

***In-vivo*-Untersuchung der Bildung von Thrombin und
aktiviertem Protein C bei Trägern der
Faktor-V-Leiden-Mutation**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Franziska Isabelle Winterhagen

aus Solingen

2021

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Bernd Pöttsch
2. Gutachter: PD Dr. med. Jan Schrickel

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.04.2021

Aus dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. Johannes Oldenburg

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Deutsche Zusammenfassung	5
1.1 Einleitung	5
1.1.1 Venöse Thromboembolien	5
1.1.2 Die thrombophile Faktor-V-Leiden-Mutation	5
1.1.3 Klinische Expressivität der FVL	7
1.1.4 Zielsetzung	8
1.2 Material und Methoden	9
1.2.1 Studienpopulation und Injektion von rFVIIa	9
1.2.2 Probengewinnung und Laboruntersuchungen	10
1.2.3 Statistische Auswertung	12
1.3 Ergebnisse	12
1.3.1 Hämostaseparameter im Ruhezustand	12
1.3.2 Biomarker der Thrombinbildung nach Verabreichung von rFVIIa	12
1.3.3 Plasmakonzentration von APC nach Verabreichung von rFVIIa	13
1.3.4 Plasmaspiegel von D-Dimer nach Verabreichung von rFVIIa	14
1.4 Diskussion	14
1.5 Zusammenfassung	17
1.6 Literaturverzeichnis	18
2. Veröffentlichung	23
3. Danksagung	27

Abkürzungsverzeichnis

aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AT	Antithrombin
BSA	Bovines Serumalbumin
EPCR	Endothelialer Protein-C-Rezeptor
F1+2	Prothrombinfragment 1+2
FII	Gerinnungsfaktor II, Prothrombin
FIIa	Thrombin
FV	Gerinnungsfaktor V
FVa	aktivierter Gerinnungsfaktor V
FVi	inaktivierter Gerinnungsfaktor V
FVIIa	aktivierter Gerinnungsfaktor VII
FVIIIa	aktivierter Gerinnungsfaktor VIII
FVIIIi	inaktivierter Gerinnungsfaktor VIII
FVL	Faktor-V-Leiden-Mutation
FX	Gerinnungsfaktor X
i.v.	intravenös
OECA	Oligonukleotid-basierter <i>enzyme capture assay</i>
PC	Protein C
PS	Protein S
rFVIIa	rekombinanter aktivierter Gerinnungsfaktor VII
TAT	Thrombin-Antithrombin-Komplex
TFPI	<i>tissue factor pathway inhibitor</i>
TM	Thrombomodulin
VTE	Venöse Thromboembolie

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

1.1.1 Venöse Thromboembolien

Venöse Thromboembolien (VTE) zählen europaweit zu den häufigsten Erkrankungen und gehen mit einer hohen Mortalität und Morbidität einher. Zu dem Krankheitsbild der VTE zählen die tiefe Venenthrombose und die Lungenembolie sowie ihr gemeinsames Auftreten. Die tiefe Venenthrombose als Erstereignis tritt mit einer Inzidenz von 1/1000 Patientenjahren auf, eine Lungenembolie als Komplikation ist bei mehr als der Hälfte der betroffenen Patienten zu finden. Bis zu 28 % der Patienten versterben innerhalb von 30 Tagen nach einer VTE. Dies variiert in Abhängigkeit des Patientenkollektivs (Heit et al., 2001; Cohen et al., 2007).

Die Entstehung einer VTE wird durch eine Reihe exogener Risikofaktoren beeinflusst. Dazu zählen unter anderem lange Immobilisation, Schwangerschaft und größere operative Eingriffe, wie zum Beispiel solche in der Bauchhöhle oder auch Hüftoperationen. Es sind aber auch hereditäre Risikofaktoren bekannt, die Thrombosen begünstigen, als häufigster Vertreter fällt darunter die Faktor-V-Leiden-Mutation. Diese autosomal dominant vererbte Mutation des Gerinnungsfaktors V (FV) finden sich in mindestens 20 % der Patienten, bei denen es bereits im jüngeren Alter zu rezidivierenden oder unerklärlichen Thromboembolien kommt. Auch ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten früher Thrombosen und einem Mangel an Antithrombin, Protein C oder Protein S konnte gesichert werden.

In etwa einem Drittel der Fälle einer VTE konnten keine exogenen Risikofaktoren identifiziert werden. Bei dieser Gruppe liegen in ungefähr 30 % unbekannte hereditäre Risikofaktoren vor. Auch in der Gruppe der Patienten mit identifizierten exogenen Risikofaktoren können hereditäre Risikofaktoren vorliegen (Pötzsch und Madlener (Hrsg.), 2010).

1.1.2 Die thrombophile Faktor-V-Leiden-Mutation

Die Faktor-V-Leiden (FVL)-Mutation ist in der europäischen Bevölkerung der häufigste Risikofaktor für die Entwicklung einer VTE (Dahlbäck, 1997). In Abhängigkeit der geographischen Herkunft variiert die Allelfrequenz bei Kaukasiern zwischen 3 und 5 %. In

der Bevölkerung afrikanischer, amerikanischer und australischer Ureinwohner konnte dieses Allel nicht nachgewiesen werden, ebenso nicht in der asiatischen Bevölkerung (Rees, 1996).

Bei der FVL-Mutation liegt eine Punktmutation des Gerinnungsfaktors V (FV) vor, bei der es zu einem Aminosäureaustausch von Arginin durch Glutamin kommt (Position 506). Sie wird autosomal dominant vererbt. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Vorliegen dieser Mutation in heterozygoter Form mit einem fünf- bis zehnfach erhöhtem Risiko für eine VTE assoziiert ist, das Risiko homozygoten Mutationsträger sogar um das 50 bis 100-fache im Vergleich zur Normalbevölkerung. Das Hauptmanifestationsalter bei homozygoten Trägern liegt bei 31 Jahren, für heterozygote Träger bei 44 Jahren (Rosendaal et al., 1995; Dahlbäck, 2003).

Physiologische wird FV neben VIII durch das aktivierte Protein C (APC) gespalten und dadurch inaktiviert. Damit ist APC Teil der Inaktivierung prokoagulatorischer Faktoren durch proteolytische Spaltung. Das Protein C ist an Endothelzellen gebunden und die Enzymvorstufe des löslichen APC, welches durch einen Aktivierungskomplex aus Thrombin und Thrombomodulin in diese aktive Form überführt wird. Ein Kofaktor bei dieser Aktivierung ist der endotheliale Protein-C-Rezeptor (EPCR), der diesen Prozess katalysiert. APC wird nun von der Endotheloberfläche freigesetzt und hemmt durch proteolytische Spaltung der aktivierten Gerinnungsfaktoren V (FVa) und VIII (FVIIIa) die Thrombinbildung (Bouwens et al., 2016, Dahlbäck und Villoutreix, 2005). Der physiologische Mechanismus der Regulierung der Thrombinbildung durch APC ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Durch den Aminosäureaustausch im FV Protein fehlt diesem eine Spaltstelle, APC kann den FV nicht mehr inaktivieren (Bertina et al., 1994). Demzufolge kommt es zu einer erhöhten Gerinnungsneigung, da durch die verzögerte Herabregulation die nachfolgende Thrombinproduktion nicht suffizient eingedämmt wird (Castoldi und Rosing, 2010). Die Gültigkeit dieser Erklärung der FVL induzierten Hyperkoagulabilität konnte laborphänotypisch belegt werden. Dabei wurde dem Plasma von FVL-Mutationsträgern exogen APC zugegeben. Es zeigte sich im Gegensatz zum Plasma der Nicht-Mutationsträger eine verminderte Antikoagulationswirkung (Castoldi und Rosing, 2010). Dadurch kommt es zur sogenannten FVL-induzierten Hyperkoagulabilität.

Der beschriebene pathophysiologische Mechanismus wird als Resistenz gegenüber APC bzw. mit dem Begriff der APC-Resistenz bezeichnet.

Die APC-Resistenz ist ebenso die Beschreibung eines Phänotyps. In ca. 90 % der Fälle ist die APC-Resistenz mit dem Genotyp der FVL-Mutation identisch. Sie kann aber auch durch andere Veränderungen hervorgerufen werden, beispielsweise durch eine Dysfunktion von Protein S oder eine erhöhte Konzentration des FVIII (Bertina et al., 1994).

Klinisch zeigt sich die oben beschriebene Hyperkoagulabilität vor allem in tiefen Venenthrombosen, die in ca. 60 % der Fälle spontan auftreten, der Zusammenhang mit arteriellen Gefäßverschlüssen konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden.

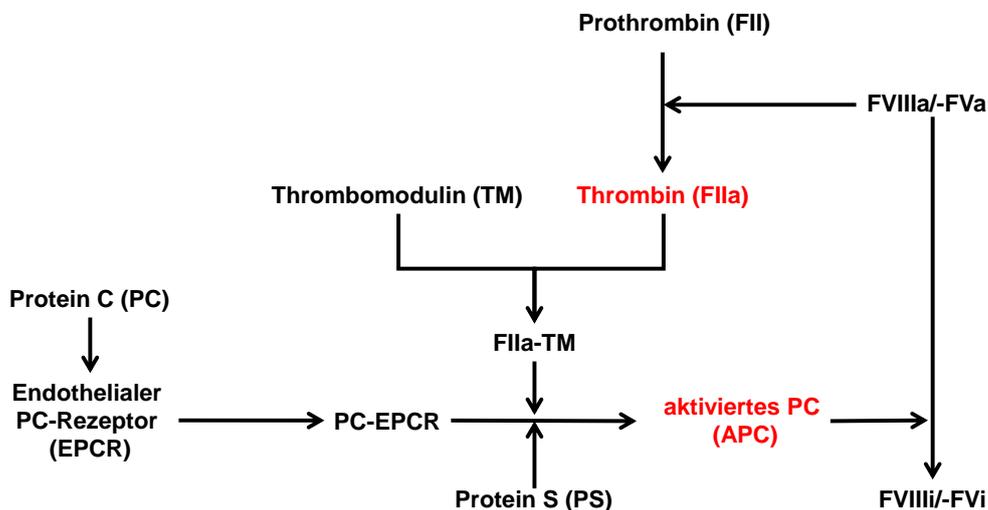


Abb. 1: Der Thrombin-APC-Mechanismus. Die Bildung von Thrombin (FIIa) aus seiner Enzymvorstufe Prothrombin (FII) wird durch die aktivierten Kofaktoren FVIIIa und FVa katalysiert. Auf der Endotheloberfläche bindet FIIa an Thrombomodulin (TM) und PC an den EPCR. Mit Protein S (PS) als Kofaktor wird in diesem Komplex APC gebildet. APC inaktiviert FVIIIa und FVa und hemmt dadurch die Thrombinbildung (eigene Darstellung).

1.1.3 Klinische Expressivität der FVL

Die Gültigkeit der oben beschriebenen Erklärung der FVL-induzierten Hyperkoagulabilität ist durch den Laborphänotyp der APC-Resistenz im Plasma der FVL-Mutationsträger belegt. Hierbei wurde durch Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (APTT) vor und nach exogener Zugabe von APC ein funktioneller Nachweis für diese Theorie erbracht. Eine geringer ausgeprägte Verlängerung der APTT gilt dabei als

Nachweis einer APC-Resistenz. Im Vergleich zu dem Plasma von Patienten ohne APC-Resistenz kommt es in diesem Fall zu einer verminderten Antikoagulationswirkung durch das exogen zugegebene APC (Castoldi und Rosing, 2010).

Die Erklärung der FVL-induzierten Hyperkoagulabilität durch eine gesteigerte Thrombinbildung zeigt sich *in vivo* durch einen erhöhten Plasmaspiegel des Prothrombinfragments 1+2 (F1+2) und des Thrombin-Antithrombin-Komplexes (TAT) (Martinelli et al., 1996; Zöller et al., 1996; Simioni et al., 1996; Gouin-Thibault et al., 2002). F1+2 entsteht bei der Thrombingenerierung als Spaltprodukt von Thrombin und ist damit ein direkter Marker der Thrombinbildung. TAT ist die Bindung des endogenen Inhibitor Antithrombin (AT) an Thrombin und gilt dadurch als Marker für die Inaktivierungsrate von Thrombin.

Auch wenn der Laborphänotyp eine ausgeprägte Homogenität unter den FVL-Mutationsträgern zeigt, erscheint der klinische Phänotyp sehr inhomogen. Es wurden Mutationsträger identifiziert, die ihr Leben lang ohne Thrombosen waren - sogar in typischen Risikosituationen wie nach operativen Eingriffen und Immobilisation. Es konnten verschiedene Erklärungen für diese Diversität nachgewiesen werden. Zum Beispiel kann neben der FVL-Mutation eine weitere prothrombotische Mutation vorliegen, wie zum Beispiel die HR2-Haplotyp-Mutation oder die Prothrombinmutation 20210G>A, aber auch Unterschiede im Plasmaspiegel des tissue factor pathway inhibitor (TFPI) (de Visser et al., 2000; Castaman et al., 2001; de Visser et al., 2005). Weiter könnte die antikoagulatorische Kapazität des Endothels die Thrombogenität modulieren, da Haplotypen und Polymorphismen des EPCR-Gens vermutlich Risikofaktoren für eine VTE darstellen (Saposnik et al., 2004; Medina et al., 2007). Mutationen des Thrombomodulin-Gens konnten mit einem erhöhten arteriellen Thromboserisiko in Verbindung gebracht werden (Auro K et al., 2006; Heit et al., 2005). Hierdurch zeigen deutliche Hinweise darauf, dass ein Ungleichgewicht zwischen der Menge des gebildeten Thrombins und der anschließenden APC-Antwort das thrombogene Potenzial der FVL-Mutation verändern.

1.1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, welchen Einfluss die FVL-Mutation *in vivo* auf die Gerinnungsaktivierung und auf die der Aktivierung folgende endothelabhängige antikoagulatorische Gegenreaktion hat. Hierzu wurde durch eine

standardisierte Gabe von rekombinantem aktiviertem Gerinnungsfaktor VII (rFVIIa) die extrinsische Gerinnung in geringem Maße aktiviert und anschließend die pro- und antikoagulatorische Reaktion beobachtet. Dazu wurden verschiedene Biomarker bestimmt, unter anderem auch durch direkte Messung von APC mit einem hochsensitiven Oligonukleotid-basiertem *enzyme capture assay* (OECA).

Drei Hypothesen wurden als Grundlage angenommen. Erstens wurde vermutet, dass durch rFVIIa eine Gerinnungsaktivierung verursacht wird, die sich in Form einer nachweisbaren Thrombinbildung zeigt. Zweitens wurde angenommen, dass diese Gerinnungsaktivierung eine antikoagulatorische Gegenreaktion in Form einer APC-Bildung auslöst. Die dritte Hypothese war, dass sowohl Gerinnungsaktivierung als auch antikoagulatorische Gegenreaktion durch die FVL-Mutation gesteigert werden.

1.2 Material und Methoden

Diese prospektive Studie wurde von Juli 2016 bis September 2017 an dem Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin an der Universität Bonn durchgeführt. Der Studienantrag wurde von dem Ethikkomitee des Universitätsklinikums Bonn genehmigt. Gemäß der Deklaration von Helsinki wurden Einverständniserklärungen der Probanden eingeholt.

1.2.1 Studienpopulation und Injektion von rFVIIa

Um zunächst die Plasmaspiegel der verschiedenen Biomarker in einem Zustand ohne Gerinnungsaktivierung zu untersuchen, wurden Blutproben von 81 Probanden ohne FVL-Mutation mit einem mittleren Alter von 30 Jahren (Spannweite von 18 bis 60 Jahren, 42 davon Frauen) und von 22 FVL-Mutationsträgern mit einem mittleren Alter von 39 (18 bis 60) Jahren (15 davon Frauen, 14 heterozygote und 8 homozygote Mutationsträger) analysiert. Einschlusskriterien waren ein normaler Body Mass Index von 18-27 kg/m² und ein geeigneter peripherer Venenstatus. Zu den Ausschlusskriterien zählten die Einnahme von Antikoagulanzen oder Antiaggreganzen in den letzten zwei Wochen vor der Blutentnahme, eine VTE in der Vorgeschichte, kardiovaskuläre oder maligne Erkrankungen, akute oder chronische Infektionen und bei Frauen Schwangerschaft oder Stillzeit.

Injektionen von rFVIIa wurden bei einer Untergruppe dieser Studienpopulation durchgeführt. Diese Untergruppe bestand aus 12 Probanden ohne FVL-Mutation (mittleres Alter 31 Jahre, sechs Frauen), 12 heterozygoten (mittleres Alter 37 Jahre, sieben Frauen) und 3 homozygoten FVL-Mutationsträgern (zwei Frauen im Alter von 22 und 60 Jahren, ein 18jähriger Mann). Bei den Probanden dieser Untergruppe erfolgten zusätzlich Untersuchungen der Leber- und Nierenfunktion durch Bestimmung von Transaminasen, γ -Glutamyltransferase, Harnstoff und Serumkreatinin. Zudem wurden die Probanden auf das Vorliegen der Prothrombinmutation 20210G>A und Mängel der Gerinnungsinhibitoren AT, PC und PS untersucht. Voraussetzung für die Durchführung der Experimente mit rFVIIa waren unauffällige Ergebnisse dieser Untersuchungen. Bei entsprechender Eignung wurde den Probanden morgens in nüchternem Zustand eine Dosis von 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ rFVIIa (eptacog alfa, Novo Nordisk A/V, Bagsvaerd, Dänemark) als Bolus i.v. injiziert. Blutentnahmen fanden unmittelbar vor der Applikation von rFVIIa sowie 10 Minuten, 30 Minuten, 1, 2, 3, 5 und 8 Stunden danach statt.

1.2.2 Probengewinnung und Laboruntersuchungen

Jede Blutprobe wurde durch frische Punktion einer Kubitalvene mittels 21 Gauge Flügelkanüle (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gewonnen. Nach Verwurf der ersten 2 ml wurden die Blutproben in Abnehmeröhrchen gesammelt, die Tri-Natriumcitrat in einer Endkonzentration von 10,5 mM enthielten (Sarstedt). Die für die spätere Messung von APC bestimmten Röhrchen enthielten zusätzlich Aprotinin (PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt, Deutschland) und Bivalirudin (The Medicines Company, Oxfordshire, Großbritannien) in Endkonzentrationen von 10 μM bzw. 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Durch Zentrifugation der Abnehmeröhrchen bei 2.600 x g für 10 Minuten wurde innerhalb von 30 Minuten nach Blutentnahme Plasma gewonnen und bei $<-70^{\circ}\text{C}$ aliquotiert bis zur späteren Messung aufbewahrt.

Der OECA zur Bestimmung von APC wurde im Mikrotiterplattenformat unter Verwendung von Maxisorp Fluoronunc Mikrotitermodulen (Nunc A/S, Roskilde, Dänemark) durchgeführt, wie in einer früheren Veröffentlichung beschrieben (Müller et al., 2012). Die Kavitäten der Mikrotitermodule wurden zunächst mit bovinem Serumalbumin (BSA)-Biotin beschichtet, indem jede Kavität mit 100 μl BSA-Biotin in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ befüllt wurde. Nach Inkubation bei 4°C über Nacht wurden die Kavitäten der

Mikrotitermodule gewaschen und danach 100 µl einer Streptavidin-Lösung in einer Konzentration von 10 µg/ml hineingegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurden überschüssigen Bindungsstellen in den Kavitäten durch Zugabe einer 2 %igen BSA-Lösung blockiert und die Mikrotitermodule mit wieder entleerten Kavitäten bei einer Temperatur von -20°C vor Gebrauch gelagert. Zur Durchführung des OECA wurde das am 3'-Ende biotinylierte APC-bindende Aptamer HS02-G52 (synthetisiert von Microsynth, Balgach, Schweiz) in die Kavitäten hineingegeben. Nach einem Waschschrift wurden anschließend die Plasmaproben hinzugefügt, die unmittelbar zuvor durch Zugabe von 1M CaCl₂ rekalkifiziert worden waren, um bei einer dadurch erreichten Endkonzentration von 7,5 mM CaCl₂ eine verbesserte Bindung von APC an das Aptamer zu erreichen. Nach Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur wurden die Module gewaschen und das fluorogene Peptidsubstrat Pefluor PCa (Pyroglu-Pro-Arg-AMC, Pentapharm, Basel, Schweiz) in die Kavitäten gegeben. Die Veränderungen der Fluoreszenz im Zeitverlauf wurden mittels eines Mikroplatten-Fluorometers (Synergy 2, BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland) gemessen. Plasma-basierte Kalibratoren, die einen halblogarithmischen Konzentrationsbereich zwischen 0 und 10 ng/ml (0-182 pM) rekombinantes APC (drotrecogin alfa (activated), Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana, USA) umfassten, wurden mit dem Probenmaterial mitgeführt. Die am Kalibrationsmaterial erhobenen Messwerte wurden mittels logistischer Regression interpoliert und zur Berechnung der Konzentration von APC in den Plasmaproben herangezogen. Alle Proben wurden im Dreifachansatz untersucht.

Zur Bestimmung der Plasmakonzentration von aktiviertem Faktor VII (FVIIa) wurde der STACLOT VIIa-rTF assay (Stago, Asnières sur Seine, Frankreich) eingesetzt. Die Plasmakonzentrationen von F1+2 und TAT wurden mit dem F1+2 (monoclonal) assay bzw. dem TAT micro assay (Siemens Healthcare Diagnostics Products, Marburg, Deutschland) bestimmt. Der D-Dimer-Spiegel wurde mittels INNOVANCE D-Dimer-Reagenzien auf dem BCS XP System (Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn Deutschland) gemessen.

1.2.3 Statistische Auswertung

In Abhängigkeit vom Vorliegen einer Normalverteilung wurden der ungepaarte t-Test oder der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt, um die bei FVL-Mutationsträgern erhobenen Messwerte mit denen der Kontrollgruppe zu vergleichen. Zum Vergleich der Basalwerte vor Verabreichung von rFVIIa mit den an den späteren Messzeitpunkten erhobenen Messwerten wurden der gepaarte t-Test oder der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test eingesetzt.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Hämostaseparameter im Ruhezustand

Die Messergebnisse der Hämostaseparameter im Ruhezustand, d.h. ohne vorherige Gerinnungsaktivierung durch rFVIIa, sind in der *Figure 1A* der Veröffentlichung dargestellt (siehe Seite 24). Mit 1,39 (0,68-2,15) pM im Vergleich zu 0,41 (<0,39-0,68) pM lag der Median (Interquartilsabstand) des Plasmaspiegels von APC bei FVL-Mutationsträgern über dem der Kontrollgruppe ($P=10^{-4}$). Die Plasmaspiegel von F1+2 und von D-Dimer waren bei FVL-Mutationsträgern ebenfalls höher als in der Kontrollgruppe und betragen 0,19 (0,15-0,28) nM gegenüber 0,13 (0,09-0,18) nM ($P=8 \cdot 10^{-4}$) bzw. 0,41 (0,27-0,58) mg/l gegenüber 0,21 (<0,17-0,29) mg/l ($P=10^{-4}$). Bei FVL-Mutationsträgern wurden Plasmaspiegel von TAT von 2,46 (<2,00-3,25) gemessen, in der Kontrollgruppe Plasmaspiegel von 2,20 (<2,00-3,08), ohne dass ein statistisch signifikanter Unterschied errechnet werden konnte.

1.3.2 Biomarker der Thrombinbildung nach Verabreichung von rFVIIa

Die Verabreichung von rFVIIa wurde von allen Studienteilnehmern gut vertragen, und es waren keine unerwünschten Ereignisse während der Studie zu verzeichnen. Das pharmakokinetische Profil von rFVIIa in der Gruppe der FVL-Mutationsträger und in der Kontrollgruppe war mit Spitzenspiegeln der FVIIa-Aktivität von 6,65 (5,19-8,82) U/ml bzw. 6,86 (5,64-7,63) U/ml praktisch identisch (*Figure 1B* der Veröffentlichung, siehe Seite 24). In der Kontrollgruppe stieg der Plasmaspiegel von F1+2 von 0,13 (0,09-0,19) mM vor Verabreichung von rVIIa auf 0,18 (0,11-0,20) nM nach zwei Stunden an ($P=0,027$) und war auch nach drei Stunden mit einem Wert von 0,18 (0,10-0,21) nM noch signifikant

erhöht ($P=0,048$, siehe auch *Figure 1C* der Veröffentlichung, Seite 24). In der Gruppe der heterozygoten FVL-Mutationsträger wurde ein vergleichbarer Anstieg des F1+2-Spiegels von 0,18 (0,12-0,20) nM vor Verabreichung von rFVIIa auf 0,23 (0,19-0,26) nM nach zwei Stunden und auf 0,23 (0,19-0,28) nM nach drei Stunden ($P=0,022$) beobachtet.

Vor Verabreichung von rFVIIa lag der Plasmaspiegel von TAT sowohl bei FVL-Mutationsträgern als auch in der Kontrollgruppe im Median unterhalb des quantifizierbaren Bereiches. Mit Werten von 3,16 (2,05-3,60) ng/ml wurde die höchste TAT-Konzentration bei FVL-Mutationsträgern 30 Minuten nach Verabreichung von rFVIIa beobachtet. (*Figure 1D* der Veröffentlichung, siehe Seite 24). Der Unterschied zum Plasmaspiegel von TAT vor Verabreichung von rFVIIa war zwar statistisch signifikant ($P=0,030$), aber nur vor Bonferroni-Korrektur, wie auch die Unterschiede der nach einer bzw. nach fünf Stunden gemessenen TAT-Konzentrationen zum Basalwert. Die TAT-Spiegel der heterozygoten FVL-Mutationsträger waren im Zeitraum von 10 Minuten bis fünf Stunden nach Verabreichung von rFVIIa stetig höher als die der Kontrollprobanden, mit errechneten P -Werten zwischen 0,047 und $9 \cdot 10^{-4}$. Der Anstieg der TAT-Spiegel fiel bei den drei homozygoten FVL-Mutationsträgern stärker aus als bei den heterozygoten FVL-Mutationsträgern (*Figure 1D* der Veröffentlichung, siehe Seite 24).

1.3.3 Plasmakonzentration von APC nach Verabreichung von rFVIIa

Wie in *Figure 1E* der Veröffentlichung (siehe Seite 24) zu sehen ist, zeigte APC unter den hier untersuchten Hämostaseparametern die deutlichste Reaktion auf die Verabreichung von rFVIIa. Als Basalwert war der APC-Spiegel mit 1,44 (1,21-2,08) pM im Vergleich zu 0,63 (0,50-1,20) pM bei heterozygoten FVL-Mutationsträgern höher als in der Kontrollgruppe ($P=0,007$). In der Kontrollgruppe war er in einem Zeitraum zwischen 10 Minuten ($P=0,028$) und drei Stunden ($P=0,044$) nach Verabreichung von rFVIIa im Vergleich zu diesem Ausgangswert erhöht, wobei der Maximalwert von 2,93 (2,44-3,58) pM nach 30 Minuten erreicht wurde. In der Gruppe der heterozygoten FVL-Mutationsträger war der APC-Spiegel im Zeitraum zwischen 10 Minuten ($P=0,022$) und fünf Stunde ($P=6 \cdot 10^{-4}$) nach Verabreichung von rFVIIa erhöht, hier wurde ein Maximalwert von 9,09 (7,69-12,88) nach einer Stunde beobachtet. Zu allen Messzeitpunkten wurden bei heterozygoten FVL-Mutationsträgern höhere APC-Spiegel als in der Kontrollgruppe gemessen, wobei die ermittelten P -Werte zwischen $6 \cdot 10^{-4}$ und $3 \cdot 10^{-5}$ lagen.

Um die APC-Bildung im zeitlichen Verlauf besser vergleichen zu können, wurde die Fläche unter der APC-Bildungskurve (*area under the curve*, AUC) berechnet (siehe *Figure 1F* der Veröffentlichung, Seite 24). Die AUC betrug nach acht Stunden 13,74 (11,41-17,28) pM·h in der Kontrollgruppe und 42,91 (32,81-50,67) pM·h in der Gruppe der heterozygoten FVL-Mutationsträger. Bei den homozygoten FVL-Mutationsträgern wurde nach acht Stunden eine AUC zwischen 47,71 und 56,33 pM·h beobachtet. Zu allen Messzeitpunkten nach Verabreichung von rFVIIa war die AUC bei heterozygoten FVL-Mutationsträgern höher als bei den Kontrollprobanden.

1.3.4 Plasmaspiegel von D-Dimer nach Verabreichung von rFVIIa

Vor Verabreichung von rFVIIa lag der D-Dimer-Spiegel bei 0,28 (0,23-0,37) mg/l in der Kontrollgruppe und 0,35 (0,26-0,44) mg/l in der Gruppe der heterozygoten FVL-Mutationsträgern. Obwohl der D-Dimer-Spiegel im Median bei heterozygoten FVL-Mutationsträgern damit höher war, erreichte dieser Unterschied keine statistische Signifikanz. Darüber hinaus unterschieden sich auch die nach Verabreichung von rFVIIa gemessenen D-Dimer-Spiegel nicht signifikant von den Basalwerten. Bei den homozygoten FVL-Mutationsträgern wurden D-Dimer-Werte beobachtet, die sowohl vor als auch nach Verabreichung von rFVIIa im Bereich der Werte der heterozygoten FVL-Mutationsträger lagen.

1.4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die FVL-Mutation die Thrombingenerierung und die anschließende APC-Bildung *in vivo* verstärkt. Bei asymptomatischen FVL-Mutationsträgern konnten nach einer Gerinnungsaktivierung erhöhte Aktivierungsraten von Prothrombin sowie erhöhte Plasmaspiegel von APC nachgewiesen werden, welches bei Nicht-Mutationsträgern nicht messbar war.

Frühere Studien aus kleinen Populationen ergaben bereits erste Hinweise auf eine gesteigerte Thrombinbildungsrate im Zusammenhang mit der FVL-Mutation. Dabei konnten erhöhte Plasmaspiegel von F1+2 auch ohne vorherige Gerinnungsaktivierung nachgewiesen werden (Martinella et al., 1996; Zöller et al., 1996; Simioni et al., 1996). Die Auswertung dieser Studie zeigt ebenfalls, dass eine signifikante Erhöhung des Plasmaspiegels von F1+2 sowie eine erhöhter Plasmaspiegel von APC auf etwa das

Dreifache vorliegt. Dabei stammen die hier gewonnenen Daten aus einer größeren Population von FVL-Mutationsträgern. Damit werden die früheren Beobachtungen nicht nur bestätigt, sondern auch erweitert.

Aus dem Anstieg der Plasmaspiegel von F1+2 und APC ergibt sich die Frage in wieweit die Kinetik der Gerinnungsreaktion nach einer *in vivo* Gerinnungsaktivierung durch die FVL-Mutation beeinflusst wird. Bisher wurde in verschiedenen Tiermodellen und auch im Menschen eine Aktivierung der Gerinnung durch eine i.v. Gabe von Endotoxin oder aktivierten Gerinnungsfaktoren durchgeführt (Suffredini et al., 1989; Marbet und Griffith, 1986; Hara et al., 1987; Patel et al., 2015; Owens und Mackman, 2010; Kang et al., 2003). In der hier vorliegenden Studie wurde rFVIIa zur Gerinnungsinduktion verwendet. Dadurch konnte eine standardisierte und begrenzte Gerinnungsaktivierung erreicht werden. Ein Vorteil dieser Form der Gerinnungsaktivierung ist der Wegfall der inflammatorischen Reaktionen, welche bei der Verwendung von Endotoxin sehr häufig auftreten.

rFVIIa ist ein Medikament, das für die prophylaktische und therapeutische Anwendung bei Blutungen von Patienten mit Hämophilie zugelassen ist, wenn ein Hemmkörper gegen Faktor VIII oder IX vorliegt, sowie beim Patienten mit angeborenem Faktor-VII-Mangel. Die zugelassene Dosierung erlaubt eine Gabe von 270 µg/kg bzw. 15-30 µg/kg (Kavakli et al., 2006; Napolitano et al., 2013; Mariani et al., 2013).

In früheren Studien wurde eine signifikante Thrombinbildung schon durch Dosen von 15 µg/kg rFVIIa erreicht, welche durch einen Anstieg des Plasmaspiegels von F1+2 gekennzeichnet wurde (Berrettini et al. 2001). Daher wurde auch in der vorliegenden Studie rFVIIa in dieser Dosierung eingesetzt. Dies minimierte ein mögliches Thromboserisiko durch die Gerinnungsaktivierung, wobei jedoch auch bei Studien mit einer Dosierung von bis zu 160 µg/kg keine schwerwiegenden oder thromboembolischen Ereignisse aufgetreten waren (Fridberg et al., 2005; Klitgaard und Nielsen, 2008). Bei keinem der Studienteilnehmer war ein Anstieg des D-Dimer-Spiegels im Plasma zu messen, was als ein Beleg für die Sicherheit dieser Dosierung anzusehen ist und sich ebenfalls mit Daten aus einer früheren Studien deckt, in der der D-Dimer-Spiegel nach Verabreichung von 40 µg/kg rFVIIa nicht den Referenzbereich überschritten hatte (Fridberg et al., 2005).

Ein weiterer Grund für die Wahl der geringen Dosierung war, die Kosten der Studie so gering wie möglich zu halten.

Die Kinetik des rFVIIa im Plasma zeigte auch in dieser Studie sowohl bei Auftreten als auch in Abwesenheit der FVL-Mutation einen wie in vorherigen Studien beschriebenen Verlauf (Berrettini et al., 2001; Klitgaard und Nielsen, 2008).

Der Anstieg von F1+2 nach der rFVIIa Gabe war bei heterozygoten FVL-Mutationsträgern signifikant größer als in der Kontrollgruppe. Dies zeigt, dass es bei den Mutationsträgern zu einer verstärkten Aktivität des Prothrombinasekomplexes kommt. Der Anstieg des Thrombininaktivierungsmarkers TAT war nur in der Gruppe der FVL-Mutationsträger zu beobachten, wobei dieser verglichen mit F1+2 auf einem geringeren molekularen Level war. Dieser Unterschied ist am ehesten dadurch zu erklären, dass F1+2 eine kürzere Halbwertszeit von etwa 44 Minuten im Vergleich zu 2 Stunden von TAT besitzt (Rühl et al., 2015).

Es kam zu einem Anstieg des APC nach rFVIIa Gabe. Dies zeigt eine Aktivierung des PC-Mechanismus an, die mit der vermehrten Thrombinbildung einhergeht. In der Gruppe der FVL-Mutationsträger stiegen im Vergleich zur Kontrollgruppe die APC-Werte signifikant höher an. Dies ist ein Hinweis darauf, dass bei ansonsten gesunden Individuen die Kapazität des Endothels ausreicht, um bei einer gesteigerten Thrombinbildung eine gesteigerte APC-Produktion als Gegenreaktion auszulösen. Bei den drei in der Studie eingeschlossenen homozygoten FVL-Mutationsträgern war zwar ein noch stärkerer Anstieg des APC-Spiegels im Plasma zu messen, aufgrund ihrer geringen Anzahl ist eine Schussfolgerung bezüglich der unterschiedlichen Bildungsrate zwischen hetero- und homozygoten Merkmalsträgern jedoch nicht möglich. Eine Erweiterung der Studienteilnehmer auf solche mit einer VTE in der Vorgeschichte und gleichzeitig Merkmalsträger ist notwendig, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob ein Ungleichgewicht zwischen gesteigerter Thrombinbildung und APC-Reaktion das prothrombotische Potential der FVL-Mutation modulieren kann.

Zu beachten ist, dass bisher nicht direkt belegt wurde, dass erhöhte APC-Spiegel im Plasma eine verstärkte Antikoagulationswirkung hervorrufen. Indirekt konnte jedoch *in vitro* gezeigt werden, dass Gerinnungszeiten, zum Beispiel die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), nach exogener Zugabe von APC Dosis-abhängig verlängert werden. Dies lässt es als sehr wahrscheinlich erscheinen, dass auch *in vivo* erhöhte APC-

Spiegel die Prothrombinaseaktivität effektiver herabregulieren und dadurch das Thromboserisiko von FVL-Mutationsträgern beeinflussen können.

Da die Studie bisher keine FVL-Mutationsträger mit einer VTE in der Vorgeschichte einschloss, ergeben sich einige Fragen. So kann aufgrund dieser Daten nicht gesagt werden, ob ein Ungleichgewicht zwischen einer gesteigerten Thrombinbildung und einer beeinträchtigten APC-Reaktion das prothrombotische Potential der FVL-Mutation erhöht. Ebenso ist nicht klar, ob die hier gemessenen APC-Spiegel eine klinisch relevante antikoagulatorische Reaktion darstellen. Bisher gibt es Hinweise darauf, dass die zytoprotektive Wirkung des APC vorwiegend durch an die Endothelfläche gebundenes APC vermittelt wird (Zheng et al., 2007). Aber der hier beobachtete erhöhte APC-Spiegel könnte möglicherweise erklären, warum FVL-Mutationsträger im Falle einer Infektion seltener eine schwere Sepsis entwickeln, und warum im Falle einer schweren Sepsis ein Überlebensvorteil besteht (Kerlin et al., 2003; Griffen et al., 2015).

1.5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der thrombophilen FVL-Mutation auf Thrombin- und APC-Bildungsraten nach *in vivo* Gerinnungsaktivierung zu zeigen. Zur Gerinnungsaktivierung wurde den Studienteilnehmern rFVIIa in einer niedrigen Dosis von 15 µg/kg i.v. injiziert. Die Studienpopulation bestand aus 12 Nichtmutationsträgern, die als Kontrollgruppe dienten, sowie 12 heterozygoten und 3 homozygoten FVL-Mutationsträgern mit unauffälliger Thromboseanamnese. Innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 8 Stunden wurden die Thrombin- und APC-Bildungsraten mittels verschiedener Biomarker im Plasma der Studienteilnehmer gemessen, zu denen unter anderem F1+2, TAT, APC und D-Dimer zählten. Zur Bestimmung des APC-Plasmaspiegels wurde ein hochsensitiver OECA eingesetzt. F1+2 stieg in der Kontrollgruppe von einem Ausgangswert von 0,13 nmol/l (Median) vor rFVIIa-Injektion auf 0,18 nmol/l an ($P=0,027$), und in der Gruppe der heterozygoten FVL-Mutationsträger von 0,18 auf 0,23 nmol/l ($P=0,022$), was eine Thrombingenerierung geringen Ausmaßes zeigte. APC stieg im Plasma der Kontrollgruppe von 0,63 auf 2,93 pmol/l an ($P=0,025$). Bei den heterozygoten FVL-Mutationsträgern zeigte sich hingegen ein stärkerer Anstieg des Plasmaspiegels von APC, nämlich von 1,44 auf 9,09 pmol/l ($P=7 \cdot 10^{-5}$). Dieser signifikant größere Anstieg von APC bei FVL-Mutationsträgern blieb über mehrere

Stunden hinweg stetig nachweisbar ($P=0,022$ bis $P=6 \cdot 10^{-4}$). Eine signifikante Veränderung des D-Dimer-Spiegels wurde nicht beobachtet, was zeigt, dass die begrenzte Gerinnungsaktivierung durch den in geringer Dosis verabreichten rFVIIa kein Thromboserisiko darstellt. Diese Daten zeigen, dass eine geringgradige Gerinnungsaktivierung, kombiniert mit engmaschiger Beobachtung der pro- und antikoagulatorischen Reaktionen, als diagnostisches Instrument für die Untersuchung der *in vivo* Funktionsfähigkeit des Protein-C-Mechanismus eingesetzt werden kann. Die dieser Arbeit zugrunde liegende Studie bildet die Voraussetzung für weitere Untersuchungen der Thrombin- und APC-Bildungsraten bei symptomatischen FVL-Mutationsträgern und Träger anderer thrombophiler Mutationen.

1.6 Literaturverzeichnis

Auro K, Komulainen K, Alanne M, Silander K, Peltonen L, Perola M, Salomaa V. Thrombomodulin gene polymorphisms and haplotypes and the risk of cardiovascular events: a prospective follow-up study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006. 26: 942-947

Berrettini M, Mariani G, Schiavoni M, Rocino A, Di Paolantonio T, Longo G, Morfini M. Pharmacokinetic evaluation of recombinant, activated factor VII in patients with inherited factor VII deficiency. *Haematologica.* 2001. 86: 640-645

Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994. 369: 64-67

Bouwens EA, Stavenuiter F, Mosnier LO. Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway. *J Thromb Haemost.* 2013. 11 Suppl 1: 242-253

Castaman G, Tosi A, Simioni M, Ruggeri M, Madeo D, Rodeghiero F. Phenotypic APC resistance in carriers of the A20210 prothrombin mutation is associated with an increased risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 2001. 86: 804-808

Castoldi E, Rosing J. APC resistance: biological basis and acquired influences. *J Thromb Haemost.* 2010. 8: 445-453

Cohen AT, Agnelli G, Anderson FA, Arcelus JI, Bergqvist D, Brecht JG, Greer IA, Heit JA, Hutchinson JL, Kakkar AK, Mottier D, Oger E, Samama MM, Spannagl M. Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost.* 2007. 98: 756-764

Curvers J, Thomassen MC, Nicolaes GA, Van Oerle R, Hamulyak K, Hemker HC, Tans G, Rosing J. Acquired APC resistance and oral contraceptives: differences between two functional tests. *Br. J Haematol.* 1999; 105: 88-94

Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as risk factor for thrombosis: molecular mechanisms, laboratory investigation, and clinical management. *Semin Hematol.* 1997. 34: 217-234

Dahlbäck B. The discovery of activated protein C resistance. *J Thromb Haemost.* 2003. 1: 3-9

Dahlbäck B, Villoutreix BO. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett.* 2005. 579: 3310-3316

De Visser MC, Guasch JF, Kamphuisen PW, Vos HL, Rosendaal FR, Bertina RM. The HR2 haplotype of factor V: effects on factor V levels, normalized activated protein C sensitivity ratios and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 2000. 83: 577-582

De Visser MC, van Hylckama Vlieg A, Tans G, Rosing J, Dahm E, Sandset PM, Rosendaal FR, Bertina RM. Determinants of the APTT- and ETP-based APC sensitivity tests. *J Thromb Haemost.* 2005. 3: 1488-1494

Fridberg MJ, Hedner U, Roberts HR, Erhardtsen E. A study of the pharmacokinetics and safety of recombinant activated factor VII in healthy Caucasian and Japanese subjects. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2005. 16: 250-266.

Gouin-Thibault I, Arkam R, Nassiri S, de la Tourette A, Conard J, Horellou MH, Elalamy I, Samama MM. Markers of activated coagulation in patients with factor V Leiden and/or G20210A prothrombin gene mutation. *Thromb Res.* 2002. 107: 7-11

Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO. Activated protein C: biased for translation. *Blood*. 2015. 125: 2898-2907.

Hara H, Tamao Y, Kikumoto R, Okamoto S. Effect of a synthetic thrombin inhibitor MCI-9038 on experimental models of disseminated intravascular coagulation in rabbits. *Thromb Haemost*. 1987. 57: 165-170.

Heit JA, Petterson TM, Owen WG, Burke JP, De Andrade M, Melton LJ 3rd. Thrombomodulin gene polymorphisms or haplotypes as potential risk factors for venous thromboembolism: a population-based case-control study. *J Thromb Haemost*. 2005. 3: 710-717.

Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, Lohse CM, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. *Thromb Haemost*. 2001. 86: 452-463

Kang C, Bonneau M, Brouland JP, Bal dit Sollier C, Drouet L. In vivo pig models of venous thrombosis mimicking human disease. *Thromb Haemost*. 2003. 89: 256-263

Kavakli K, Makris M, Zulfikar B, Erhardtsen E, Abrams ZS, Kenet G, NovoSeven trial (F7HAEM-1510) investigators. Home treatment of haemarthroses using a single dose regimen of recombinant activated factor VII in patients with haemophilia and inhibitors. A multi-centre, randomized, double-blind, cross-over trial. *Thromb Haemost*. 2006. 600-605

Kerlin BA, Yan SB, Isermann BH, Brandt JT, Sood R, Basson BR, Joyce DE, Weiler H, Dhainaut JF. Survival advantage associated with heterozygous factor V Leiden mutation in patients with severe sepsis and mouse endotoxemia. *Blood*. 2003; 102: 3085-3092

Klitgaard T, Nielsen TG. Overview of the human pharmacokinetics of recombinant activated factor VII. *Br J Clin Pharmacol*. 2008. 65: 3-11.

Marbet GA, Griffith MJ. Tissue thromboplastin induced reversible DIC and heparin-enhanced inhibitors in dogs. *Thromb Haemost*. 1986. 55: 78-85.

Mariani G, Napolitano M, Dolce A, Pérez Garrido R, Bartorova A, Karimi M, Platokouki H, Auerswald G, Bertrand AM, Di Minno G, Schved JF, Bjerre J, Ingerslev J, Sørensen B,

Ruiz-Saez A; Seven Treatment Evaluation Registry; International Factor VII Deficiency Study Group. Replacement therapy for bleeding episodes in factor VII deficiency. A prospective evaluation. *Thromb Haemost.* 2013. 109: 238-247

Martinelli I, Bottasso B, Duca F, Faioni E, Mannucci PM. Heightened thrombin generation in individuals with resistance to activated protein C. *Thromb Haemost.* 1996. 75: 703-705

Medina P, Navarro S, Estellés A, España F. Polymorphisms in the endothelial protein C receptor gene and thrombophilia. *Thromb Haemost.* 2007. 98: 564-569

Müller J, Friedrich M, Becher T, Braunstein J, Kupper T, Berdel P, Gravius S, Rohrbach F, Oldenburg J, Mayer G, Pötzsch B. Monitoring of plasma levels of activated protein C using a clinically applicable oligonucleotide-based enzyme capture assay. *J Thromb Haemost.* 2012. 10: 390-398

Napolitano M, Giasily-Blaizot M, Dolce A, Schved JF, Auerswald G, Ingerslev J, Bjerre J, Altisent C, Charoenkwan P, Michaels L, Chuansumrit A, Di Minno G, Caliskan U, Mariani G. Prophylaxis in congenital factor VII deficiency: indications, efficacy and safety. Results from the Seven Treatment Evaluation Registry (STER). *Haematologica.* 2013. 98: 538-544

Nicolaes, GA, Thomassen MC, Tans G, Rosing J, Hemker HC. Effect of activated protein C on thrombin generation and on the thrombin potential in plasma of normal and APC-resistant individuals. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1997. 8: 28-38

Owens AP 3rd, Mackman N. Tissue factor and thrombosis. The clot starts here. *Thromb Haemost.* 2010. 140: 432-439

Patel PN, Shah RY, Ferguson JF, Reilly MP. Human experimental endotoxemia in modeling the pathophysiology, genomics, and therapeutics of innate immunity in complex cardiometabolic diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015. 35: 525-534

Pötzsch B, Madlener K, Hrsg. *Hämostaseologie*, 2. vollständig aktualisierte und erweiterte Auflage. Heidelberg: Springer, 2010

Rees DC. The population genetics of factor V Leiden (Arg506Gln). *Br J Hematol.* 1996. 95: 579-586

Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood.* 1995. 85: 1504-1508

Rühl H, Berens C, Winterhagen A, Müller J, Oldenburg J, Pötzsch B. Label-Free Kinetic Studies of Hemostasis-Related Biomarkers Including D-Dimer Using Autologous Serum Transfusion. *PLoS One.* 2015. 10: e0145012.

Saposnik B, Reny JL, Gaussem P, Emmerich J, Aiach M, Gandrille S. A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis. *Blood.* 2004; 103: 1311-1318

Simioni P, Scarano L, Gavasso S, Sardella C, Scudeller A, Girolami A. Prothrombin fragment 1 + 2 and thrombin-antithrombin complex levels in patients with inherited APC resistance due to factor V Leiden mutation. *Br J Haematol.* 1996. 92: 435-441

Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, Brenner M, Kovacs JA, Wesley RA, Parrillo JE. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med.* 1989. 321: 280-287

Zheng X, Li W, Song Y, Hu Y, Ferrell GL, Esmon NL, Esmon CT. Non-hematopoietic EPCR regulates the coagulation and inflammatory responses during endotoxemia. *J Thromb Haemost.* 2007. 5: 1394-1400

Zöller B, Holm H, Svensson P, Dahlbäck B. Elevated levels of prothrombin activation fragment 1+2 in plasma from patients with heterozygous Arg506 to Gln mutation in the factor V gene (APC-resistance) and/or inherited protein S deficiency. *Thromb Haemost.* 1996. 75: 270-274

2. Veröffentlichung

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests

ORCID profiles: B.R.C., 0000-0002-2490-7362; Y.-M.S.H., 0000-0003-1143-8801; J.L., 0000-0002-2297-8435; R.H.A., 0000-0002-0821-4906.

Correspondence: Richard H. Aster, BloodCenter of Wisconsin, Medical College of Wisconsin, PO Box 2178, Milwaukee, WI 53201-2178; e-mail: richard.aster@bcw.edu.

Footnote

The online version of this article contains a data supplement.

REFERENCES

- Aster RH, Bougie DW. Drug-induced immune thrombocytopenia. *N Engl J Med*. 2007;357(6):580-587.
- Aster RH, Curtis BR, McFarland JG, Bougie DW. Drug-induced immune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis, and management. *J Thromb Haemost*. 2009;7(6):911-918.
- Reese JA, Li X, Hauben M, et al. Identifying drugs that cause acute thrombocytopenia: an analysis using 3 distinct methods. *Blood*. 2010; 116(12):2127-2133.
- Chong BH, Choi PY, Khachigian L, Perdomo J. Drug-induced immune thrombocytopenia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2013;27(3):521-540.
- Arnold DM, Nazi I, Warkentin TE, et al. Approach to the diagnosis and management of drug-induced immune thrombocytopenia. *Transfus Med Rev*. 2013;27(3):137-145.
- Curtis BR, Kaliszewski J, Marques MB, et al. Immune-mediated thrombocytopenia resulting from sensitivity to oxaliplatin. *Am J Hematol*. 2006; 81(3):193-198.
- Bautista MA, Stevens WT, Chen CS, Curtis BR, Aster RH, Hsueh CT. Hypersensitivity reaction and acute immune-mediated thrombocytopenia from oxaliplatin: two case reports and a review of the literature. *J Hematol Oncol*. 2010;3(1):12.
- Forcello NP, Khubchandani S, Patel SJ, Brahad D. Oxaliplatin-induced immune-mediated cytopenias: a case report and literature review. *J Oncol Pharm Pract*. 2015;21(2):148-156.
- Mirtsching BC, George JN, Aster RH, Curtis BR. Irinotecan-induced immune thrombocytopenia. *Am J Med Sci*. 2014;347(2):167-169.
- Curtis BR. Drug-induced immune thrombocytopenia: incidence, clinical features, laboratory testing, and pathogenic mechanisms. *Immunohematology*. 2014;30(2):55-65.
- Metzner K, Bauer J, Ponzi H, Ujcich A, Curtis BR. Detection and identification of platelet antibodies using a sensitive multiplex assay system-platelet antibody bead array. *Transfusion*. 2017;57(7):1724-1733.
- Garbe E, Andersohn F, Bronder E, et al. Drug-induced immune thrombocytopenia: results from the Berlin Case-Control Surveillance Study. *Eur J Clin Pharmacol*. 2012;68(5):821-832.
- Bose S, Wurm E, Popovich MJ, Silver BJ. Drug-induced immune-mediated thrombocytopenia in the intensive care unit. *J Clin Anesth*. 2015;27(7): 602-605.
- Anand A, Chauhan HK. Piperacillin and vancomycin induced severe thrombocytopenia in a hospitalized patient. *Platelets*. 2011;22(4):294-301.
- Bencardino K, Mauri G, Amatu A, et al. Oxaliplatin immune-induced syndrome occurs with cumulative administration and rechallenge: Single institution series and systematic review study. *Clin Colorectal Cancer*. 2016;15(3):213-221.
- Earle CC, Chen WY, Ryan DP, Mayer RJ. Oxaliplatin-induced Evan's syndrome. *Br J Cancer*. 2001;84(3):441.
- Taleghani BM, Meyer O, Fontana S, et al. Oxaliplatin-induced immune pancytopenia. *Transfusion*. 2005;45(5):704-708.
- Hofheinz RD, Nguyen XD, Buchheidt D, Kerowgan M, Hehlmann R, Hochhaus A. Two potential mechanisms of oxaliplatin-induced haemolytic anaemia in a single patient. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2004;53(3): 276-277.
- Arndt P, Garratty G, Isaak E, Bolger M, Lu Q. Positive direct and indirect antiglobulin tests associated with oxaliplatin can be due to drug antibody and/or drug-induced nonimmunologic protein adsorption. *Transfusion*. 2009;49(4):711-718.
- James E, Podoltsev N, Salehi E, Curtis BR, Saif MW. Oxaliplatin-induced immune thrombocytopenia: another cumulative dose-dependent side effect? *Clin Colorectal Cancer*. 2009;8(4):220-224.
- Bougie DW, Peterson J, Rasmussen M, Aster RH. Mechanism of quinine-dependent monoclonal antibody binding to platelet glycoprotein IIb/IIIa. *Blood*. 2015;126(18):2146-2152.
- Zhu J, Zhu J, Bougie DW, Aster RH, Springer TA. Structural basis for quinine-dependent antibody binding to platelet integrin α IIb β 3. *Blood*. 2015;126(18):2138-2145.

DOI 10.1182/blood.2017.10.812461

© 2018 by The American Society of Hematology

TO THE EDITOR:

In vivo thrombin generation and subsequent APC formation are increased in factor V Leiden carriers

Heiko Rühl,* Franziska Isabelle Winterhagen,* Christina Berens, Jens Müller, Johannes Oldenburg, and Bernd Pötzsch

Institute of Experimental Hematology and Transfusion Medicine, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

The factor V Leiden (FVL) mutation is the most common genetic risk factor for venous thromboembolism (VTE) among whites, with a prevalence varying from 3% to 15% depending on the geographical location.^{1,2} The pathophysiological mechanism of the increased thrombotic risk in FVL carriers is subsumed under the concept of activated protein C (APC) resistance. The mutant FVL gene product lacks 1 target site for the APC-catalyzed inactivation of activated factor V (FVa).³ As consequence, inactivation of FVa is impaired, resulting in delayed

downregulation of thrombin formation.⁴ Although the laboratory phenotype of APC resistance shows a high degree of homogeneity among FVL carriers, the clinical phenotype is highly diverse, ranging from recurrent VTE to a lifelong asymptomatic course. One factor that might modulate the thrombogenicity of the FVL mutation is the anticoagulant capacity of the endothelium as haplotypes and polymorphisms of the endothelial protein C receptor (EPCR) gene have been suggested as risk factors for VTE.^{5,6}

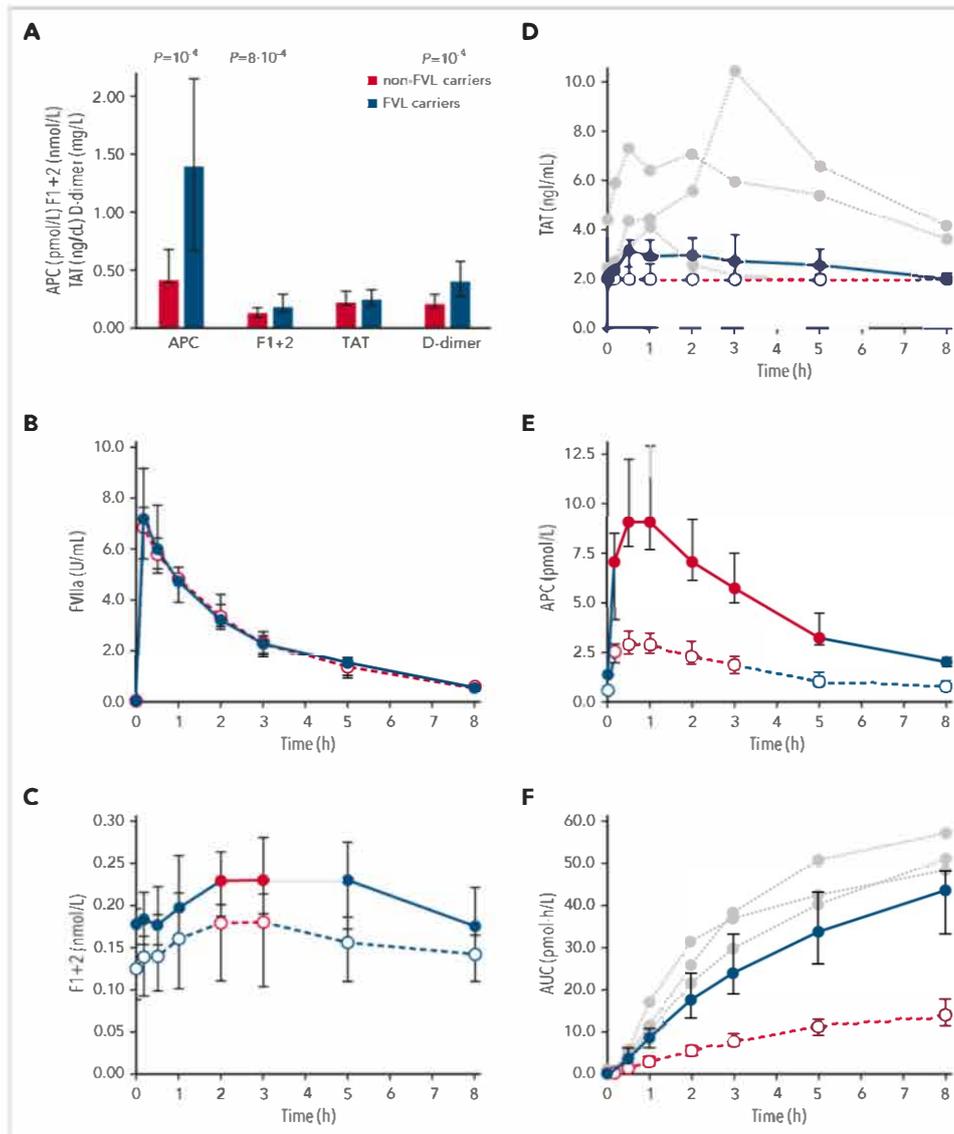


Figure 1. Hemostasis parameters in non-FVL carriers and FVL carriers. (A) Plasma concentrations of APC, F1+2, TAT, and D-dimer were measured in FVL carriers without a history of thrombosis ($n = 22$, thereof 8 homozygous), and in non-FVL carriers ($n = 81$). Data are presented as median and interquartile range (IQR). The Mann-Whitney test was used to calculate significance; P values $< .05$ are shown. Plasma levels of FVIIa (B), F1+2 (C), TAT (D), and APC (E) were measured before ($t = 0$) and after IV injection of $15 \mu\text{g}/\text{kg}$ rFVIIa in 12 heterozygous FVL carriers without a history of thrombosis (●, solid lines) and in 12 non-FVL carriers (○, intersected lines). Red data points and connections indicate a significant increase ($P < .05$) compared with baseline ($t = 0$). P values were calculated using the paired Student t test or the Wilcoxon signed-rank test, depending on the normality of data. The Bonferroni method was applied to correct for multiple testing. Plasma levels of TAT in 3 homozygous FVL carriers are additionally shown (gray circles, dotted lines). (F) Area under the APC generation curve (AUC).

To test the in vivo impact of the FVL mutation on coagulation activation and on the subsequent endothelial-dependent anticoagulant response, we combined standardized and low-dose activation of coagulation by recombinant activated factor VII (rFVIIa) with subsequent monitoring of coagulation biomarkers, including

measurement of APC using a highly sensitive oligonucleotide-based enzyme capture assay.

Blood samples were collected from 81 non-FVL carriers (mean age, 30 years; range, 18-60 years; 42 female) and 22 FVL

Table 1. rFVIIa-induced changes of biomarkers

Subjects	Non-FVL carriers, n = 12			Heterozygous FVL carriers, n = 12		
	C _{t=0}	C _{peak}	P	C _{t=0}	C _{peak}	P
F1+2, nmol/L	0.13 (0.09-0.19)	0.18 (0.10-0.21)	.048	0.18 (0.10-0.20)	0.23 (0.19-0.28)	.022
TAT, ng/mL	<2.0 (<2.0-<2.0)	<2.0 (<2.0-2.65)	NS	<2.0 (<2.0-2.31)	3.16 (2.05-3.60)	NS*
APC, pmol/L	0.63 (0.50-1.20)	2.93 (2.44-3.58)	.025	1.44 (1.21-2.08)	9.09 (7.69-12.88)	7 × 10 ⁻⁵
D-dimer, mg/L	0.28 (0.23-0.37)	0.31 (0.25-0.44)	NS	0.35 (0.26-0.44)	0.43 (0.35-0.53)	NS

Data are presented as median and interquartile range. P values describe differences of peak values from baseline and were calculated using the paired Student t test or the Wilcoxon signed-rank test.

C_{peak}, the highest plasma concentration measured within 8 hours after IV injection of 15 µg/kg rFVIIa; C_{t=0}, the plasma concentration measured at baseline; NS, not significant.

*P = .030 before Bonferroni correction.

carriers (mean age, 39 years; range, 18-60 years; 15 female; 8 homozygous) without a history of VTE. Single IV bolus injections of 15 µg/kg rFVIIa were performed in a subgroup thereof that comprised 12 non-FVL carriers, 12 heterozygous carriers, and 3 homozygous FVL carriers. Blood samples were drawn immediately before and 10 minutes, 30 minutes, 1, 2, 3, 5, and 8 hours after rFVIIa administration. After discarding the first 2 mL, blood was drawn into citrate tubes (10.5 mmol/L final concentration). Citrate tubes additionally containing aprotinin and bivalirudin (final concentration of 10 µmol/L and 250 µg/mL, respectively) were used for APC measurement. Plasma samples were obtained by centrifugation (2600g, 10 minutes) within 30 minutes after blood draw and stored at less than -70°C. The coagulation biomarkers prothrombin activation fragment 1 + 2 (F1+2), thrombin-antithrombin complex (TAT), and D-dimer were determined using commercially available assays. The oligonucleotide-based enzyme capture assay for APC detection was performed as previously described.⁷ Additional details on the study population and methods are presented in supplemental Methods (available on the BloodWeb site). The study proposal was approved by the institutional review board and ethics committee of the University Hospital of Bonn. Written informed consent was obtained from all participants in compliance with the Declaration of Helsinki.

Measurements of parameters in a quiescent state of hemostasis revealed higher plasma levels of APC, F1+2, and D-dimer in FVL carriers than in non-FVL carriers, whereas there was no statistically significant difference between TAT levels in both groups (Figure 1A). These data support and extend previous observations of increased F1+2 levels in a smaller number of FVL carriers.⁸⁻¹⁰ The constant increase in thrombin formation and basal APC plasma levels raises the question of to what extent the FVL mutation alters the kinetics of coagulant reactions after *in vivo* coagulation activation.

IV administration of endotoxin or activated coagulation factors is an established model in which to study alterations in the kinetics of coagulant reactions *in vivo*.¹¹⁻¹⁴ In this study, we used rFVIIa to achieve standardized and limited coagulation activation without any inflammatory reactions as observed with endotoxin administration. In previous studies, a significant thrombin burst as characterized by an increase in F1+2 plasma levels was achieved

by administration of rFVIIa at the low dose of 15 µg/kg.¹⁵ Hence, this dosage was selected for our clinical study primarily to minimize the potential thromboembolic risk associated with rFVIIa administration, although higher doses of up to 160 µg/kg have been administered without serious or thromboembolic events.^{16,17}

Application of rFVIIa was well tolerated by all subjects without any adverse events and without an increase in D-dimer levels (supplemental Figure 1), giving further evidence for the safety of this low-dose rFVIIa regimen. The pharmacokinetic profiles of rFVIIa in heterozygous FVL carriers and non-FVL carriers were essentially identical (Figure 1B) and as expected from previous reports.^{15,16} Plasma levels of F1+2, TAT, and APC measured before and after rFVIIa injection are shown in Figure 1C-E; a comparison of baseline and peak values is provided in Table 1. Starting from higher baseline values, the relative increase of F1+2 after rFVIIa administration was similar in heterozygous FVL carriers and non-FVL carriers, indicating that rFVIIa-induced increased rates of thrombin formation in both groups. Median TAT levels remained unchanged in non-FVL carriers and a slight increase in heterozygous FVL carriers was statistically significant only before Bonferroni correction. The increase of TAT in 2 homozygous FVL carriers exceeded that of heterozygous carriers. On a molar level, the TAT increase was lower than expected from the F1+2 values. The most likely explanation for this discrepancy is the shorter TAT half-life of 44 minutes in comparison with the F1+2 half-life of ~2 hours.¹⁸

APC showed the clearest response to rFVIIa among the studied parameters, and a significantly greater increase in heterozygous FVL carriers than in non-FVL carriers (Figure 1E). The area under the APC generation curve (AUC) of the homozygous FVL carriers was greater than the median AUC of the heterozygous carriers (Figure 1F; supplemental Figure 2), but the overall number of homozygous probands was too low to come to a clear conclusion. The enhanced APC response in FVL carriers can be explained by increased rates of protein C activation and/or by displacement of EPCR-bound APC because it has been shown that APC and FVIIa bind with similar affinities to EPCR.¹⁹ The time delay of ~1 hour between the FVIIa peak and the APC peak, together with the increased rates of thrombin formation, favor the concept of increased *de novo* APC formation.

Although there is no direct evidence that increased APC plasma levels result in enhanced anticoagulant activity, the dose-dependent prolongation of clotting times, such as the activated partial thromboplastin time in response to exogenously added APC, makes it most probable that even in vivo-enhanced APC levels more effectively downregulate prothrombinase activity and thereby modify the prothrombotic risk in FVL carriers. Further studies, including FVL carriers with a history of spontaneous thrombosis, however, are required to analyze whether a dysbalance between increased thrombin formation and an impaired APC response enhances the prothrombotic potential of the FVL mutation, and whether the APC levels measured in this study were a manifestation of a clinically relevant anticoagulant response. Although endothelial-associated APC has been suggested to convey much of the endothelial-protective effects of APC,²⁰ the increased APC plasma levels could possibly explain the slightly decreased risk of FVL carriers developing severe sepsis from infection and the increased survival rates of FVL carriers in severe sepsis.^{21,22}

In summary, this study shows that the FVL mutation enhances in vivo thrombin generation and subsequent endothelial cell-dependent APC formation, as evidenced by accelerated prothrombin activation rates and enhanced APC plasma levels after coagulation activation in thrombosis-free FVL carriers compared with healthy non-FVL carriers.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Stiftung Hämotherapie-Forschung (Hemotherapy Research Foundation).

F.I.W. is a doctoral candidate at the University of Bonn and this work will be part of her thesis.

Authorship

Contribution: H.R., J.M., and B.P. designed the experiments; H.R., C.B., and F.I.W. collected the data; H.R. and F.I.W. analyzed the data; and H.R., F.I.W., J.O., and B.P. drafted and edited the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Heiko Rühl, Institute of Experimental Hematology and Transfusion Medicine, University Hospital Bonn, Sigmund-Freud-Str 25, D-53127 Bonn, Germany; e-mail: heiko.ruehl@ukbonn.de.

Footnotes

*H.R. and F.I.W. contributed equally to this study.

Presented in abstract form at the 59th annual meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, GA, 10 December 2017.

The online version of this article contains a data supplement.

REFERENCES

- Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as risk factor for thrombosis: molecular mechanisms, laboratory investigation, and clinical management. *Semin Hematol*. 1997;34(3):221-234.
- Rees DC. The population genetics of factor V Leiden (Arg506Gln). *Br J Haematol*. 1996;95(4):579-586.
- Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994;369(6475):64-67.
- Castoldi E, Rosing J. APC resistance: biological basis and acquired influences. *J Thromb Haemost*. 2010;8(3):445-453.
- Saposnik B, Reny JL, Gaussem P, Emmerich J, Aiach M, Gandrille S. A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis. *Blood*. 2004;103(4):1311-1318.
- Medina P, Navarro S, Estellés A, España F. Polymorphisms in the endothelial protein C receptor gene and thrombophilia. *Thromb Haemost*. 2007;98(3):564-569.
- Müller J, Friedrich M, Becher T, et al. Monitoring of plasma levels of activated protein C using a clinically applicable oligonucleotide-based enzyme capture assay. *J Thromb Haemost*. 2012;10(3):390-398.
- Martinelli I, Bottasso B, Duca F, Faioni E, Mannucci PM. Heightened thrombin generation in individuals with resistance to activated protein C. *Thromb Haemost*. 1996;75(5):703-705.
- Zöller B, Holm J, Svensson P, Dahlbäck B. Elevated levels of prothrombin activation fragment 1 + 2 in plasma from patients with heterozygous Arg506 to Gln mutation in the factor V gene (APC-resistance) and/or inherited protein S deficiency. *Thromb Haemost*. 1996;75(2):270-274.
- Simioni P, Scarano L, Gavasse S, et al. Prothrombin fragment 1+2 and thrombin-antithrombin complex levels in patients with inherited APC resistance due to factor V Leiden mutation. *Br J Haematol*. 1996;92(2):435-441.
- Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, et al. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med*. 1989;321(5):280-287.
- Marbet GA, Griffith MJ. Tissue thromboplastin induced reversible DIC and heparin-enhanced inhibitors in dogs. *Thromb Haemost*. 1986;55(1):78-85.
- Hara H, Tamao Y, Kikumoto R, Okamoto S. Effect of a synthetic thrombin inhibitor MCI-9038 on experimental models of disseminated intravascular coagulation in rabbits. *Thromb Haemost*. 1987;57(2):165-170.
- Patel PN, Shah RY, Ferguson JF, Reilly MP. Human experimental endotoxemia in modeling the pathophysiology, genomics, and therapeutics of innate immunity in complex cardiometabolic diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(3):525-534.
- Berrettini M, Mariani G, Schiavoni M, et al. Pharmacokinetic evaluation of recombinant, activated factor VII in patients with inherited factor VII deficiency. *Haematologica*. 2001;86(6):640-645.
- Klitgaard T, Nielsen TG. Overview of the human pharmacokinetics of recombinant activated factor VII. *Br J Clin Pharmacol*. 2008;65(1):3-11.
- Fridberg MJ, Hedner U, Roberts HR, Erhardtsen E. A study of the pharmacokinetics and safety of recombinant activated factor VII in healthy Caucasian and Japanese subjects. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2005;16(4):259-266.
- Rühl H, Berens C, Winterhagen A, Müller J, Oldenburg J, Pötzsch B. Label-free kinetic studies of hemostasis-related biomarkers including D-dimer using autologous serum transfusion. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145012.
- Sen P, Clark CA, Gopalakrishnan R, et al. Factor VIIa binding to endothelial cell protein C receptor: differences between mouse and human systems. *Thromb Haemost*. 2012;107(5):951-961.
- Zheng X, Li W, Song Y, et al. Non-hematopoietic EPCR regulates the coagulation and inflammatory responses during endotoxemia. *J Thromb Haemost*. 2007;5(7):1394-1400.
- Kerlin BA, Yan SB, Isermann BH, et al. Survival advantage associated with heterozygous factor V Leiden mutation in patients with severe sepsis and in mouse endotoxemia. *Blood*. 2003;102(9):3085-3092.
- Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO. Activated protein C: biased for translation. *Blood*. 2015;125(19):2898-2907.

DOI 10.1182/blood-2017-12-823831

© 2018 by The American Society of Hematology

3. Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Bernd Pötzsch für die Übertragung und Betreuung dieses Forschungsthemas. Prof. Dr. med. J. Oldenburg danke ich für die Bereitstellung sämtlicher Rahmenbedingungen, die diese Arbeit erst ermöglichten. Auch möchte ich mich herzlich bei Privatdozent Dr. med. Heiko Rühl für seine Unterstützung und sachkundige Kritik bedanken, mit der er mir stets zur Seite stand und mir im Rahmen von wissenschaftlichen Diskussionen ein guter Ansprechpartner war. Ich bedanke mich stellvertretend bei Simone Gasper bei dem gesamten Gerinnungslabor des Instituts für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin, die mir stets mit ihrer fachlichen Arbeit zur Seite standen.

Ich bedanke mich aufrichtig bei meinen Eltern Thomas und Marianna Winterhagen, die mich sowohl im Rahmen meiner Ausbildung als auch privat stets unterstützten und mir diesen Werdegang ermöglicht haben.