

Aus dem
IMD Gerinnungszentrum Mannheim
Prof. Dr. med. Carl-Erik Dempfle

Charakterisierung von Fibrinderivaten bei paraneoplastischer
Gerinnungsaktivierung in der Gynäkologie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Paul Fürner

aus
Berlin
2023

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Carl-Erik Dempf

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	2
1.1 Neoplastische Gerinnungsaktivierung	2
1.2 Venöse Thromboembolien	3
1.3 Mammakarzinom	5
1.4 Ovarialkarzinom	6
1.5 Gerinnungsanalytik	7
1.5.1 „Homogenisierung“ von D-Dimer durch Plasmin-Proteolyse	12
1.6 Fragestellung	12
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Patientenkollektiv	13
2.2 Präanalytik	13
2.3 Datenerhebung	14
2.4 Onkologische Charakteristika	15
2.5 Hämostaseologie	15
2.6 Routineverfahren	17
2.6.1 Gerinnungsanalysen mittels Lichtstreuungsphotometrie	17
2.6.2 Chromogene Testverfahren mittels Absorptionsphotometrie	17
2.6.3 Latex turbidimetrische Teste mittels Absorptionsphotometrie	18
2.6.4 Weitere Testverfahren	18
2.7 Reagenzien, Puffer, Kontroll-Sets und Kalibratoren	18
2.8 Potentielles Referenzverfahren zur D-Dimer Bestimmung	20
2.9 Literaturrecherche, Auswertung und Statistik	23

3	ERGEBNISSE	24
	Globale Gerinnungsverfahren mittels Coapresta 2000 zur technischen Evaluierung	24
3.1	24	
3.2	Monoklonale Antikörper abhängige Quantifizierung mittels Standardverfahren.....	45
3.2.1	Vergleich weiterer Standardverfahren	46
3.3	Vergleich FDP mit den verschiedenen D-Dimer Testverfahren.....	47
3.4	Vergleich Tumorcharakteristika mit ausgewählten Gerinnungsparametern	48
3.5	Monoklonale Antikörper unabhängige Quantifizierung von D-Dimer-Antigen	51
4	DISKUSSION	58
4.1	Klinische Ergebnisse	58
4.2	Vergleich der automatisierten D-Dimer-Testverfahren	58
4.3	Referenzverfahren als mögliche Basis für eine gemeinsame Kalibrierung.	59
4.3.1	Fibrinogen unabhängiges Verfahren	59
4.3.2	Plasmin-Proteolyse.....	59
	Reduzierte Elektrophorese zur γ -Ketten-Detektion.....	60
4.3.3	60	
	Übertragung der Ergebnisse des Referenzverfahrens auf die automatisierten Testverfahren.	60
4.4	60	
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	62
	LITERATURVERZEICHNIS	64
6	LEBENS LAUF	67
7	DANKSAGUNG.....	68

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AT III	Antithrombin III
BE	Blutentnahme
BRCA	breast cancer associated
CaCl	Calciumchlorid
DCIS	ductale-Karzinoma-in-situ
DD	D-Dimer
DIC	Disseminierte intravasalen Gerinnung
dl	Deziliter
DTE	Dithiothreitol
FBG	Fibrinogen
FDP	Fibrinogenspaltprodukte
FEU	Fibrinogen äquivalente Einheiten
FIGO	Fédération internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
Glu	Glucose
HER	Humaner epitherdernaler Wachstumsfaktor
INR	International Normalized Ratio
LCIS	lobuläre-Karzinoma-in-situ
LE	Lungenembolie
M	Mol
Mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Mililmol
NaCl	Natriumchlorid
NST	invasives carcinoma of no special typ
PT	Prothrombinzeit
rpm	Umdrehung pro Minute
SDS	Natrium Dodeyl Sulfat
TNM Klassifikation	Tumor, Nodus, Metastasen Klassifikation
TVT	tiefen Beinvenenthrombose
TZ	Thrombinzeit
VTE	Venöse Thrombembolie
µl	Mikroliter

1 EINLEITUNG

1.1 Neoplastische Gerinnungsaktivierung

Die Lebenserwartung von Patientinnen mit einer malignen Grunderkrankung hat sich in den letzten Jahren durch neue Diagnostik- und Therapieansätze deutlich verlängert.[1]

Dadurch treten Begleiterkrankungen, sogenannte paraneoplastische Syndrome, durch die Neoplasie oder deren Behandlung induziert, als behandlungsbedürftig in den Vordergrund.

Hierzu zählt insbesondere die neoplastische Gerinnungsaktivierung, deren klinische Manifestation heute als Trousseau Syndrom bekannt ist [2]. 1823 wurde erstmalig durch Jean Baptiste Bouillaud über den Zusammenhang von Thrombosen der tiefen Beinvenen und Malignomen berichtet. Armand Trousseau beschrieb im Jahr 1865 den Zusammenhang einer wandernden, oberflächlichen Thrombophlebitis und Malignomen des Gastrointestinaltraktes. Ein Grund weswegen das Syndrom nicht nach seinem Erstbeschreiber Bouillaud benannt wurde mag der Tatsache geschuldet sein, dass Armand Trousseau zwei Jahre nach der Erstbeschreibung selbst eine Thrombophlebitis entwickelte. Im Verlauf wurde auch bei ihm ein Magenkarzinom diagnostiziert. Er verstarb zwei Jahre später. Heute wird unter dem Begriff Trousseau-Syndrom eine Vielzahl von thromboembolischen Erkrankungen aufgeführt. Es gibt keine klare Definition. Der Begriff Trousseau-Syndrom sollte aber, unter aktuellen Gesichtspunkten, einer Erstmanifestation eines thromboembolischen Ereignisses mit konsekutiver Diagnose einer malignen Grunderkrankung oder eines sekundären, klar mit einer malignen Grunderkrankung assoziierten, thromboembolischen Ereignisses vorbehalten sein [3].

Eine venöse Thromboembolie aufgrund einer Tumorerkrankung ist die zweithäufigste Todesursache bei Krebspatienten nach dem Versterben an der Grunderkrankung selbst [4]. Etwa 20% aller Thromboembolien werden durch Krebserkrankungen verursacht. Patienten mit einer Tumorerkrankung haben ein bis zu 4,7-fach erhöhtes Risiko eine VTE zu erleiden [5].

Das Risiko einer Thromboembolie im Rahmen einer Krebserkrankung zu erleiden wird multifaktoriell beeinflusst. Hierzu zählt die Tumorart, Stadium der Erkrankung, Metastasierung aber auch durch die Behandlung wie zum Beispiel ein zentraler Venenzugang oder medikamentöse Therapie, insbesondere Chemotherapeutika und Biologicals [5-8].

Risikofaktoren einer Thrombembolie bei Krebspatienten	
Kategorie	Risikofaktoren
Patienten assoziierte Risikofaktoren	Alter
	Begleiterkrankungen
	Adipositas
	Stattgehabte Thrombose
Malignom assoziierte Risikofaktoren	Tumorart
	Staging
	Grading
	Histologie
	Zeitpunkt (höchstes Risiko in den ersten 3-6 Monaten)
Behandlungsassoziierte Risikofaktoren	Chemotherapie
	Antianginöse Therapie
	Hormontherapie
	Erythropoese stimulierende Therapie
	Transfusionen
	Venöse Katheter
	Bestrahlung
	Operation

Abbildung 1: Risiken für eine Thromboembolie bei Krebspatienten nach Khorana, A.A., et al. [8].

Die Neoplasie assoziierte, biologische Gerinnungsaktivierung zeigt sich bereits häufig durch Auffälligkeiten in den gängigen, gerinnungsspezifischen Laborverfahren auch ohne Zeichen eines thromboembolischen Ereignisses. Des Weiteren kann, parallel zu der Manifestation einer Tumorerkrankung und mit deutlichem Anstieg im Rahmen einer Metastasierung, laborchemisch eine Aktivierung des Gerinnungssystems gemessen werden. Hier zeigen sich insbesondere Auffälligkeiten bei Thrombin-Antithrombin Komplex, Gerinnungsfaktor IX und X, Prothrombin Fragmente F1 und 2, den Fibrinopetide A und B, Fibrinabbauprodukte, D-Dimer und Plasmin-Antiplasmin-Complexen [9].

Das Risiko für ein thromboembolisches Ereignis wird ferner durch die Krebsart beeinflusst. Ein hohes Risiko besteht bei Beteiligung von Pankreas, Hirn, Ovar, Darm, gynäkologischer und hämatologischer Neoplasie. Bei Lungen- und Dickdarmkrebs zeigt sich ein intermediäres Risiko. Das geringste Risiko für eine malignominduzierte VTE konnte bei Prostata- und Brustkrebs nachgewiesen werden [10]. Davon muss die absolute Anzahl an Thrombosen pro Karzinom unterschieden werden. Hier wird bei Prostata-, Dickdarm-, Lungen-, und Brustkrebs die höchste Anzahl an VTE beschrieben. Dies wird durch die höhere Prävalenz und die längere Lebenserwartung im Rahmen dieser Krebserkrankungen erklärt.

1.2 Venöse Thromboembolien

Unter venösen Thromboembolien werden die Krankheitsbilder der tiefe Venenthrombose und der Lungenembolie zusammengefasst. Zwei Krankheitsbilder mit unterschiedlichen Ausprägungen, die aber dem gleichen, dynamischen Erkrankungsprozess unterliegen. Als initial Ereignis ist die tiefe Venenthrombose, die

meistens ihren Ursprung in den unteren Extremitäten hat, zu sehen. In 10-30% der Fälle ist ein so entstandener Thrombus, welcher sich in die Lungenstrombahn verlagert und zur Embolisierung einer oder mehrerer Lungenarterien führt, Ursache einer Lungenembolie. Dieser Verschluss führt zu einem konsekutiven Perfusionsdefekt mit folgendem Freisetzen von diversen Mediatoren [11].

Die jährliche Inzidenz einer venöse Thromboembolie beträgt in Europe 1 bis 2 Fällen pro tausend Einwohner und stellt damit eine relativ häufige Erkrankung dar [12]. Im Rahmen einer Kohortenstudie, basierend auf drei verschiedenen Datenbanken aus dem deutschen Gesundheitssystem, ergeben sich für die Jahre 2010 bis 2013 ähnliche Zahlen. Je nach Datenbank zwischen 1,4 bis 3,2 Fälle pro Tausend Einwohner. [13]. Durch den häufig stillen Krankheitsverlauf sind Angaben zur Inzidenz jedoch häufig mit hoher Unsicherheit behaftet [14].

Das Verständnis der Pathogenese der venösen Thromboembolie ist essentiell um Patienten mit einem höheren Risiko zu identifizieren. Diese können von intensivierten präventiven und therapeutischen Maßnahmen profitieren. Die Pathogenese der venösen Thromboembolie ist multifaktoriell. Die einzelnen Risikofaktoren (Abbildung 2) für ein thromboembolisches Geschehen werden für sich alleine betrachtet als relativ gering gewertet. Durch eine Kombination von verschiedenen Anomalien, vergesellschaftet mit diversen Umwelteinflüssen, kann allerdings die „Schwelle“ erreicht sein und es kommt zu einem thromboembolisches Geschehen [15].

Risikofaktoren für venöse Thrombembolie	
Angeborene Risikofaktoren	Erworbene Risikofaktoren
Faktor V Leiden Mutation	Immobilisation
Prothrombin Mutation	Operation in den letzten 3 Monaten
Protein S Mangel	Stattgehabte Thromboembolie
Protein C Mangel	Malignom
Antithrombin III Mangel	Adipositas
Heparin Faktor II Mangel	Nikotinkonsum
Plasminogen Mangel	Arterielle Hypertonie
Faktor XII Mangel	Antiphospholipid Syndrom
Gesteigerte Faktor VIII Aktivität	Nephrotisches Syndrom
	Essentielle Thrombozytämie
	Hormontherapie
	Sichelzell Anämie
	Operation

Abbildung 2: Risikofaktoren für venöse Thrombembolien nach Lippi, G. et al. [15]

Die Pathogenese der venösen Thromboembolie basiert auf der sogenannten Virchow Trias (Abbildung 3). Benannt nach dem deutschen Pathologen Rudolf Virchow (1821 – 1902) [16].

Virchow stellte als wesentliche Faktoren der venösen Thrombembolie einen verlangsamten Blutfluss, einen Gefäßwandschaden und die erhöhte Gerinnungsneigung des Blutes heraus.

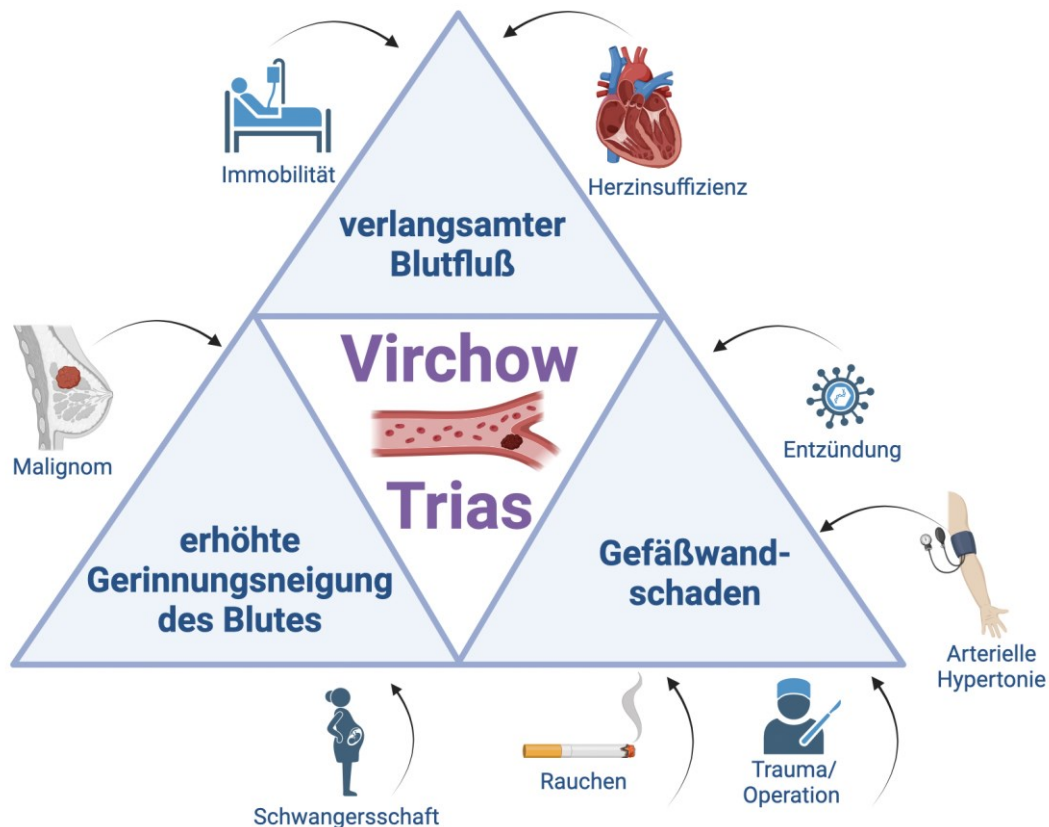


Abbildung 3: Virchow Trias zur Darstellung der Pathogenese der venösen Thromboembolie nach I Care, Georg Thieme Verlag [17]

1.3 Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen weltweit. Mit einer stetig steigenden Inzidenz ist das Mammakarzinom verantwortlich für ca 29% der Krebserkrankungen bei Frauen [18-20].

Das Lebenszeitrisko einer Frau an Brustkrebs zu erkranken liegt bei 12,9%. Das heißt circa jede 8. Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom. Die Inzidenz sowie das mittlere Erkrankungsalter variieren stark abhängig vom Ursprungsland. In Deutschland liegt die Inzidenz bei circa 69.000 Neuerkrankungen, das mittlere Erkrankungsalter einer Frau bei 64 Jahren [21].

Durch Fortschritte in der Therapie und Diagnostik konnte in den letzten Jahrzehnten die 5-Jahres-Überlebensrate der Betroffenen deutlich verbessert werden. Dennoch stellt das Mammakarzinom weltweit die häufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen dar [22, 23].

Es gibt multiple Risikofaktoren, die mit dem Auftreten eines Mammakarzinoms in Zusammenhang gebracht werden. Das Alter der Patientin bei Erstdiagnose spielt hierbei, wie zu erwarten ist, neben dem Geschlecht eine wichtige Rolle. Bei stetig steigendem Lebensalter steigt ebenfalls die Inzidenz für ein Mammakarzinom deutlich an [1, 24]. Ca 30% aller Frauen mit einem Mammakarzinom weisen zudem eine positive Familienanamnese bzgl. dem Auftreten eines Mammakarzinoms und/ oder Ovarialkarzinoms auf. Allerdings wird bei nur ca 5-10% aller Mammakarzinome eine Keimbahnmutation nachgewiesen [24-26]. Die zwei bekanntesten Mutationen sind hierbei das breast cancer associated gene 1 und 2 (BRCA 1/ BRCA 2). Bei nachgewiesener BRCA-Mutation beträgt das Risiko an einem Mammakarzinom zu

erkranken ca. 60% [25, 27]. Es gibt noch eine Vielzahl an weiteren Keimbahnmutationen, die mit einem erhöhten Risiko eines Mammakarzinoms in Verbindung gebracht werden [24]. Weiterhin wird vermutet, dass multiple, aktuell noch unbekannte Mutationen, in Zukunft eine wichtige Rolle in der Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms spielen werden.

Auch hormonelle Faktoren werden mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten eines Mammakarzinoms in Verbindung gebracht. Eine frühe Menarche und später Menopause, späte erste Gravidität sowie Hormonersatztherapie werden hierfür aufgeführt. Als weitere Risikofaktoren werden zudem der moderne Lebensstil mit zunehmender Adipositas, Nikotin-/ Alkoholabusus und Bewegungsmangel sowie die zunehmende Strahlenexposition und ein kontralaterales Mammakarzinom diskutiert [24].

Histologisch wird das Mammakarzinom in nicht-invasive-in-situ-Karzinome sowie invasive Mammakarzinome unterteilt. Bei den nicht-invasiven Karzinomen sind das ductale-Karzinoma-in-situ (DCIS), von den Milchgängen (Ductuli) ausgehend, sowie das lobuläre-Karzinoma-in-situ (LCIS), von den Läppchen (Lobuli) ausgehend, zu erwähnen. Hierzu wird ebenfalls das Paget-Karzinom gezählt, welches lediglich die Haut der Mamille betrifft [28].

Das invasive Mammakarzinom wird ebenfalls histologisch in weitere Subtypen unterteilt. Hierbei tritt das invasiv-ductale Mammakarzinom, auch als invasives carcinoma of no special typ (NST) bezeichnet, mit 70-80% am häufigsten auf. An zweiter Stelle kommt das invasiv-lobuläre Mammakarzinom mit einem Anteil von 10-15%. Deutlich seltener sind zahlreiche weitere Subtypen wie beispielsweise das tubuläre, muzinöse, papilläre oder medulläre invasive Mammakarzinom [28-30].

Unabhängig von den oben genannten histologischen Subtypen wird das invasive Mammakarzinom ebenfalls histologisch anhand des Differenzierungsgrades (Grading) weiter unterteilt. Hierbei erfolgt nach Elston und Ellist eine Differenzierung in der Grade: gute Differenzierung (G1), mäßige Differenzierung (G2) und schlechte Differenzierung (G3) [31]. Zur weiteren Differenzierung werden aktuell in der klinischen Praxis molekularbiologisch drei „Biomarker“ genutzt [28]. Der Östrogenrezeptor, der Progesteronrezeptor und der HER2-neu-Rezeptor. Diese spielen sowohl therapeutisch als auch prognostisch eine entscheidende Rolle.

Die Therapie des Mammakarzinoms ist eine multimodale Therapie, die sich aus operativer, systemischer, strahlentherapeutischer, antihormoneller sowie Immuntherapie zusammensetzen kann. Hierbei sollte die Anamnese der Patientin, sowie die vorliegende Tumorbiologie in der individuellen Therapieplanung berücksichtigt werden. In diesem Zusammenhang wurden des Weiteren eine Vielzahl an prognostischen Faktoren identifiziert, welche einen entscheidenden Einfluss auf die Wahl der Therapie sowie den therapeutischen Erfolg darstellen. Prognostisch sind hierbei insbesondere ein positiver axillärer Nodalstatus, die Größe des Tumors bei Erstdiagnose, das Grading, der Rezeptorstatus sowie das Alter der Patientin zu erwähnen [32, 33].

1.4 Ovariakarzinom

Ein Drittel aller bösartigen Neubildungen der weiblichen Genitale sind vom Eierstock ausgehend. Das Ovariakarzinom ist meist ein schnell wachsender, sehr maligner Tumor. Bei nur unspezifischer klinischer Symptomatik und damit einhergehender sehr

erschwerter Früherkennung, erfolgt die Erstdiagnose überwiegend in weit fortgeschrittenem Stadium.

Die Morbidität des Ovarialkarzinoms steigt kontinuierlich bis zum 85. Lebensjahr an. Das mittlere Erkrankungsalter in Deutschland liegt aktuell bei ca. 69 Jahren, eine von 71 Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Ovarialkarzinom.

Mit einer Inzidenz von über 7000 Neuerkrankungen entspricht das ca 3,2% aller maligner Neubildungen der Frau [21]. Das Ovarialkarzinom ist der letalste gynäkologische Tumor und mit 5,3 aller Krebssterbefälle nach dem Mammakarzinom die häufigste tödliche, gynäkologische Krebserkrankung [34].

Hierbei unterscheidet sich die Letalität maßgeblich von der Morphologie des Tumors sowie des Stadiums bei Erstdiagnose.

Eine Einteilung der Stadien erfolgt abhängig von der Ausbreitung des Tumors nach der FIGO-Klassifikation in vier Stufen.

76% aller Ovarialkarzinome werden erst in weit fortgeschrittenem Stadium III-IV erkannt. Das 5-Jahres-Überleben liegt daher derzeit insgesamt bei nur 43%. Erfolgt eine Früherkennung im Stadium I oder II zeigt sich das 5-Jahres-Überleben deutlich verbessert bei bis zu 89% im Stadium I.

Histologisch tritt das seröse Adenokarzinom mit 63% aller bösartigen Neuerkrankungen der Eierstöcke am häufigsten auf. Es gibt jedoch zahlreiche weitere histologische Subtypen, wie beispielsweise das endometrioides, das klarzellige oder das muzinöse Zystadenokarzinom. Einige sehr seltene Formen des Ovarialkarzinoms, wie Keimzelltumoren können auch bereits im Kindes-/ Jugendalter auftreten [35].

Als Risikofaktoren des Ovarialkarzinoms spielt ebenfalls eine familiäre Häufung für maligne Erkrankungen eine wichtige Rolle. Insbesondere das Auftreten von Ovarialkarzinom, Mammakarzinom und Endometriumkarzinom, jedoch auch vom Darm ausgehend Karzinome bei Verwandten ersten Grades stellen einen deutlichen Risikofaktor dar. Die häufigsten Keimbahnmutationen werden wie beim Mammakarzinom im breast cancer associated gene 1 und 2 (BRCA 1/ BRCA 2) nachgewiesen und steigern das Erkrankungsrisiko erheblich. Allerdings können Keimbahnmutationen nur bei ca. 10-20% nachgewiesen werden. Als weitere Risikofaktoren neben dem zunehmenden Alter werden ebenfalls Adipositas sowie hormonelle Faktoren diskutiert.

Die Therapie des Ovarialkarzinoms setzt sich meist aus einem operativen Debulking des Tumormasse sowie einer (neo-) adjuvanten meist taxan-/ platinhaltigen Chemotherapie zusammen. Hierbei dient die Operation sowohl zur Diagnostik (histologische Sicherung) als auch zum genauen Staging. In Abhängig vom postoperativem makroskopischen Tumorrest spielt das operative Debulking eine entscheidende Rolle zur Prognoseverbesserung.

Trotz deutlicher Fortschritte der zytotoxischen Therapie, beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom nur 30%, was die Notwendigkeit für eine Verbesserung der therapeutischen und diagnostischen Ansätze darlegt [35]

1.5 Gerinnungsanalytik

Als wichtigster laborchemischer Marker in der klinischen Routinediagnostik zur Erfassung einer Gerinnungsaktivierung gilt D-Dimer. D-Dimer Antigen ist ein

fibrinspezifisches Neo-Epitop, das durch die kovalente Verbindung von zwei D-Domänen im Fibrinkomplex durch FXIIIa entsteht [36].

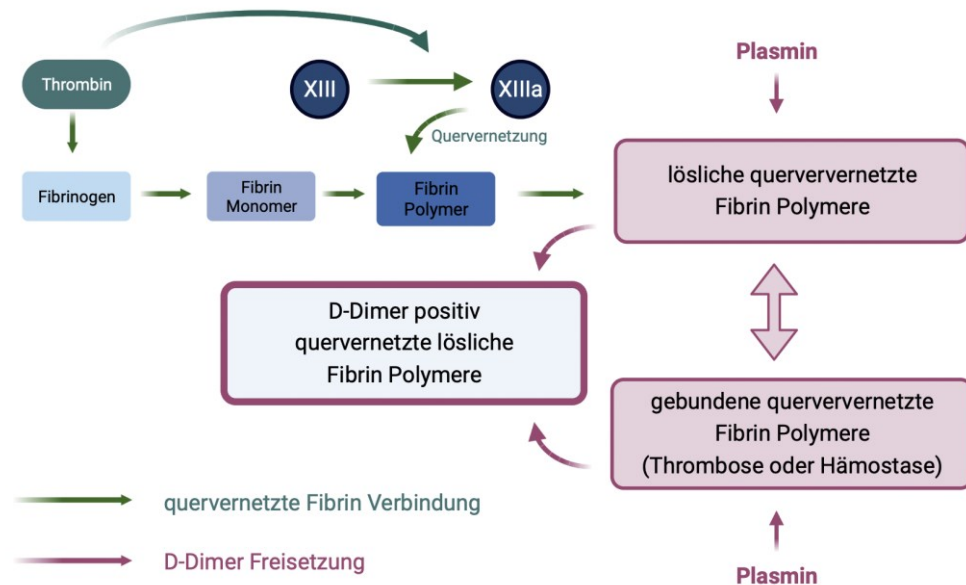


Abbildung 4: Gerinnungsaktivierung mit Bildung und Auflösung der Fibrin Gerinnsel. Die Abbauprodukte bestehen aus zwei kovalent verbundenen Fibrin-D-Domänen. Dies wurden während der Gerinnselbildung mittels Faktor XIII quervernetzt. Dieses Fragment kann durch monoklonale Antikörper in D-Dimer Tests als Nachweis der Gerinnungsaktivierung detektiert werden. Nach Adam, S.S., et al [37].

Die verwendeten Tests basieren auf monoklonalen Antikörpern, die mit dimerisierten D-Domänen, aber nicht mit Fibrinogen oder mit Fibrinogenabbauprodukten reagieren. Zur Immunisierung im Rahmen der Antikörper-Herstellung werden Fibrinabbauprodukte verwendet. Während einer Gerinnungsaktivierung wird die Bildung und Auflösung der Fibrin Gerinnsel durch das Gerinnungssystem geregelt. Die fibrinolytische Komponente führt durch die enzymatische Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin zu einer Auflösung der Fibringerinnsels. Die hierdurch entstehenden Abbauprodukte bestehen aus zwei kovalent verbundenen Fibrin-D-Domänen welche während der Gerinnselbildung mittels Faktor XIII vernetzt wurden. Dieses Fragment kann mittels monoklonaler Antikörper in D-Dimer Tests als Nachweis einer Gerinnungsaktivierung bestimmt werden [37].

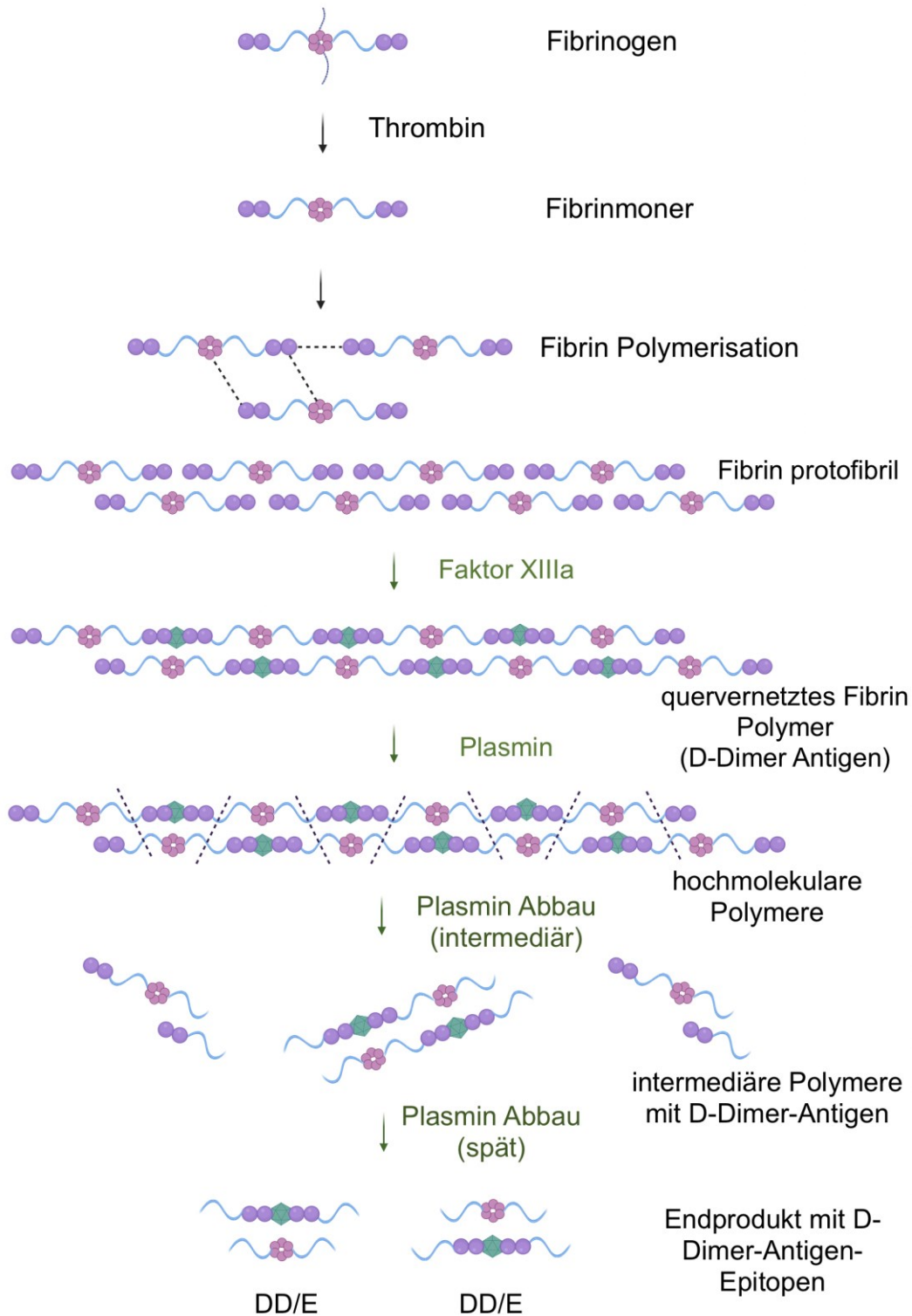


Abbildung 5: Bildung und Auflösung der Fibrin Gerinnel während einer Gerinnungsaktivierung. Durch enzymatische Umwandlung von Plasminogenen zu Plasmin kommt es zu einer Auflösung der Fibrinclots. Es entstehen Abbauprodukte bestehend aus zwei kovalent verbundenen Fibrin-D-Domänen. Diese wurden während der Gerinnelbildung mittels Faktor XIII vernetzt. Dieses Fragment kann mittels monoklonaler Antikörper in D-Dimer Tests als Nachweis einer Gerinnungsaktivierung nachgewiesen werden. Nach Adam, S.S., et al [37].

Die ersten D-Dimer Tests wurden um 1970 zum Nachweis einer Disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) verwendet [38]. Heute stehen verschiedene

Testverfahren zur routinemäßigen D-Dimer Bestimmung zur Diagnose einer Disseminierten intravasalen Gerinnung zur Verfügung. Schnell stellte sich heraus, dass sich D-Dimer Tests auch gut zum Ausschluss einer tiefen Beinvenenthrombose (TVT) und Lungenembolie (LE) eignen. Ein niedriger D-Dimer Spiegel schließt eine TVT oder mit hoher Sicherheit aus.

Zum laborchemischen Ausschluss eines thromboembolischen Geschehens wurde für einige Testverfahren vor einigen Jahren ein Grenzwert von 0,5 µg/ml FEU festgelegt. Fibrinogen Äquivalenten Einheiten (FEU) ist die Menge an Fibrinogen, welches zur Bildung eines quervernetzten Fibrin Gerinnsels und der anschließenden Proteolyse durch Plasmin erforderlich ist. [39]. Andere Testverfahren werden durch gereinigtes Fibrinfragment D-Dimer als Basis kalibriert.

Bei anderen Testverfahren erfolgte eine Anpassung der Kalibrierung um ähnliche Grenzwerte zu erhalten [40]

Auch bei gesunden Probanden ist D-Dimer Antigen im Blut als Ausdruck der physiologischen Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin, nachweisbar.

Die D-Dimer Bestimmung weist im Rahmen der Diagnostik von thromboembolischen Geschehen einen hohen negativen prädiktiven Wert auf. D-Dimer-Tests werden in der Ausschlussdiagnostik der TVT und LE häufig in Kombination mit klinischen Score-Systemen zur Erhöhung der Vortest Wahrscheinlichkeit eingesetzt. Insbesondere der Wells Score ergibt durch die Anamnese und Erfassung von klinischen Parametern eine gute Einschätzung der klinischen Wahrscheinlichkeit über das Vorliegen einer Lungenembolie oder einer Beinvenenthrombose [41-43].

Klinisches Model zur Vortestwahrscheinlichekeit einer Tiefen Venen Thrombose	
Charakteristika:	Score:
Aktive Krebserkrankung	1
Lähmung, Parese oder kürzliche Immobilisation der unteren Extremität	1
Bettruhe für 3 Tage oder größere Operation in den letzten 12 Wochen mit Regionalanästhesie oder Vollnarkose	1
Lokalisierter Druckschmerz im Verlauf der Venen	1
Schwellung des gesamten Beins	1
Wadenschwellung > 3 cm gegenüber der Gegenseite	1
Eindrückbares Ödem am symptomatischen Bein	1
Kollateralvenen	1
Frühere dokumentierte tiefe Beinvenethrombose	1
Alternative Diagnose mindestens genauso Wahrscheinlich	-2

Abbildung 6: Wells Score zur Vorhersage der Vortestwahrscheinlichkeit einer tiefen Beinvenenthrombose nach Wells, P.S., et al [43].

Exemplarisch der häufige verwendete Wells Score (Abbildung 6) als klinisches Model zur Vorhersage der Vortestwahrscheinlichkeit einer tiefen Beinvenenthrombose. Ein

Score von 2 oder höher ergibt eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer tiefen Beinvenenthrombose. Zeigt der Test einen Score von weniger als 2 ist das Vorliegen einer tiefen Beinvenenthrombose unwahrscheinlich.

Im Verlauf des Lebens lässt sich mit zunehmendem Lebensalter ein Anstieg des D-Dimers Spiegels verzeichnen. In einer bevölkerungsbasierten Kohorte zeigte sich die obere 95% Perzentile für die über 70-jährigen 2,5mal höher als bei den unter 50-jährigen [44]. Dadurch kommt es mit zunehmendem Alter der getesteten Patienten zu einer progredienten Abnahme der Spezifität, wenn an einem Grenzwert von 500 µg/l festgehalten wird. Eine Anhebung des Grenzwerts wurde lange Zeit aber Sorgen aus vor Abnahme der Sensitivität nicht durchgeführt. Douma et al. gelang es erstmals in einer retrospektiven Arbeit einen altersadaptierten, statistisch plausiblen D-Dimer Grenzwert für Patienten über 50 Jahren zu ermitteln. Durch diese Altersadaptation konnte eine deutlich verbesserte Spezifität zur laborchemischen Detektion von thrombembolischen Ereignissen erzielt werden [45]. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung dieser Arbeit waren die altersadaptierten Grenzwerte allerdings noch nicht flächendeckend in der klinischen Praxis implementiert.

Die Ergebnisse der verschiedenen D-Dimer Testverfahren zeigen eine ausgeprägte quantitative Varianz. Dies führt in der klinischen Praxis zu einer mangelnden Vergleichbarkeit und daraus resultierenden falschen, potentiell patientenschädigenden, Behandlungsentscheidungen [46]. Grund ist, dass bisher kein Konsens über das verwendete Eichmaterial besteht und die Tests sich außerdem hinsichtlich der verwendeten Antikörper unterscheiden.

Bei paralleler Messung mit verschiedenen Testverfahren zeigt sich ein unterschiedlicher Anstieg der Eichkurven. Dies führt zu einer großen Variabilität zwischen den Testverfahren, insbesondere in hohen Messbereichen mit Auswirkungen auf die Diagnose einer DIC und weiteren klinischen Fragestellungen. D-Dimer-Antigen-Tests detektieren nicht nur das D-Dimer des Fibrinfragments, sondern eine große Anzahl verschiedener Fibrinverbindungen die dimerisierte D-Domänen enthalten [47, 48].

In vorangegangenen Publikationen zeigte sich bei den gängigen D-Dimer-Tests eine große Variabilität bezüglich der hauptsächlich nachzuweisenden Fibrinverbindungen [49].

Während einige Testverfahren bevorzugt niedermolekulare Fibrinabbauprodukte wie das Fibrinfragment D-Dimer detektieren, reagieren andere Testverfahren fast ausschließlich mit hochmolekularen Verbindungen, welche mehrere dimerisierte D-Domänen enthalten. Dies könnte sich durch die leichtere Überbrückung von Fibrinverbindungen mit größerer Molekülgröße durch die antikörperbeschichteten Latexkügelchen als Fibrinfragment D-Dimer oder andere Strukturen mit niedriger Molekülgröße erklären lassen, daher ist eine Kalibrierung mittels D-Dimer bei diesen Tests nicht möglich [50, 51].

Zur Herstellung der D-Dimer-Tests wird eine Test-spezifische Kalibrierung, welche ausschließlich für das jeweilige Testverfahren angewendet werden kann, verwendet. Die zur Kalibrierung verwendeten Substanzen enthalten Fibrinfragment D-Dimer, in-vitro hergestellte Gemische aus Fibrinabbauprodukten oder gepoolte Plasmaprobe [52]. Die genaue Herstellung wird in der Regel von den Herstellern nicht offengelegt. Gepooltes Plasma von Patienten mit einer Erkrankung, die eine erhöhte Gerinnungsaktivierung generiert, und damit einen erhöhten D-Dimer Antigen Spiegel

im Plasma zeigt sowie verschiedene, in vivo erzeugte Fibrinpräparate, die eine Reihe von Fibrinverbindungen enthalten, wurden als mögliche Kalibratoren getestet.

Leider zeigt sich hier aber eine ausgeprägte Variabilität der Eichmaterialien bezüglich der Reaktivität, abhängig von Charge, Herstellung und Lagerung.

Eine weitere Ursache für Unklarheiten bei der Interpretation von D-Dimer-Ergebnissen ist, dass kein Konsens bezüglich der numerischen Basis der Kalibrierung besteht. Reportiert werden unterschiedliche FEU-Werte aller D-Dimer-Werte.

1.5.1 „Homogenisierung“ von D-Dimer durch Plasmin-Proteolyse

Kornberg et al schlagen eine ausführliche Plasminproteolyse zur Vereinheitlichung des D-Dimer Antigen im Plasma vor [53]. Durch Inkubation der Plasmaproben mit Plasmin werden alle dimerisierten D-Domänen zu Fibrinfragment D-Dimer umgewandelt.

Zur Erfassung der Fibrin-Fragmente-D-Dimer wurde bei früheren Untersuchungen eine Polysaccharidgel-Elektrophorese und Immunblot verwendet.

Mittels gereinigtem Fibrinfragment D-Dimer kann nun eine Kalibrierung durchgeführt werden. Die genaue Menge kann durch einen quantitativen Proteintest zum Wiegen des lyphophilisierten Protein Materials bestimmt werden. Leider ist die Gel Elektrophorese und Immunblotting mittels Nitrocellulose ein mehrstufiges und hauptsächlich manuelles Verfahren mit einer hohen intra- und intertest-Variabilität. In der Gesamtschau ist dieses Verfahren daher leider nicht als zuverlässiges Referenzverfahren zu nutzen.

Mit dem im Rahmen der vorliegenden Studie gewonnen Probenmaterial wurde daher ein neu entwickeltes, auf Kapillarelektrophorese und In-Kapillar-Immunodetektion basierendes Verfahren untersucht. Die Methodenentwicklung hierzu erfolgte im Rahmen eines weiterführenden Projektes durch das Team der wissenschaftlichen Arbeitsgruppe des Gerinnungszentrums.

1.6 Fragestellung

In der hier vorliegenden Arbeit soll anhand eines Patientenkollektivs mit vermuteter paraneoplastischer Gerinnungsaktivierung durch disseminierte Tumorleiden im Rahmen gynäkologischer Tumoren, anhand spezielle Aktivierungsmarker der Gerinnung eine vermehrte Gerinnungsaktivierung gemessen werden.

Die durch eine aktive Krebserkrankung bestehende Gerinnungsaktivierung wird in den in den hier gesammelten Proben primär mittels D-Dimer Spiegel in den Proben nachgewiesen. Weitere Gerinnungsparameter wurden mittels eines weiteren vollautomatischen Gerinnungsanalysegerätes bestimmt und dieses mit den D-Dimer Referenzverfahren evaluiert.

Die Messung von D-Dimer Antigen erfolgte mittels mehrerer automatisierter Messmethoden, sowie mittels einer potentiellen Referenzmethode. die

- Homogenisierung des D-Dimer-Antigens durch Plasmin-Proteolyse
- Trennung der Fibrinderivate mittels Kapillar-Elektrophorese und
- In-Kapillar-Immunodetektion und Quantifizierung erfasst.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden zwischen Februar und September 2014 konsekutiv alle stationären und ambulanten Patientinnen mit Mammakarzinom oder Ovarialkarzinom an der Frauenklinik der Universitätsmedizin Mannheim gescreent. Letztendlich konnten nach unten genannten Kriterien 60 Patientinnen eingeschlossen werden. Mittels Fragebogen (siehe Anhang) erfassten wir vor der Blutentnahme Alter, Größe, Gewicht, die Tumorerkrankung, deren Erstdiagnose sowie initiale TNM Klassifikation. Die erfolgte Vorbehandlung ob Operation, Bestrahlung oder Chemotherapie wurden erfasst. Des Weiteren umfasste die Anamnese eine diagnostizierte Gerinnungserkrankung, ergänzt durch die Erhebung eines stattgehabten thromboembolischen Ereignisses sowohl bei der Patientin als auch in der Familienanamnese sowie eine verstärkte Blutung.

2.2 Präanalytik

79 Patientinnen stimmten einer Teilnahme zu, es erfolgte im Rahmen der Routineblutentnahme eine periphervenöse Blutentnahme. Als Probenmaterial wurden zusätzlich zwei S-Monovetten® (Fa. Sarstedt, Tri-Natriumcitrat Lösung Mischungsverhältnis 9:1) 8,2 ml, eine S-Monovette® (Fa. Sarstedt, Tri-Natriumcitrat Mischungsverhältnis 9:1) 2,9 ml als Probenmaterial gewonnen. Mittels der Routinediagnostik erfolgte eine D-Dimer Bestimmung (Innovance®, Fa Siemens). 60 Patientinnen zeigten eine entsprechende Laborkonstellation mit einer D-Dimer Elevation größer 0,5mg/dl, welche als Gerinnungsaktivierung gewertet wurde, und konnten eingeschlossen werden.

Die zwei Citratmonovetten 8,2 ml wurden für 15 Minuten bei 4500 rpm zentrifugiert. Das Plasma wurde anschließend pipettiert, das Citratplasma wurde erneut für eine Minute bei 18000 rpm zentrifugiert. Dieser zweistufige Zentrifugationsprozess dient einer vollständigen Elimination der Thrombozyten aus den Plasma Proben um eine potentielle in-vitro Gerinnungsaktivierung zu verhindern. Das so gewonnen Plasma wurde schockgefrostet und dann bei – 80°C gelagert.

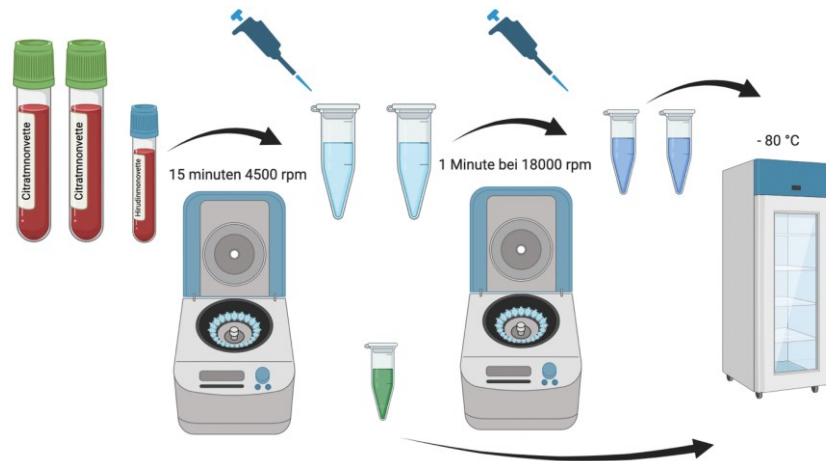


Abbildung 7: Präanalytik der Proben mit nachgewiesener Gerinnungsaktivierung inklusive Zentrifugation und Kältekonservierung

2.3 Datenerhebung

Die bezüglich der Tumorerkrankung relevanten Daten wurden mittels digitaler Aktenrecherche und Fragebogen erhoben. Des Weiteren wurde mittels des Fragebogens Dauermedikation, und gerinnungsspezifische Vordiagnosen sowie Auffälligkeiten erhoben.

Der gesamte Datensatz wurde gemäß anonymisiert und die Daten anschließend in einer Datenbank erfasst und primär ausgewertet (Microsoft Office, Excel, Microsoft Corporation Redmond, Washington USA 2011).

Probandennummer: _____ Abnahmedatum: ____ . ____ . ____

Geburtsdatum: ____ . ____ . ____

Größe: _____ cm

Gewicht: _____ kg

Mamma CA Ovarial CA O

Erstdiagnose: ____ . ____ . ____

Tumorstadium bei ED: T: __ N: __ M: __

Vor OP: Ja: O Nein: O

Bestrahlung: Ja: O Nein: O

Chemo gehabt: Ja: O Nein: O

Gerinnungserkrankung bekannt

Ja: O Nein: O

Wenn Ja, welche: _____

Labor: Quick: _____ aPTT: _____ D-Dimer: _____

Dauermedikation mit gerinnungshemmenden Medikamenten?

Ja: O Nein: O

Wenn Ja, welche: _____

Letzte Applikation vor Laborabnahme: _____

Dauermedikation:

Hatten Sie bereits eine Thrombose / Embolie: Ja: O Nein: O

Hatten Sie jemals eine verstärkte Blutung: Ja: O Nein: O

Thrombose / Embolie in der Familienanamnese: Ja: O Nein: O

Abbildung 8: Fragebogen zur Erhebung der weiteren klinisch relevanten Parameter

2.4 Onkologische Charakteristika

Von den insgesamt 60 Patientinnen litten zum Zeitpunkt des Studien-Einschlusses 44 (73%) Patientinnen an einem Mammakarzinom, 16 (27%) Patientinnen hatten die Diagnose Ovarialkarzinom. Das Alter der Patientinnen betrug zum Zeitpunkt der BE (Blutentnahme) im Mittelwert 66,3 Jahre bei den Mammakarzinom Patientinnen, in der Ovarialkarzinom Gruppe 63,6 Jahre.

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der Neoplasie zeigte sich in beiden Gruppen ein ähnlicher Mittelwert: 58,4 Jahre bei den Patientinnen mit Mammakarzinom im Vergleich zu 58,4 Jahren in der Ovarialkarzinom Gruppe. Von der Diagnosestellung bis zur Blutentnahme vergingen im Mittel 96 Monate in der Mammakarzinom Gruppe und 62 Monate bei den Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Eine Metastasierung lag bei 35 (79,5%) Patientinnen mit Mammakarzinom und bei 15 (93,4%) Patientinnen mit Ovarialkarzinom vor. Im Rahmen einer neo- oder adjuvanten Therapie wurden 33 (75%) Patientinnen in der Mammakarzinom und 14 (87,5%) in der Ovarialkarzinom Gruppe einer Operation unterziehen. 33 (75 %) Patientinnen in der Mammakarzinom und eine (6,2 %) Patientin in der Ovarialkarzinom Gruppe erhielten eine Radiatio. Einer Chemotherapie wurde 37 Patientinnen (84%) in der Mammakarzinom und 15 Patientinnen (93,8 %) in der Ovarialkarzinom Gruppe zugeführt.

2.5 Hämostaseologie

In der Gruppe mit Brustkrebs gaben 40 (90%) Patientinnen an kein bisher keine spezifische Erkrankung im Sinne einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, kardiovaskulärem Ereignis, Schlaganfall, TVT oder Lungenembolie erlitten zu haben. Bei einer (2,3%) Patientin ist eine Koronare Herzerkrankung vorbeschrieben. Drei Patientinnen (6,8%) geben ein thromboembolisches Ereignis in der Familienanamnese an. Bei den Patientinnen mit Ovarialkarzinom zeigen sich 13 (81, 2%) Patientinnen ohne relevante gerinnungsspezifische Vorerkrankung. Bei einer (6,2%) Patientin ist eine Koronare-Gefäßerkrankung beschrieben, zwei Patientinnen (12,5%) berichtet von einer positiven Familienanamnese.

Gerinnungs- oder Thrombozytenhemmende Medikamente werden in der Gruppe mit Mammakarzinom von zehn (22,7 %) eingenommen. Davon erfolgte bei sieben (15,9%) Patientinnen eine Thrombozytenaggregationshemmung, gerinnungshemmende Medikamente wurde von drei (6,8%) Patientinnen eingenommen.

In der Gruppe der Patientinnen mit Ovarialkarzinom gaben 14 (87,) Patientinnen an keine gerinnungsspezifische Medikation einzunehmen. Zwei (12,5%) nahmen gerinnungshemmende Medikamente ein.

Eine subjektiv verlängerte Blutungszeit gaben in der Mammakarzinom Gruppe zwei Patientinnen (4,5%) und in der Ovarialkarzinom Gruppe ebenfalls zwei (12,5%) Patientinnen an.

In der Familienanamnese für thromboembolische Ereignisse zeigten sich bei elf (25%) Patientinnen in der Mammakarzinom- und zwei (12,5%) Patientinnen in der Ovarialkarzinom Gruppe ein positiver Befund.

Demographie, onkologische Charakteristika und Hämostaseologie

	Mamma-Karzinom		Ovarial-Karzinom	
	Wert	% [SD]	Wert	% [SD]
n	44		16	
Alter bei Blutentnahme (BE) (MW, Jahre)	66,30	11,24	63,625	11,9882
Alter bei Erstdiagnose (ED) (MW, Jahre)	58,34	12,36	58,375	13,9851
Intervall zw. ED & BE (Monate, MW)	95,66	87,32	62,188	81,6221
Metastasierte Erkrankung				
Nein	9	20,5	1	6,3
Ja	35	79,5	15	93,8
Operative Therapie				
Nein	11	25,0	2	12,5
Ja	33	75,0	14	87,5
Bestrahlung				
Nein	11	25,0	15	93,8
Ja	33	75,0	1	6,3
Chemotherapie				
Nein	7	15,9	1	6,3
Ja	37	84,1	15	93,8
Hämostaseologisch relevantes Ereignis				
Kein Ereignis	40	90,9	13	81,3
Kardiovaskuläres Ereignis	1	2,3	1	6,3
Thromboembolisches Ereignis in Familienanamnese	3	6,8	2	12,5
Gerinnungswirksame Medikation				
Keine Medikation	34	77,3	14	87,5
Thrombozytenaggregationshemmung	7	15,9	/	/
Antikoagulation	3	6,8	2	12,5
Blutungsneigung				
Nein	42	95,5	14	87,5
Ja	2	4,5	2	12,5
Thromboembolisches Ereignis in Familienanamnese				
Nein	33	75,0	14	87,5
Ja	11	25,0	2	12,5

2.6 Routineverfahren

In einer ersten Testreihe wurden die 60 Proben mittels eines Routinelabortestverfahrens analysiert. Hierzu wurden als Testgerät der vollautomatische Coagulationsanalyser Coapresta 2000 verwendet (Sekisui, Medical Co. Ltd., Tokio, Japan). Mit diesem Gerät können mittels optischem Detektionssystem Gerinnungstests, chromogene und immunturbidimetersiche Tests vollautomatisch durchgeführt werden:

2.6.1 Gerinnungsanalysen mittels Lichtstreuungsphotometrie

- Prothrombinzeit (PT) nach Quick zur Messung der Gerinnungszeit mittels der Aktivität der Gerinnungsfaktoren II, V, VII und X sowie der Fibrinogenmenge. Den Proben werden zur Aktivierung von Faktor VII Calcium und Gewebethromboplastin hinzugefügt. Hierdurch kommt es zu einer zu der konsekutiven Aktivierung der Faktoren X, V und II. Hierdurch wird eine Fibrinpolymerisation induziert. Gemessen wird die Prothrombinzeit in Sekunden zwischen Zugabe von Gewebethromboplastin und Calcium zum Plasma und der folgenden Bildung eines Fibringerinnsels. Die Ergebnisse werden in Sekunden, als Quick Wert in % und standardisiert nach International Normalized Ratio (INR) angegeben.
- aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) dient als Monitoring des intrinsischen Gerinnungssystems. Die Plasmaproben werden mittels Kontaktaktivator und Phospholipid inkubiert. Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung der intrinsischen Gerinnungskaskade. Die Zeit bis zur Gerinnselbildung nach der Zugabe von Calciumchlorid wird gemessen. Das Ergebnis wird in Sekunden als aPTT angegeben.
- Fibrinogen (FBG) wird mittels quantitativer Bestimmung nach der Thrombinzeitmethode nach Clauss bestimmt. Zu einer verdünnten Plasmaprobe wird Thrombin hinzugefügt. Hierdurch wird eine Fibrinbildung initialisiert. Die Zeit bis zur Fibrinbildung wird gemessen. Diese Gerinnungszeit ist abhängig von der Fibrinogenkonzentration in der Probe. Die Fibrinogenkonzentration wird mittels einer Kalibrationskurve, welche durch Plasma mit bekanntem Fibrinogenspiegel generiert wurde, bestimmt. Die Ergebnisse werden in Sekunden und, abgeleitet, in mg/dl angegeben.
- Thrombinzeit (TZ) Das Verfahren ähnelt dem oben genannten quantitativen Verfahren nach Clauss zur Fibrinogenbestimmung. Allerdings wird hier im Vergleich eine geringere Menge Thrombin zugefügt und die Laborprobe nicht vorverdünnt

2.6.2 Chromogene Testverfahren mittels Absorptionsphotometrie

- Antithrombin III (AT III) wird indirekt mittels chromogener Bestimmung der Thrombin-Aktivität bestimmt. zuerst erfolgt die Zugabe eines chromogenes Substrats für Thrombin und Heparin in die Probe. Anschließend wird Thrombin der Probe hinzugefügt. Das durch Heparin „aktivierte“ Antithrombin bindet Thrombin, gemessen wird die Thrombin-Aktivität, die übrig bleibt und das

chromogene Substrat spaltet, sodass das gefärbte Produkt entsteht. Da die antikoagulatorische Wirkung von Heparin hauptsächlich Antithrombin III vermittelt wirkt, kann ein Mangel zu einer insuffizienten Therapie führen. Durch einen Mangel besteht ein erhöhtes Thromboserisiko.

2.6.3 Latex turbidimetrische Teste mittels Absorptionsphotometrie

- D-Dimer (DD) wurden quantitativ mittels immunturbidimetrischen Reagenzien-Kit (Nanopia™ D-Dimer Reagenz, Sekisui Diagnostics, Tokio, Japan) durch optische Messung in Plasmaproben bestimmt. Das Reagenzien-Kit basiert auf Latexpartikeln welche an einem für D-Dimer spezifischen monoklonalen Antikörper konjugiert sind. Die D-Dimere in der Plasmaproben reagieren mit antihumanen monoklonalen Mausantikörpern gegen D-Dimer. Dies führt zur Agglutination der Latexpartikel mit konsekutiver Trübung. Die Trübungsänderung wird mittels Spektralphotometer gemessen, durch die Messung der Trübungsänderung wird eine quantitative Bestimmung der D-Dimer Konzentration in µg/ml Fibrinogenäquivalenten Einheiten (FEU) angezeigt. Der Referenzbereich wurde seitens des Herstellers mittels Plasmaproben von 157 gesunden Probanden mit < 0,5 µg/ml FEU angegeben.
- Fibrinogenspaltprodukte (FDP) werden quantitativ ähnlich zu dem oben genanntem Verfahren mittels immunturbidimetrischem Reagenzien-Kit (Nanopia™ FDP Reagenz, Sekisui Diagnostics, Tokio, Japan) durch optische Messung in Plasmaproben bestimmt. Allerdings basiert hier das Reagenzien Kit auf Latexpartikeln die mit monoklonalen anti-FDP-Antikörpern beschichtet sind. Das Monitoring der Fibrinogenspaltprodukte, welche durch einen Plasmin induzierten Abbau von Fibrinogen und Fibrin entstehen, kann bei einer Lyse Therapie nach Schlaganfall oder fulminanter Lungenembolie, aber auch bei einer Disseminierten intravasalen Gerinnung im Rahmen einer Sepsis als wichtiger Laborparameter dienen. Der Referenzwert ist negativ, Die Konzentration wird in µg/ml angezeigt.

2.6.4 Weitere Testverfahren

Die weiteren Testverfahren, welche während der Routine Messverfahren zur Anwendung kamen waren AcuStar D-Dimer (Werfen, Kirchheim) angewendet mittels AcuStar Autoanalyzer und Innovance D-Dimer (Siemens HealthCare, Erlangen) angewendet mittels Siemens CS 5100 Coagulation Analyse System.

2.7 Reagenzien, Puffer, Kontroll-Sets und Kalibratoren

Vor der Testung wurde das Gerät gemäß Herstellerangabe kalibriert.

Für die Clotting Teste mittels Lichtstreuungsphotometrie wurden folgende Materialien verwendet: Coagpia™ PT-N Reagent, Coagpia™ ATT-N Reagent™, Coagpia Fbg Reagent™, Coagpia™ CaCl₂ Reagent Coagpia™ Buffer, Coagpia™ Calibrator und Coagpia™ Control Set (alle Sekisui Diagnostics, Tokio, Japan).

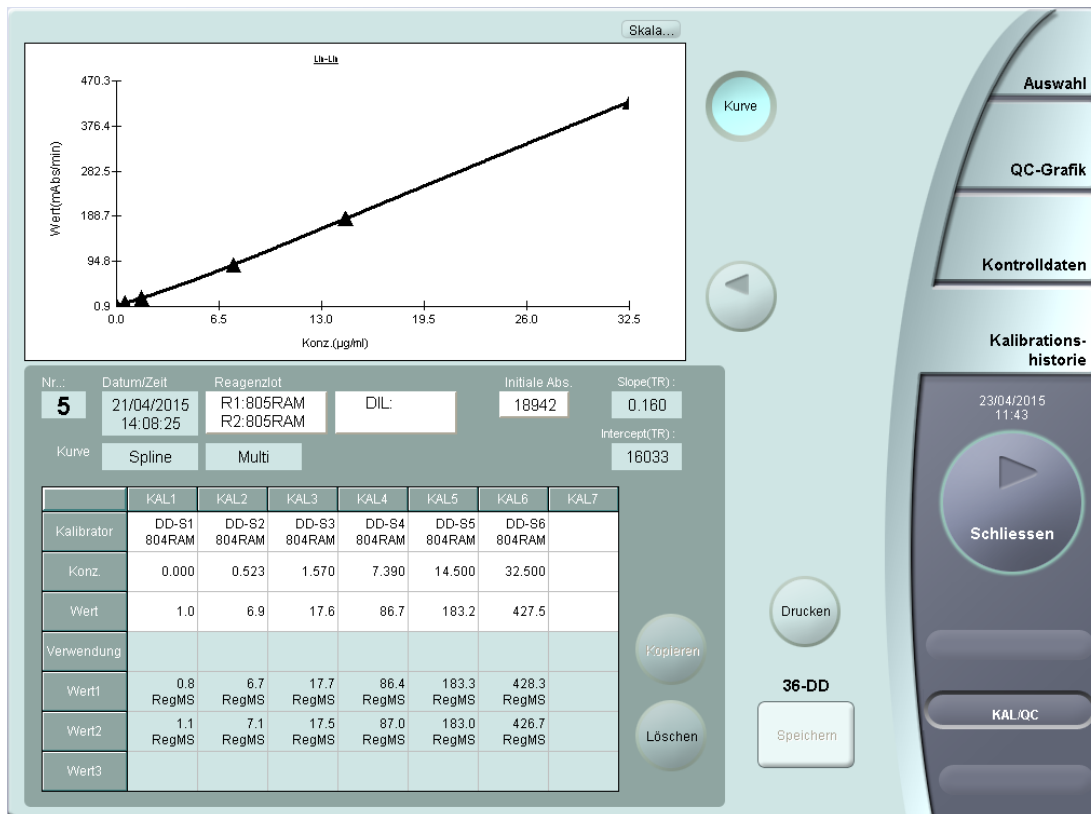


Abbildung 9: Exemplarisch die D-Dimer-Kalibrierungskurve mit entsprechenden automatisierten Kalibrierungsschritten als Screenshot des verwendeten Tests auf dem Coapresta 2000.

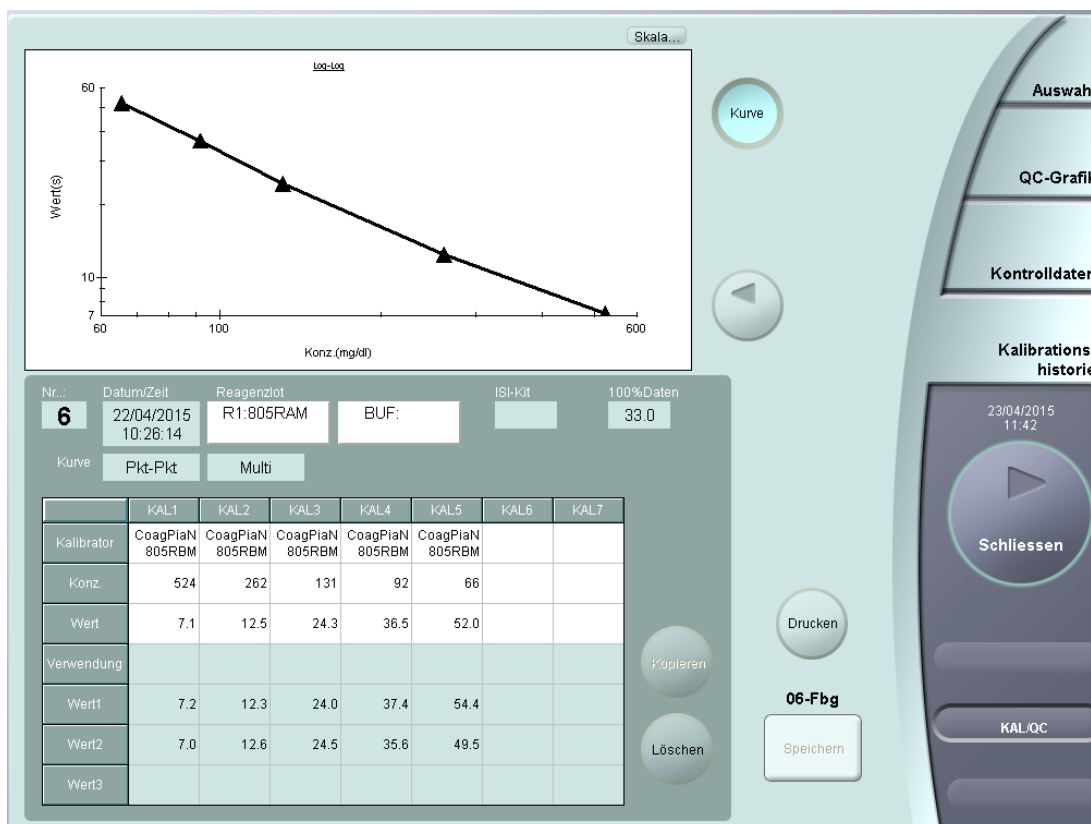


Abbildung 10: Exemplarisch die Fibrinogen-Kalibrierungskurve mit entsprechenden automatisierten Kalibrierungsschritten als Screenshot des verwendeten Tests auf dem Coapresta 2000.

2.8 Potentielles Referenzverfahren zur D-Dimer Bestimmung

Die Methodenentwicklung des unten genannten Verfahrens wurde im Rahmen eines größeren Projektes durch das Team der wissenschaftlichen Arbeitsgruppe des Gerinnungszentrums entwickelt.

Das Verfahren zur Messung der dimerisierten D-Domänen erfolgt durch mehrere Arbeitsschritte:

Die Entfernung von Fibrinogen durch die Zugabe des dem Thrombin ähnlichen Enzyms Batroxobin, welches zu der Bildung von desAA-Fibrin ohne Fibrinopeptiden A führt.

Plasmin Proteolyse der verbleibenden, nicht an der Gerinnung beteiligten, Fibrinogen- und Fibrin-Derivaten.

Anschließend erfolgt ein D-Dimer Antikörper unabhängiges, elektrophoretisches Verfahren mit Immunodetektion zur Identifizierung und Quantifizierung von D-Dimer Antigen.

Zuerst werden 110 μl einer Batroxobin Lösung mit einer Konzentration von 4,8 BU/ml (Siemens Healthcare, Marburg) zu 1000 μl Citrat Plasma hinzugefügt und vorsichtig mit der Pipette vermischt. Die Lösung wird für 30 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 10.900 rpm zentrifugiert (Biofuge 13, Abbott). Hierdurch erhält man eine Trennung des desAA-Fibrinclot und des Fibrinfreien Überstand.

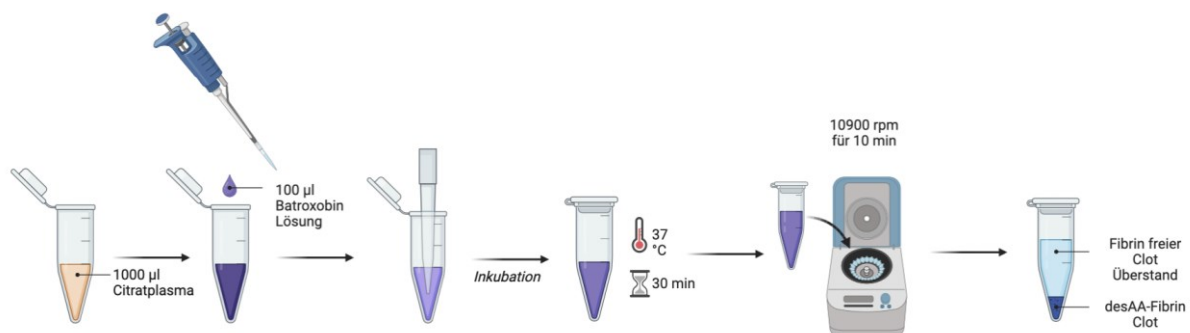


Abbildung 11: Entfernung von Fibrinogen durch Zugabe des dem Thrombin ähnlichen Enzyms Batroxobin, dies führt zur Bildung von desAA-Fibrin ohne Fibrinopeptiden A

200 μl des fibrinfreien Überstandes wurden mit 540 μl Plasmin-Lösung (0,05 M Tris Base, 0,1 M NaCl, 0,025 M CaCl₂, pH 7,4) die 1250 IU/ml Streptokinase (CSL-Behring, Marburg) und 60 μl Glu-Plasminogen Lösung (1mg/ml, CoaChrom Diagnostica, Maria Enzersdorf, Österreich) enthaltenen vermischt. Die Lösung wird gevortext und für 18 Stunden in einem Blockthermostat bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend bei Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert (10900 rpm). Der Überstand wurde anschließend in ein neues Probengefäß überführt.

Abbildung 12

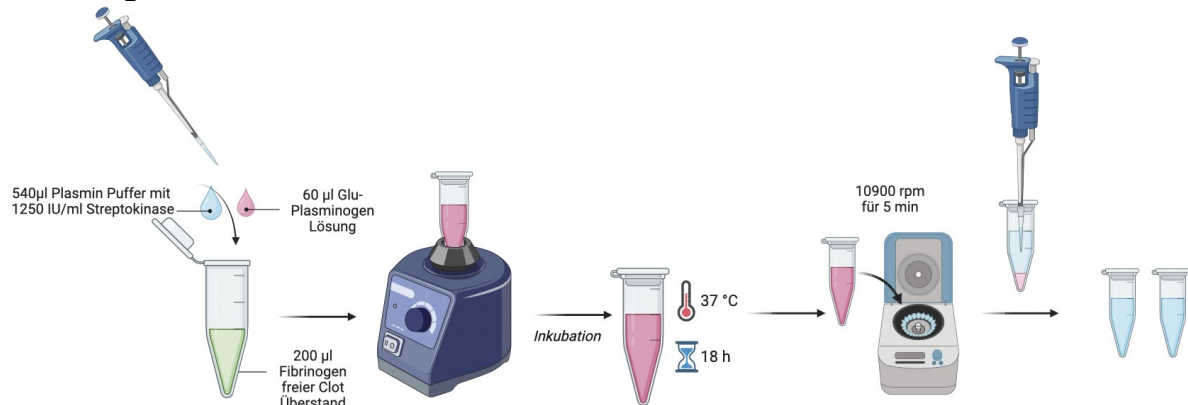


Abbildung 12: Entfernung der nicht an der Gerinnelbildung beteiligten, verbleibenden Fibrinogen- und Fibrinderivate durch Plasmin Proteolyse

Die Detektion dimerisierter D-Domänen erfolgte entweder direkt in der nicht-reduzierten Kapillarelektrophorese mittels eines Antikörpers gegen die D-Domänen bzw. ein Ant-Fibrinogen-Antikörper welcher bevorzugt mit den D-Domänen reagiert oder nach Spaltung der Schwefelbrücken mittels Dithiothreitol (DTE) und Immunodetektion der kovalent verbunden gamma-Ketten durch einen spezifischen Antikörper gegen gamma-Ketten. Die Analyse wurde unter Verwendung eines WES Protein Analyse Systems (Protein Simple, San Jose, Kalifornien, USA) durchgeführt.

4,8 µl der verdünnten Probe wurden mit 1,2 µl Proben Puffer (10%, v/v Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) mit oder ohne Zugabe von 400 mM Dithiothreitol (DTE) vermengt, für 5 Minuten bei 95 ° C im Blockthermostat inkubiert und anschließend gevortexet und zentrifugiert.

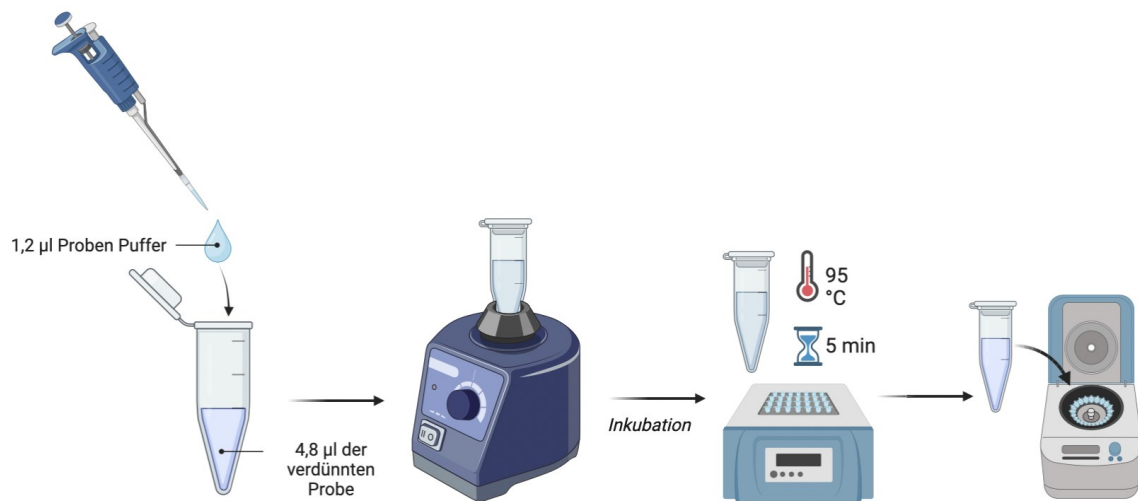


Abbildung 13: Spaltung der Schwefelbrücken mittels DTE zur späteren Detektion der kovalent verbundenen gamma-Ketten mittels eines spezifischen Antikörpers gegen gamma-Ketten

Die Proben wurden, inklusive Komigrationstandard, Kalibratoren und den von Fibrinogen befreiten, Plasmin gereinigten Plasmaproben, zusammen mit Blocking-Agent, Waschpuffer, Primärantikörper und die Lösung mit dem Sekundärantikörper sowie Luminol-S / Peroxid Substratmischung, in die vorgesehenen Vertiefungen der WES-Mikroplatte gegeben. Fixierungsmittel, Waschpuffer, Komigrationsstandard, der

enzymgekoppelte Sekundärantikörper und Verdünnungsmittel zur Herstellung der Antikörper Lösung sowie Substrat Reagenz Gemisch wurden über den Hersteller des WES-Instruments als Bestandteil des Analyse Kit bezogen. Die Mikrotiterplatte und eine 25 Kapillar Kartusche wurden an den entsprechenden Vorrichtungen des WES-Instruments platziert.

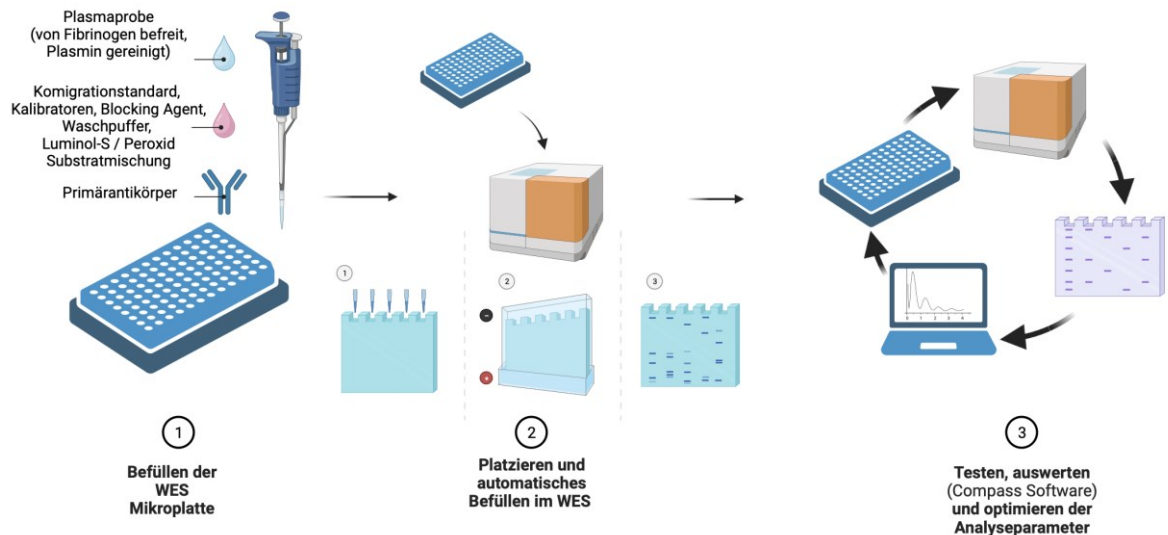


Abbildung 14: D-Dimer Antikörper unabhängiges, elektrophoretisches Verfahren mit Immunodetektion zur Identifizierung und Quantifizierung von D-Dimer Antigen mittels eines WES Protein Analyse Systems (Protein Simple, San Jose, Kalifornien, USA). Detektion direkt in der nicht reduzierten Elektrophorese oder nach Spaltung der Schwefelbrücken (Abbildung13) und Detektion der kovalent verbundenen gamma-Ketten mittels eines spezifischen Antikörpers gegen gamma-Ketten.

Die Proben wurden automatisch in die jeweiligen Analyse Kapillaren gezogen. Die Analyse Parameter inklusive stacking und Loading Matrix Zeit, Trennungszeit und Antikörper Dilution wurden getestet und für den individuellen Test optimiert.

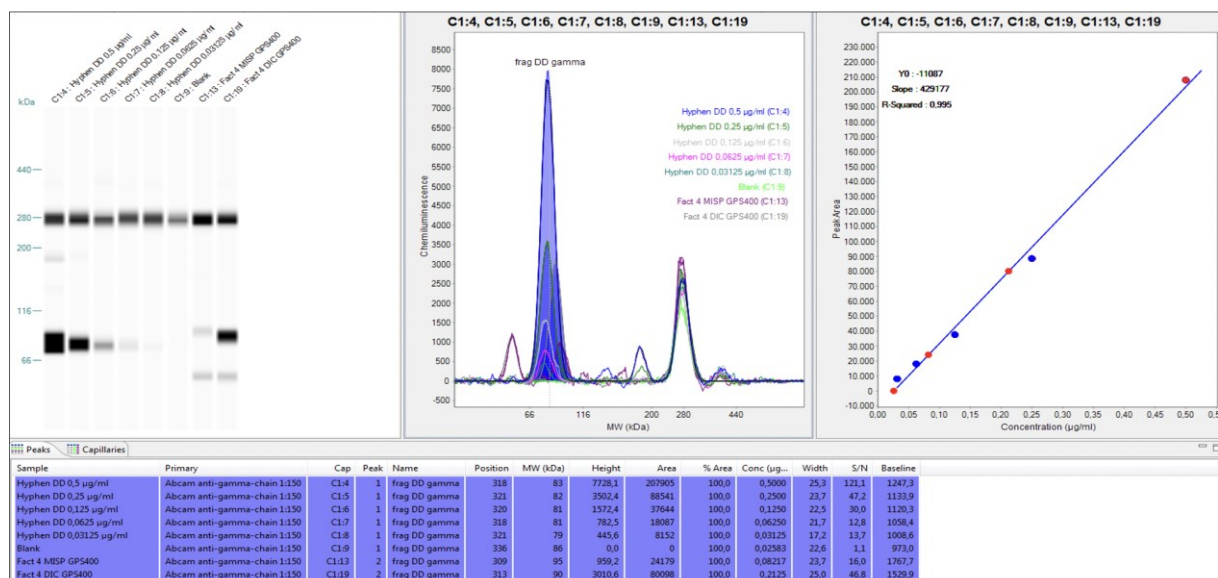


Abbildung 15: Exemplarisch Analyse und Darstellung der Elektrophorese durch die Compass Software

Mittels der Compass Software, durch den Hersteller von WES-Instruments zur Verfügung gestellt, erfolgte, wie oben exemplarisch dargestellt, die Analyse und Darstellung der gewonnenen Daten.

Die Primärantikörper zur Immundetektion beinhalteten mittels Meerrettichperoxidase markierter polyclonaler Schaafts Anti-Human Fibrinogen (Cedarlane, Burlington, NC, USA) und polyclonale Hasen anti-Human γ -Ketten Antikörper (Abcam, Cambridge, MA, USA).

Der Test wurde mittels serieller Dilution von zwei Zubereitungen von gereinigtem Fibrinfragment D-Dimer kalibriert. Diese wurden von Jean Amiral, Hyphen Biomed, Neuville-Sur-Oise, Frankreich und Josip Biokrit R&D. Llica d'Amunt, Spanien zur Verfügung gestellt.

2.9 Literaturrecherche, Auswertung und Statistik

Begleitend erfolgte eine Literaturrecherche zu den Themenfeldern, Mammakarzinom, Ovariakarzinom, neoplastische Gerinnungsaktivierung und D-Dimer in den elektronischen Datenbanken von Pubmed und Google Scholar. Die relevanten Beiträge wurden mittels dem Literaturverwaltungsprogramm Endnote archiviert

Zur Auswertung der onkologischen Charakteristika und Fragebögen wurde die Statistik mit SPSS Statistics (IBM Armonk, New York, USA) Die Auswertung der Ergebnisse im Rahmen der Labortestungen erfolgte mittels Graphpad Prism 9 (Graphpad Software, San Diego, Kalifornien, USA).

Die Abbildungen wurden größtenteils mit der BioRender Software (BioRender, 49 Spandina Ave. Ste 200, Toronto, Ontario, M5V 2J1) erstellt.

3 ERGEBNISSE

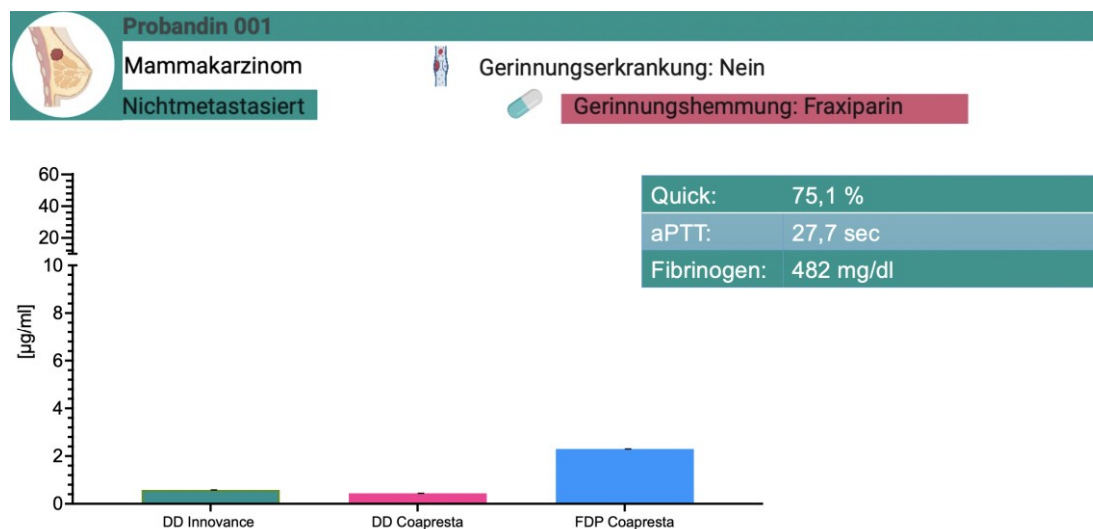
3.1 Globale Gerinnungsverfahren mittels Coapresta 2000 zur technischen Evaluierung




In einem ersten Schritt wurden mittels des, bei Probenerhebung neuartigen, vollautomatischen Gerinnungsanalysegerät Coapresta 2000 des Herstellers Sekisui die initial kältekonservierten Proben analysiert. Mittels Streulichtphotometrie für die Gerinnungszeit und Absorptionsphotometrie für chromogene und latexturbidimetrischen Tests wurde die Prothrombinzeit (PT), Thrombinzeit, D-Dimer (DD), Fibrinogen (Fbg) und Fibrinogenspaltprodukte (FDP) bestimmt.

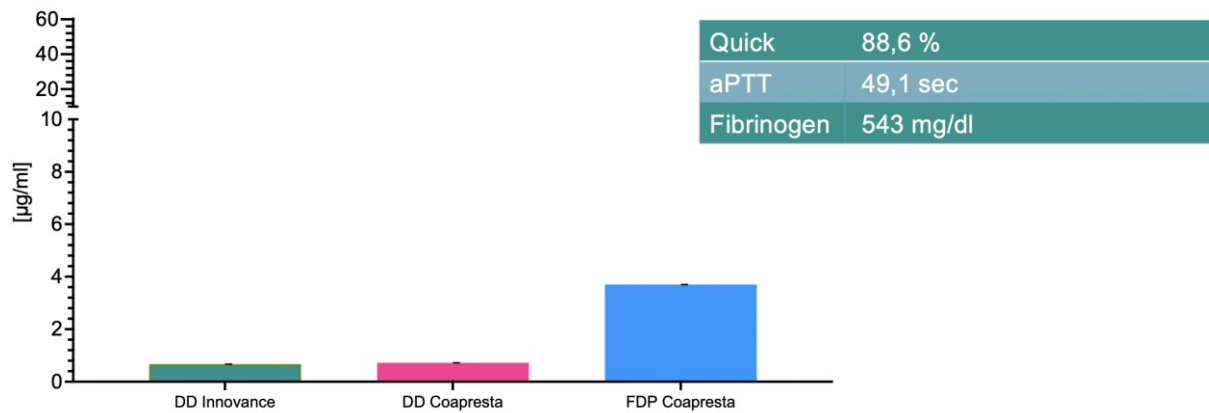
Unten aufgeführte die Ergebnisse der einzelnen Analyseverfahren mit kurzer Darstellung der relevanten weiteren klinischen Parameter der individuellen Patientinnen.




Insgesamt lässt sich festhalten, dass sich in allen Testverfahren bei den Patientinnen eine eher moderate Gerinnungsaktivierung durch die Tumorerkrankungen zeigt.

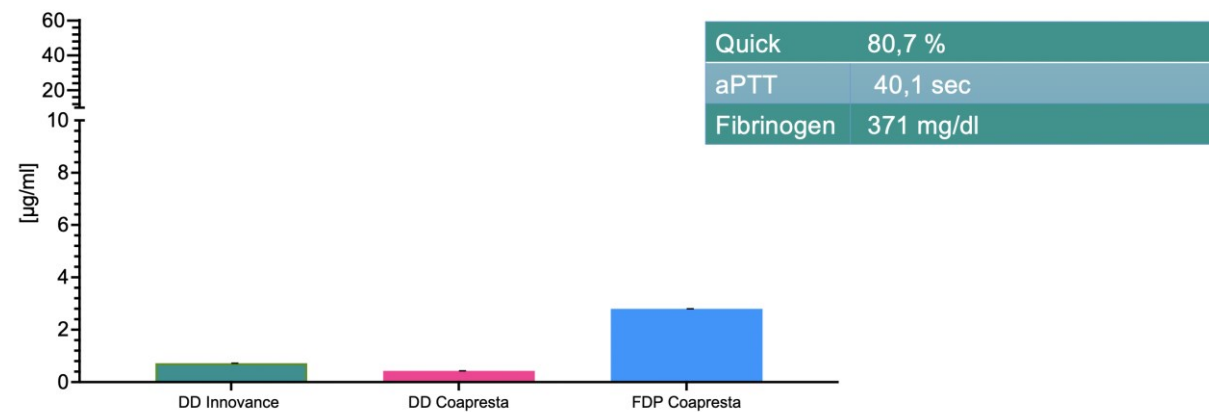
Abbildung 16: Kurzvorstellung der Patientinnen mit Darstellung der wichtigen klinischen Parameter und relevanter Dauermedikation. Gegenüberstellung der Gerinnungsaktivierung durch D-Dimer mittels Innovance Test direkt nach Probenentnahme in der Klinik bestimmt, D-Dimer und FDP mittels Coapresta 2000, sowie Darstellung von Quick, aPTT und Fibrinogen ebenfalls durch Coapresta 2000 mittels Referenzverfahren und AcuStar bestimmt. Die überwiegend hohen FDP-Werte sprechen für eine generelle Proteolyse von Fibrin und Fibrinogen als Zeichen einer Gerinnungsaktivierung. Die hohen Fibrinogenspiegel, sprechen gegen eine relevante Hyperfibrinolyse und weisen eher auf einer Akutphasereaktion hin.






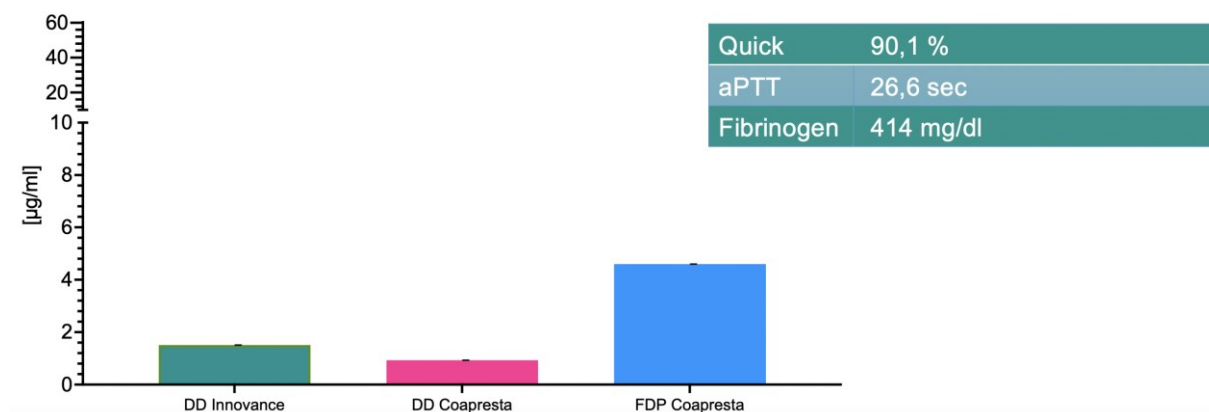
Probandin 002
 **Mammakarzinom**
Nichtmetastasiert
 Gerinnungserkrankung: Nein
 Gerinnungshemmung: Nein

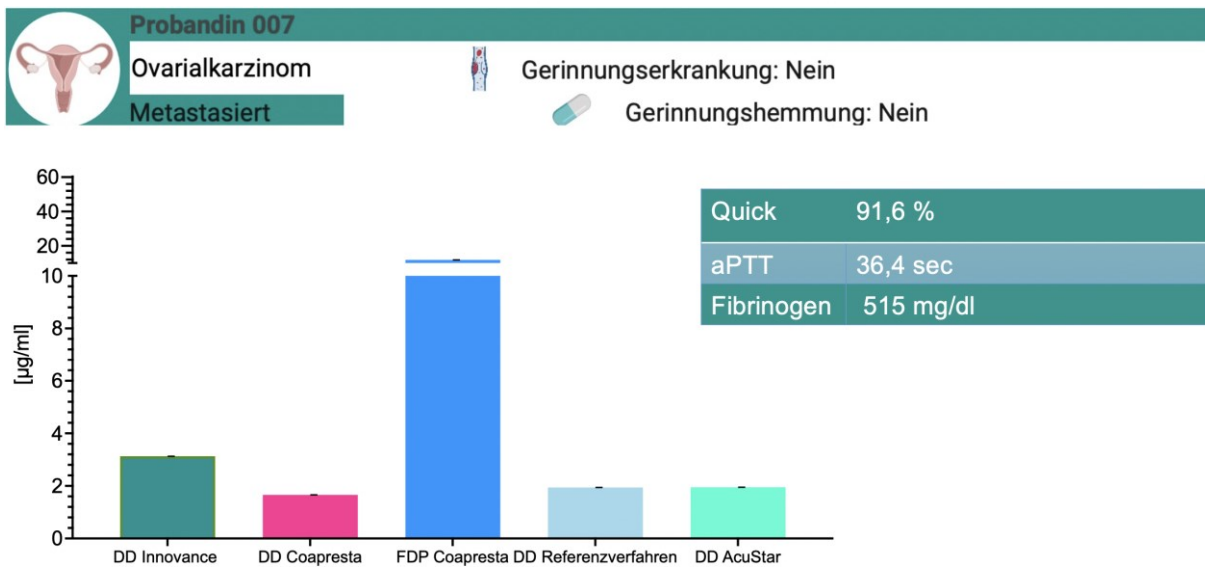
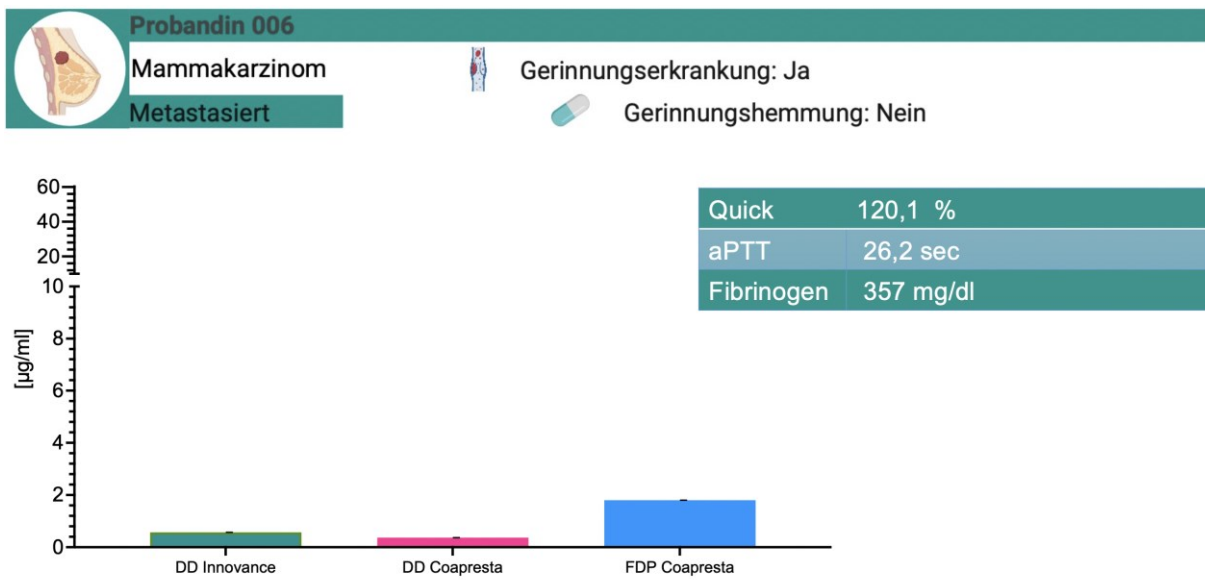
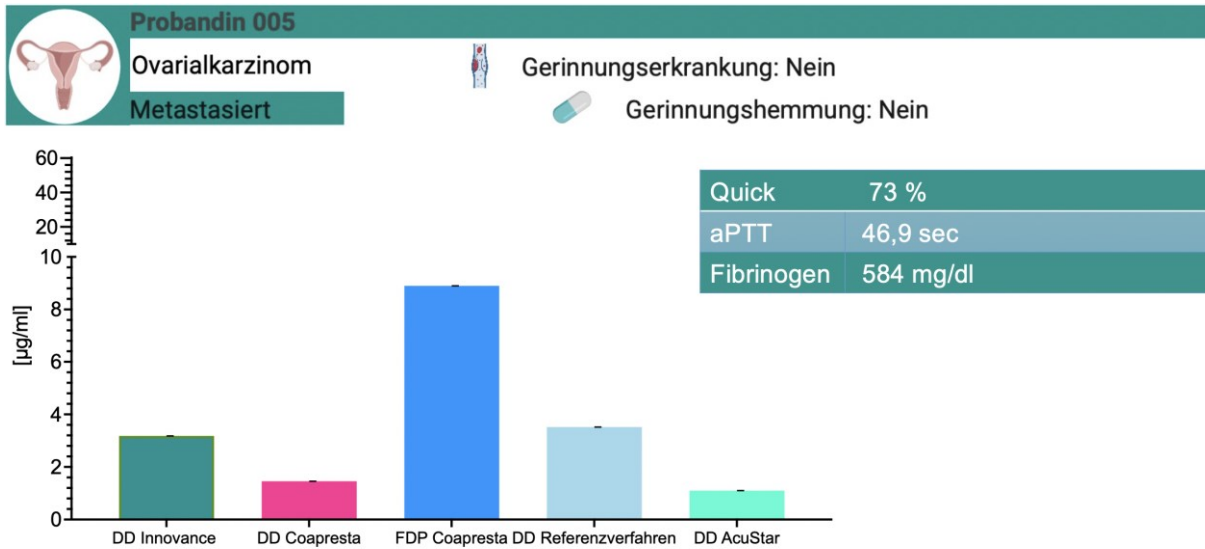


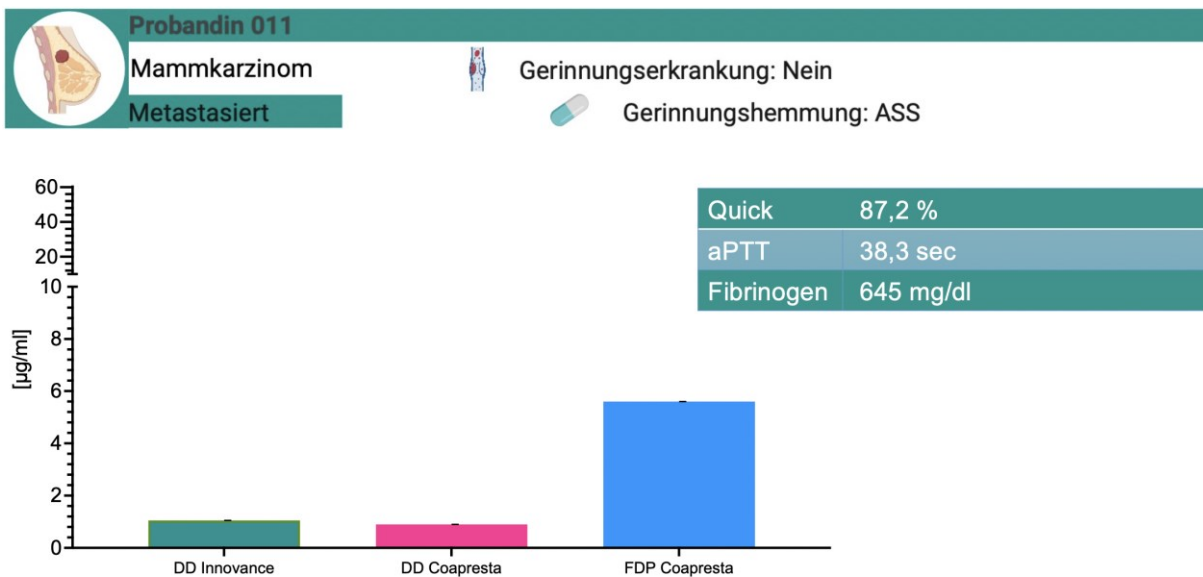
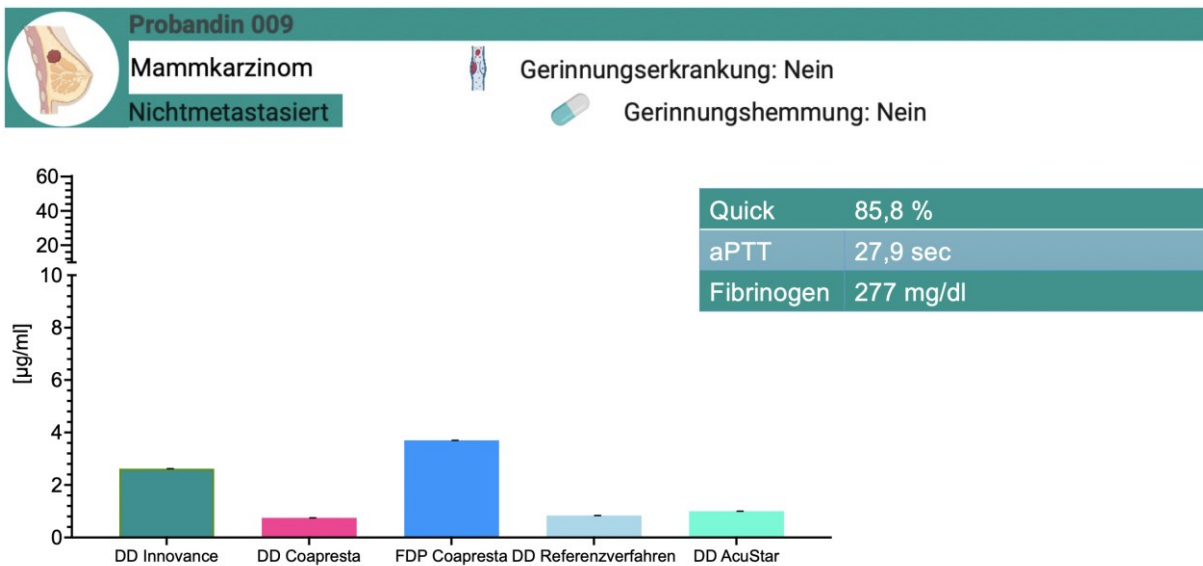
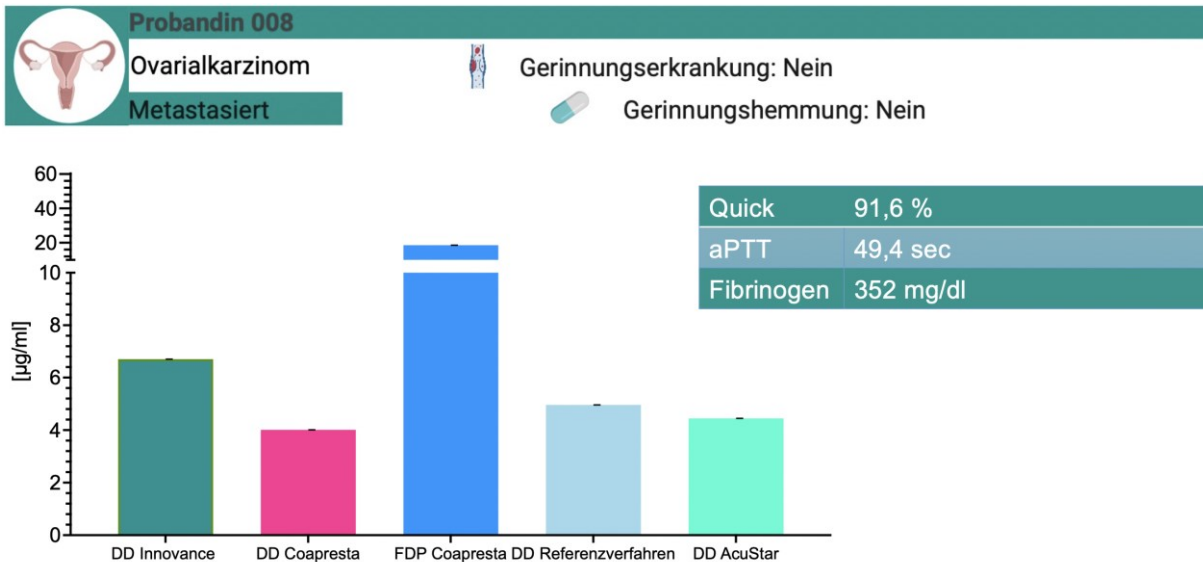
Probandin 003
 **Ovarialkarzinom**
Nichtmetastasiert
 Gerinnungserkrankung: Nein
 Gerinnungshemmung: Nein

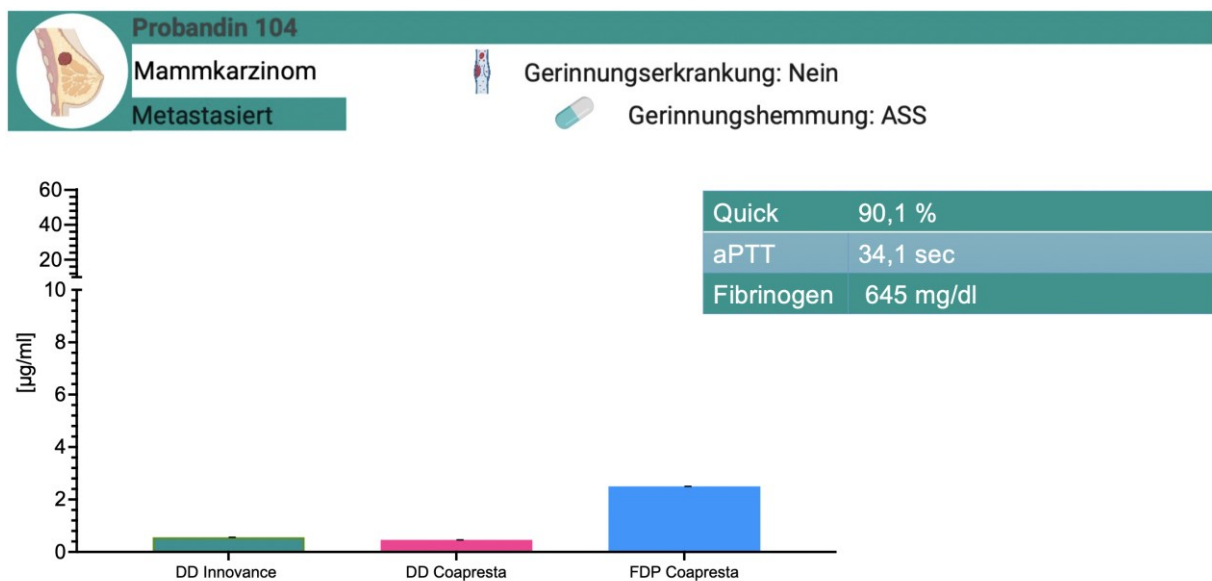
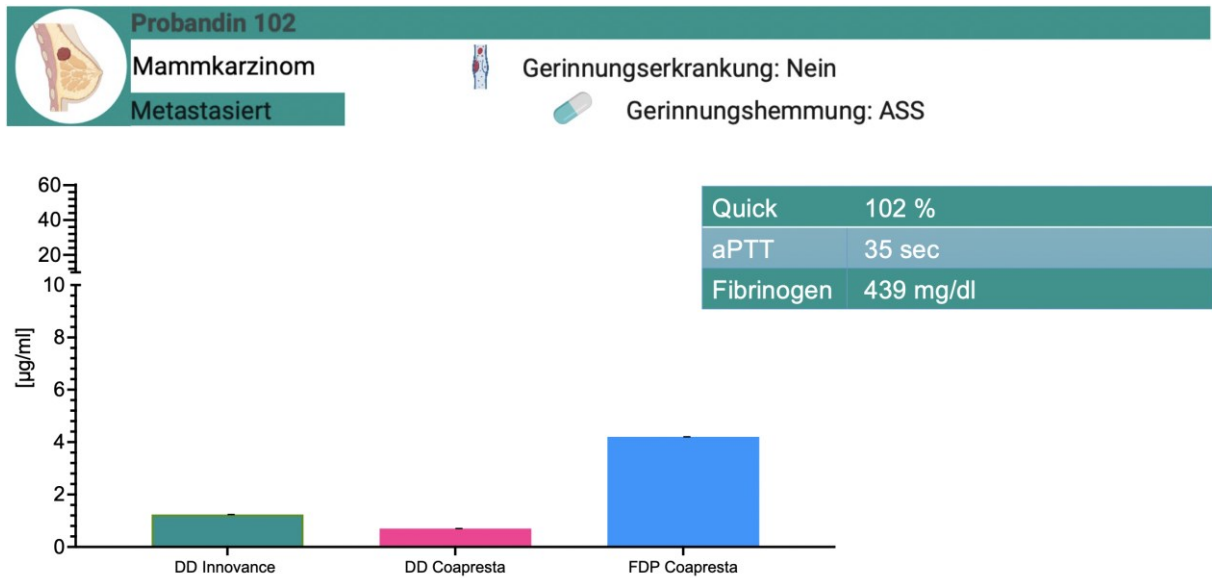
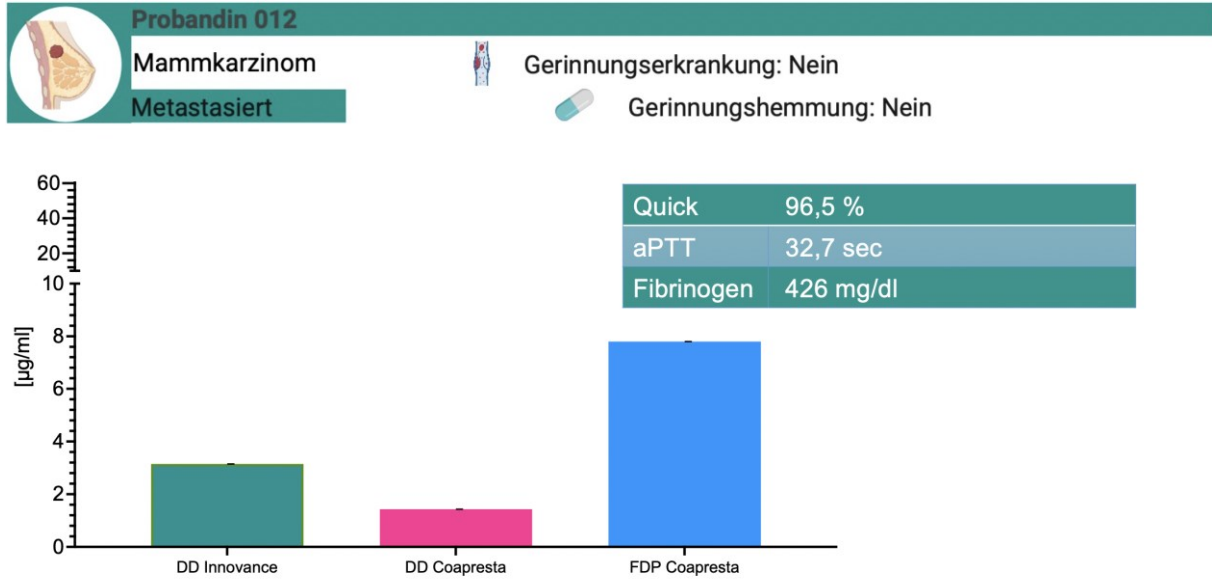


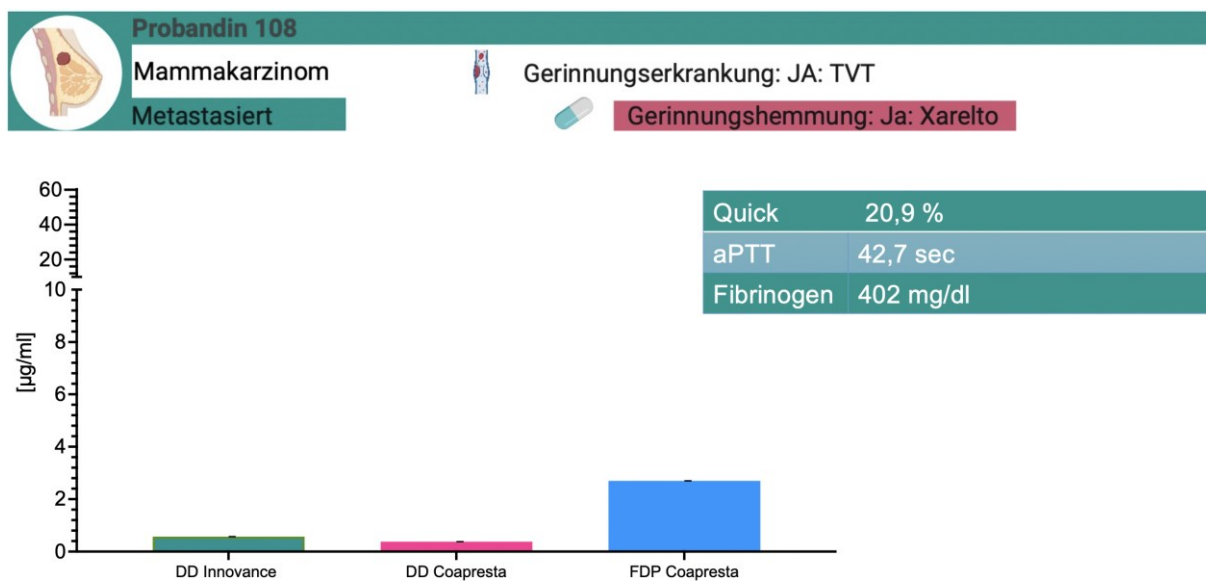
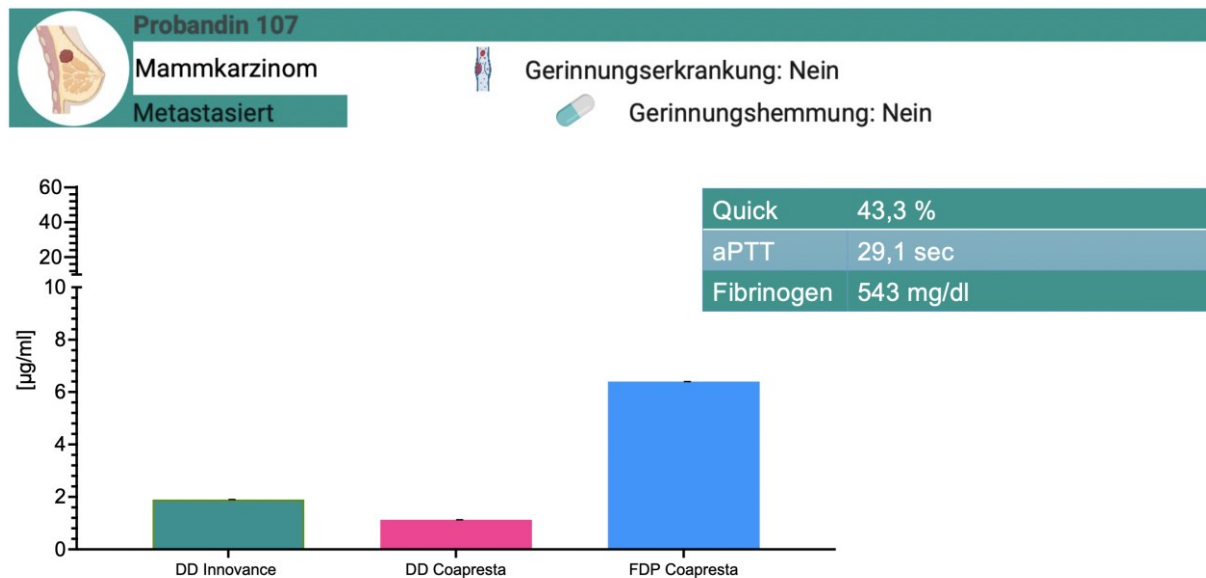
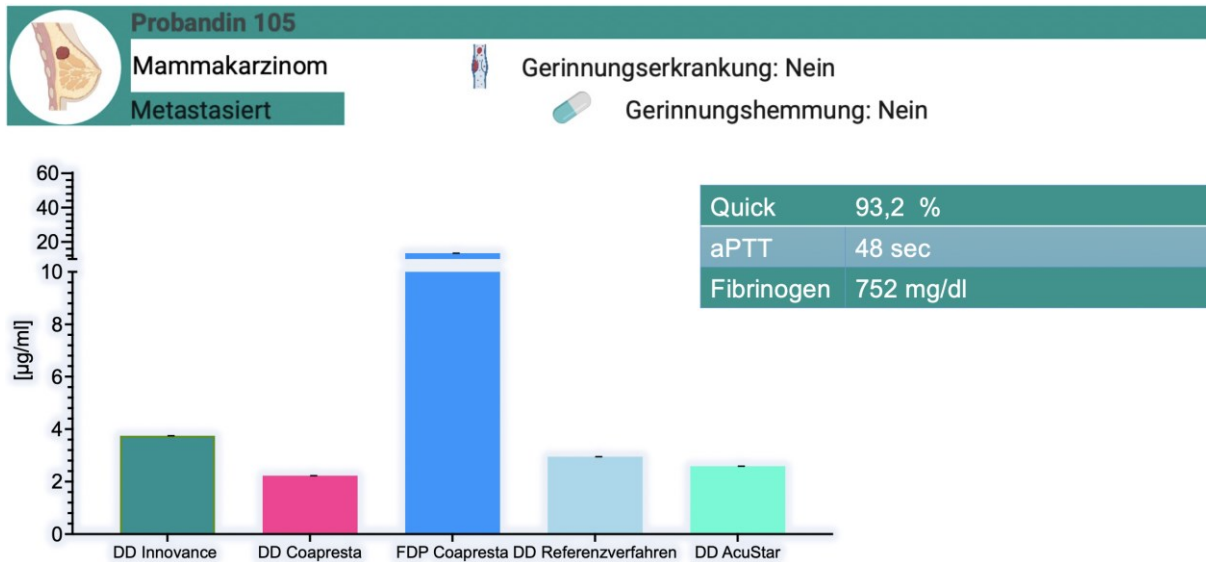
Probandin 004
 **Mammakarzinom**
Metastasiert
 Gerinnungserkrankung: Ja
 Gerinnungshemmung: Nein

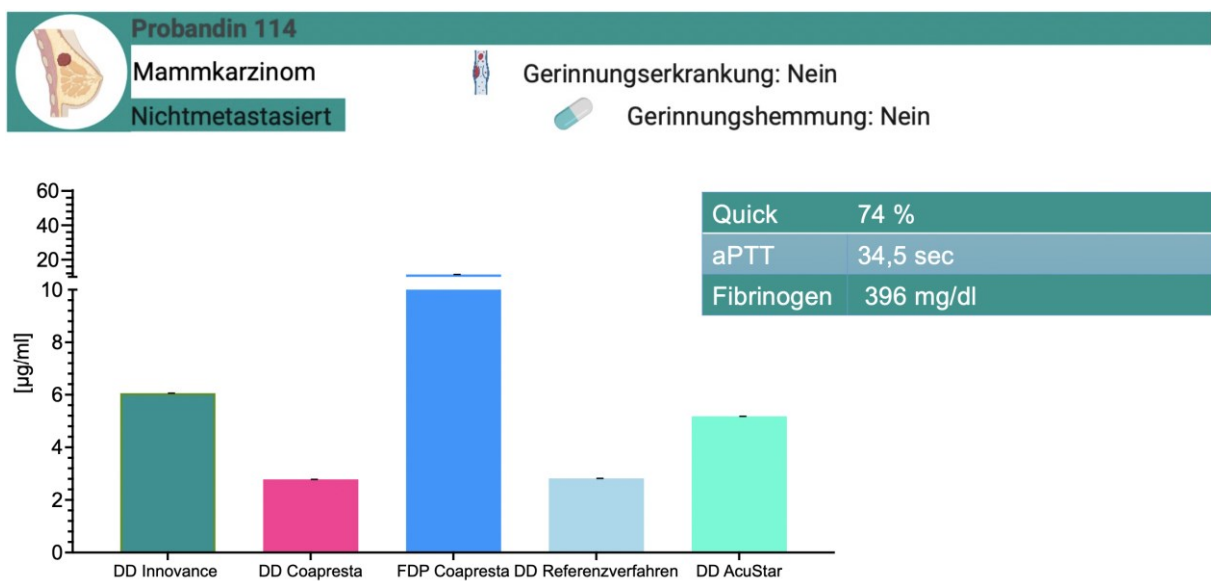
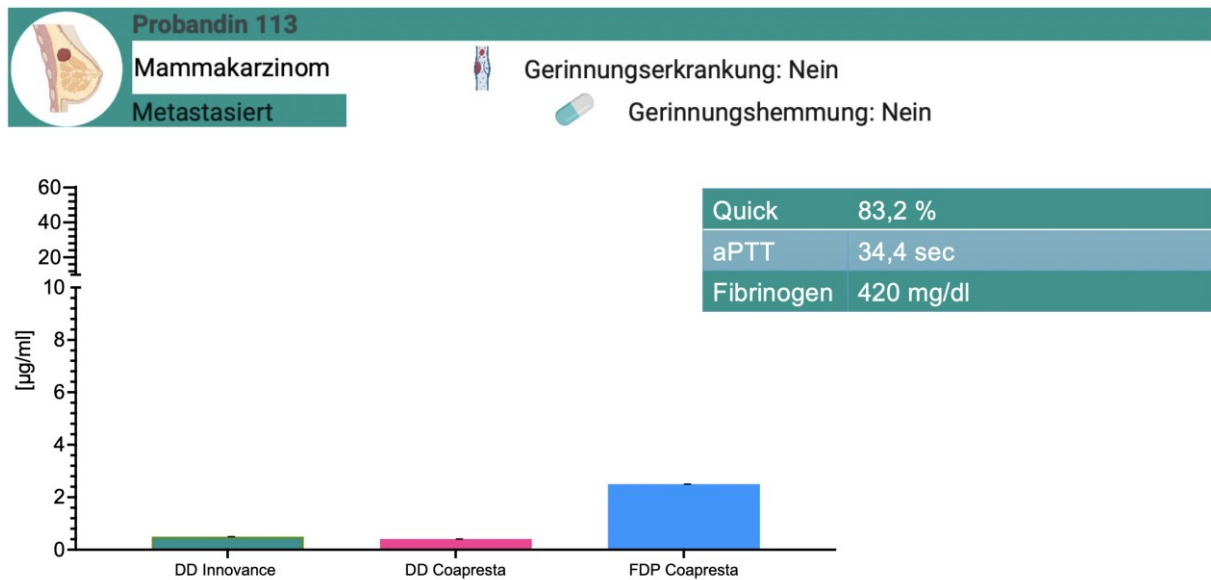
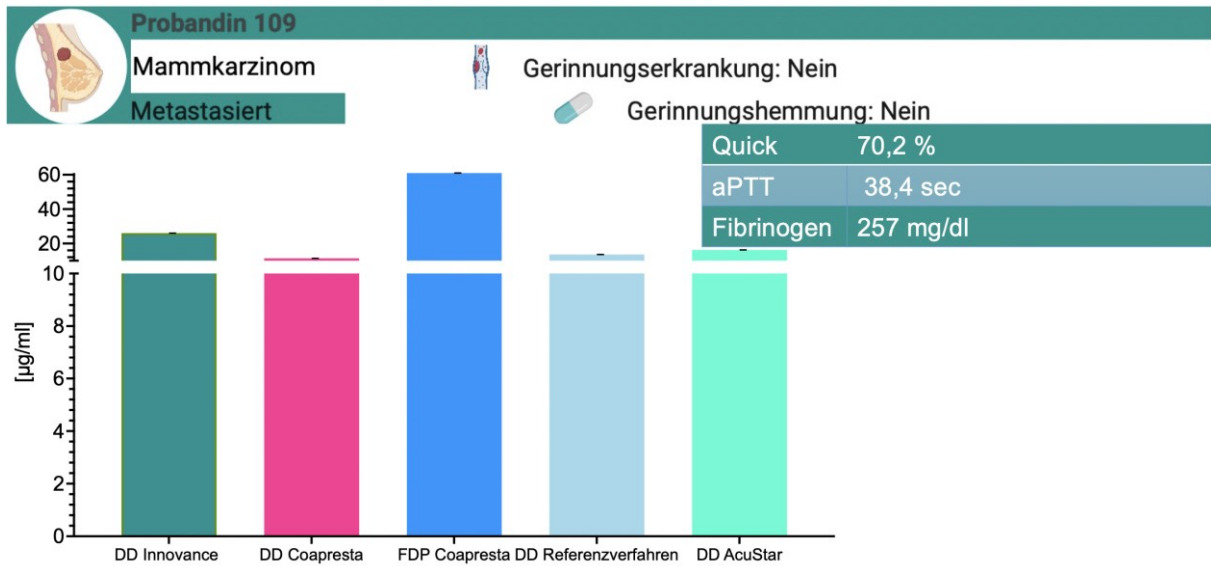







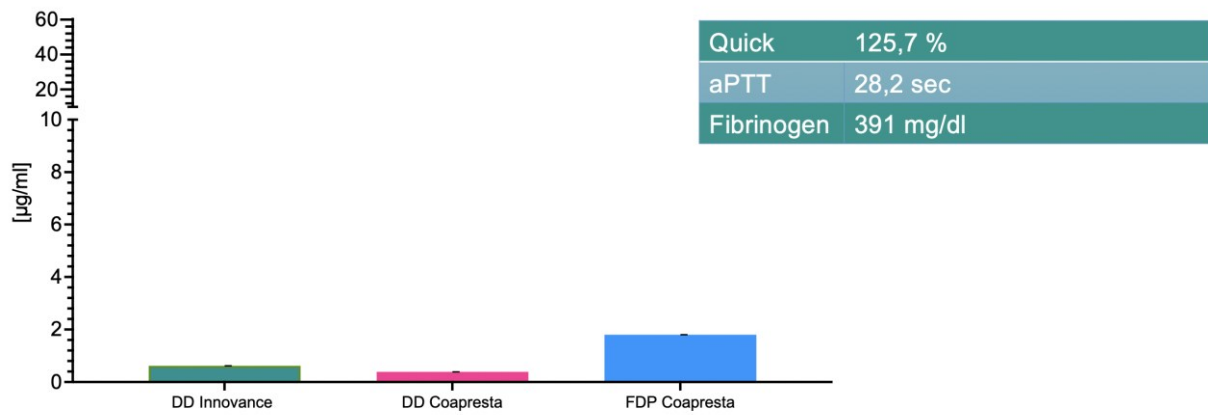







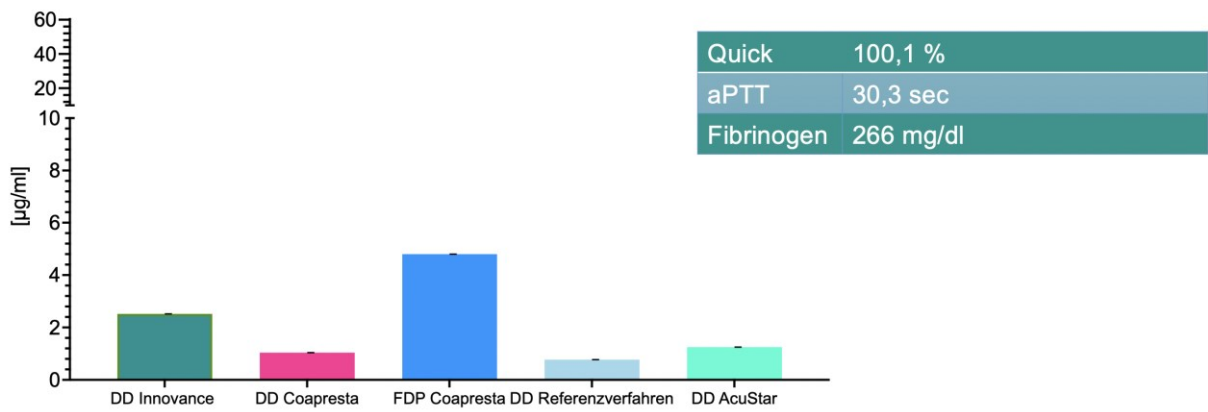




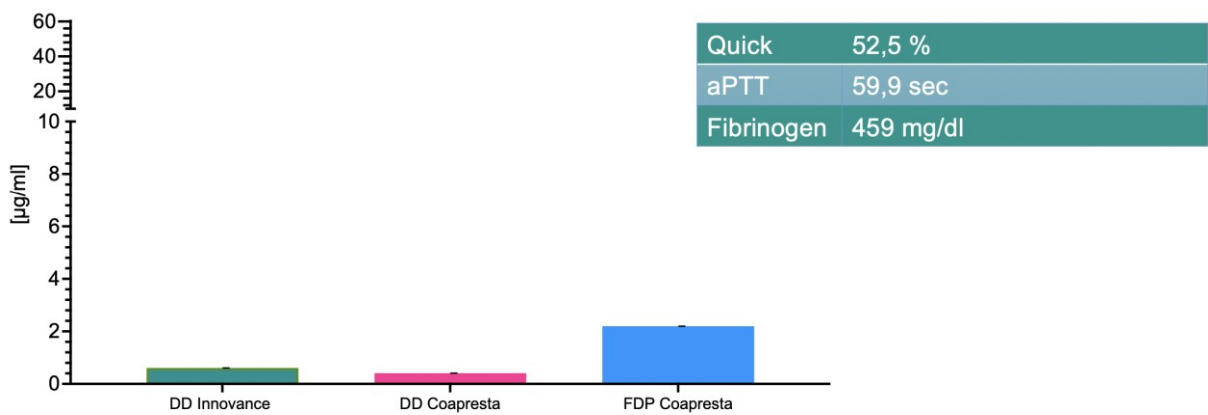
Probandin 115
 **Mammakarzinom**
Metastasiert
 Gerinnungserkrankung: Nein
 Gerinnungshemmung: Nein



Probandin 116
 **Ovarialkarzinom**
Metastasiert
 Gerinnungserkrankung: Nein
 Gerinnungshemmung: Nein

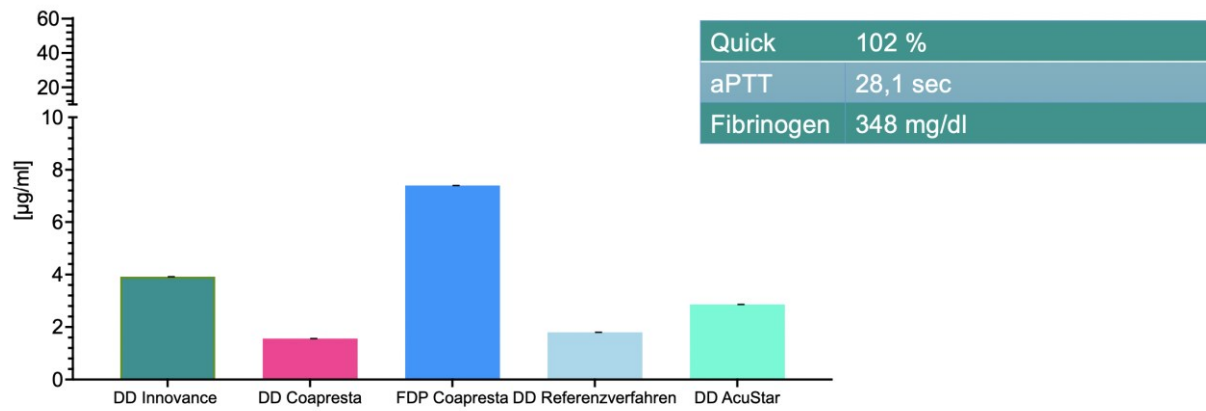


Probandin 117
 **Mammakarzinom**
Metastasiert
 Gerinnungserkrankung: Nein
 Gerinnungshemmung: Pradaxa



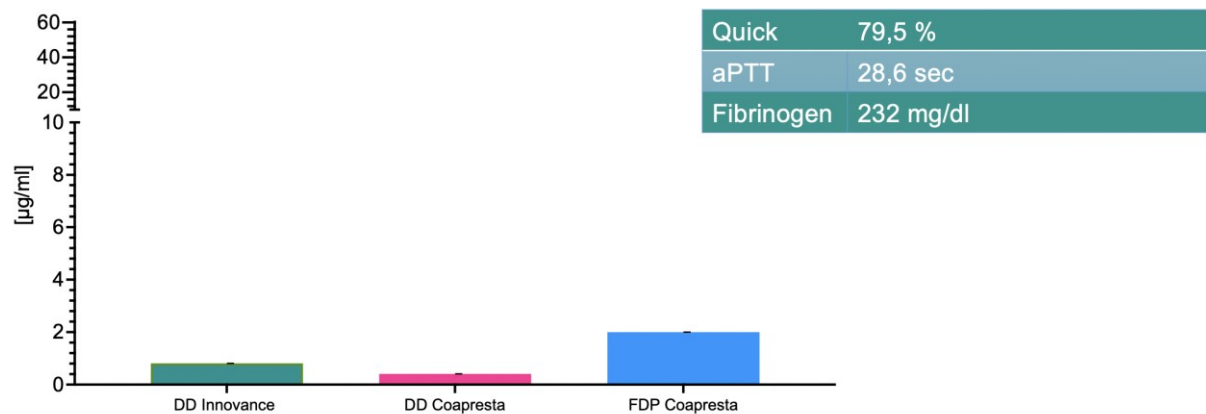
Probandin 118
 Mammakarzinom
 Metastasiert

Gerinnungserkrankung: Nein
 Gerinnungshemmung: Nein



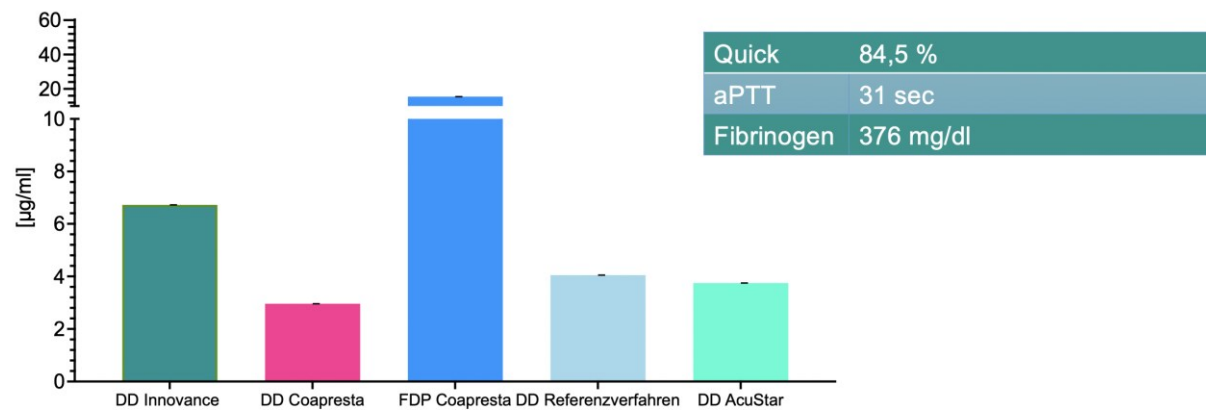
Probandin 119
 Mammakarzinom
 Metastasiert

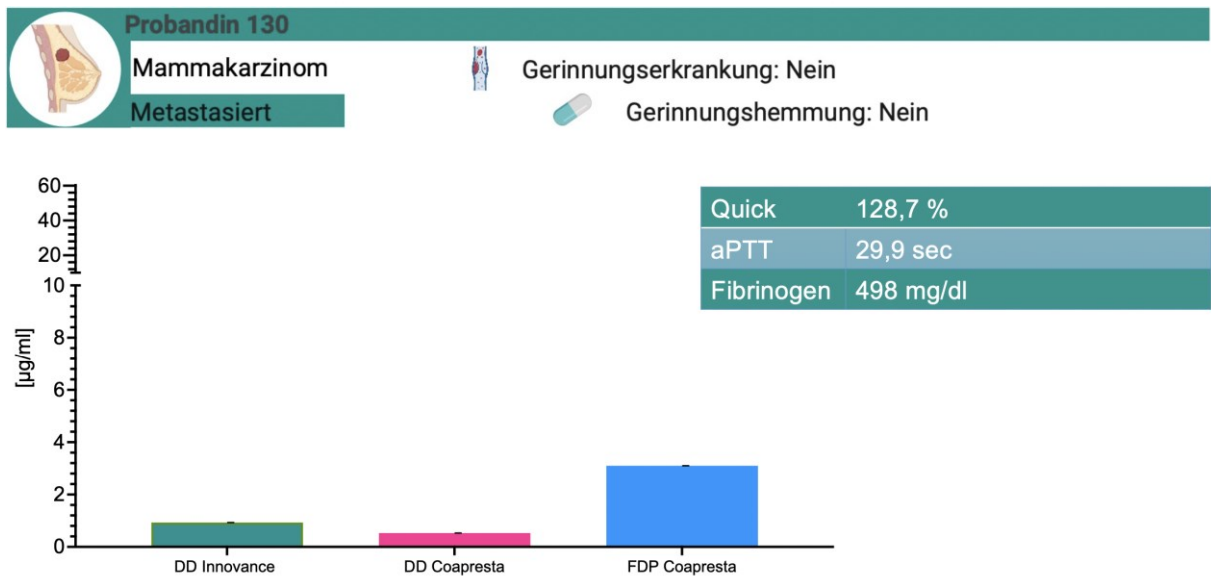
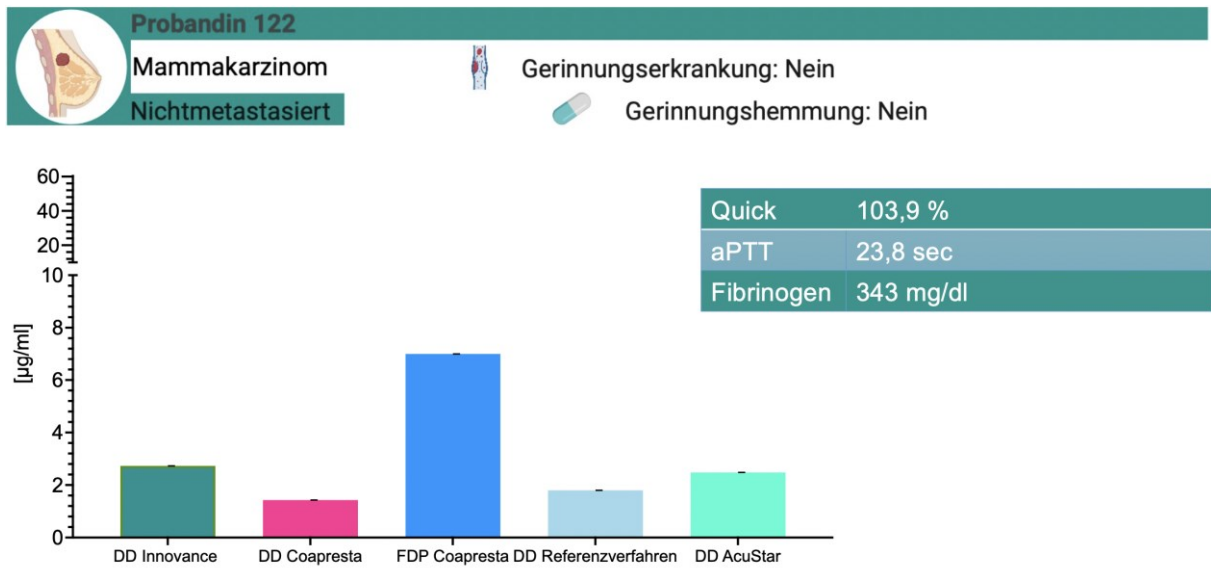
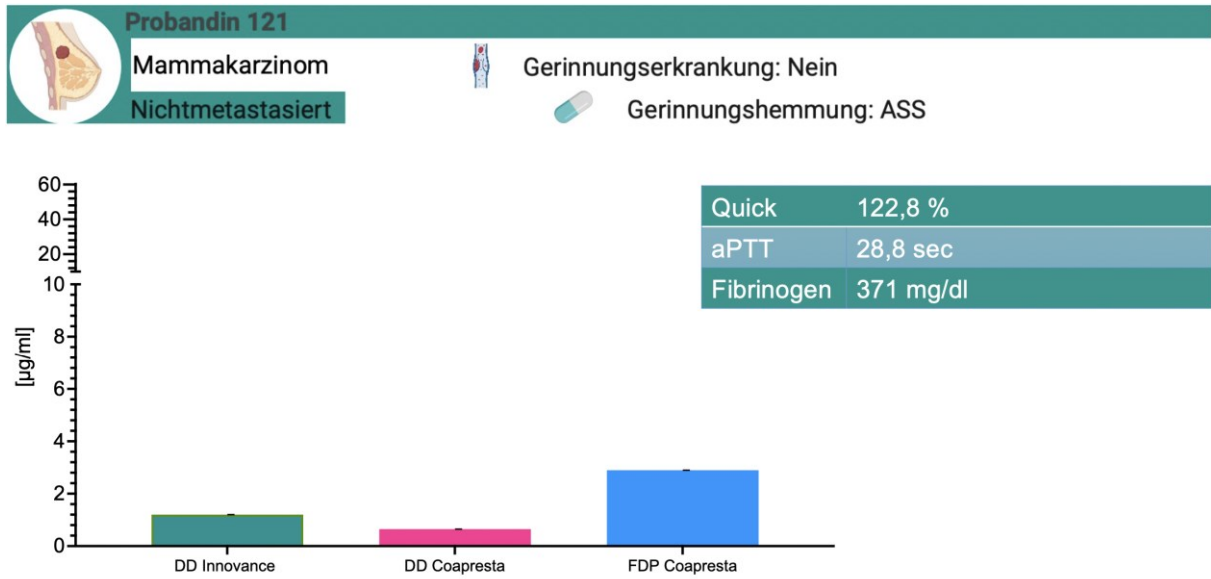
Gerinnungserkrankung: Nein
 Gerinnungshemmung: Nein

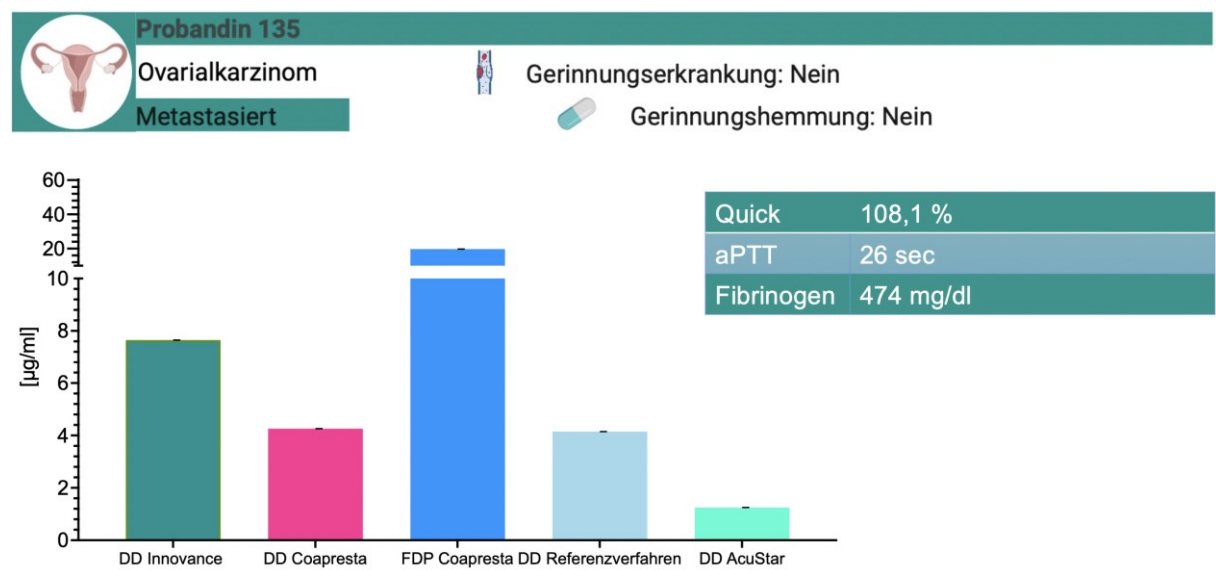
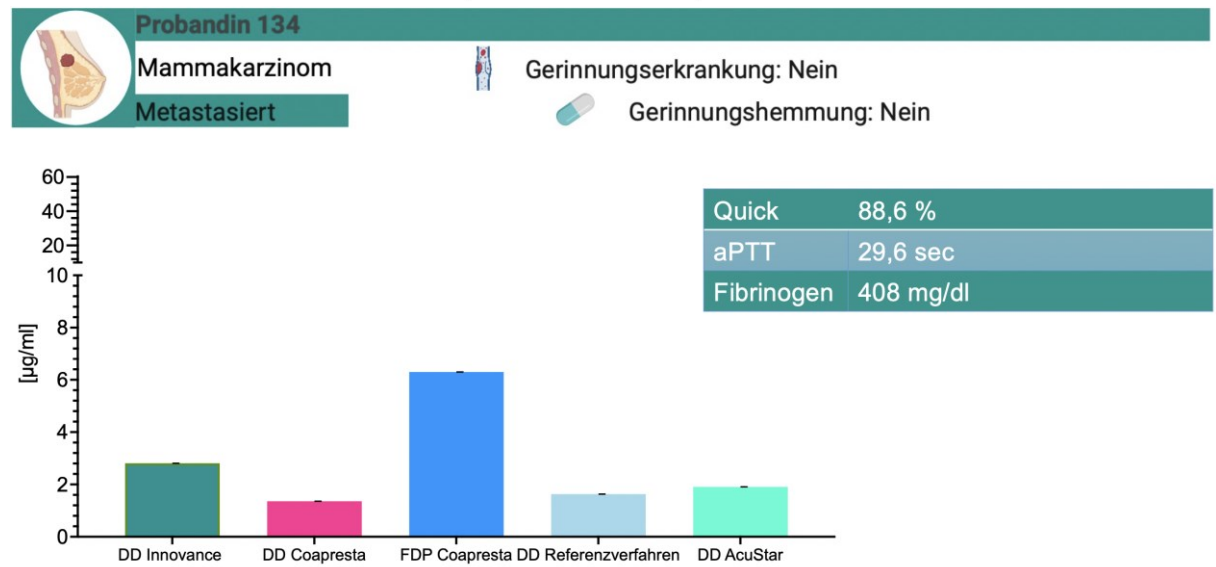
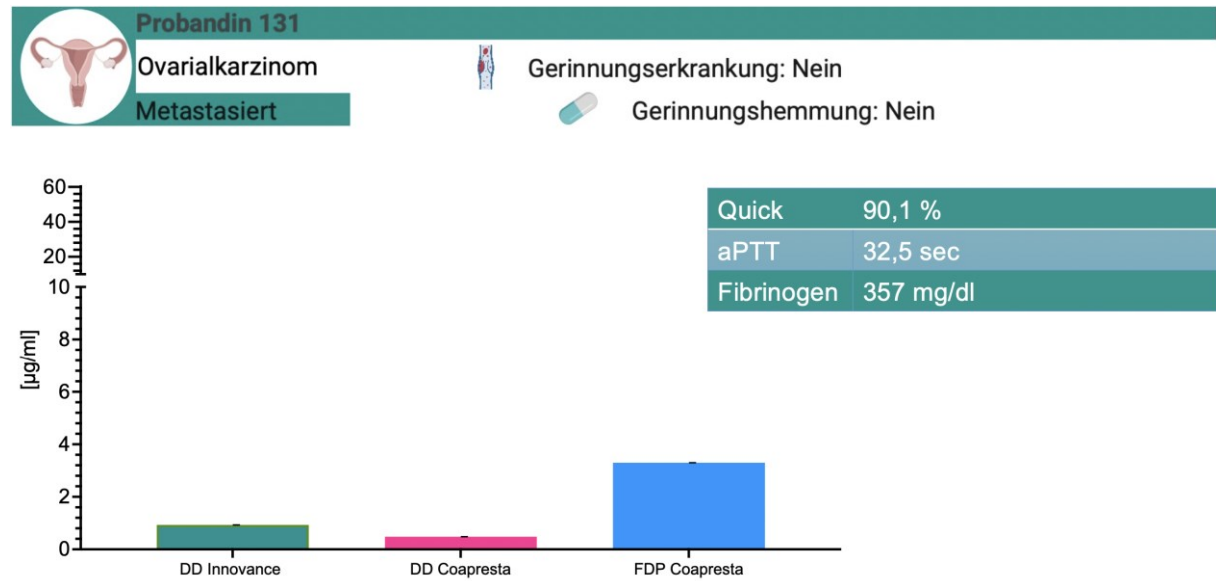


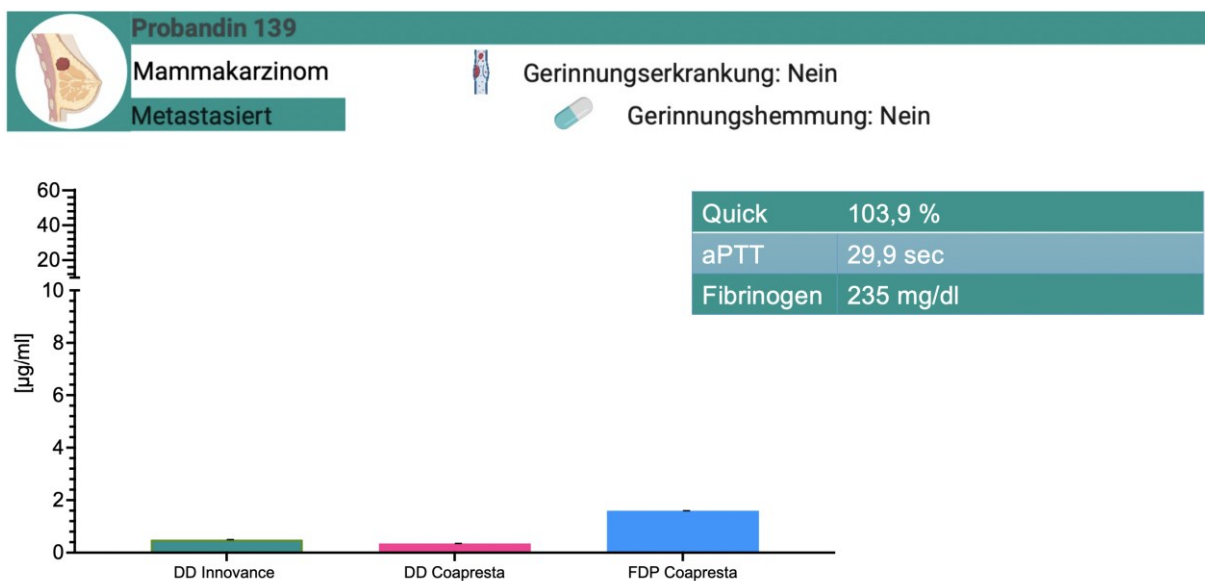
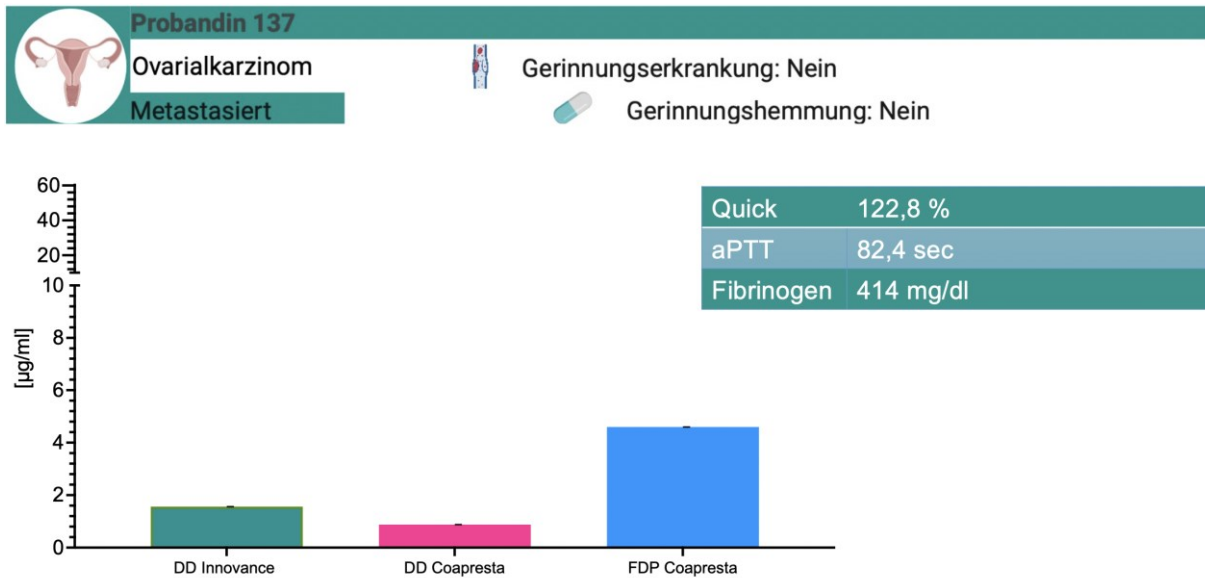
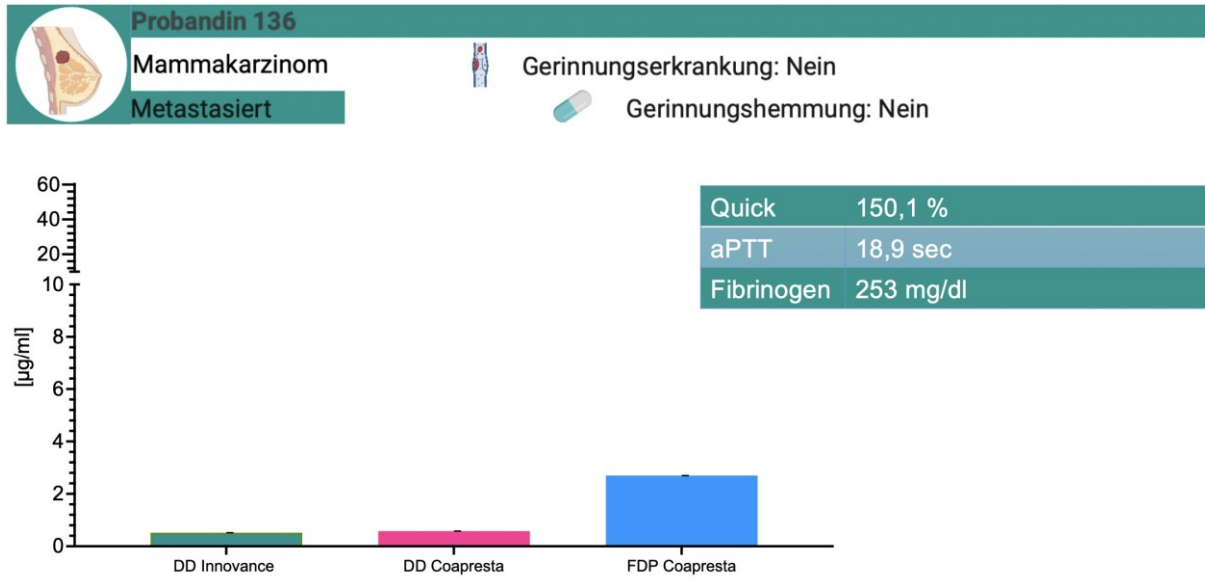
Probandin 120
 Mammakarzinom
 Metastasiert

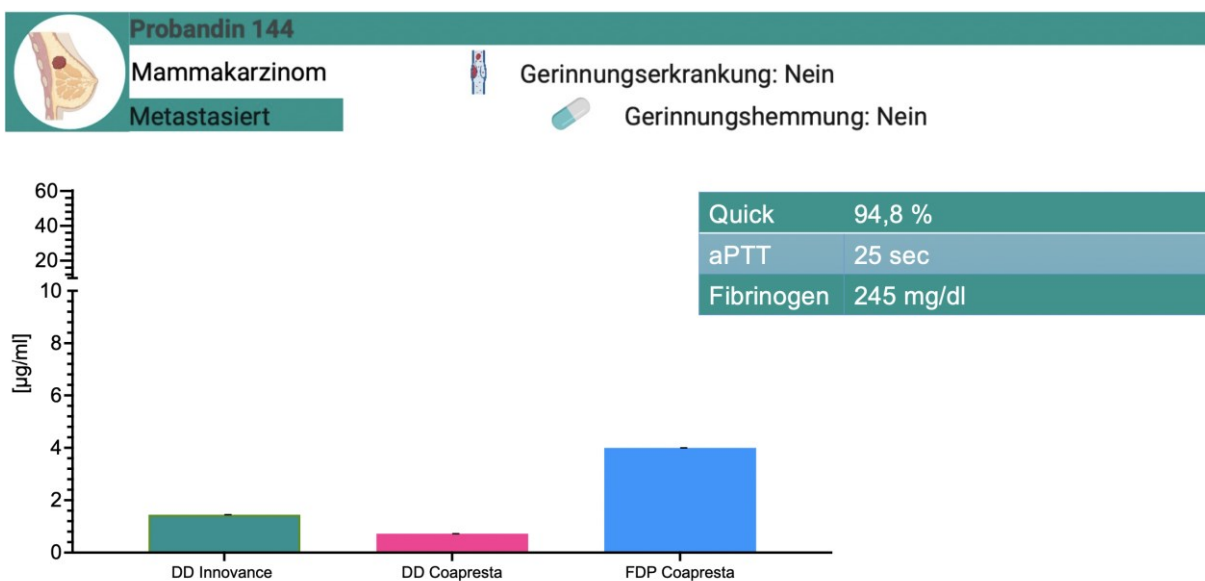
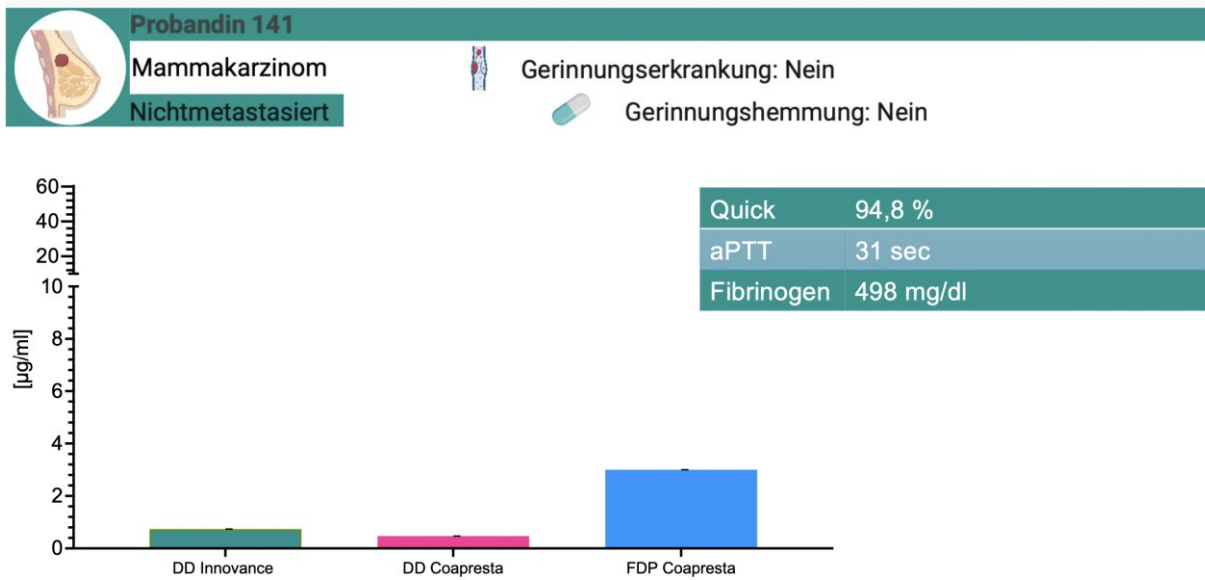
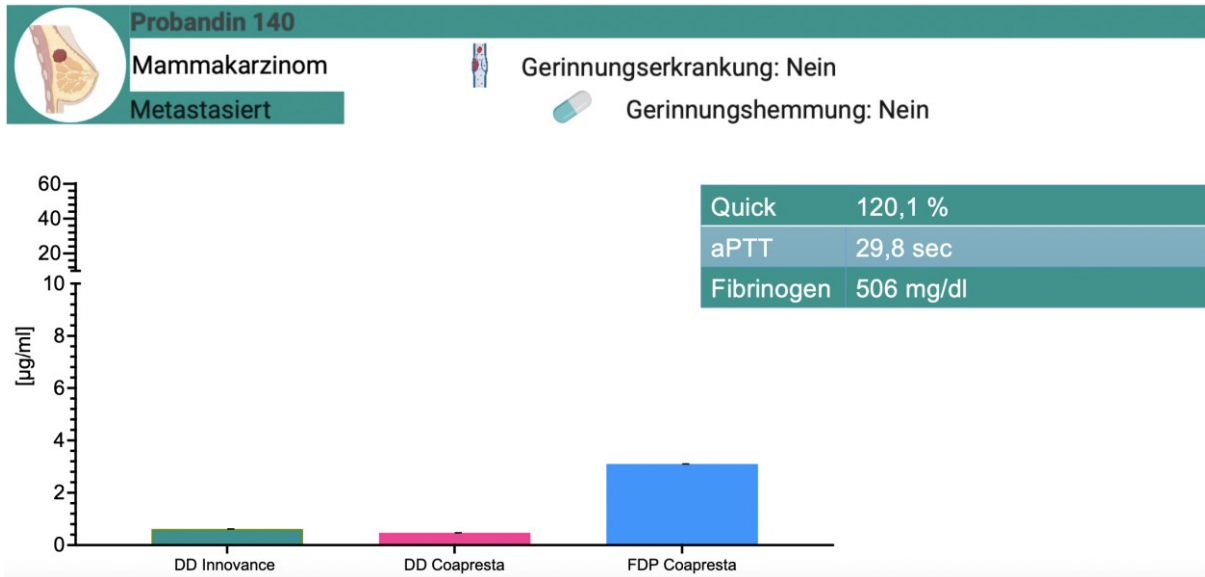
Gerinnungserkrankung: Nein
 Gerinnungshemmung: Nein

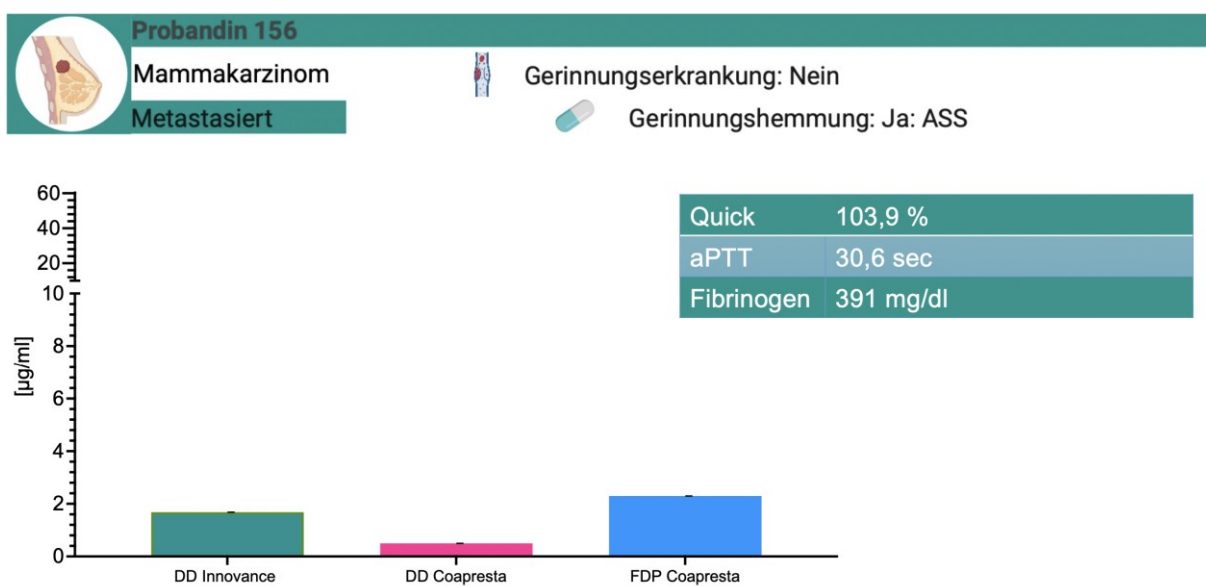
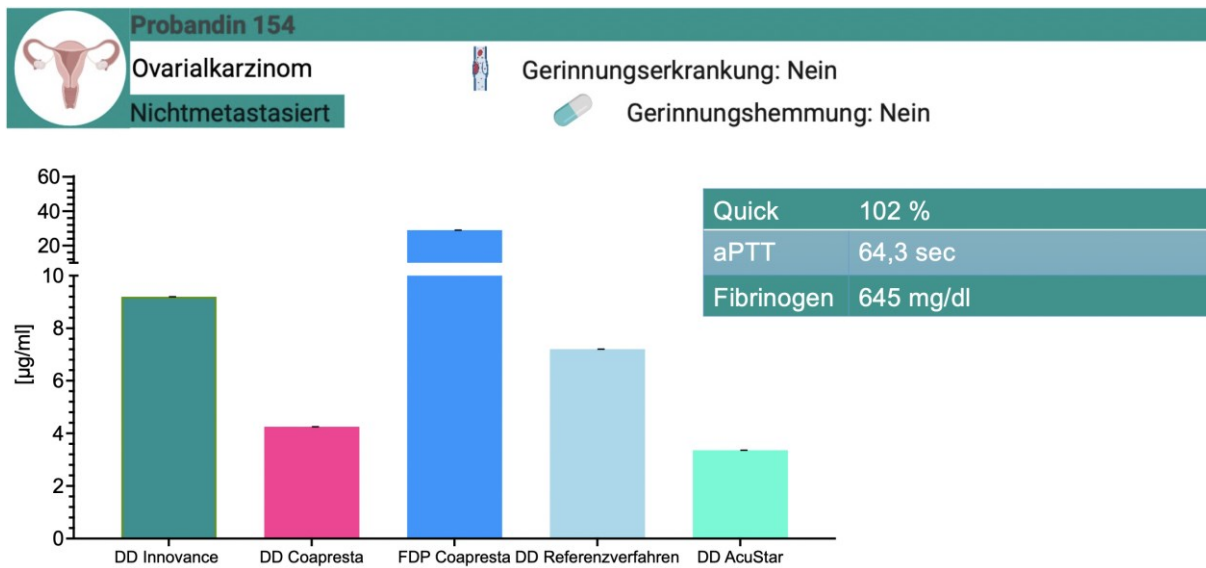
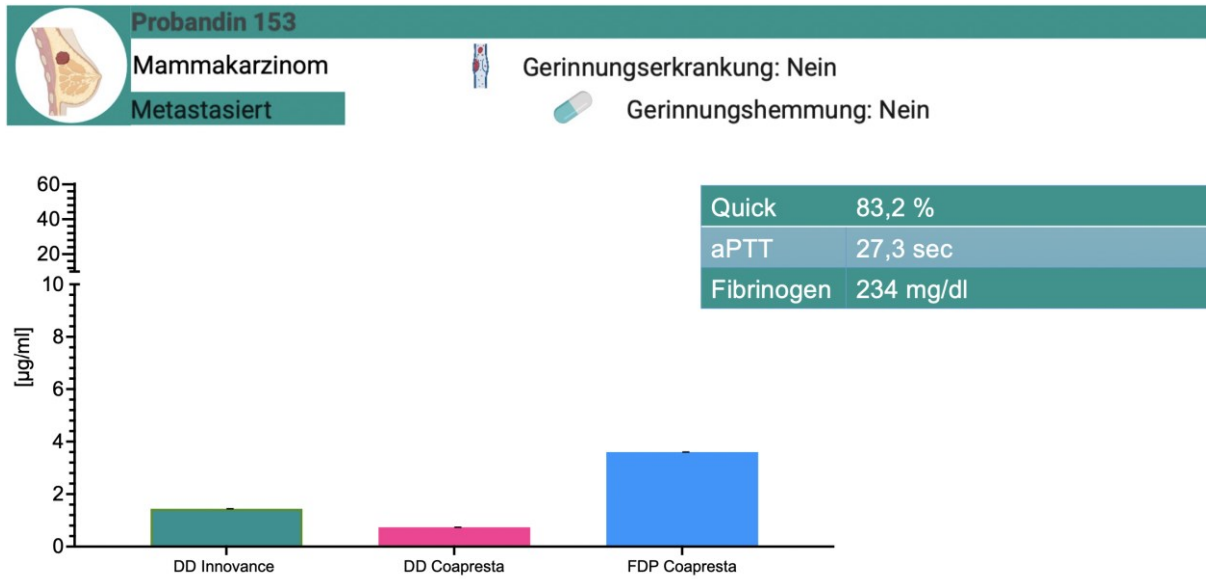


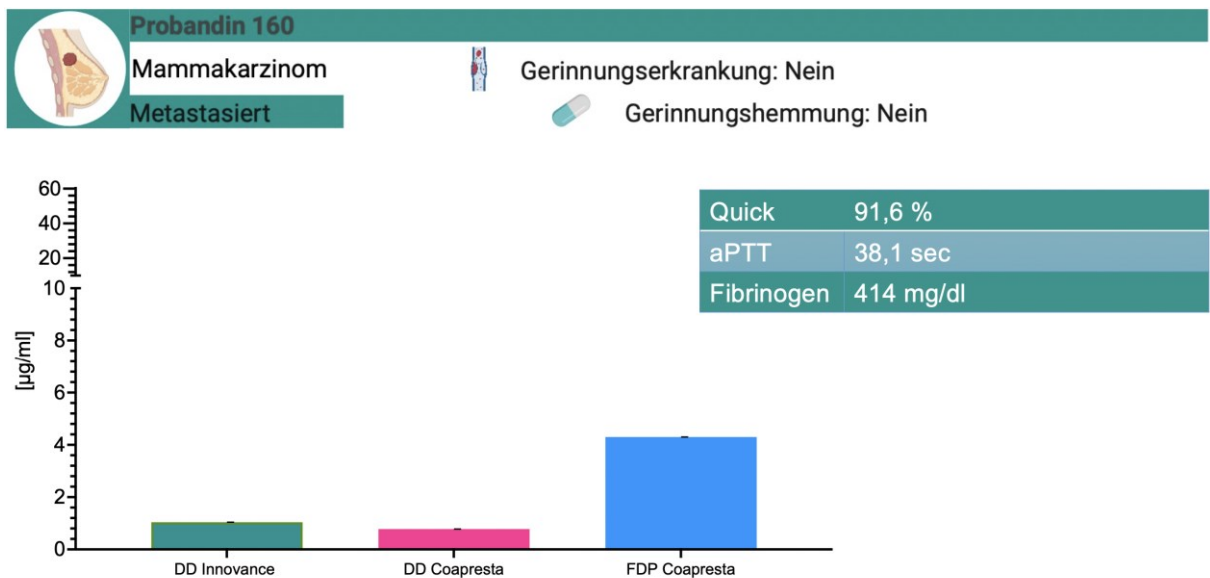
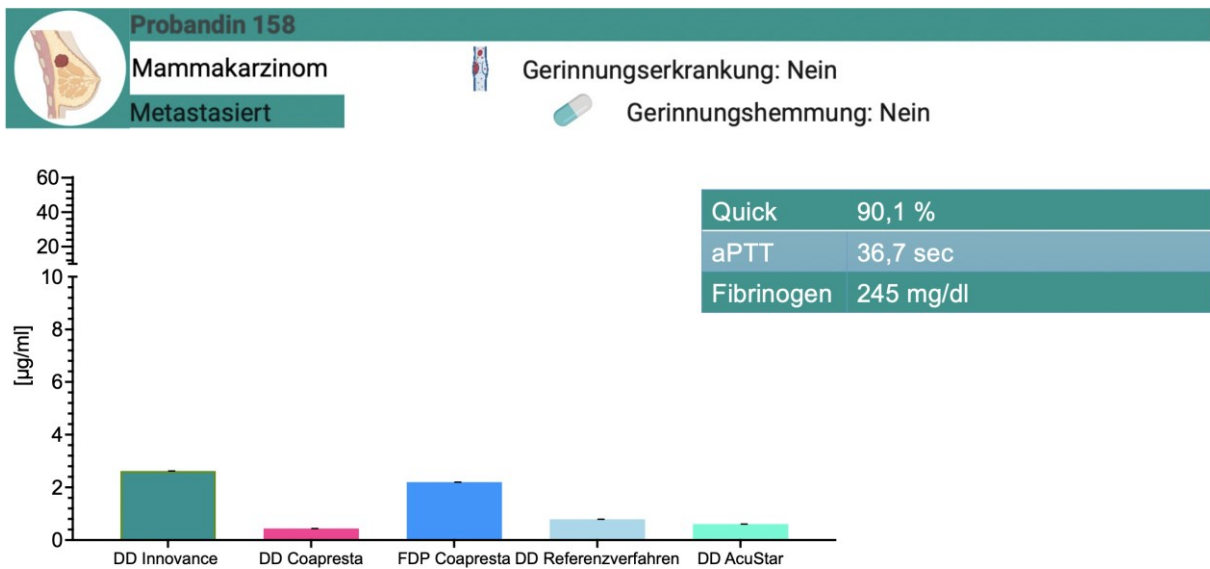
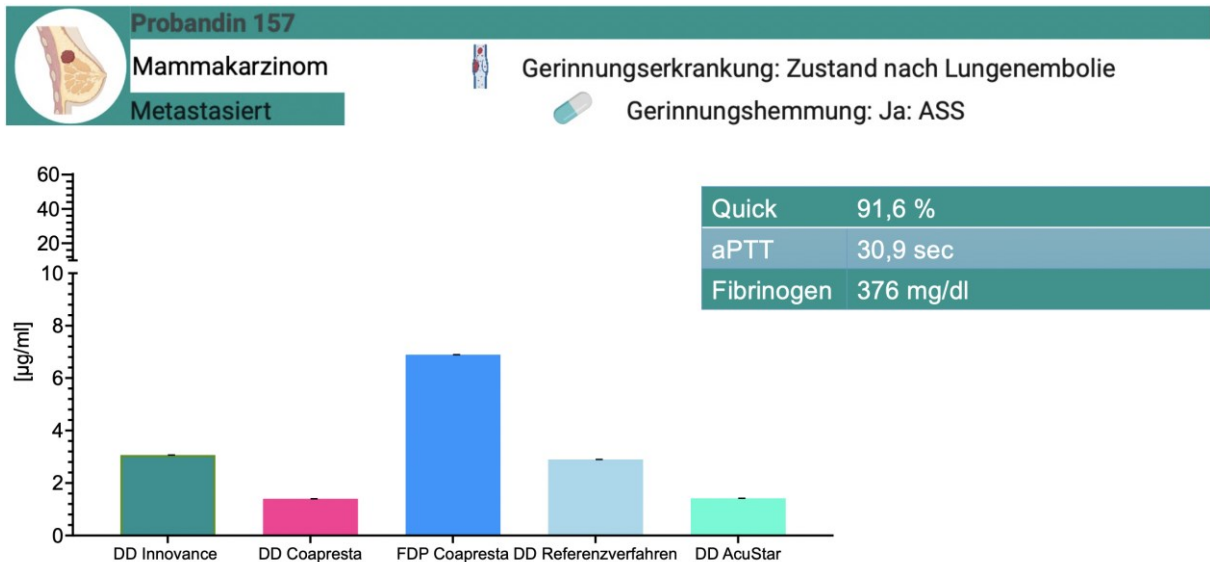


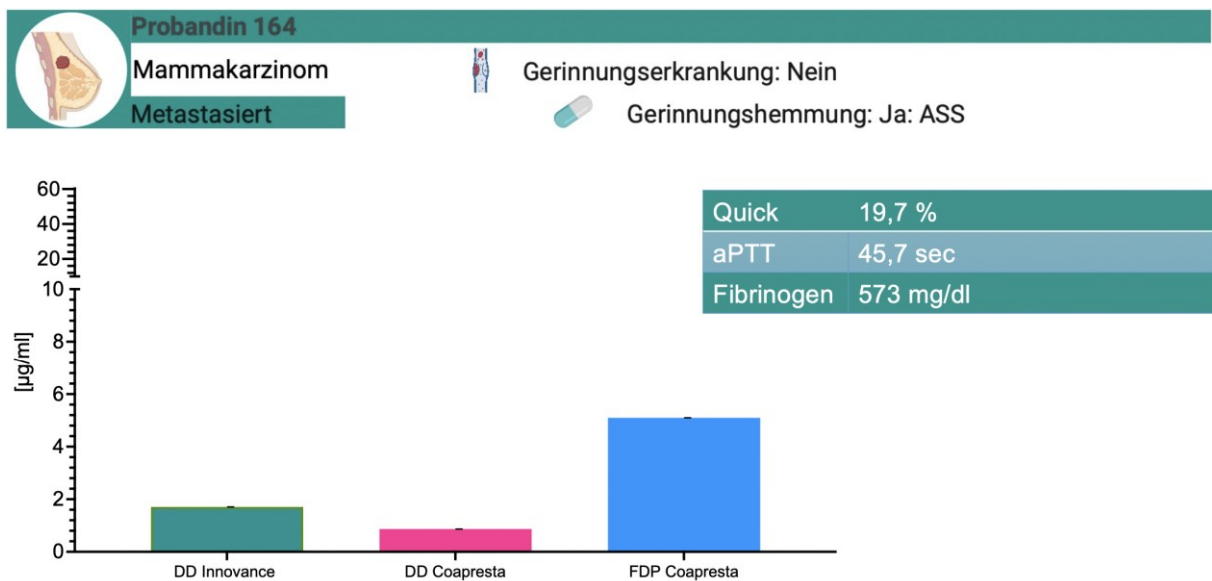
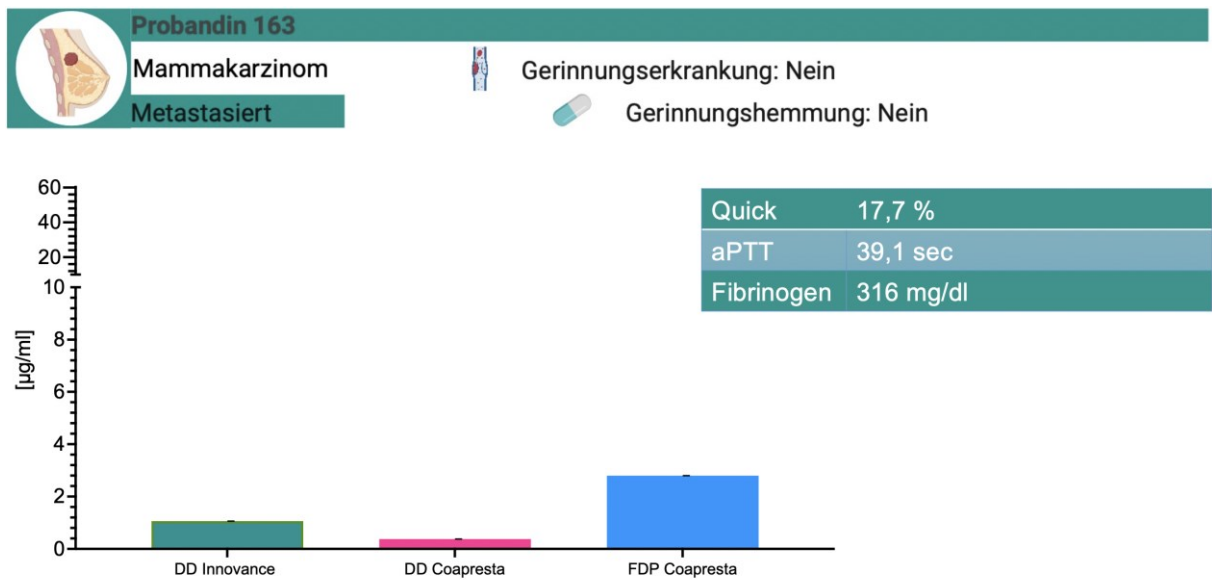
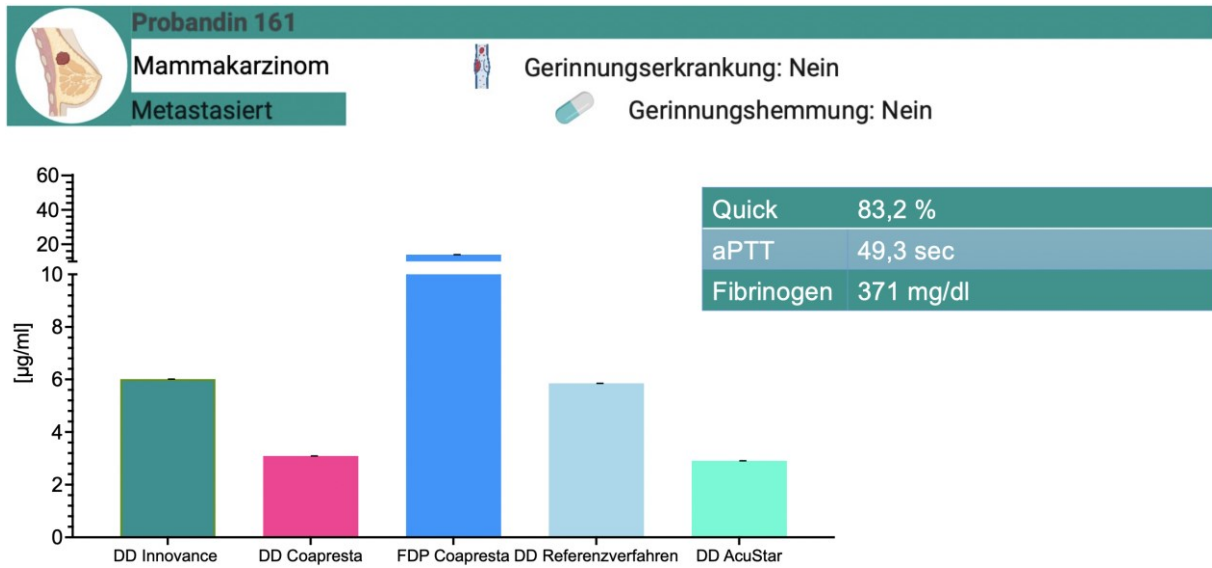


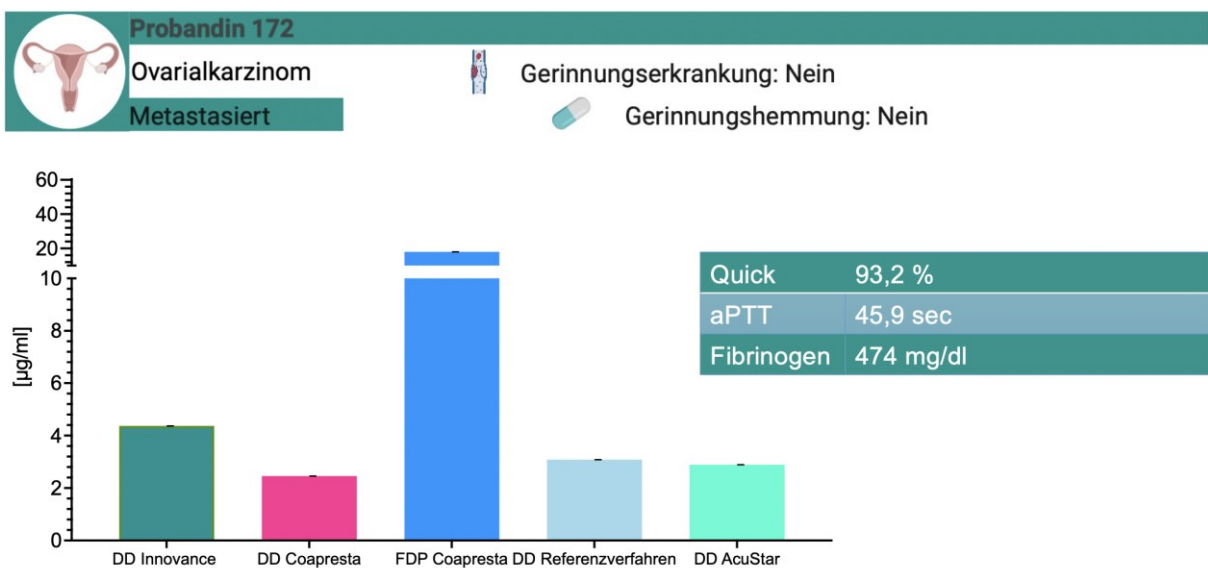
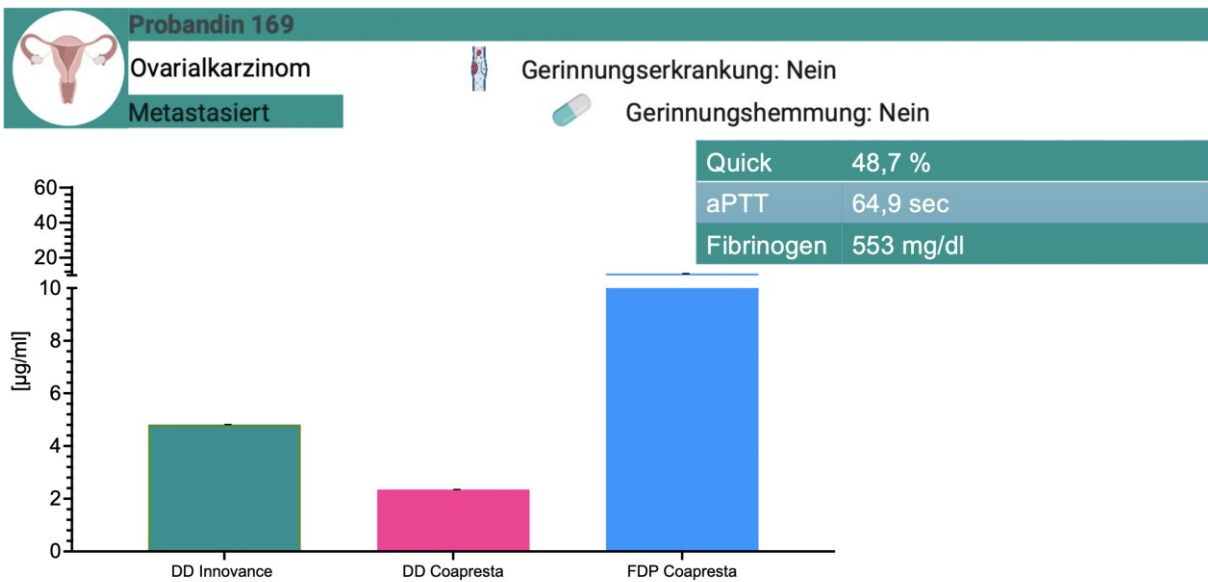
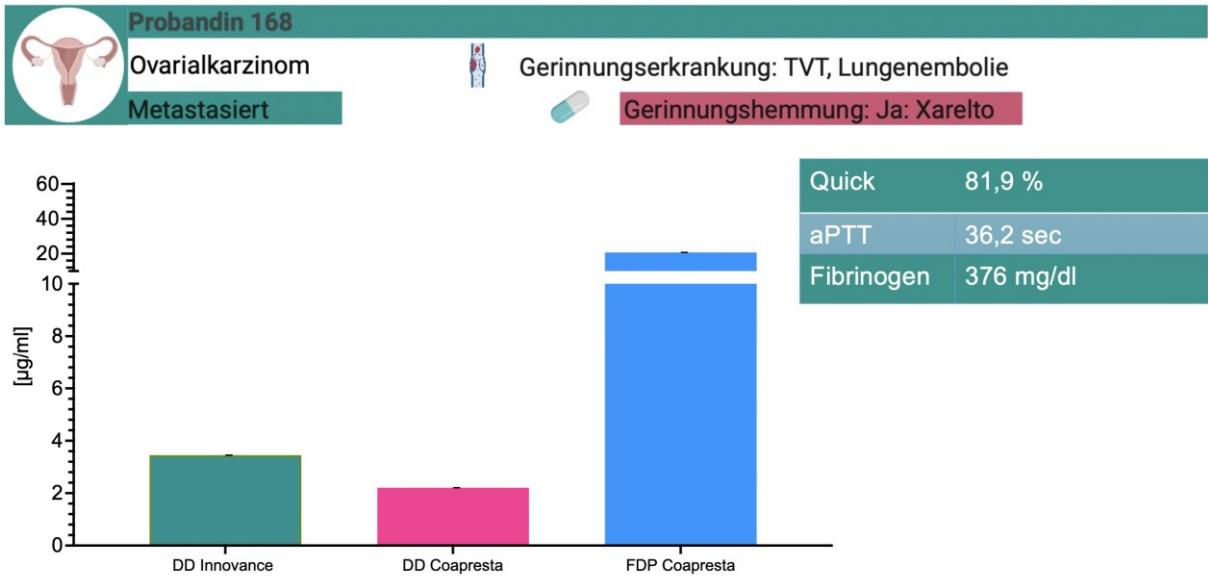


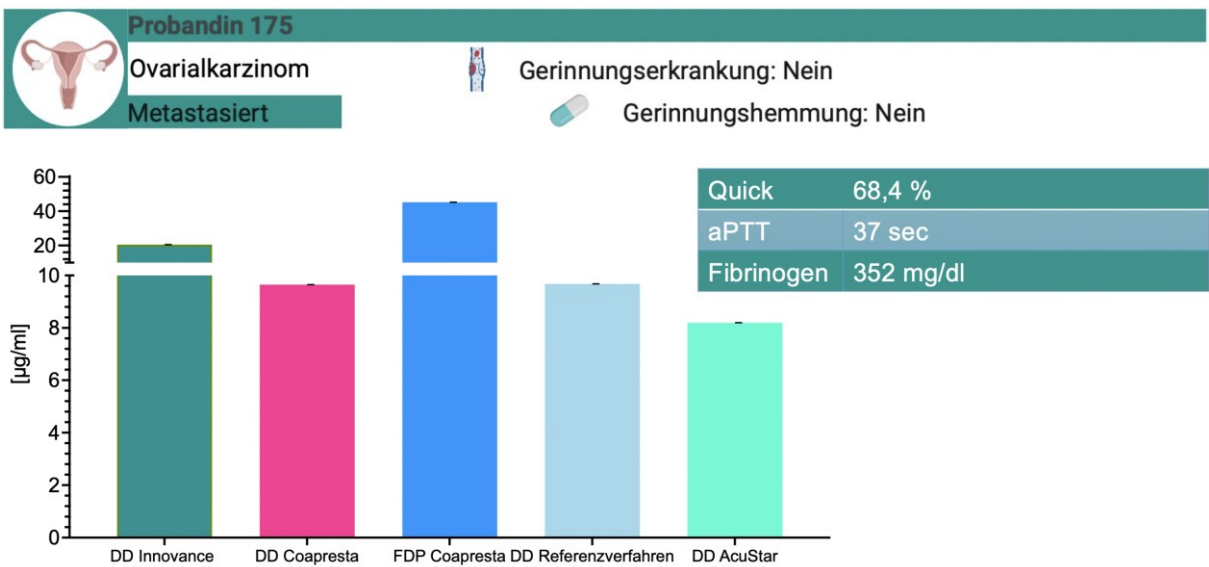
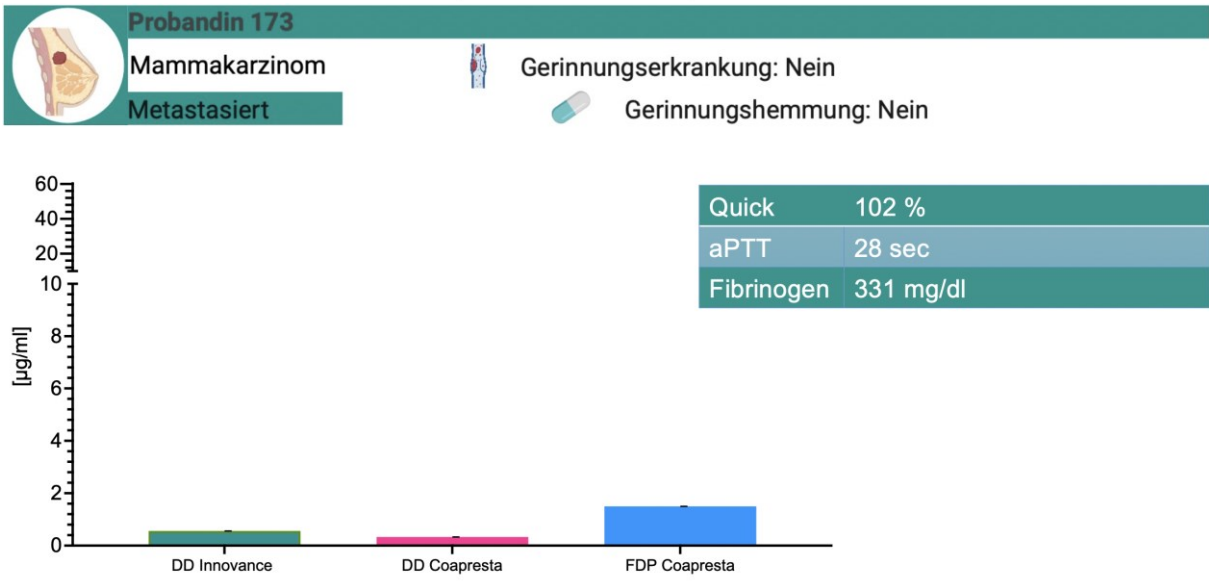
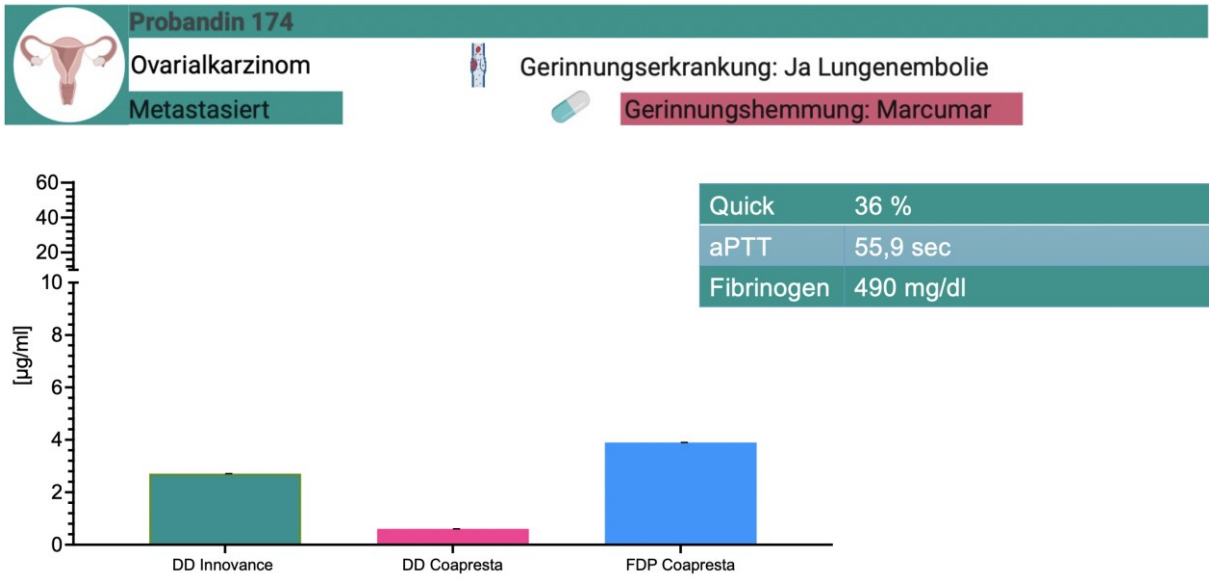












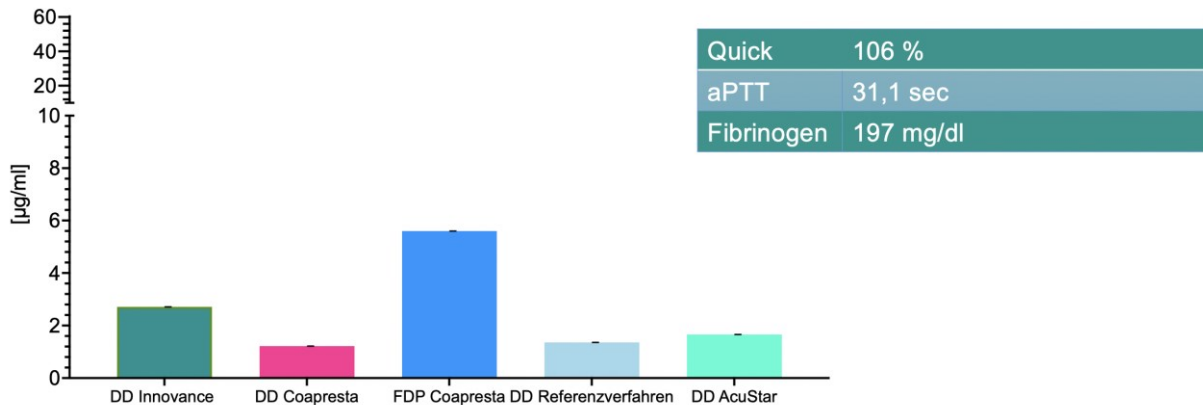
Probandin 176

Mammakarzinom

Metastasiert

Gerinnungserkrankung: Nein

Gerinnungshemmung: Nein

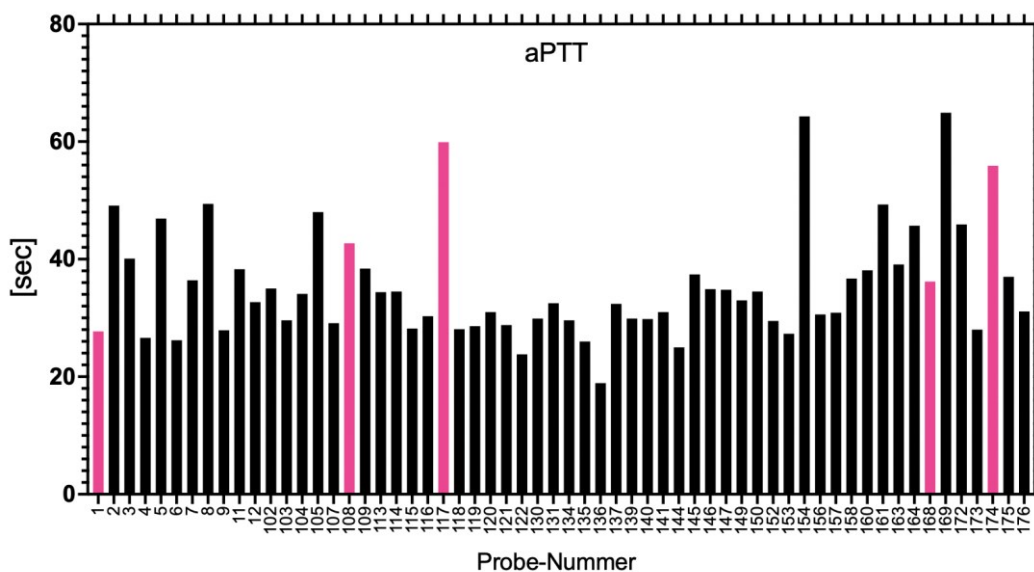


Bei der Übersicht der Gerinnungsparameter fallen überwiegend hohe FDP-Werte in den Proben auf. Dies weist auf eine generelle Proteolyse von Fibrin und Fibrinogen als Zeichen einer Gerinnungsaktivierung hin.

Des Weiteren zeigt sich bei den meisten Patientinnen ein hoher Fibrinogenspiegel, was gegen eine relevante Hyperfibrinolyse und eher auf einer Akutphasereaktion hinweist.

Die Gerinnungsaktivierung und die Proteolyse von Fibrinogen und Fibrin scheinen daher „kompensiert“ zu sein. Unter Berücksichtigung dieser Daten ist aus hämostaseologischer Sicht bei diesen Patienten eher von thrombotischen Ereignissen als von einer Blutungsgefahr auszugehen.

Die gesamten Gerinnungsparameter weisen ein sehr heterogenes Verteilungsmuster auf. Die 5 Proben der Patientinnen welche zum Zeitpunkt der Probenentnahme mittels einer medikamentösen Therapie zur plasmatischen Gerinnungshemmung behandelt wurden sind farbig hervorgehoben.



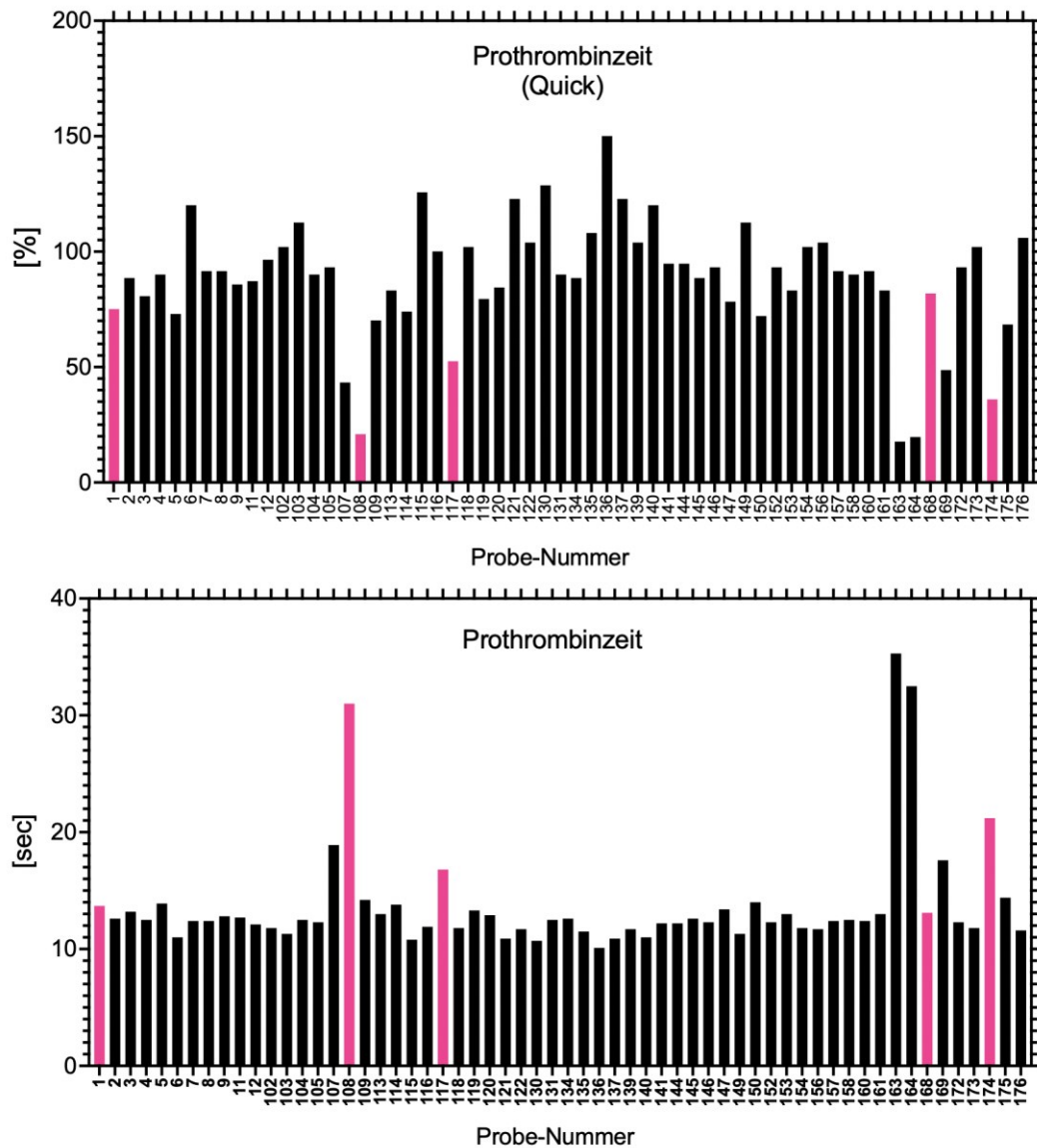


Abbildung 17: aPTT, Quick und PT der 60 Patientinnen bestimmt mittels Coapresta 2000. Farblich hervorgehoben die mittels plasmatischer Gerinnungshemmung behandelten Patientinnen. Es zeigt sich ein heterogenes Verteilungsmuster. Die Patientinnen mit medikamentöser Gerinnungshemmung weisen erhöhte Werte auf.

In den Verfahren zur Messung der Gerinnungszeit mittels aktivierter partieller Thrombinzeit und Prothrombinzeit zeigt sich, wie zu erwarten, bei den Patientinnen unter therapeutischer Vollantikoagulation eine Verteilung der Werte im oberen Bereich der Ergebnisse.

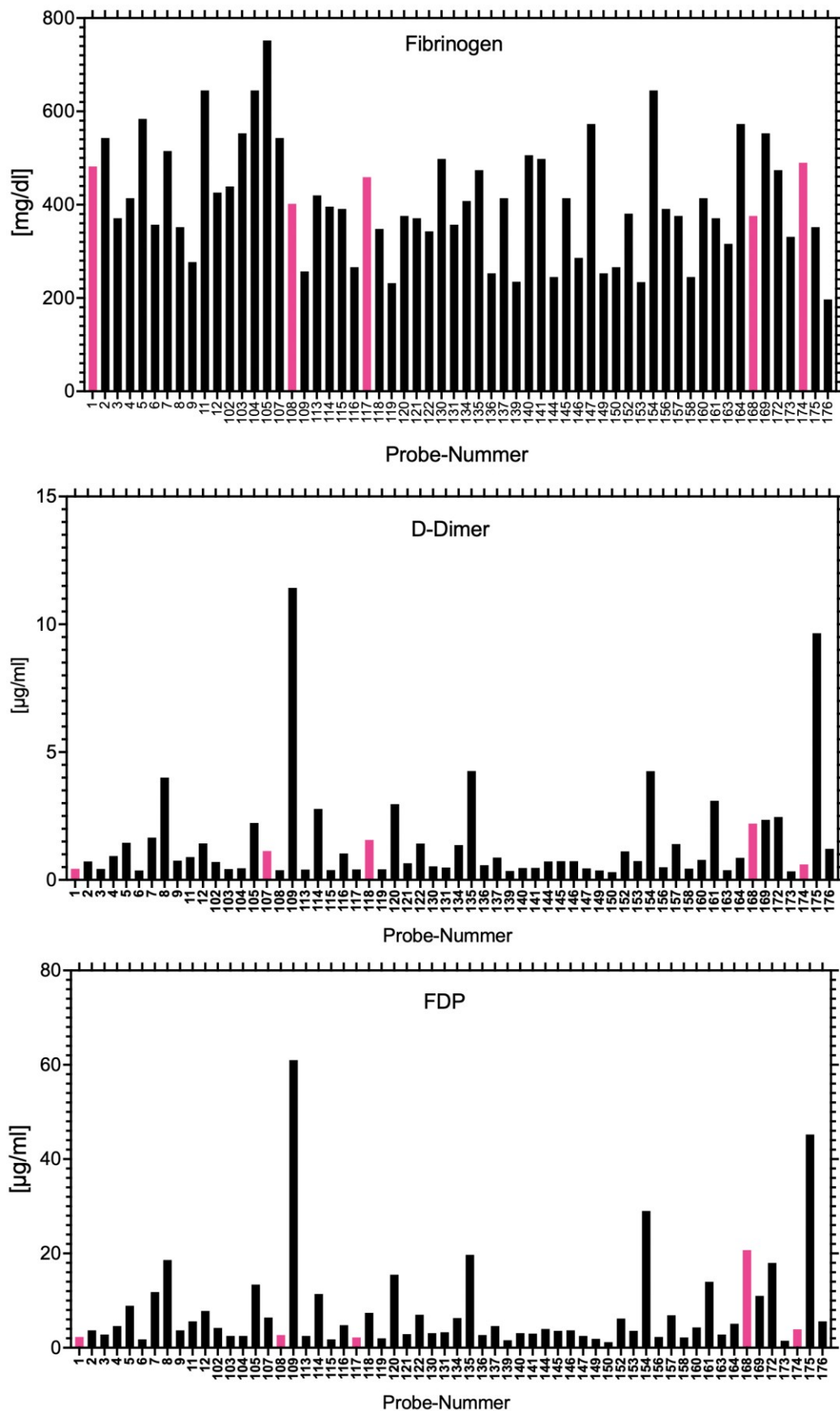


Abbildung 18: Fibrinogen, D-Dimer und FDP bestimmt mittels Coapresta 2000. Zu Darstellung einer Gerinnungsaktivierung der 60 Patientinnen. Farblich hervorgehoben die mittels plasmatischer Gerinnungshemmung behandelten Patientinnen. Es zeigt sich ein heterogenes Verteilungsmuster. Die Patientinnen mit medikamentöser Gerinnungshemmung weisen erniedrigten Werte im Sinne einer verminderten Gerinnungsaktivierung auf.

Bei den Verfahren zur Messung der Gerinnungsaktivierung verteilen sich die Proben der Patientinnen unter therapeutischer Vollantikoagulation im unteren Bereich der gemessenen Ergebnisse im Sinne einer verminderten Gerinnungsaktivierung unter entsprechender Medikamentöser Therapie.

3.2 Monoklonale Antikörper abhängige Quantifizierung mittels Standardverfahren

Die im Standardverfahren erfolgte monoklonaler Antikörper abhängige Quantifizierung der D-Dimer Werte wurde im Sinne einer technischen Evaluierung mit den bei Einschluss mittels Innovance D-Dimer-Test der Firma Siemens direkt bestimmten D-Dimer Werten verglichen.

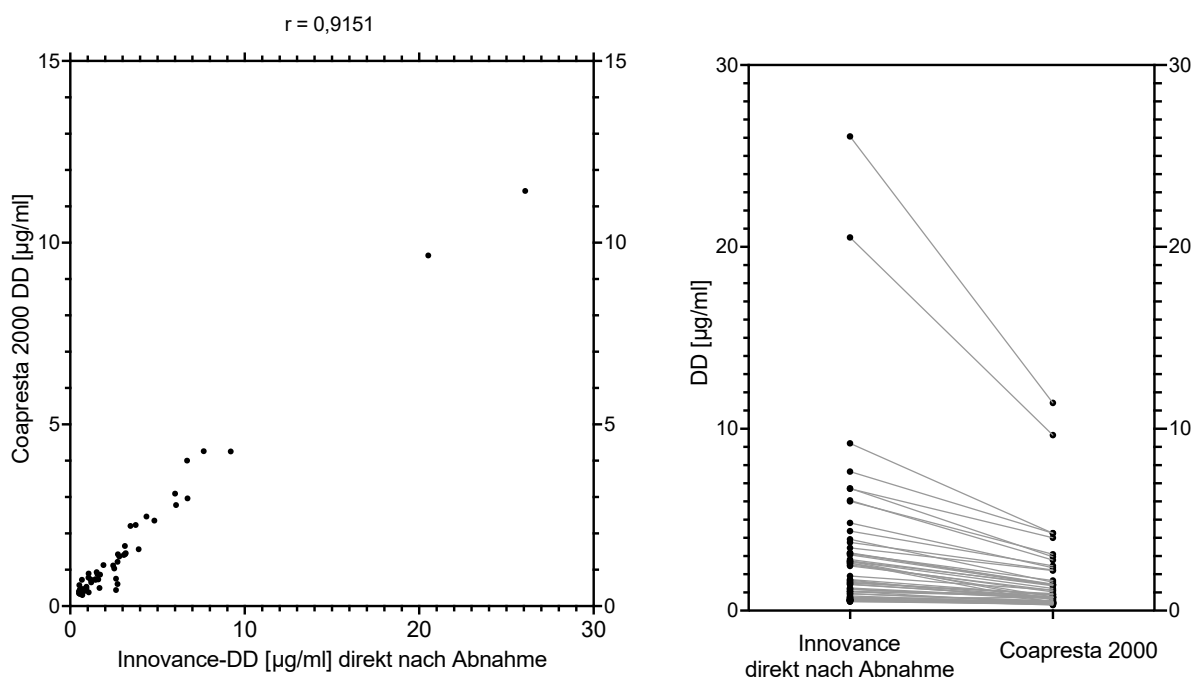


Abbildung 18: Darstellung der direkt nach Probenentnahme in der Klinik bestimmten Innovance D-Dimer-Werte in Korrelation zu den nach Zentrifugation und Kälteasservierung mittels Coapresta 2000 bestimmten D-Dimer Werten. Hier zeigt sich eine hohe Korrelation ($r = 0,9151$). Zunehmende numerische Varianz vor allem bei hohen D-Dimer Werten mit insgesamt deutlich höheren Werten bei dem Innovance Messverfahren.

Hier zeigte sich zwischen den dem Innovance und Coapresta D-Dimer-Test trotz unterschiedlicher Präanalytik mit zweifacher Zentrifugation zur Thrombozytenelemination und Ultratiefkühlung bei -80°C nach Probenentnahme mittels der Messungen durch den vollautomatischen Analyser Coapresta 2000 ein starker Korrelationskoeffizient nach Spearman mit einem r-Wert von 0,9151.

Bei den absoluten D-Dimer Werten hingegen zeigen sich mit einer Zunahme des Messwertes eine deutliche Abweichung mit deutlich höheren Werten bei der initial mittels der Messung durch den Test der Firma Siemens (Innovance).

Ein Teil der Proben wurden erneut nach der oben beschriebenen Präanalytik mittels des Innovance Test der Firma Siemens analysiert. Folgend ist als „Innovance D-Dimer

Original“ die Bestimmung initial, direkt nach Blutentnahme im Krankenhaus, vor der weiteren Präanalytik mittels Zentrifugation und Kältekonserverung dokumentiert. Die „Innovance Verlaufsmessung“ wurde im Verlauf, bei einem Teil des Probenmaterials, nach Zentrifugation und Kältekonserverung im IMH durchgeführt.

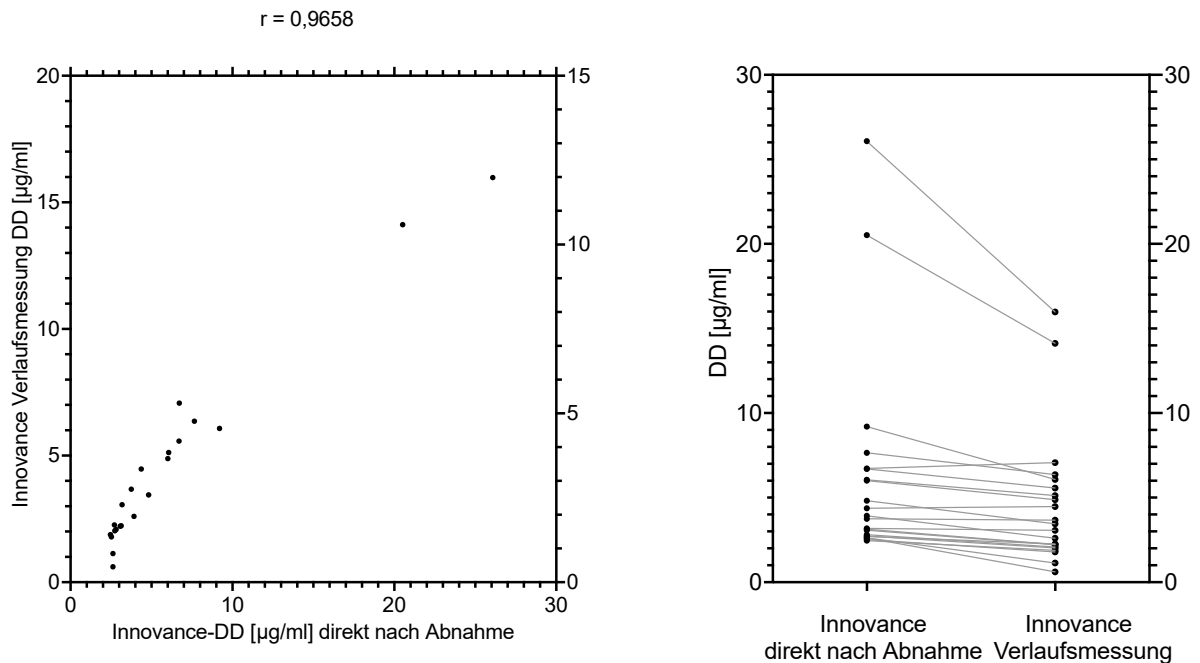


Abbildung 19: Darstellung von 22 der direkt nach Probenentnahme in der Klinik bestimmten Innovance D-Dimer-Werte in Korrelation zu den nach Zentrifugation und Kälteasservierung erneut mittels Innovance bestimmten D-Dimer Werten. Hier zeigt sich eine hohe Korrelation ($r = 0,9658$). Zunehmende numerische Varianz vor allem bei hohen D-Dimer Werten mit insgesamt deutlich höheren Werten bei dem Innovance Messverfahren welchen initial direkt in der Klinik erfolgte.

Hier zeigte sich ebenfalls ein hoher Korrelationskoeffizient nach Spearman von 0,9658, bei erneut niedrigeren Werten im direkten Vergleich in der verzögerten Messung.

3.2.1 Vergleich weiterer Standardverfahren

22 Proben wurden, neben dem unten dargestellten monoklonalen Antikörper unabhängigen Verfahren, Vergleichsmessung weiterer auf dem Markt befindlichen Antikörperanhängiger Verfahren unterzogen. Hier zeigten sich erneut für den Innovance Test die höchsten Absolutwerte

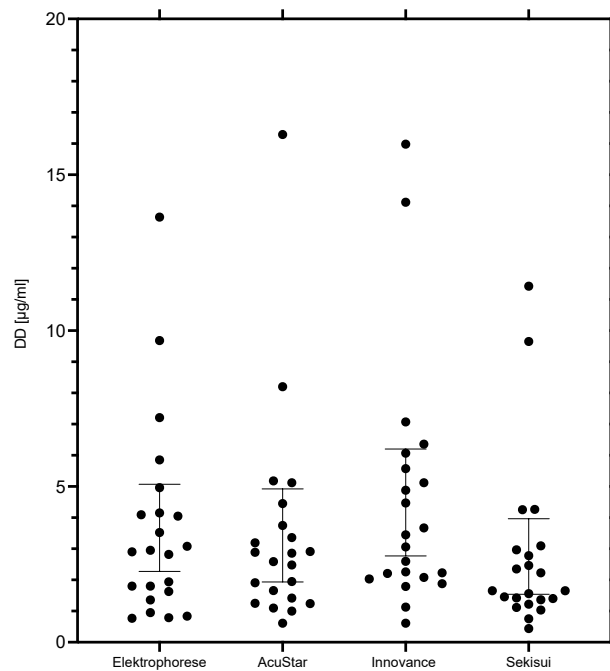
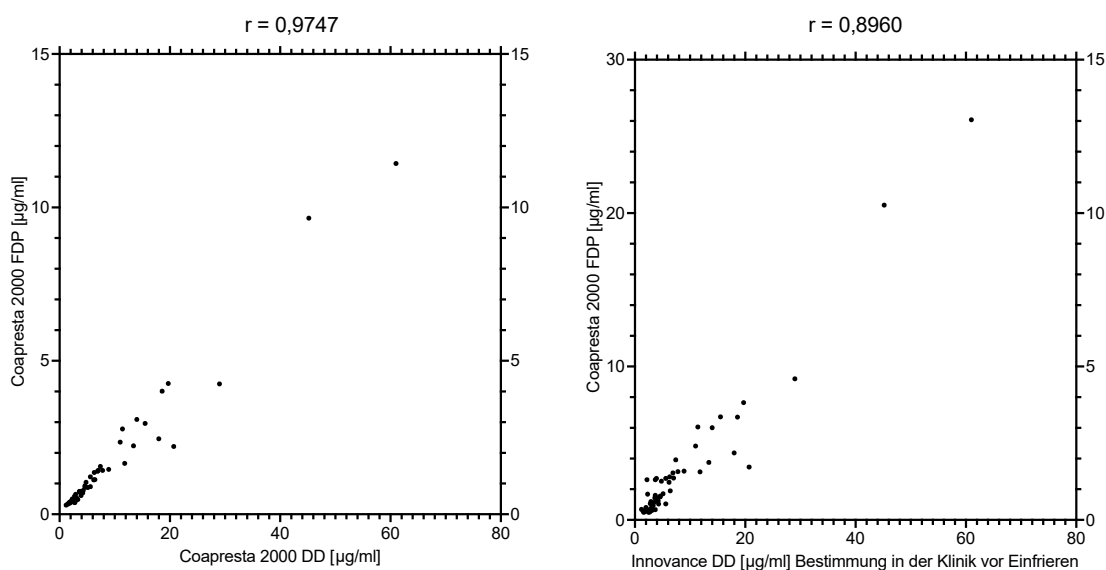


Abbildung 20: Darstellung von 22 nach Zentrifugation und Kälteasservierung erhobenen D-Dimer Werten mit verschiedenen D-Dimer Testverfahren inklusive dem Referenzverfahren. Es zeigt sich eine ausgeprägte numerische Varianz vor allem bei höheren Messwerten.

3.3 Vergleich FDP mit den verschiedenen D-Dimer Testverfahren

Die Ergebnisse der mittels verschiedener Verfahren bestimmter D-Dimer Werte wurden noch mit dem per Coapresta 2000 bestimmten Fibrinogenspaltprodukten (FDP) verglichen. Hierbei werden im Vergleich zur D-Dimer-Bestimmung alle beim Fibrinogen und Fibrin Abbau entstehenden Abbauprodukte unspezifisch bestimmt.



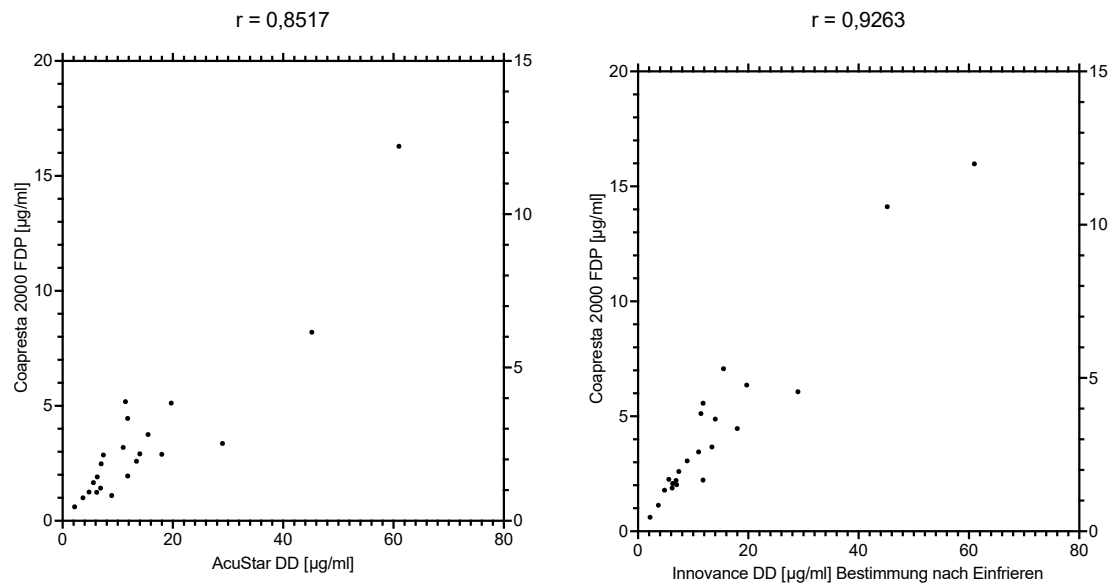


Abbildung 21: Korrelation von Coapresta-, Innovance- (initial in der Klinik und nach Zentrifugation und Kälteasservierung) und AcuStar-D-Dimer Testverfahren mit dem per Coapresta 2000 bestimmten Fibrinogenspaltprodukten (FDP). Hierbei werden im Vergleich zur D-Dimer-Bestimmung alle beim Fibrinogen und Fibrin Abbau entstehenden Abbauprodukte unspezifisch bestimmt. Es zeigen sich hohe Korrelationskoeffizienten.

Hierbei zeigt sich trotz der unterschiedlichen Verfahren zur D-Dimer Bestimmung in allen Tests ebenfalls ein hoher Korrelationskoeffizient zwischen den Fibrinogenspaltprodukten und D-Dimer.

Weiterhin zeigt sich aber erneut die mangelnde numerische Übereinstimmung der verschiedenen Verfahren

3.4 Vergleich Tumorcharakteristika mit ausgewählten Gerinnungsparametern

Exemplarisch wurden die mittels Coapresta 2000 erhobenen Werte für Fibrinogenspaltprodukte, D-Dimer und Fibrinogen mit klinischen Parametern des Patientenkollektivs wie Tumorart, Metastasierung und Chemotherapie verglichen.

Hier zeigt sich insgesamt, aufgrund der Größe des Patientenkollektiv und der sehr ungleichen Verteilung der Charakteristika in den einzelnen Kollektiven, keine statistisch signifikanten Ergebnisse bei fehlender Normalverteilung nach Pearson.

Bei der Tumorart (Abbildung 22) lässt sich, bei deutlich höher Anzahl von an Mammakarzinom erkrankten Patientinnen (44 vs. 16), ein Trend zu einer vermehrten Gerinnungsaktivierung bei den an Ovarialkarzinom erkrankten Patientinnen erkennen. Bei diesen Patientinnen zeigen sich deutlich höherer FDP- (Median 13,19 vs. 5,85) und D-Dimer-Werte (Median 1,84 vs. 1,13).

Bei insgesamt deutlichen höheren FDP-Werten im Vergleich zu den D-Dimer-Werten weist dies, wie oben beschrieben, auf eine generelle Proteolyse von Fibrin und Fibrinogen hin. Auch die Fibrinogenwerte sind bei den an Ovarialkarzinom erkrankten Patientinnen höher (Median 447,31 vs. 395,48). Diese befinden sich allerdings im hochnormalen Bereich was gegen eine relevante Hyperfibrinolyse und eher für eine Akutphasereaktion spricht.

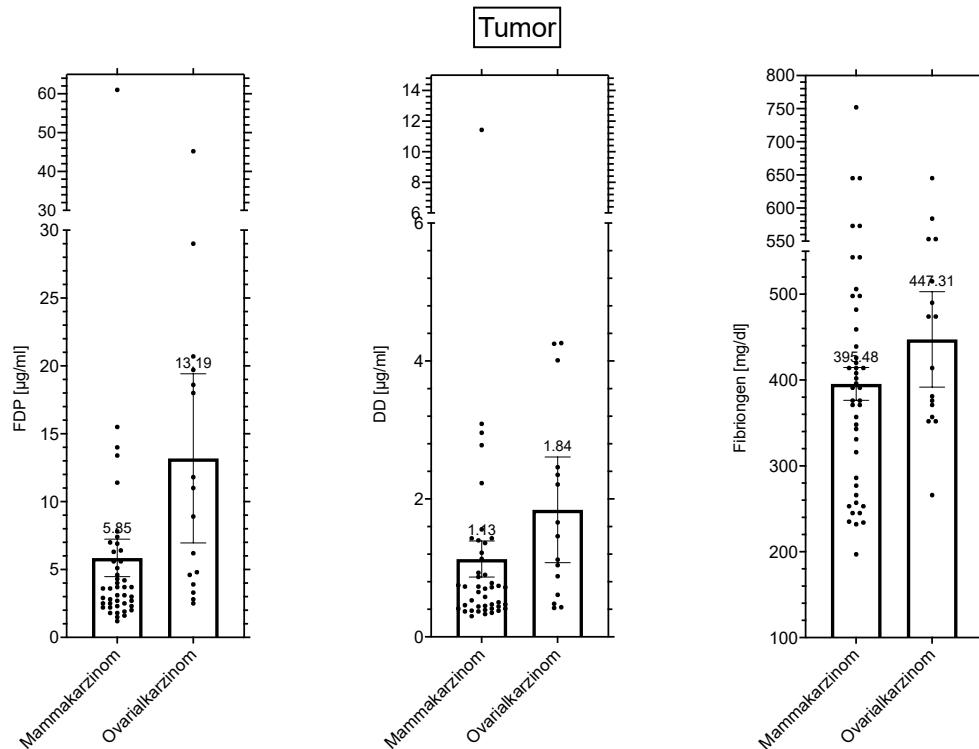


Abbildung 22: Vergleich nach Tumorerkrankung der mittels Coapresta 2000 erhobenen Werte für Fibrinogenspaltprodukte, D-Dimer und Fibrinogen. Es ergeben sich keine statistisch signifikanten Ergebnisse bei fehlender Normalverteilung nach Pearson.

Deutlich höhere Anzahl von an Mammakarzinom erkrankten Patientinnen (44 vs. 16), mit Trend zu einer vermehrten Gerinnungsaktivierung bei den an Ovarialkarzinom erkrankten Patientinnen erkennen. Mit deutlich höherem FDP- (Median 13,19 vs. 5,85) und D-Dimer-Werte (Median 1,84 vs. 1,13). Die insgesamt deutlichen höheren FDP-Werten im Vergleich zu den D-Dimer-Werten weisen auf eine generelle Proteolyse von Fibrin und Fibrinogen hin. Die Fibrinogenwerte sind bei den an Ovarialkarzinom erkrankten Patientinnen höher (Median 447,31 vs. 395,48). Diese befinden sich im hochnormalen Bereich was gegen eine relevante Hyperfibrinolyse und eher für eine Akutphasereaktion spricht.

Bei der Frage der Metastasierung (Abbildung 23) lässt sich, bei einer deutlich höheren Anzahl von metastasierten Patientinnen (50 vs. 10), ein Trend zu einer vermehrten Gerinnungsaktivierung bei den Patientinnen mit metastasiertem Tumorleiden erkennen. Bei diesen Patientinnen zeigen sich deutlich höherer FDP- (Median 8,07 vs. 6,48) und D-Dimer-Werte (1,50 vs. 1,19).

Bei insgesamt deutlichen höheren FDP-Werten im Vergleich zu den D-Dimer-Werten weist dies auch auf eine generelle Proteolyse von Fibrin und Fibrinogen hin. Die Fibrinogenwerte sind bei den Patientinnen mit metastasiertem Tumorleiden allerdings leicht niedriger (Median 401,68 vs. 447,40). Bei beiden Gruppen befinden sich die Werte im hochnormalen Bereich.

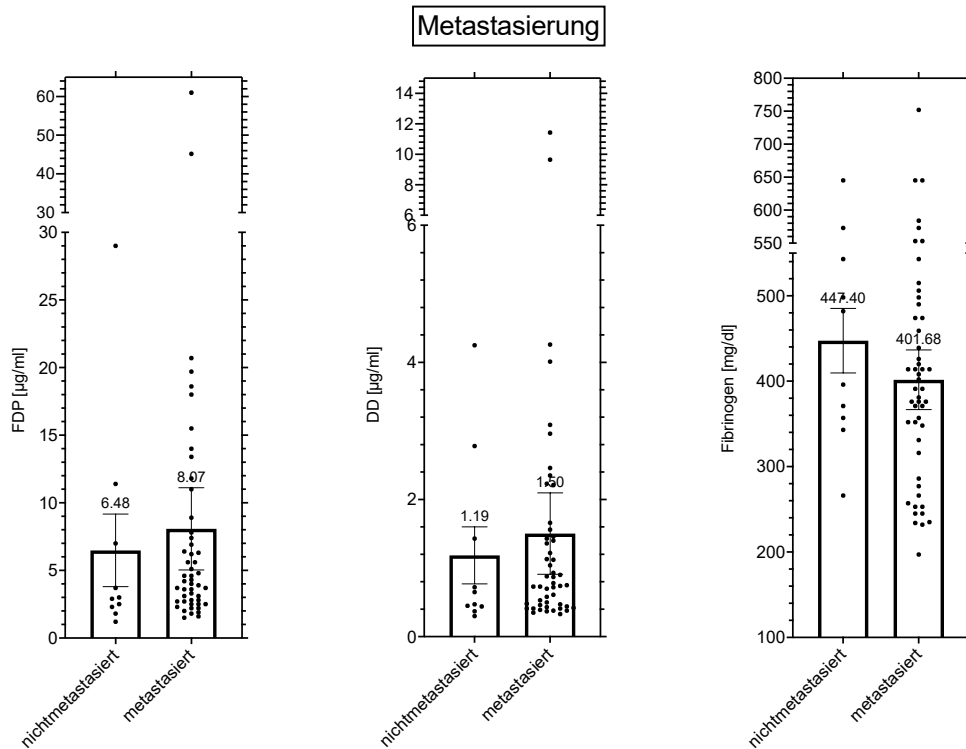


Abbildung 23: Vergleich nach Metastasierung der mittels Coapresta 2000 erhobenen Werte für Fibrinogenspaltprodukte, D-Dimer und Fibrinogen. Es ergeben sich keine statistisch signifikanten Ergebnisse bei fehlender Normalverteilung nach Pearson.

Deutlich höhere Anzahl von an Patientinnen mit Metastasen (50 vs. 10), mit Trend zu einer vermehrten Gerinnungsaktivierung bei den Patientinnen mit Metastasen. Deutlicher Varianz der FDP-Werte (Median 8,07 vs. 6,48) als bei den D-Dimer-Werten (1,50 vs. 1,19). Die insgesamt deutlichen höheren FDP-Werten im Vergleich zu den D-Dimer-Werten weisen auf eine generelle Proteolyse von Fibrin und Fibrinogen hin. Die Fibrinogenwerte sind bei den Patientinnen mit metastasiertem Tumorleiden leicht niedriger (Median 401,68 vs. 447,40). Bei beiden Gruppen befinden sich die Werte im hochnormalen Bereich.

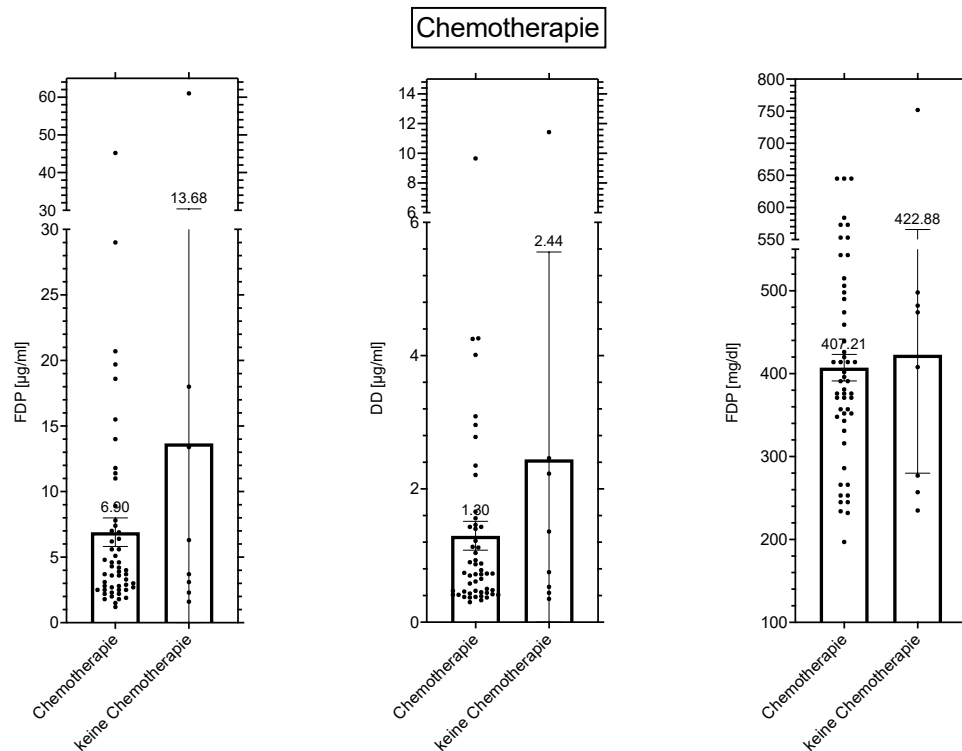


Abbildung 24: Vergleich der mittels Coapresta 2000 erhobenen Werte für Fibrinogenspaltprodukte, D-Dimer und Fibrinogen. nach Therapie durch Chemotherapie. Es ergeben sich keine statistisch signifikanten Ergebnisse bei fehlender Normalverteilung nach Pearson.

Deutlich höhere Anzahl von Patientinnen mit Chemotherapie (52 vs. 8), mit Trend zu geringerer Proteolyse bei den Patientinnen ohne Chemotherapie (FDP Median 6,90 vs. 13,68 vs. D-Dimer Median 1,30 vs. 2,44). Fibrinogen zeigte sich in beiden Gruppen nahezu gleich verteilt (Median 407,21 vs. 422,88) im hochnormalen Bereich.

Bei den Patientinnen, welche sich einer Chemotherapie (Abbildung 24) unterziehen mussten, zeigte sich, bei ebenfalls sehr ungleicher Verteilung (52 unter Chemotherapie vs. 8 ohne Chemotherapie), ein Trend zu einer geringeren Proteolyse (FDP Median . 6,90 vs. 13,68 vs. D-Dimer Median 1,30 vs. 2,44)

Die Fibrinogenwerte zeigten sich in beiden Gruppen nahezu gleich (Median 407,21 vs. 422,88) im hochnormalen Bereich.

Insgesamt lässt sich in dem Patientenkollektiv mit neoplastischer Grunderkrankung in den durchgeführten, gerinnungsspezifischen Testverfahren eine vermehrte Gerinnungsaktivierung und Fibrinolyse nachweisen. Ein Abfall der Fibrinogenkonzentration zeigt sich allerdings nicht. Ohne statistische Signifikanz zeigt sich eine erhöhte Gerinnungsaktivierung bei den Patientinnen mit Ovarialkarzinom und wie zu erwarten, bei den Patientinnen mit metastasiertem Tumorleiden.

3.5 Monoklonale Antikörper unabhängige Quantifizierung von D-Dimer-Antigen

Um das Fibrinogen in den Citratplasma Proben zu entfernen wurden diese zuerst mit Batroxobin inkubiert. Anschließend wurde die nach der Zentrifugation verbleibende Flüssigkeit, welche die gesamten, nicht gebundenen, Fibrinassozierten Bestandteile enthält, mit Glu-Plasminogen und Streptokinase vermischt.

Die durch Batroxobin induzierte Gerinnelbildung mit konsekutiver Entfernung von Fibrinogen hat nur eine geringe Auswirkung auf die mittels AcuStar D-Dimer und

Innovance D-Dimer Test gemessenen Antigen-Spiegel. Hierdurch zeigt sich, dass das durch dieses D-Dimer-Testverfahren gemessene Material im Vergleich zu Batroxobin nicht an der Gerinnungsbildung beteiligt ist

Die Ergebnisse zeigen, dass die um eine Überladung der Elektrophorese erforderliche Entfernung des Fibrinogens aus den Proben die D-Dimer-Bestimmung nicht beeinträchtigt.

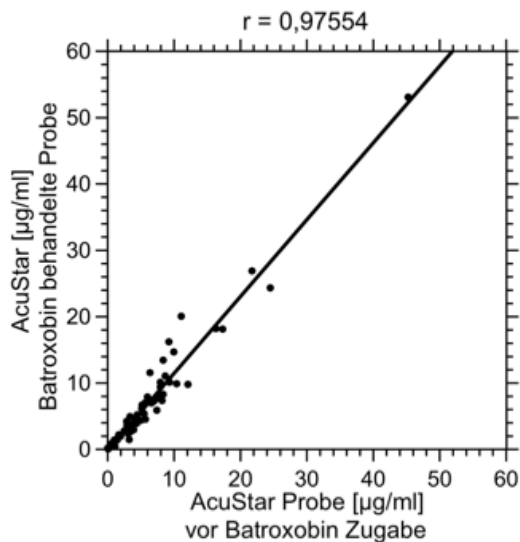


Abbildung 25:

Auswirkung der Fibrinogenentfernung durch Batroxobin induzierte Gerinnungsbildung auf die D-Dimer Antigenkonzentration. Messung der Plasma Proben nach Zentrifugation und Kälteasservierung durch AcuStar D-Dimer (Abb. 25) Innovance D-Dimer Test (Abb. 26) Jeweils hohe Korrelation zwischen den Proben ohne und mit Batroxobinzugabe ohne relevanten Verlust des D-Dimer-Antigens. Durch die konstanten D-Dimer-Spiegel lässt sich schlussfolgern, dass das D-Dimer Antigen nicht in das Fibringerinnsel inkorporiert wird.

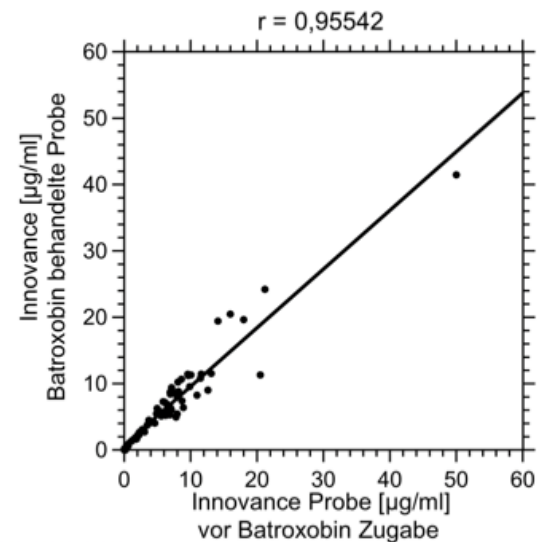


Abbildung 26:

In der Messung der Plasma Proben mittels AcuStar D-Dimer (Abbildung 25) und Innovance D-Dimer (Abbildung 26) zeigt sich jeweils, im Vergleich zu den Messungen des abzentrifugierten und der mittels Batroxobin induzierten Gerinnungsbildung, eine strenge Korrelation. Es zeigt sich kein relevanter Verlust des D-Dimer Antigens im Vergleich zu der Fibrin-Gerinnungsbildung mittels Batroxobin. Durch die gleichbleibenden D-Dimer Spiegel lässt sich schlussfolgern, dass das D-Dimer Antigen nicht in das Fibringerinnsel inkorporiert wird.

Im Folgenden wird der Effekt der Plasmin-Proteolyse auf das D-Dimer-Antigen untersucht.

Unten aufgeführt in Abbildung 27 die Ergebnisse der virtuellen Elektrophorese von ausgesuchtem Probenmaterial mit unterschiedlicher Gerinnungsaktivierung auf der Grundlage des Fluoreszenz-Scannens der Kapillarelektrophorese-Röhrchen nach der Immunodetektion unter Verwendung eines polyklonalen Anti-Fibrinogen-Antiserums.

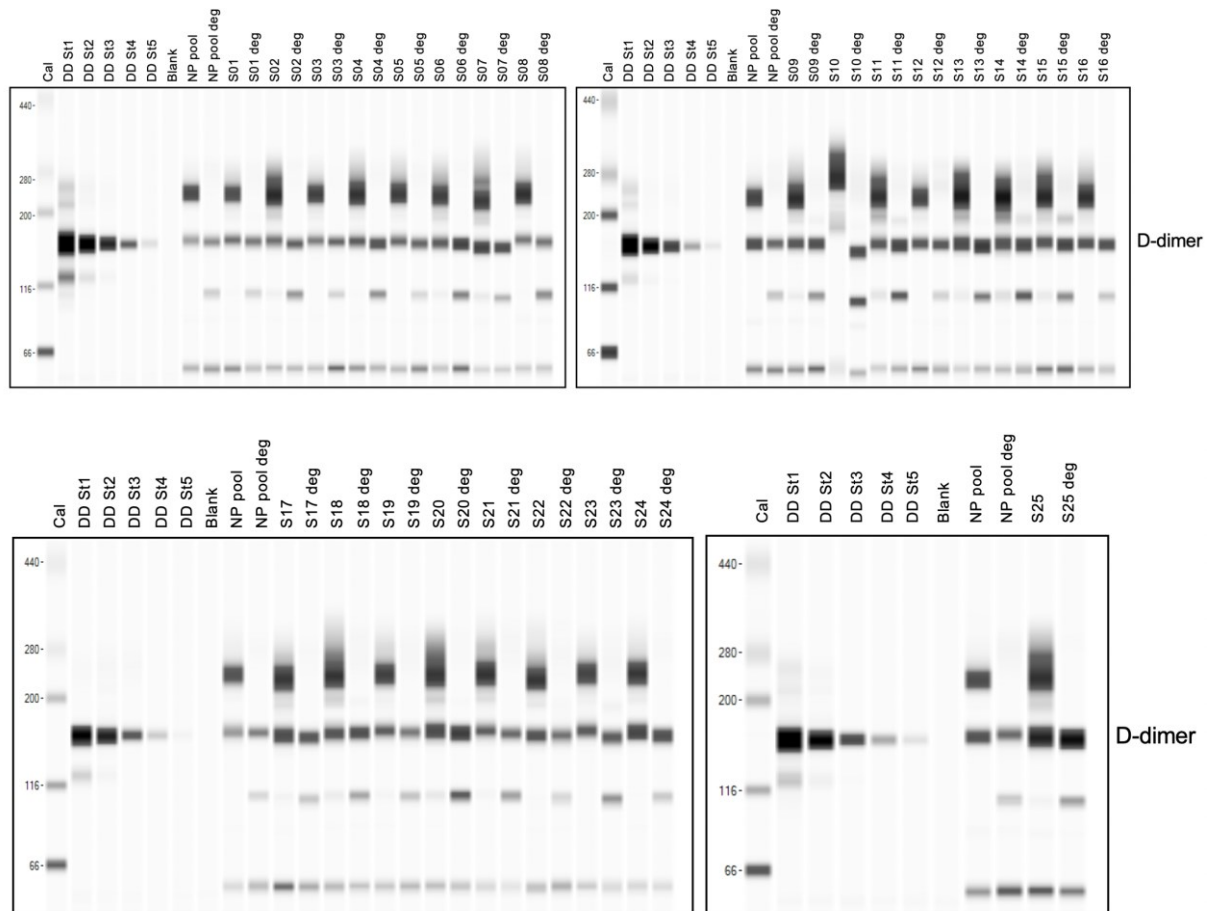


Abbildung 27: Virtuelle Elektrophorese zur Darstellung der Plasmin-Proteolyse auf das D-Dimer-Antigen. Kennzeichnung der Banden mit Molekulargewichtskalibrator, serieller Verdünnung von gereinigtem Fibrin Fragment D-Dimer (DD St1 –St5) blandem, normalem Plasma (NP) Pool und Patienten Proben gekennzeichnet. Das normale Plasma und die Patienten Proben sind jeweils Überstand nach Batroxobin Inkubation und nach Plasminabbau (deg) gekennzeichnet.

Die Banden sind jeweils mit Molekulargewichtskalibrator, serieller Verdünnung von gereinigtem Fibrin Fragment D-Dimer (DD St1 –St5) blandem, normalem Plasma (NP) Pool und Patienten Proben gekennzeichnet. Das normale Plasma und die Patienten Proben sind als jeweils Überstand nach Batroxobin Inkubation und nach Plasminabbau (deg) gekennzeichnet.

Ein Großteil des Fibrin assoziierten Materials in den ursprünglichen Proben vor Plasmin-Proteolyse zeigt in der Elektrophorese, basierend auf einer Immunodetektion mittels nichtreduzierten Gelen, eine größere Molekülgröße als Fibrinfragment D-Dimer. Nach der Plasmin-Proteolyse (die Bande ist mittels „deg“ gekennzeichnet) sind die hochmolekularen Banden verschwunden und das zu Fragment D-Dimer gehörende Signal, mittels Fragment D-Dimer Kalibrator markiert, zeigt eine deutlich erhöhte Intensität. Interessanterweise konnte auch bei Plasmaproben mit, in den mittels Standardtests bestimmten, normwertigen D-Dimer-Spiegel in (normaler Plasma Pool, markiert mittels NP in der Darstellung) eine Bande auf Höhe des D-Dimers nachgewiesen werden. Eine Kalkulation der D-Dimer Konzentration anhand einer seriellen Verdünnung von Fibrinfragment D-Dimer ergab eine höhere D-Dimer-Konzentration als anhand der Ergebnisse von AcuStar D-Dimer und Innovance D-Dimer der zugehörigen Plasma Proben zu erwarten gewesen wäre. Die kalkulierten D-Dimer-Spiegel zeigten sich nur bei Ableitung einer Farbintensität von normalem

Plasma im erwarteten Bereich. Die Ursache dieses unspezifischen Signals konnte nicht geklärt werden.

Zur Erhöhung der Spezifität der Messung wurde daher eine Vorbehandlung der Elektrophorese Proben mit DTE (Dithiothreitol) zur Spaltung der Disulfidbrücken eingesetzt, die Immunodetektion erfolgte mittels Anti- γ -Ketten-Antiserum.

Unten aufgeführt (Abbildung 28) die Ergebnisse der virtuellen Elektrophorese auf der Grundlage des Fluoreszenz-Scannes der Kapillarelektrophorese-Röhrchen nach der Immunodetektion mit polyklonalem Anti- γ -Ketten-Antiserum. Die Banden sind jeweils mit Molekulargewichtskalibrator, serielle Verdünnung des gereinigten Fibrinfragments D- Dimer (DDSt1 - St5), dem Leerwert, den normalen Plasmapool (NP) und den Patientenproben gekennzeichnet.

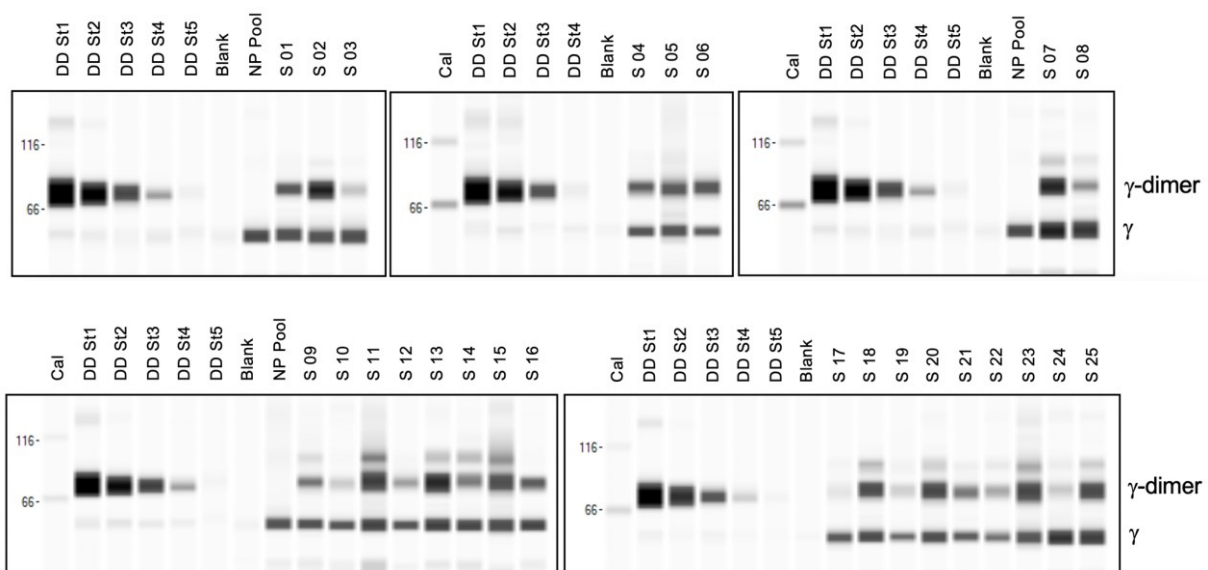
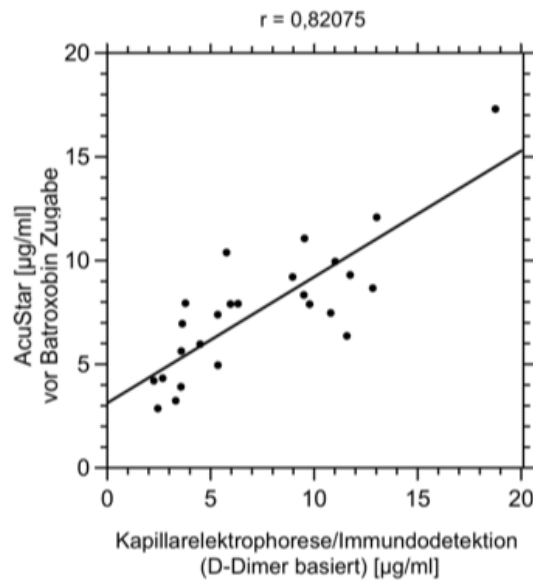


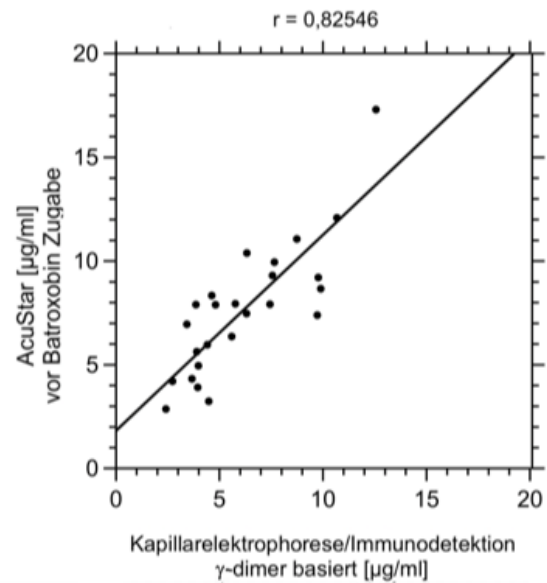
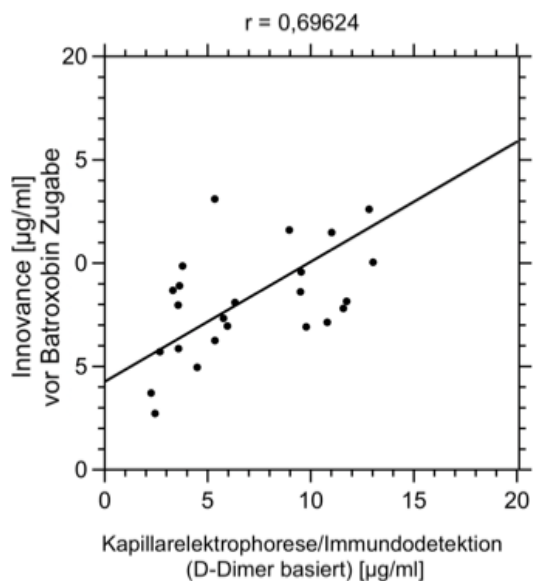
Abbildung 28: Virtuelle Elektrophorese auf der Grundlage des Fluoreszenz-Scannes der Kapillarelektrophorese-Röhrchen nach der Immunodetektion mit polyklonalem Anti- γ -Ketten-Antiserum. Die Banden sind jeweils mit Molekulargewichtskalibrator, serielle Verdünnung des gereinigten Fibrinfragments D- Dimer (DDSt1 - St5), dem Leerwert, den normalen Plasmapool (NP) und den Patientenproben gekennzeichnet.

Hier zeigte sich bei dem Normal Plasma Pool (NP Pool) keine Bande in der gamma-Ketten-Dimer-Position. Dies weist auf das Fehlen von quervernetztem Fibrin in den Proben hin. Bei den gamma-Ketten zeigt sich hingegen eine Bande, proportional zu der Menge an Fibrinfragment D-Dimer welche in den klinischen Plasma Proben gemessen wurde. Im Rahmen dieser Versuchsanordnung konnte letztendlich kein nichtspezifisches Signal abgeleitet werden.

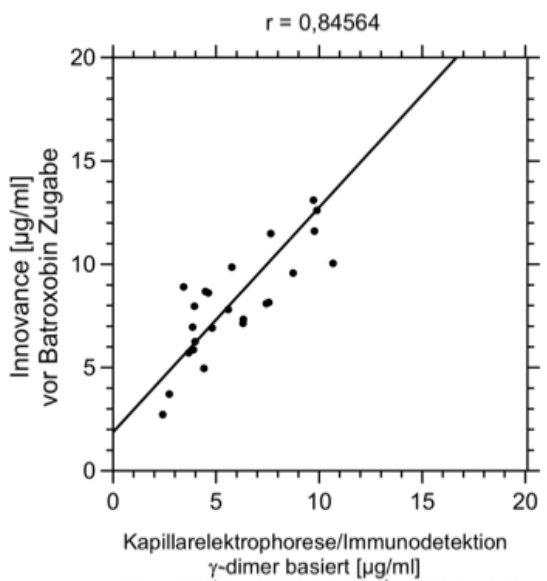
Unten aufgeführt die Korrelation zwischen den Original AcuStar D-Dimer- und Innovance D-Dimer Messungen zu dem elektrophoretischen Nachweis mittels nicht reduzierter Elektrophorese und Nachweis durch Anti-Fibrinogen Antiserum (Abbildung 29 und 31) und reduzierter Elektrophorese und Nachweis mittels Anti-gamma-Ketten Antiserum (Abbildung 30 und 32).

**Abbildung 29:**

Korrelation zwischen den AcuStar D-Dimer- Messungen nach Zentrifugation und Kälteasservierung zu dem elektrophoretischen Nachweis mittels nicht reduzierter Elektrophorese und Nachweis durch Anti-Fibrinogen Antiserum (**Abb. 29**) und reduzierter Elektrophorese und Nachweis mittels Anti-gamma-Ketten-Antiserum (**Abb. 30**).

**Abbildung 30:****Abbildung 31:**

Korrelation zwischen den AcuStar D-Dimer- Messungen nach Zentrifugation und Kälteasservierung zu dem elektrophoretischen Nachweis mittels nicht reduzierter Elektrophorese und Nachweis durch Anti-Fibrinogen Antiserum (**Abb. 31**) und reduzierter Elektrophorese und Nachweis mittels Anti-gamma-Ketten-Antiserum (**Abb. 32**). Es zeigt sich eine niedrige Korrelation der Referenzmethoden und den automatisierten D-Dimer Antigen Testverfahren.

**Abbildung 32**

Sowohl die Ergebnisse des quantitativen Scannes der D-Dimer Bande und der daraus abgeleitetem „normalen Plasma“ D-Dimer Bande des jeweiligen Durchlaufs (Abbildung 29 und 31) als auch die gamma-Ketten-Dimer-Bande (Abbildung 30 und 32) zeigen eine Korrelation mit den mittels AcuStar D-Dimer und Innovance D-Dimer in den Original Plasma Proben gemessenen D-Dimer-Antigen-Spiegeln. Die Korrelation zeigte sich allerdings, im Vergleich zu den mittels Elektrophorese unter reduzierten Bedingungen und gamma-Ketten-Dimer Detektion dargestellten Ergebnissen, geringer ausgeprägt.

Unten aufgeführt die Korrelation der Referenz Methode unter Verwendung von gamma-Dimer Darstellung und den Ergebnissen von AcuStar-Dimer (Abbildung 33) und Innovance D-Dimer (Abbildung 34) der original Plasma-Proben. Die Korrelation zwischen den Ergebnissen von AcuStar D-Dimer und Innovance D-Dimer wird in Abbildung 35 dargestellt.

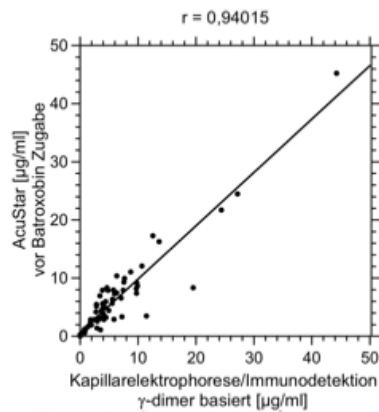


Abbildung 33

Korrelation der Referenz Methode unter Verwendung von gamma-Dimer Darstellung und den Ergebnissen von AcuStar-Dimer (**Abb. 33**) und Innovance D-Dimer (**Abb. 34**) der Plasma-Proben nach Zentrifugation und Kälteasservierung. Die Korrelation zwischen den Ergebnissen von AcuStar D-Dimer und Innovance D-Dimer (**Abb. 35**) dargestellt. Es zeigt sich eine hohe Korrelation der Referenzmethode und den automatisierten D-Dimer Antigen Testverfahren.

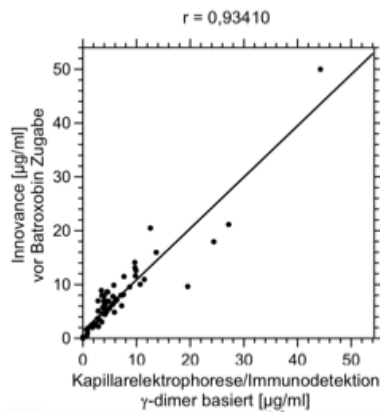


Abbildung 34

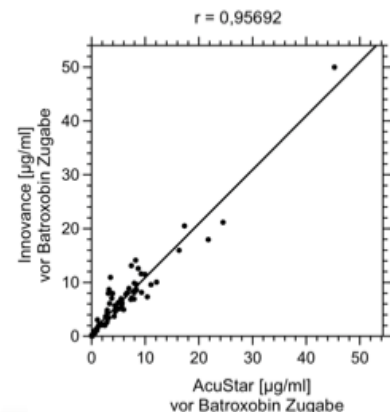


Abbildung 35

Unter der Verwendung des dimerisierten D-Domain-Test zeigte sich bei der Untersuchung von 68 Plasma Proben mit normalem bis stark erhöhten D-Dimer-Spiegeln eine hohe Korrelation mit beiden automatisierten D-Dimer-Antigen-Testverfahren Ein Wert um ca. 1.0 weist auf eine hohe Übereinstimmung der Zahlenwerte zwischen der Referenz Methode und den automatisierten D-Dimer Antigen Testverfahren hin.

Unten aufgeführt (Abbildung 36) die Ergebnisse der wiederholten Analyse von Aliquots von zwei Plasmaproben mittels D-Dimer-Referenzverfahren an zehn Tagen über einen Zeitraum von 4 Wochen mit jeweils 4 Messungen inklusiver alles Verfahrensschritten pro Untersuchungstag.

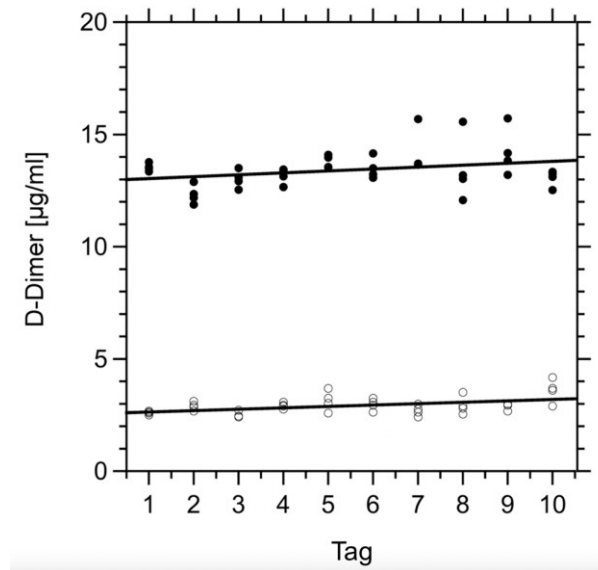


Abbildung 36: Ergebnisse der wiederholten Analyse von Aliquots von zwei Plasmaproben mittels D-Dimer-Referenzverfahren mit Batroxobin Inkubation, Plasmin Proteolyse und Zentrifugierung an zehn Tagen über einen Zeitraum von 4 Wochen mit jeweils 4 Messungen inklusiver aller Verfahrensschritten pro Untersuchungstag. Nur geringe Abweichung der Ergebnisse an den Untersuchungstagen ($13,43$, $SD \pm 0,57$ $\mu\text{g/ml}$ und $2,61 \pm 0,23$ $\mu\text{g/ml}$). Diese lassen sich am ehesten auf die Prozesse des Einfrierens, Lagerns und Auftauens zurückführen.

Die Reproduzierbarkeit des Tests wurde mittels zwei Proben evaluiert. Eine Probe einer Patientin mit Aorten Aneurysma wies stark erhöhte D-Dimer-Werte, die zweite Probe bestand aus gepooltem Plasma von Patientinnen mit leicht erhöhten D-Dimer-Spiegel.

Die Testverfahren wurden an zehn Tagen in jeweils vierwöchigem Abstand angewandt. An jedem Untersuchungstag wurden vier individuelle Messungen, unter Durchführung aller oben genannten Verfahrensschritte, durchgeführt. Hierdurch kann durch die Ergebnisse nicht nur die Variabilität der Elektrophorese und Immundetektion widerspiegelt werden. Sondern die Variabilität des ganzen Untersuchungsganges mit Batroxobin Inkubation, Plasmin Proteolyse und Zentrifugierung. Die obenstehend dargestellte geringe Abweichung der Ergebnisse zwischen den jeweiligen Untersuchungstagen lässt sich am ehesten auf die Prozesse des Einfrierens, Lagerns und Auftauens zurückführen.

Die \pm Standardabweichung der entsprechenden, vierfach durchgeführten Messungen Proben betrug für die jeweiligen Proben $13,43 \pm 0,57$ $\mu\text{g/ml}$ und $2,61 \pm 0,23$ $\mu\text{g/ml}$.

4 DISKUSSION

4.1 Klinische Ergebnisse

Insgesamt zeigt sich in dem Patientenkollektiv mit maligner Grunderkrankung D-Dimer als Marker einer möglichen neoplastischen Grunderkrankung nur mäßig erhöht.

In den verschiedenen D-Dimer Testverfahren zeigt sich eine numerische Varianz. Auch die immer wieder kommunizierte, wichtige Rolle der Präanalytik in der Labormedizin, insbesondere in der Hämostaseologie, wurde in der vorliegenden Arbeit erneut gezeigt. Durch doppelte Zentrifugation wurden nahezu thrombozytenfreie Einfrierproben generiert. Hierdurch sollte eine potentielle in-vitro Gerinnungsaktivierung verhindert werden.

Dies spiegelt sich in den Ergebnissen wider: Sowohl im direkten Vergleich des Innovance D-Dimer-Testverfahrens vor und nach Zentrifugation und Kältetasservierung als auch in allen anderen D-Dimer-Testverfahren zeigt sich eine gute Korrelation mit den D-Dimer Werten in den Verlaufsmessungen. Bei dem direkten Vergleich der Innovance Verfahren zeigen sich allerdings in den Verlaufsmessungen, vor allem bei hohen Messerergebnissen, deutliche niedrigere Werte.

Die Bestimmung der Fibrinogenspaltprodukte mittels automatisiertem Testverfahren, welches heute in der klinischen Praxis kaum mehr Anwendung findet, aber die gesamten Fibrinogen- und Fibrinabbauprodukte erfasst zeigt in den automatisierten Tests ebenfalls eine hohe Korrelation.

In der Zusammenschau mit klinischen Einflüssen wie Tumorart, Metastasierung und tumorspezifische Therapie zeigen die Fibrinogenspaltprodukte gemeinsam mit den erhobenen D-Dimer- und Fibrinogen-Werten eine vermehrte Gerinnungsaktivierung und Fibrinolyse. Bei hochnormalen Fibrinogenspiegeln steht hier das Risiko eines thromboembolischen Risikos im Vergleich zu einer Blutungsdiathese im Vordergrund. Bei der niedrigen Anzahl an eingeschlossenen Patientinnen kann statisch kein klarer Parameter als individueller Trigger für eine gesteigerte Gerinnungsaktivierung abgegrenzt werden.

4.2 Vergleich der automatisierten D-Dimer-Testverfahren

Die dargestellten Ergebnisse der Standardverfahren zur D-Dimer-Detektion zeigen erneut, die bereits vorherbeschrieben, mäßige numerische Übereinstimmung der Ergebnisse verschiedener D-Dimer-Testverfahren.

Durch die abnehmende Korrelation der verschiedenen D-Dimer-Testverfahren mit steigender D-Dimer-Erhöhung stellt sich hier vor allem bei hohen D-Dimer-Werten die Frage nach der Genauigkeit der Testverfahren. Durch die vorliegenden Arbeiten, welche eine sichere Verwendung eines altersadaptierten, statistisch plausiblen D-Dimer-Grenzwert für Patienten über 50 Jahren ohne Abnahme der Sensitivität erlauben [45], rückt die von in dieser Arbeit mit zunehmender D-Dimer-Elevation beschriebene Diskrepanz bei hohen D-Dimer-Werten in den Vordergrund.

Genau in diesem Messbereich kann eine mangelnde Vergleichbarkeit zu einer in der klinischen Praxis resultierenden falschen, potentiell patientenschädigenden, Behandlungsentscheidungen führen.

4.3 Referenzverfahren als mögliche Basis für eine gemeinsame Kalibrierung

Bei den verschiedenen D-Dimer-Test werden unterschiedliche Eichmaterialien verwendet und Tests reagieren unterschiedlich mit verschiedenen D-Dimer-haltigen Fibrinderivaten.

Durch die verschiedenen D-Dimer Antigentests nachgewiesene gemeinsame Struktur ist die der dimerisierten-Fibrin-D-Domain. Durch die oben genannten Versuche ist es gelungen, die tatsächliche Menge von D-Dimer-Antigen, zunächst als Fibrinabbauprodukt D-Dimer nach Plasmin-Proteolyse der Fibrin-Derivate, und im weiteren Verlauf als gamma-Ketten-Dimer aus Fibrin-Fragment-Dimer, zu erfassen.

Hierdurch kann die wirkliche D-Dimer-Menge in den Proben gemessen und dann die Messmethode unter Verwendung der Plasmaproben mit dann bekannter Konzentration an D-Dimer-Antigen. kalibriert werden.

4.3.1 Fibrinogen unabhängiges Verfahren

Obwohl alle D-Dimer-Messverfahren fibrinspezifische molekulare Strukturen, welche durch die Bildung von dimerisierten-D-Domänen gebildet werden, nachweisen, unterscheiden sich die Tests im Bezug auf die Reaktivität mit Fibrinverbindungen unterschiedlicher Größe [49] [54].

Einige der Testverfahren reagieren hauptsächlich mit hoch molekularen Fibrin-Verbindungen, welche viele D-Dimer-Einheiten enthalten. Andere Tests detektieren führend Fibrinfragment D-Dimer und andere kleine Fibrinsspaltprodukte.

In Ausnahmefällen detektieren einige der Messverfahren hoch molekulare Fibrinverbindungen mit scheinbar völlig fehlendem Nachweis von Fibrinfragment-D-Dimer.

Seitdem die dimerisierte D-Domain oder D-Dimer-Einheit die einheitliche, durch alle D-Dimer-Testverfahren nachgewiesene Struktur ist, konnte durch die aktuelle Untersuchung unter Verwendung der Kapillarelektrophorese-Methode, eine verlässliche Methode zum quantitativen Nachweis dieser D-Dimer-Einheiten in biologischen Proben, unabhängig von der Molekülgröße der Fibrinverbindungen die die dimerisierte D-Domäne enthalten, gezeigt werden.

4.3.2 Plasmin-Proteolyse

Dies wurde durch die Verwendung einer automatisierten Gelelektrophorese mit einer intrakapillären Immunodetektion realisiert. Diese zeigte sich, bezüglich der Reproduzierbarkeit der Verfahren, den bis dahin bekannten Methoden mittels herkömmlicher Gelelektrophorese und Immunoblotting auf Nitrocellulose Membran deutlich überlegen.

Das Verfahren basiert auf dem Grundprinzip der „Homogenisierung“ der durch ausführlichen Plasminabbau nachgewiesenen Fibrinverbindungen [53]. Dies führt, wie von Kronberg et al. vorgeschlagen, letztendlich zum reinen Fibrinfragment D-Dimer

als Endprodukt. Das hierdurch gewonnene, gereinigte Fibrinfragment D-Dimer kann zur Kalibrierung verwendet werden.

4.3.3 Reduzierte Elektrophorese zur γ -Ketten-Detektion

Um die Immunodetektion unabhängig von monoklonalen Anti-D-Dimer-Antikörpern zu gestalten wurden zunächst polyklonale Antiseren gegen Fibrinogen zur Immunodetektion verwendet. Hierbei zeigte sich die Reproduzierbarkeit des Messverfahrens durch eine unspezifische Bande auf der Position von D-Dimer auch bei Proben von gesunden Probanden gestört. Daraufhin wurden die Proben vorab mittels DTE (Dithiothreitol) behandelt. Durch DTE, ein niedermolekulares Redoxreagenz, kommt es zur Reduktion von Verbindungen in Proteinen. In diesem Falle konnte durch die Verwendung von DTE eine Reduktion der Schwefelverbindungen in den Proben erfolgen. Des Weiteren erfolgte durch einen Antikörper gegen dimerisierten γ -Ketten der Nachweis von dimerisierten γ -Ketten. Nach entsprechender Vorbehandlung zeigte sich in diesem Test keine Interferenz-Bande in dem Plasma der gesunden Probanden. In den Originalproben zeigte sich die Konzentration der γ -Ketten direkt proportional zu der Konzentration der dimerisierten D-Domänen. Als Kalibrator wurde jeweils gereinigtes Fibrinfragment D-Dimer verwendet.

4.4 Übertragung der Ergebnisse des Referenzverfahrens auf die automatisierten Testverfahren.

Die aktuell verwendeten Kalibratoren für D-Dimer-Messverfahren werden aus in-vitro-Zubereitungen von Fibrinabbauprodukten und gepoolten Plasmaproben gewonnen. Bei diesen Kalibratoren zeigt sich hierdurch, als auch durch Herstellung, Lagerung und Rekonstitution, eine hohe Variabilität von Charge zu Charge. Versuche zur Herstellung eines lyophilisierten internationalen Standards für D-Dimer unter Verwendung eines physiologischen Arrays aus Fibrinverbindungen verliefen bis jetzt frustan. Die Kalibratoren wurden unter Verwendung von vorherigen Chargen verglichen und hierdurch quasi „quer kalibriert“. Dadurch konnte es von Charge zu Charge zu einer Verschlechterung der Kalibrierung kommen. Um trotz dieser Variabilität der Kalibratoren einen oberen Normalwert des D-Dimers von 0,5 $\mu\text{g/ml}$, dem etablierten Grenzwert zum Ausschluss eines thrombembolischen Geschehens, zu erreichen wurde die Kalibrierung oft angepasst. Durch diese Anpassungen in der Kalibrierung kommt es oft, selbst bei daraus resultierenden ähnlichen Werten im niedrignormalen Bereich, beim Anstiegsverhalten der Kalibrierungskurve zu starken Varianzen. Hieraus resultieren starke Diskrepanzen in Proben von Patienten mit erhöhten D-Dimer Werten wie disseminierter intravasaler Gerinnung oder anderen Erkrankungen welche zu einer ausgeprägten D-Dimer Erhöhung führen können.

Durch das hier benutzte Verfahren ergibt sich die Möglichkeit die D-Dimer Werte den einzelnen Kalibratoren individuelle zuzuordnen. Unabhängig von dem Bias, induziert von den verschiedenen monoklonalen D-Dimer Antikörpern und dem Gebrauch von potentiell fehlerhaften „alten“ Kalibratoren. Durch die nun bestehende Unabhängigkeit des Verfahrens von den jeweiligen spezifischen monoklonalen D-Dimer-Antikörpern kann es für alle Test spezifischen Kalibratoren verwendet werden. Den Herstellern ist es damit möglich, weiterhin die zu dem jeweiligen individuellen Messverfahren am besten passenden, spezifischen Kalibrierung zu verwenden.

Die meisten der Testverfahren, welche aktuell zum Ausschluss eines thromboembolischen Geschehens, einem der Hauptverwendungszwecke von den D-Dimer-Antigen-Tests im klinischen Alltag, verwendet werden basieren auf einer Kalibrierung die ursprünglich von Amira et al. durchgeführt wurde [55]. Hier wurde ein ELISA Test und Fibrinfragment D-Dimer als Kalibrator verwendet und die Messungen von mehreren klinischen Plasma Proben verglichen. Basierend auf dieser Kalibrierung, wurde ein Cut-off-Wert von 0,5 µg/ml zum Ausschluss eines thromboembolischen Geschehens festgelegt [56, 57]. Dieser ergibt sich durch die Menge an Fibrinogen, welche zur Herstellung von Fibrinfragment D-Dimer, der Fibrinogen Äquivalent Einheit (FEU), benötigt wird. Die aktuellen Ergebnisse zeigen einen hohen Grad der numerischen Übereinstimmung mit zwei der automatischen D-Dimer-Messverfahren neuester Generation. Hierdurch zeigt sich der cut-off-Wert für ein thromboembolisches Geschehen, zu mindestens für diese beiden Messverfahren, valide.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorgestellte Methode zur Messung von D-Dimer Antigen die Kalibrierung der testspezifischen Kalibratoren ermöglicht. Dies führt zu übertragbaren Ergebnissen zwischen verschiedenen D-Dimer-Antigen-Messverfahren, da die dimerisierte D-Domäne die übereinstimmende gemeinsame nachgewiesene Antigenstruktur ist. Hierdurch werden Probleme im Rahmen der Variabilität der Chargen und der Instabilität der Kalibrationspräparate vermieden.

Die Hersteller können weiterhin die für individuellen Testverfahren am besten geeigneten Kalibratoren verwenden und die Variabilität von Charge zu Charge wird durch die Anpassung des D-Dimer-Antigenspiegels mit Hilfe des Messverfahrens mit dimerisierten D-Domänen beseitigt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Begleiterkrankungen maligner Grunderkrankung, sogenannte paraneoplastische Syndrome, treten zunehmen als behandlungsbedürftig in den Vordergrund. Hierzu zählt die neoplastische Gerinnungsaktivierung. Eine venöse Thrombose oder Lungenembolie ist häufig das erste Zeichen einer Krebserkrankung. Insbesondere Adenokarzinom-Zellen führen zu einer Gerinnungsaktivierung.

Der Nachweis von Fibrinderivaten im Blut ist sowohl bei der Diagnose als auch bei der Verlaufsbeobachtung maligner Erkrankungen hilfreich.

Der am häufigsten eingesetzte Aktivierungsparameter der Gerinnung ist D-Dimer-Antigen. D-Dimer-Antigen entsteht durch kovalente Verbindung von D-Domänen benachbarter Fibrinmonomer-Einheiten des Fibrinkomplexes durch Faktor XIIIa, gefolgt von einer Fibrin-Proteolyse durch Plasmin. Die Messung von D-Dimer erfolgt mittels spezifischer monoklonaler Antikörper. Hierfür gibt es zahlreiche verschiedene D-Dimer-Testverfahren. Zur Kalibrierung dieser Testverfahren werden unterschiedliche Eichverfahren verwendet, die mit verschiedenen D-Dimer-haltigen Fibrinderivaten reagieren. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die zahlreichen D-Dimer-Testverfahren trotz insgesamt guter Korrelation sehr unterschiedliche numerische Ergebnisse liefern. D-Dimer-Antigen findet sich im Blut in sehr unterschiedlicher Form, von hochmolekularen Fibrinkomplexen, bis zu niedermolekularen Fibrinabbauprodukten. Das kleinste Fibrinabbauprodukt dieser Art ist Fibrinfragment D-Dimer. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass manche D-Dimer-Test bevorzugt hochmolekulare Fibrinderivate erfassen, andere besser mit niedermolekularen Fibrinabbauprodukten reagieren.

Die vorliegende Arbeit hat daher zwei Ziele:

1. Messung von D-Dimer und Fibrinogen/Fibrin-Abbauprodukten im Blut von Patientinnen mit metastasierenden gynäkologischen Tumoren als Basis für eine zukünftige Anwendung als Verlaufsparemeter (Tumormarker)
2. Verwendung der gewonnenen Plasmaproben zur Validierung einer antikörper-unabhängigen Messmethode für D-Dimer-Antigen, bei der die in den Blutproben vorhandenen D-Dimere durch Plasmin-Proteolyse sämtlich in Fibrinfragment D-Dimer umgewandelt werden.

Als Patientenkollektiv wurde in Zusammenarbeit mit der Frauenklinik der Universitätsmedizin Mannheim Patientinnen mit Mamma- und Ovarialkarzinom ausgewählt. Hierbei wurde Alter, Größe, Gewicht, die Tumorerkrankung, deren Erstdiagnose sowie initiale TNM Klassifikation und bisher erfolgte Therapie erfasst. Des Weiteren umfasste die Anamnese gerinnungsspezifische Vordiagnosen und Dauermedikation. Insgesamt konnten so über einen Zeitraum von 7 Monaten 60 Patientinnen eingeschlossen werden.

Der Nachweis der Gerinnungsaktivierung erfolgte in den gesammelten Proben initial mittels D-Dimer Bestimmung. Hierfür wurde das Innovance D-Dimer Testverfahren verwendet. Im nächsten Schritt wurde das vollautomatischen Gerinnungsanalysegerätes Coapresta 2000 anhand des D-Dimer Testverfahrens evaluiert. Weitere Gerinnungsparameter wie FDP, Fibrinogen, aPTT und PT wurden

ebenfalls mittels dieses Gerätes bestimmt und mit den klinischen Parametern der Patientinnen verglichen.

Anschließend erfolgte in ausgewählten Proben die Messung von D-Dimer Antigen anhand einer potentiellen Referenzmethode. Diese wurde im Rahmen eines übergreifenden Projektes durch das Team der wissenschaftlichen Arbeitsgruppe des Gerinnungszentrums entwickelt. Das Referenzverfahren basiert auf der Entfernung von Fibrinogen durch Batroxobin und Homogenisierung der verbleibenden, nicht an der Gerinnung beteiligten, Fibrin- und Fibrinogenderivate durch Plasminproteolyse. Hiernach erfolgt ein D-Dimer Antikörper unabhängiges, elektrophoretisches Verfahren mit Immunodetektion zur Identifizierung und Quantifizierung von D-Dimer Antigen.

Die verwendeten automatisierten Testverfahren zur D-Dimer Bestimmung (Innovance, Coapresta 2000 und AcuStar) wurden mit den Ergebnissen des Referenzverfahrens verglichen.

Es zeigt sich, dass sich bei nahezu allen Patientinnen mit metastasierenden gynäkologischen Tumoren erhöhte Spiegel von D-Dimer-Antigen finden, was auf eine chronische intravasale Gerinnung hinweist. Gleichzeitig finden sich erhöhte Werte auch für Fibrinogen/Fibrin-Abbauprodukte insgesamt.

Unter Berücksichtigung der klinischen Parameter ergibt sich ein Anhalt für eine erhöhte Gerinnungsaktivierung bei den Patientinnen mit Ovarialkarzinom im Vergleich zu den an Mammakarzinom erkrankten Patientinnen. Dieser Trend zur vermehrten Gerinnungsaktivierung ergibt sich ebenfalls bei Patientinnen mit metastasiertem Tumorleiden im Vergleich zu nicht metastasiertem Tumorleiden.

Im Vergleich der verschiedenen automatisierten D-Dimer Testverfahren zeigten sich bei hohem Grad der Korrelation eine numerische Varianz.

Bei der Untersuchung der potentiellen Referenzmethode zeigten sich mehrere wichtige Ergebnisse: D-Dimer Antigen nimmt an der Gerinnung nicht teil, bei Entfernung des Fibrinogens aus den Proben durch Umwandlung in Fibrin nach Zugabe des Thrombin-ähnlichen Schlangengift-Enzyms Batroxobin tritt kein Verlust von D-Dimer-Antigen ein. Es ist daher davon auszugehen, dass D-Dimer zumindest bei dem hier untersuchten Probenmaterial tatsächlich als Fibrinabbauprodukt zu interpretieren ist und dimerisierte D-Domänen von "löslichem Fibrin" nicht erfasst werden. Durch die verwendete Plasmin-Protolyse gelingt es tatsächlich, das komplette D-Dimer Antigen in Fibrinfragment D-Dimer umzuwandeln. Fibrinfragment D-Dimer kann mittels Kapillarelektrophorese und insitu-Immundetektion quantitativ gemessen werden, wobei sich zeigte, dass die Trennung und Detektion nach Spaltung der Schwefelbrücken mit Dithiothreitol und Immundetektion mittels eines Antikörpers, der nicht die komplette D-Domäne, sondern nur die kovalent verbundenen („dimerisierten“) gamma-Ketten des Fibrinderivats erfassen, eine bessere Erfassung von D-Dimer-Antigen ergibt.

Die Methode erlaubt es, den tatsächlichen Gehalt an D-Dimer-Antigen in Eichmaterial und Plasmaproben für Vergleichsmessungen von D-Dimer Testverfahren zu ermitteln.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer Statistics, 2017*. CA Cancer J Clin, 2017. **67**(1): p. 7-30.
2. Trousseau, A., *Phlegmasia alba dolens*. Clinique Medicale de l'Hotel-Dieu de Paris, 1865. **Vol. 4.(3)**: : p. 654–712.
3. Varki, A., *Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms*. Blood, 2007. **110**(6): p. 1723-9.
4. Dammacco, F., et al., *Cancer-related coagulopathy (Trousseau's syndrome): review of the literature and experience of a single center of internal medicine*. Clin Exp Med, 2013. **13**(2): p. 85-97.
5. Cronin-Fenton, D.P., et al., *Hospitalisation for venous thromboembolism in cancer patients and the general population: a population-based cohort study in Denmark, 1997-2006*. Br J Cancer, 2010. **103**(7): p. 947-53.
6. Chakraborty, R., et al., *Venous thromboembolism risk with contemporary lenalidomide-based regimens despite thromboprophylaxis in multiple myeloma: A systematic review and meta-analysis*. Cancer, 2020.
7. Lee, A.Y., et al., *Incidence, risk factors, and outcomes of catheter-related thrombosis in adult patients with cancer*. J Clin Oncol, 2006. **24**(9): p. 1404-8.
8. Khorana, A.A., *Cancer and coagulation*. Am J Hematol, 2012. **87 Suppl 1**(Suppl 1): p. S82-7.
9. Rickles, F.R. and A. Falanga, *Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer*. Thromb Res, 2001. **102**(6): p. V215-24.
10. Helen K. Chew, M.T.W., MD; Danielle Harvey, PhD; Hong Zhou, PhD; Richard H. White, MD, *Incidence of Venous Thromboembolism and Its Effect on Survival Among Patients With Common Cancers*. 2006.
11. Kroegel, C. and A. Reissig, *Principle mechanisms underlying venous thromboembolism: epidemiology, risk factors, pathophysiology and pathogenesis*. Respiration, 2003. **70**(1): p. 7-30.
12. Diehm, C., T. Noppeney, and H. Nüllen, *Epidemiologie der venösen Thromboembolie*. Gefässchirurgie, 2012. **17**(4): p. 275-279.
13. Ohlmeier, C., et al., *[Estimating the incidence of venous thromboembolism (VTE) using various types of routine data of the German healthcare system]*. Z Evid Fortbild Qual Gesundhwes, 2018. **139**: p. 46-52.
14. Heit, J.A., et al., *Predictors of survival after deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based, cohort study*. Arch Intern Med, 1999. **159**(5): p. 445-53.
15. Lippi, G. and M. Franchini, *Pathogenesis of venous thromboembolism: when the cup runneth over*. Semin Thromb Hemost, 2008. **34**(8): p. 747-61.
16. Bagot, C.N. and R. Arya, *Virchow and his triad: a question of attribution*. Br J Haematol, 2008. **143**(2): p. 180-90.
17. Verlag, G.T., *I Care - Pflege*. 2015, Stuttgart. 3402.
18. Tuschy, B., et al., *Clinical aspects of intraoperative radiotherapy in early breast cancer: short-term complications after IORT in women treated with low energy x-rays*. Radiat Oncol, 2013. **8**: p. 95.
19. Ruano-Ravina, A., P. Cantero-Munoz, and A. Eraso Urien, *Efficacy and safety of intraoperative radiotherapy in breast cancer: a systematic review*. Cancer Lett, 2011. **313**(1): p. 15-25.

20. Ghoncheh, M., Z. Pournamdar, and H. Salehiniya, *Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World*. Asian Pac J Cancer Prev, 2016. **17**(S3): p. 43-6.
21. Koch-Institut, R., *Krebs in Deutschland für 2015/2016*. Zentrum für Krebsregisterdaten, 2015. **12. Ausgabe**
22. Sharma, R., *Breast cancer incidence, mortality and mortality-to-incidence ratio (MIR) are associated with human development, 1990-2016: evidence from Global Burden of Disease Study 2016*. Breast Cancer, 2019. **26**(4): p. 428-445.
23. Global Burden of Disease Cancer, C., et al., *Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study*. JAMA Oncol, 2018. **4**(11): p. 1553-1568.
24. Sun, Y.S., et al., *Risk Factors and Preventions of Breast Cancer*. Int J Biol Sci, 2017. **13**(11): p. 1387-1397.
25. http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Versio_4.0/LL_Mammakarzinom_Langversion_4.0.pdf.
26. *Familial Breast Cancer: classification, care and managing breast cancer and related risks in people with a family history of breast cancer*. . 2015.
27. Mavaddat, N., et al., *Incorporating tumour pathology information into breast cancer risk prediction algorithms*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(3): p. R28.
28. Vuong, D., et al., *Molecular classification of breast cancer*. Virchows Arch, 2014. **465**(1): p. 1-14.
29. Hoon Tan, P., et al., *The 2019 WHO classification of tumours of the breast*. Histopathology, 2020.
30. Shea, E.K.H., V.C.Y. Koh, and P.H. Tan, *Invasive breast cancer: Current perspectives and emerging views*. Pathol Int, 2020.
31. Elston, C.W. and I.O. Ellis, *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up*. Histopathology, 2002. **41**(3A): p. 154-61.
32. Joensuu, H., S. Toikkanen, and P.J. Klemi, *DNA index and S-phase fraction and their combination as prognostic factors in operable ductal breast carcinoma*. Cancer, 1990. **66**(2): p. 331-40.
33. Jukkola, A., et al., *c-erbB-2 positivity is a factor for poor prognosis in breast cancer and poor response to hormonal or chemotherapy treatment in advanced disease*. Eur J Cancer, 2001. **37**(3): p. 347-54.
34. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
35. Bast, R.C., Jr., B. Hennesy, and G.B. Mills, *The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(6): p. 415-28.
36. Dempfle, C.E., *Bestimmung des D-Dimer-Antigens in der klinischen Routine*. Deutsches Aerzteblatt, 2005. **102**: p. 428-432.
37. Adam, S.S., N.S. Key, and C.S. Greenberg, *D-dimer antigen: current concepts and future prospects*. Blood, 2009. **113**(13): p. 2878-87.
38. Gaffney, P.J., *Distinction between fibrinogen and fibrin degradation products in plasma*. Clin Chim Acta, 1975. **65**(1): p. 109-15.
39. Reber, G., et al., *A new, semi-quantitative and individual ELISA for rapid measurement of plasma D-dimer in patients suspected of pulmonary embolism*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1995. **6**(5): p. 460-3.

40. Wahlander, K., et al., *Comparison of various D-dimer tests for the diagnosis of deep venous thrombosis*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1999. **10**(3): p. 121-6.
41. Wells, P.S., et al., *Use of a clinical model for safe management of patients with suspected pulmonary embolism*. Ann Intern Med, 1998. **129**(12): p. 997-1005.
42. Wells, P.S., et al., *Evaluation of D-dimer in the diagnosis of suspected deep-vein thrombosis*. N Engl J Med, 2003. **349**(13): p. 1227-35.
43. Wells, P.S., et al., *Does this patient have deep vein thrombosis?* Jama, 2006. **295**(2): p. 199-207.
44. Haase, C., et al., *Age- and sex-dependent reference intervals for D-dimer: evidence for a marked increase by age*. Thromb Res, 2013. **132**(6): p. 676-80.
45. Douma, R.A., et al., *Potential of an age adjusted D-dimer cut-off value to improve the exclusion of pulmonary embolism in older patients: a retrospective analysis of three large cohorts*. BMJ, 2010. **340**: p. c1475.
46. Kahler, Z.P. and J.A. Kline, *Standardizing the D-dimer Assay: Proposing the D-dimer International Managed Ratio*. Clin Chem, 2015. **61**(5): p. 776-8.
47. Brenner, B., et al., *Quantitation of venous clot lysis with the D-dimer immunoassay during fibrinolytic therapy requires correction for soluble fibrin degradation*. Circulation, 1990. **81**(6): p. 1818-25.
48. Gron, B., et al., *Characterization of fibrinogen/fibrin derivatives isolated from normal and fibrinaemic plasma and serum using paramagnetic particles coated with a monoclonal antibody (mAb) to D-dimer*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1993. **4**(3): p. 447-54.
49. Dempfle, C.E., et al., *The Fibrin Assay Comparison Trial (FACT): evaluation of 23 quantitative D-dimer assays as basis for the development of D-dimer calibrators*. FACT study group. Thromb Haemost, 2001. **85**(4): p. 671-8.
50. Elms, M.J., et al., *Automated determination of cross-linked fibrin derivatives in plasma*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1993. **4**(1): p. 159-64.
51. Hart, R., et al., *The detection of D-dimer in plasma by enzyme immunoassay: improved discrimination is obtained with a more specific signal antibody*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1994. **5**(2): p. 227-32.
52. Adema, E. and U. Gebert, *Pooled patient samples as reference material for D-Dimer*. Thromb Res, 1995. **80**(1): p. 85-8.
53. Kornberg, A., C.W. Francis, and V.J. Marder, *Plasma crosslinked fibrin polymers: quantitation based on tissue plasminogen activator conversion to D-dimer and measurement in normal and patients with acute thrombotic disorders*. Blood, 1992. **80**(3): p. 709-17.
54. Dempfle, C.E., *D-dimer assays: the current status and new assay technologies*. Thromb Res, 2006. **118**(5): p. 569-71.
55. Amiral, J., et al., *Reactivity of D-dimer assays with the fibrinogen--fibrin split products generated by thrombolytic agents*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1990. **1**(4-5): p. 525-30.
56. Bounameaux, H., et al., *Diagnostic value of plasma D-dimer in suspected pulmonary embolism*. Lancet, 1988. **2**(8611): p. 628-9.
57. Bounameaux, H., et al., *Laboratory diagnosis of pulmonary embolism: value of increased levels of plasma D-dimer and thrombin--antithrombin III complexes*. Biomed Pharmacother, 1989. **43**(5): p. 385-8.

6 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Fürner, Paul
Geburtsdatum: 06. Januar 1984
Geburtsort: Berlin

SCHULISCHER WERDEGANG

26.06.2003 Abitur Fritz Erler Wirtschaftsgymnasium Pforzheim

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2009/2010. Beginn des Studiums (Humanmedizin)
An der Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg, Medizinische
Fakultät Mannheim
13.09.2011 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)
2011 – 2015 Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums
11.12.2015 Ärztliche Prüfung (Note: gut)

BERUFLICHER WERDEGANG

2003 - 2004 Freiwillig soziales Jahr als Rettungssanitäter beim DRK
2004 - 2009 Vollzeittätigkeit Rettungsassistent
2016 - 2021 Weiterbildungsassistent an der 1. Medizinischen Klinik der
Universitätsmedizin Mannheim (Prof. Borggreffe, Prof
Dürschmied)
Seit 2023 Funktionsoberarzt Robert Bosch Krankenhaus, Stuttgart
Internistische Intensivstation
2018 Zusatzbezeichnung Notfallmedizin
2022 Zusatzbezeichnung spezielle internistische Intensivmedizin

7 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med. Carl-Erik Dempfle, meinem Doktorvater, der mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Für die zuverlässige, kontinuierliche und sehr geduldige Betreuung sowie auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank geht an meine Betreuerin Frau PD Dr. med. Saskia Spaich für die sehr intensive und persönliche Betreuung meiner Arbeit. Ihr großes persönliches Engagement und Interesse und ihre ständige Hilfsbereitschaft während der Rekrutierung der Patientinnen und bei der Auswertung haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren möchte ich mich beim gesamten Team des Gerinnungszentrums Mannheim, insbesondere Herrn Marc Müller, für die Unterstützung und Durchführung der Versuche und die Unterstützung während der gesamten Arbeit bedanken.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meiner Frau Dr. med. Eva Fürner für die unermüdliche, liebevolle Unterstützung im täglichen Alltag mit unserer Familie bedanken. Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern. Ohne die umfassende Hilfe, große Rücksichtnahme und moralische Unterstützung wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.