

Aus der Abteilung Kardiologie der Medizinische Klinik des Universitäts-Krankenhaus  
Eppendorf – Hamburg

Direktor: Professor Thomas Meinertz

**Wirkung von natürlichen und synthetischen Hormonen auf die in vitro  
Lyse von Plättchen-Fibrin-Thromben mit Urokinase**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin,  
dem Fachbereich der Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Eileen Behrens

aus Buchen/Odenwald

Hamburg 2002

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am:

12.09.2002

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Herr Prof. Dr. F.U. Beil

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Herr. Priv. Doz. Dr. St. Willems

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Herr Prof. Dr. W. Terres

Stellv. Mitglied für die mündliche Prüfung: Herr Prof. Dr. Th. Eiermann

## **Inhalt**

	<b>Seite</b>
<b>1      Arbeitshypothese und Fragestellung</b>	<b>1</b>
<b>2      Einleitung</b>	
<b>2.1      Erläuterung der Thematik</b>	<b>2</b>
<b>3      Material und Methoden</b>	
<b>3.1      Material</b>	<b>9</b>
3.1.1      Orale Kontrazeptiva	9
3.1.2      Präparate der Hormonersatztherapie	9
3.1.3      Urokinase	9
<b>3.2      Methoden</b>	<b>10</b>
3.2.1      Probandenauswahl	10
3.2.2      Blutabnahme-Schemata	10
3.2.3      Herstellung von plättchenreichem und plättchenarmem Plasma	11
3.2.4      Gerätebeschreibung	12
3.2.5      Thrombusherstellung	12
3.2.6      Gewichtsbestimmung des Thrombus	12
3.2.7      Bestimmung der Lichttransmission des Plasma-Überstandes	13
3.2.8      Thrombolyse mit Urokinase	13
3.2.9      Kontrolluntersuchung	13
3.2.10      Photographische Darstellung der Plättchen-Fibrin-Thromben	14
3.2.11      Statistische Auswertungen	14
3.2.12      In vitro Diagnostik zur Bestimmung von Hormonen und Gerinnungsparametern	14
<b>4      Ergebnisse</b>	
<b>4.1      Hormonwerte der Probandinnen</b>	<b>16</b>

	Seite
<b>4.2      Gerinnungsparameter der Probandinnen</b>	<b>18</b>
4.2.1    Präklimakterische Frauen	18
4.2.2    Postklimakterische Frauen	19
<b>4.3      Bildung und Lyse von Plättchen-Fibrin-Thromben</b>	<b>20</b>
4.3.1    Präklimakterische Frauen ohne hormonelle Kontrazeption	20
4.3.1.1    Gewichte der Plättchen-Fibrin-Thromben vor, während und nach der Lyse mit Urokinase	20
4.3.1.2    Gewichte der Plättchen-Fibrin-Thromben ohne Zugabe von Urokinase	21
4.3.1.3    Lichttransmission des Plasma-Überstandes ohne und mit Zugabe von Urokinase	22
4.3.1.4    Morphologie der Plättchen-Fibrin-Thromben	24
4.3.2    Präklimakterische Frauen mit hormoneller Kontrazeption	25
4.3.2.1    Gewichte der Plättchen-Fibrin-Thromben vor, während und nach der Lyse mit Urokinase	25
4.3.2.2    Gewichte der Plättchen-Fibrin-Thromben ohne Zugabe von Urokinase	26
4.3.2.3    Lichttransmission des Plasma-Überstandes ohne und mit Zugabe von Urokinase	27
4.3.2.4    Morphologie der Plättchen-Fibrin-Thromben	29
4.3.3    Postklimakterische Frauen ohne Hormonersatztherapie	30
4.3.3.1    Gewichte der Plättchen-Fibrin-Thromben vor, während und nach der Lyse mit Urokinase	30
4.3.3.2    Gewichte der Plättchen-Fibrin-Thromben ohne Zugabe von Urokinase	31
4.3.3.3    Lichttransmission des Plasma-Überstandes ohne und mit Zugabe von Urokinase	31
4.3.3.4    Morphologie der Plättchen-Fibrin-Thromben	33
4.3.4    Postklimakterische Frauen mit Hormonersatztherapie	34
4.3.4.1    Gewichte der Plättchen-Fibrin-Thromben vor, während und nach der Lyse mit Urokinase	34
4.3.4.2    Gewichte der Plättchen-Fibrin-Thromben ohne Zugabe von Urokinase	35

	Seite
4.3.4.3 Lichtransmission des Plasma-Überstandes ohne und mit Zugabe von Urokinase	35
4.3.4.4 Morphologie der Plättchen-Fibrin-Thromben	37
<b>4.4 Ergebnisse der Gruppen im Vergleich</b>	<b>38</b>
4.4.1 Gewicht der Plättchen-Fibrin-Thromben vor und nach der Lyse mit Urokinase	38
4.4.2 Lichtransmission des Plasma-Überstandes während der Lyse mit Urokinase	42
4.4.3 Aggregationsmessungen im plättchenreichen Plasma	45
<b>5 Diskussion</b>	
5.1 Diskussion der Ergebnisse bei präklimakterischen Frauen mit und ohne Hormonsubstitution vor dem Hintergrund des wissenschaftlichen Umfeldes	46
5.2 Diskussion der Ergebnisse bei postklimakterischen Frauen mit und ohne Hormonsubstitution vor dem Hintergrund des wissenschaftlichen Umfeldes	52
<b>6 Ausblick</b>	<b>57</b>
<b>7 Zusammenfassung</b>	<b>58</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b>	<b>59</b>
<b>9 Danksagung</b>	<b>66</b>
<b>10 Lebenslauf</b>	<b>67</b>
<b>11 Erklärung</b>	<b>68</b>

## 1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Zur Überprüfung der Hypothese, ob weibliche Geschlechtshormone einen Einfluss auf die Hämostase und Fibrinolyse von Plättchen-Fibrin-Thromben besitzen, verglichen wir 34 Frauen zwischen dem 24. und 64. Lebensjahr mit unterschiedlichem Hormonstatus. Die Probandinnen liessen sich in 4 Gruppen einteilen. Bei zwanzig Probandinnen bestand eine intakte Menstruation, zehn unter ihnen nahmen als hormonelle Kontrazeption synthetische Östrogene ein. Die übrigen 14 Probandinnen befanden sich bereits in der postmenopausalen Lebensphase. Von diesen Frauen nahmen die Hälfte regelmäßig natürliche, konjugierte Östrogene als HET ein. Es wurde nach einem bestimmten zeitlichen Schema Blut abgenommen und hieraus wurden anschließend in-vitro Plättchen-Fibrin-Thromben hergestellt. Zusätzlich bestimmten wir die Thrombozytenaggregation und die Gerinnungsparameter. Von den Plättchen-Fibrin-Thromben wurde das in-vitro-Thrombengewicht und die Thrombolysefähigkeit mit Urokinase gemessen. Nach Erfassung der Daten verglichen wir präklimakterische Frauen ohne versus mit hormoneller Kontrazeption, präklimakterische Frauen ohne hormonelle Kontrazeption versus postklimakterische Frauen ohne HET, präklimakterische Frauen mit hormoneller Kontrazeption versus postklimakterische Frauen mit HET und postklimakterische Frauen mit HET versus ohne HET.

## 2 Einleitung

### 2.1 Erläuterung der Thematik

Die koronare Herzerkrankung und der Myokardinfarkt sind die häufigsten Todesursachen in Europa und den Vereinigten Staaten.<sup>67</sup> Männer erkranken häufiger und früher an kardiovaskulären Erkrankungen als Frauen.<sup>45,81</sup> Allerdings nimmt die relative Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen bei Frauen nach der Menopause deutlich zu und erreicht im höheren Lebensalter einen Wert, der dem der Männer entspricht.<sup>10,45</sup> Es liegt daher nahe, die Zunahme dieser Erkrankungen mit der Abnahme der ovariellen Hormonproduktion in Verbindung zu bringen.

Die meisten Frauen machen das Klimakterium zwischen dem 44. und 56. Lebensjahr durch, doch besteht hier eine recht große individuelle Schwankungsbreite. Das Klimakterium beschreibt die Übergangsphase von der vollen Geschlechtsreife zum Senium der Frau. Das Erlöschen der zyklischen Ovarialfunktion, die letzte Regelblutung (Menopause) lässt sich erst retrospektiv durch ein nachfolgendes, blutungsfreies Intervall von 12 Monaten definieren. Die Prämenopause beschreibt einen Zeitraum von etwa 6 Jahren vor der Menopause und die Postmenopause einen Zeitraum von etwa 6 Jahren nach der Menopause. Das mittlere Menopausenalter liegt in Deutschland zur Zeit bei 51 Jahren.<sup>58</sup> Somit verbringt eine Frau bei einer mittleren Lebenserwartung von 80 Jahren etwa ein Drittel ihres Lebens nach dem Klimakterium.

Im Klimakterium kommt es, bedingt durch die Ovarialinsuffizienz, zu absinkenden Östradiolkonzentrationen (Werte unter 10 pg/ml Serum). Auf Grund der nunmehr fehlenden negativen Rückkopplung schüttet die Hypophyse maximale Gonadotropinmengen aus. Die FSH-Werte liegen gewöhnlich über 20 IU/l, die LH-Werte über 17 IU/l. Nach 5-10 Jahren sinken die Gonadotropine wieder ab, allerdings liegen die FSH- und LH-Werte auch im Senium über denjenigen einer präklimakterischen Frau.<sup>82</sup> Durch den sinkenden Hormonspiegel kommt es bei einer großen Anzahl an Frauen zu dem klinisch vielfältigen Bild des klimakterischen Syndroms. Überwiegend handelt es sich um vegetativ-vasomotorische Störungen, Blutungsstörungen, Haut- und Schleimhautatrophie, Osteoporose mit Arthropathien und Gefäßerkrankungen. Die Einbeziehung des Herzkreislaufsystems in den anabolen Stoffwechselprozess führt

zwangsläufig zu ernsthaften Erkrankungen. Myokardinfarkte treten bei Frauen selten vor der Menopause auf. Nimmt man z.B. die Daten der Framingham-Studie, setzt die Häufigkeit von Myokardinfarkten bei Männern jeder Altersgruppe gleich 100 Prozent und die Häufigkeit bei Frauen dazu in Beziehung, zeigt sich, dass bis zum 45. Lebensjahr die Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen nur etwa 20 Prozent der Häufigkeit bei Männern ausmacht.<sup>46</sup> Mit zunehmendem Alter und nachlassender endokriner Ovarialfunktion kommt es zu einem steilen Anstieg der Myokardinfarktinzidenz. Mit dem 80. Lebensjahr ist die Häufigkeit bei beiden Geschlechtern gleich.

Um den nach der Menopause auftretenden postklimakterischen Beschwerden entgegenzuwirken, kommt es vor allem in den USA seit den sechziger Jahren zu einer damals unter dem Schlagwort „feminin forever“ weithin propagierten Anwendung der Hormonersatztherapie (HET) nach der Menopause.<sup>1c</sup> Die Präparate der HET bestehen aus konjugierten Östrogenen mit oder ohne Hinzunahme von Medroxyprogesteron (MPA). Bei den konjugierten Östrogenen handelt es sich um eine Mischung von sulfatierten Derivaten des Estradiols und seiner Metaboliten (Estron und Estriol), die als Ausscheidungsprodukte im Harn gefunden werden. Da diese Verbindungen gut wasserlöslich und daher schlecht resorbierbar sind, eignen sie sich nicht gut für eine perorale Therapie. Sie werden in relativ hoher Dosierung (etwa 1-2 mg/die) per os gegeben. Im Vergleich hierzu beträgt die während des Zyklus auftretende maximale renale Ausscheidung von konjugierten Östrogenen bei der Frau 0,025 bis 0,1 mg/die. Wegen der unzuverlässigen pharmakologischen Wirkung werden die konjugierten Östrogene nicht zur Kontrazeption, sondern ausschließlich bei klimakterischen Beschwerden eingesetzt.<sup>56</sup>

Die meisten der zahlreichen Fall-Kontroll-Studien als auch die prospektiven Kohortenstudien (observational studies), die sich auf eine Primärprävention der koronaren Herzerkrankung durch die HET konzentrierten, ließen eine Verringerung des Risikos kardiovaskulärer Erkrankungen um 35-50 Prozent vermuten.<sup>4,31,34,35,62</sup> Diese vermutete protektive Wirkung der HET erschien plausibel, da sie das HDL-Cholesterin um etwa 5-20% erhöht und das LDL-Cholesterin um 10-20% sowie das Lipoprotein-(a) reduziert.<sup>84,86</sup> Zum anderen zeigte sich im überwiegenden Teil der Untersuchungen ein über Stickstoffmonoxid (NO) gesteuerter vasodilatatorischer Effekt sowie ein günstiger, antithrombotischer Einfluss auf die Hämostase und die Thrombozytenaggregation.<sup>36,49</sup>

Diesen langjährigen Beobachtungen gegenüber steht nun die erste randomisierte, placebokontrollierte, prospektive Studie, die den Einfluss der HET auf das kardiovaskuläre System zeigt, die „Heart and Estrogen/Progesteron Replacement Study (HERS)“.<sup>41</sup> Bei 2763 postklimakterischen Frauen, bei denen bereits eine kardiovaskuläre Erkrankung diagnostiziert worden war, führte eine aus konjugierten Östrogenen und MPA bestehende Hormonersatztherapie über 4 Jahre zu keiner Verringerung der Morbidität und Mortalität. Überraschenderweise zeigte sich ein um 50% erhöhtes Risiko myokardialer Infarkte im ersten Einnahmehr Jahr und hier ganz besonders in den ersten 4 Monaten, zudem ein erhöhtes Risiko thromboembolischer Komplikationen und Gallenblasenerkrankungen. Erst nach dem vierten Einnahmehr Jahr war eine Reduktion myokardialer Infarkte nachweisbar.

Einen ersten Hinweis darauf, dass Sexualhormone die Thrombenentstehung beeinflussen, verdankt man der Entdeckung von Östrogenrezeptoren.<sup>53,92</sup> Es sind zwei Östrogenrezeptoren bekannt, Östrogenrezeptor-α (ÖR-α) und Östrogenrezeptor-β (ÖR-β). Diese Rezeptoren sind ein wichtiges Ziel endogener Östrogene, der HET und pharmakologischer Östrogenagonisten. Thrombozyten und kardiovaskuläre Endothelzellen besitzen beide der bekannten Östrogenrezeptoren.<sup>62</sup> Beide Rezeptortypen sind in einem Großteil menschlichen Gewebes nachgewiesen worden und besitzen eine identische DNA-Sequenz und Hormon-Bindungs-Domaine. Sie unterscheiden sich lediglich in der aktivierte Domaine.<sup>54</sup> Östrogenrezeptoren der Leber regulieren die Expression von Apoprotein-Genen und gewinnen so Einfluss auf das Cholesterinprofil im Blut. Ebenso wird auf diesem Weg die Synthese von Gerinnungsfaktoren und von fibrinolytischen Proteinen verändert. Das ER-β-Protein konnte in Megakaryozyten, Thrombozyten (hier überdurchschnittlich groß) und Erythroleukämiezellen nachgewiesen werden.<sup>47,68</sup>

Parallel zu der Entwicklung der Hormonersatztherapie mit natürlichen Östrogenen, die frühestens mit dem 45. Lebensjahr begonnen wird, sind nun seit fast 40 Jahren synthetisch hergestellte Sexualhormone auf dem Markt erhältlich, die von jüngeren Frauen zur Kontrazeption eingenommen werden. Mehr als 160 Mio. Frauen haben bisher orale Kontrazeptiva (OK) angewandt, und zur Zeit nehmen weltweit ca. 100 Mio. Frauen täglich orale hormonale Kontrazeptiva zur Schwangerschaftsverhütung.<sup>95</sup> OK bestehen aus synthetischen Östrogenen wie Ethinylestradiol und Mestranol, welche sechs bis sieben mal potenter als die natürlichen Östrogene wirken. Hinzu kommt die Wirkung des Gestagens. Wegen der negativen Rückkopplung unterdrücken die Hormone die

Gonadotropin-Inkretion, so dass keine Ovulation eintritt. Die erste Generation der Gestagene waren Derivate von Nortestosteron, dazu gehörten Norethisteron und Lynestrenol. Ende der sechziger Jahre entstand die zweite Generation, das Levonorgestrel (LNG), ebenfalls ein Derivat von Nortestosteron. Die dritte Generation der Gestagene waren Derivate von LNG. Sie wurden entwickelt, um die androgenen Nebenwirkungen zu reduzieren und gleichzeitig einen noch höheren kontrazeptiven Schutz zu erreichen.<sup>3c</sup> Hierzu zählen Desogestrel, Gestoden und Norgestinat. Heute besteht in den üblichen Fertigarzneimitteln die Östrogenkomponente aus Ethinylestradiol oder Mestranol, das im Organismus durch Demethylierung in Ethinylestradiol umgewandelt wird.<sup>5c</sup> Die erste Generation der Gestagene war mit 0,05 mg Ethinylestradiol oder mehr kombiniert. Die zweite und dritte Generation beinhaltet mit 0,03 mg oder weniger eine niedrigere Dosierung an Ethinylestradiol und wird auch niedrig dosierte Pille genannt.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Östrogen und Gestagen zu kombinieren. Man unterscheidet Einphasen-Präparate, bei denen während der gesamten Behandlungsdauer (1.-21./22. Tag) beide Hormone gleichzeitig eingenommen werden. Dabei kann das Dosierungsverhältnis während des ganzen Zeitraumes konstant sein "Einstufen Präparat" oder die Gestagendosierung wird in einem "Zweistufen-Präparat" bzw. zwei Schritten "Dreistufen-Präparat" gesteigert. Die "Zweiphasen- oder Sequenz- Präparate" beginnen mit einer reinen Östrogenzufuhr, zu der in der Mitte des Zyklus oder früher ein Gestagen hinzugefügt wird. Die alleinige und kontinuierliche Zufuhr eines niedrig dosierten Gestagens wirkt ebenfalls kontrazeptiv (Minipille). Bei ihr ist der kontrazeptive Schutz geringer als bei den Kombinationspräparaten.

Kurz nach Einführung der OK wurden bei Frauen, die diese Verhütungsmittel einnahmen, vermehrt tiefe Beinvenenthrombosen und Lungenembolien beobachtet. Etwas später nahm man an, dass ebenso myokardiale Infarkte und zerebrale Insulte mit der Einnahme von OK zunehmen. Diese Beobachtungen haben zu einer Reihe von epidemiologischen und klinischen Untersuchungen über OK und thrombotische Komplikationen geführt. Daraufhin konnte man feststellen, dass die Reduktion der Dosis von synthetischen Östrogenen von 0,05 mg auf 0,03 mg einen anhaltend sicheren Konzeptionsschutz bei geringeren Nebenwirkungen bewirkte.<sup>7,48,83,102</sup>

Aktuelle Daten der WHO beschreiben ein 3-4fach erhöhtes Risiko, unter niedrig dosierten OK eine venöse Thrombose zu erleiden.<sup>9c</sup> Das höchste Risiko besteht im ersten Jahr der

Einnahme. Das absolute Risiko bleibt aber weiterhin niedrig. Ein Risiko von weniger als 1 pro 10 000 Personen/Jahr steigt durch die Einnahme von OK auf 3-4 pro 10 000 Personen/Jahr.

Auch arterielle Thrombosen treten unter der Einnahme von OK vermehrt auf. Aber die zusätzlichen Risikofaktoren, die mit den OK für die arterielle Thrombose verantwortlich sind, weichen von denen bei venösen Thrombosen ab. Zum Beispiel erleiden Frauen, die rauchen und zusätzlich OK einnehmen, häufiger einen Myokardinfarkt, das Risiko einer tiefen Beinvenenthrombose erhöht sich durch das Rauchen aber nicht.<sup>26,1,13,37,38</sup> Man konnte zudem beobachten, dass Fälle von Frauen mit Myokardinfarkt unter synthetischer Hormonsubstitution, deren Koronarien entweder durch Angiographie oder durch Autopsie untersucht wurden, isolierte, segmentale Okklusionen in den Koronararterien bei normaler Intima und Media zeigten.<sup>22,93,95,38</sup>

Die Anzahl der „kardiovaskulären Todesfälle“, -dieser Begriff beinhaltet die tödlich ausgehenden tiefen Beinvenenthrombosen, die Thromboembolien, die ischämischen und hämorrhagischen Insulte und den Myokardinfarkt-, bei jungen Frauen (20-24 Jahre), die nicht rauchen, liegt weltweit bei 6,0 pro Millionen-Frauenjahre, im höheren Alter (40-44 Jahre) bei 25,5 pro Millionen-Frauenjahre. Durch die Einnahme von OK steigt die Anzahl der Fälle bei den jungen Frauen auf 9,6 pro Millionen-Frauenjahre und bei den älteren Frauen auf 57,3 pro Millionen-Frauenjahre an. Durch das Rauchen erhöht sich die Anzahl der Fälle im jungen Alter von 6,0 auf 11,6 pro Millionen-Frauenjahre, bei den älteren Frauen von 25,5 auf 102 pro Millionen-Frauenjahre. Die Kombination aus Rauchen und der Zufuhr von OK führt bei jüngeren Frauen zu 21,7, bei älteren Frauen zu 221 kardiovaskulären Todesfällen pro Millionen-Frauenjahre.<sup>25</sup>

1993 beschrieben Dahlbäck et al. erstmals eine erblich erworbene Protein C Resistenz.<sup>15</sup> Ein Jahr darauf konnte eine Mutation des Gerinnungsfaktors V für die Protein C Resistenz verantwortlich gemacht werden.<sup>6</sup> Protein C ist ein Hemmkörper der plasmatischen Gerinnung. Nach Anlagerung von Thrombin (Thrombin sorgt innerhalb der plasmatischen Gerinnung für die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrinpeptide A und B, woraus Fibrinomere entstehen) an einen Thrombozytenoberflächenrezeptor, der Thrombomodulin genannt wird, kommt es zur Aktivierung der Vitamin K abhängigen Serinprotease Protein C. Dieses zerstört die aktivierte Kofaktoren Va und VIIIa und verhindert so die weitere Thrombinbildung. Die Bindung von Protein C an der Thrombozytenoberfläche wird durch den Kofaktor Protein S erleichtert.

Die Prävalenz der Erberkrankung liegt innerhalb der weißen Bevölkerung bei 5%, in Asien und Afrika konnte sie bisher nicht nachgewiesen werden.<sup>74</sup> Die Anwesenheit der Mutation, die heute „Faktor V Leiden Mutation“ genannt wird, erhöht das Risiko einer tiefen Beinvenenthrombose in heterozygoten Trägern um das 4-10fache, bei homozygoten Trägerinnen um das 50-100fache und bei heterozygoten Trägern, die zusätzlich OK einnehmen, um den Faktor 35.<sup>75</sup> Unabhängig von der Faktor V Leiden Mutation verursachen OK, und hier verstärkt die dritte Generation (mit Desogestrel), eine Resistenz gegenüber dem aktivierte Protein C, deren molekulare Pathophysiologie noch unklar ist.<sup>76,77,89</sup>

Aktuelle Studien, die einen Einfluss oraler Kontrazeptiva auf die Hämostase untersuchten, fanden einen vorwiegend prothrombotischen Effekt.<sup>63,102</sup> Das Prothrombin, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor X, Fibrinogen und Prothrombin-fragment 1 und 2 waren erhöht, Faktor V erniedrigt. Die Erhöhung von Prothrombin und Faktor VII und die Reduzierung des Faktor V kamen unter der Einnahme von OK der dritten Generation (mit Desogestrel) im Vergleich zu der zweiten Generation (mit Levonorgestrel) noch deutlicher zum Vorschein. Man weiß heute, dass nur leicht erhöhte Spiegel von Prothrombin und Faktor VIII mit einer Zunahme venöser Thrombosen assoziieren.<sup>50,51,73</sup>

Veränderungen im fibrinolytischen System, welche die Parameter Plasminogen, Gewebe-Plasminogen-Aktivator, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ1 und Plasmin-Antiplasmin-Komplex betreffen, weisen auf eine erhöhte fibrinolytische Aktivität unter oralen Kontrazeptiva hin.<sup>74,83,61,102</sup> Ob eine erhöhte fibrinolytische Aktivität klinisch relevant ist, bleibt unklar. Veränderungen im fibrinolytischen System konnten bisher nicht mit einer erhöhten Inzidenz thrombotischer Ereignisse in Verbindung gebracht werden. Lediglich gesteigerte Spiegel des Thrombin-aktivierenden-fibrinolytischen-Inhibitor (TAFI), der unter der Einnahme von OK erhöht ist, können im Zusammenhang mit einem gesteigerten Risiko venöser Thrombosen gesehen werden.<sup>61,87</sup> TAFI inhibiert die Fibrinolyse, indem er die Bindung von Plasminogen an Fibrin verhindert.<sup>91</sup>

Um einen weiteren Einblick in die Thrombenentstehung unter verschiedenen hormonellen Einflüssen zu gewinnen, untersuchte diese Studie die Wirkung oraler Kontrazeptiva und der Hormonersatztherapie auf die Entstehung, Morphologie und Lyse von Plättchen-Fibrin-Thromben in-vitro. Dazu wurde gesunden Frauen mit und ohne HET, bzw. mit und ohne OK, Blut entnommen und mit dem gewonnenem Plättchen-reichen-Plasma (PRP) in

einem Aggregometer Plättchen-Fibrin-Thromben hergestellt. Unterschiedlich alte Thromben wurden anschließend mit Urokinase lysiert. Zusätzlich bestimmten wir Hämostaseparameter, die im Zusammenhang mit dem Aggregationsverhalten der jeweiligen Thrombozyten betrachtet werden sollen.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Orale Kontrazeptiva (OK)**

In dieser Studie wurden ausschließlich Frauen mit einem Einstufen-Präparat zur oralen Kontrazeption ausgewählt. Die Einnahme des Präparates war über einen Mindestzeitraum von 2 Jahren garantiert. Die Zusammensetzung bestand entweder aus Ethinylestradiol 0,03 mg und Desogestrel 0,15 mg (Marvelon®: Organon GMBH, Oberschleißheim, Deutschland), aus Ethinylestradiol 0,02 mg und Desogestrel 0,15 mg (Lovelle®: Organon GMBH, Oberschleißheim, Deutschland) oder aus Ethinylestradiol 0,03 mg und Levonorgestrel 0,15 mg (Femranette mikro®: Lederle Arzneimittel, Münster, Deutschland; Microgynon®: Schering Deutschland GMBH, Berlin). Die Einnahme erfolgte 21 Tage mit der sich anschließenden Pause von 8 Tagen, auf die eine Abbruchblutung eintritt.

##### **3.1.2 Präparate der Hormonersatztherapie (HET)**

Die postmenopausalen Frauen nahmen vom 5.-14. Zyklustag 1,25 mg bzw. 0,6 mg konjugierte Östrogene, ab dem 15. bis zum 25. Zyklustag zusätzlich 5 mg Medrogeston (Medroxyprogesteronacetat). Anschließend folgte eine Pause bis zum 5. Tag des nächsten Zyklus (Presomen® 1,25 compositum bzw. Presomen 0,6 compositum: Solvay Arzneimittel GMBH, Hannover, Deutschland). Die Einnahmezeit betrug auch hier mindestens 2 Jahre.

##### **3.1.3 Urokinase**

Zur Lyse der in dieser Studie hergestellten Thromben wurde Urokinase (Firma medac: Hamburg, Deutschland) verwendet.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Probandenauswahl

Bei den Probandinnen handelte es sich um insgesamt 34 nach dem Zufallsprinzip ausgewählte, gesunde Frauen zwischen dem 24. und 64. Lebensjahr. Hieraus ergaben sich 4 Gruppen. Von 20 präklimakterischen Frauen nahmen 10 zur oralen Kontrazeption synthetische Östrogene ein und von 14 postmenopausalen Frauen führten sieben eine Hormonersatztherapie durch. Das mittlere Alter der Probandinnen betrug bei den menstruierenden Frauen, die keine Kontrazeptiva einnahmen,  $25 \pm 2$  Jahre, bei denen mit Kontrazeptiva  $24 \pm 2$  Jahre. Bei den postklimakterischen Frauen ohne HET betrug das mittlere Alter  $55 \pm 4$  Jahre, bei denen mit HET  $54 \pm 4$  Jahre. Der Einfluss von Rauchen wurde nicht berücksichtigt.

### 3.2.2 Blutabnahme-Schemata

In der Frauengruppe ohne Einnahme von Hormonpräparaten und intaktem Zyklus erfolgte die erste Blutabnahme am Tag der Abbruchblutung, alle weiteren Abnahmen am 7., 9., 12., 14., 16., und 18. Folgetag, so dass die Untersuchungen um die Zeit des Eisprungs engmaschiger durchgeführt wurden. In der Frauengruppe mit der Einnahme oraler Kontrazeptiva erfolgte die erste Abnahme ebenfalls am 1. Tag der Menstruation, die 2. Abnahme am 5. Tag nach der Abbruchblutung -das entspricht dem ersten Einnahmetag der Pille- weitere Abnahmen erfolgten am 9., 16., und 23. Folgetag. Die Untersuchungen wurden hier von 7 Blutabnahmen auf 5 reduziert, da durch die gleichmäßige Einnahme eines Einstufenpräparates keine hormonellen Schwankungen zu erwarten waren. In der postklimakterischen Gruppe mit einer Hormonsubstitution entsprachen die Untersuchungstage denen der Frauen mit oralen Kontrazeptiva, so dass die erste Abnahme am Tag der Abbruchblutung stattfand, die folgenden zwei Untersuchungen unter der reinen Einnahme von natürlichen Östrogenen und die letzten zwei Abnahmen unter dem zusätzlichen Einfluss von Gestagenen. Bei den postklimakterischen Frauen ohne HET wurde der erste Abnahmetag willkürlich bestimmt, alle weiteren entsprachen dem Rhythmus der gleichaltrigen Frauen mit HET (Abb.1). Alle Abnahmen erfolgten jeweils nachmittags zwischen 15.00 und 17.00 Uhr. Nüchternheit wurde nicht vorausgesetzt. Nach kurzer Stauung und Desinfektion wurden 20 ml Blut mit einer 1,1 mm

dicken Kanüle aus der Cubitalvene in eine mit 2 ml Natriumcitrat (3,13%) gefüllte Plastikspritze abgenommen.

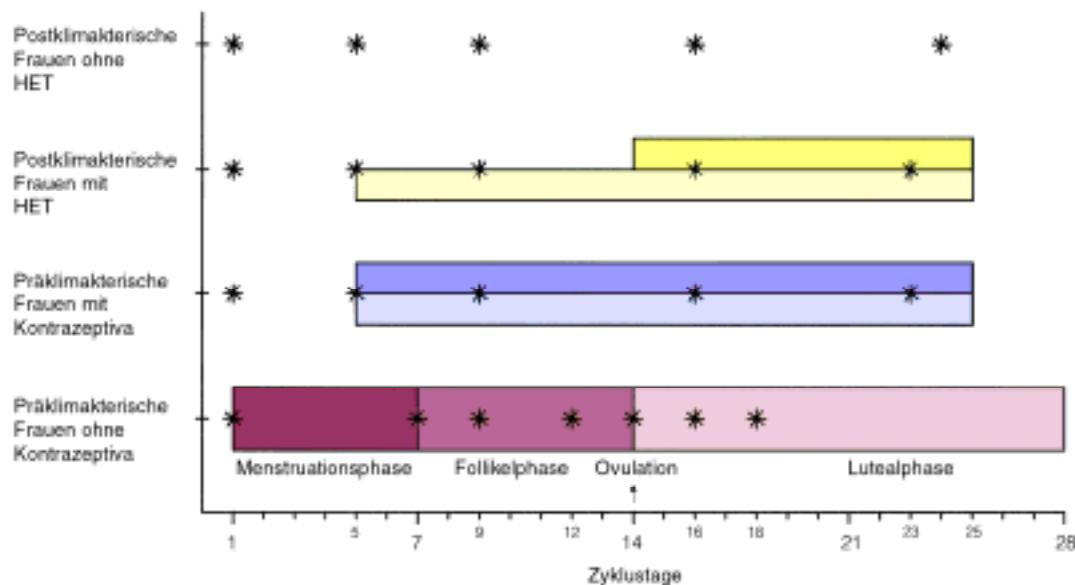


Abb. 1 Untersuchungstage der vier Frauengruppen und der jeweils unterschiedliche Hormonstatus.  
 \* = Tag der Untersuchung   █ = Medrogeston   █ = Konjugierte Östrogene   █ = Ethinylestradiol  
 █ = Desogestrel bzw. Levonorgestrel

### 3.2.3 Herstellung von plättchenreichem und plättchenarmem Plasma

Das entnommene Blut wurde durch sorgfältiges Schwenken gemischt. Anschließend wurde es in zwei Plastikreagenzröhren à 10 ml gefüllt und in einer Zentrifuge der Firma Sigma bei 37°C mit 1.500 Umdrehungen/min (300 g) zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand, plättchenreiches Plasma (PRP), wurde mit einer Eppendorf Pipette vorsichtig abpipettiert und in ein Plastikreagenzröhren gefüllt. 2 ml des PRP wurden für spätere Laboruntersuchungen in Eppendorfröhrchen bei -20°C eingefroren. Der verbliebene Rest des Blutes wurde anschließend bei 4.000 Umdrehungen/min (2.500 g) erneut zehn Minuten zentrifugiert. 2 ml davon wurden eingefroren, der Rest bei 5.000 Umdrehungen/min (8.000 g) ein weiteres Mal zentrifugiert. Der neue Überstand wurde in ein Plastikröhren pipettiert. Das Reagenzröhren mit PRP wurde nun dreimal vorsichtig geschwenkt, 50 µl davon wurden mit einer Gilson-Pipette entnommen und in ein Röhrchen mit TTV-N (Thrombozyten-Einzeltest: Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth) zur Ermittlung der Plättchenzahl pro µl umgefüllt. Das Gemisch wurde

anschließend 3 Minuten im Rüttler gemischt. Danach wurde mit einem Kapillarröhrchen etwas Lösung entnommen und eine Neubauerzählkammer beschichtet. Der Objektträger wurde zur Sedimentation der Thrombozyten in eine feuchte Kammer gegeben. Nach 10 Minuten wurden fünf Gruppenquadrate unter einem Lichtmikroskop bei 240-facher Vergrößerung ausgezählt. Darauf wurden PRP und plättchenfreies Plasma (PFP) in der Apact-Küvette so gemischt, dass  $500\mu\text{l}$  standardisiertes Plasma mit einer Thrombozytenkonzentration von 250.000 pro  $\mu\text{l}$  entstanden.

### **3.2.4 Gerätebeschreibung**

Zur Aggregationsmessung und zur Thrombusherstellung wurde das Aggregometer APACT der Firma Labor GmbH benutzt. Der Rührer wurde auf 1.200 Umdrehungen/min und der Autostop auf 99 Minuten eingestellt. Die optische Dichte wurde mit einem an das Aggregometer angeschlossenen Plotter kontinuierlich auf Thermospezialpapier aufgezeichnet.

Das Thrombusgewicht wurde auf einer Digitalwaage der Firma Sartorius gewogen. Nach der Inbetriebnahme wurde ein automatischer Kalibrierungsvorgang durchgeführt und nach dem Einmessen der Transportunterlage die Waage tarirt.

### **3.2.5 Thrombusherstellung**

Die Bildung der Plättchen-Fibrinthromben wurde durch Zugabe von  $50\mu\text{l}$  Kalziumchlorid mit einer Endkonzentration von 20 mmol/l plus  $50\mu\text{l}$  Kollagen (Kollagenreagens Horm<sup>®</sup>: Nycomed Arzneimittel GmbH, München) mit einer Endkonzentration von 1mg/l eingeleitet. Nach 4-8 Minuten wickelten sich die Plättchen-Fibrinthromben um den Metallrührer in der Apact-Küvette.

### **3.2.6 Gewichtsbestimmung der Thromben**

Zur Gewichtsbestimmung wurden die Thromben mit einer Pinzette vorsichtig vom Metallrührer genommen und auf eine Transportunterlage gebracht. Das am Thrombus hängende Plasma wurde mit einer Eppendorf pipette sorgfältig abgesaugt und in die Küvette zurückgegeben. Anschließend wurde die Unterlage auf die Waagschale gelegt und das Gewicht ermittelt. Nach Rückgabe des Thrombus in die Küvette wurde die

Transportunterlage mit Aqua destillata gereinigt und mit Saugpapier getrocknet. Das Gewicht der Unterlage wurde zwischen den Messungen immer wieder kontrolliert.

### **3.2.7 Bestimmung der Lichttransmission des Plasma-Überstandes**

Standardisiertes PRP wurde fünf Sekunden vorgerührt und in den Lichtstrahl des Photometers gebracht, um das Gerät auf 0% zu eichen. Ebenso wurde PFP vorgerührt, in den Strahlengang gebracht und auf 100% geeicht. Nach Zugabe von Kollagen und Kalzium kam es durch die Aggregation der Plättchen zu einer Abnahme der Extinktion. Mit einem Schreiber wurde die abnehmende Extinktion registriert und als Aggregogramm dargestellt. Hieraus konnte nach der Untersuchung das Aggregationsmaximum abgelesen werden. Da der Thrombus sich während der Gewichtsmessung nicht in der Küvette befand, diese aber in den Lichtstrahl des Photometers zurückgestellt wurde, konnte die vor allem während der Lyse abnehmende Lichttransmission des Plasmaüberstandes gemessen werden.

### **3.2.8 Thrombolyse mit Urokinase**

Das Gewicht der 10, 30 bzw. 60 Minuten alten Thromben (T10, T30, T60) wurde vor Beginn der Lyse festgehalten und als "Startgewicht" definiert. Anschließend wurde die Lyse mit  $50\mu\text{l}$  Urokinase (Endkonzentration 1000 IE/ml) eingeleitet und der Thrombusgewichtsverlust alle 10, 20 und 30 Minuten, bei den 30 bzw. 60 Minuten alten Thromben zusätzlich nach 40, 50 und 60 Minuten bestimmt. Somit war die Lyse bei den 10 min alten Thromben nach 30 min, bei den 30 bzw. 60 min alten Thromben nach 60 min abgeschlossen. Bei den 10 Minuten alten Thromben wurde auf eine 60-minütige Gewichtsbestimmung verzichtet, da die Thromben bereits nach 30 Minuten einen Grossteil ihrer Masse verloren hatten und für weitere Messungen zu fragil erschienen. Das Ergebnis der letzte Messung wurde als "Endgewicht" bezeichnet.

### **3.2.9 Kontrolluntersuchung**

Um die spontane Gewichtsreduktion ohne Hinzugabe von Plasminogenaktivatoren beobachten zu können, wurden zu jeder Lyseuntersuchung aus dem gleichen Plasma drei zusätzliche Thromben hergestellt, die nicht lysiert wurden. Um die

Verdünnungsverhältnisse gleich zu halten, wurde dem Kontrollverlauf, anstatt Urokinase, 50 $\mu$ l Kochsalzlösung hinzugefügt. Die Messungen erfolgten ebenso wie bei den mit Urokinase behandelten Thromben alle 10 Minuten.

### **3.2.10 Photographische Darstellung der Plättchen-Fibrin-Thromben**

Nach der Herstellung der Thromben wurden diese in flüssigem Stickstoff gefriergetrocknet. Anschließend wurden hiervon feine Querschnitte gewonnen und diese auf einen Objektträger aufgetragen. Die Färbung erfolgte mit Hämatoxylin-Eosin (HE).

### **3.2.11 Statistische Auswertung**

Zur statistischen Auswertung wurden verteilungsfreie (nicht-parametrische) Tests angewandt: der Kruskal-Wallis-Test zur Suche von Signifikanzen innerhalb der fünf bzw. sieben Abnahmetage in einer einzelnen Gruppe und der Mann-Whitney-U-Test, um Differenzen im Gruppenvergleich zu erkennen. P-Werte von 0,05 oder kleiner wurden als signifikant angesehen. Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Um den Zusammenhang zwischen zwei kardinal skalierten Merkmalen zu erkennen (Regressand und Regressor), wurden lineare, nichtlineare, einfache und multiple Regressionsanalysen durchgeführt. Der Grad des Zusammenhangs wurde mit dem Pearson'schen Korrelationskoeffizient "r" beschrieben

### **3.2.12 In-vitro-Diagnostik zur Bestimmung von Hormonen und Gerinnungsparametern**

Es wurden bei den präklimakterischen Frauen ohne Kontrazeptiva Östrogen, Progesteron, luteinisierendes Hormon (LH) und Follikel-stimulierendes Hormon (FSH) bestimmt. Da in den anschließenden Untersuchungen die Thromben innerhalb des Menstruationszyklusses miteinander verglichen werden sollten, untersuchten wir die Hormone in der Menstruationsphase, der Follikel- und der Gelbkörperphase. Somit wurde hier, gemäß des Blutabnahme-Schema, bei jeder Untersuchung eine Hormonbestimmung durchgeführt. Bei den präklimakterischen Frauen mit Kontrazeptiva wurde ausschließlich das LH und das FSH zum Nachweis einer effizienten Kontrazeptiva induzierten Suppression der Gonadotropine untersucht. Berücksichtigt man die 8-tägige

Einnahmepause der OK, wurden die Hormonbestimmungen am 5. und 12. Tag nach Einnahmebeginn vollzogen. Innerhalb der postklimakterischen Frauengruppe ohne HET wurden ebenfalls Östrogen, Progesteron, LH und FSH bestimmt, um die ovariale Insuffizienz dieser Gruppe zu belegen. Da hier keine Hormonschwankungen zu erwarten waren, wurde bei den insgesamt 5 Blutabnahmen bei der 3. und 4. Abnahme die Hormonbestimmung durchgeführt. Bei den postklimakterischen Frauen mit einer HET bestimmten wir das LH und das FSH, da hier, trotz der Zufuhr natürlicher Östrogene, erhöhte Parameter das postklimakterische Stadium erkennen lassen. Hierzu diente ebenfalls der 5. und 12. Tag nach Einnahmebeginn. Die Bestimmung von Östrogen und Progesteron bei den Frauen mit Kontrazeptiva bzw. den Frauen ohne HET wurde auf Grund der exogenen Hormonzufuhr und der somit supprimierten natürlichen Hormonspiegel nicht durchgeführt.

Zur quantitativen Bestimmung von FSH, LH, Estradiol und Progesteron wurden ausschließlich enzymimmunologische in-vitro-Tests (Enzymun-Test<sup>®</sup>: Boehringer Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Als Analysengerät diente ein ES 600 System (Boehringer Mannheim, Deutschland). Bezuglich der Gerinnungsfaktoren wurde der Von-Willebrand-Faktor (Von-Willebrand-Reagenz: Behringwerke AG Marburg, Deutschland), der Faktor VIII (F VIII-Mangelplasma: Immuno AG Wien, Österreich), das Plasminogen, das ATIII und das  $\alpha$ 2-Antiplasmin (Plasminogen Chromogen, ATIII Chromogen und  $\alpha$ 2-Antiplasmin Chromogen: Baxter Diagnostics AG New York, USA) bestimmt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Hormonwerte der Probandinnen

Die Hormonbestimmungen von Östrogen, Progesteron, LH und FSH waren innerhalb des Menstruationszyklusses bei den präklimakterischen Frauen ohne OK im Normbereich. In der Menstruationsphase, der Follikelphase und der Gelbkörperphase wichen keine der Frauen von der Norm ab, so dass ein Vergleich der Studienergebnisse innerhalb des Zyklusses gewährleistet war. Das LH und das FSH der präklimakterischen Frauen mit OK war durch die Hormonsubstitution suprimiert. Bei den postklimakterischen Frauen ohne HET veranschaulichen die niedrigen Östrogen- und Progesteronwerte die reduzierte Synthese der Sexualhormone, welche auch durch die reflektorisch hohen Gonadotropine FSH und LH nicht mehr gesteigert werden konnte. Bei den postklimakterischen Frauen mit HET reichen die konjugierten Östrogen und das Medrogeston nicht aus, die Gonadotropinsekretion auf das Maß der präklimakterischer Frauen zu reduzieren. Dieses Ergebnis entspricht der Norm. LH und FSH weisen mit ihren hohen Spiegeln auf das postklimakterische Alter hin, liegen aber, bedingt durch die HET, etwas unter den Ergebnissen gleichaltriger Frauen ohne HET (Tab.1, Abb.2).

	Östrogen pg/ml	Progesteron ng/ml	LH mIU/ml	FSH mIU/ml
<b>Frauen ohne OK</b>				
Menstruationsphase	35,8 ± 3,5 (8 - 89)	0,35 ± 0,1 (0,2 - 0,6)	5,5 ± 1,8 (1,1 - 6,2)	6,5 ± 0,5 (1,8 - 9)
Follikelphase	47,4 ± 7,2 (10 - 147)	1,05 ± 0,3 (0,3 - 1,1)	6,9 ± 2,0 (1,7 - 7,2)	6,6 ± 0,8 (2 - 12)
Gelbkörperphase	64,5 ± 16,1 (27 - 247)	2,2 ± 0,8 (1,8 - 21)	7,35 ± 2,3 (0,6 - 10)	6,4 ± 1,0 (2 - 10)
<b>Frauen mit OK</b>	-	-	2,15 ± 1,1	4 ± 1,2
<b>Frauen ohne HET</b>	2 ± 1,4 <td>0,2 ± 0,1<br (&lt;="" 1)<="" td=""/><td>17,95 ± 1,1<br (&gt;="" 17)<="" td=""/><td>47,45 ± 2,8<br (&gt;="" 20)<="" td=""/></td></td></td>	0,2 ± 0,1 <td>17,95 ± 1,1<br (&gt;="" 17)<="" td=""/><td>47,45 ± 2,8<br (&gt;="" 20)<="" td=""/></td></td>	17,95 ± 1,1 <td>47,45 ± 2,8<br (&gt;="" 20)<="" td=""/></td>	47,45 ± 2,8 
<b>Frauen mit HET</b>	-	-	15,6 ± 0,9	33,55 ± 2,9

Tab.1 Hormonbestimmungen mit Standardabweichungen. Die Zahlen in den Klammern sind die Normalwerte. OK = orale Kontrazeptiva. HET = Hormonersatztherapie. LH = luteinisierendes Hormon. FSH = Follikel stimulierendes Hormon.

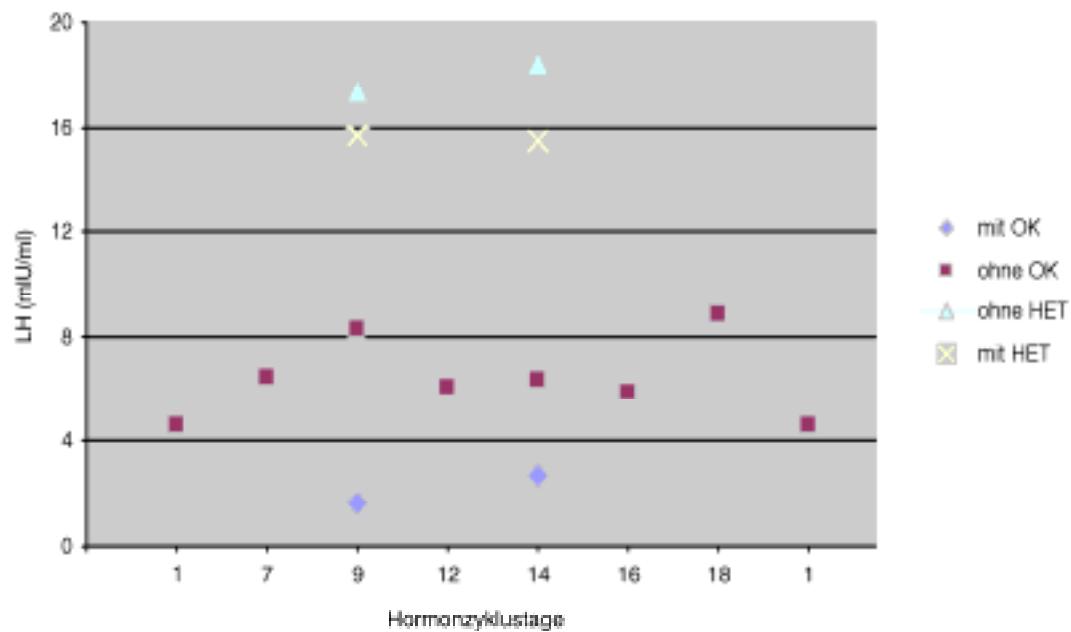


Abb.2 Mittlere Serumspiegel des luteinisierenden Hormons (LH) von prä- und postklimakterischen Frauen mit und ohne Hormonsubstitution. Bei den präklimakterischen Frauen ohne Hormonsubstitution wurde an 8 von 28 Tagen nach Beginn der Menstruation (entspricht dem 1. Hormonzyklustag) gemessen. OK = orale Kontrazeptiva. HET = Hormonersatztherapie.

## 4.2 Gerinnungsparameter der Probandinnen

### 4.2.1 Präklimakterische Frauen

Da sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Abnahmetagen während des Zyklusses bzw. den verschiedenen Östrogen- und Progesteroneinnahmetagen zeigten, sind in Tab. 2 die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen angegeben.

Die Einnahme oraler Kontrazeptiva führte zu einem über der Norm liegendem Anstieg von Faktor VIII, Ristocetin-Kofaktor und  $\alpha$ 2-Antiplasmin waren bei den Frauen mit OK höher als bei den gleichaltrigen Frauen ohne Kontrazeption, aber durchaus noch im Normbereich. Plasminogen und Antithrombin III wurden durch OK nicht beeinflusst. Die Gerinnungsparameter der präklimakterischen Frauen ohne Hormonsubstitution lagen alle im Normbereich.

	mit OK	ohne OK	Differenz	
			(%)	(p<)
Faktor VIII % (Std %)	166,2 66,2	78,9 18,3	+110,6	(0,0001)
Ristocetin-Kofaktor % (Std %)	135,2 36,6	87 18,7	+55,4	(0,0001)
Antithrombin III (Std %)	102,3 11,6	99,3 23,7	+2,9	(NS)
Plasminogen % (Std %)	94,9 17,6	97 6,2	-2,0	(NS)
$\alpha$ 2-Antiplasmin % (Std %)	103 10,5	94,2 17,6	+8,2	(0,0005)

Tab.2 Mittelwerte der Gerinnungsparameter der präklimakterischen Frauen mit und ohne oraler Kontrazeption (OK). Faktor VIII (VIII), Ristocetin-Kofaktor (Risto-Ko), Antithrombin III (AT III), Plasminogen (PL) und  $\alpha$ 2-Antiplasmin ( $\alpha$ 2-AP). Standardabweichung (Std) sowie die Unterschiede der Ergebnisse in % und das Signifikanzniveau. Die Normwerte liegen bei 70-120%, eine Ausnahme bildet Risto-Ko mit 50-150%.

#### 4.2.2 Postklimakterische Frauen

Der Gerinnungsparameter Faktor VIII war bei den postklimakterischen Frauen ohne HET weit über dem der Frauen mit HET. Der Vergleich der Ergebnisse von Ristocetin-Kofaktor bei den Frauen mit und ohne HET zeigte einen signifikant höheren Mittelwert unter der HET. Dieser befand sich allerdings noch im Normbereich. Der Fibrinolyse dienende Faktor Plasminogen und das antifibrinolytisch aktive  $\alpha$ 2-Antiplasmin waren unter der HET knapp signifikant höher als in der Vergleichsgruppe, aber auch hier noch im Normbereich. Das Antithrombin III wurde nicht beeinflusst (Tab. 3).

	mit HET	ohne HET	Differenz (%) (p<)	
<b>Faktor VIII % (Std %)</b>	101,4 7,2	173,5 61,1	-41,5	(0,0001)
<b>Ristocetin-Kofaktor % (Std %)</b>	96,2 12,9	117,7 26,6	-18,2	(0,02)
<b>Antithrombin III % (Std %)</b>	106,5 7,2	106,1 13	+0,3	(NS)
<b>Plasminogen % (Std %)</b>	104,6 11,5	95,8 14,8	+9,1	(0,03)
<b><math>\alpha</math>2-Antiplasmin % (Std %)</b>	103 10,5	94,2 12,8	+14,4	(0,05)

Tab.3 Mittelwerte der Gerinnungsparameter der postklimakterischen Frauen mit und ohne Hormonersatztherapie (HET). Faktor VIII (VIII), Ristocetin-Kofaktor (Risto-Ko), Antithrombin III (AT III), Plasminogen (PL) und  $\alpha$ 2-Antiplasmin ( $\alpha$ 2-AP). Standardabweichung (Std) sowie die Unterschiede der Ergebnisse in % und das Signifikanzniveau. Die Normwerte liegen bei 70-120%, eine Ausnahme bildet Risto-Ko mit 50-150%.

## 4.3 Bildung und Lyse von Plättchen-Fibrin-Thromben

Direkt nach der Thrombenentstehung waren sämtliche Plättchen und das gesamte Fibrin in die neu entstandenen Thromben eingebaut worden. Dies führte zu einer bereits makroskopisch sichtbaren Aufklärung des Plasmas in der Küvette und gleichzeitig zu einem raschen Anstieg der gemessenen Lichttransmission. Durch die Thrombolyse mit Urokinase und die eintretende Freigabe von Fibrin und Thrombozyten aus den Thromben trübte das Plasma wieder ein, und die Lichttransmission nahm kontinuierlich ab.

### 4.3.1 Präklimakterische Frauen ohne hormonelle Kontrazeptiva

#### 4.3.1.1 Gewichte der Plättchen-Fibrin-Thromben vor, während und nach der Lyse mit Urokinase bei präklimakterischen Frauen ohne Kontrazeptiva

In einer mit Plasma und einer standardisierten Thrombozytenkonzentration gefüllten Apact-Küvette entstand durch Zugabe von Kalzium und Kollagen ein Plättchen-Fibrin-Thrombus. Auch ohne Zugabe von Urokinase nahm das Gewicht der Thromben zeitabhängig ab (spontane Gewichtsveränderung). Das Gewicht der 30 und 60 min alten Thromben war im Vergleich zu dem Gewicht der 10 min alten Thromben bereits vor Lysebeginn um durchschnittlich 13 % niedriger. Die Endgewichte der 30 und 60 min alten Thromben waren nach 30minütiger Lyse mit Urokinase signifikant höher als die der 10 min alten Thromben. Das Endgewicht der 60 min alten Thromben lag deutlich über dem der 30 min alten Thromben. Das Thrombusgewicht reduzierte sich bei den 10 min alten Thromben durch die Lyse um durchschnittlich 51,6 %, bei den 30 min alten um 37,5 % und bei den 60 min alten um 32,1 %. Nach weiteren 30 min Lyse der 30 und 60 min alten Thromben erreichten die 30 min alten Thromben mit einem Gesamtgewichtsverlust von 59 % ein signifikant niedrigeres Endgewicht als die 60 min alten Thromben mit 51,4 % (Tab.4). Ein Zusammenhang zwischen den Start- und Endgewichten und dem Gewichtsverlust in den einzelnen Zyklusphasen fand sich nicht.

Tromben-alter	Startgewicht	Lysezeit					
		10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
10 min	16,1 ± 3,2 mg 100 %	11,6 mg 72,0 %	9,5 mg 59,0 %	7,8 ± 1,3 mg 48,4 %			
30 min	13,9 ± 2,2 mg <sup>**</sup> 100 %	11,3 mg 81,2 %	10,3 mg 74,1 %	8,7 <sup>≠</sup> mg 62,5 %	7,3 mg 52,5 %	6,4 mg 46,0 %	5,7 ± 1,5 mg 41,0 %
60 min	14,0 ± 2,3 mg <sup>**</sup> 100 %	12,0 mg 85,7 %	10,8 mg 77,1 %	9,5 <sup>≠</sup> mg 67,9 %	8,3 mg 59,3 %	7,4 mg 52,6 %	6,8 ± 1,6 mg <sup>AE</sup> 48,6 %

Tab.4 Gewichtsverlust bzw. Endgewicht in Prozent vom Startgewicht während der Lyse mit Urokinase bei präklimakterischen Frauen ohne OK (jeweils n=10). <sup>\*\*</sup>p< 0,0001 vs. Startgewicht Thrombusalter 10 min; <sup>≠</sup>p= nicht signifikant bei Startgewicht Thrombusalter 60 min vs. Thrombusalter 30 min. Nach 30 min Lyse: <sup>≠</sup>p< 0,0001 vs. Endgewicht Thrombusalter 10 min. Nach 60 min Lyse: <sup>AE</sup>p< 0,0001 vs. Endgewicht Thrombusalter 30 min.

#### 4.3.1.2 Gewichte der Plättchen-Fibrin-Thromben ohne Zugabe von Urokinase (Kontrolle) bei präklimakterischen Frauen ohne Kontrazeptiva

Die Startgewichte der Kontrollthromben waren identisch mit denen der Thromben, die anschließend mit Urokinase behandelt wurden. Das Thrombengewicht reduzierte sich in geringerem Umfang als unter Lyse mit Urokinase: bei den 10 min alten Thromben nach 30 min durchschnittlich um 18,7%, bei den 30 min alten Thromben um 6,5% und bei den 60 min alten Thromben um 3,7% (Tab.5).

Tromben-alter	Startgewicht	spontane Gewichtsveränderung					
		10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
10 min	16,1 ± 3,2 mg 100 %	14,0 mg 86,9 %	13,4 mg 83,4 %	13,1 ± 1,7 mg 81,3 %			
30 min	13,9 ± 2,0 mg <sup>**</sup> 100 %	13,3 mg 95,7 %	13,1 mg 94,2 %	13,0 mg 93,5 %	13,0 mg 93,5 %	12,9 mg 92,8 %	12,8 ± 1,6 mg 92,0 %
60 min	13,8 ± 2,1 mg <sup>**</sup> 100 %	13,6 mg 98,6 %	13,4 mg 97,1 %	13,3 mg 96,3 %	13,3 mg 96,3 %	13,3 mg 96,3 %	13,2 ± 1,7 mg <sup>≠</sup> 95,7 %

Tab.5 Gewichtsverlust bzw. Endgewicht in Prozent vom Startgewicht der Kontrolle (NaCl anstatt Urokinase) bei präklimakterischen Frauen ohne OK (jeweils n=10). <sup>\*\*</sup>p< 0,0001 vs. Startgewicht Thrombusalter 10 min. Nach 30 min Lyse keine Unterschiede im Gewicht. Nach 60 min Lyse: <sup>≠</sup>p< 0,05 vs. Endgewicht Thrombusalter 30 min.

Abbildung 3 zeigt graphisch die Gewichtsreduktion von Thromben mit und ohne Zugabe von Urokinase bei präklimakterischen Frauen ohne Kontrazeptiva.

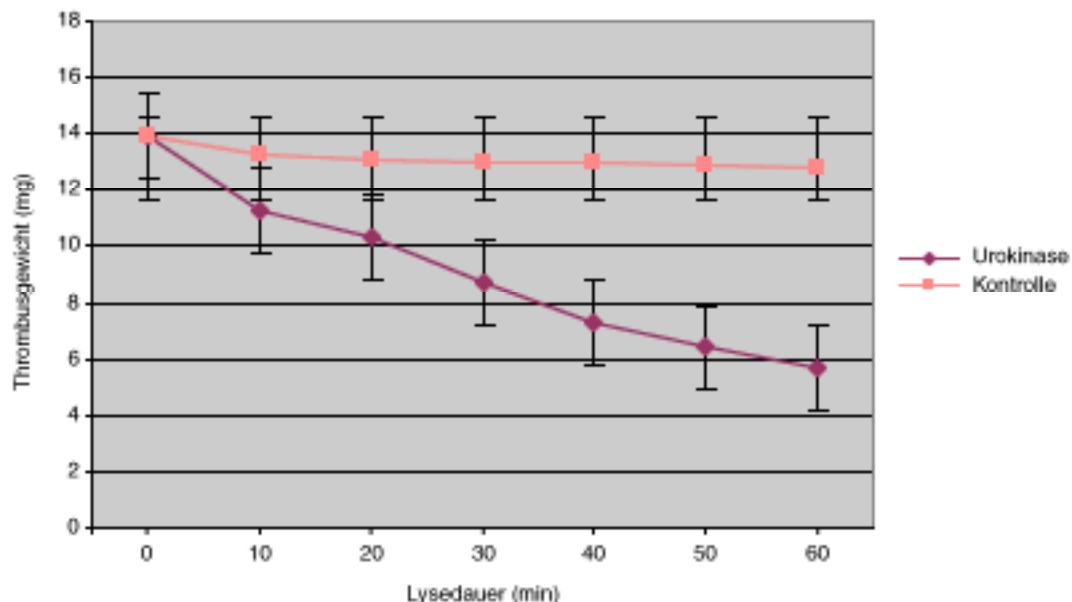


Abb.3 Thrombolyse von 30 min alten Thromben mit Urokinase im Vergleich zu der Kontrolle bei Frauen ohne OK. Nach 60 min Lyse  $p < 0,0001$ .

#### 4.3.1.3 Lichttransmission des Plasma-Überstandes ohne und mit Zugabe von Urokinase bei präklimakterischen Frauen ohne Kontrazeptiva

Die Lichttransmission des Plasma-Überstandes lag bei den 10 min alten Thromben vor der Lyse über der bei 30 bzw. 60 min alten Thromben. Die Lichttransmission des Plasmaüberstandes bei 30 min alten Thromben lag nochmals über der bei 60 min alten Thromben. In Folge der Lyse kam es zu einer Reduktion der Lichttransmission. Nach 30 min lag die Lichttransmission bei 10 min alten Thromben noch über der bei 30 und 60 min alten Thromben, während sich sowohl nach 30, als auch nach 60 min Lyse die Ergebnisse zwischen den 30 min alten Thromben und den 60 min alten Thromben nicht unterschieden. Auch hier zeigte sich keine Abhängigkeit zwischen den gemessenen Transmissionswerten und den einzelnen Zyklusphasen (Tab.6).

Tromben-alter	Zusatz	Startlicht-transmission	Lysedauer/ spontane Lichttransmissionsveränderung					
			10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
10 min	Uro	96,2 ± 3,4 %	95,1 %	92,2 %	88,6 ± 4,4 %			
	Nacl	96,1 ± 3,4 %	95,8 %	95,0 %	94,3 ± 3,3 %			
30 min	Uro	94,9 ± 3,3 % <sup>--</sup>	93,6 %	90,9 %	86,7 % <sup>Δ</sup>	80,6 %	77,5 %	73,1 ± 6,3 %
	Nacl	95,0 ± 3,6 % <sup>--</sup>	94,6 %	93,8 %	93,1 %	92,4 %	91,7 %	90,9 ± 4,0 %
60 min	Uro	93,2 ± 3,9 % <sup>--≠</sup>	92,4 %	90,6 %	86,6 % <sup>∅</sup>	82 %	77,2 %	73,2 ± 6,8 %
	Nacl	93,1 ± 3,9 % <sup>--≠</sup>	93,1 %	92,4 %	91,6 %	90,9 %	89,9 %	88,9 ± 3,9 %

Tab.6 Reduktion der Lichttransmission im Plasmaüberstand während der Lyse mit Urokinase bzw. der Kontrolle bei präklimakterischen Frauen ohne OK (jeweils n=10). <sup>--</sup>p< 0,0001 vs. Startlichttransmission Thrombusalter 10 min.; <sup>≠</sup>p< 0,0001 vs. Startlichttransmission Thrombusalter 30 min. Nach 30 min Lyse: <sup>Δ</sup>p< 0,02 vs. Endlichttransmission Thrombusalter 10 min; <sup>∅</sup>p< 0,04 vs. Endlichttransmission Thrombusalter 10 min. Bei den 30 min und 60 min alten Thromben im weiteren Verlauf keine Unterschiede mehr.

Abbildung 4 zeigt graphisch die Korrelation von Thrombusgewicht und Lichttransmission bei präklimakterischen Frauen ohne OK am Beispiel der 60 min alten Thromben, die 1 Stunde lysiert wurden. Man erkennt, dass die Gewichtsreduktion zu einer Freigabe von lichtabsorbierenden Teilchen führte, welche die photometrisch bestimmte Lichttransmission reduzieren.

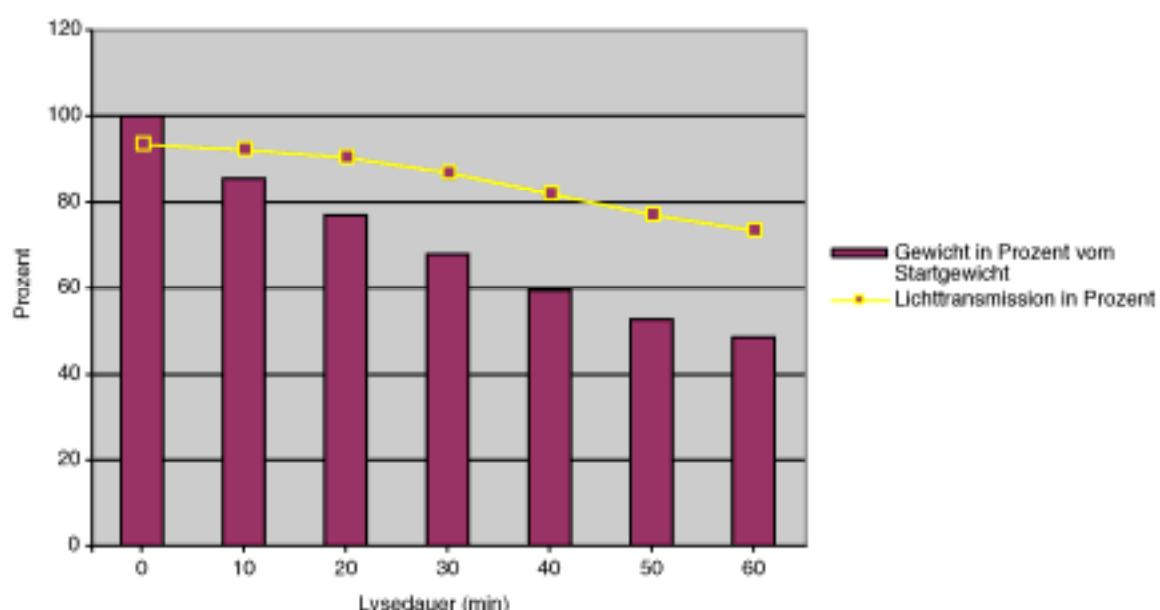


Abb.4 Korrelation von Thrombusgewicht und Lichttransmission bei präklimakterischen Frauen ohne OK am Beispiel von 60 min alten Thromben, die 1 Stunde lysiert wurden. Gewicht und Lichttransmission wurden alle 10 min bestimmt.

#### 4.3.1.4 Morphologie der Plättchen-Fibrin-Thromben bei präklimakterischen Frauen ohne Kontrazeptiva

Die Plättchen-Fibrin-Thromben waren nach 10 Minuten im Durchmesser 6-7 mm groß. Der Thrombus ließ sich mit der Pinzette in einem stabilen Zustand leicht aus dem Plasmaüberstand entnehmen. Er bestand aus mehreren Kernen von Plättchenaggregaten, die von Fibrin durchzogen und von einem Fibrinring umgeben waren. Der 30 bzw. 60 min alte Thrombus wirkte makroskopisch etwas kleiner (Abb.5a,b).

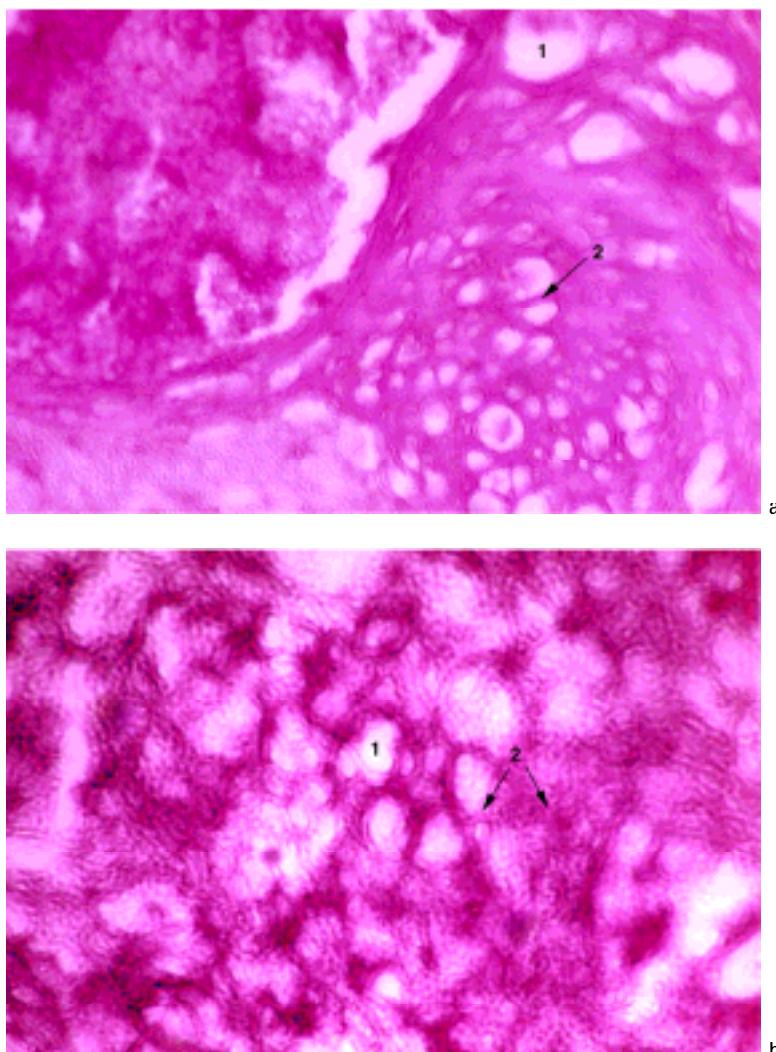


Abb.5a,b. Querschnitt eines 10 Minuten alten Plättchen-Fibrin-Thrombus, beispielhaft für präklimakterische Frauen ohne Kontrazeptiva. Man erkennt Plasmeinschlüsse (1) umgeben von Plättchenaggregaten, welche mit Fibrin durchzogen sind (2). Vergrößerung a 1:10, b 1:100 HE-Färbung.

## 4.3.2 Präklimakterische Frauen mit hormoneller Kontrazeption

### 4.3.2.1 Gewichte der Plättchen-Fibrin-Thromben vor, während und nach der Lyse mit Urokinase bei präklimakterischen Frauen mit hormoneller Kontrazeption

Das Gewicht der 30 und 60 min alten Thromben hatte sich im Vergleich zu dem Gewicht der 10 min alten Thromben bereits vor Lysebeginn um durchschnittlich 23,1 % bei 30 min alten Thromben bzw. um 20,0 % bei den 60 min. alten Thromben reduziert. Die Endgewichte der 30 und 60 min alten Thromben waren nach 30minütiger Lyse mit Urokinase signifikant höher als die der 10 min alten Thromben. Das Thrombengewicht reduzierte sich nach 30 min bei den 10 min alten Thromben um durchschnittlich 77,3 %, bei den 30 und 60 min alten jeweils um 58,4 %. Eine weitere 30minütige Lyse der 30 und 60 min alten Thromben führte zu einem Gewichtsverlust von 77,1 % bei den 30 min alten Thromben und um 77,4% bei den 60 min alten Thromben. Die Thrombengewichte der 30 und 60 min alten Thromben unterschieden sich in ihrem Endgewicht weder nach 30 noch nach 60 min Lyse (Tab.7). Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Differenzen innerhalb der unterschiedlichen Abnahmetage, auch nicht in der Menstruationsphase, in der keine OK eingenommen wurden. --

Tromben- alter	Startgewicht	Lysezeit					
		10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
10 min	21,6 ± 7,0 mg 100 %	10,9 mg 50,5 %	7,2 mg 58,5 %	4,9 ± 2,0 mg 22,7 %			
30 min	16,6 ± 4,0 mg 100 %	12,1 mg 72,8 %	9,0 mg 54,2 %	6,9 mg <sup>≠</sup> 41,6 %	5,2 mg 31,3 %	4,4 mg 26,5 %	3,8 ± 1,5 mg 22,9 %
60 min	17,3 ± 4,6 mg 100 %	12,5 mg 72,3 %	9,5 mg 54,9 %	7,2 mg <sup>≠</sup> 41,6 %	5,5 mg 31,8 %	4,5 mg 26,0 %	3,9 ± 1,5 mg 22,5 %

Tab.7 Gewichtsverlust bzw. Endgewicht in Prozent vom Startgewicht während der Lyse mit Urokinase bei präklimakterischen Frauen mit OK (jeweils n=10). -- p< 0,0001 vs. Startgewicht Thrombusalter 10 min; p= nicht signifikant bei Startgewicht Thrombusalter 60 min vs. Thrombusalter 30 min. Nach 30 min Lyse: <sup>≠</sup>p< 0,0001 vs. Endgewicht Thrombusalter 10 min. Nach 60 min Lyse unterscheiden sich die Ergebnisse nicht.

#### 4.3.2.2 Gewichte der Plättchen-Fibrin-Thromben ohne Zugabe von Urokinase (Kontrolle) bei präklimakterischen Frauen mit hormoneller Kontrazeption

Die Startgewichte in der Kontrolle waren identisch mit dem Gewicht der Thromben, die anschließend mit Urokinase behandelt wurden. Die 10 min alten Thromben verloren nach 30 min 29,4% ihres Startgewichtes. Im gleichen Zeitraum verloren die 30 min alten Thromben 11,6% und die 60 min alten Thromben 7,7% ihres Startgewichtes. Nach weiteren 30 min lag das Endgewicht der 30 min alten Thromben 15% und das der 60 min alten Thromben 11,3 % unter dem Startgewicht. Im Vergleich mit den 30 und 60 min alten Thromben war die spontane Gewichtsreduktion der 10 min alten Thromben nach 30 min deutlich höher ( $p<0,0001$ ). Die Ergebnisse der 30 und 60 min alten Thromben untereinander waren vergleichbar (Tab.8).

Tromben-alter	Startgewicht	spontane Gewichtsveränderung					
		10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
<b>10 min</b>	$21,4 \pm 7,1$ mg 100 %	17,0 mg 79,4 %	15,8 mg 73,8 %	$15,1 \pm 2,6$ mg 70,6 %			
<b>30 min</b>	$17,3 \pm 4,7$ mg <sup>--</sup> 100 %	15,8 mg 91,3 %	15,4 mg 89,0 %	15,3 mg 88,4 %	14,9 mg 86,1 %	14,8 mg 85,5 %	$14,7 \pm 2,6$ mg 85,0 %
<b>60 min</b>	$16,8 \pm 4,2$ mg <sup>--</sup> 100 %	16,1 mg 95,8 %	15,8 mg 94,0 %	15,5 mg 92,3 %	15,3 mg 91,0 %	15,0 mg 89,3 %	$14,9 \pm 2,5$ mg 88,7 %

Tab.8 Gewichtsverlust bzw. Endgewicht in Prozent vom Startgewicht der Kontrolle (NaCl anstatt Urokinase) bei Frauen mit OK (jeweils  $n=10$ ). <sup>--</sup>  $p<0,0001$  vs. Startgewicht Thrombusalter 10 min. Nach 30 min und 60 min Lyse keine Unterschiede im Gewicht.

#### 4.3.2.3 Lichttransmission des Plasma-Überstandes ohne und mit Zugabe von Urokinase bei präklimakterischen Frauen mit hormoneller Kontrazeption

Die Lichttransmission des Plasma-Überstandes lag bei den 10 min alten Thromben vor der Lyse über der bei 30 und 60 min alten Thromben, und die Lichttransmission des Plasma-Überstandes bei 30 min alten Thromben lag nochmals über der bei 60 min alten Thromben. Nach 30 min lag die Lichttransmission bei 10 min alten Thromben noch über der bei 60 min alten Thromben, gegenüber den 30 min alten Thromben zeigte sich keine Differenz. Nach 60 min Lyse lag die Lichttransmission bei 60 min alten Thromben signifikant unter der bei 30 min alten Thromben. Es ergaben sich keine Differenzen innerhalb der unterschiedlichen Untersuchungstage (Tab.9).

Tromben- alter	Zusatz	Startlicht- transmission	Lysedauer/ spontane Lichttransmissionsveränderung					
			10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
<b>10 min</b>	Uro	97,4 ± 3,5 %	95,4 %	89,6 %	85,0 ± 5,4 %			
	Nacl	97,9 ± 4,0 %	97,6 %	96,7 %	96,1 ± 3,9 %			
<b>30 min</b>	Uro	95,6 ± 3,9 % <sup>--</sup>	94,6 %	90,2 %	84,1 %	77,9 %	72,0 %	67,2 ± 6,6 %
	Nacl	95,0 ± 3,6 % <sup>--</sup>	95,3 %	94,6 %	93,9 %	92,8 %	92,0 %	91,2 ± 4,1 %
<b>60 min</b>	Uro	94,7 ± 4,2 % <sup>--≠</sup>	93,4 %	89,9 %	83,0 % <sup>≠</sup>	75,6 %	69,2 %	64,4 ± 7,4 % <sup>Ø</sup>
	Nacl	95,0 ± 3,9 % <sup>--≠</sup>	94,8 %	93,8 %	93,1 %	92,4 %	91,6 %	90,7 ± 4,8 %

Tab.9 Reduktion der Lichttransmission im Plasmaüberstand während der Lyse mit Urokinase bzw. der Kontrolle bei präklimakterischen Frauen mit OK (jeweils n=10). <sup>--</sup> p< 0,0001 vs. Startlichttransmission Thrombusalter 10 min.; <sup>≠</sup> p< 0,05 vs. Startlichttransmission Thrombusalter 30 min. Nach 30 min Lyse: <sup>≠</sup> p< 0,03 vs. Endlichttransmission Thrombusalter 10 min; Thrombusalter 30 min vs. Thrombusalter 60min nach 30 min Lyse nicht signifikant. Nach 60 min Lyse: <sup>Ø</sup> p< 0,02 vs. Endlichttransmission Thrombusalter 30 min.

Abbildung 6 zeigt graphisch die Korrelation von Thrombusgewicht und Lichttransmission bei präklimakterischen Frauen mit OK am Beispiel der 60 min alten Thromben, die 1 Stunde lysiert wurden. Auch hier ist ersichtlich, dass die Gewichtsreduktion zu einer Freigabe von lichtabsorbierenden Teilchen führte, welche die photometrisch bestimmte Lichttransmission reduzieren.

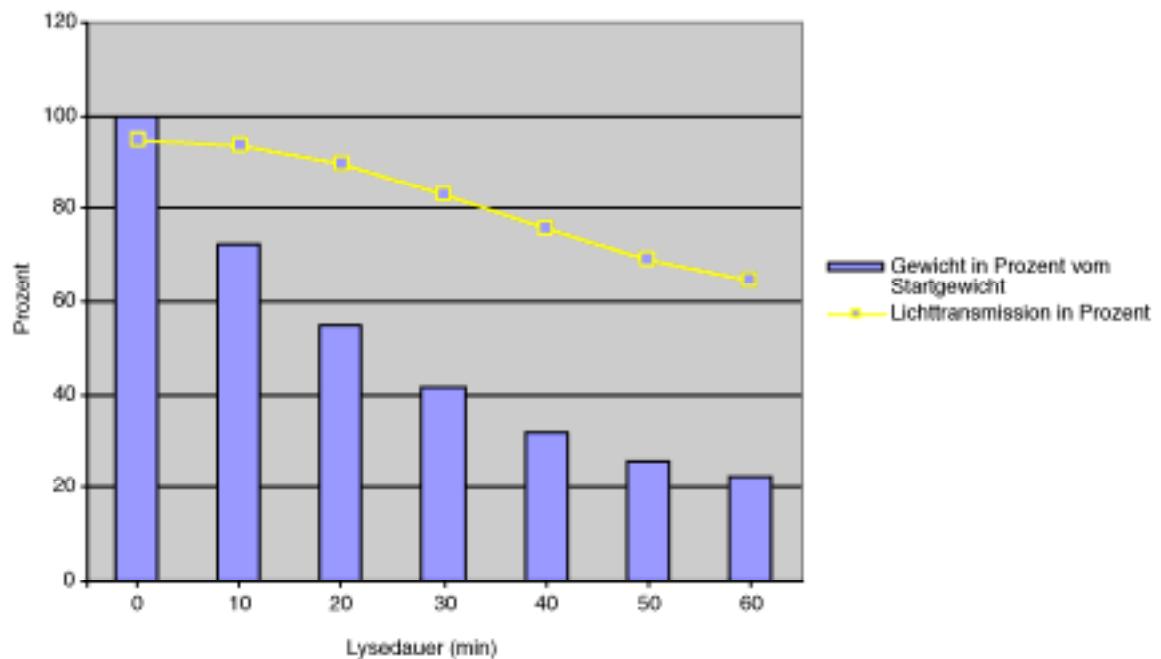


Abb.6 Korrelation von Thrombusgewicht und Lichttransmission bei den präklimakterischen Frauen mit OK am Beispiel eines 60 min alten Thrombus.

#### 4.3.2.4 Morphologie der Plättchen-Fibrin-Thromben bei präklimakterischen Frauen mit Kontrazeptiva

Hier waren die Plättchen-Fibrin-Thromben nach 10 Minuten im Durchmesser bis zu 11 mm groß. Nach Entnahme aus dem Plasmaüberstand zeigte sich ein sehr fragiler, lockerer, schwammiger und lichttransparenter Thrombus. Das die Plättchenaggregate durchziehende Fibrinnetz zeigte mikroskopisch einen zu den präklimakterischen Frauen ohne OK vergleichsweise losen Zusammenhalt, bedingt durch viele, relative große Plasmaeinschlüsse. Ebenso war der den Thrombus umschließende Fibrinring im Aufbau weniger kompakt. Die 30 bzw. 60 min alten Thromben verloren sichtbar an Volumen. Mikroskopisch war dies hauptsächlich auf den Rückgang der Plasmaeinschlüsse zurückzuführen (Abb.7a,b).

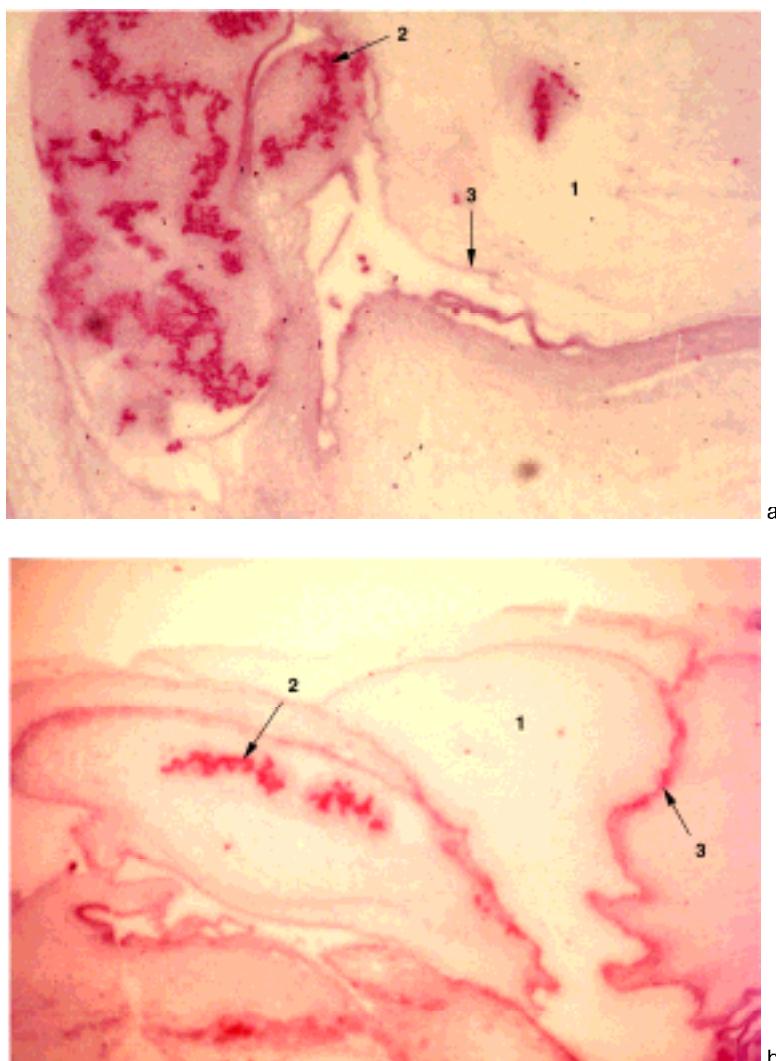


Abb.7a,b. Querschnitt eines 10 Minuten alten Plättchen-Fibrin-Thrombus, beispielhaft für präklimakterische Frauen mit Kontrazeptiva. Sichtbar sind große Mengen an Plasma (1), welches Inseln aus Plättchen-Fibrin-Aggregaten (2) umfließt. Das Plasma wird durch ein fragiles Netz (3) aus Fibrin- und Thrombozyten-Aggregaten eingefasst. Vergrößerung beider Aufnahmen 1:10. HE-Färbung.

### 4.3.3 Postklimakterische Frauen ohne Hormonersatztherapie

#### 4.3.3.1 Gewichte der Plättchen-Fibrin-Thromben vor, während und nach der Lyse mit Urokinase bei postklimakterischen Frauen ohne Hormonersatztherapie

Das Gewicht der 30 und 60 min alten Thromben hatte sich im Vergleich zu dem Gewicht der 10 min alten Thromben bereits vor Lysebeginn um durchschnittlich 19,6 % bei den 30 min alten bzw. 17,4 % bei den 60 min alten Thromben reduziert. Die Endgewichte der 30 und 60 min alten Thromben waren nach 30minütiger Lyse mit Urokinase signifikant höher als die der 10 min alten Thromben. Das Thrombusgewicht reduzierte sich bei den 10 min alten Thromben um durchschnittlich 50,6 %, bei den 30 min alten um 30,7 % und bei den 60 min alten um 28,9 %. Nach weiteren 30 min Lyse der 30 und 60 min alten Thromben erreichten die 30 min alten Thromben mit einem Gesamtgewichtsverlust von 50,8 % ein signifikant niedrigeres Endgewicht als die 60 min alten Thromben mit 46,4 % (Tab.10).

Tromben- alter	Startgewicht	Lysezeit					
		10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
10 min	23,5 ± 5,8 mg 100 %	16,3 mg 69,4 %	13,9 mg 59,1 %	11,6 ± 2,3 mg 49,4 %			
30 min	18,9 ± 3,7 mg <sup>≠</sup> 100 %	16,0 mg 84,6 %	14,6 mg 77,2 %	13,1 mg <sup>Δ</sup> 69,3 %	11,5 mg 60,8 %	10,2 mg 54,0 %	9,3 ± 1,6 mg 49,2 %
60 min	19,4 ± 3,4 mg <sup>–</sup> 100 %	16,8 mg 86,6 %	15,0 mg 77,3 %	13,8 mg <sup>Δ</sup> 71,1 %	12,7 mg 65,4 %	11,4 mg 58,8 %	10,4 ± 1,6 mg <sup>Ø</sup> 53,6 %

Tab.10 Gewichtsverlust bzw. Endgewicht in Prozent vom Startgewicht während der Lyse mit Urokinase bei postklimakterischen Frauen ohne HET (jeweils n=7). <sup>–</sup> p< 0,0002 vs. Startgewicht Thrombusalter 10 min; <sup>≠</sup> p< 0,0001 vs Startgewicht Thrombusalter 10 min. p= nicht signifikant bei Startgewicht Thrombusalter 60 min vs. Thrombusalter 30 min. Nach 30 min Lyse: <sup>Δ</sup> p< 0,0001 vs. Endgewicht Thrombusalter 10 min. Nach 60 min Lyse: <sup>Ø</sup> p< 0,0001 vs. Endgewicht Thrombusalter 30 min.

#### 4.3.3.2 Gewichte der Plättchen-Fibrin-Thromben ohne Zugabe von Urokinase (Kontrolle) bei postklimakterischen Frauen ohne Hormonersatztherapie

Die Startgewichte stimmten auch hier mit den Gewichten der anschließend lysierten Thromben überein. Ohne Zufuhr von Urokinase verloren die 10 min alten Thromben innerhalb von 30 min 22,6 % ihres Startgewichtes. Im gleichen Zeitraum reduzierte sich das Gewicht der 30 min alten Thromben um 4,9% und das der 60 min alten Thromben um 7,1%. Statistisch betrachtet unterscheiden sich die Ergebnisse zwischen den 60 und den 30 min alten Thromben nicht. Eine Differenz war nach 30 min zwischen den 10 min alten und den 30 min alten Thromben zu erkennen, allerdings nicht zwischen dem 60 min und 10 min alten Thromben. Nach 60 min war das Gewicht der 60 min alten Thromben etwas schwerer als das der 30 min alten Thromben (Tab.11).

Tromben- alter	Startgewicht	spontane Gewichtsveränderung					
		10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
10 min	23,9 ± 6,5 mg 100 %	20,3 mg 84,9 %	19,2 mg 80,3 %	18,5 ± 3,2 mg 77,4 %			
30 min	18,4 ± 3,5 mg <sup>≠</sup> 100 %	17,8 mg 96,7 %	17,8 mg 96,7 %	17,5 mg <sup>Δ</sup> 95,1 %	17,3 mg 94,0 %	17,3 mg 94,0 %	17,3 ± 2,8 mg 94,0 %
60 min	19,8 ± 3,6 mg <sup>--</sup> 100 %	19,1 mg 96,5 %	18,6 mg 93,9 %	18,4 mg 92,9 %	18,4 mg 92,9 %	18,2 mg 91,9 %	18,1 ± 3,3 mg <sup>Ø</sup> 91,4 %

Tab.11 Gewichtsverlust bzw. Endgewicht in Prozent vom Startgewicht der Kontrolle (NaCl anstatt Urokinase) bei postklimakterischen Frauen ohne HET (jeweils n=7). <sup>--</sup> p< 0,0002 vs. Startgewicht Thrombusalter 10 min; <sup>≠</sup> p< 0,0001 vs. Startgewicht Thrombusalter 10 min. Nach 30 min Lyse: <sup>Δ</sup>p< 0,005 vs. Endgewicht Thrombusalter 10 min. Nach 60 min Lyse: <sup>Ø</sup>p< 0,05 vs. Endgewicht Thrombusalter 30 min.

#### 4.3.3.3 Lichttransmission des Plasma-Überstandes ohne und mit Zugabe von Urokinase bei postklimakterischen Frauen ohne Hormonersatztherapie

Die Lichttransmission des Plasma-Überstandes lag bei den 10 min alten Thromben vor Lyse über der bei 30 und 60 min alten Thromben, und die Lichttransmission bei 30 min alten Thromben lag nochmals über der bei 60 min alten Thromben. Nach 30 bzw. 60 min Lyse waren die Ergebnisse gleich (Tab.12).

Tromben-alter	Zusatz	Startlicht-transmission	Lysedauer/ spontane Lichttransmissionsveränderung					
			10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
10 min	Uro	95,4 ± 3,5 %	94,4 %	92,2 %	88,6 ± 3,9 %			
	Nacl	95,5 ± 3,6 %	95,6 %	94,9 %	93,1 ± 4,4 %			
30 min	Uro	93,4 ± 4,6 % <sup>Δ</sup>	93,1 %	91,0 %	87,7 %	82,9 %	78,0 %	74,1 ± 8,6 %
	Nacl	95,0 ± 3,6 % <sup>Δ</sup>	92,6 %	92,0 %	91,2 %	90,1 %	89,0 %	88,2 ± 5,3 %
60 min	Uro	92,3 ± 4,5 % <sup>ΔΔ</sup> <sup>≠</sup>	91,8 %	90,3 %	86,6 %	82,4 %	77,6 %	73,5 ± 8,3 %
	Nacl	92,8 ± 4,0 % <sup>ΔΔ</sup> <sup>≠</sup>	92,9 %	92,0 %	91,1 %	90,5 %	89,7 %	88,9 ± 4,7 %

Tab.12 Reduktion der Lichttransmission im Plasmaüberstand während der Lyse mit Urokinase bzw. der Kontrolle bei postklimakterischen Frauen ohne HET (jeweils n=7). <sup>Δ</sup> p<0,0001 vs. Startlichttransmission Thrombusalter 10 min.; <sup>Δ</sup> p<0,0002 vs. Startlichttransmission Thrombusalter 10 min.; <sup>≠</sup> p< 0,05 vs. Startlichttransmission Thrombusalter 30 min. <sup>Δ</sup> p<0,02 vs. Endlichttransmission Thrombusalter 10 min. Nach 30 min und 60 min unterscheiden sich die 30 min und 60 min alten Thromben nach Lyse mit Urokinase und in der Kontrolle in ihrer Lichttransmission nicht mehr.

Abbildung 8 zeigt graphisch die Korrelation von Thrombusgewicht und Lichttransmission bei postklimakterischen Frauen ohne HET am Beispiel der 60 min alten Thromben, die 1 Stunde lysiert wurden. Die Lyse der Thromben führte zur zunehmenden Trübung des Plasmaüberstandes und zog so die Abnahme der Lichttransmission nach sich.

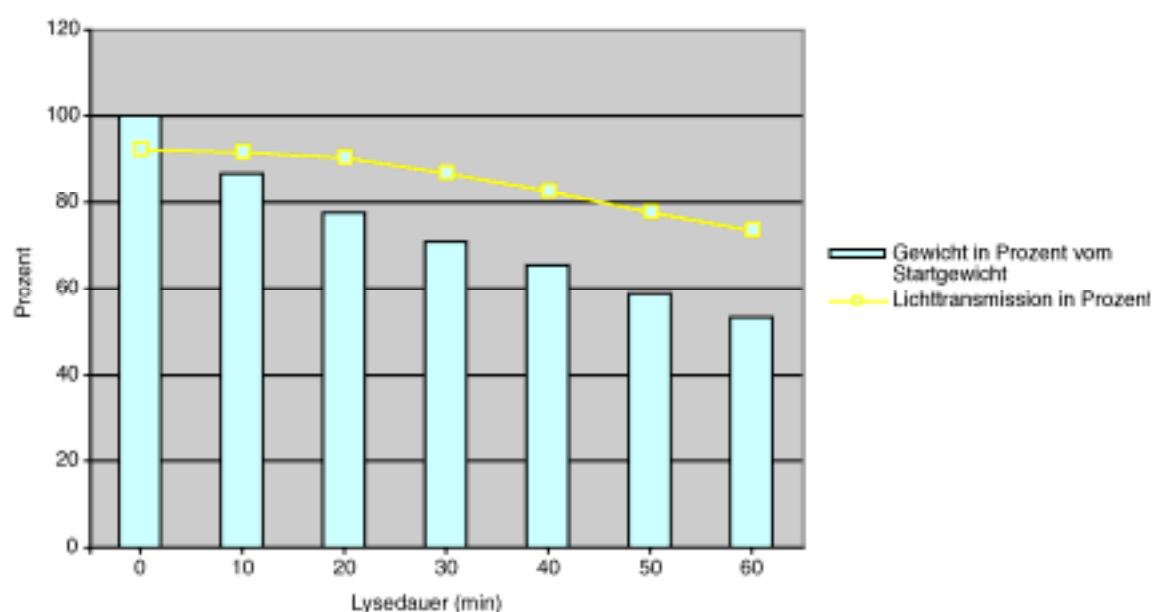


Abb.8 Korrelation von Thrombusgewicht und Lichttransmission am Beispiel der 60 min alten Thromben bei postklimakterischen Frauen ohne Hormonersatztherapie.

#### 4.3.3.4 Morphologie der Plättchen-Fibrin-Thromben bei postklimakterischen Frauen ohne Hormonersatztherapie

Die 10 min alten Thromben waren durchschnittlich 8-10 mm groß und ließen sich aufgrund eines dichten, stabilen Fibrin-Thromben-Aggregates als feste, kleine Kugel, häufig mit Thrombusschwanz, aus dem Plasmaüberstand entnehmen. Mikroskopisch zeigte sich ein engmaschiges Fibrinnetz, welches viele Kerne an Plättchenaggregaten durchzog und auch am Rand von einem dichten Fibrinnetz ummantelt wurde. Die 30 bzw. 60 min alten Thromben waren kleiner, weiterhin aber reich an Fibrin- und Plättchenaggregaten, welches sie gegenüber der Lyse mit Urokinase und den mechanischen Einflüssen durch das Wiegen zu sehr widerstandsfähigen Thromben machte (Abb.9a,b).

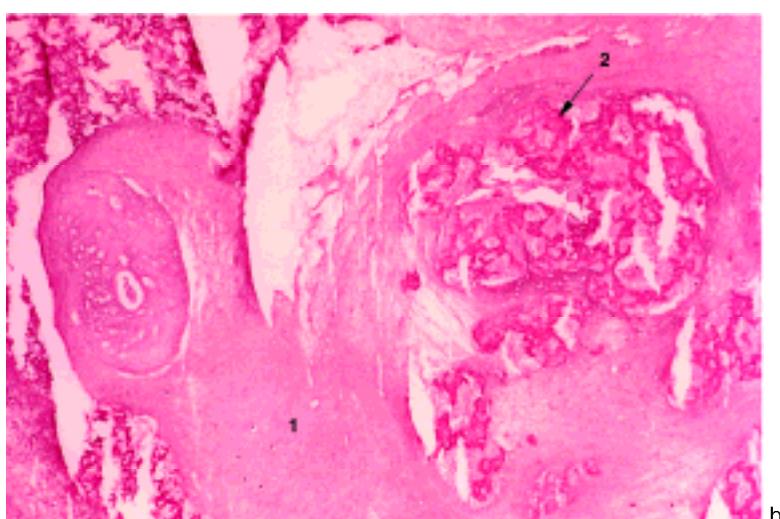
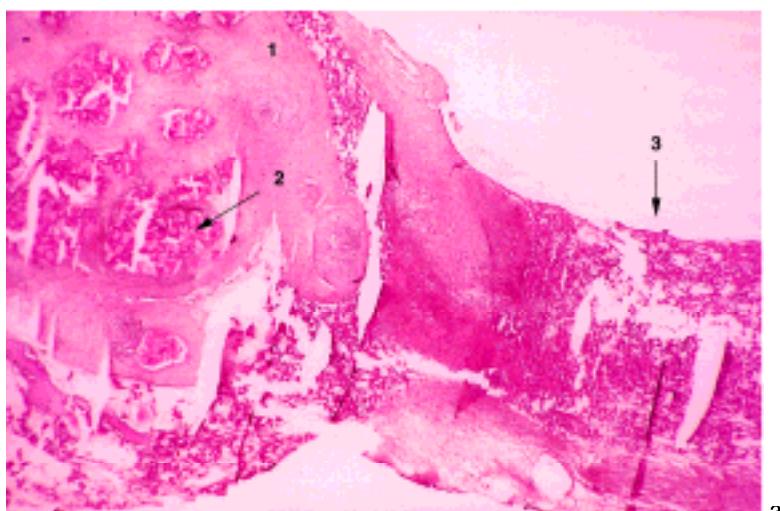


Abb.9a,b. Querschnitt eines 10 Minuten alten Plättchen-Fibrin-Thrombus, beispielhaft für postklimakterische Frauen ohne HET. Plasmaeinschlüsse (1) umfließen dichte Plättchen-Fibrin-Aggregate (2). In dieser Gruppe entwickelte sich unter der Rotation des Magneten innerhalb der Kuvette häufig ein kompakter, harter Thrombus mit einem festen Schwanzfortsatz (3). Vergrößerung a 1:4, b 1:10. HE-Färbung.

#### 4.3.4 Postklimakterische Frauen mit Hormonersatztherapie

##### 4.3.4.1 Gewichte der Plättchen-Fibrin-Thromben vor, während und nach der Lyse mit Urokinase bei postklimakterischen Frauen mit Hormonersatztherapie

Das Gewicht der 30 und 60 min alten Thromben hatte sich im Vergleich zu dem Gewicht der 10 min alten Thromben bereits vor Lysebeginn um durchschnittlich 8,3 % reduziert. Die Endgewichte der 30 und 60 min alten Thromben waren nach 30minütiger Lyse mit Urokinase signifikant höher als die der 10 min alten Thromben. Das Thrombengewicht reduzierte sich bei den 10 min alten Thromben um durchschnittlich 48,5 %, bei den 30 min alten um 39 % und bei den 60 min alten um 35,8 %. Nach weiteren 30 min Lyse der 30 und 60 min alten Thromben erreichten die 30 min alten Thromben mit einem Gesamtgewichtsverlust von 59,3 % ein signifikant niedrigeres Endgewicht als die 60 min alten Thromben mit 54,5 % (Tab.13).

Tromben- alter	Startgewicht	Lysezeit					
		10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
10 min	13,4 ± 2,4 mg 100 %	10,1 mg 75,3 %	8,3 mg 61,9 %	6,9 ± 1,8 mg 51,5 %			
30 min	12,3 ± 1,8 mg <sup>--</sup> 100 %	10,1 mg 82,1 %	8,8 mg 71,5 %	7,5 mg <sup>Æ</sup> 61,0 %	6,4 mg 52,0 %	5,6 mg 45,5 %	5,0 ± 1,6 mg 40,7 %
60 min	12,3 ± 1,7 mg <sup>--</sup> 100 %	10,1 mg 82,1 %	9,2 mg 74,8 %	7,9 mg <sup>≠</sup> 64,2 %	6,8 mg 55,3 %	6,0 mg 48,8 %	5,6 ± 2,0 mg <sup>Ø</sup> 45,5 %

Tab.13 Gewichtsverlust bzw. Endgewicht in Prozent vom Startgewicht während der Lyse mit Urokinase bei postklimakterischen Frauen mit HET (jeweils n=7). <sup>--</sup> p< 0,0001 vs. Startgewicht Thrombusalter 10 min; p= nicht signifikant bei Startgewicht Thrombusalter 60 min vs. Thrombusalter 30 min. Nach 30 min Lyse: <sup>≠</sup>p< 0,0005 vs. Endgewicht Thrombusalter 10 min. <sup>Æ</sup>p< 0,05 vs. Endgewicht Thrombusalter 10 min. Nach 60 min Lyse: <sup>Ø</sup>p< 0,05 vs. Endgewicht Thrombusalter 30 min.

#### 4.3.4.2 Gewichte der Plättchen-Fibrin-Thromben ohne Zugabe von Urokinase (Kontrolle) bei postklimakterischen Frauen mit Hormonersatztherapie

Die Startgewichte entsprachen denen der Thromben, die anschließend lysiert wurden. Nach 30 Minuten verloren die 10 min alten Thromben 15 % ihres Startgewichtes. Die 30 min alten Thromben verloren 4,2 % und die 60 min alten Thromben 3,4 % ihres Startgewichtes. Nach weiteren 30 Minuten konnte das Endgewicht mit einem Gesamtgewichtsverlust von 5,9 % bei den 30 min alten Thromben festgestellt werden. In diesen 30 Minuten veränderten sich die Gewichte der 60 min alten Thromben nicht mehr. Die Endgewichte der verschiedenen alten Thromben unterschieden sich in den statistischen Vergleichstests nicht (Tab.14).

Tromben-alter	Startgewicht	spontane Gewichtsveränderung					
		10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
10 min	13,3 ± 1,7 mg 100 %	11,9 mg 89,4 %	11,6 mg 87,2 %	11,3 ± 1,1 mg 85,0 %			
30 min	12,0 ± 1,8 mg <sup>--</sup> 100 %	11,7 mg 97,5 %	11,5 mg 95,8 %	11,5 mg 95,8 %	11,5 mg 95,8 %	11,3 mg 94,1 %	11,3 ± 1,5 mg 94,1 %
60 min	12,0 ± 1,4 mg <sup>--</sup> 100 %	11,8 mg 98,3 %	11,8 mg 98,3 %	11,6 mg 96,6 %	11,6 mg 96,6 %	11,6 mg 96,6 %	11,6 ± 1,3 mg 96,6 %

Tab.14 Gewichtsverlust bzw. Endgewicht in Prozent vom Startgewicht der Kontrolle (NaCl anstatt Urokinase) bei Frauen mit HET (jeweils n=7). <sup>--</sup> p< 0,0001 vs. Startgewicht Thrombusalter 10 min. Nach 30 und 60 min unterscheiden sich die Ergebnisse nicht.

#### 4.3.4.3 Lichttransmission des Plasma-Überstandes ohne und mit Zugabe von Urokinase bei postklimakterischen Frauen mit Hormonersatztherapie

Die Lichttransmission des Plasma-Überstandes lag bei den 10 min alten Thromben vor der Lyse über der bei 30 und 60 min alten Thromben, und die Lichttransmission des Plasma-Überstandes bei 30 min alten Thromben lag nochmals über der bei 60 min alten Thromben. Nach 30 min Lyse lag die Lichttransmission bei 10 min alten Thromben noch über der bei 60 min alten Thromben, gegenüber den 30 min alten Thromben zeigte sich keine Differenz mehr. Nach 60 min Lyse waren die Ergebnisse gleich (Tab.15).

Tromben-alter	Zusatz	Startlicht-transmission	Lysedauer/ spontane Lichttransmissionsveränderung					
			10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
10 min	Uro	96,2 ± 3,8 %	95,4 %	92,9 %	88,3 ± 4,5 %			
	Nacl	95,8 ± 3,3 %	96,0 %	95,2 %	94,2 ± 3,1 %			
30 min	Uro	94,7 ± 3,9 % <sup>≠</sup>	94,0 %	90,8 %	86,6 %	81,3 %	76,3 %	71,9 ± 5,7 %
	Nacl	93,7 ± 4,4 % <sup>≠</sup>	93,4 %	93,1 %	92,3 %	91,2 %	90,3 %	89,1 ± 4,1 %
60 min	Uro	91,2 ± 4,2 % <sup>--E</sup>	91,4 %	88,3 %	83,0 % <sup>E</sup>	77,0 %	71,8 %	67,8 ± 8,5 % <sup>∞</sup>
	Nacl	92,8 ± 3,9 % <sup>--E</sup>	92,8 %	91,8 %	90,8 %	90,3 %	89,0 %	88,2 ± 4,1 %

Tab.15 Reduktion der Lichttransmission im Plasmaüberstand während der Lyse mit Urokinase bzw. der Kontrolle bei postklimakterischen Frauen mit HET (jeweils n=7). <sup>--</sup>p< 0,0001 vs. Startlichttransmission Thrombusalter 10 min. <sup>≠</sup><sup>E</sup>p< 0,002 vs. Startlichttransmission Thrombusalter 10 min. Nach 30 min Lyse: <sup>Ø</sup>p< 0,0001 vs. Endlichttransmission Thrombusalter 10 min. Nach 60 min Lyse: <sup>∞</sup>p< 0,03 vs. Endlichttransmission Thrombusalter 30 min.

Abbildung 10 zeigt graphisch die Korrelation von Thrombusgewicht und Lichttransmission bei postklimakterischen Frauen mit HET am Beispiel der 60 min alten Thromben, die 1 Stunde lysiert wurden. Auch hier führte die durch die Lyse bedingte zunehmende Trübung des Plasmaüberstandes zu einer Abnahme der Lichttransmission.

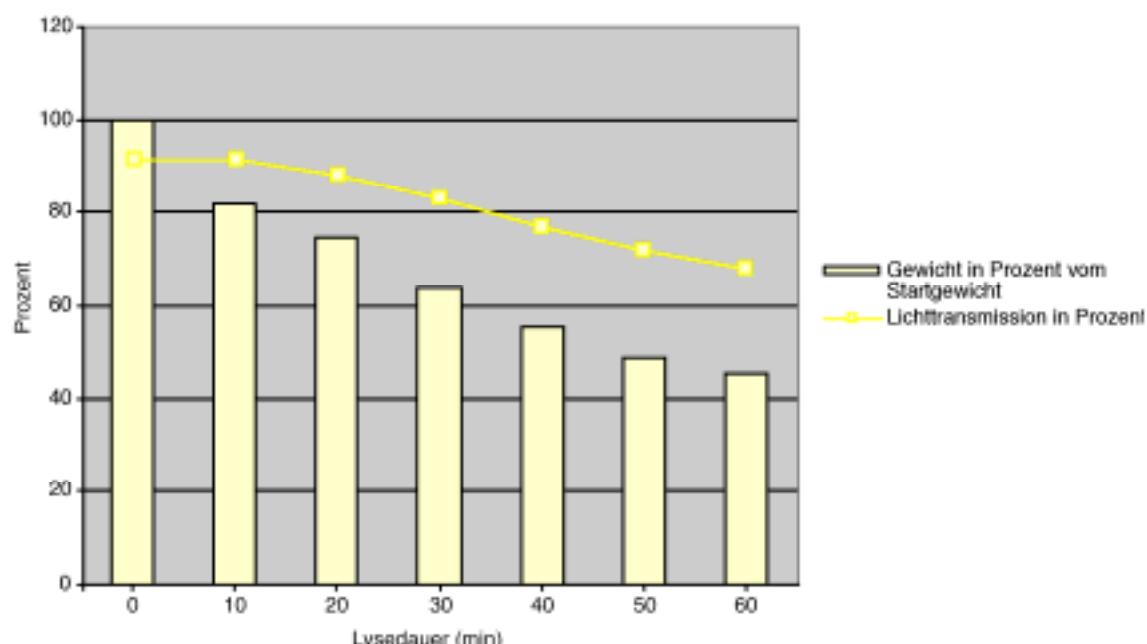


Abb.10 Korrelation von Thrombusgewicht und Lichttransmission am Beispiel der 60 min alten Thromben bei postklimakterischen Frauen mit Hormonersatztherapie.

#### 4.3.4.4 Morphologie der Plättchen-Fibrin-Thromben bei postklimakterischen Frauen mit Hormonersatztherapie

Die 10 min alten Thromben waren im Durchmesser 5-6 mm groß und somit vergleichsweise klein. Auch hier wurden mehrere Inseln bestehend aus Plättchenaggregaten von Fibrinnetzen durchzogen. Das Verhältnis von Plättchenaggregaten, Fibrinfasern und Plasmaeinschlüssen glich mikroskopisch den Thromben der präklimakterischen Frauen ohne Kontrazeptiva. Die 30 bzw. 60 min alten Thromben wirkten makroskopisch nur minimal verkleinert (Abb.11a,b).

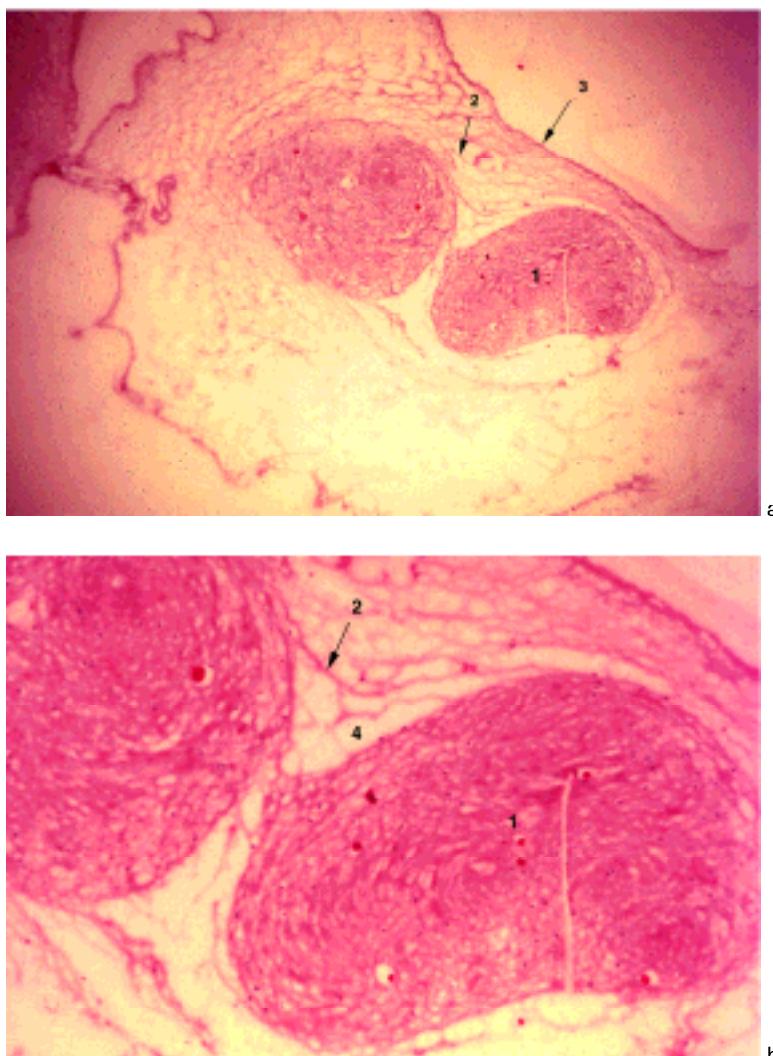


Abb.11a,b. Querschnitt eines 10 Minuten alten Plättchen-Fibrin-Thrombus, beispielhaft für postklimakterische Frauen mit Hormonersatztherapie. Zentral befinden sich dichte Plättchen-Fibrin-Aggregate (1), umschlossen von lockeren Fibrinnetzen (2), die sich am Rand zu einer Membran (3) bündeln. Neben den dichten Aggregaten sind viele kleine Plasmaeinschlüsse zu erkennen (4). Vergrößerung a 1:4, b 1:10. HE-Färbung.

## 4.4 Ergebnisse der Gruppen im Vergleich

### 4.4.1 Gewicht der Plättchen-Fibrin-Thromben vor und nach der Lyse mit Urokinase

Bei Frauen unter oralen Kontrazeptiva fand sich ein höheres Thrombengewicht als bei gleichaltrigen Frauen ohne OK. Ein anderes Ergebnis erbrachte die Lyse der Thromben mit Urokinase. Mit einer Gewichtsreduktion von durchschnittlich 77,3% in 30 min bei den 10 min alten Thromben und ebenfalls 77% nach 60 min Lyse bei den 60 min alten Thromben sind die Thromben, welche unter der Einnahme oraler Kontrazeptiva entstanden sind, sehr eindrucksvoll und erfolgreich lysiert worden. Das Thrombenendgewicht lag unter dem der präklimakterischen Frauen ohne OK (Abb.12-14). Vergleicht man den prozentualen Gewichtsverlust der Thromben in der Kontrolle (Zugabe von NaCl, nicht von Urokinase), zeigte sich bei den Frauen, die OK einnahmen, ein größerer Gewichtsverlust. Bedingt durch das hohe Startgewicht der Thromben bei den Frauen mit OK lag das Endgewicht der Thromben aber trotzdem über dem der Frauen ohne OK. Das Gewicht blieb auch nach 60 Minuten Lyse der 30 und 60 Minuten alten Thromben unverändert über dem der gleichaltrigen Frauen ohne synthetischer Hormonzufuhr (Abb.15-17).

Bei den postklimakterischen Frauen mit HET waren die Thromben leichter. Zum Beispiel war das Startgewicht der 10 min alten Thromben unter der HET 10,1 mg niedriger als das der gleichaltrigen Frauen ohne HET. Eine deutliche Differenz war auch bei den älteren Thromben zu erkennen. Nach der Lyse mit Urokinase war das Thrombenendgewicht der Frauen mit einer HET weiterhin niedriger. Prozentual zum Startgewicht betrachtet war der Gewichtsverlust durch die Lyse bei den jungen, 10 min alten Thromben identisch. Bei den älteren, 30 und 60 min alten Thromben konnten die postklimakterischen Frauen mit HET noch fast 10% mehr an Eigengewicht verlieren im Vergleich zu denen ohne HET. In der Kontrolle ohne Urokinase ist dieser Vorteil nicht mehr zu erkennen.

Die spontane Gewichtsreduktion in der Kontrolle vollzog sich hauptsächlich in den ersten 10 Minuten nach Thrombenentstehung. Dieser Verlauf war bei allen Thromben der vier verschiedenen Frauengruppen zu erkennen. Die Abb.17 verdeutlicht, dass bei den 60 min alten Thromben nach Abwarten von einer weiteren Stunde, in der die Thromben ja auch noch durch das notwendige Wiegen aus der Kuvette entfernt werden mussten, bei den Gewichtsmessungen fast keine Differenzen mehr zum Startgewicht auftraten.

Bei dem Vergleich der Gruppenergebnisse lässt sich eine Korrelation zwischen der Morphologie und dem Gewicht der Thromben herstellen. Unter der Einnahme

synthetischer Hormone entwickelten sich in unserem Modell bei den präklimakterischen Frauen große, schwere Thromben mit einem lockeren Aufbau an Plättchen-Fibrin-Aggregaten, welche von reichlich eingeschlossenem Plasma umgeben waren (Abb.7a,b). Bei den gleichaltrigen Frauen, welche keine Hormone einnahmen, war der Thrombenaufbau kompakter, die Plättchen-Fibrin-Aggregate waren dichter miteinander verbunden und somit auch weniger Plasma eingeschlossen. Hieraus ergab sich ein geringeres Thrombengewicht im Vergleich zu den plasmareichen Thromben der präklimakterischen Frauen unter dem Einfluss synthetischer Östrogene.

Je kompakter ein Thrombus aufgebaut war, desto schlechter ließ er sich anschließend mit Urokinase lysieren. Wir konnten beobachten, dass Thromben mit einem lockeren Fibringerüst und reichlich Plasmaeinschlüssen gut zu lysieren waren. Somit lagen die zu Beginn schweren, aber fragil aufgebauten Thromben der präklimakterischen Frauen unter oralen Kontrazeptiva nach der Lyse mit Urokinase mit ihrem Endgewicht unter denen der gleichaltrigen Frauen ohne Hormonzufuhr. Bei den postklimakterischen Frauen ohne HET, die ebenfalls schwere Thromben entwickelten, deren Fibrinnetze aber eine enorme Dichte und Härte aufzeigten (Abb.9a,b), konnte die Lyse mit Urokinase nur einen vergleichsweise geringen Gewichtsverlust der Thromben erzielen. In dieser Altersgruppe zeigte sich unter der Einnahme natürlicher Östrogene morphologisch ein aufgelockertes Thrombenbild (Abb.11a,b) und leichtere Thromben mit einem geringeren Start- und Endgewicht (Abb.12-14).

Gewichte der 10 min alten Thromben vor und nach Zugabe von Urokinase

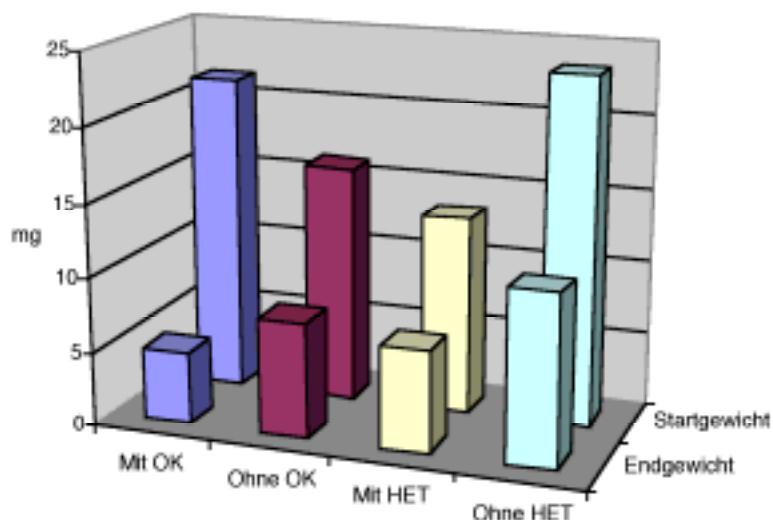


Abb.12 Durchschnittliche Gewichte von 10 min alten Thromben vor und nach 30 min Lyse mit Urokinase. Startgewichte und Endgewichte:  $p < 0,0001$  Frauen mit OK vs. ohne OK, Frauen mit OK vs. mit HET, Frauen ohne HET vs. ohne OK und bei den Frauen ohne HET vs. mit HET.

Gewichte der 30 min alten Thromben vor und nach Zugabe von Urokinase

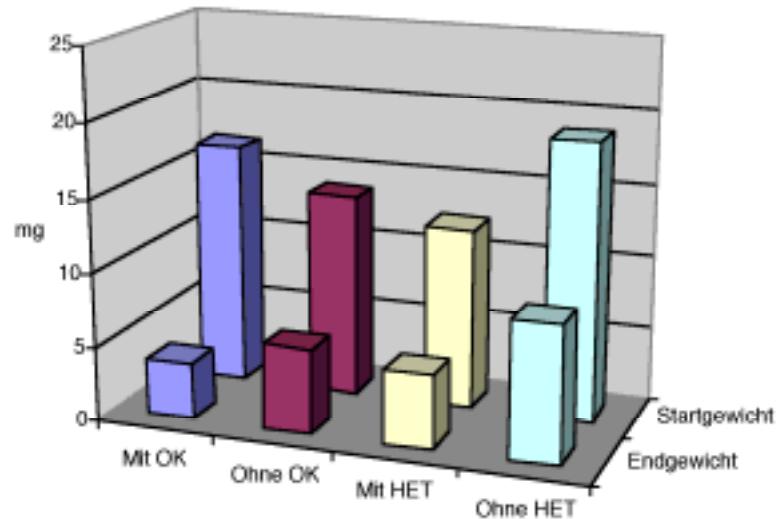


Abb.13 Durchschnittliche Gewichte von 30 min alten Thromben vor und nach 60 min Lyse mit Urokinase. Startgewichte und Endgewichte:  $p < 0,0001$  Frauen mit OK vs. ohne OK, Frauen mit OK vs. mit HET, Frauen ohne HET vs. ohne OK und Frauen ohne HET vs. mit HET.

Gewichte der 60 min alten Thromben vor und nach Zugabe von Urokinase

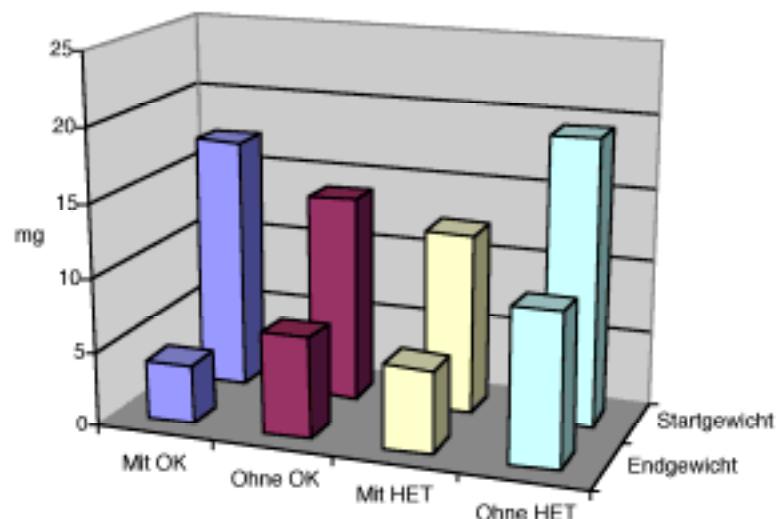


Abb.14 Durchschnittliche Gewichte von 60 min alten Thromben vor und nach 60 min Lyse mit Urokinase. Startgewichte und Endgewichte:  $p < 0,0001$  Frauen mit OK vs. ohne OK, Frauen mit OK vs. mit HET, Frauen ohne HET vs. ohne OK und Frauen ohne HET vs. mit HET.

Gewichte der 10 min alten Thromben ohne Zugabe von Urokinase

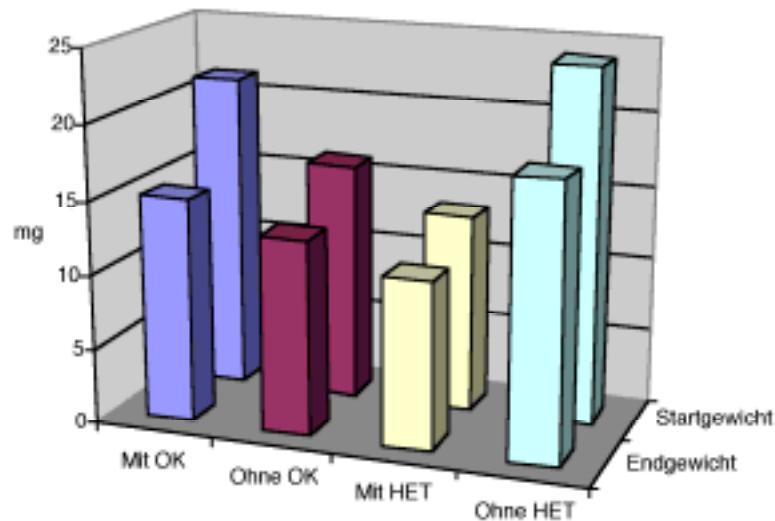


Abb.15 Durchschnittliche Gewichte von 10 min alten Thromben ohne Zugabe von Urokinase. Das Endgewicht wurde nach 30 min bestimmt. Startgewichte und Endgewichte:  $p < 0,0001$  Frauen mit OK vs. ohne OK, Frauen mit OK vs. mit HET, Frauen ohne HET vs. ohne OK und Frauen ohne HET vs. mit HET.

Gewichte der 30 min alten Thromben ohne Zugabe von Urokinase

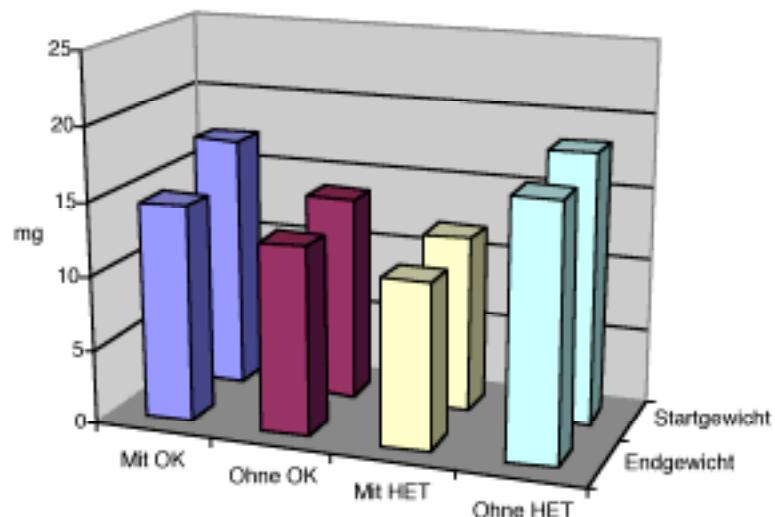


Abb.16 Durchschnittliche Gewichte von 30 min alten Thromben ohne Zugabe von Urokinase. Das Endgewicht wurde nach 60 min bestimmt. Startgewichte und Endgewichte:  $p < 0,0001$  Frauen mit OK vs. ohne OK, Frauen mit OK vs. mit HET, Frauen ohne HET vs. ohne OK und Frauen ohne HET vs. mit HET.

Gewichte der 60 min alten Thromben ohne Zugabe von Urokinase

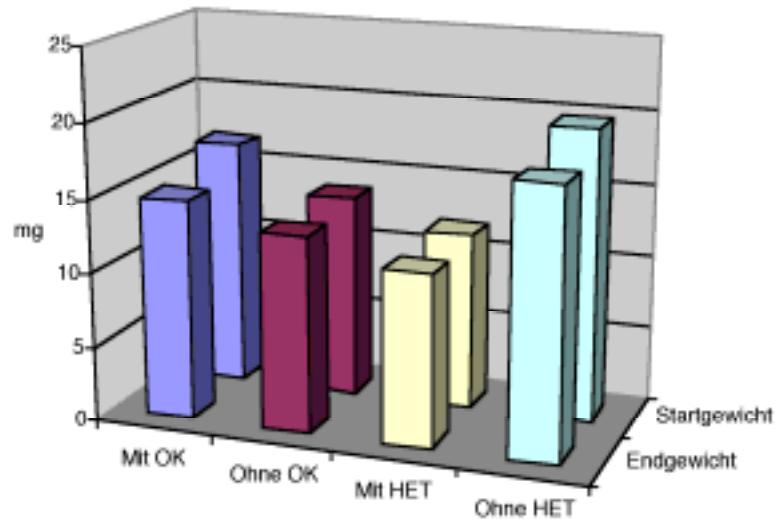


Abb.17 Durchschnittliche Gewichte von 60 min alten Thromben ohne Zugabe von Urokinase. Das Endgewicht wurde nach 60 min bestimmt. Startgewichte und Endgewichte aller Thromben:  $p < 0,0001$  Frauen mit OK vs. ohne OK, Frauen mit OK vs. mit HET, Frauen ohne HET vs. ohne OK und Frauen ohne HET vs. mit HET.

#### 4.4.2 Lichttransmission des Plasma-Überstandes während der Lyse mit Urokinase

Die Lichttransmission ist ein direktes Maß für die Lysierbarkeit der Thromben. Je besser die Lyse, desto geringer ist die Lichttransmission der Küvette, da die von den Thromben abgelösten Partikel das Plasma eintrüben.

Die Lichttransmission des Plasma-Überstandes war vor Lysebeginn bei den 10 und 60 min alten Plättchen-Fibrin-Thromben unter OK höher als in der Vergleichsgruppe ohne OK. Nach Lyse mit Urokinase zeigte sich bei den 10, 30 und 60 min alten Thromben eine geringere Lichttransmission im Plasmaüberstand als bei den präklimakterischen Frauen ohne OK. In-vitro bedeutet dies, dass die Thromben, welche unter dem Einfluss synthetischer Hormone entstanden sind, mehr Plasmabestandteile beinhalten als jene Thromben der Frauen ohne Hormoneinfluss gleichen Alters. Die geringere Lichttransmission nach der Lyse mit Urokinase bei den präklimakterischen Frauen mit OK deutet auf die vergleichsweise hohe Auflösung der Thromben hin und entspricht dem von uns gemessenen Gewichtsverhalten der Thromben in dieser Gruppe (Abb.18-20).

Die Lichttransmission des Plasmaüberstandes bei den postklimakterischen Frauen mit und ohne HET waren vor Lysebeginn identisch. Auch nach der Urokinasezugabe waren

bei den 10, 30 und 60 min alten Thromben keine Differenzen der Lichttransmission untereinander zu erkennen (Abb.18-20).

Lichttransmission der 10 min alten Thromben vor und nach Zugabe von Urokinase

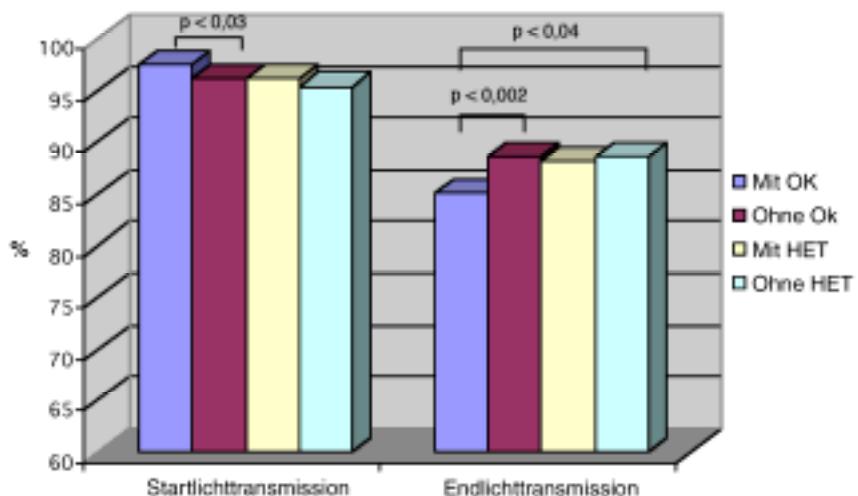


Abb.18 Lichttransmission im Plasmaüberstand bei Lyse von 10 min alten Thromben. Endlichttransmission nach 30 Minuten gemessen. Startlichttransmission:  $p < 0,03$  Frauen mit OK vs. ohne OK. Endlichttransmission:  $p < 0,002$  Frauen mit OK vs. ohne OK. Keine Differenzen bei den Frauen mit HET vs. ohne HET.

Lichttransmission der 30 min alten Thromben vor und nach Zugabe von Urokinase

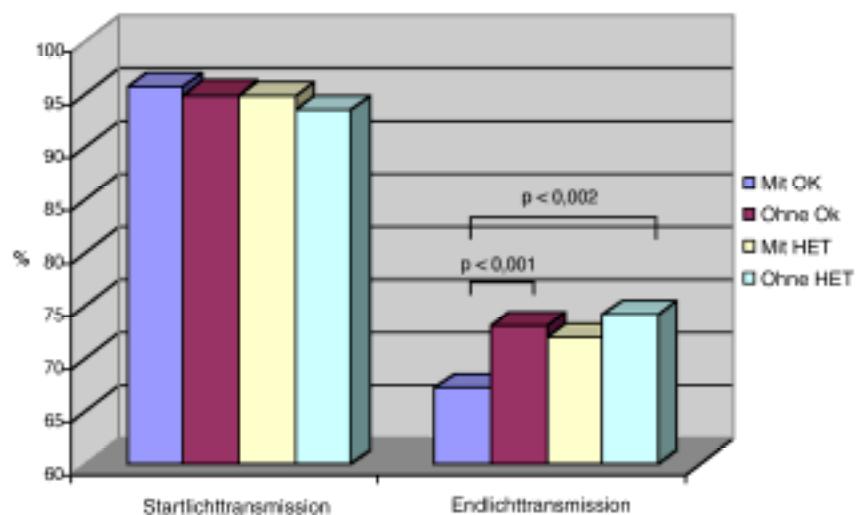


Abb.19 Lichttransmissionsverlust im Plasmaüberstand bei Lyse von 30 min alten Thromben. Endlichttransmission nach 60 Minuten gemessen. Startlichttransmissionen im Vergleich nicht signifikant. Endlichttransmission:  $p < 0,001$  Frauen mit OK vs. ohne OK;  $p < 0,002$ . Frauen mit OK vs. ohne HET

#### Lichttransmission der 60 min alten Thromben vor und nach Zugabe von Urokinase

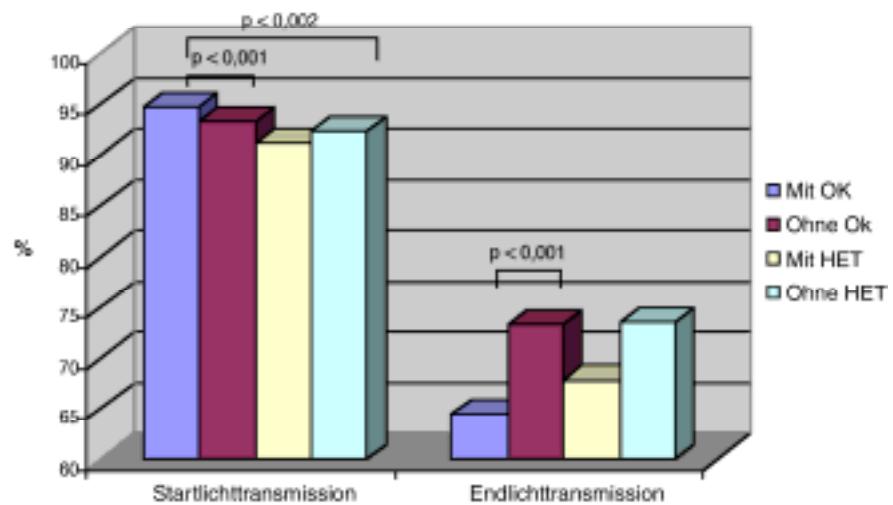


Abb.20 Lichttransmissionsverlust im Plasmaüberstand bei Lyse von 60 min alten Thromben. Endlichttransmission nach 60 Minuten gemessen. Startlichttransmission:  $p < 0,001$  Frauen mit OK vs. ohne OK.  $p < 0,002$  Frauen mit OK vs. ohne HET. Endlichttransmission:  $p < 0,001$  Frauen mit OK vs. ohne OK. Frauen mit HET vs. ohne HET nicht signifikant.

#### 4.4.3 Aggregationsmessungen im plättchenreichen Plasma

Bei den Probandinnen im präklimakterischen Alter, die Kontrazeptiva einnahmen, wurde nach Induktion mit Kollagen und Kalzium das höchste Aggregationsmaximum gemessen. Der Zeitraum bis zur maximalen Aggregation war ebenfalls in dieser Gruppe am schnellsten erreicht. Das Aggregationsmaximum war bei den postklimakterischen Frauen ohne Hormonsubstitution am geringsten, die Zeit, bis dieses erreicht wurde, war verlängert (Tab.16 und 17).

	mit OK	ohne OK	Differenz (%) (p<)
AM (%)	84,3 ± 5	83,6 ± 4,1	0,83 (0,05)
Zeit/AM	306 ± 84	324 ± 96	5,5 (0,0002)

Tab.16 Aggregationsmaximum und die dazu benötigte Zeit bei den präklimakterischen Frauen mit und ohne Hormonsubstitution nach Induktion mit Kollagen und Kalzium. AM = Aggregationsmaximum. Zeit/AM = benötigte Zeit bis zur maximalen Aggregation. (Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen.)

	mit HET	ohne HET	Differenz (%) (p<)
AM %	83,8 ± 4,5	80,6 ± 5,9	3,9 (0,0001)
Zeit/AM	312 ± 72	324 ± 96	3,7 (0,03)

Tab.17 Aggregationsmaximum und die dazu benötigte Zeit bei den postklimakterischen Frauen mit und ohne Hormonsubstitution nach Induktion mit Kollagen und Kalzium. AM = Aggregationsmaximum. Zeit/AM = benötigte Zeit bis zur maximalen Aggregation. Std% = Standardabweichung in Prozent.

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion der Ergebnisse über präklimakterischen Frauen mit und ohne Hormonsubstitution vor dem Hintergrund des wissenschaftlichen Umfeldes

In unserem in-vitro-Modell entstanden unter dem Einfluss von OK große, schwere Thromben mit einem relativ locker aufgebauten Fibrinnetz, die nach Lyse mit Urokinase das niedrigste Endgewicht im Gruppenvergleich erreichten. Bei den gleichaltrigen Frauen ohne OK waren die Thromben kleiner und stabiler aufgebaut, das Thrombengewicht nach Lyse blieb vergleichsweise hoch, die spontane Retraktion war gering. Zusätzlich bestand in der Gruppe mit OK eine zeitlich überdurchschnittlich schnelle und überdurchschnittlich hohe Thrombozytenaggregation.

Eine erhöhte Plättchenaggregation unter OK, wie wir sie beobachten konnten, ist bereits in vorausgegangenen Studien beschrieben worden.<sup>20,21,48,65</sup> Als mögliche Ursache kann die unter OK gesteigerte Synthese an Gerinnungsfaktoren angesehen werden. So waren in unserer Studie prokoagulatorische Proteine wie der Faktor VIII und Ristocetin-Kofaktor (mit Hilfe des Antibiotikums Ristocetin kann die Aktivität des Von-Willebrand-Faktors nachgewiesen werden) unter OK deutlich erhöht. In einer anderen aktuellen Untersuchung zeigten sich unter der Einnahme von OK erhöhte Werte von Prothrombin, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor X, Fibrinogen und Prothrombinfragment 1+2, während Faktor V verringert war.<sup>51</sup> Die Erhöhung von Prothrombin und Faktor VII und die Verringerung des Faktor V kamen unter der Einnahme von OK der dritten Generation (mit Desogestrel) im Vergleich zu der zweiten Generation (mit Levonorgestrel) noch deutlicher zum Vorschein. Nur leicht erhöhte Spiegel von Prothrombin und Faktor VIII sind klinisch mit einer Zunahme venöser Thrombosen assoziiert.<sup>50,51,73</sup> Warum ATIII und Plasminogen, im Gegensatz zu den meisten Untersuchungen, in unserer Studie nicht verändert waren, muss offen bleiben. Eventuell ist die kleine Fallzahl hier nicht ausreichend. Der überwiegende Teil auch älterer Studien registrierte unter OK ein unvorteilhaftes Muster im Sinne einer Reduktion von antikoagulatorischen und einer Erhöhung an prokoagulatorischen Proteinen. Dem gegenüber stieg die fibrinolytische Aktivität vorteilhaft an.<sup>23,29,60,72,96,99,101</sup> Die Ursache der von uns gemessenen erhöhten  $\alpha$ -2 Antiplasminspiegel unter der Einnahme OK bleibt letztlich unklar.

In unserem Modell zeigte sich bei Frauen mit OK die Lyseaktivität im Vergleich zu Frauen ohne OK deutlich gesteigert. Meijers et al. und weitere Studien konnten zeigen, dass unter OK die Plasmakonzentration von Plasmin-Aktivatoren (PA) und die Anzahl an Inhibitoren des fibrinolytischen Systems erhöht sind.<sup>7,61,48,83,102</sup> Eine überdurchschnittlich gute Fibrinolyse basiert darauf, dass Aktivatoren des fibrinolytischen Systems- und hier ist nicht der Gehalt an freiem Plasminogen, sondern der der PA wie z.B. der aktivierte Hagemann-Faktor (F XIIa) oder der Tissue-Plasminogen-Aktivator (t-PA) ausschlaggebend-, in hohen Mengen vorhanden sind, oder dass die Anzahl an Inhibitoren des fibrinolytischen Systems-, hierzu zählen  $\alpha$ 2-Antiplasmin und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI)-, vermindert bzw. deren Aktivität gehemmt ist. Die unter OK nachgewiesene Erhöhung des Thrombin-aktivierenden-fibrinolytischen-Inhibitors (TAFI), dessen Aufgabe darin besteht, die Fibrinolyse zu inhibieren, indem es die Bindung von Plasminogen an Fibrin verhindert, reicht nicht aus, die Fibrinolyse auf ein normales Niveau zu reduzieren.<sup>61</sup>

Eine weitere Beeinflussung der Fibrinolyse gelingt über den Thrombenaufbau. Die makroskopische Form und Konsistenz der von uns hergestellten Thromben sowie ihre histologischen Bilder machen anschaulich, warum sich einige Thromben gut, andere dagegen kaum lysieren lassen. Für die ausgesprochen gute Lyse unter OK wäre als Erklärung denkbar, dass der lockere Thrombenaufbau der Urokinase eine große Angriffsfläche bot und somit das Hineindiffundieren derselben erleichtert wurde. Zusätzlich ist vorstellbar, dass die Plasminogenkonzentration und die der Aktivatoren im Thrombus durch die größere Anzahl von Plasmeinschlüssen erhöht war. Im Verlauf der Kontrolle war der Gewichtsverlust, der überwiegend durch Retraktion zu erklären ist, gering. Diese Kräfte reichten nicht aus, um größere Plasmamengen aus dem Thrombus auszupressen. Da in-vivo, im Gegensatz zu unserem Kontrollexperiment, immer eine Fibrinolyse, z.B. durch die Freisetzung von Urokinase oder tPA aus dem Gefäßendothel stattfindet, müsste bei vermehrter Thrombenentstehung und somit Lyse bei Frauen, die synthetische Östrogene einnehmen, die Fibrinolyseaktivität vergleichsweise hoch sein. Durch den Nachweis von überdurchschnittlich vielen Fibrinolyseprodukten im Serum dieser Frauen konnte diese Annahme bestätigt werden.<sup>7,48,61,70,83,102</sup>

Die unterschiedliche Morphologie der Thromben kommt wahrscheinlich durch die beschleunigte Gerinnungskaskade und die rasch ablaufende Aggregation der Plättchen zustande. Die schnelle Entstehung der Fibrinnetze verursachte ein hohes Einfangen von Plasma. Diese Anordnung der Fibrinnetze hinderte die durch den Magnetrührer auf den

Thrombus einwirkende Zentrifugalkraft am Auspressen von Plasma. Es ist anzunehmen, dass dies der Grund für das hohe Gewicht und den relativ lockeren Thrombenaufbau ist. Bei der langsamer ablaufenden Thrombenentstehung bei den Frauen ohne OK war das Thrombenskelett kompakter, es bestand ein dichteres Plättchen-Fibringerüst, folglich war der Plasmaanteil und somit das Gesamtgewicht geringer.

Bei den Frauen mit OK lag das Endgewicht der Thromben in der Kontrolle, welcher Kochsalz anstatt Urokinase zugeführt wurde, höher als bei Frauen ohne OK. Die unabhängig von der Urokinase eintretende spontane Gewichtsreduktion reichte nicht aus, das hohe Startgewicht soweit zu reduzieren, dass es dem der Thromben entsprach, die nicht unter dem Einfluss von OK entstanden sind. Dieser Verlauf war unabhängig von dem Thrombenalter. Eine solche Eigenschaft des Gerinnungssystems könnte in-vivo eine gesteigerte Thromboseneigung mit sich führen. In klinischen Studien können wir diesen pathophysiologischen Ablauf bei den Frauen mit OK sehen. Ebenso müsste man bei einem gesundem Fibrinolysesystem eine gesteigerte Aktivität erkennen, und auch das sehen wir in der Klinik. Demzufolge ist gut vorstellbar, dass bei einem nur gering insuffizientem Fibrinolysesystem die Wahrscheinlichkeit, rezidivierende Thrombosen zu entwickeln, sehr hoch ist. Bei der Faktor-V-Leiden-Mutation zum Beispiel, einer Erberkrankung, die zu einer Protein C Resistenz führt, lässt sich dieses in-vitro entstandene Bild der Thrombophilie, bedingt durch ein defektes Fibrinolysesystem, gut übertragen. Ist das Risiko einer tiefen Beinvenenthrombose bei heterozygoten Trägern der Faktor-V-Leiden-Mutation 4-5fach erhöht, potenziert es sich um den Faktor 35 bei zusätzlicher Einnahme von Kontrazeptiva.<sup>7c</sup>

Je früher die Lysetherapie bei einem Myokardinfarkt durchgeführt wird, desto geringer ist das Ausmaß der Nekrose. Vergleichsweise war in unserer Untersuchung bei allen Probandinnen der 10 min alte Thrombus deutlich besser zu lysieren als der dreissig bzw. sechzig Minuten alte Thrombus. Eine Gewichtsdifferenz am Ende der Lyse zwischen dem sechzig und dem dreissig Minuten alten Thrombus wird durch die Einnahme von OK nicht mehr signifikant, die Ergebnisse sind vergleichbar. Eventuell ist hier die Retraktion bereits nach dreissig Minuten abgeschlossen. Ohne den Einfluss von OK ist der ältere, sechzig Minuten alte Thrombus deutlich schlechter zu lysieren. Da bei den meisten Infarktpatienten eine Lysetherapie erst nach frühestens dreissig Minuten begonnen wird, müsste nach unseren Ergebnissen die Gruppe mit OK besser abschneiden. Bisher gibt es

hierüber keine Daten in der Literatur. Dies wird sicherlich auf Grund der niedrigen Fallzahl auch in Zukunft durch eine Studie nicht zu belegen sein.

Thrombozyten und kardiovaskuläre Zellen besitzen, wie ein weiterer Großteil menschlichen Gewebes, Östrogenrezeptoren.<sup>62</sup> Über die Östrogenrezeptoren werden u.a. die Synthese von Lipiden, Gerinnungsfaktoren und fibrinolytischer Proteine gesteuert. Auf den Thrombozyten konnte man beide der bekannten Rezeptortypen, Östrogenrezeptor- $\alpha$  (ÖR- $\alpha$ ) und Östrogenrezeptor- $\beta$  (ÖR- $\beta$ ), nachweisen. Es ist wahrscheinlich, dass der Einfluss der Östrogene auf die Thrombenentstehung nicht unmittelbar während der Thrombenentstehung eintritt, sondern dass die Thrombozytenoberfläche bereits durch die kontinuierliche Anwesenheit des Sexualhormons eine Umwandlung erfahren hat, die bei Aktivierung zu einem veränderten Ergebnis führt. Wir gehen auch in unseren Versuchen davon aus, dass die natürlichen und synthetischen Hormone, die sich direkt in der Küvette befanden, nicht ausschlaggebend für die Entstehung verschiedener Thrombentypen waren, sondern dass der über Jahre bestehende spezielle Hormonspiegel zu unterschiedlich reaktiven Blutplättchen und zu unterschiedlichen Hämostaseparametern geführt hat, die jeder für sich ein anderes Ergebnis produzieren. Diese Vermutung wird bestärkt durch die Tatsache, dass eine unterschiedliche Reaktionsbereitschaft von Thrombozyten zwischen Frauen und Männern in Medien beobachtet werden kann, die frei von Plasmahormonen sind.<sup>24</sup> Auch zeigt eine Beifügung von Sexualhormonen in ein Thrombozytenmedium keine Veränderung in der Aggregationsbereitschaft.<sup>24,43</sup>

Es gibt direkte und indirekte Hinweise, dass Sexualhormone die Biologie von Thrombozyten beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass sich Thrombozyten von Frauen innerhalb des Menstruationszyklusses verändern. Die Bindung an Fibrinogen ist in der Lutealphase, der zweiten Hälfte des Menstrualzykluses, höher als in der Follikelphase. Eventuell ist hierfür eine hormonale Steuerung über GPIIb-IIIa (Glykoproteinrezeptor IIb-IIIa an der Thrombozytenoberfläche) verantwortlich.<sup>24</sup> Der GPIIb-IIIa-Rezeptor auf den Plättchen spielt eine zentrale Rolle in der Thrombozytenaggregation. Er bindet den von-Willebrand-Faktor (vWF), ein Hauptligand des Fibrinogens. Zum Beispiel führt bei einer atherosklerotisch veränderten Intima die Gefäßverletzung zur Freilegung subendothelialer Mikrofasern, die den vWF binden. Der vWF besitzt Rezeptoren, die wiederum mit GPIb an der Thrombozytenoberfläche reagieren. Die Bindung GPIb/vWF führt zur Exponierung weiterer Glykoproteinrezeptoren wie den GPIIb-IIIa-Rezeptorkomplex. Er steht als weiterer Bindungsort für den vWF zur Verfügung und unterstützt so die Adhäsion. Die Adhäsion an Kollagen wird durch GPIa

gefördert.<sup>7c</sup> Prämenopausale Frauen besitzen auf ihren Thrombozyten die gleiche Anzahl an GPIIb-IIIa-Rezeptoren wie junge Männer. Der Rezeptorkomplex der Frauen ist allerdings deutlich schneller und leichter zu aktivieren. Er besitzt eine 50-80% höhere Fibrinogenbindungskapazität als die GPIIb-IIIa-Rezeptoren gleichaltriger Männer.

Weitere Hinweise über den hormonellen Einfluss auf Thrombozyten zeigen sich durch die steigende Anzahl adrenerger  $\alpha$ -2-Rezeptoren auf den Blutplättchen zu Beginn der Menses und durch die Verringerung derselben in der Zyklusmitte um bis zu 77%.<sup>44</sup> Die Plättchenadhäsion an Typ I Kollagen zeigt einen biphasischen Verlauf während des ovariellen Zyklusses.<sup>8c</sup> Östrogen und Testosteron-sensible Gene, wie NO-Synthase, ein Inhibitor der Plättchenaggregation, und Thromboxan A2 sind in Thrombozyten und Megakaryozyten vorhanden.<sup>1,9,1c</sup> Innerhalb der Thrombozyten senkt Thromboxan A<sub>2</sub> den Spiegel von zirkularem AMP (cAMP). Das cAMP, welches aus ATP über die Adenylatzyklase gewonnen wird, kontrolliert die Konzentration freier Kalziumionen und verhindert so die Aggregation und Adhäsion. Kalziumionen aktivieren das Aktin-Myosin-System, welches die Thrombozyten-Granula entleert.

Zudem konnte gezeigt werden, dass eine in-vitro-Aggregation der Plättchen, induziert mittels Arachidonsäure, durch die Hinzugabe von Androgenen verstärkt, durch Östrogene aber inhibiert werden kann.<sup>3,2c</sup> Eine Therapie mit Androgenen bei Patienten mit Myelodysplasie und Thrombozytopenie führt zu einem Anstieg der Thrombozyten.<sup>94</sup>

Die Vermutung, dass bereits unter einem schwankenden Östrogen- und Progesteronplasmaspiegel während des Menstruationszyklus akut eine unterschiedliche Neigung zur Thrombenentstehung und Lyse entsteht, konnte bei unserem Kollektiv prämenopausaler Frauen ohne OK nicht bestätigt werden. Verglich man das Verhalten der Thromben unter einem niedrigeren Östrogen- bzw. Progesteronspiegel, wie er am ersten Zyklustag vorlag, mit dem Verhalten unter einem hohen Östrogenspiegel kurz vor und einem hohen Progesteronspiegel wenige Tage nach der Ovulation, zeigten sich keine signifikanten Differenzen.

Die Abnahme des Thrombengewichts führte bei allen Frauen in unserer Untersuchung zu einer verminderten Lichttransmission in der Küvette des Aggregometers. Dies ist auf die Zunahme der durch Lyse in Lösung gegangenen Substanzen zurückzuführen. Allerdings zeigte sich, dass ein hoher Gewichtsverlust nicht mit einer entsprechenden Abnahme der Lichttransmission korrelieren muss. Die bessere Lyse des zehn Minuten alten Thrombus korrelierte generell nicht mit der Abnahme der Lichttransmission, sie lag am Ende der

Lyse über denen der älteren, dreissig und sechzig Minuten alten Thromben. Somit war die Abnahme des Thrombengewichts nicht nur auf eine Lyse von Thrombusanteilen, sondern auch auf eine Abgabe von Plasma und auf Retraktionskräfte zurückzuführen. Man kann davon ausgehen, dass die Konzentration an Thrombozyten und Fibrin in den zehn, dreissig und sechzig Minuten alten Thromben quasi identisch waren, da das umgebende Plasma stets frei von Fibrinogen und Thrombozyten war.

Im Gruppenvergleich nahm die Lichttransmission unter Lyse am deutlichsten in der Frauengruppe mit OK ab. Dies war bedingt durch eine überdurchschnittliche Abgabe von Thrombenanteilen. Auch hieraus lässt sich schließen, dass OK zu einem Thrombenaufbau führen, dessen Fibrinmassen und Plättchenaggregate lockerer sind und sich unter Urokinase gut lysieren lassen.

Unabhängig von der Präsenz endothelialer Funktionen ließ sich an unserem in-vitro-Modell die Neigung zur Thrombophilie unter OK im Vergleich zu den klinischen Beobachtungen nachvollziehen. Fälle von Frauen mit Myokardinfarkt unter synthetischer Hormonsubstitution, deren Koronarien entweder durch Angiographie oder durch Autopsie untersucht wurden, zeigten isolierte, segmentale Okklusionen in den Koronararterien bei normaler Intima und Media.<sup>22,38,93,95</sup> Diese Untersuchungen könnten die Beobachtung bestätigen, dass OK die Thrombose der Koronararterien fördern, nicht aber deren Atherosklerose. Die vorläufige Vermutung ist, dass durch OK ausgelöste, entgegengesetzte Wirkungsmechanismen auf das Gerinnungssystem einwirken, die sich im Sinne von koagulatorischen und fibrinolytischen Effekten ausbalancieren. Diese Gegenregulationsmechanismen reichen aber nicht aus, um das Thromboserisiko auf das von Frauen ohne Einnahme synthetischer Hormone zu reduzieren. Die Übertragbarkeit von in-vitro-Untersuchungen auf die Situation in-vivo bleibt allerdings eingeschränkt, insbesondere weil die Endothelfunktion der Gefäße hier eine außerordentlich große Rolle spielt.

## 5.2 Diskussion über die Ergebnisse der postklimakterischen Frauen mit und ohne Hormonsubstitution vor dem Hintergrund des wissenschaftlichen Umfeldes

Mehr als dreissig prospektive Kohortenstudien haben den Eindruck vermittelt, dass die Einnahme von Östrogenen in der Postmenopause zu einer Verringerung des Risikos kardiovaskulärer Erkrankungen führt.<sup>5,11,34,81,82</sup> Größtenteils wurden in diesen Studien entweder konjugierte Östrogene allein oder in Kombination mit Medroxyprogesteronacetat (MPA) eingenommen. Die protektive Wirkung der HET erklärte man sich durch vielfältige Mechanismen. Die „Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI)“-Studie, eine der größten klinischen Untersuchungen, in der Risikofaktoren der koronaren Herzerkrankung berücksichtigt wurden, zeigte eine vorteilhafte Lipidkonstellation unter der HET, indem sie das LDL-Cholesterin um 10%-20% reduzierte und das HDL-Cholesterin um 5-20% erhöhte.<sup>86</sup> Östrogene sind zudem vasodilatorisch wirksam und inhibieren die Verletzlichkeit von Gefäßen, so dass die Entstehung einer Atherosklerose verhindert werden kann. Eine direkte Östrogen-induzierte Vasodilatation tritt innerhalb von 5 bis 20 Minuten ein, und da sie unabhängig von einer Veränderung der Gen-Expression am vaskulären Gewebe stattfindet, wird sie auch als „nicht-genetische-Reaktion“ bezeichnet.<sup>62</sup> Zwei Mechanismen sind für den schnellen Reaktionsweg verantwortlich: Manipulationen am Ionenkanal der Zelle und die Freisetzung von Nitrid-Oxid (NO), eine vasodilatatorische und, auf Thrombozyten bezogen, antiaggregatorische Substanz.<sup>65</sup> Der präventive Effekt des Östrogens gegen die Bildung atherosklerotischer Plaques tritt innerhalb von Stunden bis Tagen auf und basiert auf einer veränderten Gen-Expression des vaskulären Gewebes. Er wird deswegen auch als eine „genetische-Reaktion“ betrachtet und führt zu einem lang anhaltenden Effekt. Eine Modulation beider Reaktionen über den Östrogenrezeptor-α (ÖR-α) und den Östrogenrezeptor-β (ÖR-β) ist wahrscheinlich.<sup>62,65</sup>

Mit einem überraschenden Ergebnis steht diesen langjährigen Beobachtungen nun die erste randomisierte, placebokontrollierte, prospektive Studie gegenüber, die den Einfluß der HET auf das kardiovaskuläre System zeigt, die „Heart and Estrogen/Progesteron Replacement Study („HERS“).<sup>41</sup> Bei den 2763 postklimakterischen Frauen, die vorwiegend das 60. Lebensjahr überschritten hatten und bei denen bereits eine kardiovaskuläre Erkrankung diagnostiziert wurde, führte die über 4-jährige Einnahme der aus konjugierten Östrogenen und MPA bestehenden Hormonersatztherapie zu keiner

Verringerung der Morbidität und Mortalität. Es zeigte sich sogar ein um 50% erhöhtes Risiko myokardialer Infarkte im ersten Einnahmejahr und hier ganz besonders in den ersten vier Monaten. Erst nach dem vierten und fünften Einnahmejahr konnte eine Reduktion kardiovaskulärer Erkrankungen beobachtet werden. Hierauf wurden retrospektiv 22 kleinere klinische Studien mit insgesamt 4124 Frauen betrachtet, und auch hier zeigte sich bei den Frauen mit kurzer Einnahmezeit der HET (unter 2 Jahren) ein 1.4fach erhöhtes Risiko, einen Myokardinfarkt zu erleiden. In der Nurses` Health Study, an der in den USA von 1976 bis 1996 2489 postmenopausale Frauen mit bereits erlebten Myokardinfarkt oder diagnostizierter koronarer Herzerkrankung teilnahmen, wurde in den ersten zwei Jahren der Einnahme ein erhöhtes relatives Risiko von 1.25 berechnet. Nach einer Zufuhr der HET über bis zu 20 Jahre reduzierte sich das relative Risiko auf 0.65, verglichen mit Frauen ohne HET.<sup>34</sup>

In unseren Untersuchungen sahen wir eine deutlich verstärkte Aggregationsneigung der Thrombozyten unter der HET, die vergleichbar ist mit dem Aggregationsmaximum und der dafür benötigten Geschwindigkeit von präklimakterischen Frauen ohne Hormonzufuhr. In kleinen Studien wurde bisher nur von einer HET induzierten Unterdrückung der Plättchenaggregation berichtet.<sup>2,3,42,64</sup> Das hohe Aggregationsmaximum der Thrombozyten unter der Hormonersatztherapie führte zu keinem erhöhten Thrombengewicht. Im Vergleich zu den postklimakterischen Frauen ohne HET führte die Einnahme der Hormone zu einem niedrigeren Thrombengewicht. Dies machte sich in Start- und Endgewicht der lysierten als auch der Kontrollthromben bemerkbar. Eine starke Aggregationsneigung der Thrombozyten führte also nicht zwangsmäßig zu schweren oder fest organisierten Thromben, denn die Plättchen-Fibrin-Thromben waren ja unter der Einnahme einer HET besser zu lysieren. Eventuell ist diese gute Lysierbarkeit in-vitro eine Fortsetzung bzw. ein weiterer Hinweis für eine bereits in-vivo bestehende erhöhte fibrinolytische Aktivität. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die reduzierte, aber im Normbereich liegende Präsenz der Gerinnungsfaktoren. Bei Frauen ohne HET ist der Gerinnungsfaktor VIII im Durchschnitt deutlich höher als bei Frauen mit HET. Ristocetin-Kofaktor liegt ebenfalls deutlich über den Ergebnissen der Vergleichsgruppe mit HET, aber noch knapp im Normbereich. Aktuelle Veröffentlichungen aus der PEPI-Studie berichten von einer Erhöhung des Faktors VIIIc, des von Willebrand Faktor und der Fibrinogen-Konzentrationen in der Placebogruppe (ohne HET).<sup>17</sup> In weiteren Querschnittsstudien zeigte sich der Einfluss auf die Hämostase vorwiegend in der Reduktion des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Antigens (PAI-1),<sup>28,52,79</sup> des Serum-

Fibrinogens,<sup>27,57,66,90</sup> des Faktor VII,<sup>14,52</sup> des Faktor VIII, des vWF und des t-PA.<sup>18,78,86,100</sup> Die ATIII-Spiegel sind in Querschnittsstudien<sup>66</sup> und kleinen Fall-Kontroll-Studien<sup>8,12,30,52,59,80</sup> erniedrigt. In unseren Bestimmungen war keine Veränderung zu erkennen. Die Gerinnungsinhibitoren wie AT III, Protein S und C können eine Thrombophilie begründen, wenn die Konzentration bzw. die Aktivität auf weniger als 60 % der Norm absinkt.<sup>4c</sup> Bei keiner der genannten Studien war dies der Fall. Ob es sich um eine durch die HET direkt supprimierte Synthese der Faktoren handelt oder um einen erhöhten Verbrauch, bleibt offen. Sicher ist, dass ohne Einnahme von Sexualhormonen im Alter die Konzentration an Gerinnungsfaktoren bei den Frauen zunimmt und diese Konstellation einen für die Lyse unvorteilhaften Thrombus entstehen ließ. Aus dem Serum der postklimakterischen Frauen ohne HET entwickelten sich die Thromben mit dem höchsten Startgewicht, der schlechtesten Lysierbarkeit und somit dem höchsten Endgewicht im gesamten Probandenvergleich. Das von uns gemessene, knapp signifikant erhöhte  $\alpha$ 2-Antiplasmin unter der HET ist eventuell ein weiterer Hinweis auf eine erhöhte fibrinolytische Aktivität.

Somit entwickelten die Gruppen in unserem Modell mit den nachweislich erhöhten Faktoren die schwersten Thromben. Es ist denkbar, dass das Gerüst der Plättchen-Fibrin-Thromben unter einer HET wegen verminderter Präsenz an Fibrin und Gerinnungsfaktoren weniger dicht und kompakt aufgebaut ist und so größere Mengen an Plasma nicht gehalten werden können. Dies könnte das verminderte Gewicht erklären.

Die von uns gemessene Steigerung der Plättchenaggregation unter der HET könnte zu der in der HERS-Studie beobachteten Zunahme an Myokardinfarkten passen. Die positiven Eigenschaften der HET zum Beispiel auf die verminderte Entstehung einer Atherosklerose oder die günstigen Veränderungen des Lipidstoffwechsels sind Vorgänge, die eher langfristig vorteilhaft auf die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen wirken. Der Einfluss auf die Plättchenaktivität allerdings ist ein Vorgang, der unmittelbar gravierende pathophysiologische Reaktionen nach sich ziehen kann. Hinzu kommt, dass sich vor allem im arteriellen Hochdrucksystem, im Vergleich zum venösen System, viele Thrombozyten aufhalten und bei den in der HERS-Studie aufgenommenen Frauen ja bereits eine koronare Herzerkrankung vorlag. Somit ist gerade hier an der unregelmäßigen Oberfläche des Endothels eine rasche Aktivierung der bereits durch die HET sensibilisierten Thrombozyten denkbar. Die Flussverhältnisse in einem atherosklerotisch verändertem Koronargefäß sind sicher nicht identisch mit unserem in-vitro-Modell, aber auch in-vivo wird der gleichmäßige Fluss durch die irreguläre

Oberfläche gestört und verlangsamt, so dass die bereits von Virchow beschriebene Ursachenkonstellation einer Thrombenentstehung, nämlich Veränderung der Gefäßwand, Veränderung des Blutstromes und Veränderung der Blutzusammensetzung, zum Tragen kommt. Unter der HET konnten wir eine erhöhte Aggregationsbereitschaft der Plättchen nachweisen, die bei bereits bestehender Koronarsklerose, und dies war bei den Probandinnen der HERS-Studie der Fall, die Bildung eines okklusierenden Thrombus leicht ermöglichen kann. Da das Risiko der Frauen mit koronarer Herzerkrankung, einen Myokardinfarkt unter der HET zu erleiden, nach vier Jahren sinkt, kann man davon ausgehen, dass entweder das hämostatische und fibrinolytische System eine Balance zwischen pro- und antikoagulatorischen Gerinnungssystem gefunden hat, oder dass zu Beginn der Einnahme die Risikopatienten, die unter der HET thrombotische Ereignisse erleben, selektiert werden.

Zusammenfassend besteht also die Möglichkeit, dass die HET einen unterdrückenden Einfluss auf die Entstehung einer koronaren Herzerkrankung ausübt, die unmittelbare Neigung zur Bildung von Thromben im venösen und arteriellen System, auch im Hinblick auf unsere Beobachtungen, aber gesteigert ist. Die Wahrscheinlichkeit einer tiefen Beinvenenthrombose ist in der HERS-Studie als auch in anderen aktuellen Studien bei postklimakterischen Frauen mit einer HET um das 2- bis 4fache gesteigert.<sup>32,97</sup> Dies bedeutet, dass 1 von 250 Frauen unter einer HET im ersten Jahr der Einnahme eine tiefe Beinvenenthrombose bekommt. Bei älteren Frauen ohne HET liegt die Wahrscheinlichkeit bei 1 zu 750. Während sich das Risiko einer tiefen Beinvenenthrombose in den weiteren 4,1 Jahren nicht verändert, steigt das der Lungenembolie an.

Eine vermehrte Thrombenbildung unter einer HET könnte auch die bekannte erhöhte fibrinolytische Aktivität erklären, sichtbar vorwiegend an einem reduzierten Fibrinogenspiegel und, wie auch in unserer Studie, einer nachweisbar erhöhten Plasminogenaktivität, die sich zeitgleich in einem Anstieg von „tissue-plasminogen-activator“ widerspiegelt.

Ebenso wie bei den jüngeren Probandinnen war bei allen postklimakterischen Frauen der zehn Minuten alte Thrombus besser zu lysieren als der dreissig- bzw. sechzig Minuten alte Thrombus. Nach dreissig- bzw. sechzig Minuten Lyse bestand dieser Trend fort. Je jünger der Thrombus, desto besser die Lyse. Eine frühe Lyse nach Myokardinfarkt ist demnach nicht nur unbedingt notwendig, um die fortschreitende Ischämie am Myokard

aufzuheben, sondern möglicherweise auch, um den Thrombus überhaupt erfolgreicher lysieren zu können.

Eine Beobachtung, die auf alle Thromben in der Kontrolle zutrifft und bei den präklimakterischen Frauen ohne OK bzw. postklimakterischen Frauen ohne HET signifikant ist, ist das niedrigere Endgewicht des dreissig Minuten alten Thrombus im Vergleich zu dem sechzig Minuten alten Thrombus. Geht man von einer kontinuierlichen Gewichtsverminderung, bedingt durch eine spontane Retraktion, aus, müsste der ältere Thrombus das niedrigere Endgewicht erreichen. Am Beispiel des Kontrollverlaufes bei den präklimakterischen Frauen ohne OK zeigte sich, dass das durchschnittliche Gewicht eines Thrombus nach dreissig und sechzig Minuten bei 13 mg liegt. Man kann annehmen, dass der jüngere, dreissig Minuten alte Thrombus vor Messbeginn noch vulnerabler ist als der ältere, sechzig Minuten alte Thrombus. Die in dieser Studie festgelegte zehnminütige Gewichtsmessung setzt ein Herausnehmen des Thrombus aus der Küvette voraus. Eventuell kam es hierbei bei dem jüngeren, weniger stabilen Thrombus zu einem vermehrten Plasmaverlust. Somit handelt es sich hier um einen systematischen Fehler in der Kontrollgruppe, den wir in Kauf nehmen müssen und der sich bei den lysierten Thromben wegen des bereits eingetretenen hohen Gewichtsverlustes nicht zeigte.

## 6 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die klinisch beobachteten unterschiedlichen Neigungen zur Thrombenentstehung bei gebärfähigen und postmenopausalen Frauen mit und ohne Hormonsubstitution auch an einem in-vitro-Modell nachzuvollziehen sind. Vernetzte Wirkungszusammenhänge sind zwischen der Auswirkung von Östrogenen auf physikalisch und chemische Determinanten der Gefäß- und Herzfunktion, der endothelialen Regulation und der Gerinnung anzunehmen.

Unsere Beobachtungen an in-vitro-Thromben sind sicherlich nicht direkt auf in-vivo-Verhältnisse übertragbar, können aber als Modell für mögliche in-vivo-Konstellationen gedacht werden. So könnte dieses Modell benutzt werden, um z.B. das Verhalten der verschiedenen Pillengenerationen, den Einfluss unterschiedlicher Gestagendosierungen in der HET oder den der „Selektiven Östrogenrezeptor Modulatoren (SERM)“ sowie den Einfluss des Rauchens mit und ohne Medikamentenkombination, zu untersuchen.

## 7 Zusammenfassung

Die vorliegende Untersuchung wurde an 34 gesunden Frauen zwischen dem 24. und 64. Lebensjahr durchgeführt: 20 präklimakterischen Frauen, von denen 10 als hormonelle Kontrazeption synthetische Östrogene einnahmen, und 14 postmenopausalen Frauen, von denen 7 konjugierte Östrogene und Progesteron einnahmen. Von jeder Gruppe wurden an festgelegten (Zyklus-) Tagen Plättchen-Fibrin-Thromben hergestellt und nach zehn, dreissig und sechzig Minuten mit Urokinase lysiert.

In allen vier Gruppen entstanden unterschiedlich schwere und dichte Thromben, die verschiedene Lyseeigenschaften aufwiesen. Bei den präklimakterischen Frauen mit hormoneller Kontrazeption bildeten sich größere und schwerere Thromben als in der menstruierenden Frauengruppe ohne Hormoneinnahme. Das Endgewicht der Thromben nach Lyse lag bei Frauen mit Kontrazeptiva deutlich unter dem der Frauen ohne orale Kontrazeption. Wurden diese Thromben nicht lysiert, behielten sie ihr hohes Gewicht bei. Die postklimakterischen Frauen mit hormoneller Ersatztherapie bildeten leichtere und besser lysierbare Thromben als die postklimakterischen Probandinnen ohne hormonelle Ersatztherapie.

Bei Frauen mit Kontrazeptiva waren Faktor VIII ( $p<0,0001$ ) und Ristocetin-Kofaktor ( $p<0,0001$ ) erhöht. Das  $\alpha$ 2-Antiplasmin war ebenfalls erhöht ( $p<0,005$ ), allerdings noch im Normbereich. Plasminogen und Antithrombin III zeigten keine signifikanten Unterschiede. Postklimakterische Frauen ohne HET hatten einen über die Norm erhöhten Faktor VIII ( $p<0,0001$ ). Ristocetin-Kofaktor war ohne HET im Normbereich erhöht ( $p<0,02$ ). Die HET erhöhte Plasminogen ( $p<0,03$ ) und  $\alpha$ 2-Antiplasmin ( $p<0,05$ ). Beide Faktoren befanden sich aber noch im Normbereich. ATIII wurde durch eine HET nicht beeinflusst.

Die maximale Thrombozytenaggregation wurde durch OK ( $p<0,05$ ) und durch die HET ( $p<0,0001$ ) erhöht, die Zeit bis zur maximalen Thrombozytenaggregation durch beide Arten der Hormonsubstitution verkürzt (OK  $p<0,0002$ , HET  $p<0,03$ ).

Das verwendete in-vitro-Modell der Thrombusentstehung und Lyse könnte dazu geeignet sein, den Einfluß zukünftig zu entwickelnder Hormonpräparate zu untersuchen.

## 8 Literaturverzeichnis

- 1 Ajaya AA, Mathur R, Halushka PV. Testosterone increase human platelet thromboxane A2 receptor density and aggregation responses. *Circulation* 1995; 91: 2742.
- 2 Aune B, Oian P, Omsjø I, Osterud B. Hormone replacement Therapy reduce the reactivity of monocytes and platelets in whole blood-A beneficial effects on atherogenesis and thrombus formation ? *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1816-20.
- 3 Bar J, Tepper R, Fuchs J, Pardo Y, Goldberger S, Ovadia J. The effect of estrogen replacement therapy on platelet aggregation and adenosine triphosphate release in postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 1993; 81: 261-264.
- 4 Barrett-Conner E. Sex differences in coronary heart disease: why are women so superior? The 1995 Ancel Keys Lecture. *Circulation* 1997; 95: 252-264.
- 5 Barrett-Connor E, Grady D. Hormone replacement therapy, heart disease, and other considerations. *Ann Rev Pub Health* 1998; 19: 55-72.
- 6 Bertina RM, Koeleman RPC, 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: 64-7.
- 7 Bonnar J. Coagulation effects of oral contraception. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157: 1042-8.
- 8 Boschetti C, Cortellaro M, Nencioni T, Bertolli V, Della Volpe A, Zanussi C. Short and long-term effects of hormone replacement therapy. Transdermal estradiol vs oral conjugated equine estrogens, combined with medroxyprogesterone acetate on blood coagulation factors in postmenopausal women. *Thromb Res* 1991; 62: 1-8.
- 9 Broady VC, Lin NL, Fox N, Taga T, Saito M, Kaushansky K. Thrombopoietin stimulates colony-forming unit-megakaryocyte proliferation and megakaryocyte maturation independently of cytokines that signal through the gp130 receptor subunit. *Blood* 1996; 88: 2026
- 10 Bush TL. The epidemiology of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 592: 263-271.
- 11 Bush TL, Miller VG. Effects of pharmacologic agents used during menopause. Impact on lipids and lipoproteins. In Mishell DR (Ed): *Menopause. Physiology and Pharmacology* (Year book medical publishers, Chicago) 1987; 187-208.
- 12 Caine YG, Bauer KA, Barzegar S, ten Cate H, Sacks FM, Walsh BW, Schiff I, Rosenberg RD. Coagulation activation following estrogen administration to postmenopausal women. *Thromb Haemost* 1992; 68: 392-395.
- 13 Carter CJ. The natural history and epidemiology of venous thrombosis. *Prog Cardiovasc Dis* 1994; 36: 423-38.
- 14 Chang WC, Nakao J, Orimi H, Murota S-I. Stimulation of prostaglandin cyclooxygenase and prostacyclin synthetase activities by estradiol in rat aortic smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1980; 620: 472-482.
- 15 Chen LY, Metha JL. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996; 27:154.

- 16 Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova ZI, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 1999; 103: 401-406.
- 17 Cushman M, Legault C, Barrett-Connor E, et al. Effect of postmenopausal hormones on inflammation-sensitive proteins. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Study. *Circulation* 1999; 100: 717-722.
- 18 Cushman M, Yanez D, Psaty BM et al. Association of fibrinogen and coagulation factors VII and VIII with cardiovascular risk factors in the elderly. The Cardiovascular Health Study. *Cardiovascular Health Study Investigators. Am j Epidemiol* 1996; 143: 665-677.
- 19 Dahlbäck B, Calsson M, Svensson PJ. Familial Thrombophilia due to a previously unrecognised mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1004-8.
- 20 Daly L, Bonnar J. Comparative studies of 30Fg ethinyl estradiol combined with getodene and desogestrel on blood coagulation, fibrinolysis and platelets. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 430-437.
- 21 Daume E. Influence of modern low-dose oral contraceptives on hemostasis. *Adv Contraception* 1990; 6 supp: 51-68.
- 22 Dear HD, Jones WB. Myocardial infarction associated with the use of oral contraceptives. *Ann Int Med* 1971; 74: 236-239.
- 23 Durand-P, Blache D. Enhanced platelet thromboxane synthesis and reduced macrophage-dependent fibrinolytic activity related to oxidative stress in oral contraceptive. *Atherosclerosis* 1996 April 5; 121(2): 205-16.
- 24 Faraday N, Goldschmidt-Clermont PJ, Bray PF. Gender differences in platelet GPIIb-IIIa activation. *Thromb Haemost*. 1997; 77: 748.
- 25 Farley TMM, Collins J, Schlesselman JJ. Hormonal contraception and risk of cardiovascular disease: an international perspective. *Contraception* 1998; 57: 211-30.
- 26 Farley TMM, Meirik O, Collins J. Cardiovascular disease and combined oral contraceptives: reviewing the evidence and balancing the risks. *Human Reprod Update* 1999; 5: 721-35.
- 27 Folsum AR, Wu KK, Davis CE, Conlan M, sorlie PD, Szklo M. Population correlates of plasma fibrinogen and factor VII, putative cardiac risk factors. *Atherosclerosis* 1991; 91: 191-205.
- 28 Gebara OCE, Mittelman MA, Sutherland P, Lipinska I, Matheney T, Xu P, Welty FK, Wilson PWF, Levy D, Muller JE, Tofler GH. Association between increased estrogen status and increased fibrinolytic potential in the Framingham Offspring Study. *Circulation* 1995; 91: 1952-1958.
- 29 Gevers Leuven JA, Kluft C, Dersjant-roorda MC, Harthoorn-Lasthuizen EJ, de Boer R, Helmerhorst FM. Effects of low dose oral contraceptives differing in progestogen compound on coagulationand fibrinolytic risk variables for venous and arterial thromboembolic diseases. In: *Fibrinolysis and disease, molecular and hemovascular aspects of fibrinolysis*. Glas-Greenwalt P, ed CRC Press 1995; Chapter 32: 226-234.
- 30 Gordon EM, Williams SR, Frenchek B, Mazur CA, Speroff L. Dose dependent effects of postmenopausal estrogen and progestin an antithrombin III anf factor XII. *J Lab Clin Med* 1988; 111: 52-56.

- 31 Grady D, Rubin SM, Petitti DB, et al. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med* 1992; 117: 1016-1037.
- 32 Grady D, Wenger NK, Herrington D et al. Postmenopausal hormone therapy increase risk for venous thromboembolic disease. The heart and Estrogen/progesteron Replacement Study. *Ann Intern Med* 2000; 132: 689-96.
- 33 Grodstein F, Manson JE, Stampfer MJ. Postmenopausal Hormone use and Secondary Prevention of Coronary Events in the Nurses' Health Study. *Ann Intern Med* 2001; 135: 1-8.G
- 34 Grodstein F, Meir J, Stampfer MD, Manson JE, Colditz G, Willet W, Rosner B, Speizer F, Hennekens H Postmenopausal hormone replacement Therapy and Mortality. *New Engl J Med* 1997; 336: 1761-75.
- 35 Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996; 335: 453-461.
- 36 Guetta V, Quyyumi AA, Prasad A, et al. The role of nitric oxide in coronary vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation*. 1997; 96: 2795-2801.
- 37 Hannaford PC, Owen-Smith V. Using epidemiological data to guide clinical practice:review of studies on cardiovascular disease and use of combined oral contraceptives. *BMJ* 1998; 316: 984-7.
- 38 Hartveit F. Myokardial infarction and oral contraceptives. *N Engl J Med* 1965; 286: 436-437.
- 39 Helmerhorst FM, Bloemenkamp KWM, Rosendaal FR, Vandebroucke JP. Oral contraceptives and thrombotic disease: Risk of venous thromboembolism. *Thromb haemostas* 1997; 78(1): 327-333.
- 40 Hoffbrand, Pettit, Hoelzer. *Roche Grundkurs Haematologie*. Blackwell Wissenschaft 1997; Band 5: 321-337.
- 41 Hulley S, Grady G, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E: Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA* 1998; 280: 605-613.
- 42 Johnson M, Ramey E, Ramwell PW. Androgen-mediated sensitivity in platelet aggregation. *Am J Physiol* 1977; 232: H381-H385.
- 43 Johnson M, Ramey E, Ramwell PW. Sex and age differences in human platelet aggregation. *Nature* 1975; 253: 355-357.
- 44 Jones SB, Bylund DB, Rieser CA, Shekim WO, Byer JA, Carr GW.  $\alpha$ -2Adrenergic receptors binding in human platelets: alterations during the menstrual cycle. *Clin Pharmacol Ther* 1983; 34: 90.
- 45 Kalin MF, Zumoff B. Sex hormones and coronary disease. *Steroids* 1990; N55: 330-352.
- 46 Kannel WB, D'Agostino RB, Belanger AJ. Update on fibrinogen as a cardiovascular risk factor. *Ann Epidemiol* 1992; 2 :457-466.
- 47 Khetawat G, Faraday N, Nealen ML, Bolton E, Tarunina O, Noga S, Bray PF. Human megakaryocytes and platelets contain the estrogen receptor- $\beta$  and androgen receptor (AR): testosterone regulates AR expression. *Blood*. 2000; 95: 2289-2296.
- 48 Kluft C, Lansink M. Effekt of oral contraceptives on haemostasis variables. *Thromb Haemost* 1997; 78: 315-26.

- 49 Koh KK, Mincemoyer R, Bui NM, et al. Effects of hormone-replacement therapy on fibrinolysis in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 1997; 336: 683-690.
- 50 Koster T, Blann Ad, Riet E, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR, et al. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep vein thrombosis. *Lancet* 1995; 345: 152-155.
- 51 Kraaijenhagen RA, in't Anker PS, Koopman MM, et al. High plasma concentration of factor VIII is a major risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2000; 83: 5-9.
- 52 Kroon U-B, Silfverstolpe G, Tengborn L. The effects of transdermal estradiol and oral conjugated estrogens on haemostasis variables. *Thromb Haemost* 1994; 71: 420-423.
- 53 Kuipper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 5925-5930.
- 54 Kuipper GG, Gustafsson JA. The novel estrogen receptor- $\beta$  subtype: potential role in the cell and promotor specific actions of estrogen and anti-estrogen. *FEBS Lett.* 1997 Jun 23; 410(1): 87-90. Review.
- 55 Kuschinsky G, Lüllmann H. Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Thieme, Stuttgart New York 1989; 12 Aufl: 195-197.
- 56 Kuschinsky G, Lüllmann H. Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Thieme, Stuttgart New York 1989; 12.Aufl: 417- 420.
- 57 Lee AJ, Lowe GOD, Smith WCS, Turnstall-Pedoe H. Plasma fibrinogen in women: relationship with oral contraceptives, the menopause and hormone replacement therapy. *Br J Haematol* 1993; 83: 616-21.
- 58 Leidenberger FA. Endokrinologie der perimenopausalen Übergangsphase, der Postmenopause und des Seniums. In: Leidenberger FA (Hrsg) *Klinische Endokrinologie, für Frauenärzte* 1998. Springer, Berlin, Heidelberg, New York; 123.
- 59 Lindberg UB, Crona L, Stigendal L, Teger-Nilsson AC, Silfverstolpe G. A comparison between effects of estradiol on haemostasis. *Thromb Haemost* 1989; 61: 65-69.
- 60 Lox CD. Biochemical effects in women following one year's exposure to a new triphasic contraceptive-II. Coagulation profiles. *Gen Pharm* 1996; 27: 371-374.
- 61 Meijers JCM, Middeldorp S, Tekelenburg W, et al. Increased fibrinolytic activity during use of oral contraceptives is counteracted by an enhanced factor XI-independent down regulation of fibrinolysis: a randomized cross-over study of two low-dose oral contraceptives. *Thromb Haemost* 2000; 84: 9-14.
- 62 Mendelson ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 1999; 340: 1801-1811.
- 63 Middeldorp S, Meijers JCM, van den Ende AE, et al. Effects on coagulation of levonorgestrel- and desogestrel-containing low dose oral contraceptives: a cross over study. *Thromb Haemost* 2000; 84: 4-8.
- 64 Mitchell HC. Effect of an estrogen and an progestogen on platelet adhesiveness and aggregation in rabbits. *J Lab Clin Med* 1974; 83: 381-385.
- 65 Moncada S, Higgs A. The 1-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012.

- 66 Nabulsi AA, Folsom AR, White A, Patsch W, Heiss G, Wu KK, Szklo M. For the Atherosclerosis Risk in Communities Study Investigators. Association of hormone replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1993; 328: 1069-1075
- 67 National Heart, Lung and Blood Institute. Morbidity and Mortality: 1996 Chartbook on Cardiovascular, Lung and Blood Diseases. Bethesda, MD: National Institute of Health, 1996. Coronary artery disease. *Cardiol Clin*. 1996; 14:105.
- 68 Nealen ML, Vijayan V, Bolton E, Bray PF. Human platelets contain a glycosylated estrogen receptor- $\beta$ . *Circulation Research* 2001; 88: 438.
- 69 Norris LA, Bonnar J. Effect of oestrogen dose on whole blood platelet activation in women taking new low dose contraceptives. *Thromb Haemost* 1994; 72(6): 926-930.
- 70 Norris LA, Bonnar J. The effect of oestrogen dose and progestogen type on haemostatic changes in women taking low dose oral contraceptives. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; 103(3): 261-267.
- 71 Petitti DB, Sidney S, Quesenberry CP. Oral contraceptive use and myocardial infarction. *Contraception* 1998; 57: 143-55.
- 72 Plu-Bureau G, Amiral J, Guize L, Scarabin P-Y. Safety of combined oral contraceptive pills. *Lancet* 1996; 347: 549.
- 73 Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698-703.
- 74 Ridker PM, Miletich JP, Hennekens CH, Buring JE. Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women: implications for venous thromboembolism screening. *JAMA* 1997; 277: 1305-7.
- 75 Rosendaal FR, Koster T, Vandebroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995; 85: 1504-8.
- 76 Rosing J, Middeldorp S, Curvers J, et al. Low-dose oral contraceptives and acquired resistance to activated Protein C: a randomised cross-over study. *Lancet* 1999; 354: 2036-40.
- 77 Rosing J, Tans G, Nicolaes GAF, et al. Oral contraceptives and venous thrombosis: different sensitivities to activated protein C in women using second-and third-generation oral contraceptives. *Br J Haematol* 1997; 97: 233-8.
- 78 Scarabin PY, Vissac AM, Kirzin JM et al. Population correlates of coagulation factor VII: importance of age, sex and menopausal status as determinants of activated factor VII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1170-1176.
- 79 Shahar E, Folsom AR, Salomaa VV, Stinson VL, Mc Govern PG, Shimakawa T, Chambliss LE, Wu KK (1996). For the Atherosclerosis Risk in Communities Study Investigators. Relation of hormone replacement therapy to measure of plasma fibrinolytic activity. *Circulation* 1996; 93: 1970-1975.
- 80 Sporrong T, Mattsson LA, Samsioe G, Stigendal L, Hellgren M. Haemostatic change during continuous oestradiol-progestogen treatment of postmenopausal women. *Brit J Obstets Gynaecol* 1990; 97: 934-944.
- 81 Stampfer MJ, Colditz GA. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease- a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev Med* 1991; 20: 47-63.

- 82 Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, et al.. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease- ten year follow up from the Nurses`Health study. *N Engl J Med* 1991; 325: 756-762.
- 83 Strubblefield PG. Cardiovascular effects of oral contraceptives: a review. *Int J Fertil* 1989; 34:Suppl: 40-9.
- 84 Sullivan JM, Fowleks LP. Estrogen, menopause, and coronary artery disease. *Cardiol Clin.* 1996; 14: 105.
- 85 Tarantino MD, Kunicki TJ, Nugent DJ. The estrogen receptor is present in human megakaryocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 14: 293.
- 86 The Writing Group for the PEPI Trial: Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women: the Postmenopausal Estrogen/Progesteron Interventions (PEPI) Trial. *J. Amer. med.Ass* 1995; 273: 199-208.
- 87 Van Tilburg NH, Rosendaal FR, Bertina RM. Thrombin activatable fibrinolyses inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. *Blood* 2000; 95: 2855-9.
- 88 Vanderbroucke JP, Koster T, Briet E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased risk of venous thrombosis in oral contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet* 1994; 344: 1453-57.
- 89 Vanderbroucke JP, Rosendaal FR. End of line for „third-generation-pill“ controversy? *Lancet* 1997; 349: 1113-4.
- 90 Vencov CD, Rankin AB, Vaughan DE. Endothelial cells express estrogen receptors: evidence for a full length mRNA. *Circulation* 1995; 92(Suppl.): 168.
- 91 Von dem Borne PA, Bajzar L, Meijers JC, Nesheim NE, Bouma BN. Thrombin-mediated activation of factor XI results in a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-dependent inhibition of fibrinolysis. *J Clin Invest* 1997; 99: 2323-7.
- 92 Walter P, Green S, Green G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, Chambon P. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985; 82: 7889-7893.
- 93 Wardekar AS, Bercu BA. Myocardial infarction and oral contraceptives. *South Med J* 1973; 66: 382-384.
- 94 Wattel E, Cambier N, Caulier MT, Sautiere D, Bauters F, Fenaux P. Androgen therapy in myelodysplastic syndromes with thrombocytopenia: a report on 20 cases. *Br J Haematol.* 1994; 87: 205.
- 95 Waxler EB, Kimbiris D, van den Broek H, Segal BL, Likoff W. Myocardial infarction and oral contraceptive agents. *Am J Cardiol.* 1971; 28: 96-101.
- 96 Weinges KF, Wenzel E, Hellstern P, Geurts TBP, Dieben TOM. The effect of two phasic oral contraceptives on hemostasis and platelet function. *Adv Contraception* 1995; 11: 227-237.
- 97 Whiteman MK, Cui Y, Flaws JA, Espeland M, Bush TL: Low fibrinogen level: A predisposing factor for venous thromboembolic events with hormone replacement therapy. *Am J Hematol* 1999; 61: 271-273.
- 98 WHO scientific group. Cardiovascular disease and steroid hormone contraception: report of a WHO scientific group. *WHO Tech Rep Ser* 1998; 877: 1-89.

- 99 Winkler UH. Hormonersatz-Therapie und das Herz-Kreislaufsystem: Zur Rolle der Hämostase. Zentralbl Gynakol 1995; 117: 510-515.
- 100 Winkler UH, Oberhoff C, Bier U, Schindler AE, Gillain D. Hemostatic effects of two oral contraceptives containing low dose of ethinylestradiol and either gestodene or norgestimate: an open, randomized, parallel-group study. Int J Fertil Menopausal Stud 1995; 40: 260-268.
- 101 Winkler UH, Schindler AE, Krämer R, Kwee B. Östrogensubstitution in der Postmenopause. Vergleich einer neuartigen transdermalen Östradiolbehandlung mit der oralen Therapie mit konjugierten Östrogenen. Zentralbl Gynakol 1995; 117: 540-548.
- 102 Winkler UH. Blood coagulation and oral contraceptives: a critical review. Contraception 1998; 57: 203-9.

## **9 Danksagung**

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. K-H. Kuck, dem früheren Direktor der kardiologischen Abteilung im Universitätsklinikum-Eppendorf und jetzigem Leiter der kardiologischen Abteilung des St. Georg Krankenhauses, für die Überlassung des Themas bedanken. Mein Dank gilt außerdem im ganz besonderen Maße Herrn Prof. Dr. med. W. Terres, von dem die Idee zu dieser Arbeit ausging und der mir ihre Durchführung anvertraute. Er war mir in wichtigen Fragen stets ein geduldiger Zuhörer und Ratgeber. Ebenso herzlich möchte ich mich bei Dr. med. C. Beythien bedanken. Dr. Beythien hat mich mit großer Sorgfalt bei der Umsetzung des experimentellen Teils der Arbeit begleitet und war ebenfalls bei Rückfragen im gesamten Verlauf dieser Dissertationsarbeit ein immer ansprechbarer Betreuer.

Mein Dank gilt zudem allen Probandinnen, die für die insgesamt 190 Treffen, welche für die Blutabnahmen notwendig waren, Ihre Zeit zur Verfügung gestellt haben.

## **11 Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.