G Genotyp hinsichtlich ihrer Beziehung zur VTE zu untersuchen.

Auch die beschriebene Beziehung zwischen PAI-1 Genotyp, PAI-1 Aktivität und der venösen Thromboembolie, die auch in der Subgruppe der spontanen Ereignisse zum Vorschein kommt, verdeutlicht die Bedeutung der Erkrankungsheterogenität der venösen Thromboembolie. Dies ist bei weiteren Untersuchungen zu berücksichtigen.

6. Literaturverzeichnis

1. Heit JA. Venous thromboembolism: disease burden, outcomes and risk factors. *J Thromb Haemost* 2005;3:1611-7.
2. Lensing AW, Prandoni P, Prins MH, Buller HR. Deep-vein thrombosis. *Lancet* 1999;353:479-85.
3. 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;232:155-60.
4. Wong P, Baglin T. Epidemiology, risk factors and sequelae of venous thromboembolism. *Phlebology* 2012;27 Suppl 2:2-11.
5. Gomes MP, Deitcher SR. Risk of venous thromboembolic disease associated with hormonal contraceptives and hormone replacement therapy: a clinical review. *Arch Intern Med. United States*2004:1965-76.
6. Nielsen HK. Pathophysiology of venous thromboembolism. *Semin Thromb Hemost* 1991;17 Suppl 3:250-3.
7. Rosendaal FR, Reitsma PH. Genetics of venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2009;7 Suppl 1:301-4.
8. Lijfering WM, Rosendaal FR, Cannegieter SC. Risk factors for venous thrombosis - current understanding from an epidemiological point of view. *Br J Haematol* 2010;149:824-33.
9. Martinelli I. Risk factors in venous thromboembolism. *Thromb Haemost. Germany*2001:395-403.
10. Anderson FA, Jr., Spencer FA. Risk factors for venous thromboembolism. *Circulation* 2003;107:I9-16.
11. Iorio A, Kearon C, Filippucci E, et al. Risk of recurrence after a first episode of symptomatic venous thromboembolism provoked by a transient risk factor: a systematic review. *Arch Intern Med* 2010;170:1710-6.
12. Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease [Review]. *Blood* 2000;95:1517-32.
13. Engbers MJ, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR. Venous thrombosis in the elderly: incidence, risk factors and risk groups. *J Thromb Haemost* 2010;8:2105-12.
14. Rosendaal FR. Thrombosis in the young: epidemiology and risk factors. A focus on venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997;78:1-6.
15. Kyrle PA, Eichinger S. Is Virchow's triad complete? *Blood* 2009;114:1138-9.
16. Douketis JD, Gu CS, Schulman S, Ghirarduzzi A, Pengo V, Prandoni P. The risk for fatal pulmonary embolism after discontinuing anticoagulant therapy for venous thromboembolism. *Ann Intern Med* 2007;147:766-74.
17. Kyrle PA, Rosendaal FR, Eichinger S. Risk assessment for recurrent venous thrombosis. *Lancet. England: 2010 Elsevier Ltd; 2010:2032-9.*
18. Prandoni P, Noventa F, Ghirarduzzi A, et al. The risk of recurrent venous thromboembolism after discontinuing anticoagulation in patients with acute proximal deep vein thrombosis or pulmonary embolism. A prospective cohort study in 1,626 patients. *Haematologica* 2007;92:199-205.
19. Heit JA. Predicting the risk of venous thromboembolism recurrence. *Am J Hematol* 2012.
20. Hansson PO, Sorbo J, Eriksson H. Recurrent venous thromboembolism after deep vein thrombosis: incidence and risk factors. *Arch Intern Med* 2000;160:769-74.
21. Baglin T, Luddington R, Brown K, Baglin C. Incidence of recurrent venous thromboembolism in relation to clinical and thrombophilic risk factors: prospective cohort study. *Lancet* 2003;362:523-6.

22. Eichinger S, Heinze G, Jandek LM, Kyrle PA. Risk assessment of recurrence in patients with unprovoked deep vein thrombosis or pulmonary embolism: the Vienna prediction model. *Circulation* 2010;121:1630-6.
23. Lijfering WM, Middeldorp S, Veeger NJ, et al. Risk of recurrent venous thrombosis in homozygous carriers and double heterozygous carriers of factor V Leiden and prothrombin G20210A. *Circulation* 2010;121:1706-12.
24. Brouwer JL, Lijfering WM, Ten Kate MK, Kluin-Nelemans HC, Veeger NJ, van der Meer J. High long-term absolute risk of recurrent venous thromboembolism in patients with hereditary deficiencies of protein S, protein C or antithrombin. *Thromb Haemost* 2009;101:93-9.
25. Schulman S, Svenungsson E, Granqvist S. Anticardiolipin antibodies predict early recurrence of thromboembolism and death among patients with venous thromboembolism following anticoagulant therapy. Duration of Anticoagulation Study Group. *Am J Med* 1998;104:332-8.
26. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, et al. Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2010;8:237-42.
27. Cosmi B, Palareti G. Update on the predictive value of D-dimer in patients with idiopathic venous thromboembolism. *Thromb Res* 2010;125 Suppl 2:S62-5.
28. Tosetto A, Iorio A, Marcucci M, et al. Predicting Disease Recurrence in Patients with Previous Unprovoked Venous Thromboembolism. A Proposed Prediction Score (DASH). *J Thromb Haemost* 2012.
29. Ageno W, Cosmi B, Ghirarduzzi A, et al. The negative predictive value of D-dimer on the risk of recurrent venous thromboembolism in patients with multiple previous events: A prospective cohort study (the PROLONG PLUS study). *Am J Hematol* 2012.
30. Douketis J, Tosetto A, Marcucci M, et al. Risk of recurrence after venous thromboembolism in men and women: patient level meta-analysis. *BMJ* 2011;342:d813.
31. Kyrle PA, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M, Weltermann A, Eichinger S. The risk of recurrent venous thromboembolism in men and women. *N Engl J Med* 2004;350:2558-63.
32. Baglin T, Luddington R, Brown K, Baglin C. High risk of recurrent venous thromboembolism in men. *J Thromb Haemost* 2004;2:2152-5.
33. McRae S, Tran H, Schulman S, Ginsberg J, Kearon C. Effect of patient's sex on risk of recurrent venous thromboembolism: a meta-analysis. *Lancet* 2006;368:371-8.
34. Lindhoff-Last E. [Risk assessment of recurrence of venous thromboembolism]. *Hamostaseologie. Germany*2011;7-12; quiz 3.
35. Hiller E, Riess H. *Hämorrhagische Diathese und Thrombose*, 3. Auflage2002.
36. Kiefel V. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, 4. Auflage2012.
37. Engelmann B, Luther T, Muller I. Intravascular tissue factor pathway--a model for rapid initiation of coagulation within the blood vessel. *Thromb Haemost* 2003;89:3-8.
38. Preissner KT. [Physiology of blood coagulation and fibrinolysis: biochemistry]. *Hamostaseologie. Germany*2008:259-71.
39. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:41-8.
40. Esmon CT. Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface. *FASEB J* 1995;9:946-55.
41. Fukudome K, Esmon CT. Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* 1994;269:26486-91.
42. Potzsch B, Witt I. [APC (activated protein C) resistance]. *Hamostaseologie* 2002;22:25-8.
43. Dahlback B. New molecular insights into the genetics of thrombophilia. Resistance to activated protein C caused by Arg506 to Gln mutation in factor V as a pathogenic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1995;74:139-48.

44. Grimsley PG, Normyle JF, Brandt RA, et al. Urokinase binding and catabolism by Hep G2 cells is plasminogen activator inhibitor-1 dependent, analogous to interactions of tissue-type plasminogen activator with these cells. *Thromb Res* 1995;79:353-61.
45. Huber K. Plasminogen activator inhibitor type-1 (part one): basic mechanisms, regulation, and role for thromboembolic disease. *J Thromb Thrombolysis* 2001;11:183-93.
46. Francis CW. Plasminogen activator inhibitor-1 levels and polymorphisms. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:1401-4.
47. Binder BR, Christ G, Gruber F, et al. Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles. *News Physiol Sci* 2002;17:56-61.
48. Iwaki T, Urano T, Umemura K. PAI-1, progress in understanding the clinical problem and its aetiology. *Br J Haematol* 2012;157:291-8.
49. Vague P, Juhan-Vague I, Aillaud MF, et al. Correlation between blood fibrinolytic activity, plasminogen activator inhibitor level, plasma insulin level, and relative body weight in normal and obese subjects. *Metabolism* 1986;35:250-3.
50. Alessi MC, Juhan-Vague I. PAI-1 and the metabolic syndrome: links, causes, and consequences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* United States 2006:2200-7.
51. Lupu F, Bergonzelli GE, Heim DA, et al. Localization and production of plasminogen activator inhibitor-1 in human healthy and atherosclerotic arteries. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1090-100.
52. Sobel BE, Woodcock-Mitchell J, Schneider DJ, Holt RE, Marutsuka K, Gold H. Increased plasminogen activator inhibitor type 1 in coronary artery atherectomy specimens from type 2 diabetic compared with nondiabetic patients: a potential factor predisposing to thrombosis and its persistence. *Circulation* 1998;97:2213-21.
53. Margaglione M, Di Minno G, Grandone E, et al. Abnormally high circulation levels of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in patients with a history of ischemic stroke. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1741-5.
54. Zotz RB. [Impact of thrombophilic risk factors in patients with arterial thromboses]. *Hamostaseologie* 2008;28:120-9.
55. Meltzer ME, Doggen CJ, de Groot PG, Rosendaal FR, Lisman T. The impact of the fibrinolytic system on the risk of venous and arterial thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2009;35:468-77.
56. Foekens JA, Peters HA, Look MP, et al. The Urokinase System of Plasminogen Activation and Prognosis in 2780 Breast Cancer Patients. *Cancer Research* 2012;60:636-43.
57. Rickles FR. Mechanisms of cancer-induced thrombosis in cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006;35:103-10.
58. Mehta R, Shapiro AD. Plasminogen activator inhibitor type 1 deficiency. *Haemophilia* 2008;14:1255-60.
59. Juhan-Vague I, Alessi MC, Mavri A, Morange PE. Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk. *J Thromb Haemost* 2003;1:1575-9.
60. Leander K, Wiman B, Hallqvist J, Sten-Linder M, de Faire U. PAI-1 level and the PAI-1 4G/5G polymorphism in relation to risk of non-fatal myocardial infarction: results from the Stockholm Heart Epidemiology Program (SHEEP). *Thromb Haemost.* Germany 2003:1064-71.
61. Smith A, Patterson C, Yarnell J, Rumley A, Ben-Shlomo Y, Lowe G. Which hemostatic markers add to the predictive value of conventional risk factors for coronary heart disease and ischemic stroke? The Caerphilly Study. *Circulation* 2005;112:3080-7.
62. Folsom AR, Cushman M, Heckbert SR, Rosamond WD, Aleksic N. Prospective study of fibrinolytic markers and venous thromboembolism. *J Clin Epidemiol* 2003;56:598-603.
63. Crowther MA, Roberts J, Roberts R, et al. Fibrinolytic variables in patients with recurrent venous thrombosis: a prospective cohort study. *Thromb Haemost.* Germany 2001:390-4.

64. Meltzer ME, Lisman T, de Groot PG, et al. Venous thrombosis risk associated with plasma hypofibrinolysis is explained by elevated plasma levels of TAFI and PAI-1. *Blood* 2010;116:113-21.
65. Swiatkiewicz A, Jurkowski P, Kotschy M, Ciecierski M, Jawien A. Level of antithrombin III, protein C, protein S and other selected parameters of coagulation and fibrinolysis in the blood of the patients with recurrent deep venous thrombosis. *Med Sci Monit* 2002;8:CR263-8.
66. Schulman S, Wiman B. The significance of hypofibrinolysis for the risk of recurrence of venous thromboembolism. Duration of Anticoagulation (DURAC) Trial Study Group. *Thromb Haemost* 1996;75:607-11.
67. Lindhoff-Last E, Luxembourg B, Pabinger I. [Update thrombophilia]. *Hamostaseologie* 2008;28:365-75.
68. Moheimani F, Jackson DE. Venous thromboembolism: classification, risk factors, diagnosis, and management. *ISRN Hematol* 2011;2011:124610.
69. Kamphuisen PW, Eikenboom JC, Rosendaal FR, et al. High factor VIII antigen levels increase the risk of venous thrombosis but are not associated with polymorphisms in the von Willebrand factor and factor VIII gene. *Br J Haematol* 2001;115:156-8.
70. Ota S, Yamada N, Ogihara Y, et al. High plasma level of factor VIII: an important risk factor for venous thromboembolism. *Circ J* 2011;75:1472-5.
71. Kraaijenhagen RA, in't Anker PS, Koopman MM, et al. High plasma concentration of factor VIIIc is a major risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2000;83:5-9.
72. Koster T, Blann AD, Briet E, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet* 1995;345:152-5.
73. Berger M, Mattheisen M, Kulle B, et al. High factor VIII levels in venous thromboembolism show linkage to imprinted loci on chromosomes 5 and 11. *Blood* 2012;105:638-44.
74. Rosendaal FR. Risk factors for venous thrombotic disease. *Thromb Haemost* 1999;82:610-9.
75. Tait RC, Walker ID, Perry DJ, et al. Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population. *Br J Haematol* 1994;87:106-12.
76. Tait RC, Walker ID, Reitsma PH, et al. Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost* 1995;73:87-93.
77. Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1965;13:516-30.
78. Chowdhury V, Lane DA, Mille B, et al. Homozygous antithrombin deficiency: report of two new cases (99 Leu to Phe) associated with arterial and venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1994;72:198-202.
79. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981;68:1370-3.
80. Lijfering WM, Brouwer JL, Veeger NJ, et al. Selective testing for thrombophilia in patients with first venous thrombosis: results from a retrospective family cohort study on absolute thrombotic risk for currently known thrombophilic defects in 2479 relatives. *Blood* 2009;113:5314-22.
81. McGehee WG, Klotz TA, Epstein DJ, Rapaport SI. Coumarin necrosis associated with hereditary protein C deficiency. *Ann Intern Med* 1984;101:59-60.
82. Seligsohn U, Berger A, Abend M, et al. Homozygous protein C deficiency manifested by massive venous thrombosis in the newborn. *N Engl J Med* 1984;310:559-62.
83. Dahlback B. Physiological anticoagulation. Resistance to activated protein C and venous thromboembolism. *J Clin Invest* 1994;94:923-7.

84. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:1004-8.
85. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-7.
86. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995;85:1504-8.
87. Herrmann FH, Koesling M, Schroder W, et al. Prevalence of factor V Leiden mutation in various populations. *Genet Epidemiol* 1997;14:403-11.
88. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996;88:3698-703.
89. Vicente V, Gonzalez-Conejero R, Rivera J, Corral J. The prothrombin gene variant 20210A in venous and arterial thromboembolism. *Haematologica* 1999;84:356-62.
90. Butenas S, van't Veer C, Mann KG. "Normal" thrombin generation. *Blood* 1999;94:2169-78.
91. Smirnov MD, Safa O, Esmon NL, Esmon CT. Inhibition of activated protein C anticoagulant activity by prothrombin. *Blood* 1999;94:3839-46.
92. Martinelli I, Sacchi E, Landi G, Taioli E, Duca F, Mannucci PM. High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives. *N Engl J Med* 1998;338:1793-7.
93. Martinelli I, Battaglioli T, Tosetto A, et al. Prothrombin A19911G polymorphism and the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost. England* 2006;2582-6.
94. Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Psaty BM, Raghunathan TE, Vos HL. A common prothrombin variant (20210 G to A) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997;90:1747-50.
95. Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Goncalves MS, Costa FF. Prevalence of the prothrombin gene variant (nt20210A) in venous thrombosis and arterial disease. *Thromb Haemost* 1997;78:1430-3.
96. Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, et al. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998;79:706-8.
97. Bank I, Libourel EJ, Middeldorp S, et al. Prothrombin 20210A mutation: a mild risk factor for venous thromboembolism but not for arterial thrombotic disease and pregnancy-related complications in a family study. *Arch Intern Med* 2004;164:1932-7.
98. Adamek L, Jankowski M, Sanak M, et al. [Coincidence of 20210A prothrombin variant and factor V Leiden predisposing to venous thromboembolism]. *Pol Arch Med Wewn* 1999;102:1095-9.
99. Strandberg L, Lawrence D, Ny T. The organization of the human-plasminogen-activator-inhibitor-1 gene. Implications on the evolution of the serine-protease inhibitor family. *Eur J Biochem* 1988;176:609-16.
100. Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1993;268:10739-45.
101. Ye S, Green FR, Scarabin PY, et al. The 4G/5G genetic polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene is associated with differences in plasma PAI-1 activity but not with risk of myocardial infarction in the ECTIM study. *Etude CasTemoins de l'infarctus du Myocarde. Thromb Haemost* 1995;74:837-41.

102. Burzotta F, Di Castelnuovo A, Amore C, et al. 4G/5G promoter PAI-1 gene polymorphism is associated with plasmatic PAI-1 activity in Italians: a model of gene-environment interaction. *Thromb Haemost* 1998;79:354-8.
103. Margaglione M, Grandone E, Vecchione G, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) antigen plasma levels in subjects attending a metabolic ward: relation to polymorphisms of PAI-1 and angiotensin converting enzyme (ACE) genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2082-7.
104. Eriksson P, Kallin B, van 't Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1851-5.
105. Catto AJ, Carter AM, Stickland M, Bamford JM, Davies JA, Grant PJ. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism and levels in subjects with cerebrovascular disease. *Thromb Haemost* 1997;77:730-4.
106. Endler G, Lalouschek W, Exner M, Mitterbauer G, Haring D, Mannhalter C. The 4G/4G genotype at nucleotide position -675 in the promoter region of the plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) gene is less frequent in young patients with minor stroke than in controls. *Br J Haematol* 2000;110:469-71.
107. van Goor ML, Garcia EG, Leebeek F, Brouwers GJ, Koudstaal P, Dippel D. The plasminogen activator inhibitor (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism and PAI-1 levels in ischemic stroke. A case-control study. *Thromb Haemost* 2005;93:92-6.
108. Segui R, Estelles A, Mira Y, et al. PAI-1 promoter 4G/5G genotype as an additional risk factor for venous thrombosis in subjects with genetic thrombophilic defects. *Br J Haematol* 2000;111:122-8.
109. Barcellona D, Fenu L, Cauli C, Pisu G, Marongiu F. Allele 4G of gene PAI-1 associated with prothrombin mutation G20210A increases the risk for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2003;90:1061-4.
110. Oguzulgen IK, Yilmaz E, Demirtas S, et al. The role of plasminogen activator inhibitor-1 polymorphism, factor-V-Leiden, and prothrombin-20210 mutations in pulmonary thromboembolism. *Clin Appl Thromb Hemost* 2009;15:73-7.
111. Sartori MT, Danesin C, Saggiorato G, et al. The PAI-1 gene 4G/5G polymorphism and deep vein thrombosis in patients with inherited thrombophilia. *Clin Appl Thromb Hemost* 2003;9:299-307.
112. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, et al. Association between the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and venous thrombosis. A meta-analysis. *Thromb Haemost* 2007;97:907-13.
113. Akar N, Yilmaz E, Akar E, Avcu F, Yalcin A, Cin S. Effect of plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in Turkish deep vein thrombotic patients with and without FV1691 G-A. *Thromb Res* 2000;97:227-30.
114. Grubic N, Stegnar M, Peternel P, Kaider A, Binder BR. A novel G/A and the 4G/5G polymorphism within the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 gene in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res* 1996;84:431-43.
115. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Miletich JP. Arterial and venous thrombosis is not associated with the 4G/5G polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor gene in a large cohort of US men. *Circulation* 1997;95:59-62.
116. Selby R, Geerts W. Prevention of venous thromboembolism: consensus, controversies, and challenges. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. United States 2009:286-92.
117. Hoppe B, Heymann GA, Koscielny J, Hellstern P, Kiesewetter H, Salama A. Screening for multiple hereditary hypercoagulability factors using the amplification refractory mutation system. *Thromb Res* 2003;111:115-20.

118. Davies HT, Crombie IK, Tavakoli M. When can odds ratios mislead? *BMJ* 1998;316:989-91.
119. Dawson S, Hamsten A, Wiman B, Henney A, Humphries S. Genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus is associated with altered levels of plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity. *Arterioscler Thromb* 1991;11:183-90.
120. Eriksson P, Kallin B, van 't Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1851-5.
121. Stegnar M, Uhrin P, Peternel P, et al. The 4G/5G sequence polymorphism in the promoter of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene: relationship to plasma PAI-1 level in venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 1998;79:975-9.
122. Sartori MT, Wiman B, Vettore S, Dazzi F, Girolami A, Patrassi GM. 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene promoter and fibrinolytic capacity in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Haemost. Germany*1998:956-60.
123. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999;353:1167-73.
124. Akhter MS, Biswas A, Ranjan R, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene 4G/5G promoter polymorphism is seen in higher frequency in the Indian patients with deep vein thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2010;16:184-8.
125. Hooper WC, Lally C, Austin H, et al. The role of the t-PA I/D and PAI-1 4G/5G polymorphisms in African-American adults with a diagnosis of myocardial infarction or venous thromboembolism. *Thromb Res* 2000;99:223-30.
126. Morange PE, Henry M, Tregouet D, et al. The A -844G polymorphism in the PAI-1 gene is associated with a higher risk of venous thrombosis in factor V Leiden carriers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1387-91.
127. Gohil R, Peck G, Sharma P. The genetics of venous thromboembolism. A meta-analysis involving approximately 120,000 cases and 180,000 controls. *Thromb Haemost* 2009;102:360-70.
128. Mansilha A, Araujo F, Severo M, Sampaio SM, Toledo T, Albuquerque R. Genetic polymorphisms and risk of recurrent deep venous thrombosis in young people: prospective cohort study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;30:545-9.
129. Baglin T. Using the laboratory to predict recurrent venous thrombosis. *Int J Lab Hematol* 2011;33:333-42.
130. Cosmi B, Legnani C, Cini M, Guazzaloca G, Palareti G. D-dimer and residual vein obstruction as risk factors for recurrence during and after anticoagulation withdrawal in patients with a first episode of provoked deep-vein thrombosis. *Thromb Haemost* 2011;105:837-45.
131. Meijers JC, Middeldorp S, Tekelenburg W, et al. Increased fibrinolytic activity during use of oral contraceptives is counteracted by an enhanced factor XI-independent down regulation of fibrinolysis: a randomized cross-over study of two low-dose oral contraceptives. *Thromb Haemost. Germany*2000:9-14.
132. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Miletich JP. Arterial and venous thrombosis is not associated with the 4G/5G polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor gene in a large cohort of US men. *Circulation* 1997;95:59-62.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzym
APC	aktiviertes Protein C
BMI	Body Mass index
EPCR	endothelialer Protein-C-Rezeptor
HMWK	High-molekular-weight Kininogen = hochmolekulares Kininogen
LE	Lungenembolie
MTHFR	Methyltetrahydrofolat-Reduktase
OR	Odds Ratio
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PK	Präkallikrein
PC	Protein C
PS	Protein S
TF	Tissue Faktor
t-PA	Tissue Plasminogen Aktivator
TVT	tiefe Venenthrombose
U	Units
VTE	venöse Thromboembolie
VWF	Von-Willebrand-Faktor

7.2. Selbständigkeitserklärung

„Ich, Larisa Bukreeva, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: selbst verfasst und keine anderen als die angegeben Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum: 19.10.2012

Unterschrift:

7.3. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7.4. Danksagung

Dank allen, die mich bisher in meinem Leben gefördert und unterstützt haben.

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. A. Salama, der mir durch die Überlassung des Themas ermöglicht hat, diese Dissertation anzufertigen.

Für die große und stete Hilfe gilt mein ganz besonderer Dank Herrn PD Dr. B. Hoppe.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. A. Pruß für seine Unterstützung danken.

Mein Dank gilt ferner allen Mitarbeitern des Institutes für Transfusionsmedizin, insbesondere aber Frau I. Baransky und R. Kuchar, für ihre tatkräftige Unterstützung.

Mein persönlicher Dank gilt dem Team des Stammzellbereiches.

Der größte Dank gilt meiner Familie, ohne deren langjährige und tatkräftige Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.