

**'Tissue factor'– aktivierte Thrombelastographie:  
Vergleich mit der nicht aktivierten  
Thrombelastographie und die Rolle  
in der Routinediagnostik**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Janina Antonia Tschekorsky Orloff  
aus Bonn

2011

Angefertigt mit der Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. B. Pötzsch
2. Gutachter: Prof. Dr. med. E. Rabe

Tag der Mündlichen Prüfung: 29.03.2011

Aus dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin,  
Universitätsklinikum Bonn  
Direktor: Prof. Dr. J. Oldenburg

*Meinen Freunden*



## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
Plasmatische Gerinnungsfaktoren.....	9
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>10</b>
1.1. Hämostaseologie.....	10
1.1.1. Primäre Hämostase.....	10
1.1.2. Sekundäre Hämostase.....	12
1.1.2.1. Rückkopplungsmechanismen.....	14
1.2. Die Thrombelastographie.....	15
1.2.1. Die klassische Thrombelastographie.....	15
1.2.2. Das ROTEG®-System.....	16
1.2.2.1. NaTEG (nicht aktivierte Thrombelastographie).....	20
1.2.2.2. ExTEG (extrinsisch aktivierte Thrombelastographie).....	21
1.2.3. Klinische Bedeutung der Thrombelastographie.....	23
1.3. Aufgabenstellung.....	24
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
2.1. Verwendete Materialien.....	25
2.1.1. Materialien für die nicht aktivierte Thrombelastographie (NaTEG).....	25
2.1.2. Materialien für die TF-aktivierte Thrombelastographie (ExTEG).....	25
2.1.3. Materialien für die Faktor VII Bestimmung.....	25
2.1.4. Verwendete Geräte.....	25
2.2. Methoden.....	26
2.2.1. Patientenkollektiv / Blutproben.....	26
2.2.2. ROTEG®-Analysen.....	26
2.2.2.1. nicht aktivierte Thrombelastographie.....	27
2.2.2.2. 'tissue factor'-aktivierte Thrombelastographie.....	27
2.2.3. Bestimmung des Gerinnungsfaktor VII.....	27

2.2.4. Statistische Analysen.....	28
3. Ergebnisse.....	29
3.1. Korrelation der entsprechenden Parameter in ExTEG und NaTEG.....	29
3.2. Korrelationen innerhalb von ExTEG und NaTEG.....	32
3.3. Einfluss des Gerinnungsfaktor VII auf ExTEG und NaTEG.....	36
3.4. Qualitative Übereinstimmung der Messergebnisse.....	38
3.5. Schwankungsbreiten von ExTEG und NaTEG.....	43
4. Diskussion.....	45
4.1. Korrelationen der TEG-Parameter.....	45
4.1.1. 'clotting time'.....	45
4.1.2. 'clot formation time'.....	47
4.1.3. 'maximum clot firmness'.....	47
4.1.4. Korrelation der Parameter innerhalb von ExTEG und NaTEG.....	48
4.2. Qualitative Übereinstimmung der korrespondierenden Parameter in ExTEG und NaTEG.....	49
4.3. ExTEG in der Routinediagnostik.....	50
5. Zusammenfassung.....	52
6. Abbildungsverzeichnis.....	54
7. Tabellenverzeichnis.....	55
8. Literaturverzeichnis.....	56
9. Danksagung.....	62

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCD	Charge-coupled Device
CFT	'clot formation time' (Gerinnselformierungszeit)
CT	'clotting time' (Gerinnungszeit)
ExTEG	extrinsisch aktivierte Thrombelastographie
FGF	'fibroblast growth factor' (Fibroblasten- Wachstumsfaktor)
GP	Glykoprotein
h	Stunde
Kap.	Kapitel
MCF	'maximum clot firmness' (maximale Gerinnselfestigkeit)
M	Mol
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NaCl	Natrium Chlorid
NaTEG	nicht aktivierte Thrombelastographie
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PDGF	'platelet derived growth factor'
PF3	Plättchenfaktor 3
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
PTT	partielle Thromboplastinzeit
ROTEG®	Rotations-Thrombelastographie
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle

TEG	Thrombelastographie, Thrombelastogramm
TF	'tissue factor' (Gewebethromboplastin)
TFPI	'tissue factor pathway inhibitor'
TGF- $\beta$	'transforming growth factor- $\beta$ ' (transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$ )
vWF	von-Willebrand-Faktor
$\mu$ l	Mikroliter

## Plasmatische Gerinnungsfaktoren

- I Fibrinogen
- II Prothrombin
- III Gewebethromboplastin
- IV  $\text{Ca}^{2+}$
- V Proakzelerin
- VI Akzelerin
- VII Prokonvertin
- VIII antihämophiles Globulin A
- IX antihämophiles Globulin B (Christmas- Faktor)
- X Stuart-Prower-Faktor
- XI Rosenthal-Faktor, (PTA, Plasmathromboplastin antecedent)
- XII Hageman-Faktor
- XIII Fibrin stabilisierender Faktor (FSF, Laki-Lorand-Faktor)
- XIV Fitzgerald-Faktor, hochmolekulares Kininogen
- XV Fletcher-Faktor, Präkallikrein

# 1. Einleitung

## 1.1. Hämostaseologie

Der Ablauf der Gerinnung gliedert sich in die primäre und die sekundäre Hämostase. Das Ziel der primären Hämostase ist die Bildung eines Thrombozytenpfropfes (weißer Thrombozytenthrombus) durch die Wirkung und Wechselwirkung von Thrombozyten und Gefäßwand. Die sekundäre Hämostase beinhaltet die Aktivierung der plasmatischen Gerinnungsfaktoren mit dem Ziel des endgültigen Defektverschlusses. Es entsteht der rote Abscheidungsthrombus, der auch andere Blutzellen wie Erythrozyten mit einschließt.

### 1.1.1. Primäre Hämostase

Sobald es durch eine Gefäßverletzung zur Freilegung von subendothelialen Strukturen kommt, lagern sich an der geschädigten Stelle Thrombozyten an. Diese Anlagerung wird durch den von-Willebrand-Faktor (vWF) vermittelt. Der von-Willebrand-Faktor bildet Brücken zwischen speziellen Membranrezeptoren der Plättchen und Kollagenfasern (vgl. Abb. 1). Unterstützt wird die Adhäsion außerdem von dem Verankerungsprotein Fibronectin.

Durch die Anlagerung an Kollagen werden die Thrombozyten aktiviert. Es kommt zur Freisetzung von verschiedenen aggregationsfördernden Substanzen (ADP, PAF, Thromboxan A<sub>2</sub>) wodurch weitere Thrombozyten angelockt werden (Chemotaxis). Durch Ca<sup>2+</sup>-abhängige Aktin-Myosin-Interaktionen in den Blutplättchen nehmen diese eine kugelige Form an und bilden Pseudopodien aus. So können sie in einen engen verzahnten Kontakt untereinander treten. Zeitgleich mit dieser Strukturveränderung der Thrombozyten, entleeren sich ihre α-Granula. Es werden weitere aggregationsfördernde (Fibrinogen, Thrombospondin) und adhäsionsfördernde (Fibronectin, vWF) Substanzen, sowie wachstumsfördernde (PDGF, TGF-β, FGF) und gerinnungseinleitende (Faktor I, Faktor V, Faktor VIII) Faktoren freigesetzt. Mit Hilfe der Brückenproteine Fibrinogen, Fibronectin und Thrombospondin, kommt es über den Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor zu einer Vernetzung der Thrombozyten untereinander.

Der so entstandene Thrombozytenpfropf ist jedoch noch recht instabil.

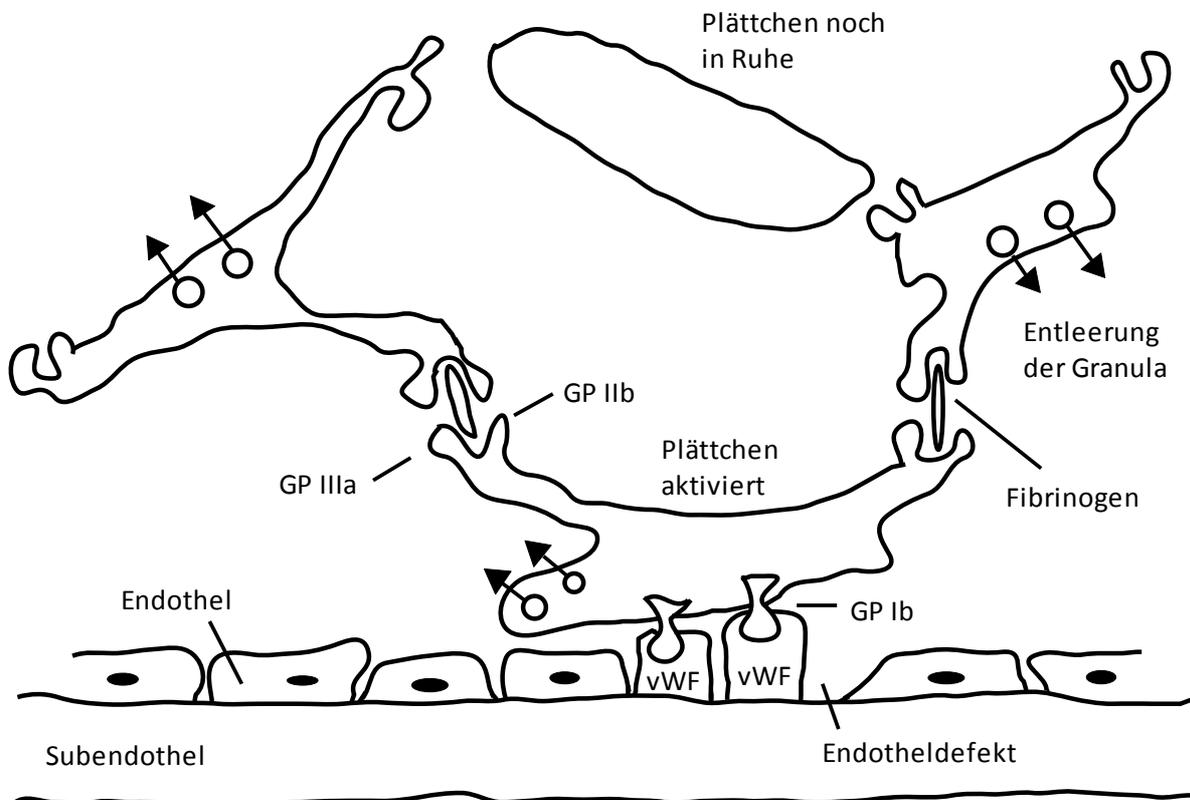


Abbildung 1: Anlagerung der Thrombozyten an die verletzte Gefäßregion. Aktivierte Thrombozyten verformen sich, bilden Glykoproteinrezeptoren (GP) und entleeren ihre Granula. Der vWF heftet die Thrombozyten (über Rezeptor GP Ib) an die Gefäßwand (Thrombozytenadhäsion). An andere Rezeptoren (GP IIb/IIIa für Fibrinogen) binden bestimmte Proteine, die die Thrombozyten untereinander verknüpfen (irreversible Thrombozytenaggregation). Nach Schmidt und Thews 1995.

Das schon zu Beginn freigesetzte Thromboxan  $A_2$  bewirkt über eine Vasokonstriktion eine Verlangsamung des Blutstroms im betroffenen Gefäßabschnitt und fördert so das Wachstum des Thrombozytenpfropfes. Die Vasokonstriktion wird durch den Austritt von Blutplasma noch verstärkt und es kommt zu einer Reparaturischämie.

Eine überschießende Aggregation wird durch das von den begrenzenden, intakten Endothelzellen freigesetzte Prostazyklin ( $PGI_2$ ) verhindert. Es aktiviert die membranständige Adenylatzyklase der Thrombozyten und erhöht so die intrazelluläre cAMP-Konzentration der

Thrombozyten. cAMP stabilisiert die Thrombozyten und steigert den  $\text{Ca}^{2+}$ -Rückstrom in das Zytosol.

### 1.1.2. Sekundäre Hämostase

Um einen endgültigen Defektverschluss zu erreichen, bedarf es der Mitwirkung des Gerinnungssystems. Nach dem klassischen Konzept erfolgt hierbei eine kaskadenartige Aktivierung der Gerinnungsfaktoren über zwei unterschiedliche Wege: vermittelt über das extrinsische System (Faktor VIIa/TF) oder über das intrinsische System (kontaktaktiviert, Faktor XII). Am Schluss der gemeinsamen Endstrecke dieser beiden Systeme wird aus Fibrinogen Fibrin abgespalten (vgl. Abb. 2).

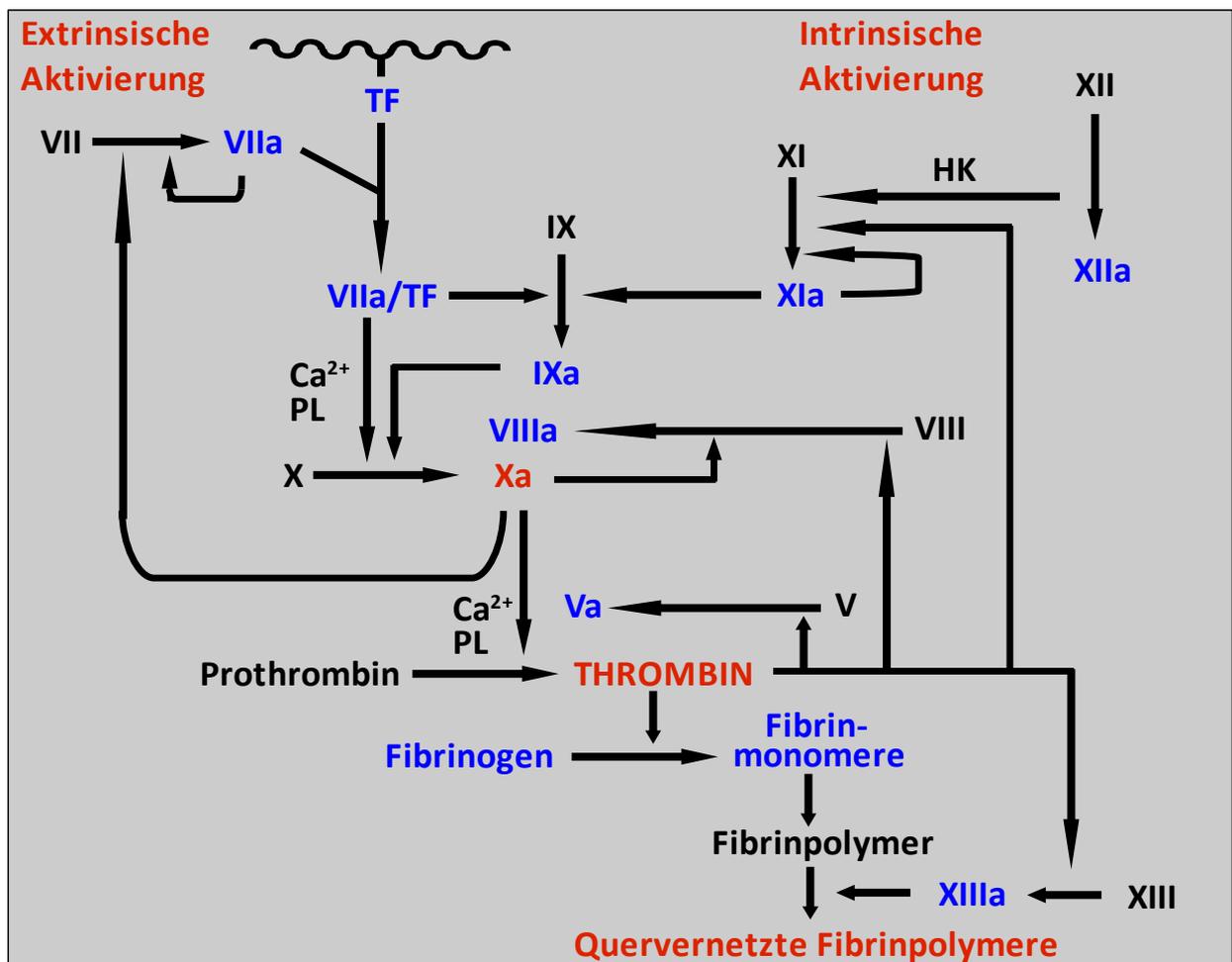


Abbildung 2: Ablauf der Blutgerinnung, Gerinnungskaskade

Seit der Entwicklung des klassischen Konzepts der Blutgerinnung von Paul Oskar Morawitz 1905, ist die Darstellung des Gerinnungsprozesses wesentlich differenzierter geworden. Schon Mc Vey beschrieb 1999 die Blutgerinnung nicht mehr als zwei getrennt ablaufende Kaskaden (kontaktaktiviert oder 'tissue factor'-aktiviert), sondern vielmehr als ein komplexes Netzwerk von Interaktionen die sich über positive und negative Rückkopplungsmechanismen regulieren. Die Thrombozyten bieten für diese  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Aktivierungsprozesse die nötige phospholipiddichte Oberfläche. Allgemein gilt heute der Faktor VIIa/TF-Komplex als physiologischer Hauptaktivator der Blutgerinnung (*Butenas und Mann 1996, Key et al. 2007, Mc Vey 1999, Morrissey et al. 1993, Nemerson 1988*).

'Tissue factor' ist in der Gefäßwand hauptsächlich in den adventitiellen Fibroblasten lokalisiert. Bei einer Gefäßverletzung kommt er in Kontakt mit dem Blutgerinnungsfaktor VII welcher als einziger Gerinnungsfaktor zu 1% bereits in aktiver Form (VIIa) im Blut vorliegt (*Mc Vey 1999*). Alle anderen Gerinnungsfaktoren sind ausschließlich in ihren inaktiven Vorstufen vorhanden. Der Faktor VIIa/TF-Komplex führt dann direkt über den Faktor X oder indirekt über den Faktor IX (*Butenas et al. 1997, Butenas und Mann 1996 und 2002, Hoffmann et al. 1995, Mc Vey 1999, Nemerson 1988*), zur Bildung einer kleinen Menge Thrombin (Faktor IIa). Dieser Teil der Gerinnung wird auch als 'initiation phase' bezeichnet. In der darauf folgenden 'propagation phase' aktiviert das gebildete Thrombin die Kofaktoren V und VIII. Der Faktor VIIIa bildet mit dem Faktor IXa einen Komplex der den Faktor X deutlich stärker aktiviert als der Faktor VIIa/TF-Komplex. Der Faktor Va bildet zusammen mit dem Faktor Xa den Prothrombinase-Komplex und steigert erheblich die Thrombinbildung. Die Thrombinbildung läuft zu diesem Zeitpunkt unabhängig vom Faktor VIIa/TF-Komplex ab, der schon schnell durch den 'tissue factor pathway inhibitor' (TFPI) inaktiviert wird. Das gebildete Thrombin wandelt Fibrinogen in Fibrin um und aktiviert die Faktoren VII (*Butenas et al. 1997*), XI und XIII. Außerdem gilt Thrombin als stärkster Thrombozytenaktivator.

Das frisch gebildete Fibrin ist noch instabil. Erst durch den aktivierten Faktor XIII (Fibrin stabilisierender Faktor) kommt es zur Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen den Fibrinmonomeren und damit zur Stabilisierung des Fibrinnetzes.

Die entstandenen Fibrinfäden sind über den Membranrezeptor Glykoprotein IIb/IIIa mit den Thrombozyten verbunden. Durch eine Kontraktion des Proteins Thrombostenin in den

Thrombozyten, entsteht ein Zug auf das Fibrinmaschenwerk. Der Thrombus zieht sich auf einen Bruchteil seines ursprünglichen Volumens zusammen und erhält so seine endgültige Festigkeit.

#### **1.1.2.1. Rückkopplungsmechanismen**

In zahlreichen Studien wurden die Wechselwirkungen der Gerinnungsfaktoren untereinander untersucht. Einige Mechanismen scheinen für den ungestörten Ablauf der Gerinnung unbedingt notwendig zu sein. Nielsen et al. (2005) zeigten, dass der positive Rückkopplungsmechanismus des Gerinnungsfaktor Xa auf den Gerinnungsfaktor VII essentiell für eine uneingeschränkte Gerinnselbildung ist. Dieser Mechanismus wurde auch schon früher beschrieben (*Butenas und Mann 1996, Morrissey et al. 1993, Nemerson 1988*). Butenas und Mann (1996) konnten sogar feststellen, dass der Faktor Xa den Faktor VII viel stärker aktiviert als der Faktor VIIa/TF-Komplex. Sie beschrieben den Faktor Xa deshalb auch als Hauptaktivator des Faktor VII.

Über die Rolle weiterer Faktoren bei der Aktivierung des Gerinnungsfaktor VII liegen kontroverse Informationen vor. Morrissey et al. (1993) und Seligsohn et al. (1979) berichteten dass auch die Faktoren XIIa, IXa und IIa den Faktor VII aktivieren. Butenas und Mann (1996) beschrieben die proteolytische Aktivität der Faktoren IXa und IIa jedoch als zu gering, um eine Rolle bei der Aktivierung von Faktor VII zu spielen. Im Falle des Thrombins (Faktor IIa) räumten sie jedoch ein, dass die geringe proteolytische Aktivität durch eine hohe Konzentration kompensiert werden kann (*Butenas et al. 1997*). Nakagaki et al. (1991) und Morrissey et al. (1993) konnten außerdem zeigen, dass eine Autoaktivierung des Faktor VII durch den bereits im Blut vorliegenden Faktor VIIa (ca. 1% der Faktor VII-Konzentration) stattfindet.

Gailani und Broze (1991 und 1993) sowie Naito und Fujikawa (1991) berichteten dass auch der Gerinnungsfaktor XI zur Autoaktivierung fähig ist. Außerdem kann er ebenfalls durch Thrombin aktiviert werden. Über diese beiden Mechanismen kann der Gerinnungsfaktor XI unabhängig von der Kontaktaktivierung (Faktor XII) die Gerinnselbildung unterstützen indem er den Faktor IX aktiviert und so die Thrombinbildung aufrecht erhält.

## 1.2. Die Thrombelastographie

### 1.2.1. Die klassische Thrombelastographie

Die klassische Thrombelastographie wurde im Jahr 1948 von Prof. Hellmut Hartert in Heidelberg entwickelt. Mit dieser neuen Methode war es zum ersten Mal möglich mit einer einzigen Messung einen Überblick über den gesamten Gerinnungsprozess einschließlich Thrombozytenfunktion, Gerinnselretraktion und Fibrinolyse zu erhalten (*Mallet und Cox 1992*), während man für einen klassischen Gerinnungsstatus auf mehrere Einzeluntersuchungen angewiesen war. Außerdem war es mit den bisherigen Messmethoden nicht möglich den Gerinnungsprozess über die Bildung der ersten Fibrinfäden hinaus aufzuzeichnen.

Bei der Durchführung der klassischen Thrombelastographie wurde das frisch abgenommene Blut in eine auf 37°C temperierte Stahlküvette gegeben. Die Küvette wurde, angetrieben durch einen Synchronmotor, in eine Drehpendelbewegung versetzt und drehte sich so um ihre Längsachse hin und her. In die Küvette hinein taucht frei ein torsionselastisch aufgehängter Stempel (vgl. Abb. 3).

Als Gerinnungsaktivator diente einzig die nicht physiologische Oberfläche der Küvettenwand. Sobald sich die ersten Fibrinfäden bilden, kommt es zu einer Verbindung des Stempels mit der Küvettenwand, und damit zu einer Übertragung der Küvettenbewegung auf den Stempel. Mit einer Zunahme der Gerinnselhaftigkeit verstärkt sich auch die Drehung des Stempels. Die Stempelbewegung überträgt sich mittels einer Spiegeleinrichtung auf ein Photokymographion. Es entsteht eine typische Thrombelastographiekurve aus der die Reaktionszeit, die Gerinnselbildungszeit, die Gerinnselhaftigkeit sowie die Retraktionszeit abgelesen werden kann.

Bei der klassischen Thrombelastographie handelt es sich um eine nicht aktivierte Messung. Die Gerinnung setzt erst nach ungefähr 20min ein. Bis zu einem aussagekräftigen Ergebnis vergehen ungefähr 60min. Der klassische Thrombelastograph ist sehr stoß- und vibrationsempfindlich. Außerdem erfordert die Methode gut eingearbeitetes Personal sowie eine sehr sorgfältige Arbeitsweise.

Eine Weiterentwicklung der Methode nach Hartert stellt das im folgenden Abschnitt beschriebene ROTEG®-System dar.

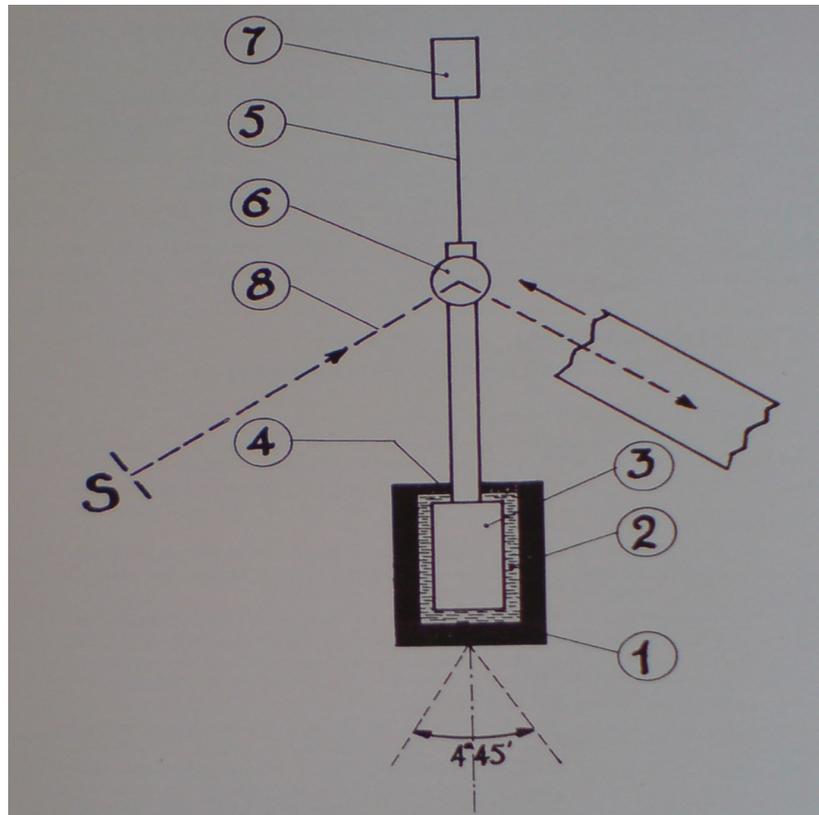


Abbildung 3: Schema zum Prinzip des HARTERTschen Thrombelastographen: 1 = Stahlküvette, 2 = Blutprobe, 3 = Stempel an Torsionsdraht, 4 = Paraffinölschicht, 5 = Torsionsdraht, 6 = Mess-Spiegel, 7 = Träger des Torsionsdrahtes, 8 = Lichtquelle. Atlas de Thrombodynamographie

### 1.2.2. Das ROTEG®- System

Das ROTEG®-System besteht aus dem Messgerät mit vier separaten Kanälen, einem darauf fest installierten Notebook zur Datenverarbeitung, einer elektronischen Pipette und einem Drucker (vgl. Abb. 4, ohne Drucker). Oben auf dem Gerät befindet sich ein Vorwärmblock für die Proben.

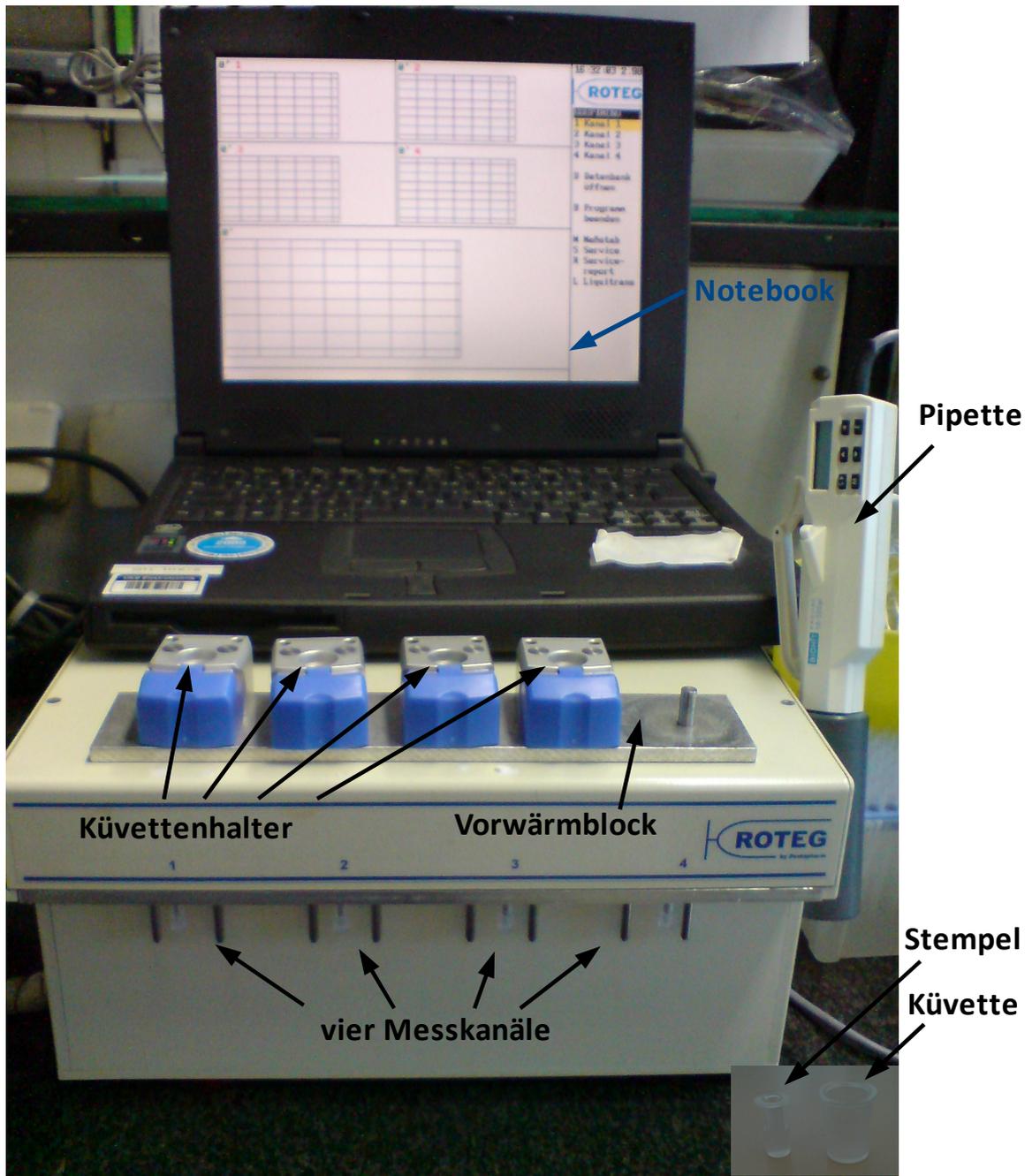


Abbildung 4: Das ROTEG®-System: Messgerät mit darauf installiertem Notebook, vier nummerierte Messkanäle mit hier bereits angebrachtem Stempel, vier Küvettenhalter auf dem Vorwärmblock, rechts: automatische Pipette, rechts unten: Küvette und Stempel.

Die Handhabung wurde im Vergleich zur klassischen Thrombelastographie stark vereinfacht, so dass die Messungen bereits nach einer kurzen Einarbeitungsphase von jedem selbstständig durchgeführt werden können. Die jeweiligen Arbeitsschritte erscheinen auf dem Bildschirm des angeschlossenen Notebooks. Auf jedem Gerät können bis zu vier Untersuchungen gleichzeitig durchgeführt werden. Die Messungen können auf dem Bildschirm mitverfolgt und jederzeit ausgedruckt werden.

Im Unterschied zur klassischen Thrombelastographie steht die Küvette beim ROTEG®-System still. Stattdessen führt der in die Probe eingetauchte Stempel eine Drehpendelbewegung von  $4,75^\circ$  abwechselnd nach rechts und links (10/min) durch. Die Achse, die den Stempel aufnimmt, wird durch ein Kugellager stabil geführt. Durch die Beschränkung der Freiheitsgrade der Achse auf Rotation, wurde die Stoß- und Vibrationsanfälligkeit erheblich gesenkt. Das Gerät ist dadurch transportabel und unempfindlicher während der Messung.

Die Drehung des Stempels wird während der Messung mittels einer Anordnung Lichtquelle–Spiegel–CCD-Zeilensensor optisch abgetastet und durch ein internes 32bit Computersystem in Echtzeit verrechnet. Bei dem CCD-Zeilensensor handelt es sich im Prinzip um eine kleine elektronische Kamera, mit der die Position des Spiegels erkannt wird (vgl. Abb. 5). Der Grad der Drehung des Stempels wird in die TEG-Amplitude umgerechnet und stellt ein stetiges Maß für die Gerinnselfestigkeit dar.

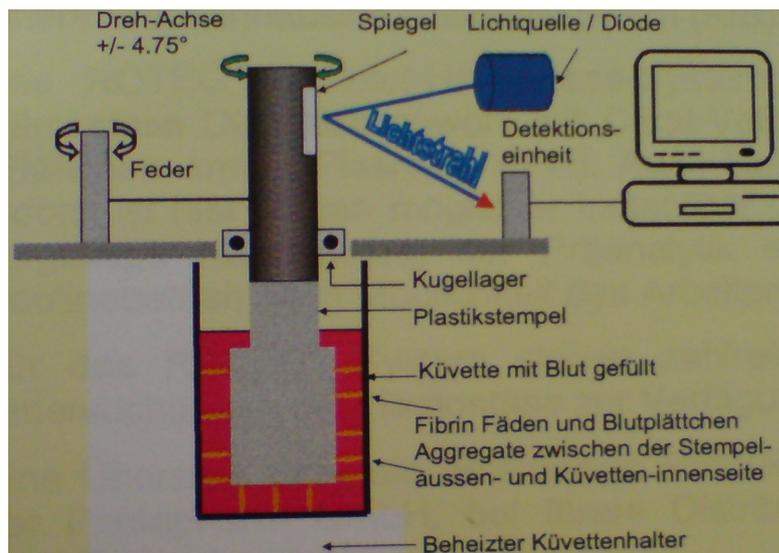


Abbildung 5: Abtastsystem des ROTEG®-Systems. ROTEG® 05 Bedienungshandbuch, Pentapharm GmbH

Um eine nicht aktivierte Messung (NaTEG) mit dem ROTEG® zu starten, muss das Blut lediglich mit star-TEM® rekalzifiziert werden. Die Küvette muss nach der Rekalzifizierung schnellstmöglich in den Messkanal eingesetzt werden, um eine Verfälschung der Messergebnisse zu vermeiden. Zur Verkürzung der Messzeit, kann man mittels verschiedener Reagenzien das extrinsische (ex-TEM®) oder das intrinsische System (in-TEM®) aktivieren. Mit Hilfe weiterer Reagenzien wie z.B. fib-TEM®, ap-TEM® oder hep-TEM® können Gerinnungsstörungen noch spezifischer untersucht werden.

Gegenstand dieser Studie waren nicht aktivierte Messungen (NaTEG) sowie Messungen mit aktiviertem extrinsischen System (ExTEG).

Die Messergebnisse werden vom Computer kontinuierlich aufgezeichnet und es entsteht das typische Thrombelastogramm mit den folgenden Parametern (vgl. Abb. 6).

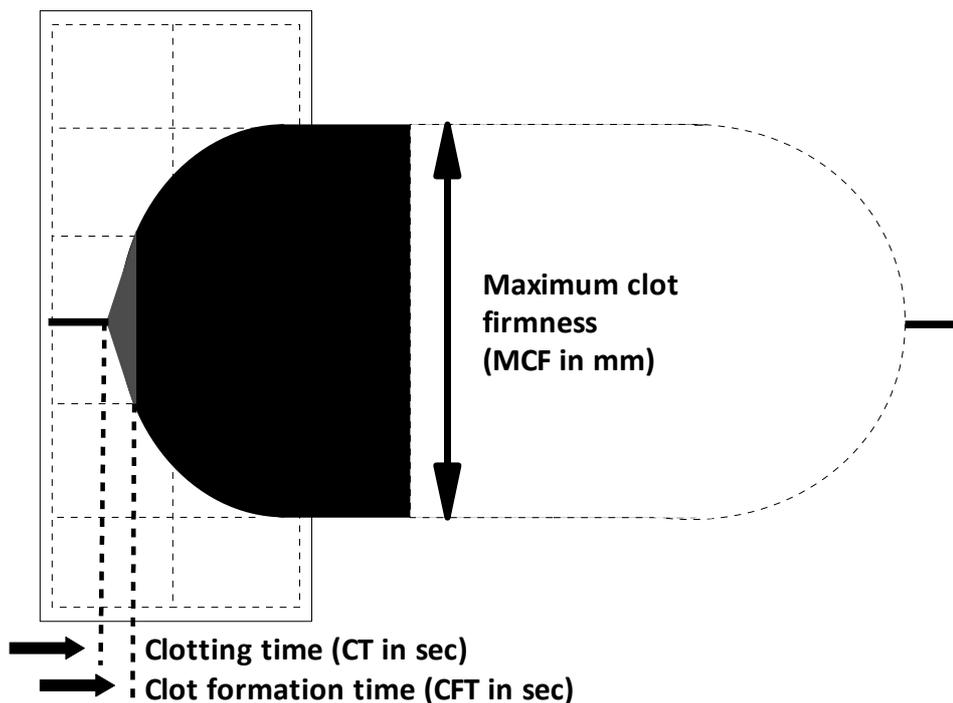


Abbildung 6: Thrombelastogramm mit den Messparametern 'clotting time', 'clot formation time' und 'maximum clot firmness'

- Die Gerinnungszeit ('clotting time' bzw. CT, in sec) ist die Zeit bis zum Einsetzen der Gerinnung bzw. bis die TEG-Amplitude 2mm erreicht. Sie wird im Wesentlichen durch die Aktivität der Gerinnungsfaktoren und der Inhibitoren beeinflusst.
- Die Gerinnselbildungszeit ('clot formation time' bzw. CFT, in sec) ist die Zeit vom Beginn der Gerinnung bis zum Erreichen einer TEG-Amplitude von 20mm; also einer definierten Grundfestigkeit des Gerinnsels. Sie ist im Wesentlichen abhängig von den Gerinnungsfaktoren (besonders des Prothrombinkomplex), dem Fibrinogengehalt und der Thrombozytenzahl.
- Die maximale Gerinnselstabilität ('maximum clot firmness' bzw. MCF, in mm) entspricht der höchsten Amplitude im Thrombelastogramm. Sie wird von Fibrinogenkonzentration, Thrombozytenzahl und Thrombozytenfunktion beeinflusst.

Bei ausreichend langer Testlaufzeit, kann auch noch eine Information über die Fibrinolyse gewonnen werden ('maximum lysis' bzw. ML, in % der MCF). Dieser Parameter fand jedoch in der vorliegenden Studie keine Berücksichtigung.

#### **1.2.2.1. NaTEG (nicht aktivierte Thrombelastographie)**

Bei der nicht aktivierten Messung (NaTEG) mit dem ROTEG®-System wird das zu untersuchende Zitratblut lediglich mit star-TEM® rekalkifiziert. Nach Platzierung der Probe im Messkanal, beginnt der ROTEG®-Analyser mit der Aufzeichnung der Messergebnisse. Er erfasst Gerinnungsaktivierung, Gerinnselbildung, Gerinnselstabilität und eine eventuelle Fibrinolyse. Der NaTEG liefert einen globalen Überblick über den gesamten Gerinnungsprozess, ist dabei jedoch wenig spezifisch. Verschiedene Gerinnungsstörungen können sich in ähnlicher Weise in der nicht aktivierten Messung widerspiegeln, so dass keine genaue Aussage über die Störung getroffen werden kann. Zudem gibt es Anhaltspunkte dafür, dass die Qualität der Blutproben bei den nicht aktivierten Messungen eine größere Rolle spielt als bei den aktivierten Messungen (*Pentapharm GmbH*).

Für die Auswertung der nicht aktivierten Messungen (NaTEG) wurden in dieser Studie die

laborspezifischen Normwerte verwendet (vgl. Tab. 1). Abbildung 7 zeigt eine unauffällige Thrombelastographiekurve.

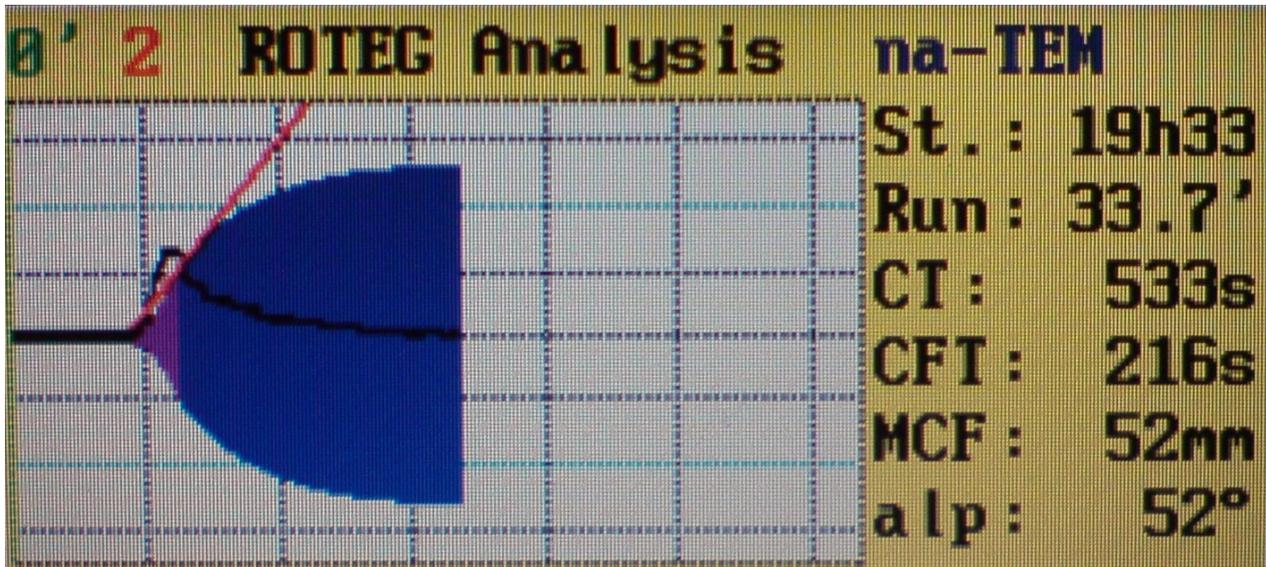


Abbildung 7: unauffälliges nicht aktiviertes Thrombelastogramm

$CT_{na}$	480 - 960sec
$CFT_{na}$	180 - 600sec
$MCF_{na}$	45 - 60mm

Tabelle 1: Laborspezifische Normwerte für die nicht aktivierte Thrombelastographie.

#### 1.2.2.2. ExTEG (extrinsisch aktivierte Thrombelastographie)

Der ExTEG unterscheidet sich dadurch vom NaTEG, dass bei dieser Messung zusätzlich zum star-TEM® noch ex-TEM® Reagenz hinzu gegeben wird, wodurch das extrinsische Gerinnungssystem aktiviert wird. Das ex-TEM® Reagenz setzt sich aus Thromboplastin (aus

Kaninchenhirn), Konservierungsmitteln, Heparin-Inhibitor und Puffer zusammen. Die Zugabe von ex-TEM® zur Probe bewirkt eine milde, standardisierte Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade durch den zugesetzten 'tissue factor' (Thromboplastin). Die Gerinnungsaktivierung mit ex-TEM® erfolgt deutlich rascher als bei der alleinigen Rekalzifizierung mit star-TEM®. Außerdem werden die aktivierten Messungen vom Hersteller als unempfindlicher auf die Probenqualität beschrieben. (Pentapharm GmbH).

Dadurch erhält man beim ExTEG die ersten Parameter bereits innerhalb weniger Minuten. Abbildung 8 zeigt eine unauffällige Thrombelastographiekurve.

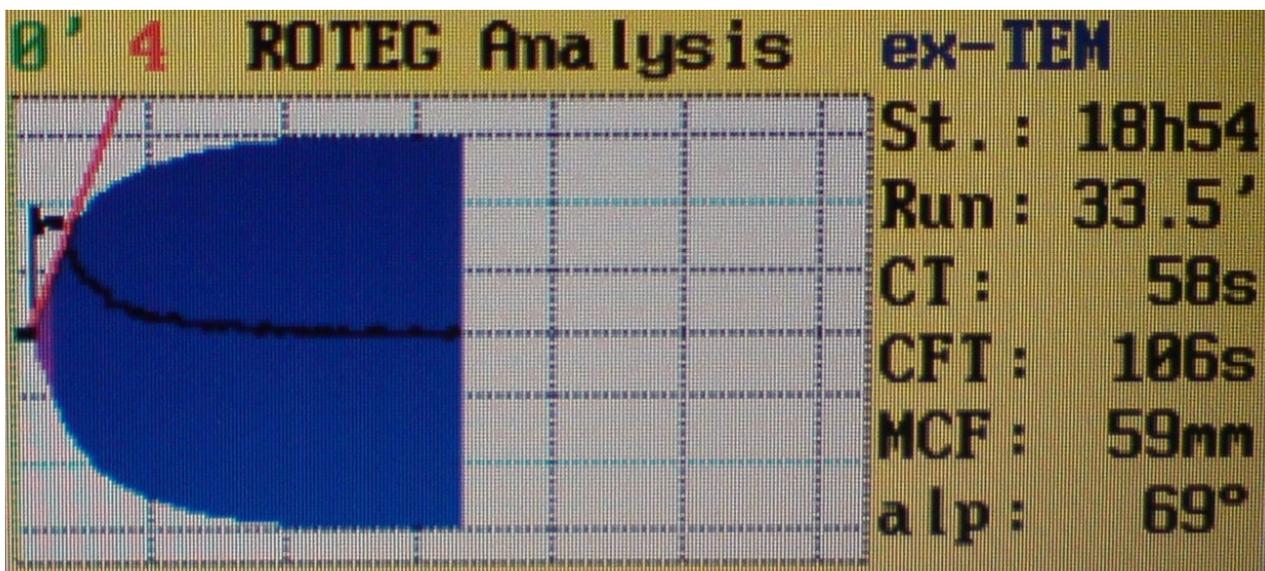


Abbildung 8: unauffälliges 'tissue factor'-aktiviertes Thrombelastogramm.

Da für die 'tissue factor'-aktivierte Thrombelastographie bisher keine laborspezifischen Normwerte ermittelt wurden, wurden in dieser Studie die von Pentapharm GmbH angegebenen Referenzbereiche verwendet (vgl. Tab. 2).

CT <sub>ex</sub>	38 – 79sec
CFT <sub>ex</sub>	34 – 159sec
MCF <sub>ex</sub>	50 – 72mm

*Tabelle 2: Referenzbereiche für die 'tissue factor'-aktivierte Thrombelastographie. Gebrauchsanweisung ex-TEM® Pentapharm GmbH*

### **1.2.3. Klinische Bedeutung der Thrombelastographie**

Die Blutgerinnung basiert auf vielen komplexen Wechselwirkungen zwischen endogenen bzw. exogenen Aktivatoren und Inhibitoren, plasmatischen Faktoren, zellulären Bestandteilen und dem Endothel. Bei Blutungskomplikationen ergibt sich folglich eine breite Palette an therapeutischen Optionen wie z.B. die Verabreichung von Gerinnungsfaktoren, Thrombozytenkonzentraten, Fibrinolysehemmern (Aprotinin), Protamin (zur Heparinneutralisation) oder eine chirurgische Intervention um die Blutung zu stoppen. Um eine gezielte Therapie einleiten zu können, bedarf es jedoch auch einer präzisen Diagnostik. Da die Standardgerinnungsparameter wie Thrombozyten, Quick und aPTT hierfür nicht ausreichen (*Zuckermann et al. 1981*), erfolgt die Therapie meist empirisch.

Zur Bestimmung von Quick und aPTT werden zentrifugierte Plasmafraktionen verwendet und somit nur isolierte Teile der Gerinnungskaskade untersucht. Außerdem endet die Quick- wie auch die aPTT-Untersuchung mit der Bildung der ersten Fibrinfäden, wobei im Körper an dieser Stelle erst die eigentlichen Gerinnungsprozesse beginnen (*Calatzis et al. 1995*). Wichtige vitale Interaktionen der Gerinnungsbildung können so nicht erkannt werden.

Mit der Thrombelastographie hat man, durch die Verwendung von Vollblut, die Möglichkeit das Ergebnis der vielen verschiedenen Interaktionen während des gesamten Gerinnungsprozesses bis zur eventuellen Lyse aufzuzeichnen und so Hinweise auf die Lokalisation einer eventuellen Störung zu erhalten. Die Thrombelastographie kann folglich viel eher die Gerinnungsprozesse in vivo darstellen, als Plasma-gestützte Untersuchungen.

### 1.3. Aufgabenstellung

Bisherige Studien beschäftigten sich vor allem mit der Rolle der Thrombelastographie als 'bedside'-Methode in der Herzchirurgie, der Transplantationschirurgie sowie bei der Überwachung von Traumapatienten mit Blutungskomplikationen. Gegenstand dieser Studie sind dagegen die Routineuntersuchungen eines breiten Patientenkollektivs mit und ohne hämostasewirksamer Erkrankung bzw. Medikation.

Das Standardverfahren in der Routinediagnostik ist die nicht aktivierte Messung (NaTEG) mit dem ROTEG®-System, die bereits ausführlich in Abschnitt 1.2.2.1. beschrieben wurde.

Nachteile dieser Methode sind die wesentlich längere Laufzeit bis zum Erhalt der ersten Ergebnisse, sowie die größere Abhängigkeit von der Probenqualität im Gegensatz zu aktivierten Messungen.

In dieser Studie sollte deshalb geprüft werden ob und inwieweit die nicht aktivierte Messung (NaTEG) durch die 'tissue factor'-aktivierte Messung (ExTEG) abgelöst werden könnte. Es sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Inwieweit stimmen die Ergebnisse der 'tissue factor'-aktivierten Messungen mit denen der nicht aktivierten Messungen überein?
2. Wird die 'tissue factor'-aktivierte Messung wesentlich durch den Gerinnungsfaktor VII beeinflusst? Sind Veränderungen des Gerinnungsfaktor VII lediglich mit dem ExTEG nachweisbar?
3. Werden alle Messparameter im ExTEG durch die zusätzliche extrinsische Aktivierung beeinflusst?
4. Welche Rolle kann der ExTEG in der Routinediagnostik einnehmen?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Verwendete Materialien

#### 2.1.1. Materialien für die nicht aktivierte Thrombelastographie (NaTEG)

0,1M CaCl <sub>2</sub>	Herstellung im Universitätslabor
10ml CaCl <sub>2</sub> - Stammlösung	
100ml H <sub>2</sub> O (Ampuwa)	

#### 2.1.2. Materialien für die TF-aktivierte Thrombelastographie (ExTEG)

0,1M CaCl <sub>2</sub>	Herstellung im Universitätslabor
ex-TEM <sup>®</sup> Reagenz	Pentapharm GmbH, München

#### 2.1.3. Materialien für die Faktor VII Bestimmung

Michaelispuffer (pH 7,42)	Herstellung im Universitätslabor
175ml Puffer-Stammlösung	
175ml n/10 HCl (Salzsäure 0,1mol)	
70ml NaCl 0,9%	
455ml H <sub>2</sub> O (Ampuwa)	
Faktor VII Mangelplasma	Herstellung im Universitätslabor
Innovin (Start Reagenz)	Dade Behring, Marburg

#### 2.1.4. Verwendete Geräte

Multifuge 3 S-R	Heraeus Instruments, München
-----------------	------------------------------

Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments, München
Amax CS 160	Trinity Biotech GmbH, Lemgo
ROTEG® 05 Analyser	Pentapharm GmbH, München

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Patientenkollektiv / Blutproben**

Es wurden insgesamt 43 Blutproben (Zitratblut) von Patienten im Alter zwischen 16 und 85 Jahren (Median: 67 Jahre) untersucht. Hiervon waren 27 (62,8%) Männer und 16 (37,2%) Frauen. 18 (41,9%) Patienten litten an einer die Hämostase beeinflussende Grunderkrankung wie z.B. einer Leber-/Niereninsuffizienz, Sepsis oder Leukämie. 24 (55,8%) Patienten erhielten zum Zeitpunkt der Untersuchung lediglich Hämostase wirksame Medikamente (ohne Grunderkrankung). Bei einem Patient (2,3%) wurde bisher keine Diagnose gestellt. Mit jeder Blutprobe wurden ein ExTEG und ein NaTEG zeitgleich durchgeführt.

Zur Präzisionsprüfung von ExTEG und NaTEG wurden vier Testserien durchgeführt. Pro Serie erfolgten jeweils zwölf ExTEG- und zwölf NaTEG-Messungen. Alle Messungen wurden auf dem selben Gerät durchgeführt.

### **2.2.2. ROTEG®- Analysen**

Die ROTEG®-Analysen des Zitratbluts wurden mit einem ROTEG®-Analyser (Pentapharm GmbH, München) wie vom Gerätehersteller angegeben durchgeführt. Nach Anbringen des Stempels an das Messgerät und Platzieren der Küvette im Küvettenhalter wurden die Tests wie folgt angesetzt.

### **2.2.2.1. nicht aktivierte Thrombelastographie**

Für die nicht aktivierte Thrombelastographie wurden zunächst mit der Automatikpipette 20µl CaCl<sub>2</sub> in die auf 37°C temperierte Küvette pipettiert. Anschließend wurden mit einer neuen Pipettenspitze 320µl Zitratblut dazu pipettiert. Um eine optimale Durchmischung von Blutprobe und Reagenzien zu erreichen, wurde der Testansatz durch nochmaliges Aufziehen und Ablassen in die Pipettenspitze durchmischt. Danach wurde der Küvettenhalter schnellstmöglich in den Messkanal eingebracht. Nach ca. 45min wurden die Messungen gestoppt, das gebrauchte Testmaterial entsorgt und die Messergebnisse ausgedruckt.

### **2.2.2.2. 'tissue factor'- aktivierte Thrombelastographie**

Für die 'tissue factor'-aktivierte Thrombelastographie wurden die Blutproben zunächst für 15min im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Das auf Raumtemperatur gebrachte ex-TEM® Reagenz wurde vorsichtig durchmischt um eventuell entstandene Sedimente wieder in Suspension zu bringen. Mit der Automatikpipette wurden als erstes 20µl CaCl<sub>2</sub> in die Pipettenspitze aufgezogen. Diese 20µl CaCl<sub>2</sub> wurden anschließend in der Pipettenspitze nach oben gesogen (Luftpolster), so dass im nächsten Schritt 20µl ex-TEM® Reagenz pipettiert werden konnten, ohne dass die beiden Reagenzien in Berührung kamen. Beide zusammen wurden dann in die vorgewärmte Küvette abgelassen. Nach Aufsetzen einer neuen Pipettenspitze, wurden dem Testansatz 300µl Zitratblut zugegeben. Der Testansatz wurde, wie auch beim NaTEG, durch nochmaliges Aufziehen und wieder Ablassen in die Pipettenspitze durchmischt. Danach wurde der Küvettenhalter schnellstmöglich in den Messkanal eingebracht. Die Messungen wurden nach ca. 40min beendet, das gebrauchte Testmaterial entsorgt und die Messergebnisse ausgedruckt.

### **2.2.3. Bestimmung des Gerinnungsfaktor VII**

Um das Blutplasma für die Faktor VII Bestimmung zu gewinnen, wurden die Blutproben zunächst für 10min bei 3000g zentrifugiert. Die Messungen wurden mit dem Amax CS 160

durchgeführt. Ein Testansatz setzte sich aus folgenden Teilen zusammen:

50µl Patientenplasma + Michaelispuffer (5:1)

50µl Mangelplasma (2min auf 37°C erwärmt)

50µl Innovin (Start Reagenz)

#### **2.2.4. Statistische Analysen**

Alle Daten wurden tabellarisch erfasst und unter Verwendung der Software SPSS (Version 17.0) ausgewertet. Die Korrelationen der ROTEG®-Parameter untereinander und mit anderen erfassten Daten wurden nach Pearson ermittelt.

Die Ergebnisse der in 2.2.1. beschriebenen Testserien wurden ebenfalls mittels SPSS (Version 17.0) erfasst und ausgewertet. Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurde für jeden Parameter der Mittelwert +/- Standardabweichung und der Variationskoeffizient ermittelt.

Als signifikant wurden Werte angenommen, für die höchstens eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  gefunden wurde. Diese Werte sind jeweils mit einem Sternchen gekennzeichnet. Werte mit einem  $p \leq 0,01$  sind jeweils mit zwei Sternchen gekennzeichnet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Korrelation der entsprechenden Parameter in ExTEG und NaTEG

Um den Zusammenhang der Messergebnisse aus ExTEG und NaTEG beurteilen zu können, wurden zunächst die jeweils entsprechenden Parameter der beiden Messmethoden gegeneinander aufgetragen. Zwischen der  $CT_{ex}$  und der  $CT_{na}$  ergab sich hierbei eine signifikante Korrelation von  $p = 0,033$  (nach Pearson auf einem Niveau von  $p \leq 0,05$ ). Da der Korrelationskoeffizient mit  $r = 0,327$  jedoch eher klein war, ist die Korrelation trotz dieser Signifikanz als relativ niedrig anzusehen (vgl. Abb. 9). Ein ähnlicher Zusammenhang fand sich zwischen der  $CFT_{ex}$  und der  $CFT_{na}$ . Bei diesem Parameter ergab sich eine ähnlich signifikante Korrelation von  $p = 0,034$  bei einem relativ niedrigen Korrelationskoeffizient mit  $r = 0,325$  (vgl. Abb. 10).

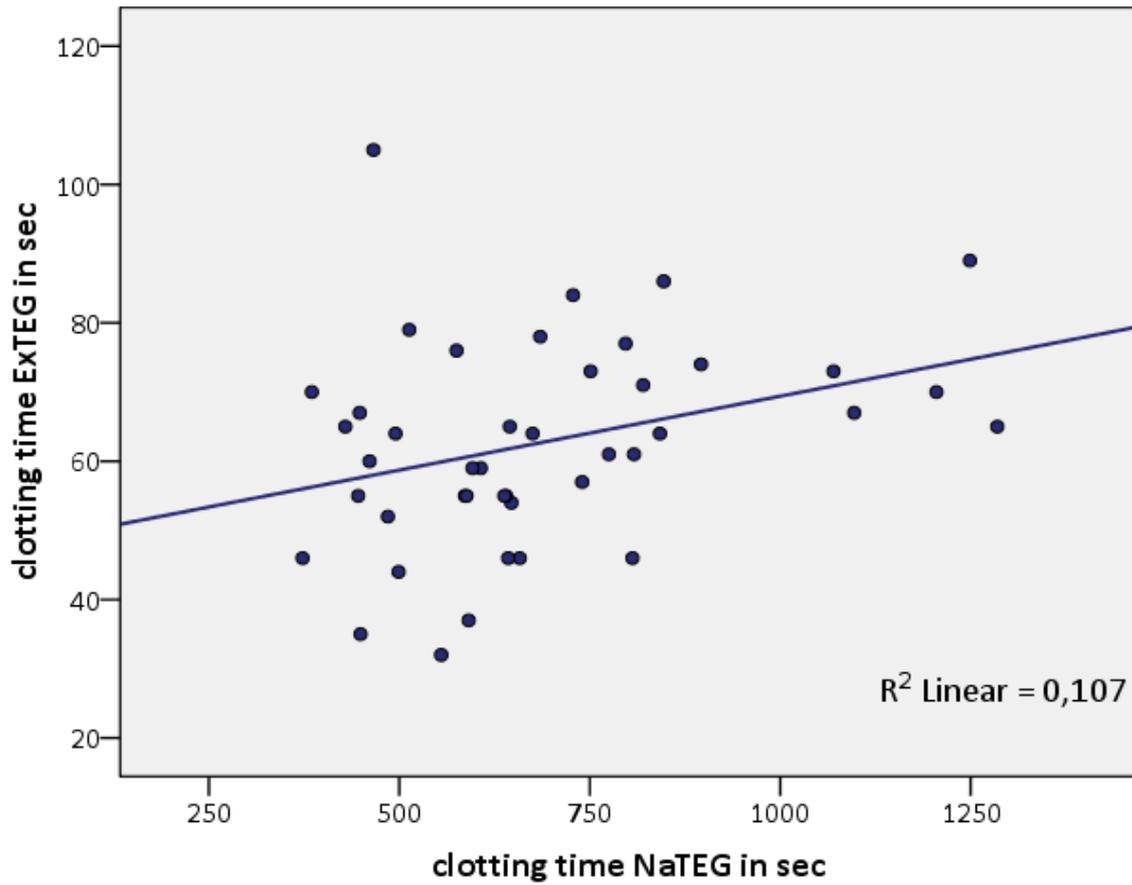


Abbildung 9: Korrelation der 'clotting time' in ExTEG und NaTEG. Dargestellt ist die Regressionsgerade mit dem Bestimmtheitsmaß der Regression  $r^2 = 0,107$ . Der Korrelationskoeffizient nach Pearson (zweiseitig) beträgt  $r = ,327^*$  ( $p = ,033$ ).

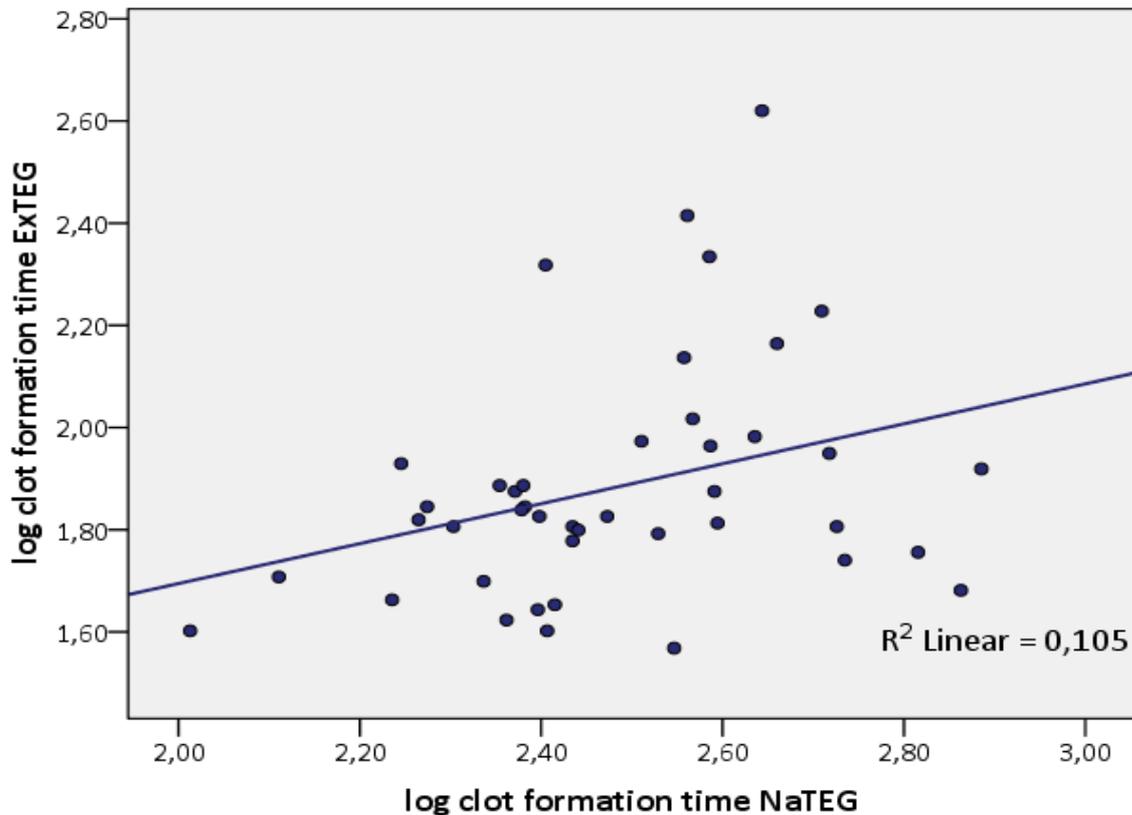


Abbildung 10: Korrelation der 'clot formation time' in ExTEG und NaTEG (logarithmische Darstellung). Dargestellt ist die Regressionsgerade mit dem Bestimmtheitsmaß der Regression  $r^2 = 0,105$ . Der Korrelationskoeffizient nach Pearson (zweiseitig) beträgt  $r = ,325^*$  ( $p = ,034$ ).

Anders als bei der CT und der CFT, ergab sich für die 'maximum clot firmness' zwischen ExTEG und NaTEG eine hohe signifikante Korrelation von  $p = 0,000$  (nach Pearson auf einem Niveau von  $p \leq 0,01$ ) mit einem Korrelationskoeffizient von  $r = 0,819$  (vgl. Abb. 11). Bereits diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die zusätzliche extrinsische Aktivierung im ExTEG einen stärkeren Einfluss auf die 'clotting time' und die 'clot formation time' hat als auf die 'maximum clot firmness'.

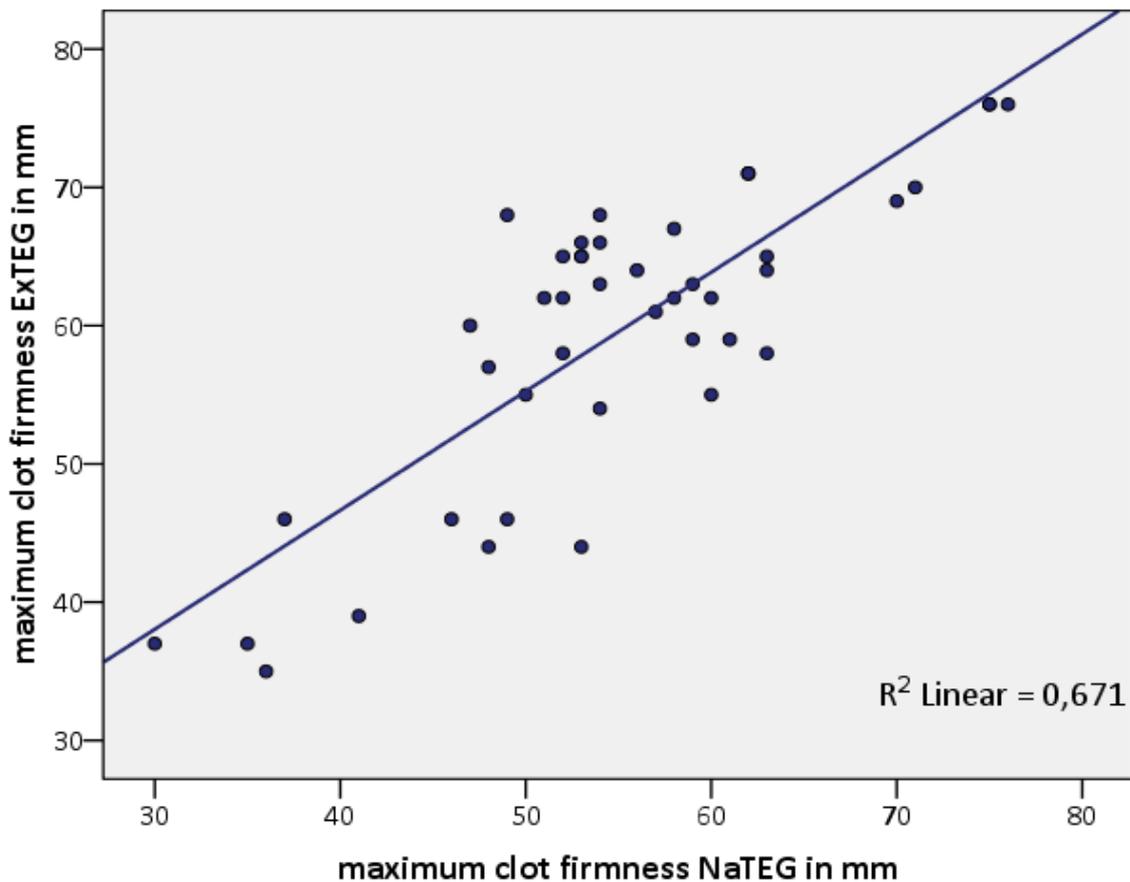


Abbildung 11: Korrelation der 'maximum clot firmness' in ExTEG und NaTEG. Dargestellt ist die Regressionsgerade mit dem Bestimmtheitsmaß der Regression  $r^2 = 0,671$ . Der Korrelationskoeffizient nach Pearson (zweiseitig) beträgt  $r = ,819^{**}$  ( $p = ,000$ ).

### 3.2. Korrelationen innerhalb von ExTEG und NaTEG

Um festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen den konsekutiven Parametern innerhalb einer Messung gibt, wurde zunächst die  $CT_{na}$  mit der  $CFT_{na}$  verglichen. Zwischen diesen beiden Parametern fand sich eine Korrelation auf hohem Signifikanzniveau ( $p \leq 0,01$ ) mit einem Korrelationskoeffizient von  $r = 0,515$  (vgl. Abb. 12). Dieser Zusammenhang zwischen  $CT_{na}$  und  $CFT_{na}$  lässt sich durch die teilweise Übereinstimmung der Einflussgrößen auf  $CT_{na}$  und  $CFT_{na}$

erklären, da sich Veränderungen der plasmatischen Gerinnungsfaktoren auf die 'clotting time' sowie auf die 'clot formation time' im NaTEG auswirken.

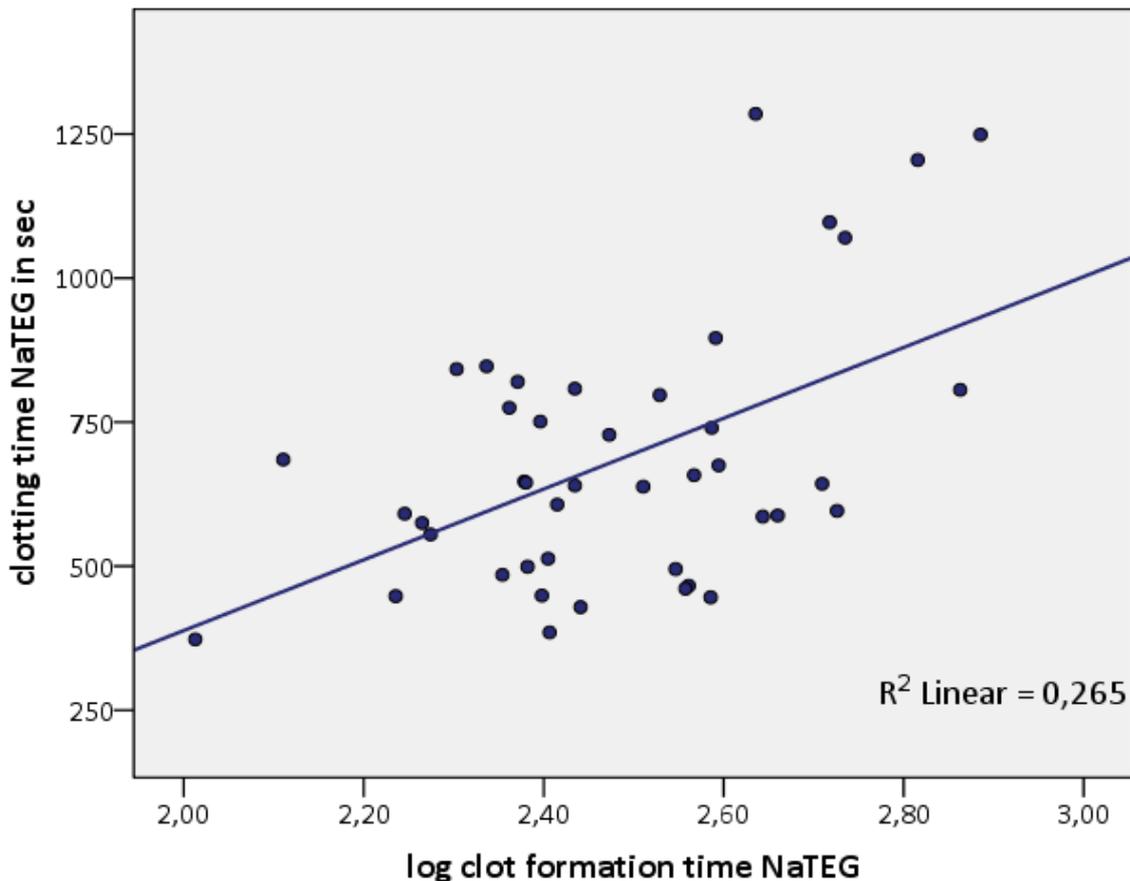


Abbildung 12: Korrelation der 'clotting time' mit dem Logarithmus der 'clot formation time' im NaTEG. Dargestellt ist die Regressionsgerade mit dem Bestimmtheitsmaß  $r^2 = 0,265$ . Der Korrelationskoeffizient nach Pearson (zweiseitig) beträgt  $r = ,515^{**}$  ( $p = ,000$ ).

Zwischen der CFT und der MCF im NaTEG fand sich ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang. Bei einem Korrelationskoeffizient von  $r = 0,458$  war das Signifikanzniveau mit  $p \leq 0,01$  auch zwischen diesen beiden Parametern hoch (vgl. Abb. 13), was wiederum auf gemeinsame Einflussgrößen zurückzuführen ist. Die 'clot formation time' ist neben den Gerinnungsfaktoren auch von Fibrinogengehalt und Thrombozytenzahl abhängig. Die beiden

letztgenannten bestimmen außerdem auch maßgeblich die 'maximum clot firmness' (*Mallet und Cox 1992*).

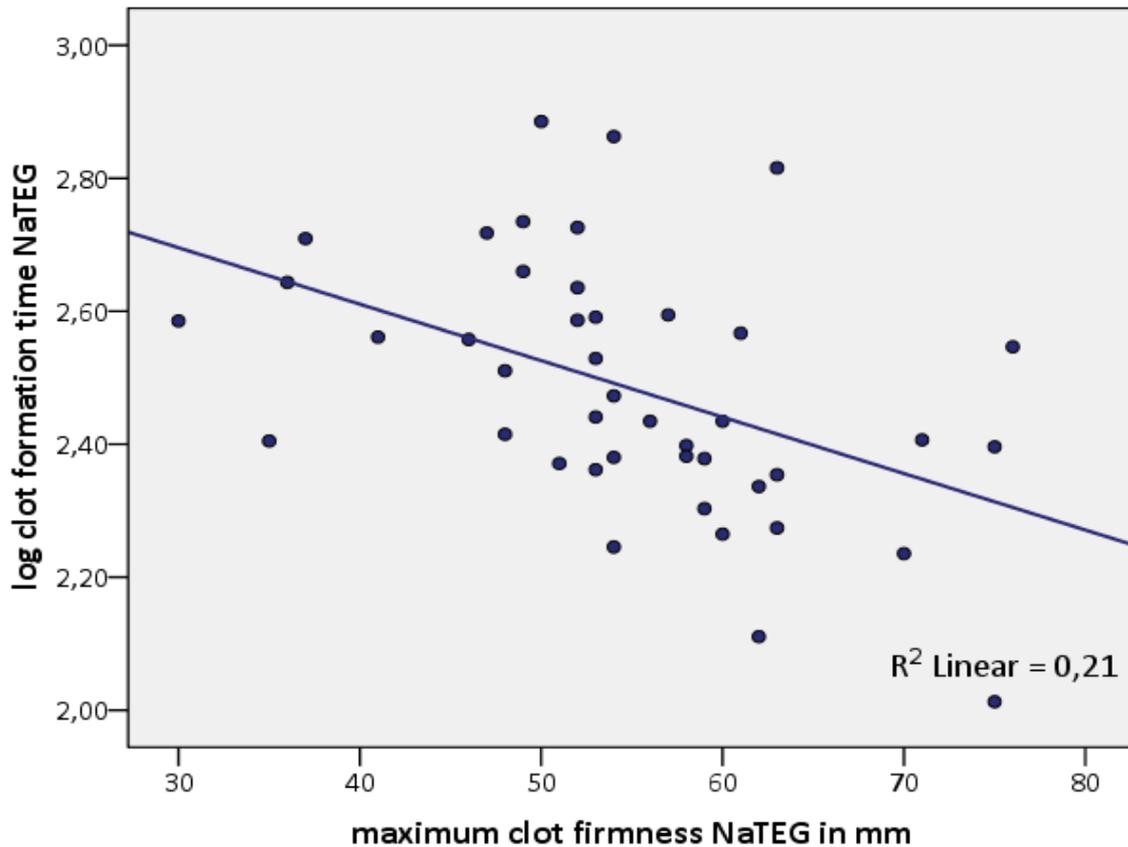


Abbildung 13: Korrelation des Logarithmus der 'clot formation time' mit der 'maximum clot firmness' im NaTEG. Dargestellt ist die Regressionsgerade mit dem Bestimmtheitsmaß  $r^2 = 0,21$ . Der Korrelationskoeffizient nach Pearson (zweiseitig) beträgt  $r = ,458^{**}$  ( $p = ,002$ ).

Mit den Messergebnissen des ExTEG wurden dieselben Vergleiche angestellt wie mit den Parametern des NaTEG. Auffallend war hier, dass sich anders als im NaTEG kein Zusammenhang zwischen  $CT_{ex}$  und  $CFT_{ex}$  feststellen ließ (vgl. Abb. 14). Durch die zusätzliche extrinsische Aktivierung im ExTEG ist die 'clotting time' bei diesem Messverfahren nicht wie im NaTEG von mehreren Gerinnungsfaktoren abhängig, sondern wird im Wesentlichen nur vom

Gerinnungsfaktor VII beeinflusst. Die Einflussgrößen von CT und CFT stimmen somit nicht in dem Maße überein wie es beim NaTEG der Fall ist. Zwischen der  $CFT_{ex}$  und der  $MCF_{ex}$  fand sich wie im NaTEG eine hohe signifikante Korrelation von  $p = 0,000$  mit einem hohen Korrelationskoeffizient von  $r = 0,828$  (vgl. Abb. 15).

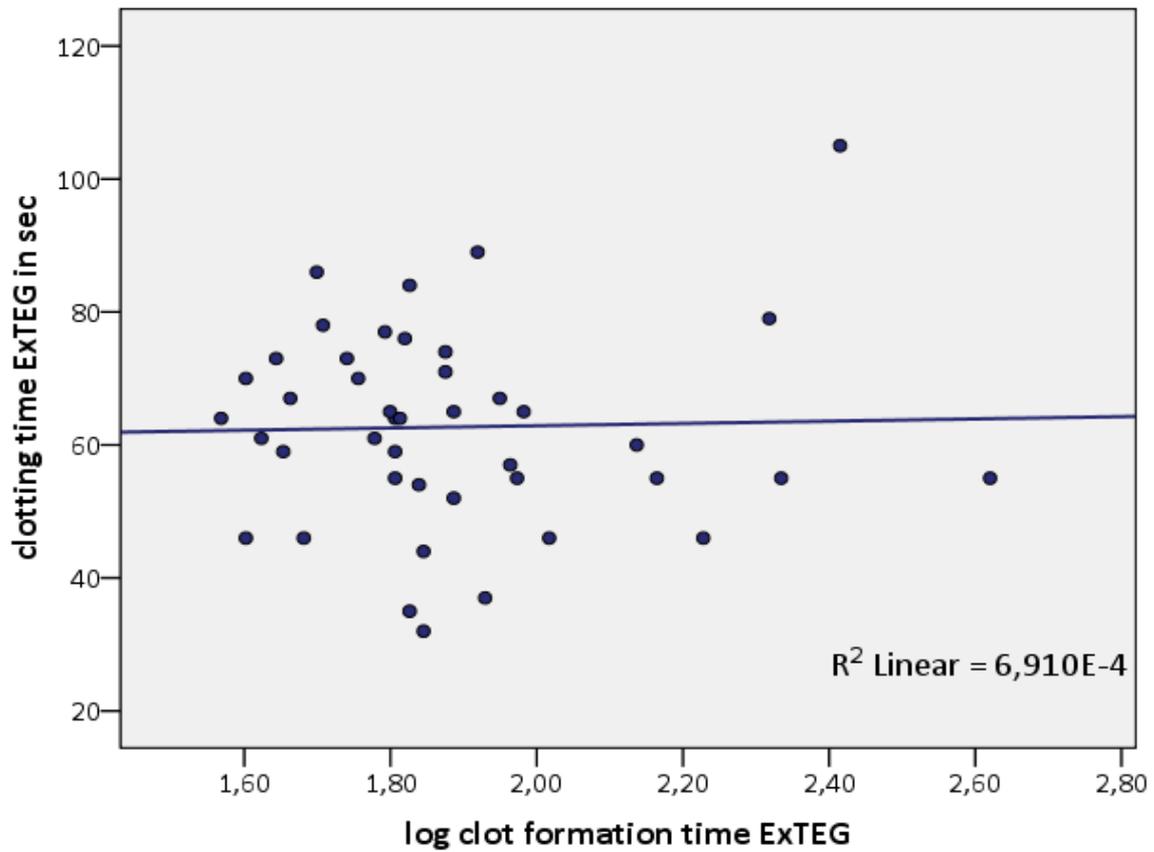


Abbildung 14: Korrelation der 'clotting time' mit dem Logarithmus der 'clot formation time' im ExTEG. Dargestellt ist die Regressionsgerade mit dem Bestimmtheitsmaß  $r^2 = 6,910E-4$ . Der Korrelationskoeffizient nach Pearson (zweiseitig) beträgt  $r = ,026$  ( $p = ,867$ ).

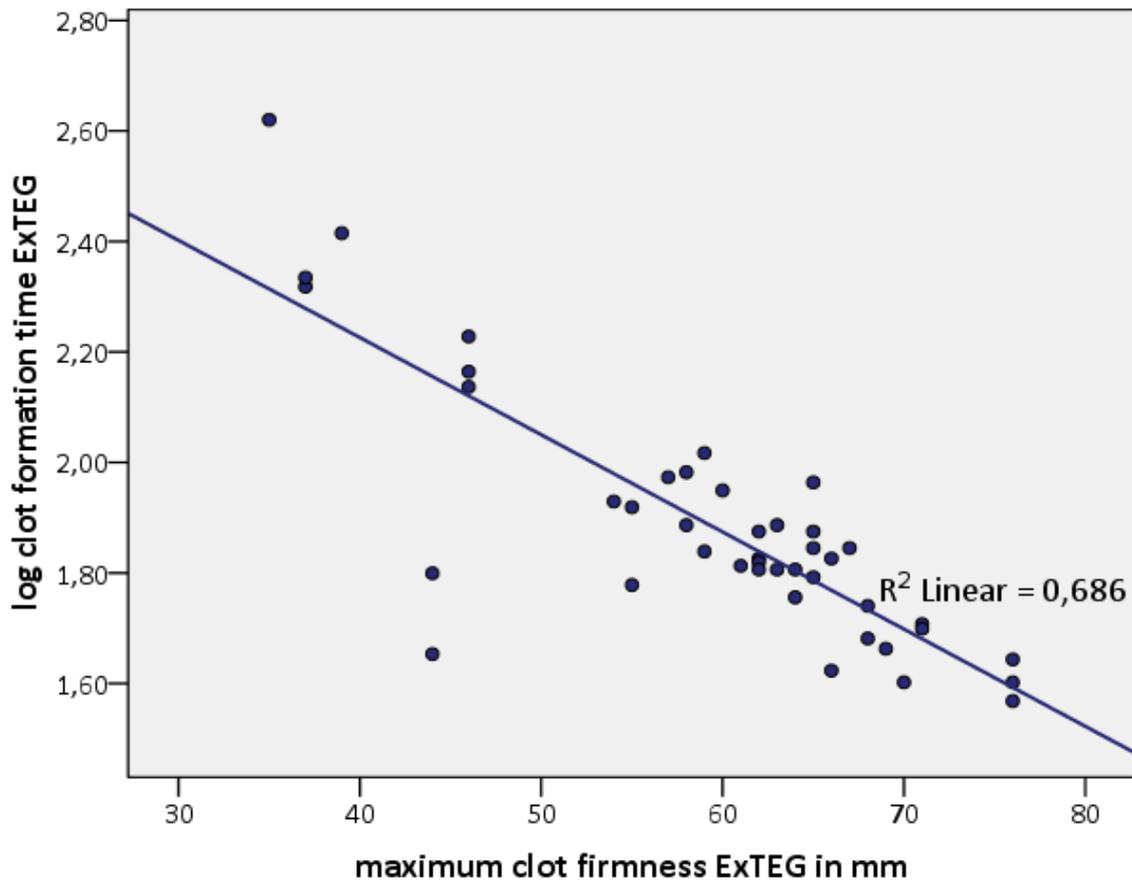


Abbildung 15: Korrelation des Logarithmus der 'clot formation time' mit der 'maximum clot firmness' im ExTEG. Dargestellt ist die Regressionsgerade mit dem Bestimmtheitsmaß  $r^2 = 0,686$ . Der Korrelationskoeffizient nach Pearson (zweiseitig) beträgt  $r = ,828^{**}$  ( $p = ,000$ ).

### 3.3. Einfluss des Gerinnungsfaktor VII auf ExTEG und NaTEG

Um festzustellen inwieweit ExTEG und NaTEG durch den Gerinnungsfaktor VII beeinflusst werden, wurde die Korrelation der einzelnen Messparameter von ExTEG und NaTEG auf Abhängigkeit vom Gerinnungsfaktor VII überprüft. Dabei zeigte einzig die 'clotting time' im ExTEG eine signifikante Korrelation mit dem Faktor VII (vgl. Tab. 3).

	Statistik	CT <sub>ex</sub>	CT <sub>na</sub>	CFT <sub>ex</sub>	CFT <sub>na</sub>	MCF <sub>ex</sub>	MCF <sub>na</sub>
<b>Faktor VII</b>	Pearson Korrelationskoeffizient	<b>-,626**</b>	-,248	,075	-,033	-,198	-,101
	Signifikanz (zweiseitig)	,000	,109	,634	,831	,204	,521

\*\* signifikante Korrelation auf einem Niveau von 0,01 (zweiseitig)

Tab. 3: Korrelation des Faktor VII mit den thrombelastographischen Parametern.

Die Korrelation zwischen CT<sub>ex</sub> und Faktor VII war bei einem Korrelationskoeffizient von  $r = 0,626$  auf hohem Niveau signifikant  $p = 0,000$  (vgl. Abb. 16).

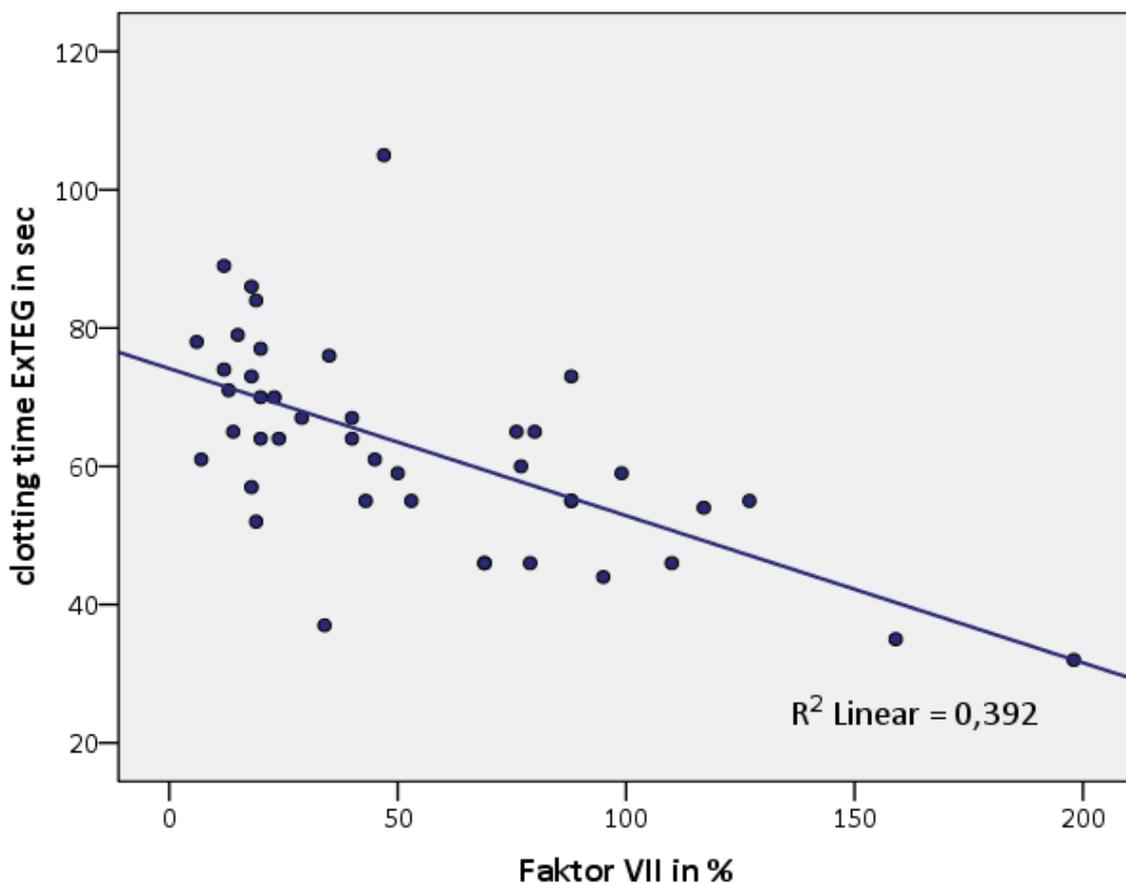


Abbildung 16: Korrelation der 'clotting time' im ExTEG mit dem Gerinnungsfaktor VII. Dargestellt ist die Regressionsgerade mit dem Bestimmtheitsmaß  $r^2 = 0,392$ . Der Korrelationskoeffizient nach Pearson (zweiseitig) beträgt  $r = ,626^{**}$  ( $p = ,000$ ).

Die Korrelation zwischen der 'clotting time' im ExTEG und dem Gerinnungsfaktor VII war mit  $r = 0,626$  deutlich stärker als die Korrelation zwischen der 'clotting time' in ExTEG und NaTEG ( $r = 0,327$ ). Um festzustellen inwieweit die Korrelation zwischen  $CT_{ex}$  und  $CT_{na}$  durch den Gerinnungsfaktor VII beeinflusst wird, wurde eine partielle Korrelation dieser beiden Parameter bedingt auf der Faktor VII-Konzentration durchgeführt, die zu keinem signifikanten Ergebnis führte ( $p = 0,148$ ). Der Zusammenhang zwischen  $CT_{ex}$  und  $CT_{na}$  beruht somit überwiegend auf der Faktor VII-Korrelation (vgl. Tab. 4).

Kontrollvariable		Statistik	$CT_{na}$ in sec
FVII in %	$CT_{ex}$ in sec	Pearson Korrelationskoeffizient	,227
		Signifikanz (zweiseitig)	,148

Tabelle 4: Partielle Korrelation der  $CT_{ex}$  mit der  $CT_{na}$

### 3.4. Qualitative Übereinstimmung der Messergebnisse

Um die qualitative Übereinstimmung der Messergebnisse zu beurteilen, wurden die Messergebnisse jedes Parameters in drei Bereiche eingeteilt:

1 = *unterhalb* des Normbereichs liegend

2 = *im* Normbereich liegend

3 = *oberhalb* des Normbereichs liegend.

Die Abbildungen 17 bis 19 zeigen für jeden Parameter in ExTEG und NaTEG die Lage der Messergebnisse zum entsprechenden Normbereich.

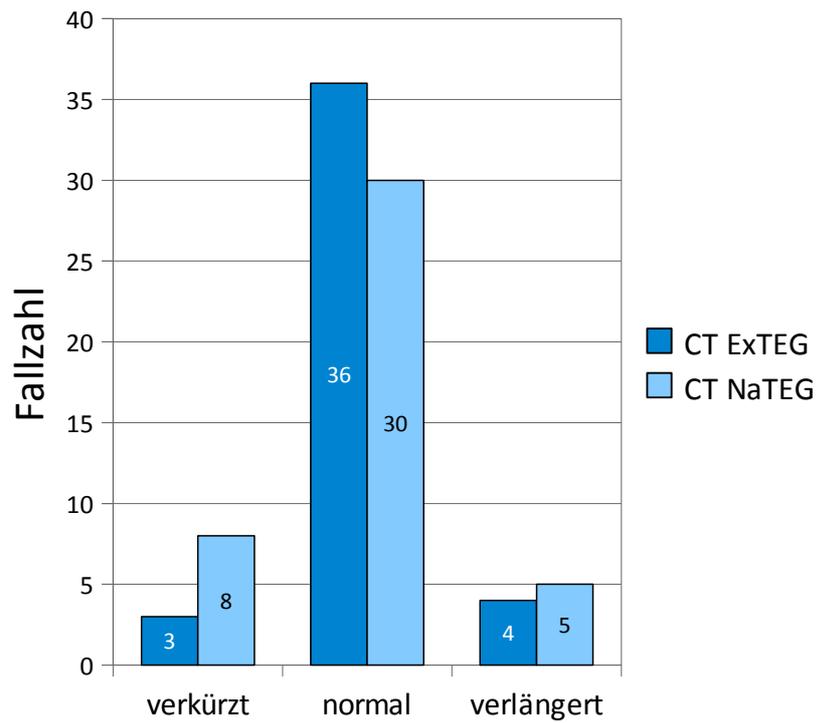


Abbildung 17: Lage zum Normbereich: 'clotting time' in ExTEG (38-79sec) und NaTEG (480-960sec).

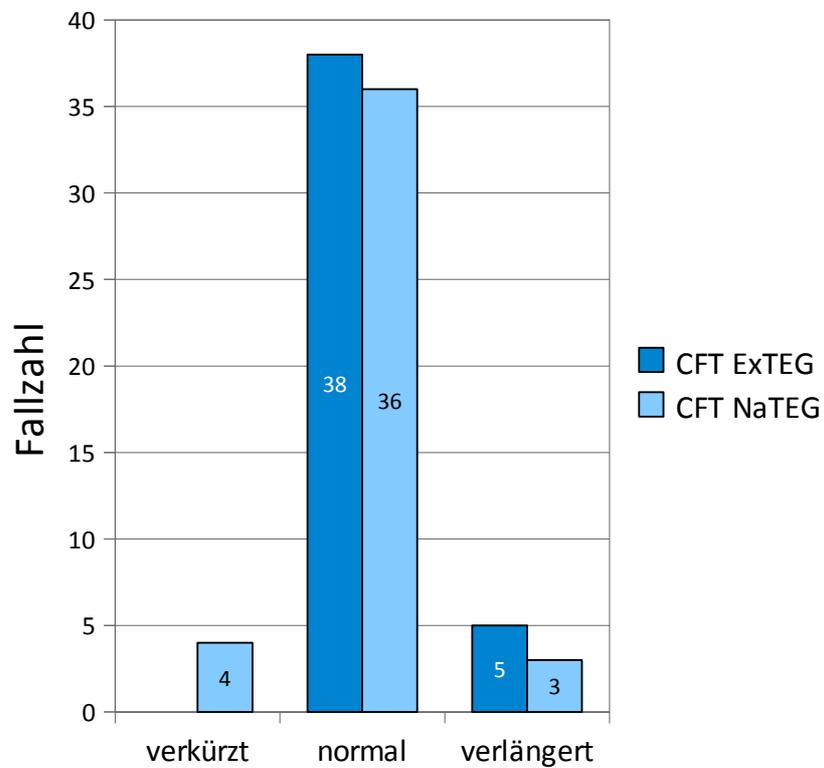


Abbildung 18: Lage zum Normbereich: 'clot formation time' in ExTEG (34-159sec) und NaTEG (180-600sec).

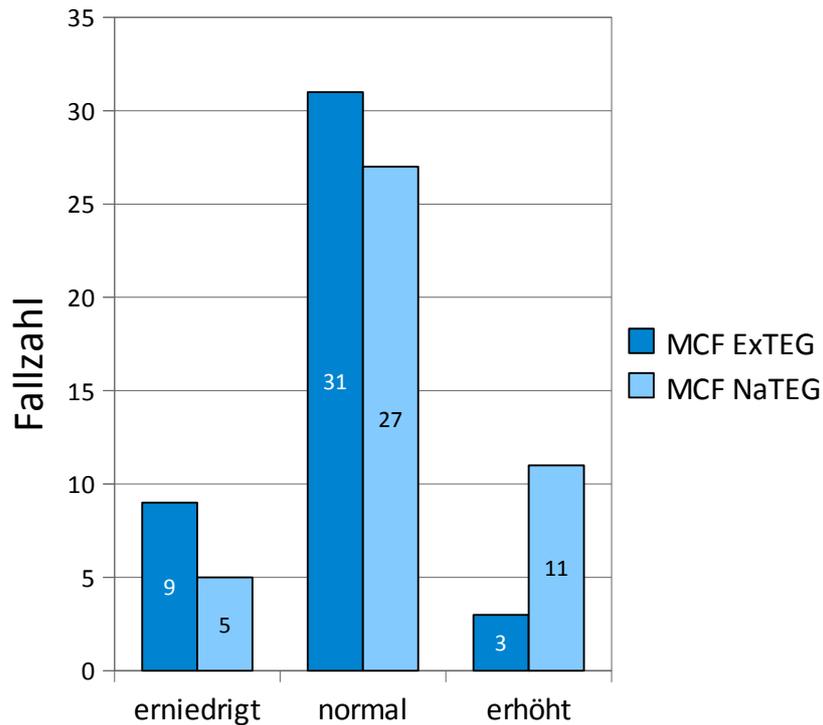


Abbildung 19: Lage zum Normbereich: 'maximum clot firmness' in ExTEG (50-72mm) und NaTEG (45-60mm).

Es zeigte sich, dass die überwiegende Zahl der Messergebnisse innerhalb der entsprechenden Normbereiche lag, wobei dies etwas häufiger für die Ergebnisse des ExTEG zutraf (81,4% vs. 72,1% beim NaTEG).

Um einen Vergleich der qualitativen Aussagen der beiden Testverfahren machen zu können, wurden die jeweils korrespondierenden Parameter bezüglich ihrer Lage zum Normbereich verglichen. Für die 'clotting time' sowie auch für die 'clot formation time' ergab sich hierbei kein signifikanter Zusammenhang zwischen ExTEG und NaTEG (vgl. Tab. 5 und 6). Dagegen zeigte die 'maximum clot firmness', wie auch bei der quantitativen Analyse (Kap. 3.1.), eine Korrelation auf hohem Signifikanzniveau ( $p = 0,000$ ) zwischen ExTEG und NaTEG mit einem Korrelationskoeffizient von  $r = 0,679$  (vgl. Tab. 7).

	Statistik	CT <sub>na</sub> (qualitativ)
<b>CT<sub>ex</sub> (qualitativ)</b>	Pearson Korrelationskoeffizient	,113
	Signifikanz (zweiseitig)	,470

Tabelle 5: Korrelation der 'clotting time' in ExTEG und NaTEG nach qualitativer Einteilung

	Statistik	CFT <sub>na</sub> (qualitativ)
<b>CFT<sub>ex</sub> (qualitativ)</b>	Pearson Korrelationskoeffizient	,021
	Signifikanz (zweiseitig)	,894

Tabelle 6: Korrelation der 'clot formation time' in ExTEG und NaTEG nach qualitativer Einteilung

	Statistik	MCF <sub>na</sub> (qualitativ)
<b>MCF<sub>ex</sub> (qualitativ)</b>	Pearson Korrelationskoeffizient	,679**
	Signifikanz (zweiseitig)	,000

\*\* signifikante Korrelation auf einem Niveau von 0,01 (zweiseitig)

Tabelle 7: Korrelation der 'maximum clot firmness' in ExTEG und NaTEG nach qualitativer Einteilung

Für alle Messwerte die in ExTEG und NaTEG qualitativ übereinstimmten, wurde die jeweilige Lage zum Normbereich ermittelt. Dabei fiel auf, dass die Messergebnisse bei qualitativer Übereinstimmung von ExTEG und NaTEG überwiegend innerhalb des entsprechenden Normbereichs lagen, wobei dies bei der 'maximum clot firmness' weniger stark ausgeprägt war. Für die 'clotting time' fanden sich insgesamt am wenigsten qualitative Übereinstimmungen (vgl. Tab. 8).

	clotting time	clot formation time	maximum clot firmness
übereinstimmend verkürzt / erniedrigt	1 (2,3%)	0 (0,0%)	5 (11,6%)
übereinstimmend normal	26 (60,5%)	31 (72,1%)	23 (53,5%)
übereinstimmend verlängert / erhöht	1 (2,3%)	0 (0,0%)	3 (7,0%)
nicht übereinstimmend	15 (34,9%)	12 (27,9%)	12 (27,9%)
Fallzahl	43	43	43

Tabelle 8: Lage zum Normbereich bei qualitativer Übereinstimmung eines Messparameters in ExTEG und NaTEG.

Bei den Messergebnissen der 'clotting time', die in ExTEG und NaTEG qualitativ nicht übereinstimmten, zeigte sich dass die Ergebnisse des ExTEG häufiger innerhalb des Normbereichs lagen als die Ergebnisse des NaTEG (vgl. Abb. 20).

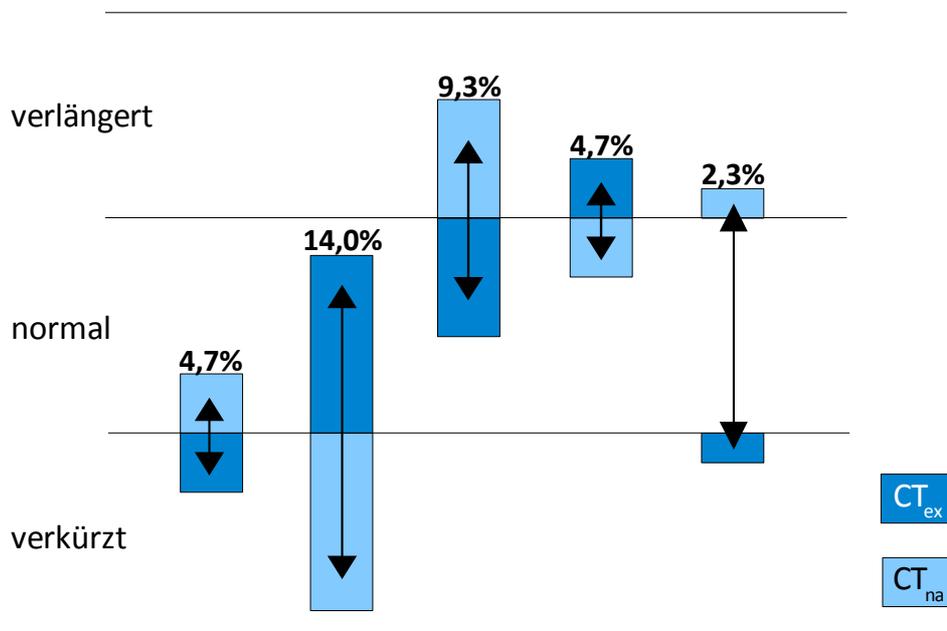


Abbildung 20: Lage zum Normbereich: 'clotting time' in ExTEG und NaTEG bei fehlender Übereinstimmung in diesem Parameter.

### 3.5. Schwankungsbreiten von ExTEG und NaTEG

Um die Genauigkeit der ExTEG- und NaTEG-Messungen feststellen und vergleichen zu können, wurden für jede Messmethode vier Testserien durchgeführt. Jede Serie bestand aus zwölf ExTEG- und zwölf NaTEG-Messungen (drei Messungen pro Kanal und Methode). Die Ergebnisse der Testserien sind in den Tabellen 9 bis 12 dargestellt. Für jeden Parameter wurde der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient (in Klammern) ermittelt.

Da in verschiedenen Studien beschrieben wurde, dass die TEG-Parameter in den ersten 30min nach Venenpunktion großen Schwankungen unterliegen (*Sorensen et al. 2003*), lagerten die Blutproben 30min vor Beginn der ersten Messung. Eine gesamte Testserie wurde in einem Zeitraum von 4,5h durchgeführt.

	clotting time (sec)	clot formation time (sec)	maximum clot firmness (mm)
<b>ExTEG</b> (12 Messungen)	61,92 ± 5,017 (8,1%)	113,67 ± 9,059 (7,97%)	57,83 ± 1,193 (2,06%)
<b>NaTEG</b> (12 Messungen)	572,75 ± 38,139 (6,66%)	225,08 ± 35,261 (15,67%)	51,17 ± 1,193 (2,33%)

Tabelle 9: Testserie 1: Angegeben sind für jeden Parameter Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient (in Klammern).

	clotting time (sec)	clot formation time (sec)	maximum clot firmness (mm)
<b>ExTEG</b> (12 Messungen)	62,67 ± 4,163 (6,64%)	79,67 ± 7,487 (9,4%)	64,33 ± 1,303 (2,03%)
<b>NaTEG</b> (12 Messungen)	567,08 ± 51,093 (9,01%)	174,08 ± 20,839 (11,97%)	55,75 ± 1,288 (2,31%)

Tabelle 10: Testserie 2: Angegeben sind für jeden Parameter Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient (in Klammern).

	<b>clotting time (sec)</b>	<b>clot formation time (sec)</b>	<b>maximum clot firmness (mm)</b>
<b>ExTEG</b> (12 Messungen)	60,91 ± 5,907 (9,7%)	80,42 ± 5,900 (7,34%)	63,92 ± 1,379 (2,16%)
<b>NaTEG</b> (12 Messungen)	556,92 ± 40,282 (7,23%)	205,75 ± 37,149 (18,06%)	54,58 ± 1,621 (2,97%)

Tabelle 11: Testserie 3: Angegeben sind für jeden Parameter Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient (in Klammern).

	<b>clotting time (sec)</b>	<b>clot formation time (sec)</b>	<b>maximum clot firmness (mm)</b>
<b>ExTEG</b> (12 Messungen)	54,33 ± 2,741 (5,05%)	104,33 ± 9,109 (8,73%)	61,58 ± 1,311 (2,13%)
<b>NaTEG</b> (12 Messungen)	527,83 ± 36,925 (7,00%)	220,83 ± 39,045 (17,68%)	52,58 ± 1,621 (3,08%)

Tabelle 12: Testserie 4: Angegeben sind für jeden Parameter Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient (in Klammern).

Bei allen Parametern fand sich ein Variationskoeffizient unterhalb von 10% mit Ausnahme der 'clot formation time' im NaTEG. Die Variationskoeffizienten dieses Parameters lagen zwischen 11,97% und 18,06%. Für die 'clotting time' und die 'maximum clot firmness' zeigten ExTEG und NaTEG ähnliche Variationskoeffizienten (vgl. Tab. 13).

Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen aus anderen Studien (Hänecke und Klouche 2007). Auch hier wurde lediglich für die CFT<sub>na</sub> ein Variationskoeffizient über 10% gefunden.

	<b>clotting time</b>	<b>clot formation time</b>	<b>maximum clot firmness</b>
<b>ExTEG</b>	5,05 - 9,7	7,34 - 9,4	2,03 - 2,16
<b>NaTEG</b>	6,66 - 9,01	11,97 - 18,06	2,31 - 3,08

Tabelle 13: Variationskoeffizienten der Testserien 1 bis 4 in ExTEG und NaTEG in %.

## 4. Diskussion

### 4.1. Korrelationen der TEG- Parameter

#### 4.1.1. 'clotting time'

Die 'clotting time' ist die Zeit vom Start der Messung bis zum Einsatz der Gerinnungsbildung. Während dieser Zeit werden die plasmatischen Gerinnungsfaktoren aktiviert und die Gerinnung wird eingeleitet. Die durchgeführten Analysen zeigten einen signifikanten Zusammenhang der 'clotting time' in ExTEG und NaTEG mit einem Korrelationskoeffizient von  $r = 0,327$  ( $p \leq 0,05$ ) (vgl. Abb. 9). Dieses Ergebnis ist nicht unbedingt zu erwarten gewesen, da die Gerinnungsinisierung in den beiden Messmethoden auf unterschiedlichem Wege erfolgt. Während es beim ExTEG über die Bildung des Faktor VIIa/TF-Komplex zur Bildung von Faktor Xa und über diesen zur Thrombinbildung kommt, wird die Gerinnung beim NaTEG durch die nicht physiologische Oberfläche der Küvettenwand über das kontaktaktivierte System (Faktoren XII, XI, IX, X, VIII, V, II) gestartet.

Beim ExTEG wird dem Testansatz eine definierte Menge 'tissue factor' zugegeben. Dieser bildet mit dem Gerinnungsfaktor VII einen Komplex und aktiviert die Faktoren IX und X. Auf diesem Weg wird auch unter physiologischen Bedingungen die Gerinnung gestartet (Mc Vey 1999). Da der zugegebene 'tissue factor' nur zusammen mit dem Gerinnungsfaktor VII die Gerinnung einleiten kann, war ein sehr starker Zusammenhang der  $CT_{ex}$  mit dem Gerinnungsfaktor VII zu erwarten, der sich auch in den Ergebnissen zeigte (Korrelationskoeffizient  $r = 0,626$ , Signifikanzniveau  $p \leq 0,01$ ). Auch in früheren Studien wurde dieser Zusammenhang beschrieben (Audu et al. 2006, Nielsen et al. 2005). Da die  $CT_{ex}$  stärker mit dem Gerinnungsfaktor VII korrelierte als mit der  $CT_{na}$ , kann davon ausgegangen werden, dass durch den starken Einfluss des Faktor VII auf die Gerinnungsinisierung im ExTEG, die kontaktvermittelte Gerinnung hier im Wesentlichen überdeckt wird. Für die trotzdem signifikante Korrelation von  $CT_{ex}$  und  $CT_{na}$  könnte es folgende Erklärungen geben: Auch wenn beim ExTEG die Gerinnung über den Faktor VIIa/TF-Komplex gestartet wird, sind die  $CT_{ex}$  wie auch die  $CT_{na}$  gleichsam abhängig von der Konzentration der Faktoren IX, X, VIII, V und II (Nielsen

*et al. 2005*). Besonders gilt dies für den Faktor Xa, da er als Hauptaktivator des Faktor VII gilt (*Butenas und Mann 1996*). Nielsen *et al.* (2005) konnten zeigen, dass der Faktor Xa essentiell für eine ungestörte Gerinnung nach 'tissue factor'-Aktivierung ist. Seine proteolytische Aktivität auf den Faktor VII wird in Anwesenheit von 'tissue factor' erheblich gesteigert (*Key et al. 2007, Nemerson und Repke 1985*).

Fraglich ist, inwieweit auch beim NaTEG der Gerinnungsfaktor VII aktiviert wird. Die Ergebnisse zeigten, dass die 'clotting time' in ExTEG und NaTEG im Wesentlichen über die Faktor VII-Konzentration korrelieren. Dieser kann jedoch nur in Anwesenheit von 'tissue factor' aktiviert werden. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass 'tissue factor' nicht nur in den adventitiellen Zellen sondern auch in der Blutbahn vorkommt; gespeichert in Zellen (v.a. Monozyten und Thrombozyten), auf Mikropartikeln und im Plasma gelöst (*Engelmann et al. 2003, Giesen et al. 1999, Key et al. 2007, Monroe und Key 2007*). Die Bedeutung dieses intravaskulären 'tissue factor' ist zur Zeit Thema zahlreicher Studien (*Butenas et al. 2008, Osterud und Bjorklid 2006, Panes et al. 2007*). Für die Konzentration des aktiven 'tissue factor' im Blut werden in den aktuellen Studien sehr unterschiedliche Angaben gemacht. Auch die Aktivität des intravasalen 'tissue factor' ist nicht endgültig geklärt. Neuenschwander und Morrissey (1992) berichtete, dass der im Blut gelöste 'tissue factor' unter physiologischen Bedingungen nicht in der Lage sei die Gerinnung zu initiieren. Butenas und Mann (2004) und Butenas *et al.* (2005) vertreten die Ansicht, dass die 'tissue factor'-Konzentration im Blut von Gesunden unterhalb 20fM liegen muss, da auch schon sehr geringe Mengen 'tissue factor' die Gerinnung beeinflussen können. Eventuell wird die 'tissue factor'-Konzentration in Blutproben auch durch die Blutabnahme beeinflusst (*Audu et al. 2006, Gorton et al. 2000*). Die im Blut vorhandenen sehr kleinen Mengen 'tissue factor' reichen vermutlich nicht aus um im NaTEG die Gerinnung zu starten. Eventuell unterstützen sie aber die Autoaktivierung des Faktor VII sowie die Aktivierung des Faktor VII durch den Faktor Xa. Beide Vorgänge sind an die Anwesenheit von 'tissue factor' gebunden (*Butenas und Mann 1996, Key et al. 2007, Nemerson und Repke 1985*). Bei der nicht aktivierten Thrombelastographie könnte es über diese Rückkopplungsmechanismen zu einer minimalen Aktivierung von Faktor VII kommen und darüber zu der signifikanten Korrelation zwischen der 'clotting time' in ExTEG und NaTEG.

#### 4.1.2. 'clot formation time'

Die 'clot formation time' ist die Zeit, die das Gerinnsel braucht um eine bestimmte Grundfestigkeit zu erreichen. Sie wird durch Faktorenmängel (besonders im Prothrombinkomplex) sowie durch die Thrombozytenzahl und -funktion beeinflusst und spiegelt die Abläufe der 'propagation phase' wider (*Simioni et al. 2008*). Während dieser Phase der Gerinnung kommt es zu einer explosionsartigen Steigerung der Thrombinbildung, die für eine ausreichende Gerinnselfestigkeit nötig ist. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten bei einem Korrelationskoeffizient von  $r = 0,325$  einen signifikanten Zusammenhang ( $p \leq 0,05$ ) zwischen der 'clot formation time' in ExTEG und NaTEG (vgl. Abb. 10). Mit dem Gerinnungsfaktor VII korrelierte die 'clot formation time' bei beiden Tests nicht (vgl. Tab. 3). Zu diesem Zeitpunkt der Gerinnung unterliegt der ExTEG somit nicht mehr dem maßgeblichen Einfluss der zusätzlichen 'tissue factor'-Aktivierung. Allerdings lässt die wesentlich kürzere Testlaufzeit bis zum Erreichen der erforderlichen Gerinnselfestigkeit von 20mm, trotzdem einen zusätzlichen Einflussfaktor auf die 'clot formation time' im ExTEG vermuten. Möglicherweise führt die große Menge 'tissue factor' im ExTEG zu einem gesteigerten Ablauf der Rückkopplungsmechanismen (siehe Kap. 1.1.2.1.) während dieser Phase der Gerinnung. Die Gerinnselbildung könnte so im ExTEG zusätzlich unterstützt werden und zu einem schnelleren Erreichen der Grundfestigkeit führen.

#### 4.1.3. 'maximum clot firmness'

Die 'maximum clot firmness' ist im Gegensatz zu der 'clotting time' und der 'clot formation time' kein zeitabhängiger Parameter. Sie wird beeinflusst von der Thrombozytenzahl, der Thrombozytenfunktion und dem Fibrinogengehalt der Blutprobe. Zwischen ExTEG und NaTEG fand sich für die 'maximum clot firmness' eine Korrelation auf hohem Signifikanzniveau mit einem Korrelationskoeffizient von  $r = 0,819$  ( $p \leq 0,01$ ) (vgl. Abb. 11). Da für die 'maximum clot firmness' lediglich die am Ende gebildete Menge an Fibrin sowie die Thrombozytenzahl und -funktion entscheidend ist, hat der Weg über den das Fibrin gebildet wird keinen Einfluss auf diesen Parameter. Es ist also anzunehmen, dass die

'maximum clot firmness' nicht direkt durch die zusätzliche extrinsische Aktivierung im ExTEG beeinflusst wird. Allerdings könnte es durch die gesteigerte Gerinnungsaktivierung während der 'clotting time' und der 'clot formation time' im ExTEG auch zu einer gesteigerten Fibrinbildung kommen. In knapp 70% der Messungen lag der Wert für die  $MCF_{ex}$  höher als für die  $MCF_{na}$ . Auch der Referenzbereich für die 'maximum clot firmness' liegt beim ExTEG etwas höher als beim NaTEG.

Diese Beobachtung passt auch zu der Annahme, dass die 'tissue factor'-Aktivierung zur Verstärkung von einigen Aktivierungsmechanismen während der Gerinnungsbildung führt. Dadurch kommt es möglicherweise zu einer insgesamt etwas gesteigerten Fibrinbildung, so dass die endgültige Gerinnselfestigkeit im ExTEG allgemein höher liegt als im NaTEG.

#### **4.1.4. Korrelation der Parameter innerhalb von ExTEG und NaTEG**

Bei den Einflussgrößen, die auf die drei ermittelten Messparameter (CT, CFT, MCF) wirken, gibt es teilweise Überschneidungen. So werden die 'clotting time' wie auch die 'clot formation time' beide von den Gerinnungsfaktoren beeinflusst. Die 'clot formation time' ist zudem noch von Thrombozytenzahl und -funktion sowie vom Fibrinogengehalt abhängig, die wiederum auch die 'maximum clot firmness' maßgeblich beeinflussen.

Beim Vergleich der in einer Messung jeweils aufeinander folgenden Parameter zeigte sich, dass diese überwiegend signifikant miteinander korrelierten (vgl. Abb. 13-15). Für den NaTEG zeigte sich sowohl zwischen  $CT_{na}$  und  $CFT_{na}$  als auch zwischen  $CFT_{na}$  und  $MCF_{na}$  eine signifikante Korrelation. Der ExTEG hingegen korrelierte nur zwischen der  $CFT_{ex}$  und der  $MCF_{ex}$ . Zwischen der  $CT_{ex}$  und der  $CFT_{ex}$  ergab sich keine signifikante Korrelation (vgl. Abb. 12). Möglicherweise kommt hier der schon in Abschnitt 4.1.1. beschriebene starke Einfluss des Gerinnungsfaktor VII auf die 'clotting time' im ExTEG zum tragen. Die  $CT_{ex}$  wird als einziger Messparameter wesentlich durch den Gerinnungsfaktor VII beeinflusst. Die oben geschilderte Übereinstimmung der Einflussfaktoren auf die 'clotting time' und die 'clot formation time' ist durch diese starke Abhängigkeit der  $CT_{ex}$  vom Gerinnungsfaktor VII beim ExTEG nicht gegeben, wodurch sich die fehlende Korrelation zwischen  $CT_{ex}$  und  $CFT_{ex}$  erklären lässt.

## 4.2. Qualitative Übereinstimmung der korrespondierenden Parameter in ExTEG und NaTEG

Im klinischen Alltag spielt auch die qualitative Aussage einer Untersuchungsmethode eine wichtige Rolle. Deshalb wurden die Messergebnisse von ExTEG und NaTEG auch bezüglich ihrer Lage zum Normbereich verglichen. Bei dieser qualitativen Einteilung fand sich weder für die 'clotting time' noch für die 'clot formation time' ein signifikanter Zusammenhang zwischen ExTEG und NaTEG (vgl. Tab. 5 und 6). Dagegen zeigte die 'maximum clot firmness' eine Korrelation auf hohem Signifikanzniveau (vgl. Tab. 7). Dieses Ergebnis unterstreicht die Annahme, dass die 'maximum clot firmness' kaum durch die 'tissue factor'-Aktivierung beeinflusst wird, während die 'clotting time' diesem Einfluss stärker unterliegt. ExTEG und NaTEG erzielten deshalb für die 'maximum clot firmness' annähernd die selben Ergebnisse. Für die 'clot formation time' wäre eigentlich auch ein größerer Zusammenhang zwischen ExTEG und NaTEG zu erwarten gewesen, da für diesen Parameter keine starke Abhängigkeit von der 'tissue factor'-Aktivierung gefunden werden konnte.

Bei allen Messergebnissen, die qualitativ überein stimmten fiel auf, dass bei einer qualitativen Übereinstimmung der 'clotting time' sowie auch der 'clot formation time', die entsprechenden Messergebnisse überwiegend innerhalb des jeweiligen Normbereichs lagen (vgl. Tab. 8). Die Ursache hierfür konnte in dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Möglicherweise ist dies jedoch auf den Einfluss der 'tissue factor'-Aktivierung im ExTEG zurück zu führen. Sie könnte Grund dafür sein, dass sich die beiden Messmethoden bei Abweichungen vom Normbereich unterschiedlich verhalten und es dadurch in diesen Fällen zu einer geringeren Übereinstimmung der Messergebnisse kommt. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass sich der oben genannte Effekt nicht so stark bei den Ergebnissen der 'maximum clot firmness' zeigte. In diesem Parameter stimmten NaTEG und ExTEG bei Abweichungen vom Normbereich häufiger qualitativ überein. Wie schon vorher gezeigt werden konnte, unterliegt die 'maximum clot firmness' keinem wesentlichen Einfluss der 'tissue factor'-Aktivierung. Das Verhalten von ExTEG und NaTEG bei Abweichungen vom Normbereich in diesem Parameter ist somit vermutlich ähnlich. Kommt es zu Abweichungen der 'maximum clot firmness', werden diese auch von beiden Messmethoden erfasst.

In den Tests in denen die Ergebnisse qualitativ nicht übereinstimmten fiel auf, dass die  $CT_{ex}$  insgesamt viel häufiger normale Ergebnisse lieferte, als die  $CT_{na}$  (vgl. Tab. 9). Bei den anderen Messparametern, zeigte sich dieser Effekt nicht. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass die  $CT_{ex}$  hauptsächlich von nur einem Faktor (dem Gerinnungsfaktor VII) beeinflusst wird, während die  $CT_{na}$  durch mehrere Faktoren gleichermaßen beeinflusst wird.

Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass die gewählte qualitative Einteilung der Messparameter, deren Aussagekraft gemindert hat. Die Einteilung berücksichtigte lediglich ob ein Wert im Referenzbereich liegt oder nicht, jedoch nicht ob ein Wert z.B. 'hochnormal' oder 'niedrignormal' ist oder nur knapp unter- oder oberhalb der Normgrenze liegt. Normwerte sind zudem variable Größen, die anhand von Testserien ermittelt werden. Sie unterliegen Schwankungen und sollten deshalb für jedes Labor individuell festgelegt werden. In dieser Studie wurden für die qualitative Einteilung die laborspezifischen Normwerte für den NaTEG verwendet. Für den ExTEG standen jedoch nur die Angaben des Herstellers zur Verfügung.

### 4.3. ExTEG in der Routinediagnostik

Nach heutigem Kenntnisstand nimmt das kontaktaktivierte System der Gerinnung nur eine untergeordnete Rolle bei der physiologischen Gerinnung ein. Bei Mängeln des Faktor XII, von hochmolekularem Kininogen oder Präkallikrein kommt es zu keiner Beeinträchtigung der Gerinnung in vivo, auch wenn eine beeinträchtigte Funktion dieser Parameter mit der aPTT nachgewiesen werden kann (*Gailani und Broze 1993*). Lediglich der Faktor XI scheint für die normale Blutgerinnung wichtig zu sein. Der Faktor XI kann jedoch unabhängig von Faktor XII auch durch Thrombin oder durch eine über Faktor XIa vermittelte Autoaktivierung aktiviert werden (*Butenas und Mann 2002, Gailani und Broze 1993, Naito und Fujikawa 1991*). Bei der nicht aktivierten Thrombelastographie wird die Gerinnung über die nicht physiologische Oberfläche der Küvettenwand und damit über den Faktor XII gestartet. Es wird jedoch heute allgemein angenommen, dass die Gerinnung in vivo durch den Faktor VIIa/TF-Komplex gestartet wird. Die nicht aktivierte Thrombelastographie spiegelt also nicht die physiologischen Vorgänge

der Gerinnungsinitiierung wider. Ein den physiologischen Bedingungen entsprechendes Verfahren stellt die 'tissue factor'-aktivierte Thrombelastographie dar. Durch die Zugabe von 'tissue factor' zur Blutprobe wird die Gerinnung wie auch in vivo durch die Bildung des Faktor VIIa/TF-Komplex gestartet. Über die Faktoren IX und X kommt es zur Bildung einer kleinen Menge Thrombin, die wiederum die Faktoren V, VIII und XI aktiviert und die Gerinnung aufrecht erhält. Somit können alle für die Gerinnung wichtigen Faktoren auch mit dem ExTEG erfasst werden.

Die Ergebnisse konnten zeigen, dass die 'clotting time' wesentlich durch die 'tissue factor'-Aktivierung im ExTEG beeinflusst wird. Für die 'clot formation time' und die 'maximum clot firmness' konnte dieser Zusammenhang nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse lassen jedoch trotzdem einen eventuell nur geringen Einfluss durch die 'tissue factor'-Aktivierung vermuten. Fraglich ist, ob die Menge an zugegebenem TF der freigesetzten Menge in vivo entspricht. Sorensen et al. (2003) konnten zeigen, dass es mit steigender 'tissue factor'-Konzentration in der Thrombelastographie zu einem Angleich der Messergebnisse von Gesunden und Hämophilen kommt. Bei niedrigen 'tissue factor'-Konzentrationen waren für diese Hämophilie-Patienten dagegen pathologische Werte gemessen worden. Das könnte darauf hindeuten, dass eine hohe 'tissue factor'-Konzentration zu einer Kompensation bzw. Verschleierung von Faktorenmängeln führt wie es auch schon Hoffmann et al. (1995) für einen Faktor IX-Mangel zeigen konnte.

Auch wenn der ExTEG besser die physiologischen Bedingungen der Gerinnungsinitiierung widerspiegelt als der NaTEG, kann nicht abschließend gesagt werden, ob während der weiteren Gerinnungsprozesse, die Aktivität der anderen Gerinnungsfaktoren durch die zusätzliche 'tissue factor'-Aktivierung zu stark verdeckt wird.

Vor kurzem konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die 'tissue factor'-aktivierte Thrombelastographie mit hoher Signifikanz das Blutungsrisiko bei Hunden vorraussagen kann (*Wiinberg et al. 2009*). Weitere Studien könnten klären, inwieweit die 'tissue factor'-aktivierte Thrombelastographie auch beim Menschen mit den klinischen Zeichen einer Hämostasestörung übereinstimmt.

## 5. Zusammenfassung

Der 'Tissue factor' gilt heute als der wichtigste Initiator der physiologischen Blutgerinnung. Nach einer Gefäßverletzung tritt der 'tissue factor' in Kontakt mit dem Blutgerinnungsfaktor VII und bildet mit ihm den Faktor VII/TF-Komplex, der die Gerinnungskaskade startet. Die anschließende Bildung eines ausreichend stabilen Gerinnsels beruht auf vielfältigen Wechselwirkungen zwischen zellulären und plasmatischen Blutbestandteilen. Seit Entwicklung der Thrombelastographie durch Hellmut Hartert, ist es möglich diese Mechanismen mit nur einer Untersuchung aufzuzeichnen. In der Routine-Labordiagnostik mit dem ROTEG®-System wird standardmäßig eine nicht aktivierte Messung (NaTEG) durchgeführt bei der die Gerinnung über die nicht physiologische Oberfläche der Küvettenwand gestartet wird. In der vorliegenden Studie wurden die nicht aktivierten Messungen mit den 'tissue factor'-aktivierten Messungen quantitativ und qualitativ verglichen. Außerdem wurde der Einfluss des Gerinnungsfaktor VII auf die einzelnen Messparameter betrachtet.

Die Ergebnisse zeigen eine gute quantitative und qualitative Korrelation zwischen der 'maximum clot firmness' in ExTEG und NaTEG. Außerdem korrelierte die 'maximum clot firmness' bei beiden Messmethoden sehr gut mit der 'clot formation time', während sich mit dem Gerinnungsfaktor VII keine Korrelation ergab. Die 'tissue factor'-Aktivierung im ExTEG hat somit keinen wesentlichen Einfluss auf die 'maximum clot firmness'.

Für die 'clotting time' fand sich lediglich bei der quantitativen Analyse eine signifikante Korrelation zwischen ExTEG und NaTEG. In den weiteren Analysen zeigte sich jedoch, dass dieser Zusammenhang hauptsächlich auf einer Faktor VII-Korrelation beruht. Die 'clotting time' im ExTEG war als einziger Parameter stark abhängig vom Gerinnungsfaktor VII, was auf einen deutlichen Einfluss durch die 'tissue factor'-Aktivierung schließen lässt. Die  $CT_{ex}$  ist deshalb sehr gut geeignet Veränderungen des Faktor VII nachzuweisen und erfasst als einziger Parameter die wichtige Funktion des Gerinnungsfaktor VII für den Gerinnungsstart.

Die 'clot formation time' korrelierte wie auch die 'clotting time' nur in der quantitativen Analyse zwischen ExTEG und NaTEG signifikant. Der Gerinnungsfaktor VII hatte auf diesen Parameter keinen Einfluss.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die 'tissue factor'-aktivierte Thrombelastographie eine gute

Alternative zur nicht aktivierten Thrombelastographie darstellt, da er vielmehr die physiologischen Bedingungen des Gerinnungsstarts widerspiegelt als der NaTEG. Um eine abschließende Aussage über die Einsetzbarkeit des ExTEG in der Routinediagnostik machen zu können, bedarf es jedoch weiterer Studien, in denen der Einfluss der 'tissue factor'-Aktivierung auf die 'clot formation time' genauer untersucht wird. Möglicherweise werden durch die 'tissue factor'-Aktivierung im ExTEG Beeinträchtigungen von Gerinnungsabläufen während der 'propagation phase' schlechter dargestellt als bei der nicht aktivierten Messung.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Anlagerung der Thrombozyten an die verletzte Gefäßregion.....	11
Abb. 2: Ablauf der Blutgerinnung, Gerinnungskaskade.....	12
Abb. 3: Schema zum Prinzip des HARTERTschen Thrombelastographen.....	16
Abb. 4: Das ROTEG®-System.....	17
Abb. 5: Abtastsystem des ROTEG®-Systems.....	18
Abb. 6: Thrombelastogramm mit den Messparametern 'clotting time', 'clot formation time' und 'maximum clot firmness'.....	19
Abb. 7: unauffälliges nicht aktiviertes Thrombelastogramm.....	21
Abb. 8: unauffälliges 'tissue factor'-aktiviertes Thrombelastogramm.....	22
Abb. 9: Korrelation der 'clotting time' in ExTEG und NaTEG.....	30
Abb. 10: Korrelation der 'clot formation time' in ExTEG und NaTEG.....	31
Abb. 11: Korrelation der 'maximum clot firmness' in ExTEG und NaTEG.....	32
Abb. 12: Korrelation der 'clotting time' mit dem Logarithmus der 'clot formation time' im NaTEG.....	33
Abb. 13: Korrelation des Logarithmus der 'clot formation time' mit der 'maximum clot firmness' im NaTEG.....	34
Abb. 14: Korrelation der 'clotting time' mit dem Logarithmus der 'clot formation time' im ExTEG.....	35
Abb. 15: Korrelation des Logarithmus der 'clot formation time' mit der 'maximum clot firmness' im ExTEG.....	36
Abb. 16: Korrelation der 'clotting time' im ExTEG mit dem Gerinnungsfaktor VII.....	37
Abb. 17: Lage zum Normbereich: 'clotting time' in ExTEG und NaTEG.....	39
Abb. 18: Lage zum Normbereich: 'clot formation time' in ExTEG und NaTEG.....	39
Abb. 19: Lage zum Normbereich: 'maximum clot firmness' in ExTEG und NaTEG.....	40
Abb. 20: Lage zum Normbereich: 'clotting time' in ExTEG und NaTEG bei fehlender Übereinstimmung in diesem Parameter.....	42

## 7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Laborspezifische Normwerte für die nicht aktivierten Thrombelastographie.....	21
Tab. 2:	Referenzbereiche für die 'tissue factor'-aktivierte Thrombelastographie.....	23
Tab. 3:	Korrelation des Faktor VII mit den thrombelastographischen Parametern.....	37
Tab. 4:	Partielle Korrelation der $CT_{ex}$ mit der $CT_{na}$ .....	38
Tab. 5:	Korrelation der 'clotting time' in ExTEG und NaTEG nach qualitativer Einteilung.....	41
Tab. 6:	Korrelation der 'clot formation time' in ExTEG und NaTEG nach qualitativer Einteilung.....	41
Tab. 7:	Korrelation der 'maximum clot firmness' in ExTEG und NaTEG nach qualitativer Einteilung.....	41
Tab. 8:	Lage zum Normbereich bei qualitativer Übereinstimmung eines Messparameters in ExTEG und NaTEG.....	42
Tab. 9:	Testserie 1.....	43
Tab. 10:	Testserie 2.....	43
Tab. 11:	Testserie 3.....	44
Tab. 12:	Testserie 4.....	44
Tab. 13:	Variationskoeffizienten der Testserien 1 bis 4 in ExTEG und NaTEG in %.....	44

## 8. Literaturverzeichnis

Audu P, Nielsen VG, Armstead V, Powell G, Kim J, Kim L, Mehta M. The Impact of Tissue Factor Pathway Inhibitor on Coagulation Kinetics Determined by Thrombelastography. *Anesth Analg* 2006; 103: 841-845

Bach RR. Tissue factor encryption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 456-461

Benedetto PDI, Baciarello M, Cabetti L, Martucci M, Chiaschi A, Bertini L. Thrombelastography. *Minerva Anesthesiol* 2003; 69: 501-515

Bowbrick VA, Mikhailidis DP, Standsby G. Value of Thrombelastography in the Assessment of Platelet Function. *Clin Appl Thromb Hemost* 2003; 9: 137-142

Butenas S, Mann KG. Kinetics of Human Factor VII Activation. *Biochemistry* 1996; 35: 1904-1910

Butenas S, van 't Veer C, Mann KG. Evaluation of the Initiation Phase of Blood Coagulation Using Ultrasensitive Assays for Serine Proteases. *J Biol Chem* 1997; 272: 21527-21533

Butenas S, Mann KG. Blood Coagulation. *Biochemistry* 2002; 67: 3-12

Butenas S, Mann KG. Active tissue factor in blood?. *Nat Med* 2004; 10: 1155-1156

Butenas S, Bouchard BA, Brummel-Ziedins KE, Parhami-Seren B, Mann KG. Tissue factor activity in whole blood. *Blood* 2005; 105: 2764-2770

Butenas S, Orfeo T, Mann KG. Tissue factor activity and function in blood coagulation. *Thromb Res* 2008; 122: 42-46

Calatzis A, Calatzis A, Kling M, Stemberger A, Hipp R. Konzept zum "bedside"-Gerinnungsmonitoring mittels modifizierter Thrombelastographie. *Anaesthesist* 1995; 44: 437

Engelmann B, Luther T, Müller I. Intravascular tissue factor pathway – a model for rapid initiation of coagulation within the blood vessel. *Thromb Haemost* 2003; 89: 3-8

Gailani D, Broze GJ Jr. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science* 1991; 253: 909

Gailani D, Broze GJ Jr. Factor XII-independent activation of factor XI in plasma: effects of sulfatides on tissue factor-induced coagulation. *Blood* 1993; 82: 813-819

Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roqué M, Fallon JT, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, Nemerson Y. Blood-borne tissue factor: Another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2311-2315

Gorton H, Lyons G, Manraj P. Preparation for regional anaesthesia induces changes in thrombelastography. *Br J Anaesth* 2000; 84: 403-404

Hänecke P, Klouche M. Thrombelastography Today: Practicability and Analytical Power. *Transfus Med Hemother* 2007; 34: 421-428

Hartert H. Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. *Klin Wochenschr* 1948; 26: 577-583

Hartert H. Die Thrombelastographie. Eine Methode zur physikalischen Analyse des Blutgerinnungsvorganges. *Z Gesamte Exp Med* 1951; 117: 189-203

Hoffman M, Monroe DM, Oliver JA, Roberts HR. Factors IXa and Xa play distinct roles in tissue factor-dependent initiation of coagulation. *Blood* 1995; 86: 1794-1801

Key NS, Geng JG, Bach RR. Tissue Factor; From Morawitz to Microparticles. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2007; 118: 165-173

Mallet SV, Cox DJA. Thrombelastography. *Br J Anaesth* 1992; 69: 307- 313

Mann KG, Orfeo T, Butenas S, Undas A, Brummel-Ziedins K. Blood coagulation dynamics in haemostasis. *Hamostaseologie* 2009; 29: 7-16

Marchal G, Leroux ME, Samama M. Atlas de Thrombodynamographie. Clinique des Maladies du Sang de la Faculté de Médecine de Paris

Mc Vey JH. Tissue Factor pathway. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999; 12: 361-372

Monroe DM, Key NS. The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1097-1105

Morawitz P. Beiträge zur Kenntnis der Blutgerinnung. *Dtsch Arch Klin Med* 1904; 79: 215-233

Morrissey JH, Macik BG, Neuenschwander PF, Comp PC. Quantitation of Activated Factor VII Levels in Plasma Using a Tissue Factor Mutant Selectively Deficient in Promoting Factor VII Activation. *Blood* 1993; 81: 734-744

Naito K, Fujikawa K. Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII: Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces. *J Biol Chem* 1991; 266: 7353

Nakagaki T, Foster DC, Berkner KL, Kiesel W. Initiation of the extrinsic pathway of blood coagulation: evidence for the tissue factor dependent autoactivation of human coagulation factor VII. *Biochemistry* 1991; 30: 10819-10824

Nemerson Y, Repke D. Tissue factor accelerates the activation of coagulation factor VII: the role of a bifunctional coagulation cofactor. *Thromb Res* 1985; 40: 351-358

Nemerson Y. Tissue factor and hemostasis. *Blood* 1988; 71: 1-8

Neuenschwander PF, Morrissey JH. Deletion of the Membrane Anchoring Region of Tissue Factor Abolishes Autoactivation of Factor VII but Not Cofactor Function. *J Biol Chem* 1992; 267: 14477-14482

Nielsen VG, Cohen BM, Cohen E. Effects of coagulation factor deficiency on plasma coagulation kinetics determined via thrombelastography®: critical roles of fibrinogen and factors II, VII, X and XII. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005; 49: 222-231

Orfeo T, Butenas S, Brummel-Ziedins KE, Mann KG. The tissue factor requirement in blood coagulation. *J Biol Chem* 2005; 280: 42887-42896

Osterud B, Bjorklid E. Sources of tissue factor. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 11-23

Osterud B, Rapaport SI. Activation of Factor IX by the reaction product of tissue factor and Factor VII: Additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5260-5264

Panes O, Matus V, Saez CG, Quiroga T, Pereira J, Mezzano D. Human platelets synthesize and express functional tissue factor. *Blood* 2007; 109: 5242-5250

Pentapharm GmbH, Gebrauchsanweisung ex-TEM® 2004-04

Seligsohn U, Osterud B, Brown SF, Griffin JH, Papaport SI. Activation of Human Factor VII in Plasma and in Purified Systems. *J Clin Invest* 1979; 64: 1056-1065

Simioni P, Spiezia L, Radu C, Bertini D. New Rotation Thrombelastography (ROTEM) in Thrombotic and Haemorrhagic Disorders: Lights and Shadows. *Hematology Meeting Reports* 2008; 2: 6-8

Sorensen B, Johansen P, Christiansen K, Woelke M, Ingerslev J. Whole blood coagulation thrombelastographic profiles employing minimal tissue factor activation. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 551-558

Spiezia L, Bertini D, Simioni P. Whole blood rotation thrombelastometry in subjects undergoing vitamin K antagonist treatment: hypo- or hypercoagulable profiles?. *Thromb Res* 2008; 122: 568-569

Vig S, Chitolie A, Bevan DH, Halliday A, Dormandy J. Thrombelastography: a reliable test?. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12: 555-561

Wasowicz M, Srinivas C, Meineri M, Banks B, McCluskey SA, Karkouti K. Technical report: Analysis of citrated blood with thrombelastography: comparison with fresh blood samples. *Can J Anaesth* 2008; 55: 284-289

Wiinberg B, Jensen AL, Rozanski E, Johansson PI, Kjelgaard-Hansen M, Tranholm M, Kristensen AT. Tissue factor activated thrombelastography correlates to clinical signs of bleeding in dogs. *Vet J* 2009; 179: 121-129

Zambruni A, Thalheimer U, Leandro G, Perry D, Burroughs AK. Thrombelastography with citrated blood: comparability with native blood, stability of citrate storage and effect of repeated sampling. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; 15: 103-107

Zuckermann L, Cohen E, Vagher JP, Woodward E, Caprini JA. Comparison of thrombelastography with common coagulation tests. *Thromb Haemost* 1981; 46: 752- 756

## 9. Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Bernd Pötzsch, für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Betreuung dieser Arbeit.

Außerdem danke ich herzlich dem Laborpersonal für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung.

Weiter möchte ich danken:

Rolf Fimmers, der stets ein offenes Ohr für meine vielen Fragen hatte und sie immer bereitwillig beantwortete.

Alexander Kloss, der mir durch viele Diskussionen geholfen hat, den roten Faden nicht zu verlieren.

Miriam Ganse, die mich ermutigt hat, diese Arbeit fertig zu stellen.

Minka Tschekorsky Orloff, die mir viele wichtige Ratschläge gab und die Arbeit trotz „Medizin-Geheimsprache“ tapfer Korrektur gelesen hat.

Lars Möllmann für das Korrekturlesen und die konstruktive Kritik.

Sebastian Hölzl für die tolle Unterstützung bei Form und Layout.