

Hämostaseologische Diagnostik bei Thrombosepatienten

Diagnostics of Haemostasis in Thrombosis Patients

W. Reiter^{1,2}, B. Pohl^{1,3}, P. Brauer^{1,4}, B. Steinbrückner^{1,5}, F. Keller¹

Zusammenfassung

Plasmen von 259 Thrombosepatienten wurden auf Gerinnungsstörungen im Sinne einer Hyperkoagulabilität untersucht. Physiologische Inhibitoren wurden ebenso bestimmt wie Komponenten des fibrinolytischen Systems und Lupus-Antikoagulantien. Es fanden sich in 1 % der Patienten ein schwerer und in 8 % ein leichter Antithrombin III (AT III)-Mangel. Protein C war in 4 % leicht und in 2 % deutlich vermindert, freies Protein S in 13 % bzw. 10 %. In 5 % fanden sich Lupusantikoagulantien, 2 % der Patienten hatten einen milden und 1 % einen schweren Plasminogenmangel. Die Freisetzung von tissue plasminogen activator (t-PA) im Stauversuch war bei 21 % leicht und bei 7 % deutlich vermindert. Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI) war in keinem Fall stark und in 29 % leicht erhöht. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit venösen Thrombosen und solchen mit zerebralen Insulten und ebenso keine zwischen Patientengruppen jünger und älter als 40 Jahre. Bei 16 % unserer Patienten fanden wir eine schwere und bei 20 % eine leichte Anomalie. Bei 64 % waren alle untersuchten Parameter im Referenzbereich. Wegen möglicher therapeutischer Konsequenzen empfehlen wir eine hämostaseologische Untersuchung bei allen Thrombosepatienten.

Schlüsselwörter

Thrombose – Hyperkoagulabilität – Antithrombin III – Protein C – Protein S – Lupus-Antikoagulantien – Plasminogen – tissue-Plasminogenaktivator – Plasminogen-Aktivator-Inhibitor

Summary

Plasma samples of 259 patients suffering from thromboembolic events have been analysed for disorders of the coagulation system leading to hypercoagulability. The parameters determined have been physiological inhibitors, lupus anticoagulation inhibitors and components of the fibrinolytic system. In 1 % of the patients investigated we detected a severe and in 8 % a mild antithrombin III deficiency. Protein C was diminished severely in 2 % and mildly in 4 %, free protein S in 10 % and 13 %, respectively. 5 % were positive for lupus anticoagulants. 1 % of our patients had a severe and 2 % a mild plasminogen deficiency. The release of tissue plasminogen activator (t-PA) after 10 minutes of venous congestion was severely reduced in 7 % and mildly in 21 %. The plasminogen activator inhibitor (PAI) was never severely raised but slightly in 29 %. There were no significant differences between patients with venous thromboses and those with cerebral insults or between patient groups younger or older than 40 years. Overall, we detected severe disorders in 16 % of our patients and a mild disorder in 20 %. In 64 % all parameters investigated were within the reference ranges. Concerning the therapeutical consequences, we suggest a haemostaseological examination in all patients suffering from thromboses.

Key Words

thrombosis – blood coagulation disorders – antithrombin III – protein C – protein S – lupus anticoagulation inhibitor – plasminogen – plasminogen activator, tissue-type – plasminogen activator inhibitor

¹ Zentrallaboratorium der Medizinischen Universitätsklinik, Josef-Schneider-Str. 2, D-97080 Würzburg.

² Korrespondenzadresse: Dr. W. Reiter, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Katharinenhospital, Kriegsbergstraße 60, D-70174 Stuttgart. Fax: x49-711-278-4809.

³ Dr. B. Pohl, Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Josef-Schneider-Str. 2, D-97080 Würzburg.

⁴ Dr. P. Bauer, Institut für Transfusionsmedizin, Albert-Schweitzer-Straße 33, D-48129 Münster.

⁵ Dr. B. Steinbrückner, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Klinikum der Universität Freiburg, Hermann-Herder-Straße 11, D-79104 Freiburg.

Einleitung

Vor einem Jahrhundert beschrieb *Rudolf Virchow* (1821–1902) in der nach ihm benannten Trias die Ursachen von Thrombosen: Stasis, Gefäßwandverletzungen und Hyperkoagulabilität. Aber lange Zeit war „Hyperkoagulabilität“ nicht meßbar. Erst in den letzten Jahren wurden zunehmend Tests entwickelt, die einen genauen Einblick in das Gerinnungssystem ermöglichen. Die Untersuchung des Inhibitors AT III und des Protein C-/Protein S-Systems sind inzwischen in vielen Laboratorien Routine, viele Komponenten der Fibrinolyse können bestimmt werden. Weiterhin erwiesen sich Lupus-Inhibitoren als thrombosefördernd, ohne daß die Pathogenese bisher endgültig geklärt werden konnte [1].

Wir untersuchten 259 Thrombosepatienten unserer Gerinnungsambulanz auf diese Faktoren, um festzustellen, wie häufig leichte oder schwerere Defekte vorliegen.

Patienten und Methoden

Patienten

Zwischen Januar 1989 und Juni 1993 besuchten 259 Patienten (122 weiblich und 137 männlich) unsere Ambulanz (s. Tabelle 1). Das mittlere Alter war 40 Jahre (weiblich 39 und männlich 41 Jahre) mit einer Spanne von 15 bis 69 Jahren. 202 Patienten erlitten eine venöse Thrombose, 32 am Unterschenkel, 73 am Oberschenkel, 32 im Hüftbereich, 13 am Arm, 8 im Auge und 9 in einem zerebralen Sinus. 37 hatten einen Schlaganfall, 10 TIAs (transitorische ischämische Attacken). Bei 84 Patienten konnte eine positive Familienanamnese (Thrombose bei Verwandten ersten Grades) eruiert werden. 47 hatten mehr als ein thromboembolisches Ereignis. Begünstigende Faktoren wie Operationen, Immobilisierung, Schwangerschaft oder die Einnahme oraler Kontrazeptiva fanden sich in 68 Fällen. Die Protein C- und S-Bestimmungen der 62 Patienten unter Behandlung mit Vitamin K-Antagonisten gingen nicht in die statistische Auswertung ein. Alle Proben wurden in 1/10 Volumen 0,12 mol/l Natriumzitat (Monovetten der Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gewonnen und unmittelbar anschließend bei $2000 \times g$ für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Für Tests, die nicht am Tag der Probengewinnung durchgeführt wurden, wurde Plasma in Aliquots von je 500 µl bei $-70^\circ C$ tiefgefroren.

Abkürzungen:

APC	Activated Protein C
AT III	Antithrombin III
ICA	Index of Circulating Anticoagulant
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor
t-PA	tissue Plasminogen Activator
TTI	Tissue Thromboplastin Inhibition

Tabelle 1. Klinische Patientendaten

	Anzahl	Anteil (%)
Gesamt	259	
weiblich	137	53
männlich	122	47
Thromboselokalisierung	202	78
Unterschenkel	32	12
Oberschenkel	73	28
Becken	32	12
Arm	13	5
Auge	8	3
zerebraler Sinus	9	3
Lungenembolie	37	14
Schlaganfall	37	14
TIA	10	4
positive Familienanamnese	84	32
prädisponierende Faktoren	68	26
wiederholte Thrombosen	47	18
Cumarintherapie	62	24

Analysenmethoden

Die Bestimmung von AT III erfolgte funktionell (Immuno-chrom® AT III, Immuno, Heidelberg, Deutschland). Protein C wurde sowohl immunochemisch (Asserachrom®-Protein C, Boehringer Mannheim, Deutschland) als auch ab Januar 1992 funktionell (Dade®-Protein C, Baxter Diagnostics Inc., Unterschleißheim, Deutschland) gemessen. Die Protein S-Bestimmung wurde immunochemisch durchgeführt (Asserachrom®-Protein S, Boehringer Mannheim), zur Bestimmung des freien Protein S auch nach Fällung mit Polyethylenglykol. Die Untersuchung auf Lupus-Antikoagulantien erfolgte mit 2 Plasmatauschversuchen, der Tissue Thromboplastin Inhibition (TTI) und dem Index of Circulating Anticoagulant (ICA) nach *Rosner et al.* [2]. Die Parameter der Fibrinolyse – Plasminogen, Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI) und Tissue-Plasminogen-Activator (t-PA) – wurden immunochemisch bestimmt (Berichrom®-Plasminogen, Berichrom®-PAI, Behringwerke, Marburg, Deutschland und Asserachrom®-t-PA, Boehringer Mannheim). Die Provokation der t-PA-Freisetzung erfolgte durch 10minütige Stauung am Oberarm mit einem Druck zwischen dem systolischen und diastolischen Blutdruck.

Statistische Analyse

Unterschiede zwischen einzelnen Patienten-Subkollektiven wurden mit dem nicht-parametrischen Fischer-Test mit Tocher Korrektur auf statistische Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau $p < 0,05$).

Ergebnisse

Soweit möglich unterteilt in mild und schwer (Kriterien siehe Tabelle 2). Abbildung 1 faßt die Ergebnisse aller Teste zusammen.

Inhibitoren

Schwere AT III-Mangelzustände mit Werten unter 50 % fanden sich bei 2 (1 %) Patienten, leichte mit Werten zwischen 50 % und 80 % bei 20 (8 %) Patienten. Protein C- und S-Werte von Patienten unter Therapie mit Vitamin K Antagonisten wurden nicht berücksichtigt. Von den verbliebenen 197 Plasmen wiesen 3 (2 %) Protein C-Werte unter 50 % und 6 (4 %) Werte zwischen 50 % und 70 % auf. 53 Plasmen wurden ab Januar 1992 zusätzlich mit dem funktionellen Protein C Test untersucht. In Übereinstimmung mit dem immunochemischen Test fanden wir 1 (2 %) Patienten mit einem schweren und 2 (4 %) mit einem leichten Mangel. Werte des Protein S (gesamt) unter 50 % bestimmten wir in 5 (2 %) Fällen und Werte zwischen 50 % und 70 % in 11 (5 %) Fällen. Nach Fällung mit Polyethylenglykol fanden wir bei 21 Patienten (10 %) eine schwere und bei 27 (13 %) eine leichte Erniedrigung des freien Protein S.

Lupus-Inhibitoren

Plasmatauschversuche sind nicht quantitativ. Daher wurde auf eine Unterteilung in schwere und leichte Fälle verzichtet. Bei 15 (5 %) Patienten fanden sich Lupus-Antikoagulantien. In 8 Fällen war ausschließlich der ICA positiv, in 2 Fällen der TTI und in 5 Fällen waren beide Teste positiv.

Tabelle 2. Untersuchte Parameter und Bewertungskriterien

Parameter	Referenzbereich	leicht pathologisch	schwer pathologisch
AT III (%)	80–120	50–80	< 50
Protein C (%)	70–140	50–70	< 50
Protein S (%)	70–140	50–70	< 50
ICA	< 15	> 15	–
TTI	< 1,25	> 1,25	–
Plasminogen (%)	75–140	50–75	< 50
PAI (U/ml)	0,3–3,5	3,5–10	> 10
t-PA-Freisetzung	> 1,5fach	1,2–1,5fach	< 1,2fach

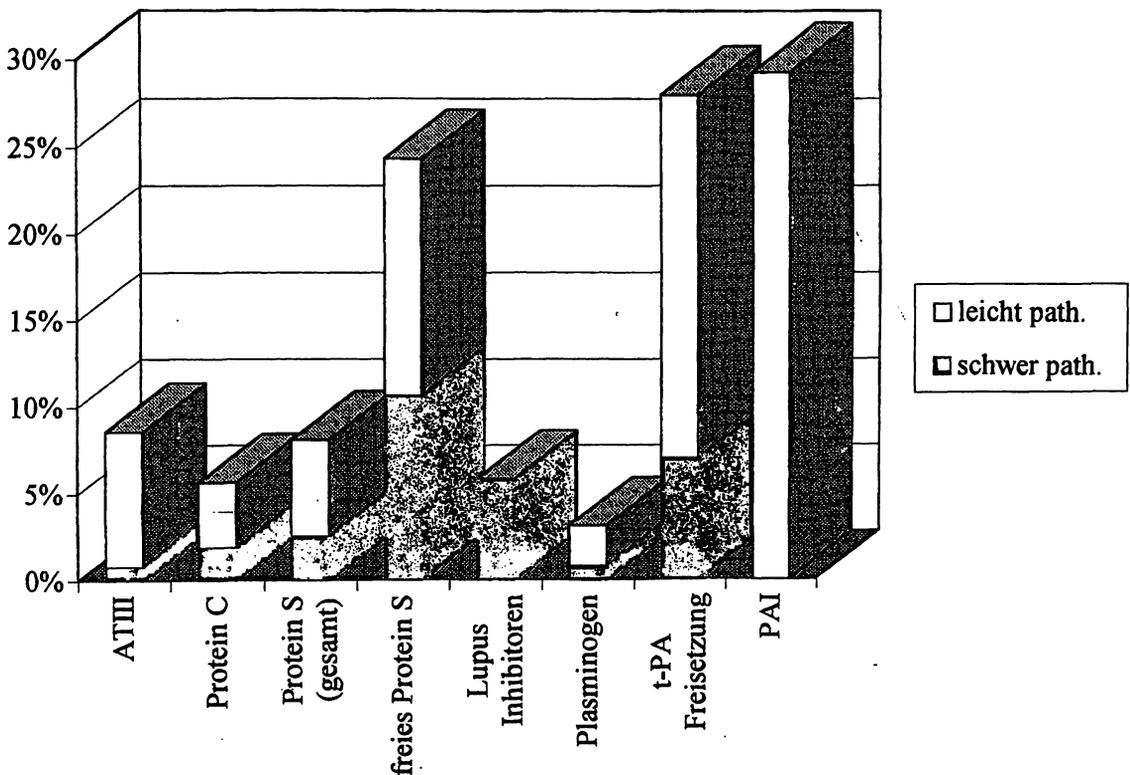


Abb 1. Häufigkeiten der Gerinnungsanomalien.

Fibrinolytisches System

Plasminogen-Werte unter 50 % bestimmten wir in 2 (1 %) Fällen, solche zwischen 50 % und 75 % in 6 (3 %) Fällen. Bei 100 Patienten konnten wir die Freisetzung von t-PA im Stauversuch bestimmen. In 7 (7 %) Fällen war der Anstieg geringer als 1,2fach und in 21 (21 %) Fällen zwischen 1,2 und 1,5fach. PAI wurde bei 58 Patienten bestimmt. Werte unter 10 U/ml fanden sich in keinem Fall, zwischen 3,5 U/ml und 10 U/ml bei 17 (29 %) dieser Patienten.

Vergleich von Patienten-Subkollektiven

Wir konnten keine signifikanten Unterschiede feststellen zwischen Patienten mit einer venösen Thrombose und solchen, die einen zerebralen Insult erlitten hatten. Auch zwischen Patientengruppen jünger bzw. älter als 40 Jahre oder mit bzw. ohne klinische Risikofaktoren fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

Anteil der Patienten mit Gerinnungsanomalien

Bei 42 (16 %) der Patienten fanden wir mindestens eine schwere Anomalie und bei 52 (20 %) mindestens eine milde. Bei 169 (64 %) Patienten lagen alle untersuchten Parameter im Referenzbereich (Abb. 2).

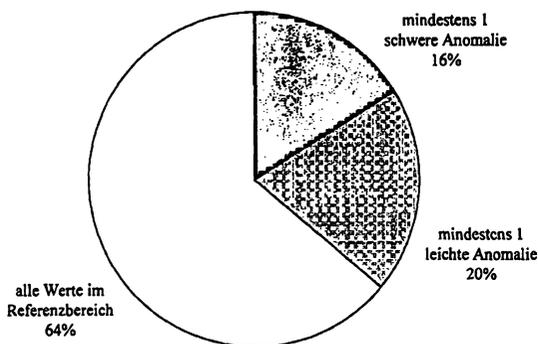


Abb. 2. Anteil der Patienten mit Gerinnungsanomalien.

Diskussion

Seit 1965 ist der Zusammenhang zwischen erniedrigten AT III-Werten und venösen Thrombosen bekannt [3]. Verschiedene Untersuchungen berichteten über AT III-Mangelzustände bei Patienten mit venösen Thrombosen in 1 bis 7,2 % [4, 5, 6]. Bei unserem Patientenkollektiv fanden wir schwere Mangelzustände in 1 % und leichte in 8 %.

Protein C ist eine Vitamin-K-abhängige Serinprotease und inaktiviert die Kofaktoren FVIIIa und FVa [7]. Ho-

mozygote Defekte führen zu massiven Thrombosen bei Neugeborenen [8]. Angaben über die Häufigkeit von heterozygoten Defekten bei Patienten mit venösen Thrombosen schwanken zwischen 1 % und 18 % [4, 6, 9, 10, 11]. Diese Spannweite ist vermutlich Folge einer noch unzureichenden Standardisierung der vor allem bei den frühen Untersuchungen eingesetzten Laborteste.

Protein S wurde 1977 erstmals beschrieben [12]. Es ist ein Kofaktor für aktiviertes Protein C [13] und liegt teilweise gebunden an C4b-bindendes Protein vor [14, 15]. Nur das freie Protein S ist biologisch aktiv. Auch beim Protein S variieren die Angaben in früheren Studien, vermutlich aus den schon beim Protein C genannten Gründen. Ein Mangel wird in 1 % bis 13 % der Thrombosepatienten beschrieben [4, 6, 10, 11]. In unserem Kollektiv fanden sich 2 % mit einer schweren und 5 % mit einer milden Verminderung des Protein S (gesamt). Bei Betrachtung des freien Protein S ergaben sich höhere Werte: Hier zeigten 10 % eine schwere und 13 % eine leichte Verminderung. Es stellt sich hier jedoch die Frage, ob eine untere Referenzbereichsgrenze von 70 % für Frauen nicht zu hoch angesetzt ist.

Antiphospholipid-Antikörper sind bei Patienten mit einem systemischen Lupus erythematoses (SLE) oder verwandten Autoimmunerkrankungen mit einem erhöhten Thromboserisiko verbunden [1, 16, 17]. Man findet sie auch bei ansonst gesunden Personen [1]. Malm et al. berichteten eine Prävalenz von 2 % in einer unselektierten Population von Thrombosepatienten [6]. Dies ist vergleichbar mit den 5 %, die in unserem Kollektiv gefunden wurden.

Eine verminderte Fibrinolyse findet sich bei vielen Patienten mit venösen Thrombosen [18, 19, 20]. Ursache können sowohl ein Plasminogenmangel oder -defekt, als auch eine verminderte Plasminogenaktivierung sein [21, 22, 23].

Hach-Wunderle fand einen Patienten mit Plasminogenmangel unter 435 Thrombosepatienten [24]. 1 % unserer Patienten hatte einen schweren und 2 % einen leichten Plasminogenmangel. Eine verminderte Freisetzung des Plasminogenaktivators t-PA wird in 10 % bis 35 % beschrieben [18, 21, 25]. Dies steht im Einklang mit unseren Ergebnissen (10 % schwere Verminderung, 21 % leichte). Das von uns angewandte immunochemische Nachweisverfahren schaltet den Einfluß einer Inaktivierung von t-PA durch PAI in der Probe weitgehend aus. Erhöhte PAI-Spiegel werden in 9 % bis 30 % der Thrombosepatienten berichtet [21, 25, 26], vergleichbar den 29 % bei unseren Patienten.

Zu unserer eigenen Überraschung fand sich kein Unterschied zwischen Patienten mit anderen Risikofaktoren und solchen, die ihre Thrombose unerwartet erlitten. Ursache hierfür dürfte sein, daß Patienten mit einer entsprechenden Gerinnungsanomalie einerseits ein erhöhtes Risiko haben, Thrombosen zu entwickeln, daß dies andererseits jedoch bevorzugt dann geschieht, wenn weitere Risikofaktoren hinzu kommen. Im Gegensatz zu anderen Un-

tersuchungen fanden wir keine Unterschiede in der Häufigkeit von Inhibitor-Defizienzen zwischen jüngeren und älteren Patienten [4, 11]. Da bei unserem Patientengut ein Rückschluß vom Alter oder vom Vorliegen oder der Abwesenheit von begünstigenden Faktoren, wie Operationen, Immobilisierung, Schwangerschaft oder der Einnahme von oralen Kontrazeptiva, auf die Häufigkeit von Gerinnungsanomalien nicht möglich war, sehen wir die in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen für alle Patienten mit einer Thrombose als indiziert an.

Insgesamt fanden wir bei 16 % unserer Patienten eine schwere Gerinnungsanomalie und bei 20 % eine leichte. 64 % unserer Thrombosepatienten waren in allen angewandten Testen völlig unauffällig.

So gelang es uns, durch Betrachtung sowohl der Inhibitoren als auch des fibrinolytischen Systems, bei einem guten Drittel unserer Patienten laboranalytisch ein Thromboserisiko zu erfassen. Dies sollte zu einer Analyse dieser Parameter bei allen Thrombosepatienten ermutigen, zumal künftig sicherlich durch Entwicklung und Einsatz weiterer Untersuchungsmethoden, z. B. der Bestimmung der APC-Resistenz oder des Thrombomodulins, bei einem noch höheren Anteil der Thrombosepatienten eine Ursache der Hyperkoagulabilität aufgefunden werden kann.

Literatur

- Love PE, Santoro SA. Antiphospholipid Antibodies (1990) Anticardiolipin and the Lupus Anticoagulant in Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and in Non-SLE Disorders. *Ann Int Med* 112, 682-698
- Rosner E, Pauzner R, Lusky A, Modan M, Many A (1987) Detection and Quantitative Evaluation of Lupus Circulating Anticoagulant Activity. *Thromb Haemost* 57, 144-147
- Egeberg O (1965) Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 13, 516-530
- Hirsch J, Piovella F, Pini M (1989) Congenital Antithrombin III Deficiency. *Am J Med* 87, 3B-37S
- Vikydal R, Korninger C, Kyrle PA, Niessner H, Pabinger I, Thaler E, Lechner K (1985) The Prevalence of Hereditary Antithrombin-III Deficiency in Patients with a History of Venous Thromboembolism. *Thromb Haemost* 54, 744-745
- Malm J, Laurell M, Nilsson IM, Dahlbäck B (1992) Thromboembolic Disease - Critical Evaluation of Laboratory Investigation. *Thromb Haemost* 68, 7-13
- Marlar RA, Kleiss AJ, Griffin JH (1982) Mechanism of Action of Human Activated Protein C, a Thrombin-Dependent Anticoagulant Enzyme. *Blood* 59, 1067-1072
- Seligsohn U, Berger A, Abend M, Rubin L, Attias D, Zivelin A, Rapaport SI (1984) Homozygous Protein C Deficiency Manifested By Massive Venous Thrombosis In The Newborn. *New Engl J Med* 310, 559-561
- Bertina RM, Broekmans AW, Krommenhoek-van Es C, Wijngaarden A (1984) The Use of a Functional and Immunologic Assay for Plasma Protein C in the Study of the Heterogeneity of Congenital Protein C Deficiency. *Thromb Haemostas* 51, 1-5
- Gladson CL, Scharrer I, Hach V, Beck KH, Griffin JH (1988) The Frequency of Type I Heterozygous Protein S and Protein C Deficiency in 141 Unrelated Young Patients with Venous Thrombosis. *Thromb Haemost* 59, 18-22
- Broekmans AW, Linden van der IK, Jansen-Koeter Y, Bertina RM (1986) Prevalence of Protein C (PC) and Protein S (PS) Deficiency in Patients with Thrombotic Disease. *Thromb Res suppl* VI, 135 (Abstr.)
- Di Scipio RG, Hermodson MA, Yates SG, Davie EW (1977) A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S. *Biochemistry* 16, 698-706
- Walker FJ (1980) Regulation of activated protein C by a new protein. *J Biol Chem* 255, 5521-5524
- Comp PC, Doray D, Patton D, Esmon CT (1986) An Abnormal Plasma Distribution of Protein S Occurs in Functional Protein S Deficiency. *Blood* 67, 504-508
- Fletcher B, Taylor JR (1992) Protein S, C4b binding protein, and the hypercoagulable state. *J Lab Clin Med* 119, 596-597
- Lechner K, Pabinger-Fasching I (1985) Lupus Anticoagulants and Thrombosis. A Study of 25 Cases and Review of the Literature. *Haemostasis* 15, 254-262
- Bick RL, Baker WF (1992) Anticardiolipin Antibodies and Thrombosis. *Hematol Oncol Clin North AM* 6(6), 1287-1299
- Wiman B, Ljungberg B, Chmielewska J, Urden G, Blombäck M, Johnsson H (1985) The role of the fibrinolytic system in deep vein thrombosis. *J Lab Clin Med* 105, 265-270
- Browse NL, Gray L, Jarett PEM, Morland M (1977) Blood and vein-wall fibrinolytic activity in health and vascular disease. *Br Med J* 1, 478-481
- Korninger C, Lechner K, Niessner H, Gössinger H, Kundi M (1984) Impaired Fibrinolytic Capacity Predisposes for Recurrence of Venous Thrombosis. *Thromb Haemost* 52, 127-130
- Nilsson IM, Ljunger H, Tengborn L (1985) Two different mechanisms in patients with venous thrombosis and defective fibrinolysis: low concentration of plasminogen activator or increased concentration of plasminogen activator inhibitor. *Br Med J* 290, 1453-1456
- Aoki N, Moroi M, Sakata Y, Yoshida N, Matsuda M (1978) A Hereditary Molecular Abnormality Found In A Patient With Recurrent Thrombosis. *J Clin Invest* 1186-1195
- Brommer EJP, Verheijen JH, Chang GTG., Rijken DC (1984) Masking of Fibrinolytic Response to Stimulation by an Inhibitor of Tissue-Type Plasminogen Activator in Plasma. *Thromb Haemost* 52, 154-156
- Hach-Wunderle V, Scharrer I, Lottenberg R (1988) Congenital Deficiency of Plasminogen and Its Relationship to Venous Thromboses. *Thromb Haemost* 59, 277-280
- Juhan-Vague I, Valadier J, Alessi MC, Aillaud MF, Ansaldi J, Philip-Joet C, Holvoet P, Serradimigni A, Collen D (1987) Deficient t-PA Release and Elevated PA Inhibitor Levels in Patients with Spontaneous or Recurrent Deep Venous Thrombosis. *Thromb Haemost* 57, 67-72
- Engesser L, Brommer EJP, Kluft C, Briet E (1989) Elevated Plasminogen Activator Inhibitor (PAI), a Cause of Thrombophilia? - A Study in 203 Patients with Familial or Sporadic Venous Thrombophilia. *Thromb Haemost* 62, 673-680