

**Aus dem Institut für Klinische Chemie  
(Direktor: Prof. Dr. med. Ralf Junker)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

**Individuelles  
venöses Thromboembolierisiko  
bei A>G Einzelnukleotid-Polymorphismus  
im  
Prothrombin-Gen (rs3136516)**

**Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

**vorgelegt von  
Bettina Kiesau  
aus Kiel**

**Kiel, 2021**

1- Berichterstatter: Professor Dr. med. Ralf Junker  
Institut für Klinische Chemie

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. Markus Steinfath  
Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juni 2022

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 09.02.2022

gez.: Professor Burkhard Brandt  
Vorsitzender der Prüfungskommission

*Vor dem Meer, dem Land und dem alles deckenden  
Himmel zeigte Natur in der ganzen Welt nur ein einziges  
Antlitz. Chaos ward es genannt: eine rohe, gestaltlose  
Masse, nichts als träges Gewicht und, uneins  
untereinander, Keime der Dinge, zusammengehäuft in  
wirrem Gemenge.*

*Publius Ovidius Naso (Ovid, 43 v. Chr. - 17 n. Chr.): Metamorphosen I, 5 - 20)*

*Meinen Eltern.*

# Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	1
Lungenembolie .....	1
Hämostaseologie.....	3
Thromboembolie - Risikofaktoren.....	3
Thrombophilien.....	4
Endogene und exogene Risikofaktoren.....	5
(Anlage-) Variante - Mutation – Polymorphismus.....	6
Faktor V Leiden-Mutation/ APC-Resistenz.....	6
Prothrombin-Gen .....	7
Prothrombin G20210A -Anlagevariante.....	7
Single Nucleotid Polymorphism (SNP) .....	8
Prothrombin (FII)-Gen A19911G-Polymorphismus .....	9
Prothrombin .....	9
Material und Methoden .....	12
Ethik .....	12
Studienpopulation.....	12
Ein- und Ausschlusskriterien.....	12
Primäres Studienziel .....	13
Sekundäres Studienziel.....	13
Klinischer Ablauf.....	14
Blutprobensammlung .....	14
Laboranalyse .....	15
Blutspender-Kontrollkollektiv.....	16
Antikoagulantien-Therapie .....	17
Statistik .....	17

Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test .....	17
Chi-Quadrat-Test .....	18
Odds Ratio (OR) .....	18
Logistisches Regressionsmodell .....	18
Multivariables Regressionsmodell.....	19
Multiplikative Skala .....	19
Methode nach Kaplan und Meier .....	19
Log-rank-Test.....	19
Proportionales Hazard-Modell von Cox .....	20
Likelihood-Quotienten-Test (LQT).....	21
Prädiktiver Wert /negativer Vorhersagewert .....	21
Receiver-Operating-Characteristics (ROC-)-Analyse.....	22
Score .....	23

Ergebnisse .....	25
Primäres Studienziel.....	25
Deskriptive Analyse des Kollektivs.....	26
Deskriptive Analyse der Thrombophilien .....	29
Univariate und multivariate Analyse .....	30
Validation eines Vorhersage-Modells .....	31
Ereigniszeit-Analyse im Hinblick auf das vorliegende Geschlecht.....	32
Ereigniszeit-Analyse bei Vorhandensein von Thrombophilien.....	33
Erstellung eines Risikoprofils (Scoring).....	35
Ermittlung des Risiko-Grenzwertes und Randomisierungsergebnis .....	35
Ergebnisse der Derivations- und Validations-Kohorten im Vergleich .....	36
Darstellung des Risiko-Scores in der Gesamtkohorte .....	39
Diskussion .....	40
Zusammenfassung .....	49
Literaturangaben .....	VI

## Anhang

Fördermittel /Ausschluss Interessenskonflikt .....	XVI
Publikation.....	XVII
Danksagung .....	XLII

# Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: THROMBOPHILIEN (MODIFIZIERT (MOD.) NACH KYRLE, EICHINGER 2010)	4
TABELLE 2: BEISPIELE FÜR EXO- UND ENDOGENE RISIKOFAKTOREN (MOD. NACH KYRLE, EICHINGER 2010)	5
TABELLE 3: FUNKTIONEN DES THROMBINS (MOD. NACH BARTHEL 2013)	10
TABELLE 4: DARSTELLUNG DER STUDIENPOPULATION MIT RELEVANTEN DATEN: MANIFESTATIONSORT UND RISIKOFAKTOREN (RF) DER VTE	27
TABELLE 5: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG VON EINZELN ODER KOMBINIERT VORKOMMENDEN HEREDITÄREN THROMBOPHILIEN ALS RISIKOFAKTOR	29
TABELLE 6: UNIVARIANTE UND MULTIVARIANTE ANALYSE (LOGISTISCHE REGRESSION) MIT DARSTELLUNG DER ODDS RATIO, 95 %-KONFIDENZINTERVALL (CI)	30
TABELLE 8: PUNKTE-VERGABESYSTEM IM RISIKOSCORE	35
TABELLE 9: VERGLEICH DER PUNKTWERTE IM SCORING-SYSTEM ZWISCHEN DER DERIVATIONS- UND VALIDATIONS-KOHORTE	37
TABELLE 10: VERTEILUNG DER REZIDIV-EREIGNISSE IN DER DERIVATIONS- UND VALIDIERUNGSKOHORTE UND ERGEBNISSE DER COX-REGRESSIONSANALYSE (VERGLEICH LRG VERSUS HRG)	38
TABELLE 11: ERGEBNISSE DER COX-REGRESSION FÜR DIE EINZELNEN KATEGORIEN IM RISIKO-SCORE, ADJUSTIERT FÜR ALTER BEI ERSTEREIGNIS EINER VTE UND BLUTGRUPPE (BG „0“ VERSUS „NON-0“)	40

# Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: FLOW CHART PATIENTENREKRUTIERUNG	26
ABBILDUNG 2: EREIGNISZEIT-ANALYSE MIT DARSTELLUNG DER WAHRSCHEINLICHKEIT DER REZIDIV-FREIEN ZEIT IM ANSCHLUSS AN EINE ERSTE SYMPTOMATISCHE VTE.	32
ABBILDUNG. 3: KAPLAN-MEIER-VERFAHREN MIT DARSTELLUNG DER WAHRSCHEINLICHKEIT DES REZIDIV-FREIEN ÜBERLEBENS NACH EINER ERSTEN SYMPTOMATISCHEN VTE.	34
ABBILDUNG 4: RANDOMISIERUNG DER PATIENT*INNEN IN EINE DERIVATIONS- UND VALIDATIONS-GRUPPE ZUR ERSTELLUNG EINES RISIKOPROFILS.	36
ABBILDUNG 5: REZIDIV-FREIES ÜBERLEBEN IN BEZUG AUF DEN JEWEILS ERZIELTEN RISIKOSCORE IM KAPLAN-MEIER-VERFAHREN.	39



## Einleitung

Das erste Kapitel seiner wissenschaftlichen Abhandlung „Thrombose und Embolie“ hat der Pathologie-Professor Rudolf Ludwig Karl Virchow der Lungenarterienembolie gewidmet. So beginnt er mit dem Satz: „Erst in der neuesten Zeit ist man mehrfach auf das ebenso merkwürdige, als wichtige Phänomen der Verstopfung der Lungenarterie durch Blutgerinnsel aufmerksam geworden“ (Virchow 1846). Um dann aufgrund seiner Erfahrungen bei den Sektionen in der Berliner Charité zu der Schlussfolgerung zu kommen, dass die Verstopfung der Lungenarterie zu den häufigeren Krankheitszuständen zu rechnen und die geringe Anzahl der beobachteten Lungenarterienembolien eher der Mangelhaftigkeit der Untersuchungen geschuldet sei (Virchow 1856).

Das Ereignis einer Thromboembolie bedeutet, dass es zu einer übermäßigen (krankhaften) Entwicklung eines Blutgerinnsels kommt. Dieses Blutgerinnsel verschließt ein Gefäß – sei es Vene oder Arterie – in Form einer Thrombose am Entstehungsort oder im Sinne eines Embolus, der auf Wanderschaft geht und zu einem Gefäßverschluss andernorts führt. Wiederholt sich das Thromboembolie-Ereignis, spricht man von einem Rezidiv. Beispiele für Thromboembolien sind die oberflächliche und tiefe Beinvenenthrombose, die Lungenarterienembolie (LAE), die zerebrale Sinusthrombose und der Schlaganfall oder aber auch der Herzinfarkt.

## Lungenembolie

Die neueste Leitlinie der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC, European Society of Cardiology) beschreibt die venöse Thromboembolie (VTE), zu der die tiefe Venenthrombose (TVT) und die Lungenarterienembolie (LAE) zählen, als die dritthäufigste kardiovaskuläre Erkrankung mit einer Inzidenz von 100 – 200 Fällen pro 100.000 Einwohner (vgl. Konstatinides et al. ESC 2019: 8). Umgerechnet für das Bundesland Schleswig-Holstein mit seinen fast 2,9 Millionen (Stand 2018) wären das 2900 – 5800 Neuerkrankungen pro Jahr. Bereits in der Leitlinien-Version von 2014 der deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) wird darauf hingewiesen, dass die akute LAE das schwerwiegendste Krankheitsbild einer VTE darstelle und eine der

Hauptursachen für Mortalität, Morbidität und Hospitalisierung sei. Sie führt weiter aus, dass im Jahre 2004 in der Europäischen Union (mit sechs Ländern und einer Gesamtpopulation von 454,4 Millionen) über 370.000 Todesfälle in Zusammenhang mit einer VTE gestanden hätten. 34 % davon seien durch eine LAE bedingt gewesen und – so schließt sich der Kreis zu Virchows Ausführungen vor über 150 Jahren – nahezu 60 % der Todesfälle hätten sich aufgrund einer nicht erkannten LAE ereignet (DGK 2014). Allerdings weisen die neuesten ESC-Leitlinien zur Lungenarterienembolie auch darauf hin, dass sich in aktuellen Studien ein Gegenteil herauskristallisiere, der vermutlich u. a. auch der verbesserten Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten sowie einer geschärften Aufmerksamkeit, nicht zuletzt durch die Erstellung von Leitlinien geschuldet sei (Konstatinides et al., ESC 2019). Das Thromboembolie-Risiko scheint mit steigendem Alter anzusteigen, so dass die Inzidenz bei den über 70-Jährigen bei über 500 pro 100000 Einwohner\*innen liegen soll. Gleichzeitig schätzt man, dass allein in Deutschland jährlich circa 5000 Menschen an einer LAE versterben (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2017). Hinzu kommen die Langzeitfolgen bei überlebter LAE, wie anhaltende Belastungseinschränkungen, erhöhtes Rezidivrisiko für Thromboembolien, psychische Belastungserscheinungen und die Entwicklung einer chronisch thromboembolischen pulmonalen Hypertonie (CTPH) (Wilkins & Held 2018). Umso wichtiger erscheint es, sich im Bereich der Thrombose-Entstehung und ihrer Behandlung zu engagieren. Bis heute sind immer noch viele Ursachen bzw. Risikofaktoren unklar. Diese Dissertation möchte einen kleinen Beitrag zur Beantwortung der noch offenen Fragen leisten. Ihr Thema kommt somit aus dem komplexen Bereich der Hämostaseologie.

## Hämostaseologie

Die Hämostaseologie befasst sich mit den normalen physiologischen Vorgängen der Blutstillung, ebenso aber auch mit krankheitsbedingten Ursachen der Blutungs- und Thromboseneigung. Ein wichtiger Bereich sind die Funktionen der Thrombozyten (Blutplättchen) und der plasmatischen Gerinnungsfaktoren bzw. -inhibitoren und ihre Bedeutung für die primäre und sekundäre Wundheilung. Ebenso umfasst die Hämostaseologie den Themenbereich der Fibrinolyse und die Blutzirkulation bzw. das Gefäßsystem (Müller-Berghaus 2010). Das Wort „Hämostase“ selbst hat seinen Ursprung im Griechischen und setzt sich aus den beiden Anteilen „háíma“ (zu Deutsch „Blut“) und „stasis“ („Stauung“ oder „Stillstand“) zusammen. Sinngemäß lässt sich somit für den physiologischen Bereich der Begriff der Blutstillung ableiten. Gleichzeitig betont „Hämostase“ aber auch - im Sinne einer Homöostase - das fein austarierte System zwischen Blutfluss und Blutstillung bzw. Wundheilung, die jeweils für sich essentiell für die Integrität des Körpers sind. Im pathologischen Sinne führt der Begriff der Hämostase zum nicht erwünschten Blutstillstand durch eine übermäßige Gerinnselformung und damit zum Thema der Thromboembolie und ihren Ursachen.

## Thromboembolie - Risikofaktoren

Ein Thrombus (altgriech. thrómbos, dt. „Pfropf“; Blutgerinnsel) befindet sich im Gegensatz zu einem Koagel (lat. Coagulum) im Gefäßsystem und verstopft durch appositionelles Wachstum das Lumen der Ader. Es entsteht eine Thrombose. Geht der Thrombus auf Wanderschaft und verschließt ein Blutgefäß in einem anderen Teil des Körpers, spricht man von Embolie. Für thromboembolische Ereignisse gibt es, wie bereits Virchow in seinen Ausführungen beschrieb, vielfältige Ursachen. Unter der nach dem Pathologen benannten Virchow-Trias subsumieren sich die drei wesentlichen Ursachen Gefäßwandschaden, Störungen des Blutflusses und fehlregulierte Hämostase. In unserer heutigen Zeit, mit den Möglichkeiten der Molekulargenetik und DNA-Sequenzierung, geht der Blick aber auch zu den genetischen Veranlagungen und Mutationen. In der aktuellen Version der ESC-Guidelines zur Diagnose und zum Management der akuten Lungenarterienembolie findet sich eine Tabelle (ESC 2019, Table 3) mit prädisponierenden Faktoren für eine VTE, die schon 2014 in die deutsche Pocket-Leitlinie der DGK aufgenommen worden

war. Die VTE-Risikofaktoren werden in dieser Tabelle in die Kategorien stark, mittel und schwach eingeteilt. So wird der Zustand nach stattgehabter VTE oder innerhalb von drei Monaten nach einem Myokardinfarkt als starker prädisponierender Risikofaktor für ein VTE-Rezidiv eingestuft. Gleichzeitig gelten nach der Tabelle z. B. Thrombophilien, Wochenbett, die Einnahme oraler Kontrazeptiva, Tumorerkrankungen oder die oberflächliche Venenthrombose (OVT) als eher mittlere Risikofaktoren, wohingegen eine Bettlägerigkeit über mindestens drei Tage, Immobilität durch langes Sitzen, Schwangerschaft, höheres Alter, Krampfadern, Adipositas u.v.m. als schwache Risikofaktoren eingestuft werden.

## Thrombophilien

Eine Thrombophilie ist eine angeborene (hereditäre) Neigung zur Thromboembolie (TE). Zu den in der Bevölkerung häufiger vorkommenden, dafür aber mit einem eher geringeren Risiko behafteten Thrombophilien zählen z. B. die Anlagevarianten im Faktor V Leiden- und im Prothrombin-Gen. Thrombophilien, die mit einem höheren Risiko einhergehen, sind u. a. der Antithrombin- und Protein S-Mangel (Rosendaal 1999, Dahlbäck 2000, Martinelli 2001, Bertina et al. 1994, Poort et al. 1996). Im Folgenden (Tabelle 1) sind einige der thrombogenen Risikofaktoren (ohne Anspruch auf Vollständigkeit) noch einmal aufgeführt. Eine aktuelle Meta-Analyse zur Bedeutung der einzelnen thrombophilen Hämostasedefekte findet sich bei Wu et al. (2006).

Tabelle 1: Thrombophilien (modifiziert nach Kyrle & Eichinger 2010)

- Faktor V Leiden-Mutation, Prothrombin G20210A-Variante
- Antithrombin-, Protein C-, Protein S-Mangel
- Dysfibrinogenämie
- Plasminogen-Mangel
- Anhaltend erhöhte Faktor FVIII-, FIX- oder XI-Plasmaspiegel
- Hyperhomozysteinämie (nicht erworben)
- Antiphospholipid-Syndrom (Autoimmunerkrankung)
- Lipoprotein(a)-Erhöhung

## Endogene und exogene Risikofaktoren

Von den hereditären Thrombophilien müssen die erworbenen Risikofaktoren und Situationen abgegrenzt werden, die zu einer erhöhten Thromboembolie-Neigung führen. Nikotinkonsum oder Adipositas (aufgrund einer Fehlernährung) zählen zu den exogenen Risikofaktoren, die sich durch Modifikation des Lebensstils mindern lassen. Auch Schwangerschaft und Wochenbett oder eine Bettlägerigkeit aufgrund einer schweren Grippe sind vorübergehende Zustände. Hinzu kommen Faktoren, wie männliches Geschlecht – Männer haben z. B. ein höheres TE-Rezidivrisiko als Frauen (Kyrle et al. 2004) - ein zunehmendes Alter oder die Blutgruppen A, B und AB (Baudouy et al. 2015). Es handelt sich hierbei zwar nicht um hereditäre Thrombophilien, gleichwohl aber um nicht veränderbare endogene Situationen. Sie alle nehmen Einfluss auf das Thromboembolie-Risiko (Rosendaal 1999, Dahlbäck 2000, Martinelli 2001).

Die aktuelle S3-Leitlinie der AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.) zur Prophylaxe der venösen Thromboembolie und die ESC-Leitlinie zur Lungenarterienembolie differenzieren zwischen expositionellen und dispositionellen Faktoren, aus denen sich das Gesamtrisiko für eine Thromboembolie ergebe. Dabei setze sich das dispositionelle Risiko aus angeborenen und erworbenen personenbezogenen Einflussvariablen zusammen, während das expositionelle Risiko durch krankheitsbedingte bzw. situationsbedingte Ursachen mit entsprechender Immobilisation zustande käme (AWMF 2015, ESC 2019). Einige Beispiele für Risikofaktoren finden sich in der folgenden Tabelle, auch diese ohne Anspruch auf Vollständigkeit.

Tabelle 2: Beispiele für exo- und endogene Risikofaktoren (mod. nach Kyrle, Eichinger 2010:)

• Alter	• Operation, Trauma
• Adipositas	• Schwangerschaft und Wochenbett
• Blutgruppe Non-0	• Stattgehabte Thromboembolie
• Chron. entzündliche Darmerkrankungen	• Tumorerkrankung
• Immobilisation	• Zentraler Venenkatheter
• Männliches Geschlecht	• Hormoneinnahme

## (Anlage-) Variante - Mutation – Polymorphismus

Zu den häufigsten und bekanntesten Anlagevarianten, die das Thromboembolie-Risiko leicht (milde) erhöhen, zählen die Faktor V Leiden-Mutation und die Variante 20210G>A (rs1799963) im Prothrombin (Faktor FII) -Gen. Es sei bemerkt, dass der Begriff Mutation häufig in einem unterschiedlichen Kontext verwendet wird, was z. T. für Verwirrung sorgt. Mutation kann sich einerseits auf das akute Ereignis einer genetischen Veränderung beziehen, z. B. durch den Einfluss radioaktiver Strahlung. Andererseits bedeutet Mutation auch eine über viele Generationen weitergegebene Veränderung im Erbgut, die vor langer Zeit zufällig entstanden ist. Hinzu kommt die Bedeutung in der Medizin als seltene, häufig schwere Erkrankung aufgrund eines Defekts im Erbgut. Besser verwendet man die Bezeichnung „Variante“ oder „Anlagevariante“, wenn es um Abweichungen vom Wildtyp geht. Der Wildtyp gilt als Normalsequenz in der Basenabfolge, kann aber durchaus willkürlich festgelegt worden sein. Geht es um Häufigkeitsverteilungen bei genetischen Varianten, spricht man von einem Polymorphismus, wenn das seltenere Allel der Variante mit einer Häufigkeit von  $\geq 1\%$  in der betreffenden Population auftritt. Ein Allel ist eine Merkmalsausprägung an einem bestimmten Genort oder Chromosomenabschnitt. Ist die Zustandsform auf beiden homologen Chromosomen gleich, handelt es sich um ein homozygotes Merkmal (Schaaf & Zschocke, 2018). Die Prävalenz der Prothrombin G20210A-Variante wird in der kaukasischen Bevölkerung mit 2 % beziffert, es handelt sich ebenso wie die Faktor V Leiden-Variante um einen Polymorphismus.

## Faktor V Leiden-Mutation/ APC-Resistenz

Der Begriff APC-Resistenz geht auf eine Beobachtung des schwedischen Mediziners Björn Dahlbäck (\*1949) zurück. Aktiviertes Protein C (APC) ist eine Serinprotease, die während der physiologisch ablaufenden Hämostase durch proteolytische Inaktivierung von Faktor FVa und FVIIIa die Gerinnselbildung begrenzt. Dafür bedarf das aktivierte Protein C der Hilfe von Protein S, einem nichtenzymatischen Kofaktor. 1994 konnte an der Universität Leiden eine Punktmutation an Position 1691 im Faktor V-Gen (Chromosom 1, Genlocus 1q24.2) nachgewiesen werden. Hierdurch kommt es zu einem Aminosäuretausch von Glutamin zu Arginin an der Position 506 (Bertina et al. 1994: 64-7). Folge ist eine deutlich (etwa zehnfach) langsamere Spaltung des Faktor FV, so als wäre dieser resistent gegen APC. Da der inaktive Faktor FV auch als

Kofaktor für APC bei der Inaktivierung der Faktoren FVIIIa und FVa dient, resultiert eine verminderte antikoagulatorische Eigenschaft des aktivierten Protein C respektive eine erhöhte Gerinnungsneigung (Nicolaes & Dahlbäck 2002). Hinzu kommt, dass der Gerinnungsfaktor FV auch an der Thrombinaktivierung beteiligt ist. Das Vorkommen einer heterozygoten Faktor V Leiden-Mutation in der kaukasischen Bevölkerung wird mit einer Häufigkeit von 5-8 % angegeben. Damit handelt es sich also um eine Anlagevariante (s. o.) Die homozygote Form ist sehr selten. Die Faktor V Leiden-Variante kann bei 24 – 37 % der von einer Thromboembolie betroffenen Patient\*innen nachgewiesen werden. Das Risiko, unter einer heterozygoten Faktor V Leiden-Variante eine erste Thrombose zu erleiden, ist gegenüber einem Nicht-Merkmalträger etwa 3,7- bis 8-fach erhöht (Cushman et al. 2004, Koster et al. 1993).

## Prothrombin-Gen

Das Prothrombin-Gen liegt auf Chromosom 11 und zählt damit zu den über 1300 Genen, die bisher auf Chromosom 11 entschlüsselt wurden. Chromosom 11 hat unter den 46 Chromosomen die größte Gen-Dichte und codiert die höchste Anzahl an Erkrankungen. Das Prothrombin-Gen selbst besteht aus 20.300 Basenpaaren (und 14 Exons). Nach der Transkription wird die messenger-RNA translatiert und zum Prothrombin-Molekül mit seinen 579 Aminosäuren modifiziert. Zur Erinnerung sei hier erwähnt, dass die Desoxyribonukleinsäure (DNS, engl. DNA) in Form eines Doppelstranges aufgebaut ist und die Erbinformation des Menschen, aber auch anderer Lebewesen verschlüsselt. Die messenger-RNA enthält Ribonukleinsäure und ist der zentrale Botenstoff in der Proteinbiosynthese. Die Bausteine der Nukleinsäuren sind vier verschiedene Nukleotide, die ihrerseits jeweils aus einem Phosphatrest, einem Zucker (Desoxyribose oder Ribose) und einer der vier Basen Adenin, Thymin, Guanin oder Cytosin zusammensetzt sind.

## Prothrombin G20210A -Anlagevariante

Die Prothrombin G20210A-Variante findet sich bei 20 % der Patient\*innen mit einer VTE. Sie beruht auf einer Veränderung im Promotor-Gen<sup>1</sup>, welches die Bildung von

---

<sup>1</sup> Ein Promoter ist eine Nukleotid-Sequenz auf der Desoxyribonukleinsäure (DNS, DNA) und reguliert die Expression eines Gens durch seine Interaktion mit bestimmten Transkriptionsfaktoren (DNA-bindenden Proteinen) welche den Start der Transkription des Gens durch die RNA-Polymerase vermitteln

Prothrombin reguliert. Die Punktmutation mit resultierender Substitution von Guanin durch Adenin an der Position 20210 des Faktor FII-Gens bewirkt einen um bis zu 25 % höheren Prothrombinspiegel im Blutplasma im Vergleich zu Individuen ohne dieses Merkmal. Die Prävalenz in der kaukasischen Bevölkerung liegt bei 1,7–3,0 % mit einer tendenziell zunehmenden Häufigkeit im Süden Europas (Poort et al. 1996).

## Single Nucleotid Polymorphism (SNP)

In dieser Arbeit geht es um die Bedeutung einer weiteren Prothrombin-Genvariante: den Single Nucleotid Polymorphism A19911G. Single Nucleotid Polymorphism (SNP, ausgesprochen „Snip“) heißt zu Deutsch Einzel-Nukleotid-Polymorphismus. Wie bereits oben ausgeführt, handelt es sich bei einem Polymorphismus um eine Region im Genom, die bekannt ist für unterschiedliche Ausprägungen bei den einzelnen Individuen. Ein Einzelnukleotid-Polymorphismus ist eine Position im Genom, an der alternativ eine unterschiedliche Base sitzen kann, also ein einzelner Basentausch. Die Häufigkeit von mehr als einem Prozent in der Population unterscheidet die SNPs von Punktmutationen. SNPs sind sehr stabil und verändern sich über mehrere Generationen kaum. Aufgrund statistischer Überlegungen wird angenommen, dass im humanen Genom mit seinen drei Milliarden Basenpaaren drei Millionen SNPs anzutreffen sind (Schaaf & Zschocke 2018).



## Prothrombin (FII)-Gen A19911G-Polymorphismus

Bei dem Prothrombin-Gen A19911G-Polymorphismus mit der rs3136516 handelt sich, wie bereits oben erwähnt, um einen Einzel-Nukleotid-Polymorphismus. Der rs-Code ist eine Zugangsnummer (Reference SNP Cluster ID) der NCBI (National Center for Biotechnology Information) -Datenbank, die von Forschern respektive anderen Datenbanken genutzt wird, um Bezug auf einen spezifischen SNP nehmen zu können. Es konnte gezeigt werden, dass eine starke - wenn auch nicht vollständige Assoziation zwischen den beiden Polymorphismen 19911 und 20210 besteht und diese den Faktor FII-Spiegel im Plasma beeinflusst (Ceelie et al. 2001, Martinelli et al 2006). Darüber hinaus wird angenommen, dass ein komplettes Assoziationsungleichgewicht (Linkage Disequilibrium, LD) zwischen diesen beiden Markern in der kaukasischen Bevölkerung besteht und es somit drei mögliche Haplotypen (Varianten in der Nukleotidsequenz) gibt, die mit dem Plasmaspiegel von Prothrombin korrelieren: 19911A-20210G, 19911G-20210G und 19911A-20210A. Insgesamt ist die Rolle des Prothrombin A19911G-Polymorphismus im Hinblick auf das Thromboembolierisiko aber weiterhin unklar. In allen Studien entsprach die Prävalenz des 19911A-Allels annähernd derjenigen der niederländischen Population, wie bereits 2001 von Ceelie et al. berichtet. Die homozygote A19911G-Variante kommt bei 16% bis 24% in der gesunden weißen Bevölkerung vor. Sie ist mit einem ca. 1,5-2-fach erhöhten Risiko assoziiert an einer venösen Thromboembolie zu erkranken (Chinthammitr et al. 2006, Martinelli et al. 2006, Djordjevic et al. 2014). Die heterozygote A19911G Variante ist der homozygoten Variante äquivalent. Die Kombination mit weiteren Thrombophilien erhöht das Thromboembolierisiko zusätzlich.

## Prothrombin

Tom DeLoughery, Professor für Pathologie und Pädiatrie vom Institut für Hämatologie, Onkologie und Labormedizin an der Universitätsklinik Portland in Oregon und Herausgeber und Mitautor des Hämostaseologie-Buches „Hemostasis and Thrombosis“, bezeichnet den aktivierten Gerinnungsfaktor FIIa, auch Thrombin genannt, in seinem Vortrag „TTP and DIC“ als das „master molecule“ der Gerinnungskaskade (DeLoughery 2018, EMCritPodcast-Video). Schon das Thema thrombotisch-thrombogene Purpura (TTP) und disseminierte intravasale Koagulation (DIC) verdeutlicht die immense Bedeutung des Faktor FII-Moleküls für die Entstehung

schwerer Erkrankungen mit hoher Mortalität aus dem hämostaseologischen Formenkreis. Auch Preisner erkennt in seiner Übersicht über die biochemische Struktur und Interaktionen des Moleküls Thrombin als das Schlüsselenzym der Gerinnung an (Preisner 2010). Zu den wichtigen Funktionen des Gerinnungsfaktor FII zählen die Aktivierung von Gerinnungsfaktoren und der Thrombozyten sowie die Stimulation der Fibrinolyse. Eine der Hauptfunktionen ist aber die Spaltung von Fibrinogen (FI) zum wundverschließenden Fasernetz Fibrin. Gleichzeitig aktiviert FIIa auch den Faktor FXIII, der das Fibringerinnsel stabilisiert. Hieraus wird ersichtlich, dass es bei einem erhöhten Prothrombin- bzw. Thrombin-Plasmaspiegel zu einer gesteigerten Gerinnungsaktivierung kommt und das Risiko einer Thromboseentstehung steigt. Ein extremes Beispiel aus der Klinik wäre der Thrombin-Burst bei der DIC, bei dem es durch eine massive Gerinnungsaktivierung u. a. zu einer Thrombosierung der Mikrozirkulation kommen kann.

Table 3: Funktionen des Thrombins (mod. nach Barthels 2013)

- |  |  |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Faktor FXIII-Aktivierung</li> <li>• Abspaltung des Faktor VIII vom von Willebrand-Faktor vWF</li> <li>• Aktivierung der Faktoren FV, FVIII, FXI, FXII und FIX</li> <li>• Thrombozytenaktivierung (via Protease-aktivierter Faktor PAR)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Stimulation Fibroblastenwachstums</li> <li>• Protein C-Aktivierung (via Thrombomodulin)</li> <li>• TAFI (Thrombin-aktivierbarer Fibrinolyse-Inhibitor) -Aktivierung</li> <li>• Prothrombin-Spaltung</li> <li>• Fibrinbildung</li> </ul> |
|--|--|

Prothrombin ist die Vorstufe (Proenzym) von Thrombin und wird synonym als (nicht aktivierter) Faktor FII bezeichnet. Es ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 72000 Dalton (D) und besteht aus 579 Aminosäuren. Syntheseort sind die Leberzellen. Seine Halbwertszeit (HWZ) beträgt in etwa 57 (48 – 123) Stunden. Die Plasmakonzentration liegt bei 1 – 2 µmol /l, die normale Faktoraktivität bei 105 Prozent (%). Prothrombin gehört zum Vitamin K-abhängigen Prothrombinkomplex (PPSB), zu dem neben dem Faktor FII das Prokonvertin (Faktor FVII), der Stuart-Prower-Faktor (FX) und der antihämophile Faktor B (FIX) zählen. Die Serinprotease Thrombin wird unter Freisetzung von Prothrombin-Fragment F 1 + 2 durch den aktivierten Faktor Xa abgespalten. FIIa spaltet wiederum Fibrinogen zu Fibrin. Serinproteasen bilden eine

Enzym-Unterfamilie der Peptidasen und sind somit in der Lage Eiweiße (Peptide) zu spalten (Barthels et al. 2012).

Der Einzelnukleotid-Polymorphismus A19911G im Prothrombin (Faktor FII) -Gen mit der Referenznummer rs3136516 ist, wie oben angeführt, mit erhöhten Prothrombin-Plasmaspiegeln assoziiert, seine Rolle als Risikofaktor hinsichtlich der Entstehung von Thromboembolien respektive Rezidiven ist aber weiterhin unklar (Ceelie et al. 2001, Pérez-Caballos et al. 2002, Martinelli et al. 2006, Chinthammitr et al. 2006, Aradjanski et al. 2014, Soria et al. 2000). Von der geringen Anzahl bisheriger Fall-Kontroll-Studien, die sich mit diesem Polymorphismus und seiner Assoziation zu Thromboembolien beschäftigen, konnten zwei der Untersuchungen ein moderat erhöhtes Risiko für eine TE nachweisen (Martinelli et al. 2006, Chinthammitr et al. 2006), während eine weitere Studie keine statistische Signifikanz zeigen konnte (Aradjanski et al. 2014).

Diese Dissertation sollte die Relevanz des Einzelnukleotid-Polymorphismus A19911G im Prothrombin-Gen (SNP mit der Referenznummer rs3136516) näher eingrenzen. Auf der Basis einer Fall-Kontroll-Studie wurde seine Bedeutung für i) ein Thromboembolie-Risiko respektive ii) die Rezidiv-Gefahr untersucht.

Im Weiteren wurde im Rahmen der Nachbeobachtungsstudie anhand bekannter thromboembolischen Risikofaktoren ein einfacher Score entwickelt, der im klinischen Alltag eine Kategorisierung in Hochrisiko- versus Niedrigrisiko-Patienten erleichtern könnte. Hierdurch wäre der Score als Entscheidungshilfe für oder gegen die Fortsetzung einer Antikoagulanzen-Therapie einsetzbar.

Die Patient\*innen und ihre Kontrollen sind eingebunden in die international angelegten GWAS- und TWAS-Studien (Genomic and transcriptomic association studies), die sich mit dem Zusammenhang zwischen Erbgutanlagen und der Neigung zu venösen Thromboembolien (VTE) beschäftigen. Zuletzt konnten 16 neue genetische Suszeptibilitäts-Loci für venöse Thromboembolien identifiziert werden (vgl. Lindström et al. 2019).

# Material und Methoden

## Ethik

Die zugrunde liegende Multicenter-Fall-Kontroll-Studie wurde durch das medizinische Ethik-Komitee der Universitäten Münster und Kiel [B304/16] in Deutschland bewilligt. Eine schriftliche Einwilligung nach ausführlicher Aufklärung wurde im Vorfeld bei allen Studienteilnehmer\*innen eingeholt.

## Studienpopulation

Für die Fall-Kontroll-Studie, die dieser Arbeit zugrunde liegt, wurden zwischen Dezember 2008 und Dezember 2019 konsekutiv Patient\*innen mit einer symptomatischen venösen Thromboembolie rekrutiert. Die Rekrutierung erfolgte unabhängig davon, ob thrombosefördernde Risikofaktoren vorhanden waren oder nicht. Die Überprüfung hinsichtlich einer Thrombophilie erfolgte bei insgesamt 1020 Patient\*innen (14 bis < 60 Jahre) sowie bei 902 gesunden Blutspender\*innen (18 bis < 60 Jahre). Die Index-Patient\*innen stellten sich erstmalig im Gerinnungszentrum mit der Vorgeschichte einer venösen Thromboembolie vor. Die untere Altersgrenze für eine erste stattgehabte Thromboembolie lag bei 14, die obere bei 60 Jahren (14 bis < 60 Jahre). Die Einzugsregion für die Studienpopulation und ihre Kontrolle war Norddeutschland. Es handelte sich ausschließlich um Individuen kaukasoider Abstammung. Die Bezeichnung Kaukasier/-oide geht auf den deutschen Anatomen und Anthropologen Johann Friedrich Blumenbach zurück (Dissertation „De generis humanis varietate nativa“ 1775), der alle hellhäutigen Menschen als Kaukasier definierte. So ist der Begriff „caucasian“ heute immer noch in den englischsprachigen Ländern gebräuchlich, und hier vor allem in den USA.

## Ein- und Ausschlusskriterien

Entsprechend der folgenden Kriterien wurden die Studienteilnehmer\*innen in die Studie eingeschlossen: *i)* Alter vom 15. bis zum 61. Lebensjahr (14 bis < 60 Jahre) bei erstem Ereignis einer venösen Thromboembolie. *ii)* Nachweis einer mit etablierten bildgebenden Methoden objektiv bestätigten Thrombose und Rezidiv-Thrombose. Als etablierte Nachweismethoden für die VTE galten Duplex- und Dopplersonographie sowie die Computer- und Magnetresonanztomographie. Für die objektive Bestätigung

einer Lungenarterienembolie wurden eine Spiral-CT mit Pulmonalisangiographie oder eine Lungenfunktionsszintigraphie akzeptiert. Patient\*innen wurden von der Studie ausgeschlossen, wenn *i*) eine durch einen Zentralvenenkatheter bzw. Fremdmaterial oder einen Shunt provozierte VTE vorlag, die VTE im Rahmen einer malignen Erkrankung auftrat, ein Antithrombin-, Protein C- oder Protein S-Mangel molekulargenetisch oder ein Antiphospholipid-Syndrom (APS) laborchemisch nachgewiesen wurde oder wenn sie *ii*) – im Sinne eines „Lost to follow-up“ nicht mehr zur Verfügung standen. „Lost to follow-up“ bedeutet, dass die Studienteilnehmer\*innen der Nachbeobachtung nicht mehr zur Verfügung standen. Sei es durch Wohnortwechsel oder Versterben oder dass sie aus anderen Gründen nicht mehr zu den Nachfolgeterminen erschienen.

### Primäres Studienziel

In dieser Arbeit ging es primär um die folgende Frage: Wie hoch ist das individuelle VTE-Risiko von kaukasoïden adulten (und adoleszenten) Patient\*innen, wenn sie eine Anlagevariante für Prothrombin (Faktor FII) A19911G im Referenz-SNP rs3136516 besitzen? Um Störvariablen (Confounder) möglichst auszuschließen, wurde bei dem Vergleich der Thromboembolie- [n = 1012] mit der gesunden Blutspender-Population [n = 902] eine Adjustierung hinsichtlich der Einflussfaktoren *i*) häufige Thrombophilien (Anlagevarianten für Faktor FV Leiden mit der Referenznummer rs6025 und Prothrombin mit der rs1799963), *ii*) Alter bei Erstdiagnose einer VTE und *iii*) Blutgruppe vorgenommen (Rosendaal 1999, Dahlbäck 2000, Martinelli 2001, Anderson et al. 1991, Nowak-Göttl et al. 2017).

### Sekundäres Studienziel

Zweites Untersuchungsobjekt dieser Studie war die Analyse der Zeitdauer zwischen Absetzen der Antikoagulation nach einer ersten venösen Thromboembolie bis zum Auftreten eines Rezidiv-Ereignisses. Auch hier erfolgte eine Adjustierung bezüglich der bereits oben erwähnten Störvariablen.

## Klinischer Ablauf

Bei ihrem ersten Besuch in der Gerinnungsambulanz erschienen die Patient\*innen aufgrund einer symptomatisch gewordenen venösen Thromboembolie. Sie wurden hinsichtlich ihrer Krankheitsgeschichte sowie möglicher Risikofaktoren bzw. Auslösemechanismen, die eine VTE befördern, befragt. Hierzu zählten z. B. die Einnahme oraler Kontrazeptiva, Schwangerschaft, Adipositas, Immobilisation, operative Eingriffe und Nikotinkonsum. Die Datenerfassung beinhaltete außerdem die Familienanamnese im Hinblick auf eine stattgehabte Thromboembolie, Labortestresultate, die bisherige Therapie inklusive der injizierten oder eingenommenen Antikoagulation, deren Dosis und Dauer sowie die Adhärenz an die Medikation. Soweit möglich, erfolgten Nachuntersuchungen zur Verlaufskontrolle in regelmäßigen Zeitabständen. Zu diesen Vorstellungsterminen wurden die Daten jeweils neu evaluiert und es wurde nach neuen thromboembolischen Ereignissen geforscht. Die Patient\*innen wurden, unabhängig der genetischen Vorbelastung, gemäß den aktuellen antithrombotischen Therapie-Richtlinien behandelt (Kearon et al. 2016, Monagle et al. 2012, AWMF S3-Leitlinie Prophylaxe der venösen Thromboembolie 2015).

## Blutprobensammlung

Den Patient\*innen und den Blutspende-Kontrollen wurde im Studienzentrum morgens nach einer 12-stündigen Fastenperiode Blut entnommen und gesammelt. Die Proben wurden durch eine periphere Venenpunktion in Kunststoffspritzen gezogen, die zu einem Zehntel mit 3,8 %-igem Trinatriumcitrat gefüllt waren (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland). Direkt im Anschluss wurden die Proben auf Schmelzeis gelagert. Hiernach wurde plättchenarmes Blutplasma mittels zwanzigminütiger doppelter Zentrifugation bei 3000 g<sup>2</sup> und 4 °C gewonnen. Plasma enthält im Gegensatz zum Blutserum noch alle Gerinnungsfaktoren. Das Blutplasma wurde in Langzeitaufbewahrungsröhrchen aus Polysterene (PS, weitverbreiteter Standard-

---

<sup>2</sup> Der g-Wert (relative Zentrifugalbeschleunigung RCF = Vielfaches des g-Wertes) ist der kennzeichnende Wert für die Zentrifugation. Es handelt sich bei dem g-Wert um die Größe „Kraft pro Masse“, sie hat daher die Dimension einer Beschleunigung und wird als Vielfaches der normalen Erdbeschleunigung  $g = 9,80665 \text{ m/s}^2$  angegeben.

Kunststoff) aliquotiert (d. h. in gleichmäßige Anteile ohne Rest verteilt), bei – 70°C aufbewahrt und unmittelbar vor der Analyse aufgetaut. Die DNA wurde durch die Spinsäulen-Technologie (QUIAGEN, Hilden, Deutschland) extrahiert. Die Blutentnahme erfolgte sechs bis zwölf Monate nach dem akuten thromboembolischen Ereignis und frühestens sechs Wochen nach Beendigung der Antikoagulantien-Therapie.

## Laboranalyse

Mit schriftlicher oder mündlicher (ggf. elterlicher) Zustimmung wurden Mutationen im F2-Gen (rs3136516,) im F5-Gen (rs6025) und im F2-Gen (rs1799963) analysiert. Seit 2011 mussten gemäß dem Gendiagnostikgesetz die Einwilligungen schriftlich erfolgen. Die Plasmaspiegel für Antithrombin und andere Gerinnungsinhibitoren, die D-Dimer-Konzentration, Lupus-Antikoagulantien und Antiphospholipid-Antikörper wurden mit standardisierten Labor-Techniken gemessen (Holzhauer et al. 2012, Nowak-Göttl et al. 2017). Das erste Mal wurde gemessen, wenn die Patientinnen und Patienten im Gerinnungszentrum im Zustand nach einer stattgehabten VTE erschienen. Die Messungen wurden, soweit möglich, während der Routine-Nachfolgeuntersuchungen wiederholt. Insbesondere die Analyse von Protein C und Protein S wurde frühestens drei Monate nach dem Indexereignis bzw. der Beendigung einer Medikation mit einem Vitamin K-Antagonisten durchgeführt. Mangelzustände an Antithrombin, Protein C oder Protein S wurden bestätigt, wenn die Werte wiederholt unterhalb des altersbezogenen Referenzbereiches persistierten (Nowak-Göttl et al. 2017: 67). Kriterium für die hereditäre Natur eines hämostaseologischen Defektes war seine Präsenz bei mindestens einem weiteren erst- oder zweitgradigen Familienangehörigen und/ oder die Identifikation einer kausalen Genmutation.

Die SNP-Genotypisierung für F2 A19911G (LRG\_551t1:c.1726-59G>A, rs3136516) wurde mittels der TaqMan-PCR-Analysemethode realisiert. TaqMan ist eine Art Echtzeit-PCR und verwendet Nukleinsäure-Sonden, die zu einem innerhalb der Ziel-DNA gelegenen Segment komplementär sind. PCR steht für Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion) und ist ein enzymatisches Verfahren zur Vervielfältigung von DNA bzw. bestimmter Gen-Sequenzen innerhalb dieser. Die TaqMan-Genexpressionsassays bestehen aus einem Paar von unmarkierten und hochspezifischen PCR-Primern sowie einer Allele-spezifischen TaqMan-Sonde mit

Farbstoffmarkierung (unverwechselbare Fluoreszenzfarbstoffe) zur Ziel-Detektion (Analysen-Identifikationsnummer: C\_11661574\_10, ThermoFisher Scientific). Die Emission des Fluoreszenzspektrums der einen Sonde überlappt das Anregungsspektrum der anderen, was in einer Auslöschung der ersten Fluoreszenz durch die Zweite resultiert. Für die Analyse wurde das ABI7900HT Fast Echtzeit-PCR-System verwendet. Es gibt über 1,8 Millionen vorgefertigte TaqMan Genexpressionsassays, die in Form von Einzelröhrchen, 96-Well-Platten, 384-Well-Mikrofluidik-Karten und Applied Biosystems Open Arrays erhältlich sind. Nebenbei sei bemerkt, dass der eingesetzte spezifische SNP (rs3136516) keine signifikante Abweichung vom Hardy Weinberg-Äquilibrium in der gesunden Kohorte der Blutspenderinnen und Blutspender zeigte ( $p = 0,55$ ).

### Blutspender-Kontrollkollektiv

Für die Teilnahme zur Blutspende im Rahmen der Fall-Kontroll-Studie konnten insgesamt 1011 europäische (kaukasische) Individuen zwischen 18 und 70 Jahren aus dem schleswig-holsteinischen Einzugsgebiet gewonnen werden. Die Blutspenden erfolgten im Blutspende-Zentrum der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel. Der Abnahme-Zeitraum lag zwischen April 2014 und Juli 2015, die Blutentnahme wurde am Morgen nach einer 12-stündigen Fastenperiode durchgeführt. Entsprechend den Blutspende-Kriterien (Nowak-Göttl et al. 2017: 67) wurden 902 Kontrollpersonen für die Studie akzeptiert. Aufgrund begrenzter Plasmaproben und notwendiger Wiederholungsuntersuchungen standen für einige Parameter für die adjustierte bzw. multivariate Analyse nur 875 von 902 Proband\*innen zur Verfügung. Als Ausschlusskriterium galt eine positive Vorgeschichte hinsichtlich Blutungsneigung, Thrombose oder eine frühe Manifestation (vor dem 56. Lebensjahr) eines Myokardinfarktes oder Schlaganfalls. Im Ergebnis konnten in dieser Population 0,2 % als homozygote und 5,5 % als heterozygote Trägerinnen/ Träger für eine Faktor FV Leiden-Anlagevariante (F5 c.1691G>A; rs6025) identifiziert werden. 2,6 % zeigten die heterozygote Variante 20210G>A (rs1799963) im Prothrombin (Faktor FII) -Gen.



## Antikoagulantien-Therapie

Basierend auf einer innerklinischen standardisierten (Kearon et al. 2016, Monagle et al. 2012) Therapie-Richtlinie (Standard Operating Procedure, SOP) erhielten Patient\*innen mit einer provozierten Beinvenenthrombose eine Antikoagulation über einen Zeitraum von drei bis sechs Monaten, während die Antikoagulation bei einer unprovozierten venösen Thromboembolie und/ oder einer Lungenarterienembolie auf zwölf Monate verlängert wurde. Vor Beendigung der Antikoagulation musste die D-Dimer-Konzentration sich im Referenzbereich unterhalb des altersabhängigen Grenzwertes (Cut off) befinden. Zweites Kriterium vor Beendigung der antithrombotischen Therapie war eine unauffällige echokardiographische Kontrolluntersuchung ohne Zeichen für eine Rechtsherzbelastung bei Patientinnen und Patienten mit einer stattgehabten Lungenarterienembolie.

## Statistik

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der MedCalc-Software bvba (Version 16.4.3, Ostend, Belgium) und StatView 5 software packages (SAS Institute Inc.) realisiert. Die kontinuierlichen Variablen wurden als Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) oder Median (Minimum – Maximum) exprimiert und kategoriale Daten in Zahlen- und Prozentangaben.

## Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test

Der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben (auch U-Test oder Wilcoxon-Rangsummentest genannt) analysierte für die kontinuierlichen Daten die Unterschiede zwischen den nichtsymmetrisch (schief) verteilten Variablen der zwei unabhängigen Gruppen. Das Prinzip eines nichtparametrischen Tests ist die Rangbildung. In die Berechnung der Teststatistiken geht der Rang der Daten in der aufwärts sortierten Stichprobe ein (Bender et al. 2007a).

## Chi-Quadrat-Test

Der Chi-Quadrat-Test differenzierte die Unterschiede zwischen den Gruppen für binäre und kategoriale Daten. Der Chi-Quadrat-Test meint eigentlich eine Reihe von verschiedenen Tests. Diese haben gemeinsam, dass ihre Prüfgröße eine Chi-Quadrat-Verteilung hat. Die  $\chi^2$ -Verteilung wird insbesondere für den Unabhängigkeitstest für Kontingenztafeln verwendet (Methodenberatung Universität Zürich 2020).

## Odds Ratio (OR)

Für das primäre Studienziel wurden die jeweiligen Odds Ratio (OR) und ihr korrespondierendes 95%-Konfidenzintervall (KI) berechnet. Aufgabe der Odds Ratio ist es, einen möglichen Zusammenhang zwischen einer Erkrankung und ihrer Ursache rechnerisch darzustellen. Über die Berechnung im Regressionsmodell ergibt sich dann ein Anhalt, ob und wie stark die Erkrankungshäufigkeit durch einen bestimmten Risikofaktor beeinflusst wird. Eine Chance (engl.: odds) setzt die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines Ereignisses ins Verhältnis zur Wahrscheinlichkeit für das Nichteintreten eines Ereignisses. Eine  $OR > 1$  bedeutet, dass sich das Risiko für das Ereignis erhöht, eine  $OR = 1$ , dass die zu untersuchende Variable (im Beispiel das Absetzen der Antikoagulation) keinen Einfluss hat und eine  $OR < 1$  das Risiko abnimmt. Die OR macht keine Aussagen über einen kausalen Zusammenhang. Für die Beurteilung, ob der beobachtete Effekt statistisch signifikant ist, muss das Konfidenzintervall (KI) betrachtet werden (Bender & Lange 2007a).

## Logistisches Regressionsmodell

Es wurde ein univariates logistisches Regressionsmodell angewandt, welches Patient\*innen mit den gesunden Blutspende-Kontrollen verglich. Der homozygote GG- und der heterozygote AG-Genotyp wurden mit dem AA-Wildtyp der Anlagevariante 19911 im F2-Gen (rs3136516) verglichen. Bei einer abhängigen Outcome-Variablen mit binärem Messniveau ist die Anwendung eines linearen Regressionsmodells nicht sinnvoll. Wenn man anstelle von  $Y$  die Wahrscheinlichkeit für den Eintritt des Zielereignisses  $p = P(Y = 1)$  einsetzt, kann das Risiko  $p$  jede beliebige Zahl zwischen 0 und 1 annehmen und die Chance  $(p/p-1)$  kann jede beliebige positive Zahl

annehmen, ebenso wie der Logarithmus der Chance (genannt „logit“) dann ein Wert aus dem reellen Zahlenbereich sein kann (Bender et al 2007b, Schneider et al. 2010).

### Multivariables Regressionsmodell

Um einen unabhängigen Einfluss auf das VTE-Risiko zu evaluieren und für weitere mögliche Störvariablen (häufige hereditäre Thrombophilie, Alter bei Auftreten der VTE, Blutgruppe) (Rosendaal 1999, Dahlbäck 2000, Martinelli 2001, Anderson et al. 1991, Nowak-Göttl et al. 2017) zu adjustieren, wurde ein multivariables Regressionsmodell mit rückwärtiger Variablenselektion eingesetzt. Bei der Rückwärtsselektion werden die unabhängigen Variablen nach und nach aus dem Modell ausgeschlossen (Bender et al. 2007c).

### Multiplikative Skala

Weiterhin wurde, um auf mögliche statistische Wechselwirkungen zwischen dem F5 (rs6025) - und dem F2 (rs3136516) -Genotyp zu testen, eine multiplikative Skala in das Modell implementiert. Die Verhältnisskala ist eine metrische Skala mit einem absoluten Nullpunkt (z. B. Lebensalter). Die einzigen erlaubten Transformationen bei Verhältnisskalen sind multiplikative Transformationen, damit der Nullpunkt erhalten bleibt.

### Methode nach Kaplan und Meier

Für das sekundäre Studienziel, d. h. die Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs, wurde die Wahrscheinlichkeit für ein VTE-freies Überleben als eine Funktion der Zeit unter Verwendung der Methode nach Kaplan und Meier kalkuliert. Das Kaplan-Meier-Verfahren ist wie die Cox-Regression eine Ereigniszeitanalyse. Anhand der Kaplan-Meier-Kurve lassen sich Überlebensraten bestimmen (Ziegler et al. 2007c).

### Log-rank-Test

Der Log-rank-Test wurde verwendet, um Unterschiede im Rezidiv-freien Überleben zwischen den Gruppen zu testen. Basierend auf früheren Berichten (Douketis et al. 2011, McRae et al. 2006) wurde die Kalkulation der Stichproben-Mindestgröße für den

Vergleich zweier Teilmengen durchgeführt unter der Annahme einer Typ-1-Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 und einer Typ-2-Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,20. Während die Kaplan-Meier-Kurven zum deskriptiv-graphischen Vergleich von Überlebens- oder Ereigniszeiten zweier Gruppen dienen, vergleicht der Log-rank-Test die Ereigniszeiten auf statistischer Ebene und analysiert, ob die Zeiten gleich lang sind. Patienten wurden aus der Überlebenszeitanalyse genommen (zensierte Fälle), wenn entweder ein Versterben aus anderer Ursache als ein VTE-Rezidiv vorlag oder bei einem lost to follow-up unter Verwendung der Daten vom letzten Kontrollbesuch (zensierte Fälle) (Ziegler et al. 2007b, Zwiener et al. 2011).

### Proportionales Hazard-Modell von Cox

Zur Evaluation eines unabhängigen Einflusses auf das Risiko eines VTE-Rezidivs (dichotome Variable „Rezidiv ja“ versus „kein Rezidiv“) und für die Adjustierung weiterer potentieller Confounder (Geschlecht, hereditäre Thrombophilie, Alter beim Erstereignis einer VTE, Blutgruppe) (Rosendaal 1999, Dahlbäck 2000, Martinelli 2001, Brouwer et al. 2009, Anderson et al. 1991) wurde die Hazard Ratio HR zusammen mit dem 95 %-Konfidenzintervall über das proportionale Hazard-Modell von Cox geschätzt. Die Regressionsanalyse von Cox wird eingesetzt, wenn der Einfluss mehrerer Faktoren auf die Outcome-Variable analysiert werden soll. Das Modell soll helfen einzuschätzen, welchen Effekt ein interessierender Parameter auf die Zeit bis zum Eintreten eines bestimmten Ereignisses oder auf die Überlebenszeit hat. Gleichzeitig wird durch das Modell eine Adjustierung für die anderen wesentlichen Effektgrößen vorgenommen. Dabei gibt es keinen festen Beobachtungszeitraum. Daher wird die Hazard-Funktion  $h(t)$  als Hilfsmittel herangezogen. Sie benennt die Wahrscheinlichkeit, dass innerhalb eines definierten Zeitintervalls (Risiko pro Zeiteinheit) das Zielereignis zum Zeitpunkt  $t$  eintritt. Die Hazard Ratio (HR) ist der Quotient aus der Hazard-Funktion zweier Gruppen und stellt somit ein vergleichendes Risikoverhältnis dar. Zentrale Annahme des Cox'schen Modells ist die Proportionalität, d. h., dass dieser Quotient der Hazardfunktionen über die Zeit konstant ist. Dieses lässt sich anhand der Kaplan-Meier-Kurven in etwa abschätzen, indem man schaut, ob sie die beiden Kurven kreuzen oder nicht (Ziegler et al. 2007a).

## Likelihood-Quotienten-Test (LQT)

Um die Verbindung zwischen unabhängigen und abhängigen Variablen abschätzen zu können, wurde der Likelihood-Quotienten-Test (LQT) durchgeführt. Die Likelihood-Ratio soll einschätzen, wie sich das Resultat eines diagnostischen Tests auf die Chance für das Vorliegen einer Krankheit auswirkt. Der positive Likelihood-Quotient ( $LR+ = \text{Sensitivität} / 1 - \text{Spezifität}$ ) gibt an, um wievielfach wahrscheinlicher ein positives Testergebnis bei einem kranken Menschen als bei einem Gesunden ist. Ein  $LR+ > 10$  wird mit gut bewertet. Der negative Likelihood-Quotient ( $LR-$ ) gibt an, wievielfach wahrscheinlicher ein negatives Testergebnis bei einem Kranken ist. Ein  $LR- < 0,1$  gilt als gut (Hilgers et al. 2007, Hedderich & Sachs 2016). Um zu testen, ob die proportionale Hazard-Annahme - eine der Voraussetzungen für die Anwendung des Log-rank-Tests oder die Eignung des Cox-Regressions-Modells – erfüllt ist, wurde die `cox.zph`-Funktion aus dem Paket „survival“ (v3.1.8; Therneau TM, 2019) in R 3.4.3 (R Core Team, 2019) verwendet. Ein p-Wert von  $> 0,05$  indiziert, dass die proportionale Hazard-Annahme nicht verletzt wurde. Die Rezidiv-Raten wurden als Anzahl von Rezidiv-Ereignissen pro 100 Personenjahre berechnet.

## Prädiktiver Wert /negativer Vorhersagewert

Prädiktive Werte - oder auch Vorhersagewerte - geben die Wahrscheinlichkeit an, dass die einem diagnostischen Test und dem Testergebnis folgende Entscheidung, dass eine Krankheit vorliegt oder nicht, richtig ist. Im Gegensatz zu Sensitivität und Spezifität, hängt der Vorhersagewert von der Prävalenz einer Erkrankung in der Bevölkerung ab. Dabei ist die Prävalenz ein epidemiologischer Begriff für die Krankheitshäufigkeit. Diese gibt an, wie viele Menschen zu einem bestimmten Zeitpunkt an einer bestimmten Krankheit leiden. Somit gibt der negative prädiktive Wert (auch: negative Vorhersagewert) an, wie viele Individuen, bei denen ein medizinischer Test negativ ausgefallen ist, auch tatsächlich negativ und damit gesund sind. Der negative prädiktive Wert berechnet sich als  $d / (c + d)$  mit  $d$  = Anzahl der richtig negativ getesteten Personen und  $c + d$  = Anzahl aller negativ getesteten Personen (Hedderich & Sachs 2016).

## Receiver-Operating-Characteristics (ROC-)-Analyse

Für die Erstellung eines Punktwertesystems (Score) zur Diskriminierung in eine Niedrig- und Hochrisikogruppe für VTE-Rezidive wurde die ROC-Kurvenanalytik verwendet. ROC steht für Receiver Operating Characteristics und ist Teil des MedCalc-Programms, einer statistischen Analyse-Software. Die Analytik ermöglicht die Erstellung einer ROC-Kurve und generiert einen kompletten Sensitivitäts- und Spezifitäts-Bericht. Die ROC-Methode vermittelt u. a. eine Aussage über die diagnostische Qualität eines Tests. Auch soll sie helfen, anhand bestimmter Variablen (z. B. Geschlecht, hereditäre Thrombophilie) die Patient\*innen einer bestimmten Gruppe in einem Klassifikationssystem zuzuordnen (z. B. zu einer Niedrig- oder Hochrisikogruppe). Dazu wird in der ROC-Kurve die Sensitivität (wahre Positivrate) als Funktion der Spezifität (wahre Negativrate) für die unterschiedlichen Cut-off-Werte der interessierenden Parameter aufgetragen. Jeder Punkt in der ROC-Kurve repräsentiert ein Sensitivitäts- /Spezifitäts-Paar, korrespondierend zu einer bestimmten Entscheidungsschwelle (Cut-off-Wert). Somit ist die ROC-Kurve ein graphisches Mittel, um die Trennschärfe eines Diagnoseverfahrens darzustellen.

Kommt es zu Überschneidungen der Verteilungen von  $x$  (i. e. Score-Wert als Funktion der interessierenden Variablen) in den beiden Gruppen (z. B. Niedrig-/Hochrisikogruppe, Gesunde /Kranke), so folgen unweigerlich auch Fehleinschätzungen, da eine geringe Trennschärfe im Überlappungsbereich besteht. Dabei entsteht ein Fehler erster oder zweiter Art. Fehler erster Art bedeutet, dass ein negatives Ergebnis vorliegt, obwohl es in Wirklichkeit positiv ist. Z. B. wird ein Patient einer Gruppe 1 mit niedrigem Risiko zugeordnet, obwohl er in Wirklichkeit ein hohes Risiko trägt und der Gruppe 2 zugehört. Das Ergebnis ist falsch negativ. Für eine hohe Sensitivität, d. h. eine hohe Wahrscheinlichkeit, ein Hochrisikoindividuum auch korrekt als solches zu identifizieren, muss ein Fehler erster Art möglichst vermieden werden. Vice versa entspricht eine hohe Spezifität der Vermeidung eines Fehlers zweiter Art (falsch positiv). Um bei dem obigen Beispiel zu bleiben, würde eine hohe Spezifität bedeuten, mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Gesunden korrekt als gesund zu diagnostizieren oder ein Individuum korrekt der Gruppe mit niedrigem Risiko zuzuordnen (und ihm dadurch z. B. das Risiko einer Langzeitantikoagulation zu ersparen). Die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC, Area Under the Curve) ist ein

visuelles und intuitiv leicht erfassbares Maß, wie gut ein bestimmter Parameter zwischen zwei Diagnostik-Gruppen (z. B. LRG /HRG; Gesunde / Kranke) differenzieren kann. Je weiter sich die Kurve von der Winkelhalbierenden entfernt bzw. sich wegbiegt, je größer ist die Trennschärfe (MedCalc Manual, ROC curve analysis 2021; Hedderich & Sachs 2016).

## Score

Der Begriff Score kommt aus dem Englischen und bedeutet Punktzahl oder Trefferstand. Oft wird er auch abgekürzt verwendet als Bezeichnung für das gesamte Punktwertesystem. Dieses Punktwertesystem dient einer Klassifizierung oder Eingruppierung, z. B. in der Medizin der Einteilung eines Krankheitsbildes in verschiedene Schweregrade anhand bestimmter Kriterien. Bekannte Scores in der Intensivmedizin sind z. B. der SOFA (Sepsis-related organ failure assessment) -Score zur Beurteilung eines Organversagens und seine stark verkürzte Variante, der Quick-SOFA, zum einfachen und schnellen Erkennen einer Sepsis.

Bei Erfüllung bestimmter Kriterien oder Merkmale einer Variablen (z. B. Geschlecht: männlich /weiblich, Thrombophilie: nein /ja /mehrere) erfolgt die Vergabe eines Punktwertes und entsprechend der Gesamtpunktzahl die Zuordnung zu einer Gruppe in einem Punktwertesystem. Scores dienen so zur Information und Beratung von Patienten, zur Diagnose- und Prognosestellung sowie zur Therapieplanung und -kontrolle. In der Medizin dominieren gerne Scores zur Prognose (predictive score) und Evaluation (outcome score) (Holle 1995).

Im Rahmen der Nachverfolgungsstudie dieser vorliegenden Arbeit wurde ein Prognose-Score konstruiert, der auf wenigen Variablen und dem dichotomen Kriterium „Rezidiv-Wahrscheinlichkeit: niedrig oder hoch“ beruht. Diesem wiederum folgt die Therapieentscheidung: „Fortsetzung der Antikoagulation: nein oder ja“. Da es sich bei Rezidiv-Ereignissen um zeitlich nachgestellte Ereignisse handelt, ist es erforderlich, die prädiktive Validität des Konstrukts zu messen. Damit soll die Zuverlässigkeit der Wahrscheinlichkeitsaussagen überprüft werden. Wie aber bereits weiter oben

angedeutet, hängt der Vorhersagewert von der Prävalenz einer Erkrankung in der Bevölkerung ab. Somit bezieht sich die Aussagekraft des Scores nur auf die untersuchte Population. Zudem besteht durch die künstliche Einteilung in die Gruppen „niedriges“ und „hohes Rezidivrisiko“ das Problem, dass es Patient\*innen mit sehr ähnlichen Verläufen gibt, sie aber jeweils der anderen Gruppe zugeordnet werden. Hier erlangen die Trennschärfe des Scores und das oben beschriebene statistische ROC-Analyseverfahren an Bedeutung.

Letztlich sollen Punktwertssysteme eine Entscheidungshilfe sein und subjektive Entscheidungen möglichst objektiver gestalten. Um sich dieser Objektivität zu nähern, wird versucht, die Qualität eines Scores mit Hilfe Statistischer Analyseverfahren, wie z. B. dem ROC-Verfahren zu verbessern. Es gibt inzwischen diverse Scores in der Medizin und sie sind immer wieder Kritik ausgesetzt: So wird angemerkt, dass sie Objektivität oft nur vorgaukeln würden und die individuelle Betrachtung des Patienten und seiner Problematik zu kurz kommen würden. Zu berücksichtigen ist, dass den Punktwertesystemen oft sehr komplexe klinische Gegebenheiten zugrunde liegen und die Erstellung eines Score Informationen zwar zum Teil verdichtet, aber durch Beschränkung auf möglichst wenige Variablen auch zu einem erheblichen Informationsverlust führt. Infolgedessen sollte bei der Beurteilung eines Klassifikationssystems immer bedacht werden, welche Informationen bzw. Merkmale (Variablen) in den Score eingegangen sind, ob er reproduzierbar und praktikabel im klinischen Alltag ist, aber auch der zeitliche Bezug der Datenerhebung ist nicht unerheblich. Schließlich beruht die Auswahl der Eingangsvariablen oft einer subjektiven Auswahl auf Expertenebene. In dem Bewusstsein, dass es in der Praxis oft um Entscheidungen zum Wohle eines einzelnen Individuums geht, sollte ein Score nur als ein Baustein in der gesamten Informationsmenge und Entscheidungsfindung gesehen werden. Durch Gütekriterien wie Reliabilität, Validität, Präzision und Unverzerrtheit soll die Qualität dieses Bausteins auf statistischer Ebene verbessert werden (Holle 1995).



# Ergebnisse

## Primäres Studienziel

Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Relevanz des Einzelnukleotid-Polymorphismus A19911G für die Erstmanifestation einer venösen Thrombose. Der SNP befindet sich im Prothrombin (FII)- Gen und besitzt die Referenznummer rs3136516.

1. Auf der Basis einer Fall-Kontroll-Studie sollte die Bedeutung des SNP für ein Thromboembolie-Risiko respektive die Rezidivgefahr für ein thromboembolisches Ereignis untersucht werden.
2. Im Weiteren wurde versucht, unter Einbezug thromboembolischer Risikofaktoren einen Score zu entwickeln, der eine Kategorisierung der Patient\*innen in eine Hochrisiko- (High Risk Group, HRG) oder Niedrigrisiko-Gruppe (Low Risk Group, LRG) erleichtern soll.

Die Ergebnisse dieser Erhebung werden im nachfolgenden Teil dargestellt.

## Deskriptive Analyse des Kollektivs

Wie im folgenden Flow-chart (Abb. 1) dargestellt, wurden Patient\*innen rekrutiert, die im Alter von 14 bis < 60 Jahre eine Thromboembolie erlitten hatten. Der Anteil männlicher Patienten betrug 32 %. Entsprechend der Ausschlusskriterien (Antithrombin-, Protein C- und Protein S-Mangel, persistierendes Antiphospholipid-Syndrom (APS)) verblieb eine Kollektivmenge von N = 1020 und für die interessierenden Variablen letztlich eine Studienpopulation von 1012 Probandi\*nnen.

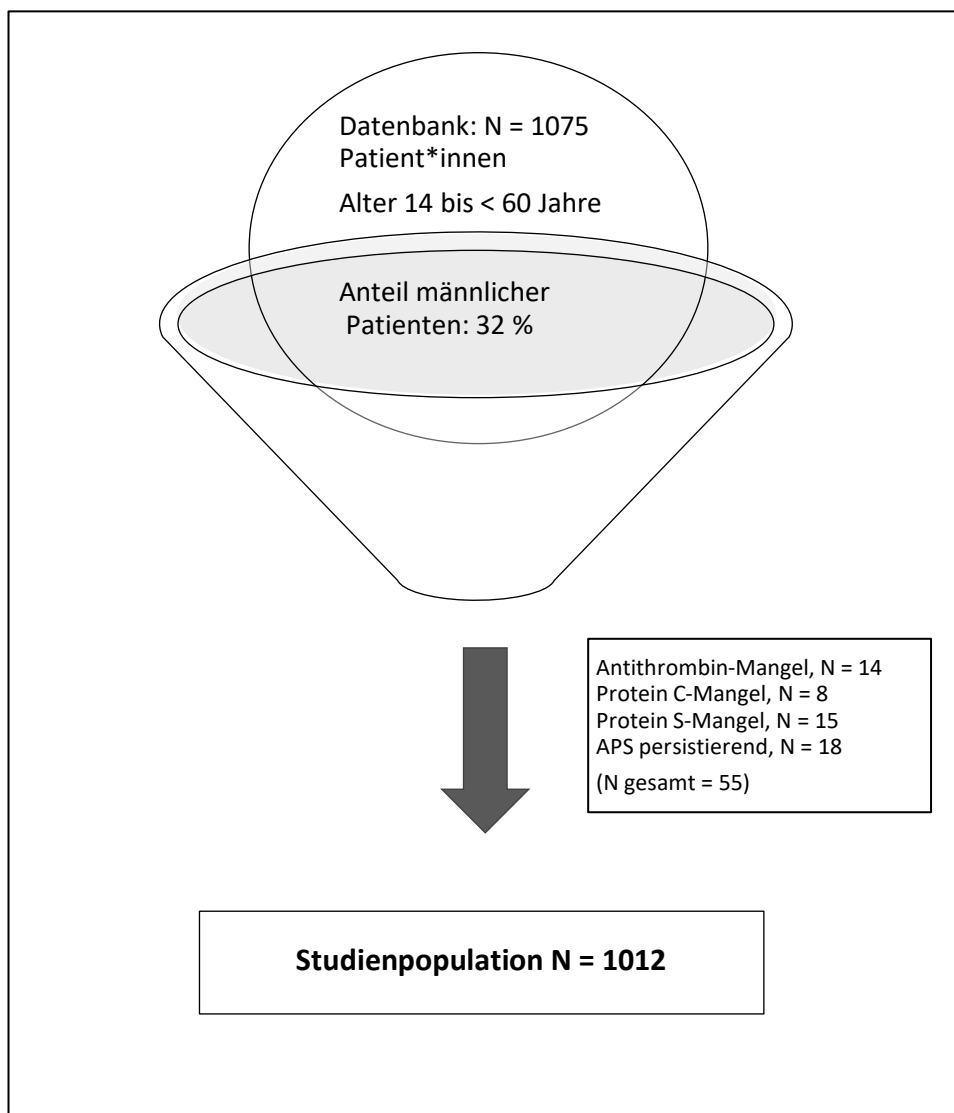


Abbildung 1: Flow Chart Patientenrekrutierung

Tabelle 4: Darstellung der Studienpopulation mit relevanten Daten: Manifestationsort und Risikofaktoren (RF) der VTE

	Patient*innen mit VTE N = 1012	Gesunde Kontrollen N = 902
Alter	36.8 ± 10.9	37.8 ± 14
Weiblich	696 (68.8%)	443 (49.1%)
<b>VTE-Lokalisation</b>		
	N [%]	
VTE Bein	688 [68.0]	–
VTE und LAE	192 [19.0]	–
SVT	61 [ 6.0]	–
Multiple	32 [ 3.1]	–
AVT (ATE)	39 [ 3.9]	–
<b>Provozierte VTE: N [%]</b>		
	857 [84.7]	–
<b>Provozierende Risikofaktoren</b>		
Vorerkrankung*	113*	–
Immobilisation /Operation	293*	–
Body Mass Index > 27	140*	15
Orale Antikonzeption	168*	170
Nikotinkonsum (> 10 Zig. /die)	143*	131
RF nicht näher klassifiziert	228*	–
<b>Rezidiv-VTE Lokalisation</b>		
	N [%]	
VTE Bein	122 [68.5]	–
VTE und LAE	1 [0.6]	–
SVT	4 [ 2.2]	–
LAE	47 [ 26.4]	–
AVT (ATE)	4 [ 2.2]	–

\*Vorerkrankung: Akute Inflammation / Infektion, Autoimmunerkrankung, maligne Neoplasie, Diabetes mellitus

Abkürzungen (Abk.): AIS: Akuter ischämischer Schlaganfall, AVT (ATE): Arterielle Embolie venösen Ursprungs, BVT: Beckenvenenthrombose; LAE: Lungenarterienembolie; OVT: Oberflächliche Venenthrombose; SVT: Sinusthrombose; TVT: Tiefe Venenthrombose, nicht weiter definiert; UVT: Unterschenkel-TVT; ZVT: Zentralvenenthrombose

In der Tabelle 4 sind die Eigenschaften der Studienpopulation und des Kontrollkollektivs dargestellt. Das durchschnittliche Alter unterscheidet sich zwischen den Gruppen nur geringfügig um 1,3 Jahre (Indexpatient\*innen: 35,5 Jahre; Kontrollkollektiv: 36,8 Jahre). Im Patient\*innenkollektiv sind etwa zwei Drittel (70,5%) der erfassten Patient\*innen weiblich, während im Kontrollkollektiv das Verhältnis nahezu ausgeglichen ist und 46 (46,3 %) von 100 Patient\*innen weiblich sind. Darüber hinaus ist der Tabelle die Verteilung der verschiedenen thrombotischen Ereignisse zu entnehmen. Es fällt auf, dass im Patient\*innenkollektiv etwa jede\*r Vierte eine Thrombose im Unterschenkel (25,1%) oder eine Lungenarterienembolie (26,1%) erlitten hatte. Der größte Teil der Ereignisse (31,1%) wird durch nicht genau definierte (d. h. lediglich Angabe des Körperteils ohne nähere Angabe des Gefäßabschnittes) tiefe Venenthrombosen vertreten. Weitere Lokalisationen bewegen sich im einstelligen Prozentbereich.

Insgesamt wurden vier von fünf Thromboembolie-Ereignissen (77,8%) durch einen oder mehrere Faktoren provoziert. Den häufigsten provozierenden Faktor stellt die Immobilisation /Operation mit einem Vorkommen bei nahezu jeder zweiten Thrombose (49,8%) dar. Gefolgt von der Einnahme der Pille bzw. von Hormonen mit 44% und dem Nikotinkonsum mit etwa einem Drittel (29,6%). Weniger häufig wurden Adipositas (20,8%) oder eine Grunderkrankung (10,3%) als auslösende Risikosituationen erfasst. Für den Vergleich wurden im Kontrollkollektiv ebenfalls Risikofaktoren erfasst. Man erkennt, dass die Prävalenz des Nikotinkonsums mit 24,7% niedriger als im Patientenkollektiv (29,6%) ist. Auch die Einnahme der Pille oder von Hormonen (20,1%), ebenso wie das Vorhandensein von Adipositas (14,7%) sind im Kontrollkollektiv seltener.

## Deskriptive Analyse der Thrombophilien

In der folgenden Tabelle 5 ist die Verteilung der untersuchten Parameter dargestellt. Der p-Wert zeigt zu einem Signifikanzniveau von  $\leq 0,05$ , ob ein Unterschied zwischen dem Patienten- und Kontrollkollektiv vorhanden ist. Die Faktor 5-Genvariante findet sich bei einem Viertel der Patient\*innen (25,8%). Dahingegen ist nur jede\*r Zwanzigste (5,26 %) des Kontrollkollektivs Merkmalsträger\*in. Eine Veränderung des Prothrombin-Gens konnte bei etwa sechs von 100 Patient\*innen (6,42 %) nachgewiesen werden, während im Kontrollkollektivs nur 2,63 % Individuen betroffen sind.

*Tabelle 5: Häufigkeitsverteilung von einzeln oder kombiniert vorkommenden hereditären Thrombophilien als Risikofaktor*

<i>Risikofaktor Thrombophilie:</i>	Patient*innen mit VTE N=1012	Gesunde Kontrollen N=902
<i>Einzelner Risikofaktor:</i>	N [%]	N [%]
F2 rs3136516 GG	261/1012 [25.8%]	206/902 [22.8%]
F2 rs3136516 GA	518/10102 [51.3%]	452/902 [50.1%]
F2 rs3136516 AA	231/1012 [22.9%]	244/902 [27.1%]
F2 rs1799963 GA/AA	41/642 [6.4%]	24/902 [2.7%]
F5 rs605 GA/AA	275/1012 [27.3%]	50/902 [5.5%]
<i>Kombinierter Risikofaktor</i>	N [%]	N [%]
F2 rs3136516 GG	261/1012 [25.8%]	206/902 [22.8%]
& F5 rs605 GA/AA	80/1012 [7.9%]	19/902 [2.1%]
F2 rs3136516 GG	261/1012 [25.8%]	206/902 [22.8%]
& rs1799963 GA/AA	–	–
F2 rs3136516 GA	23/642 [3.6%]	11/902 [1.2%]
& F2 rs1799963 GA/AA	–	–

Abk.: F2: Faktor 2; F5: Faktor 5; N: Anzahl; RF: Risikofaktor; VTE: Venöse Thromboembolie

## Univariate und multivariate Analyse

In der univariaten Analyse ist das angenäherte Risiko eine Thrombose zu erleiden für Merkmalsträger\*innen der hetero- oder homozygoten FV-Variante im Vergleich zu gesunden Blutspender\*innen etwa sechsfach erhöht (OR: 6,19; 95% CI: 4,37 – 8,76). Trägerinnen/ Träger der hetero- oder homozygoten Prothrombin-Variante G20210A haben eine univariate Odds Ratio von 2,54 (95% CI: 1,51 – 4,28) eine Thrombose zu erleiden.

*Tabelle 6: Univariate und multivariate Analyse (logistische Regression) mit Darstellung der Odds Ratio, 95 %-Konfidenzintervall (CI)*

Risikofaktor	Odds Ratio (95% CI) Univariable Analyse	Odds Ratio (95% CI) Multivariable Analyse
F2 (rs3136516) AA	1	
F2 (rs3136516) GG	1.39 (1.04-1.73)	1.48 (1.06-2.06)
F2 (rs3136516) GA	1.21 (0.97-1.51)	1.45 (1.10-1.92)
F2 (rs1799963) GG	1	
F2 (rs1799963) GA	2.44 (1.47-4.04)	2.38 (1.35-4.20)
F5 (rs6025) GG	1	
F5 (rs6025) GA	6.35 (4.59-8.77)	5.68 (3.94-8.20)
Blutgruppe 0	1	
Blutgruppe non-0	3.77 (3.04-4.69)	2.74 (2.11-3.55)

Abk.: F2: Faktor 2; F5: Faktor 5

## Validation eines Vorhersage-Modells zur Identifikation eines erhöhten Risikos für ein thromboembolisches Rezidiv

Follow-up-Studie für Rezidiv-Thromboembolie

*Tabelle 7: Inzidenz-Raten der venösen Thromboembolie-Rezidive pro 100 Patientenjahre hinsichtlich des Geschlechts und hereditärer Thrombophilien*

Einflussfaktor	Expositions- Zeit Jahre	Ereignis Anzahl N	Inzidenz /100 PJ % (KI 95%)	p-Wert
männlich	2014	87	4.3 (3.4-5.3)	< 0.0001
weiblich	4690	91	1.9 (1.6-2.4)	
keine IT	2860	67	2.4 (1.9-3.0)	
(irgend)eine IT	3578	111	3.1 (2.6-3.7)	0,089
kombinierte IT	700	34	4.8 (3.4-6.8)	0,0006
Total	6704	178	2.6 (2.3-3.1)	

Abk.: KI: Konfidenzintervall, PJ: Patientenjahre

## Ereigniszeit-Analyse im Hinblick auf das vorliegende Geschlecht

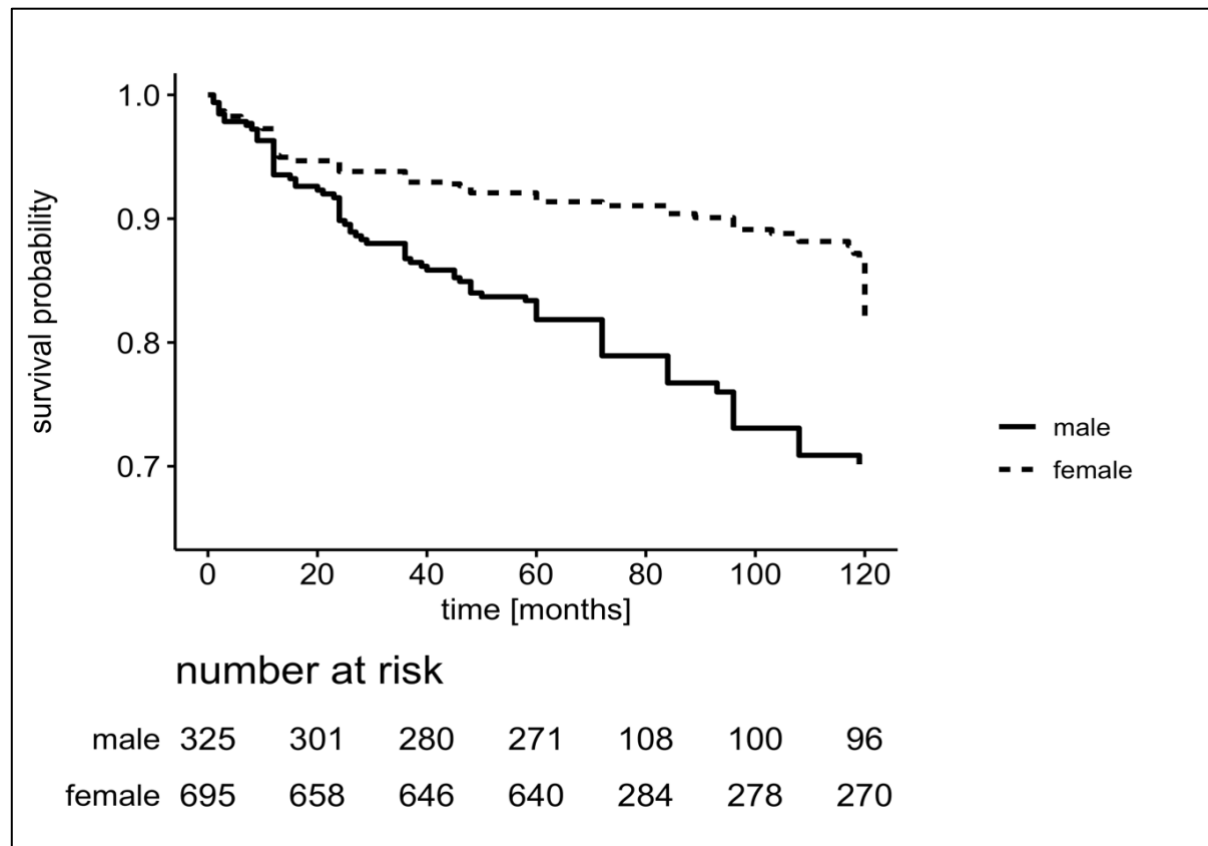


Abbildung 2: Wahrscheinlichkeit der rezidivfreien Zeit im Anschluss an eine erste symptomatische VTE. 13,1 % der Frauen im Vergleich zu 26,5 % der Männer erlitten ein zweites thromboembolisches Ereignis innerhalb von 10 Jahren (Log-rank-Wert:  $p < 0,0001$ ).

Während die Kaplan-Meier-Kurven zum deskriptiv-graphischen Vergleich von Überlebens- oder Ereigniszeiten zweier Gruppen dienen, vergleicht der Log-rank-Test die Ereigniszeiten auf statistischer Ebene und analysiert, ob die Zeiten gleich lang sind. Die univariate Analyse konnte mit einer Hazard Ratio von 2,07 (95 %-Konfidenzintervall: 1,66 – 2,59) für männliche Individuen ein signifikant erhöhtes Risiko für ein weiteres thromboembolisches Ereignis errechnen. Konvention ist, dass die Outcome-Variable auf der y-Achse (Ordinate) und die erklärende Variable X auf der x-Achse (Abszisse) notiert werden. In der oben dargestellten Graphik ist entsprechend auf der y-Achse die Überlebenswahrscheinlichkeit (survival probability) für die Rezidive aufgetragen. Die x-Achse repräsentiert einen Zeitraum über 120 Monate (10 Jahre). Anhand der graphischen Darstellung für das jeweilige Geschlecht kann die Wahrscheinlichkeit abgelesen werden, zu einem bestimmten Zeitpunkt t (time) kein



Rezidiv erlitten zu haben (Intervallabstand 20 Monate). 15 Patient\*innen mussten aus der Analyse ausgeschlossen werden, da für das Rezidiv-Ereignis kein bestimmter Zeitpunkt feststellbar war. Dem Verlauf der Kaplan-Meier-Kurve ist zu entnehmen, dass sich die Überlebenswahrscheinlichkeit für Frauen und Männer in den ersten zehn Monaten ähnelt. Danach scheren die Verläufe auseinander und es ist ersichtlich, dass die männlichen Patienten mit fortschreitender Zeit deutlich häufiger als die Frauen ein Rezidiv erleiden. Nach einem Zeitraum von zehn Jahren beträgt die Wahrscheinlichkeit einer Rezidiv-freien Überlebenszeit für das männliche Geschlecht 63,5 %, für das weibliche hingegen noch 87,7 %. Die mittlere – geschlechtsunabhängige – rezidivfreie Überlebenszeit beträgt 102 Monate (Männer 95 Monate, Frauen 102 Monate).

### Ereigniszeit-Analyse bei Vorhandensein einer oder mehrerer Thrombophilien (Faktor V Leiden 1691 G>A, PT G20210A, PT A19911G)

In der folgenden Graphik der Abbildung 3 ist auf der y-Achse erneut die Überlebens-Wahrscheinlichkeit (survival probability) aufgetragen. Die x-Achse repräsentiert wiederum einen Zeitraum über 120 Monate. Anhand der graphischen Darstellung kann die Wahrscheinlichkeit abgelesen werden, als Individuum zu einem bestimmten Zeitpunkt  $t$  (time) unter der Bedingung „keine“, „irgendeine“ oder „kombinierte Thrombophilien“ kein Rezidiv erlitten zu haben (Unterteilung in sieben Zeitpunkte mit einem Intervallabstand à 20 Monate). 15 Patient\*innen mussten aus der Analyse ausgeschlossen werden, da für das Rezidiv-Ereignis kein bestimmter Zeitpunkt feststellbar war. Gemäß der Kaplan-Meier-Analyse ähneln sich die Kurvenverläufe der Überlebenszeiten für die unterschiedlichen Veranlagungen (keine, irgendeine, kombinierte Thrombophilie) in den ersten zehn Monaten. Nach den ersten 20 Monaten scheren die Verläufe zunächst nur leicht auseinander. Es zeichnet sich aber schon eine Tendenz ab, dass Individuen ohne eine thrombophile Anlagevariante im Vergleich zu Individuen mit einer kombinierten Thrombophilie eine höhere Wahrscheinlichkeit haben, rezidivfrei zu überleben. Nach 5 Jahren (60 Monaten) klappt die Schere plötzlich auf und die Wahrscheinlichkeit, kein Rezidiv zu erleiden, nimmt für die Patient\*innen mit der kombinierten Thrombophilie rapide ab. Die Gruppe mit nur einer Thrombophilie folgt zunächst eher dem Verlauf der Gruppe mit mehreren thrombophilen Varianten,

gleichet sich dann aber nach circa 40 Monaten eher dem Verlauf der Gruppe ohne Anlagevariante an. Mit fortschreitender Zeit (etwa 80 Monate) nimmt auch ihre Wahrscheinlichkeit, Rezidiv-frei zu überleben – im Vergleich zu den Individuen ohne Thrombophilie - deutlich stärker ab. Nach einem Zeitraum von etwa zehn Jahren betrug die Wahrscheinlichkeit einer rezidivfreien Überlebenszeit für Patient\*innen ohne thrombophile Anlagevariante knapp 90 %, die der Individuen mit einer Thrombophilie etwas über 80 % und von den Patient\*innen mit einer kombinierten erbten Thromboseneigung hatten über 30 % ein VTE-Rezidiv erlitten, d. h. die Wahrscheinlichkeit des rezidivfreien Überlebens lag bei unter 70 %.

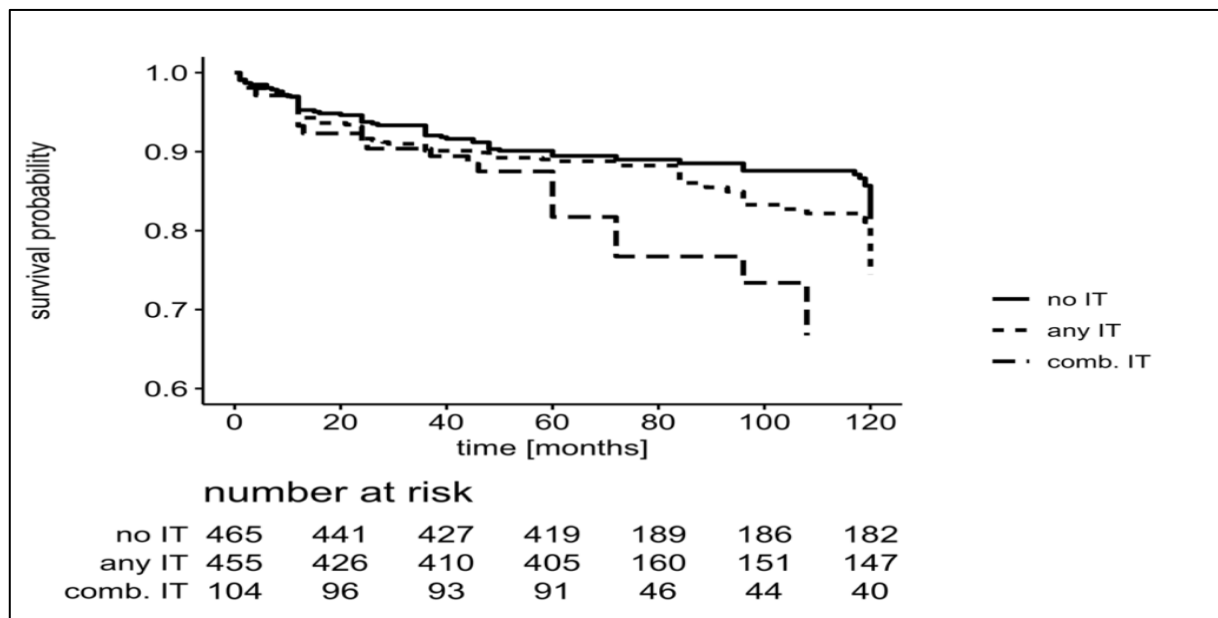


Abbildung. 3: Kaplan-Meier-Verfahren mit Darstellung der Wahrscheinlichkeit des rezidiv-freien Überlebens nach einer ersten symptomatischen VTE: 32,7% der Patient\*innen mit einer kombinierten hereditären Thrombophilie (\*IT: Inherited Thrombophilia) erlitten eine zweite VTE. Dagegen nur 15,6 % der Individuen ohne eine IT (Log-rank-Wert:  $p < 0,0001$ ). Zusätzlich ist das Rezidiv-freie Überleben bei Präsenz nur (irgend-)einer Thrombophilie dargestellt.

## Erstellung eines Risikoprofils (Scoring)

Tabelle 7: Punkte-Vergabesystem im Risikoscore

Punkte-System (Score)	Vergebene Punkte
<b>Geschlecht:</b>	
weiblich	0
männlich	1
<b>Thrombophilie*</b>	
keine	0
eine	1
kombiniert ( $\geq 2$ Thrombophilien)	2
<b>Adjustiert für</b>	
Blutgruppe	
Alter bei Erstereignis VTE	

\* Faktor V Leiden 1691 G>A, Prothrombin 20210 G>A, Prothrombin 19911 A>G unter Ausschluss von Antithrombin-, Protein C- oder Protein S-Mangel und APS.

## Ermittlung des Risiko-Grenzwertes und Randomisierungsergebnis

Der mit Hilfe der ROC-Analyse ermittelte Risiko-Grenzwert (Cut-off) in der Derivations-Kohorte betrug  $> 2$ . Patient\*innen mit einem niedrigen Rezidivrisiko R (LRG) hatten einen Score  $\leq 2$ . Patient\*innen mit einem gesteigerten Thromboembolie-Risiko hatten einen Punktwert  $> 2$  (HRG). Die Rezidivrate in der Niedrig-Risiko-Gruppe lag nach 10 Jahren bei 10 – 11 %, während das Rezidivrisiko in der Kohorte der Hochrisiko-Patienten bei 26 – 30 % lag. Die Sensitivität betrug 51,95 % für die Derivations- und 43,04 % für die Validations-Kohorte. Die Spezifität wurde mit 78,57 % bzw. 78,3 % berechnet.

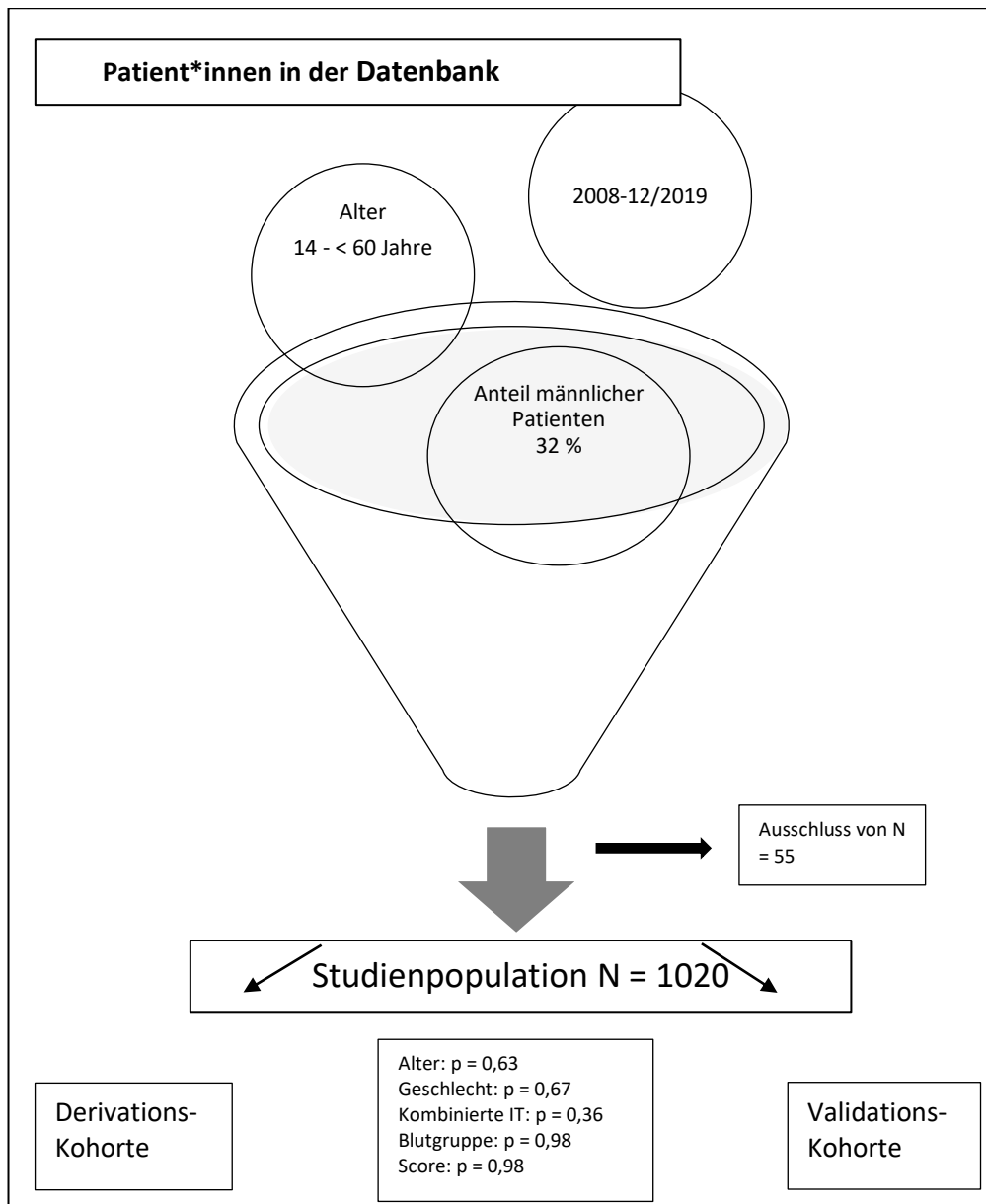


Abbildung 4: Randomisierung der Patient\*innen in eine Derivations- und Validationsgruppe zur Erstellung eines Risikoprofils.

Abbildung 4 zeigt die via Computerprogramm in eine Derivations- und Validationskohorte randomisierten Patient\*innen. Beide Kohorten wiesen hinsichtlich Alter und Geschlechterverteilung keinen Unterschied auf. Auch gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Verteilung thrombophiler Risikofaktoren, der Blutgruppen und des Risiko-Scores. 55 Individuen wurden aufgrund des Nachweises eines Antithrombin-, Protein C- u. Protein S-Mangel oder APS (Antiphospholipid-Syndrom) aus der Studie ausgeschlossen.

## Ergebnisse der Derivations- und Validations-Kohorten im Vergleich

### Einzeldarstellung der Kohorten

*Tabelle 8: Vergleich der Punktwerte im Scoring-System zwischen der Derivations- und Validations-Kohorte*

Scoring-System	Punktzahl	P-Wert	(Derivation, Validation)
<hr/>			
Geschlecht		0,63	
weiblich	0		
männlich	1		
<hr/>			
Thrombophilie*		0,36	
keine	0		
eine	1		
kombiniert	2		
<hr/>			
Adjustierung	NA	0,98	
Blutgruppe			
Alter bei Erstereignis VTE			

\* Faktor 5 1691 G>A, Prothrombin G20210A, Prothrombin A19911G; unter Ausschluss einer Kombination mit einem Antithrombin-, Protein C- oder Protein S-Mangels sowie eines Antiphospholipid-Syndroms (APS)

NA: Number does not apply (Nummer gilt nicht)

In der folgenden Tabelle 9 ist die Verteilung der Rezidiv-Ereignisse - aufgeschlüsselt nach Derivations- und Validierungskohorte - dargestellt. Im Weiteren sind die Resultate der Cox-Regressionsanalyse und dem Vergleich Low Risk Group (LRG) versus High Risk Group (HRG) dargestellt.

*Tabelle 9: Verteilung der Rezidiv-Ereignisse in der Derivations- und Validierungskohorte und Ergebnisse der Cox-Regressionsanalyse (Vergleich LRG versus HRG)*

Ergebnis	Derivations-Kohorte N = 511	Validations-Kohorte N = 509
Rezidiv-Rate (%):		
LRG ( $\leq 2$ ) (%)	11,8	9,8
HRG ( $> 2$ ) (%)	26,0	30,2
P-Wert	= 0,0002	< 0,0001
Spezifität	78,57	78,3
Sensitivität	51,95	43,04
NPV	89	88,4
LRG	1	1
HRG		
HR*	3,7 (1,75 – 7,91)	4,7 (2,24 – 9,81)

\*adjustiert für Blutgruppe und Alter bei Erstereignis

NPV: Negative Predictive Value

## Darstellung des Risiko-Scores in der Gesamtkohorte

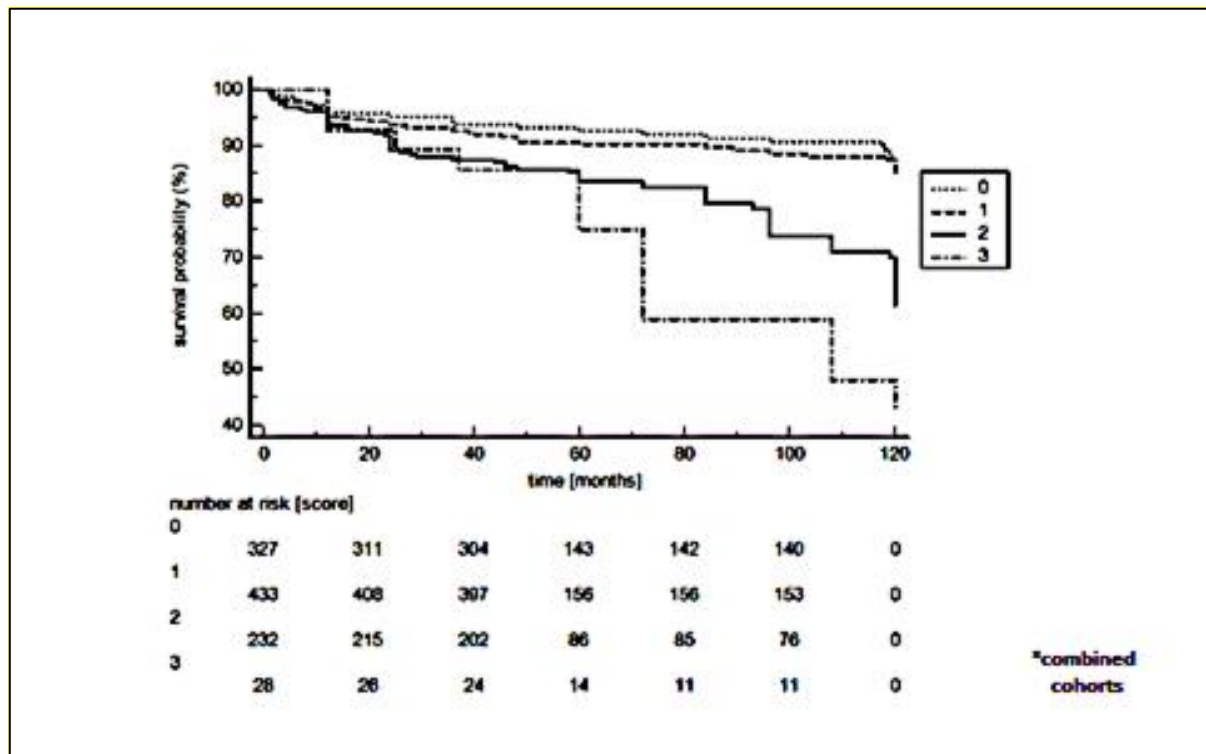


Abbildung 5: Rezidiv-freies Überleben in Bezug auf den jeweils erzielten Risikoscore im Kaplan-Meier-Verfahren.

Die Abbildung 5 zeigt die Ereigniszeit-Analyse für das rezidivfreie Überleben in Bezug auf den jeweils erzielten Risiko-Score (Kaplan-Meier-Verfahren). Auf der y-Achse ist wiederum die Überlebens-Wahrscheinlichkeit (survival probability) in Prozent aufgetragen. Die x-Achse repräsentiert einen Zeitraum über zehn Jahre, unterteilt in sieben Zeitpunkte mit einem Intervallabstand à 20 Monate. Anhand der graphischen Darstellung können die Verläufe der vier Kategorien des Risiko-Scores (0, 1, 2, 3 Punkte) nachverfolgt werden. Die Wahrscheinlichkeit, zu einem bestimmten Zeitpunkt t (time) ein VTE-Rezidiv zu erleiden, nimmt für die beiden Gruppen mit 0 bzw. 1 Risikopunkt nur sehr langsam zu. Die Kategorien mit 2 oder 3 Risikopunkten nehmen zunächst einen ähnlichen Verlauf während der ersten fünf Jahre. Dann reduziert sich die Wahrscheinlichkeit, kein Rezidiv zu erleiden, für die Gruppe mit dem höchsten Risiko-Score (3 Punkte) deutlich und liegt nach zehn Jahren bei etwa 50 %.

Tabelle 10: Ergebnisse der Cox-Regression für die einzelnen Kategorien im Risiko-Score, adjustiert für Alter bei Erstereignis einer VTE und Blutgruppe (BG „0“ versus „non-0“)

Ergebnis-Score*	Hazard Ratio	95 %-Konfidenzintervall
0	1	
1	1,32	0,9 – 1,9
2	3,05	1,98 – 4,70
3	5,18	1,92 – 13,91
Alter bei erster VTE	1,05	1,036 – 1,066
Blutgruppe non-0	0,76	0,45 – 1,26

\* Gesamtkohorte

In der obigen Tabelle 10 wurde die Hazard Ratio HR zusammen mit dem 95 %-Konfidenzintervall über das proportionale Hazard-Modell von Cox für die einzelnen Kategorien im Risiko-Score geschätzt, adjustiert für das Alter zum Zeitpunkt einer erstmaligen VTE und für die Blutgruppe. Aufgeführt sind die vier Kategorien 0 bis 3 des Punktwertesystems, die zugehörige Hazard Ratio und das Konfidenzintervall. Gemäß der ROC-Analyse hatten Patient\*innen mit einem niedrigen Rezidivrisiko (LRG) einen Score  $\leq 2$ . Die Hazard Ratio (HR) als vergleichendes Risikoverhältnis hatte in der Kategorie 0 einen Wert von 1, d. h. es gab keinen Unterschied zu den Kontrollen bezüglich des Rezidivrisikos, wohingegen in den drei Kategorien 1, 2 und 3 die HR über 1 lag. Während sie in der Risikogruppe 1 mit 1,32 (95 %-KI 0,9 – 1,9) noch nahe der Gruppe 0 liegt, findet sich bei einem Score von 2 bereits ein deutlicher Anstieg auf das Dreifache (95 %-KI 1,98 – 4,70) und bei einem Punktwert von 3 ist die Hazard Ratio bereits auf einen Wert von über 5 (95 %-KI 1,92 – 13,91) angestiegen.



## Diskussion

In der hier beschriebene Fall-Kontroll-Studie mit einer kaukasischen Ethnie konnten wir zeigen, dass die Anwesenheit der F2-Anlagevariante an Position rs3136516 in ihren genotypischen Ausprägungen GG und GA - verglichen mit dem AA-Genotyp (Wildtyp) – eine nur mäßige Rolle für die Entstehung venöser Thromboembolien spielt. Allerdings ist das Vorhandensein dieser Variante mit einer adjustierten Odds von 1,48 für den GG- und 1,45 für den GA-Genotyp als unabhängiger Risikofaktor anzusehen.

Dieser berechnete Risikoanstieg steht in Einklang mit Studienergebnissen, die von der italienischen Hämatologin Ida Martinelli und ihren Mitarbeiter\*innen 2006 für eine Patientenkohorte präsentiert wurde (OR 1,5). Gleiches gilt für Daten aus den Niederlanden, die ein 1,3-fach erhöhtes Risiko für eine VTE nachweisen konnten. Wie in unserer eigenen, wurden bei letzteren Kohorten Träger\*innen des GG-Genotypen im F2-SNP (rs3136516) mit AA-Träger\*innen verglichen (Martinelli et al. 2006, Chinthammitr et al. 2006).

Die von uns berichtete Beobachtung, dass die GG- und GA-Varianten im SNP 19911 das venöse Thromboembolie-Risiko erhöhen, steht, ebenso wie die Ergebnisse der italienischen und niederländischen Kohorten aus dem Jahr 2006, in Konkurrenz zu Daten, die von Perez-Ceballos sowie von Aradjanski et al. veröffentlicht wurden (Perez-Ceballos et al. 2002, Aradjanski et al. 2014). Die spanische Gruppe um Perez-Ceballos hatte den Effekt des A19911G-Polymorphismus in Hinblick auf ein erhöhtes arterielles und venöses Thromboserisiko in einer kleinen Studie mit jeweils 204 Patient\*innen und Kontrollen untersucht. Aufgrund ihrer Ergebnisse kamen die Kolleg\*innen zu der Schlussfolgerung, dass der 19911A/G-Genotyp alleine keine signifikante Rolle bei der Entstehung von tiefen Beinvenenthrombose (TVT) spiele. (OR 3-34 versus 5-86). Dieses führte zu der Annahme, dass der Prothrombin 19911-Polymorphismus das TVT-Risiko unter einer G20210A-Variante modulieren könnte. Eine Zusammenfassung gesammelter Daten früherer Veröffentlichungen (Perez-Ceballos et al. 2002, Martinelli et al. 2006, Chinthammitr et al. 2006, Aradjanski et al. 2014), die auch unsere eigenes Patientengut berücksichtigte, ist im Online-Supplement dargestellt: Mit 6150 VTE-Patient\*innen und 6588 Kontroll-Individuen aus

der Bevölkerung konnte ein moderater Risikoanstieg von 1,3 für Träger\*innen des F2 (rs3136516) GG-Genotyps kalkuliert werden.

In der multivariaten Analyse konnte für unsere Kohorte kein signifikanter Einfluss auf das venöse Thromboembolie-Risiko durch eine Kombination aus homozygotem F2-GG-Genotyp (rs3136516) und der F5-Variante (rs6025) gezeigt werden. Diese Beobachtung stand im Gegensatz zu den Ergebnissen der beiden bereits erwähnten Studien von 2006 (Martinelli et al. 2006, Chinthammitr et al. 2006). Kombinationen des GG-Genotypen mit den GA- /AA-Genotypen des F2-SNPs an Position rs1799963 wurden nicht gefunden, was früher veröffentlichte Daten bestätigt. Nebenbefundlich bestätigten Daten der multivariaten Analyse (primäres Studienziel) Ergebnisse anderer Wissenschaftler\*innen, dass die Blutgruppe „non-0“ (id est: A, B, AB) einen unabhängigen Risikofaktor für die erstmalige Entstehung einer VTE darstellt (Franchini et al. 2014).

Des Weiteren wurde der Einfluss von männlichem Geschlechtsmerkmal, Alter bei Auftreten einer ersten VTE und Veranlagung für eine Thrombophilie als sekundäres Studienziel in einem Follow-up untersucht. Während der Nachbeobachtung nach (erstmaliger) Beendigung der therapeutischen Antikoagulation konnten wir einen signifikanten Anstieg von venösen Thromboembolierезидивen bei männlichen Patienten im Vergleich zu weiblichen Patientinnen nachweisen. Dieser Risikoanstieg bei männlichen Individuen mit einer Inzidenzrate pro 100 Patient\*innenjahre von 4,3 verglichen zu 1,9 bei den weiblichen Individuen behielt seine Signifikanz in der multivariaten adjustierten Analyse als ein unabhängiger Risikofaktor für VTE-Rezidive bei. Die Daten unserer eigenen Studie - in der die venösen Thromboembolien bei erstmaligem Ereignis und Auftreten eines Rezidivs in der Mehrheit der Fälle mit provozierenden Risikofaktoren assoziiert waren - stehen in Einklang mit einem höheren Rezidivrisiko bei Männern nach einer VTE ohne Provokationsfaktor (Douketis et al. 2011, McRae et al. 2006, Kearon et al. 2019). Die Metaanalyse von McRae und Kolleg\*innen von 2006 stellte ein erhöhtes Rezidiv-Risiko für Männer heraus (McRae et al. 2006). Im Gegensatz dazu stehen die 2011 veröffentlichten Ergebnisse, die von einer Metaanalyse auf Patientenebene stammen und in denen das Risiko eines VTE-Rezidivs bei Männern mit einem ersten provozierten Gefäßverschluss dem Rezidivrisiko bei Individuen weiblichen Geschlechts ähnlich war (Douketis et al. 2011).

In der hier vorliegenden Studie wurde das zuvor erwähnte erhöhte Rezidivrisiko bei Männern weder durch das Alter bei erstmaligem Auftreten einer VTE noch durch eine nachgewiesene gleichzeitig vorhandene hereditäre Thrombophilie beeinflusst. In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse der Follow-up-Studie verloren das Vorhandensein des Merkmals Blutgruppe „non-0“ (und im Gegenzug die protektive Rolle der Blutgruppe 0) ihre Bedeutung für das erhöhte Rezidivrisiko. Dieses könnte möglicherweise bedingt sein durch die kleine Anzahl der Patient\*innen, die von einem venösen Thromboserezidiv betroffen waren. Jenseits der möglichen Erklärungen für das höhere VTE-Rezidivrisiko bei männlichen Individuen, die in detaillierter Form 2011 von Douketis und Kolleg\*innen diskutiert wurden (Douketis et al. 2011), könnte das männliche Geschlecht per se eine Erklärung sein: Endogene Testosteron-Spiegel liegen bei Männern eindeutig höher als bei Frauen. Erhöhte Testosteronspiegel gehen mit einem hypofibrinolytischen Zustand einher, der möglicherweise das Auftreten einer symptomatischen Thrombose begünstigt. Letzteres wurde nicht nur für endogen erhöhte Testosteronspiegel beschrieben, sondern auch für Patienten, die eine Testosteronsubstitution erhielten (Normann et al. 2009, Freedman et al. 2015).

Da in jüngster Zeit eine groß angelegte internationale Studie mit Kindern und Adoleszenten, die einen thromboembolischen vaskulären Schlaganfall erlitten hatten, publiziert wurde (DeVeber et al. 2019), sei an dieser Stelle noch einmal hervorgehoben, dass in der Erwachsenen-Kohorte mit stattgehabter VTE die Anwesenheit von mehr als einer hereditären Thrombophilie ebenfalls ein wichtiger Risikofaktor für ein Rezidiv ist. Träger\*innen der F5-Mutation (bzw. -Anlagevariante) zeigten ein weiteren Risikoanstieg mit einer OR von 3,34, wenn sie zusätzlich die F2-GG /GA-Variante (rs3136516) trugen, verglichen mit einer OR von 1,86 bei Träger\*innen einer alleinigen F5 Leiden-Variante.

Diese Studie weist einige potentielle Limitationen auf: Abgesehen von einem i) Selektions-Bias, z. B. durch das Alter bei Eintreten einer venösen Thromboembolie, dem Ausschluss von Individuen mit einer ZVK- oder tumorassoziierten VTE sowie der Ausschluss von Patient\*innen mit einem persistierenden Antiphospholipid-Syndrom oder einem angeborenen schweren Mangel an Protein C oder S, wird die Aussagekraft

dieser vorliegenden Studie eingeschränkt durch den Einschluss einer ii) jungen Population rein hellhäutiger Ethnizität. Somit können die hier präsentierten Ergebnisse nicht 1: 1 auf Patient\*innen anderer Altersklassen übertragen werden. Ebenso können die Ergebnisse nicht auf VTE -Patient\*innen mit einer der Grunderkrankungen, die in unserer Untersuchung ausgeschlossen wurden (z. B. eine maligne Erkrankung) übertragen werden. Auch ist es nicht möglich, die Schlussfolgerungen dieser Studie auf andere ethnische Populationen nichtkaukasischer Herkunft zu transferieren.

iii) Die für diese Studie kontinuierlich seit 2008 untersuchten und gesicherten Patient\*innen wurden in einer kritischen Zeitspanne zugewiesen, in der es zu einem maßgeblichen Fortschritt innerhalb der bildgebenden Techniken und der klinischen Praxis kam (Kearon et al. 2019, Monagle et al. 2012). Insbesondere die Einführung und Implementierung neuer therapeutischer Ansätze, wie beispielsweise der Beginn der DOAK-Area, könnte möglicherweise die Zuweisungs- und Therapiepraktiken beeinflusst haben.

iv) Obwohl wir eine große Anzahl Patient\*innen mit einem milden Risikofaktor durch eine der häufigen hereditären Thrombophilien beobachten konnten, könnte diese Studie immer noch zu klein angelegt sein, um eine statistische Signifikanz nachzuweisen: Auch wenn unsere Ergebnisse im Rahmen der Fall-Kontroll-Studie im Einklang stehen mit früher veröffentlichten populationsbasierten Studien (Martinelli et al. 2006, Chinthamittr et al. 2006), bedarf es in der Zukunft doch einer Rekrutierung von weit mehr Patient\*innen, um einen statistischen Irrtum auszuschließen.

iv) Schließlich – mit Blick auf die gewonnenen Daten, die wir aus dem Follow-up gewonnen haben – könnte es sein, dass Rezidiv-Thrombosen bei untersuchten Patient\*innen übersehen wurden. Nun scheint das Übersehen einer symptomatischen - im Gegensatz zu einem asymptomatischen VTE - eher unwahrscheinlich, wenn auch nicht gänzlich ausgeschlossen. Die von uns detektierten Thromboserezidiv-Raten bewegen sich in einem Rahmen, wie er auch von anderen wissenschaftlichen Arbeiten berichtet wird (Vossen et al. 2005, Heit 2012). Subjektiv bestand eher der Eindruck, dass diejenigen Thrombosen, die im ambulanten Bereich übersehen wurden, durch die Fokussierung auf die Materie in der Gerinnungsambulanz noch herausgefiltert werden konnten.

Es gibt weitere Diskussionspunkte, die u.a. durch die Stellungnahmen in der AWMF S3-Leitlinie zur Prophylaxe der venösen Thromboembolie (2015) aufgeworfen werden. Sei es hinsichtlich der Frage, inwieweit Nikotinkonsum als relevantes Risiko für die venöse Thromboseentstehung gewertet werden kann. Oder dass die Leitlinie den Einfluss des Geschlechts nicht als Variable für eine Risikoerhöhung betrachtet (vgl. AWMF 2015). Auch bewertet die Leitlinie die Immobilität als mittleres Risiko für eine VTE, während in unserer Datensammlung diese mit einem Vorkommen bei nahezu jeder zweiten Thrombose (49,8%) den häufigsten provozierenden Faktor für die VTE darstellt. Gefolgt von der Einnahme der Pille bzw. von Hormonen mit 44% und dem Nikotinkonsum mit etwa einem Drittel (29,6%).

Im Standardwerk „Hämostaseologie“ der Herausgeber Pötzsch und Madlener weisen Kyrle und Eichinger in ihrer Einleitung zur Pathogenese und den Risikofaktoren der venösen Thrombose (Kapitel 31, 2. Auflage 2010) noch einmal darauf hin, dass die Entstehung der venösen Thromboembolie multikausaler Natur sei und die Interaktion zu einem additiven oder auch multiplikativen Anstieg des Thromboserisikos führe. Dabei sei der bedeutendste erworbene Risikofaktor das höhere Lebensalter. Auch stellen sie noch einmal- unter Bezugnahme auf die Studie von Kyrle (Kyrle et al. 2004) -das deutlich erhöhte Rezidivrisiko bei Männern hin.

Ein weiterer interessanterer Aspekt ist, dass die Leitlinie einer tiefen Beinvenenthrombose oder Lungenarterienembolie per se ein hohes Risikopotential für ein folgendes (Rezidiv-) Ereignis beimitst (S3-Leitlinie Prophylaxe der venösen Thromboembolie, AWMF 2015, Tab. VII). An der Fülle der Einflussfaktoren, wie sie auch in der Leitlinie in den Tabellen aufgeführt werden - so z. B. die Unterscheidung in dispositionelle und expositionelle Risiken, Art und Größe der Operation oder die Lokalisation der Thrombose – lässt sich bereits die Komplexität der VTE-Entstehung erkennen. Aktuell wird die Leitlinie von 2015 überarbeitet und man darf gespannt sein auf eventuelle Neuerungen.

Trotz alledem hat unser Team im Rahmen unserer Follow up-Studie den Versuch unternommen, ein einfaches Punktwertesystem zu erstellen, welches in der klinischen Praxis eine Hilfestellung bei der Therapieentscheidung für oder gegen eine Rezidivprophylaxe mit einem Antikoagulans geben könnte. So, wie bei der Risiko–Nutzen-Abwägung im Rahmen des Vorhofflimmerns über den HAS-BLED- und CHA2DS2-VASc-Score mit einer überschaubaren Anzahl von Parametern das Schlaganfallrisiko gegen das Blutungsrisiko abgewogen werden kann, haben wir mit den markanten Merkmalen Geschlecht (männlich /weiblich) und hereditäre Thrombophilie (nein /ja /kombiniert) einen einfachen Score erstellt, der helfen könnte, Patient\*innen keinem unnötigen Blutungsrisiko auszusetzen. Der mit Hilfe der ROC-Analyse ermittelte Risiko-Grenzwert (Cut-off) identifizierte Patient\*innen mit einem niedrigen Rezidivrisiko R (LRG) und einem Score  $\leq 2$ . Patient\*innen mit einem gesteigerten Thromboembolie-Risiko hatten einen Punktwert  $> 2$  (HRG). Bei einer Spezifität von circa 78 % wäre der, von uns erarbeitete einfache Score somit ein Baustein bei der individuellen Risiko-Nutzen-Abwägung. Patient\*innen der Niedrig-Risiko-Gruppe könnte so ggf. das Blutungsrisiko durch eine Antikoagulation erspart bleiben. Dieses wäre z. B. von Bedeutung bei Menschen, die einer erhöhten Verletzungsgefahr (z. B. berufsbedingt, durch Unfall oder Gleichgewichtsstörungen mit Sturzgefahr) ausgesetzt sind.

Zuletzt hatten 2019 Khan und Mitarbeiter\*innen vom Ottawa Blood Disease Center in Kanada in Zusammenarbeit mit einem internationalen Team eine systematische Übersicht und Metaanalyse zur Vorhersage eines Thromboembolierrezidivs nach Absetzen der Antikoagulation entwickelt (Khan et al. 2019). Dabei hatten sie sich nach

eigenen Angaben auf Patient\*innen mit nicht primär onkologischen Erkrankungen und unprovozierte Thrombosen beschränkt. Insgesamt wurden laut ihrer Aussage 18 Studien (14 randomisierte kontrollierte Studien und 4 prospektive Beobachtungsstudien) mit insgesamt 7515 Patient\*innen mit einer ersten unprovozierten VTE in die Metaanalyse aufgenommen. Bei näherer Betrachtung der Angaben zur Studienselektion bis März 2019 fällt allerdings auf, dass die Wissenschaftler\*innen „...enrolled patients with a first episode of objectively confirmed symptomatic VTE that was either unprovoked or associated with minor transient risk factors...“ (Khan et al. 2019). Im Weiteren geben sie an, dass 15 (das entspricht 6462 Patient\*innen) der 18 Studien den Kriterien der ISTH für eine unprovozierte VTE oder VTE mit einem geringeren vorübergehenden Risiko gerecht wurden. Sie verweisen dabei auf die Definition der International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH)-Leitlinie und führen deren Kriterien noch einmal in ihrer Tabelle 1 auf. Aus dieser geht hervor, dass eine VTE die Definition unprovoziert erfüllt, wenn „persistent“, „major transient“ und „minor transient“ Risikofaktoren nicht vorhanden sind. Unter der von Khan et al. in die Metaanalyse eingeschlossenen Rubrik der geringeren vorübergehenden („minor transient“) Risikofaktoren werden dann folgende Situationen aufgeführt: Operationen unter einer Allgemeinanästhesie von weniger als 30 Minuten, stationäre Krankenhausaufenthalte von weniger als drei Tagen bei akuter Erkrankung, eine Östrogentherapie, Schwangerschaft oder Wochenbett, Bettlägerigkeit außerhalb des Krankenhauses von mindestens drei Tagen unter einer akuten Erkrankung und eine Verletzung der unteren Extremität, die mit einer reduzierten Mobilität für mindestens drei Tage einhergeht. Konsequenterweise muss man also schlussfolgern, dass es sich bei den betrachteten Studien von Khan und Kolleg\*innen um einen Mix aus provozierten und unprovozierten venösen Thromboembolien handelt.

Nichtsdestoweniger sind die Ergebnisse der Metaanalyse von Kahn et al. interessant. Es der Versuch unternommen, das venöse Thromboserezidivrisiko nach Absetzen der Antikoagulation einzuschätzen. Dabei wurde die Rate an Rezidiven und die kumulative Inzidenz über einen Zeitraum bis zu 10 Jahren betrachtet. Unter der Voraussetzung, dass die Antikoagulation vor Absetzen für mindestens drei Monate durchgeführt worden war, fanden die Kolleg\*innen heraus, dass das Langzeitrisiko, ein venöses Thrombosereisiko zu erleiden, beachtlich war. Ihren Angaben zufolge betrug das Rezidivrisiko im ersten Jahr nach Beendigung der Antikoagulation 10,3 %,

mit einer kumulativen Inzidenz von 16 % nach 2 Jahren, 25 % nach 5 Jahren und 36 % nach 10 Jahren. Sie kamen zu der Schlussfolgerung, dass durch ihre Ergebnisse mehr Sicherheit für das Vorgehen bei der Risiko-Nutzenabwägung von Blutungs- und Thromboemboliegefahr entstehen könnte und dass sich bei einer Letalitätsrate von rund 4 % und einem Rezidivrisiko von 36 % für ein VTE-Rezidiv innerhalb von 10 Jahren nach Beendigung einer Antikoagulation für die Patient\*innen mit fortgesetzter VTE-Therapie ein kleiner Überlebensvorteil herauskristallisierte. Das Team um Khan betonte, dass es bei der Entscheidungsfindung wichtig sei, das Geschlecht der von der Thromboembolie Betroffenen zu berücksichtigen. Vor allem die männlichen Patienten könnten von einer fortgesetzten Therapie profitieren, da sie einem höheren Rezidivrisiko im Vergleich zu den weiblichen Patientinnen ausgesetzt seien (kumulatives Risiko über 10 Jahre nach Absetzen der Therapie: 41 % bei Männern versus 29 % bei Frauen).

Eine weitere Arbeit, die sich mit der Risikostratifizierung von unprovokierten venösen Thromboembolien beschäftigt, ist die 2014 veröffentlichte französische Studie um das Team von Cohen (Cohen et al. 2014: 138-46). Dabei hatten die Mitarbeiter\*innen ein Vorhersagemodell mit einem 5-Variablen-Score zur Einschätzung des venösen Thromboserisikos bei Familien mit einer bekannten hereditären Thrombophilie auf der Basis der MARFAST-Kohorte entwickelt. Aus initial 16 klinischen und physiologischen Risikofaktoren extrahierten sie einen Score mit 5 Variablen. Diese waren der Familiengeschichte-Punktwert, das Alter, der von Willebrand-Faktor-Plasmaspiegel, die Schwere der Thrombophilie und FG (rs2066865, erhöhte Fibrinogenspiegel im Plasma).

Die Mitarbeiter\*innen von der französischen Universität Marseilles haben ihre Untersuchungen fortgesetzt. 2018 konnten Suchon et al. Ergebnisse präsentieren, die sich mit dem Einfluss von häufigen Risikofaktoren auf das VTE-Risiko bei Familien mit hereditärer Thrombophilie und mindestens einem Indexpatienten in der Familie beschäftigten. Ausgangspunkt ihrer Arbeit war die Feststellung, dass sich trotz gleicher hereditärer Gerinnungsstörung innerhalb einer Familie die klinische VTE-Ausprägung doch sehr heterogen zeigte. Es wurde versucht, näher abzugrenzen, inwieweit diese Heterogenität des VTE-Risikos durch alltägliche Umgebungseinflüsse und genetische Risikofaktoren beeinflusst wird. Hierfür rekrutierten die



Wissenschaftler\*innen von 1986 bis 2013 insgesamt 2214 Familienmitglieder aus 651 Familien mit einer bekannten vererbten Thrombophilie (Antithrombin-, Protein C- und S-Mangel). Entsprechend der Schwere der Erkrankung unterteilten sie in die drei Gruppen: kein familiärer Defekt, milde Thrombophilie und schwere Thrombophilie. Zusätzlich betrachteten sie allgemeine genetische Faktoren wie das ABO-Blutgruppensystem und 11 Polymorphismen, die in der Allgemeinbevölkerung in Zusammenhang mit der Entstehung einer VTE stehen. Weiterhin wurden Body Mass Index und Nikotinkonsum als Parameter hinzugezogen. Suchon und Mitarbeiter\*innen identifizierten fünf allgemeine Risikofaktoren, die mit einer VTE in ihrer Kohorte assoziiert waren: Adipositas, Nikotinkonsum, das ABO-Blutgruppensystem sowie die Polymorphismen F11 rs2036914 und FGG rs2066865. Diese Parameter wurden in ein Score mit drei Risikoklassen implementiert. Dieser zeigte eine hohe Effizienz bei der Identifizierung des VTE-Risikos bei Vorhandensein einer milden Thrombophilie. Interessanterweise hatten die Individuen mit einem niedrigen Wert im Punktwertesystem das gleiche Risiko wie Individuen ohne einen familiären Defekt. Hingegen hatten die Familienmitglieder mit einem hohen Score das gleiche Risiko wie Individuen mit einer schweren Thrombophilie. Es wurde ein Gesamt-Score aus oben aufgeführten fünf Parametern und dem Thrombophilie-Status entwickelt. Die VTE-Inzidenz lag bei 1,74, 3,64 und 6,40 pro 1000 Personenjahre entsprechen den Kriterien „keine“, „milde“ beziehungsweise „schwere Thrombophilie“. Über die ROC-Kurve konnte bei einem Wert von 0,702 VTE- und Nicht-VTE-Risiko-Familienangehörige diskriminiert werden (Suchon et al. 2018).

## Zusammenfassung

Somit lässt sich in der Zusammenfassung der hier vorliegenden Arbeit Folgendes formulieren: Im Rahmen einer Fall-Kontrollstudie untersuchten wir kaukasische Individuen ab dem Jugendlichen- bzw. jungen Erwachsenenalter bis zum 60. Lebensjahr mit einer erstmalig in Erscheinung getretenen venösen Thromboembolie. Diese Patient\*innen und ihre Kontrollen wurden eingebunden in die international

angelegten GWAS- und TWAS-Studien (Genomic an transcriptomic association studies), die sich mit dem Zusammenhang zwischen Erbgutanlagen und VTE-Neigung beschäftigen und zuletzt 16 neue genetische Suszeptibilitäts-Loci für venöse Thromboembolien identifizieren konnten (Lindström et al. 2019).

Im Ergebnis trugen die F2 (rs3136516) -GG- /GA-Genotypen als unabhängiger milder hereditärer Thrombophilie-Risikofaktor zum erstmaligen Auftreten einer VTE bei. Daten der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie konnten Evidenz geben, dass für Patient\*innen mit Vorhandensein eines Provokationsfaktors bei erstmaligem Auftreten einer VTE die Faktoren i) männliches Geschlecht, ii) kombinierte hereditäre Thrombophilien – inklusive der F2-Variante an Position rs3136516 – und iii) älteres Lebensalter bei erstmaligem Ereignis einer VTE eine wichtige Risiko-Konstellation für das erneute Auftreten einer VTE darstellen. Dieses sollte bei der Entscheidungsfindung mit Hinblick auf eine Antikoagulanzen-Therapie Berücksichtigung finden. Ob iv) die Blutgruppe „Non-0“ in ein Vorhersage-Scoring-System integriert werden sollte, ist Teil einer laufenden prospektiven Studie.

Auf Basis der sich anschließenden Follow-up-Studien und unter Einbeziehung weniger entscheidender Variablen, die ein VTE-Rezidiv begünstigen, entwickelten wir einen, im klinischen Alltag einfach zu handhabenden Score. Dieser könnte als Hilfsmittel bei der Entscheidung für oder gegen die Fortsetzung einer Antikoagulanzen-Therapie dienen und Patient\*innen mit niedrigem Risiko für ein venöses Thromboembolie-Rezidiv vor einem therapeutisch bedingten Blutungsrisiko bewahren.

## Literaturangaben

1. AGENO, W., DENTALI, F., DONADINI, M. P. & SQUIZZATO, A. 2013. Optimal treatment duration of venous thrombosis. *J Thromb Haemost*, 11 Suppl 1, 151-60.
2. ANDERSON, F. A., JR., WHEELER, H. B., GOLDBERG, R. J., HOSMER, D. W., PATWARDHAN, N. A., JOVANOVIĆ, B., FORCIER, A. & DALEN, J. E. 1991. A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. The Worcester DVT Study. *Arch Intern Med*, 151, 933-8.
3. ARADJANSKI, M., DJORDJEVIĆ, V., PRUNER, I., TOMIĆ, B., GVOZDENOV, M., KOVAC, M. & RADOJKOVIĆ, D. 2014. The 3' end prothrombin gene variants in serbian patients with idiopathic thrombophilia. *Balkan J Med Genet*, 17, 43-8.
4. AWMF ARBEITSGEM. DER WISS. MEDIZIN. FACHGESELLSCHAFTEN E.V., S3-Leitlinie Prophylaxe der venösen Thromboembolie (VTE), 2015. Bedeutung von Risikofaktoren. Registernummer 003 – 001, <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/003-001.html>, 1-238 [Zugriff 15.03.2020].
5. BARTHEL, M. 2012. Grundlagen der Hämostase, Plasmatische Gerinnung: Funktionen des Thrombins. In: Barthels, M. (Hrsg.) *Das Gerinnungskompodium*, 2. Auflage, Thieme, Stuttgart, 50.
6. BARTHEL, M., BERGMANN, F., CZWALINNA A. 2012. Einzelfaktoren und Inhibitoren der plasmatischen Gerinnung: Faktor II (Prothrombin) und Prothrombingenvariante. In: Barthels, M. (Hrsg.) *Das Gerinnungskompodium*, 2. Auflage, Thieme, Stuttgart, 438-41.
7. BAUDOY, D., MOCERI, P., CHICHE, O., BOUVIER, P., SCHOUVER, E. D., CERBONI, P., GIBELIN, P. & FERRARI, E. 2015. B blood group: A strong risk factor for venous thromboembolism recurrence. *Thromb Res*, 136, 107-11.
8. BENDER, R. & LANGE, S. 2007. [What is the p-value?]. *Dtsch Med Wochenschr*, 132 Suppl 1, e15-6.
9. BERTINA, R. M., KOELEMAN, B. P., KOSTER, T., ROSENDAAL, F. R., DIRVEN, R. J., DE RONDE, H., VAN DER VELDEN, P. A. & REITSMA, P. H.

1994. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*, 369, 64-7.

10. BIONDI, A., VALSECCHI, M. G., SERIU, T., D'ANIELLO, E., WILLEMSE, M. J., FASCHING, K., PANNUNZIO, A., GADNER, H., SCHRAPPE, M., KAMPS, W. A., BARTRAM, C. R., VAN DONGEN, J. J. & PANZER-GRUMAYER, E. R. 2000. Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group. *Leukemia*, 14, 1939-43.
11. BROUWER, J. L., LIJFERING, W. M., TEN KATE, M. K., KLUIN-NELEMANS, H. C., VEEGER, N. J. & VAN DER MEER, J. 2009. High long-term absolute risk of recurrent venous thromboembolism in patients with hereditary deficiencies of protein S, protein C or antithrombin. *Thromb Haemost*, 101, 93-9.
12. CASTOLDI, E., SIMIONI, P., TORMENE, D., THOMASSEN, M. C., SPIEZIA, L., GAVASSO, S. & ROSING, J. 2007. Differential effects of high prothrombin levels on thrombin generation depending on the cause of the hyperprothrombinemia. *J Thromb Haemost*, 5, 971-9.
13. CEELIE, H., BERTINA, R. M., VAN HYLCKAMA VLIEG, A., ROSENDAAL, F. R. & VOS, H. L. 2001. Polymorphisms in the prothrombin gene and their association with plasma prothrombin levels. *Thromb Haemost*, 85, 1066-70.
14. CHINTHAMMITR, Y., VOS, H. L., ROSENDAAL, F. R. & DOGGEN, C. J. 2006. The association of prothrombin A19911G polymorphism with plasma prothrombin activity and venous thrombosis: results of the MEGA study, a large population-based case-control study. *J Thromb Haemost*, 4, 2587-92.
15. COHEN, W., CASTELLI, C., ALESSI, M. C., AILLAUD, M. F., BOUVET, S., SAUT, N., BRUNET, D., BARTHET, M. C., TREGOUET, D. A., LAVIGNE, G. & MORANGE, P. E. 2012. ABO blood group and von Willebrand factor levels partially explained the incomplete penetrance of congenital thrombophilia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32, 2021-8.
16. COHEN, W., CASTELLI, C., SUCHON, P., BOUVET, S., AILLAUD, M. F., BRUNET, D., BARTHET, M. C., ALESSI, M. C., TREGOUET, D. A. & MORANGE, P. E. 2014. Risk assessment of venous thrombosis in families with known hereditary thrombophilia: the MARseilles-Nimes prediction model. *J Thromb Haemost*, 12, 138-46.
17. CUSHMAN, M., TSAI, A. W., WHITE, R. H., HECKBERT, S. R., ROSAMOND, W. D., ENRIGHT, P. & FOLSOM, A. R. 2004. Deep vein thrombosis and

pulmonary embolism in two cohorts: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *Am J Med*, 117, 19-25.

18. DAHLBACK, B. 2000. Blood coagulation. *Lancet*, 355, 1627-32.
19. DELOUGHERY, T., 2018. TTP and DIC, Part 1 Diagnosis. *EMCritPodcast, Video*, 223, <https://podcast/emcrit-podcast-critical-care-and-resuscitation/id314020330?i=1000422674031> [Zugriff 10.03.2020]
20. DEVEBER, G., KIRKHAM, F., SHANNON, K., BRANDAO, L., STRATER, R., KENET, G., CLAUSNIZER, H., MOHARIR, M., KAUSCH, M., ASKALAN, R., MACGREGOR, D., STOLL, M., TORGE, A., DLAMINI, N., GANESAN, V., PRENGLER, M., SINGH, J. & NOWAK-GOETTL, U. 2019. Recurrent stroke: the role of thrombophilia in a large international pediatric stroke population. *Haematologica*, 104, 2116.
21. DJORDJEVIC, V., PRUNER, I., TOMIC, B., NESTOROVIC, A., GVOZDENOV, M., KOVAC, M. & RADOJKOVIC, D. 2014. The 3'end prothrombin gene variants in patients with different thrombotic events. *Lab Med*, 45, 309-14.
22. DOUKETIS, J., TOSETTO, A., MARCUCCI, M., BAGLIN, T., COSMI, B., CUSHMAN, M., KYRLE, P., POLI, D., TAIT, R. C. & IORIO, A. 2011. Risk of recurrence after venous thromboembolism in men and women: patient level meta-analysis. *BMJ*, 342, d813.
23. DU PREL, J. B., ROHRIG, B., HOMMEL, G. & BLETTNER, M. 2010. Choosing statistical tests: part 12 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int*, 107, 343-8.
24. DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR KARDIOLOGIE – HERZ-UND KREISLAUFFORSCHUNG E.V. 2015 ESC Pocket Guidelines. Management der akuten Lungenembolie, Version 2014. Börm Bruckmeier Verlag GmbH, Grünwald, Kurzfassung der "ESC Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism", *Eur. Heart J.* 2014, 35, 5.
25. EICHINGER, S. & KYRLE, P. A. 2004. Prevention of deep vein thrombosis in orthopedic surgery. *Eur J Med Res*, 9, 112-8.
26. FESTA, A., D'AGOSTINO, R., JR., HOWARD, G., MYKKANEN, L., TRACY, R. P. & HAFFNER, S. M. 2000. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation*, 102, 42-7.

27. FRANCHINI, M. & MANNUCCI, P. M. 2014. ABO blood group and thrombotic vascular disease. *Thromb Haemost*, 112, 1103-9.
28. FREEDMAN, J., GLUECK, C. J., PRINCE, M., RIAZ, R. & WANG, P. 2015. Testosterone, thrombophilia, thrombosis. *Transl Res*, 165, 537-48
29. GESUNDHEITSBERICHTERSTATTUNG DES BUNDES 2017. Sterbefälle, Sterbeziffern (je 100.000 Einwohner, altersstandardisiert) (ab 1998). Gliederungsmerkmale: Jahre, Region: Deutschland, Alter: Alle Altersgruppen, Geschlecht: Insgesamt, Nationalität: Alle Nationalitäten, Art der Standardisierung: Standardbevölkerung "Deutschland 2011", <http://www.gbe-bund.de/> [Zugriff: 10.03.2020]
30. HANLEY, A. J., KARTER, A. J., FESTA, A., D'AGOSTINO, R., JR., WAGENKNECHT, L. E., SAVAGE, P., TRACY, R. P., SAAD, M. F., HAFFNER, S. & INSULIN RESISTANCE ATHEROSCLEROSIS, S. 2002. Factor analysis of metabolic syndrome using directly measured insulin sensitivity: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes*, 51, 2642-7.
31. HEDDERICH, J. & SACHS, L. 2016. *Angewandte Statistik: Methodensammlung mit R (German Edition) (S.iv)*. Springer Berlin Heidelberg. Kindle-Version.
32. HEIT, J. A. 2012. Predicting the risk of venous thromboembolism recurrence. *Am J Hematol*, 87 Suppl 1, S63-7.
33. HILGERS, R., BAUER, P., SCHEIBER, V., (2007 87-90). Einführung in die Medizinische Statistik. doi10.1007/978-3-540-33944-1, 87-90.
34. HOKE, M., KYRLE, P. A., PHILIPP, K., PABINGER, I., KAIDER, A., SCHONAUER, V., QUEHENBERGER, P. & EICHINGER, S. 2004. Prospective evaluation of coagulation activation in pregnant women receiving low-molecular weight heparin. *Thromb Haemost*, 91, 935-40.
35. HOLLE, R. 1995. *Methoden zur Konstruktion und Evaluierung klinischer Scores*, Habilitationsschrift, Nr. 27, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Institut für Medizinische Biometrie und Informatik, open access.
36. HOLZHAUER, S., GOLDENBERG, N. A., JUNKER, R., HELLER, C., STOLL, M., MANNER, D., MESTERS, R., KRUMPEL, A., STACH, M. & NOWAK-GOTTL, U. 2012. Inherited thrombophilia in children with venous thromboembolism and the familial risk of thromboembolism: an observational study. *Blood*, 120, 1510-5.

37. KEARON, C., AKL, E. A., ORNELAS, J., BLAIVAS, A., JIMENEZ, D., BOUNAMEAUX, H., HUISMAN, M., KING, C. S., MORRIS, T. A., SOOD, N., STEVENS, S. M., VINTCH, J. R. E., WELLS, P., WOLLER, S. C. & MOORES, L. 2016. Antithrombotic Therapy for VTE Disease: CHEST Guideline and Expert Panel Report. *Chest*, 149, 315-352.
38. KEARON, C., PARPIA, S., SPENCER, F. A., SCHULMAN, S., STEVENS, S. M., SHAH, V., BAUER, K. A., DOUKETIS, J. D., LENTZ, S. R., KESSLER, C. M., CONNORS, J. M., GINSBERG, J. S., SPADAFORA, L. & JULIAN, J. A. 2019. Long-term risk of recurrence in patients with a first unprovoked venous thromboembolism managed according to d-dimer results; A cohort study. *J Thromb Haemost*, 17, 1144-1152
39. KHAN, F., RAHMAN, A., CARRIER, M., KEARON, C., WEITZ, J. I., SCHULMAN, S., COUTURAUD, F., EICHINGER, S., KYRLE, P. A., BECATTINI, C., AGNELLI, G., BRIGHTON, T. A., LENSING, A. W. A., PRINS, M. H., SABRI, E., HUTTON, B., PINEDE, L., CUSHMAN, M., PALARETI, G., WELLS, G. A., PRANDONI, P., BULLER, H. R., RODGER, M. A. & COLLABORATORS, M. 2019. Long term risk of symptomatic recurrent venous thromboembolism after discontinuation of anticoagulant treatment for first unprovoked venous thromboembolism event: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 366, l4363.
40. KONSTANTINIDES, S. V., MEYER, G., BECATTINI, C., BUENO, H., GEERSING, G. J., HARJOLA, V. P., HUISMAN, M. V., HUMBERT, M., JENNINGS, C. S., JIMENEZ, D., KUCHER, N., LANG, I. M., LANKEIT, M., LORUSSO, R., MAZZOLAI, L., MENEVEAU, N., AINLE, F. N., PRANDONI, P., PRUSZCZYK, P., RIGHINI, M., TORBICKI, A., VAN BELLE, E., ZAMORANO, J. L., THE TASK FORCE FOR THE, D. & MANAGEMENT OF ACUTE PULMONARY EMBOLISM OF THE EUROPEAN SOCIETY OF, C. 2019. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism developed in collaboration with the European Respiratory Society (ERS): The Task Force for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Respir J*, 54, 1901647.
41. KOSTER, T., ROSENDAAL, F. R., DE RONDE, H., BRIET, E., VANDENBROUCKE, J. P. & BERTINA, R. M. 1993. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet*, 342, 1503-6.
42. KWIECIEN, R., KOPP-SCHNEIDER, A. & BLETTNER, M. 2011. Concordance analysis: part 16 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int*, 108, 515-21.

43. KYRLE, P. A., MINAR, E., BIALONCZYK, C., HIRSCHL, M., WELTERMANN, A. & EICHINGER, S. 2004. The risk of recurrent venous thromboembolism in men and women. *N Engl J Med*, 350, 2558-63.
44. KYRLE P. A., EICHINGER 2010. Pathogenese und Risikofaktoren der venösen Thrombose. In: Pötzsch B., Madlener, K. (Hrsg.), *Hämostaseologie. Grundlagen, Diagnostik und Therapie*, 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 393.
45. LANGE, S. & BENDER, R. 2007. [Quantiles, cumulative distribution function, and box-plot]. *Dtsch Med Wochenschr*, 132 Suppl 1, e3-4.
46. LINDBLAD, B., SVENSSON, P. J. & DAHLBACK, B. 1994. Arterial and venous thromboembolism with fatal outcome and resistance to activated protein C. *Lancet*, 343, 917.
47. LINDSTROM, S., WANG, L., SMITH, E. N., GORDON, W., VAN HYLCKAMA Vlieg, A., DE ANDRADE, M., BRODY, J. A., PATTEE, J. W., HAESSLER, J., BRUMPTON, B. M., CHASMAN, D. I., SUCHON, P., CHEN, M. H., TURMAN, C., GERMAIN, M., WIGGINS, K. L., MACDONALD, J., BRAEKKAN, S. K., ARMASU, S. M., PANKRATZ, N., JACKSON, R. D., NIELSEN, J. B., GIULIANINI, F., PUURUNEN, M. K., IBRAHIM, M., HECKBERT, S. R., DAMRAUER, S. M., NATARAJAN, P., KLARIN, D., MILLION VETERAN, P., DE VRIES, P. S., SABATER-LLEAL, M., HUFFMAN, J. E., GROUP, C. H. W., BAMMLER, T. K., FRAZER, K. A., MCCAULEY, B. M., TAYLOR, K., PANKOW, J. S., REINER, A. P., GABRIELSEN, M. E., DELEUZE, J. F., O'DONNELL, C. J., KIM, J., MCKNIGHT, B., KRAFT, P., HANSEN, J. B., ROSENDAAL, F. R., HEIT, J. A., PSATY, B. M., TANG, W., KOOPERBERG, C., HVEEM, K., RIDKER, P. M., MORANGE, P. E., JOHNSON, A. D., KABRHEL, C., TREGOUET, D. A. & SMITH, N. L. 2019. Genomic and transcriptomic association studies identify 16 novel susceptibility loci for venous thromboembolism. *Blood*, 134, 1645-1657.
48. LOUNES, K. C., SORIA, C., MIRSHAHI, S. S., DESVIGNES, P., MIRSHAHI, M., BERTRAND, O., BONNET, P., KOOPMAN, J. & SORIA, J. 2000. Fibrinogen A $\alpha$ : a homozygous case of dysfibrinogenemia (gamma-Asp(330)-->Val) characterized by a defective fibrin polymerization site "a". *Blood*, 96, 3473-9.
49. LUXEMBOURG, B. & LINDHOFF-LAST, E. 2007. [Genomic diagnosis of thrombophilia in women: clinical relevance]. *Hamostaseologie*, 27, 22-31.
50. MARTINELLI, I. 2001. Risk factors in venous thromboembolism. *Thromb Haemost*, 86, 395-403.



51. MARTINELLI, I., BATTAGLIOLI, T., TOSETTO, A., LEGNANI, C., SOTTILE, L., GHIOTTO, R. & MANNUCCI, P. M. 2006. Prothrombin A19911G polymorphism and the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost*, 4, 2582-6.
52. MCRAE, S., TRAN, H., SCHULMAN, S., GINSBERG, J. & KEARON, C. 2006. Effect of patient's sex on risk of recurrent venous thromboembolism: a meta-analysis. *Lancet*, 368, 371-8.
53. MEIJER, K. & SCHULMAN, S. 2009. The absence of 'minor' risk factors for recurrent venous thromboembolism: a systematic review of negative predictive values and negative likelihood ratios. *J Thromb Haemost*, 7, 1619-28.
54. MONAGLE, P., CHAN, A. K. C., GOLDENBERG, N. A., ICHORD, R. N., JOURNEYCAKE, J. M., NOWAK-GOETTL, U. & VESELY, S. K. 2012. Antithrombotic therapy in neonates and children: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*, 141, e737S-e801S
55. MUELLER-BERGHAUS, G. 2010. Das Konzept „Hämostaseologie“ – Geschichte und Entwicklung. In: Pötzsch, B., Madlener, K. (Hrsg.), *Hämostaseologie. Grundlagen, Diagnostik und Therapie*, 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1–3.
56. NICOLAES, G. A. & DAHLBACK, B. 2002. Factor V and thrombotic disease: description of a janus-faced protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 530-8.
57. NORMANN, S., DE VEBER, G., FOBKER, M., LANGER, C., KENET, G., BERNARD, T. J., FIEDLER, B., STRATER, R., GOLDENBERG, N. A. & NOWAK-GOTTTL, U. 2009. Role of endogenous testosterone concentration in pediatric stroke. *Ann Neurol*, 66, 754-8.
58. NOWAK-GOETTL, U., LIMPERGER, V., KENET, G., DEGENHARDT, F., ARLT, R., DOMSCHIKOWSKI, J., CLAUSNIZER, H., LIEBSCH, J., JUNKER, R. & STEPPAT, D. 2017. Developmental hemostasis: A lifespan from neonates and pregnancy to the young and elderly adult in a European white population. *Blood Cells Mol Dis*, 67, 2-13.
59. PEREZ-CEBALLOS, E., CORRAL, J., ALBERCA, I., VAYA, A., LLAMAS, P., MONTES, R., GONZALEZ-CONEJERO, R. & VICENTE, V. 2002. Prothrombin A19911G and G20210A polymorphisms' role in thrombosis. *Br J Haematol*, 118, 610-4.
60. POORT, S. R., ROSENDAAL, F. R., REITSMA, P. H. & BERTINA, R. M. 1996. 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*, 88, 3698-703.

61. PREISNER, K. T. 2010. Vitamin K-abhängige Gerinnungsfaktoren. In: Pötzsch, B., Madlener, K. (Hrsg.), *Hämostaseologie. Grundlagen, Diagnostik und Therapie*, 2. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg, 393.
62. RESSING, M., BLETTNER, M. & KLUG, S. J. 2010. Data analysis of epidemiological studies: part 11 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int*, 107, 187-92.
63. ROHRIG, B., DU PREL, J. B., WACHTLIN, D., KWIECIEN, R. & BLETTNER, M. 2010. Sample size calculation in clinical trials: part 13 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int*, 107, 552-6.
64. ROSENDAAL, F. R. 1999. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet*, 353, 1167-73.
65. ROSENKRANZ, S., DILLER, G. P., DUMITRESCU, D., EWERT, R., GHOFRANI, H. A., GRUNIG, E., HALANK, M., HELD, M., KAEMMERER, H., KLOSE, H., KOVACS, G., KONSTANTINIDES, S., LANG, I. M., LANGE, T. J., LEUCHTE, H., MAYER, E., OLSCHIEWSKI, A., OLSCHIEWSKI, H., OLSSON, K. M., OPITZ, C., SCHERMULY, R. T., SEEGER, W., WILKENS, H. & HOEPER, M. M. 2019. [Hemodynamic Definition of Pulmonary Hypertension: Commentary on the Proposed Change by the 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension]. *Dtsch Med Wochenschr*, 144, 1367-1372.
66. SCHAAF, C. & ZSCHOCKE, J., 2018. MUTATIONEN UND GENETISCHE VARIABILITÄT. IN: BASISWISSEN HUMANGENETIK; 3. ÜBERARBEITETE UND ERWEITERTE AUFL. SPRINGER-LEHRBUCH. SPRINGER-VERLAG GMBH;
67. SCHNEIDER, A., HOMMEL, G. & BLETTNER, M. 2010. Lineare Regressionsanalyse. *Dtsch Arztebl International*, 107, 776-782.
68. SHERRY, S. T., WARD, M. H., KHOLODOV, M., BAKER, J., PHAN, L., SMIGIELSKI, E. M. & SIROTKIN, K. 2001. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*, 29, 308-11.
69. SORIA, J. M., ALMASY, L., SOUTO, J. C., TIRADO, I., BORELL, M., MATEO, J., SLIFER, S., STONE, W., BLANGERO, J. & FONTCUBERTA, J. 2000. Linkage analysis demonstrates that the prothrombin G20210A mutation jointly influences plasma prothrombin levels and risk of thrombosis. *Blood*, 95, 2780-5.

70. SUCHON, P., RESSEGUIER, N., IBRAHIM, M., ROBIN, A., VENTON, G., BARTHET, M. C., BRUNET, D., SAUT, N., ALESSI, M. C., TRÉGOUËT, D. A., & MORANGE, P. E. 2019. Common Risk Factors Add to Inherited Thrombophilia to Predict Venous Thromboembolism Risk in Families. *TH open: companion journal to thrombosis and haemostasis*, 3(1), e28–e35.
71. SUNDQUIST, K., SUNDQUIST, J., SVENSSON, P. J., ZOLLER, B. & MEMON, A. A. 2015. Role of family history of venous thromboembolism and thrombophilia as predictors of recurrence: a prospective follow-up study. *J Thromb Haemost*, 13, 2180-6.
72. UNIVERSITÄT ZÜRICH, Methodenberatung 2020, Varianzen - Chi2-Test, online- Zugriff.
73. VASAN, S. K., ROSTGAARD, K., MAJEED, A., ULLUM, H., TITLESTAD, K. E., PEDERSEN, O. B., ERIKSTRUP, C., NIELSEN, K. R., MELBYE, M., NYREN, O., HJALGRIM, H. & EDGREN, G. 2016. ABO Blood Group and Risk of Thromboembolic and Arterial Disease: A Study of 1.5 Million Blood Donors. *Circulation*, 133, 1449-57; discussion 1457.
74. VIRCHOW, R. 1846. IV. Thrombose und Embolie. Gefässentzündung und septische Infection: I. Über die Verstopfung der Lungenarterie. In: Virchow, R., *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin*, Meidinger, Frankfurt a. M., Elektronische Reproduktion, 2009, urn:nbn:de:bvb:12-bsb10086613-0, München, Bayerische Staatsbibliothek, 2009, BSB-ID: 8215377, OCLC-Nr.: 260046615, 219–26.
75. VOSSSEN, C. Y., WALKER, I. D., SVENSSON, P., SOUTO, J. C., SCHARRER, I., PRESTON, F. E., PALARETI, G., PABINGER, I., VAN DER MEER, F. J., MAKRIS, M., FONTCUBERTA, J., CONARD, J. & ROSENDAAL, F. R. 2005. Recurrence rate after a first venous thrombosis in patients with familial thrombophilia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 1992-7.
76. WILKENS, H. & HELD, M. 2016. Predictors of long-term survival in pulmonary hypertension. *Lancet Respir Med*, 4, 338-9.
77. WILLING, M., SOWERS, M., ARON, D., CLARK, M. K., BURNS, T., BUNTEN, C., CRUTCHFIELD, M., D'AGOSTINO, D. & JANNAUSCH, M. 1998. Bone mineral density and its change in white women: estrogen and vitamin D receptor genotypes and their interaction. *J Bone Miner Res*, 13, 695-705.
78. WU, O., ROBERTSON, L., TWADDLE, S., LOWE, G. D., CLARK, P., GREAVES, M., WALKER, I. D., LANGHORNE, P., BRENKEL, I., REGAN, L. & GREER, I. 2006. Screening for thrombophilia in high-risk situations: systematic

review and cost-effectiveness analysis. The Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) study. *Health Technol Assess*, 10, 1-110.

79. ZIVELIN, A., ROSENBERG, N., FAIER, S., KORNBROT, N., PERETZ, H., MANNHALTER, C., HORELLOU, M. H. & SELIGSOHN, U. 1998. A single genetic origin for the common prothrombotic G20210A polymorphism in the prothrombin gene. *Blood*, 92, 1119-24.

80. ZWIENER, I., BLETTNER, M. & HOMMEL, G. 2011. Survival analysis: part 15 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int*, 108, 163-9

## Anhang

### Fördermittel /Ausschluss Interessenskonflikt

Die Studie wurde unterstützt durch Fördermittel des Fördervereins “Schlaganfall und Thrombosen im Kindesalter e.V.” und des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF: CRA01-09) der Universität Münster. Keine der genannten Institutionen hatte einen Einfluss auf das Studiendesign, die Durchführung, Interpretation oder die Berichterstattung. Es besteht kein Interessenskonflikt und die an der Studie beteiligten Wissenschaftler\*innen haben keine finanziellen Interessen respektive finanziellen Vorteil.

## Role of prothrombin 19911 A>G polymorphism, blood group and male gender in patients with venous thromboembolism: Results of a German cohort study

Verena Limperger<sup>1</sup> · Gili Kenet<sup>2,3</sup> · Bettina Kiesau<sup>1</sup> · Max Köther<sup>1</sup> · Malin Schmeiser<sup>1</sup> · Florian Langer<sup>4</sup> · David Juhl<sup>5</sup> · Maria Shneyder<sup>1</sup> · Andre Franke<sup>6</sup> · Ulrich K. Klostermeier<sup>1</sup> · Rolf Mesters<sup>7</sup> · Frank Rühle<sup>8</sup> · Monika Stoll<sup>8,9</sup> · Dagmar Steppat<sup>5</sup> · Dorothee Kowalski<sup>1</sup> · Angela Rocke<sup>1</sup> · Piotr Kuta<sup>1</sup> · Tido Bajorat<sup>1</sup> · Antje Torge<sup>1</sup> · Bruno Neuner<sup>10</sup> · Ralf Junker<sup>1</sup> · Ulrike Nowak-Göttl<sup>1</sup>

© The Author(s) 2020

### Abstract

The role of the A>G polymorphism at position 19911 in the prothrombin gene (factor [F] 2 at rs3136516) as a risk factor for venous thromboembolism [VTE] is still unclear. To evaluate the presence of the F2 polymorphism in VTE patients compared to healthy blood donors and to adjust the results for common inherited thrombophilias [IT], age at onset and blood group [BG], and to calculate the risk of VTE recurrence. We investigated 1012 Caucasian patients with a diagnosis of VTE for the presence of the F2 rs3136516 polymorphism and compared these with 902 healthy blood donors. Odds ratios [OR] together with their 95% confidence intervals were calculated adjusted for F5 at rs6025, F2 at rs1799963, blood group, age and gender. In addition, we evaluated the risk of recurrent VTE during patient follow-up calculating hazard ratios [HR] together with their 95% CI. Compared with the AA wildtype, the F2 GG and AG genotypes (rs3136516) were associated with VTE (OR 1.48 and 1.45). The OR in F5 carriers compared to controls was 5.68 and 2.38 in patients with F2 (rs1799963). BG “non-O” was significantly more often diagnosed in patients compared to BG “O” (OR 2.74). VTE recurrence more often occurred in males (HR 2.3) and in carriers with combined thrombophilia (HR 2.11). Noteworthy, the rs3136516 polymorphism alone was not associated significantly with recurrence. In Caucasian patients with VTE the F2 GG/GA genotypes (rs3136516) were moderate risk factors for VTE. Recurrence was associated with male gender and combined thrombophilia.

**Keywords** Prothrombin 19911 A>G polymorphism · Thrombosis · Recurrence · Male gender

1. Institute of Clinical Chemistry, Univ. Hospital Kiel & Lübeck, Germany
2. National Hemophilia Center, Institute of Thrombosis and Hemostasis, Sheba Medical Centre, Tel-Hashomer, Israel
3. The Amalia Biron Research Institute of Thrombosis & Hemostasis, Tel Aviv University, Israel
4. Department of Hematology & Oncology, Univ. Hospital Hamburg, Germany
5. Institute of Transfusion Medicine, Univ. Hospital Kiel & Lübeck, Germany
6. Institute of Clinical Molecular Biology, Christian-Albrechts-University of Kiel, Germany
7. Department of Medicine/ Hematology & Oncology, Univ. Hospital Münster, Germany
8. Institute of Human Genetics, Westfälische-Wilhelms-University, Münster, Germany
9. Cardiovascular Research Institute Maastricht, Maastricht University, The Netherlands
10. Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte and Campus Virchow-Klinikum, Berlin, Germany

Running head: prothrombin 19911 A>G and venous thromboembolism

Correspondence: Prof. Dr. med. Ulrike Nowak-Göttl  
Center of Thrombosis & Hemostasis  
Institute of Clinical Chemistry, Univ. Hospital Kiel  
Arnold-Heller-Str. 3, building 17  
24105 Kiel, Germany  
Tel: +49 431 500 16201  
Fax: +49 431 500 16204  
Email: [leagottl@uksh.de](mailto:leagottl@uksh.de)

\*VL and BK contributed equally; \*\*RJ and UNG contributed equally as senior author

## Abstract

**Background:** The role of the A>G polymorphism at position 19911 in the prothrombin gene (factor [F] 2 at rs3136516) as a risk factor for venous thromboembolism [VTE] is still unclear. **Objectives:** To evaluate the presence of the F2 polymorphism in VTE patients compared to healthy blood donors and to adjust the results for common inherited thrombophilias [IT], age at onset and blood group [BG], and to calculate the risk of VTE recurrence.

**Patients/Methods:** We investigated 1012 Caucasian patients with a diagnosis of VTE for the presence of the F2 rs3136516 polymorphism and compared these with 902 healthy blood donors. Odds ratios [OR] together with their 95% confidence intervals were calculated adjusted for F5 at rs6025, F2 at rs1799963, blood group, age and gender. In addition, we evaluated the risk of recurrent VTE during patient follow-up calculating hazard ratios [HR] together with their 95%-CIs.

**Results:** Compared with the AA wildtype, the F2 GG and AG genotypes (rs3136516) were associated with VTE (OR 1.48 and 1.45). The OR in F5 carriers compared to controls was 5.68 and 2.38 in patients with F2 (rs1799963). BG “non-O” was significantly more often diagnosed in patients compared to BG “O” (OR 2.74). VTE recurrence more often occurred in males (HR 2.3) and in carriers with combined thrombophilia (HR 2.11). Noteworthy, the rs3136516 polymorphism alone was not associated significantly with recurrence.

**Conclusion:** In Caucasian patients with VTE the F2 GG/GA genotypes (rs3136516) were moderate risk factors for VTE. Recurrence was associated with male gender and combined thrombophilia.



**Key words:** prothrombin 19911 A>G polymorphism, thrombosis, recurrence, male gender

Title character count: 145

Abstract word count: 250

Main text word count: 3895

References: 29

Tables: 4

Figures: 2

Online supplement: 1121 words, 1 figure, 2 tables

## **Introduction**

Acquired risk factors such as surgery, immobilization, pregnancy, smoking, oral contraceptives and obesity, as well as inherited risk factors simultaneously contribute to the onset of venous thromboembolism [VTE].[1–3] Rare inherited risk factors such as antithrombin-, protein C - protein S deficiency are considered as high risk factors for VTE, whereas the factor [F] 5 [rs6025] and F2 [rs1799963] mutations are considered as more commonly diagnosed but being rather mild risk factors.[1–5] The A>G polymorphism at position 19911 of the prothrombin gene, e.g. F2 at rs3136516, located in intron 13 of the prothrombin gene is associated with increased plasma prothrombin levels, but its role as a risk factor for VTE is still unclear.[6–11] There is a small number of case control studies investigating the role of the F2 at rs3136516 polymorphism and its association with VTE. Of these, two reports showed a moderate risk for VTE [8, 9], whereas another study showed no statistical significance.[10] Therefore, the objectives of this study were to *i)* evaluate the presence of the prothrombin 19911 A>G polymorphism in adolescent and younger adult Caucasian VTE in- and outpatients compared to healthy blood donors and to adjust the results obtained for common inherited thrombophilias [IT], age at onset and blood group [BG]. The second objective of this study was to *ii)* calculate in the patient cohort the risk of VTE recurrence independently of gender, common mild ITs including the F2 at rs3136516 polymorphism, age at first VTE onset and blood group.

## **Material and Methods**

*Study population:* Consecutive patients with a first symptomatic VTE were recruited between December 2008 and 2018 whether or not prothrombotic risk factors were present. Screening of thrombophilia was performed in 1012 adolescent and adult

patients [14 to < 60 years] and 902 healthy blood donors [18 to < 61 years] from the same catchment area.

*Inclusion and exclusion criteria:* corresponding to the following criteria patients were included into the study: *i)* age from puberty status > Tanner 2 [12] to 60 years at first VTE onset, *ii)* objectively confirmed thrombosis and re-thrombosis with established imaging procedures such as Duplex- or Doppler- ultrasonography, computed tomography or magnetic resonance tomography for venous thrombosis and spiral computed pulmonary angiography or lung perfusion scintigraphy for pulmonary embolism. Patients were excluded from the study when they suffer from *i)* central line-associated VTE, VTE linked to malignancy, antiphospholipid syndrome, inherited antithrombin-, protein C- or protein S-deficiency or *ii)* when they were lost to follow-up or did not abide by the follow-up visits.

*Study aims:* The primary study objective was to determine the individual VTE risk of the F2 mutation at rs3136516 in Caucasian VTE patients [n=1012] compared to healthy blood donors [n=902] adjusted for *i)* common ITs, e.g. F5 at rs6025 and F2 at rs1799963, age at onset and blood group.[1–3, 13, 14] The secondary study objective was to investigate the time to VTE recurrence after withdrawal of antithrombotic therapy, adjust for the above listed potential confounders.

*Clinical procedures:* Following a first VTE onset (in- and outpatients) and during regular follow-up visits (3-6 months [adolescents], 9-12 months, 2 years [adults]) we evaluated and re-evaluated patient's disease history and possible risk factors causing VTE, such as the use of oral contraceptives, pregnancy, obesity, immobilization, surgery and smoking. Clinical data collection also included laboratory test results, antithrombotic

therapy, including adherence to anticoagulation and duration and family history of VTE. Adolescent and adult patients were treated independently from the underlying IT risk factors according to the latest antithrombotic VTE therapy guidelines. (online supplement).[15–17]

Details on blood sample collection are depicted in detail in the online supplement.

*Laboratory analyses:* With written or oral parental consent mutations in F2 at rs3136516, F5 at rs6025 and F2 at rs1799963 as well as circulating levels of antithrombin, coagulation inhibitors, d-dimer concentration as well as lupus anticoagulants and antiphospholipid antibodies were investigated with standard laboratory techniques at VTE onset and were repeated during routine follow up visits.[12, 14] Especially, the analyses of protein C and protein S were performed at least three months after the index event and/or withdrawal of vitamin-K-antagonists and deficiency states of antithrombin, protein C or protein S were confirmed if values repeatedly persisted below the age-related reference ranges.[14] Criteria for the hereditary nature of a hemostatic defect were its presence in at least one further first or second-degree family member and/or the identification of a causative gene mutation.

Single nucleotide polymorphism [SNP] Genotyping for F2 A19911G (LRG\_551t1:c.1726-59G>A, rs3136516) was performed by TaqMan PCR. The assay includes two allele specific TaqMan probes containing distinct fluorescent dyes and highly specific PCR primers to detect the target (Assay ID: C\_\_11661574\_10, ThermoFisher Scientific, RRID:SCR\_018060). ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System was used for analysis. Of note, the specific snip applied (rs3136516) does not

show a significant deviation from Hardy Weinberg equilibrium in the healthy cohort of blood donors ( $p= 0.55$ ).

*Statistics:* Statistical analyses were performed using the MedCalc® software bvba (version 16.4.3, Ostend, Belgium, RRID:SCR\_015044) and StatView 5 software packages (SAS Institute Inc., RRID:SCR\_017411). Continuous variables were expressed as mean ( $\pm$  standard deviation) or median [minimum-maximum] values and categorical data were expressed as counts and percentages. The Wilcoxon-Mann-Whitney-U-test investigated differences in continuous non-normal distributed variables between two independent groups. The Chi-Square-test was used to analyze differences in binary and categorical data between for the primary study aim Odds ratios [OR] and their corresponding 95% confidence intervals [CI] were calculated using an univariable logistic regression model comparing patients with healthy controls (blood donors). The homozygous GG genotype and the heterozygous AG were compared with the AA wildtype (F2 at rs3136516). In order to evaluate an independent contribution to the risk of VTE and to adjust for further potential confounders (common IT, age at onset, blood group) [1–3, 13, 14] these variables were entered into a backward multivariable logistic regression model. In addition, to test for possible statistical interactions between F5 rs6025 and F2 rs313616 genotypes a multiplicative scale was incorporated in the model. Per “a priori” definition this backward model included variables with a p value of  $\leq 0.2$  and, vice versa, removed variables from the model if p was  $> 0.21$ . For the secondary study objective, i.e. the time to recurrence, we calculated the probability of VTE-free survival as a function of time utilizing the method of Kaplan and Meier (univariable analysis). The log rank test was used to test for differences in recurrence-free survival between groups. On the basis of previous reports (data presented in the online suppl. Tables 1 and 2) minimum sample size

calculation for the comparison of two proportions was performed assuming a type I error of 0.05 and a type II error of 0.20 (sampling comparison of proportions).[18] Patients were withdrawn from the survival analysis (censored cases) either at death unrelated to VTE recurrence or at loss to follow-up using data of the last clinical follow-up visit. In order to evaluate an independent contribution to the risk of recurrent VTE (dichotomous variables: recurrence “yes” versus “no recurrence”) and to adjust for further potential confounders (gender, common IT, age at first VTE onset, blood group) the hazard ratio (HR) together with 95% confidence intervals (CI) were estimated from Cox’s proportional hazards model. To further test the relationship between independent and dependent variables, the likelihood ratio test was performed. To test the proportional hazard assumption, one of the prerequisites for applying the Log-rank test or the Cox regression model fit, we used the `cox.zph` procedure in the package ‘survival’ (v3.1.8; Therneau TM, 2019) in R 3.4.3.[19] A p-value > 0.05 indicates no violation of the proportional hazard assumption. The recurrence rates were calculated as the number of recurrent events per 100 person-years.

*Ethics:* The underlying multicenter cohort study was approved by the medical ethics committee of the University of Münster & Kiel [B304/16], Germany and written informed consent was provided in all cases prior to study participation.

## Results

Demographic data of patients (n=1010) and healthy controls (n=902) are depicted in table 1. Thrombotic locations and provoking risk factors are given in table 2 and in the online supplement.

*Primary study aim (univariable analysis: Table 3):* Compared with the AA wildtype the GG genotype (rs3136516) increases the risk of VTE with an OR of 1.39 (CI: 1.04-1.73) and 1.21 (CI: 0.97-1.51) in carriers of the AG variant. In addition, in the cohort investigated the OR of F5 carriers compared to healthy blood donors was 6.35 (CI 4.59-8.77) and 2.44 (1.47-4.05) in patients with F2 (rs1799963). Combinations between the homozygous F2 GG genotype at rs3136516 and F5 at rs6025 did not significantly influence the thrombotic risk when comparing patient with controls (OR 0.56; CI 0.29-1.09) and combinations between the factor 2 rs1799963 GA/AA variants and the homozygous GG (rs3136516) genotype were neither detected in cases nor in healthy controls, respectively. BG “non-O” was significantly more often found in patients with VTE compared to BG “O” (OR 3.77, CI 3.04-4.69). Furthermore, increasing age per year at first VTE onset enhances the VTE risk significantly by an OR of 1.01 (CI 1.02-1.04).

*Multivariable analysis (Table 3):* Backward logistic regression showed that compared with the AA wildtype the GG genotype (rs3136516) was independently associated with a diagnosis of VTE with an OR of 1.48 (95%-CI: 1.06-2.06) and with the OR of 1.45 (95%-CI: 1.1-1.92) in carriers in which the AG variant was genotyped. In addition, the OR of F5 in patients compared to healthy blood donors was 5.68 (95%-CI: 3.94-8.20) and 2.38 (95%-CI: 1.35-4.20) in patients with F2 (rs1799963). BG “non-O” was

significantly more often found in patients with VTE compared to BG “O” (OR 2.74; 95%-CI: 2.11-3.55). Again, as depicted in univariable analysis increasing age per year at first onset retained its significance also in multivariate analysis (OR 1.03; 95%-CI: 1.02-1.04). Due to the “a priori” defined statistical cut-off p-values combinations between F5 rs6025 and F2 rs3135616 (multiplicative scale) were removed from the multivariable model and were not included in the final analysis.

*Secondary study aim:* Within a mean time of 51.2 months (standard deviation: 43.5), recurrent VTE events (provoked 77%; locations depicted in table 1) occurred in 178 out of 1012 patients (17.5%) following the first VTE onset (figure 1): 26.5% in men and 13.1% in women ( $p < 0.001$ ). Gender associated incidence rates per 100 patient years (table 4) were 4.3 (95%-CI: 3.4-5.3) in men and 1.9 (95%-CI: 1.6-2.4) in women ( $p < 0.0001$ ). Further details of thrombotic locations and AC prior VTE recurrence are described in the online supplement material.

Whereas no significant associations were found between the risk of recurrent VTE and individuals classified as carriers of *i*) the F2 mutation at rs3136516 “GG” subjects (OR 1.41; 95%-CI 0.9-2.16) or in patients carrying *ii*) the F2 rs179963 “GA” genotype (OR 1.81; 95%-CI 0.87-3.76), results of the logistic regression model demonstrates that *iii*) heterozygous F5 carriers had an increased OR of 1.86 (95%-CI 1.22-2.83) to suffer from recurrent VTE with a further increase in patients additionally carrying the F2 GG/GA variant (rs3136516): OR 3.34 (95%-CI: 1.62-6.89). Patients with at least any IT compared to patients with no IT showed an increased odds ratio of 1.7 (95%-CI: 1.2-2.3) for a recurrence of VTE, while in patients with combined ITs the OR increased to 2.4 (95%-CI: 1.7-3.4). Of note, there was no significant association between the presence or absence of provoking risk factors and inherited thrombophilia ( $p=0.93$ ).



The recurrence-free survival is depicted in Figure 2: 32.7% of patients carrying combined ITs compared to 15.6% without IT developed a second thromboembolic event within 36 months (min-max: 1-120; log rank test:  $p < 0.0001$ ). Multivariable analysis including time to recurrence demonstrates that male gender (Hazard Ratio [HR] 2.3; 95%-CI: 1.7-3.0) and combined ITs (HR 2.11; 95%-CI: 1.5-3.0) showed a significant impact on the risk of VTE recurrence. Noteworthy, in this specific data set, gender, F5, F2 rs3136516, F2 rs179963 and blood group did not violate the proportional hazard assumption. Remarkably, age, both as continuous term or grouped into three equal sized groups did violate the proportional hazard assumption and was thus not included in the multivariable analysis. Due to the “a priori” defined statistical cut-off p-values the comparison between BG O and non-O was removed from the multivariate model. Incidence rates of recurrence per 100 patient years are depicted in detail in table 4.

## **Discussion**

In the present longitudinal study in German patients with VTE we have shown that the presence of the F2 mutation at rs3136516 either in its GG or its GA genotype compared to the AA variant plays a moderate but independent role at first VTE onset with an adjusted odds ratio of 1.48 (GG genotype) and 1.45 (GA genotype), respectively. These findings were in agreement to study results described earlier in 2006 in an Italian cohort of patients (OR: 1.5) and in line with data derived from the Netherlands with a 1.3-fold increased OR to suffer from VTE. As in our study, in the latter two cohorts the F2 rs3136516 GG genotypes were compared to AA carriers. [8, 9] The observation of a moderately enhanced association with VTE reported by us and by both cohorts

published in 2006, however, is in contrast to findings reported by Perez-Ceballos et al. in 2002 and by Aradjanski et al. in 2014. [7, 10] A summary of pooled data of previous reports [7–10] including our patients is depicted in the online supplement. Pooling results of overall four studies with 6150 patients with VTE and 6588 population-based controls, a modest increased association with VTE in carriers of the F2 (rs3136516) GG genotype of 1.3 (95%-CI:1.2-1.4;  $p < 0.0001$ ; heterogeneity [ $I^2$ ] 0.0%) was calculated. Interestingly, when investigating the role of this F2 intron polymorphism in a genome-wide association study the risk association with VTE was also modestly increased with an OR of 1.08 (1.06-1.11).[20]

In our cohort, combinations between the homozygous F2 GG genotype at rs3136516 and F5 at rs6025 additionally incorporated in the statistical model in a multiplicative scale did not significantly influence the thrombotic risk at VTE onset. This observation was in contrast to both cohort studies reported in 2006.[8, 9] Combinations of the GG genotype with the F2 variant at rs1799963 GA/AA genotypes were not found, in accordance to previously reported data.[8]

Of note, data of the multivariable analysis (primary study objective) confirmed findings by others that blood group “non-O” is an independent risk factor for a first VTE onset.[21]

The contribution of male gender, age at first VTE onset and IT risk factors on VTE events were additionally investigated as secondary study aim in the patient follow-up study. During the patient-follow up after the first withdrawal of therapeutic AC we could demonstrate a significant risk increase of recurrent VTE in males (annual incidence

rate of 4.3) compared to females (annual incidence rate of 1.9). Male gender remained an independent risk factor for recurrent VTE in multivariable analysis. The findings of our study, where VTE events were associated in the majority of cases with provoking risk factors, are in line with the higher recurrence risk in men following unprovoked VTE.[22–24] In contrast to findings from 2011 derived from a patient level meta-analysis in which the risk of recurrent VTE in men with a first provoked vascular occlusion was similar to that in women, the meta-analysis by McRae [23] found an enhanced risk for VTE recurrence in men. In our study the aforementioned increased risk of recurrence in men was neither affected by age at first VTE onset nor by underlying IT risk factors. Additionally, in the follow-up study, probably due to the small number of patients affected, the increased risk of blood group “non-O” and vice versa the protective role of BG O lost its significance in multivariable Cox regression analysis. Apart from possible explanations for the higher VTE recurrence in males compared to females discussed in more detail by Douketis [22], another explanation may be male gender per se: endogenous testosterone levels in males compared to females are clearly higher. Enhanced testosterone levels are associated with a hypo-fibrinolytic state possibly contributing to the onset of symptomatic thrombosis. The latter is not only described for endogenous elevated testosterone levels but also in patients receiving testosterone substitution therapy.[25, 26]

As recently evaluated in a large international cohort of children and adolescents with VTE leading to thromboembolic and vascular stroke, the presence of more than one IT is an important risk factor for recurrent VTE.[27] Carriers of the F5 mutation showed a further risk increase in patients additionally carrying the F2 GG/GA variant (rs3136516) with the Odds ratio of 3.34 compared to 1.86 found in F5 carriers alone.

This study has several limitations: apart from *i)* selection bias, i.e. age at onset, exclusion of subjects with central line- or malignancy-associated VTE, the non-enrollment of patients with antiphospholipid syndrome, limitations of the present study include *ii)* the patient population ascertained with subjects of white race only. Thus, the results presented here cannot be directly transferred to other races, other age groups, to patients with VTE suffering from basic diseases not included in our cohort, such as malignancies. *iii)* Continuously admitted patients were ascertained from 2008 onwards and were referred as in- and outpatients within a critical period in which improvement of imaging methods and clinical practice was noted.[15, 16] Results obtained at first thrombotic onset (case-control setting), however, are independent from change in imaging methods or clinical practice and the distribution of F5 rs605 GA/AA and F2 rs3136516 GA/AA is in line with previous reports: thus referral bias caused by inclusion of in- and outpatients seems to be unlikely. Since in- and outpatients were followed according to a similar study protocol a possible referral bias did not play a role with respect to recurrent VTE. It has to be mentioned here that the introduction and uptake of new therapeutic approaches such as DOACs might have influenced referral and treatment patterns. *iv)* Although we observed a large number of patients with common mild IT risk factors this study might still be too small to show statistical significance: Although our findings in a clinical setting are in agreement with previously reported population based studies [8, 9], higher patient numbers are needed to rule out statistical errors. *v)* Finally, we may have missed recurrent thrombosis in the patients investigated: whereas we may have overlooked asymptomatic VTE recurrence it is unlikely, however, that we would have missed symptomatic recurrences. This statement is underlined by the fact that the recurrence rates detected in this investigation are within the range reported by others.[28, 29]

In conclusion in Caucasian adolescent and adult patients with a first VTE onset, the F2 GG/GA genotypes (rs3136516) contribute to the first onset of the disease. Findings of this study gave evidence that in patients with provoked VTEs *i)* male gender and *ii)* combined ITs, including the F2 mutation at rs3136516 may be regarded as important risk factors for VTE recurrence. These should be included in decision-making in regard to length of AC treatment. Whether *iii)* blood group non-O should be included into a predictive scoring system, however, is part of an ongoing prospective study.

## References

1. Rosendaal FR (1999) Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 353:1167–1173. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)10266-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)10266-0)
2. Dahlbäck B (2000) Blood coagulation. *Lancet* 355:1627–1632. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02225-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02225-X)
3. Martinelli I (2001) Risk factors in venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 86:395–403
4. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al (1994) Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 369:64–67. <https://doi.org/10.1038/369064a0>
5. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM (1996) 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* 88:3698–3703
6. Ceelie H, Bertina RM, van Hylckama Vlieg A, et al (2001) Polymorphisms in the prothrombin gene and their association with plasma prothrombin levels. *Thromb Haemost* 85:1066–1070
7. Pérez-Ceballos E, Corral J, Alberca I, et al (2002) Prothrombin A19911G and G20210A polymorphisms' role in thrombosis. *Br J Haematol* 118:610–614. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03624.x>
8. Martinelli I, Battaglioli T, Tosi A, et al (2006) Prothrombin A19911G polymorphism and the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 4:2582–2586. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02216.x>
9. Chinthammitr Y, Vos HL, Rosendaal FR, Doggen CJM (2006) The association of prothrombin A19911G polymorphism with plasma prothrombin activity and venous thrombosis: results of the MEGA study, a large population-based case-

- control study. *J Thromb Haemost* 4:2587–2592. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02257.x>
10. Aradjanski M, Djordjevic V, Pruner I, et al (2014) The 3' end prothrombin gene variants in serbian patients with idiopathic thrombophilia. *Balkan J Med Genet* 17:43–48. <https://doi.org/10.2478/bjmg-2014-0073>
  11. Soria JM, Almasy L, Souto JC, et al (2000) Linkage analysis demonstrates that the prothrombin G20210A mutation jointly influences plasma prothrombin levels and risk of thrombosis
  12. Holzhauer S, Goldenberg NA, Junker R, et al (2012) Inherited thrombophilia in children with venous thromboembolism and the familial risk of thromboembolism: an observational study. *Blood* 120:1510–1515. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-405514>
  13. Anderson FA, Wheeler HB, Goldberg RJ, et al (1991) A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: The Worcester DVT study. *Arch Intern Med* 151:933–938. <https://doi.org/10.1001/archinte.1991.00400050081016>
  14. Nowak-Göttl U, Limperger V, Kenet G, et al (2017) Developmental hemostasis: A lifespan from neonates and pregnancy to the young and elderly adult in a European white population. *Blood Cells, Mol Dis* 67:. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2016.11.012>
  15. Kearon C, Akl EA, Ornelas J, et al (2016) Antithrombotic Therapy for VTE Disease. *Chest* 149:315–352. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2015.11.026>
  16. Monagle P, Chan AKC, Goldenberg NA, et al (2012) Antithrombotic therapy in neonates and children: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 141:e737S--801S. <https://doi.org/10.1378/chest.11-2308>

17. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (2015) S3 Leitlinie Prophylaxe der venösen Thrombembolie (VTE). 1–238
18. Machin D, Campbell MJ, Tan SB, Tan SH (2008) Sample Size Tables for Clinical Studies. Wiley-Blackwell, Oxford, UK
19. Therneau TM, Grambsch PM (2000) Modeling survival data : extending the Cox model. Springer, New York
20. Lindström S, Wang L, Smith EN, et al (2019) Genomic and transcriptomic association studies identify 16 novel susceptibility loci for venous thromboembolism. *Blood* 134:1645–1657. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000435>
21. Franchini M, Mannucci PM (2014) ABO blood group and thrombotic vascular disease. *Thromb Haemost* 112:1103–1109. <https://doi.org/10.1160/th14-05-0457>
22. Douketis J, Tosetto A, Marcucci M, et al (2011) Risk of recurrence after venous thromboembolism in men and women: patient level meta-analysis. *BMJ* 342:d813. <https://doi.org/10.1136/bmj.d813>
23. McRae S, Tran H, Schulman S, et al (2006) Effect of patient's sex on risk of recurrent venous thromboembolism: a meta-analysis. *Lancet* 368:371–378. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69110-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69110-1)
24. Kearon C, Parpia S, Spencer FA, et al (2019) Long-term risk of recurrence in patients with a first unprovoked venous thromboembolism managed according to d-dimer results; A cohort study. *J Thromb Haemost* 17:1144–1152. <https://doi.org/10.1111/jth.14458>
25. Normann S, de Veber G, Fobker M, et al (2009) Role of endogenous testosterone concentration in pediatric stroke. *Ann Neurol* 66:754–758. <https://doi.org/10.1002/ana.21840>



26. Freedman J, Glueck CJ, Prince M, et al (2015) Testosterone, thrombophilia, thrombosis. *Transl Res* 165:537–548. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.12.003>
27. DeVeber G, Kirkham F, Shannon KK, et al (2019) Recurrent stroke: the role of thrombophilia in a large international pediatric stroke population. *Haematologica* 104:haematol.2018.211433. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.211433>
28. Vossen CY, Walker ID, Svensson P, et al (2005) Recurrence rate after a first venous thrombosis in patients with familial thrombophilia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1992–1997. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000174806.76629.7b>
29. Heit JA (2012) Predicting the risk of venous thromboembolism recurrence. *Am J Hematol* 87:S63. <https://doi.org/10.1002/ajh.23128>

## **Figures and tables**

**Figure 1:** Probability of recurrence-free survival following a first symptomatic VTE onset is depicted: 13.1% of women compared to 26.5% of men developed a second thrombotic event (log rank value:  $p < 0.0001$ ).

**Figure 2:** Probability of recurrence-free survival following a first symptomatic VTE onset is depicted: 32.7% of patients carrying combined thrombophilia variants compared to 15.6% without thrombophilia developed a second thrombotic event (log rank value:  $p < 0.0001$ ). In addition, recurrence-free survival in patients with any thrombophilia is depicted.

**Table 1:** VTE manifestations in patients are depicted.

**Table 2:** Frequency distribution of single & combined thrombophilic risk factors in patients and controls are summarized.

**Table 3:** Uni- and multivariable analysis (logistic regression): Odds Ratios, 95% confidence intervals are depicted.

**Table 4:** Incidence rates of recurrent VTE per 100 patient years (gender and inherited thrombophilia) are depicted.

## **Funding Sources**

The study was supported by grants from the Förderverein “Schlaganfall und Thrombosen im Kindesalter e.V.”, Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung (IZKF: CRA01-09: University of Münster) and the „Gesellschaft für Thrombose und Hämostaseforschung /Society of Thrombosis and Hemostasis Research“ (GTH (grant 2016)). None of the aforementioned funding agencies had a role in study design, conduct, interpretation, or reporting.

## **Author’s contribution**

U.N.G., B.K. and V.L. designed the study and analyzed the data. V.L., B.K., R.J., B. and U.N.G. wrote the paper, G.K., M.K., M.S., F.L., D.J., M.Sch., A.F., U.C.K., R.M., F.R., M.S., D.S., D.K., A.R., P.K., T.B., A.T. and B.N. had full access to the data and took part in the design, execution and data analysis, discussion, and in writing the report.

The manuscript has been read and approved for submission to the Journal of Thrombosis and Haemostasis by all authors.

## **Conflicts of interest**

Verena Limperger: personal fees from Bristol-Myers Squibb, Amedes holding GmbH, CSL Behring, NovoNordisk, non-financial support from Octapharma, NovoNordisk, outside the submitted work

Gili Kenet: personal fees from Bayer, personal fees from Boehringer Ingelheim, personal fees from Daiichi Sankyo, other from Pfizer, outside the submitted work

Bettina Kiesau: personal fees and other from Sobi, outside the submitted work.

Max Köther: no conflicts of interest

Malin Schmeiser: no conflicts of interest

Florian Langer: personal fees from Bayer, personal fees from Bristol-Myers Squibb, personal fees from Daiichi Sankyo, personal fees from LEO Pharma, grants and personal fees from Pfizer, personal fees from Chugai, personal fees from Roche, personal fees from SOBI, personal fees from Takeda, personal fees from CSL Behring, personal fees from SOBI, personal fees from Werfen, personal fees from Siemens, personal fees from Grifols, personal fees from Novo Nordisk, personal fees from Octapharma, personal fees from Ablynx, outside the submitted work.

David Juhl: no conflicts of interest

Maria Shneyder: personal fees from NovoNordisk, Octapharma and Takeda, outside the submitted work.

Andre Franke: no conflicts of interest

Ulrich K. Klostermeier: no conflicts of interest

Rolf Mesters: no conflicts of interest

Frank Rühle: no conflicts of interest

Monika Stoll: no conflicts of interest

Dagmar Steppat: no conflicts of interest

Dorothee Kowalski: non-financial support from Octapharma, NovoNordisk and LFB GmbH outside the submitted work.

Angela Rocke: personal fees from Octapharm, CSL Behring outside the submitted work.

Piotr Kuta: personal fees from CSL Behring, NovoNordisk, Octapharma, Stago, Aspen outside the submitted work.

Tido Bajorat: personal fees from BFSH e.V. (Bündnis zur Förderung der Sicherheit von Hämophilen), personal fees from Octapharma, outside the submitted work.

Antje Torge: no conflicts of interest

Bruno Neuner: no conflicts of interest

Ralf Junker: no conflicts of interest

Ulrike Nowak-Göttl: grants from Octapharma, grants from LFB, other from Bayer Vital, other from Boehringer-Ingelheim, outside the submitted work.

## Online Supplement

### Online supplement

**Anticoagulant treatment:** Based on standardized in-house[1, 2] treatment guidelines, patients with provoked VTE of the legs received anticoagulation (AC) between 3 and 6 months and the duration of AC in patients with unprovoked VTE and/or pulmonary embolism (PE) was prolonged up to 12 months. Prior to withdrawal of anticoagulation the D-dimer concentration was aimed to be settled below the aged-dependent cut-off values in two follow-up visits and had to stay within the normal ranges six weeks following AC removal. In addition, in patients with PE cardiovascular ECHO examination must be normal, e.g. without signs of left-ventricular dysfunction prior to AC removal.

**Blood sample collection:** As previously described blood samples were collected from patients and controls at the study centers in the morning after a 12-hour fasting period. Samples were drawn by peripheral venipuncture into plastic tubes containing 1/10 by volume of 3.8% trisodium citrate (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and were immediately placed on melting ice. The blood samples from patients were collected 6-12 months after the acute thrombotic event, and at least 6 weeks after discontinuation of anticoagulation therapy. Platelet-poor plasma was prepared by double centrifugation at 3000 g at 4°C for 20 minutes, aliquoted in polystyrene long-term freezer storage tubes, stored at -70°C and thawed immediately before assay. DNA extraction was performed by a spin column procedure (Qiagen, Hilden, Germany) as previously described.

**Statistics:** Sample size calculations. [3]

**Table 1: Incidence and prevalence proportions according to known population-based data (reference 1-3). Minimum sample size calculated in male and female patients are depicted.**

<b>Cohorts</b>	<b>Proportion of F5 rs605 GA/AA</b>	<b>Proportion of F2 rs3136516 GA/AA</b>	<b>Proportion of F2 rs3136516GG &amp; F5 rs605 GA/AA</b>
VTE (%)	12	5	29 (3)
Controls (%)	5 (reference 1)	2.5 (reference 2)	23 (reference 3)
Cases (n) VTE	276	984	871
Controls (n)	276	984	871

Abbreviations: F: factor; VTE: venous thromboembolism

**Table 2: Proportion of gender in recurrent deep vein thrombosis. Minimum sample size calculated in male and female patients are depicted.**

<b>Cohorts</b>	<b>Proportion of recurrence (reference 4)</b>	<b>Proportion of recurrence (reference 5)</b>	<b>Proportion of recurrence (own data)</b>
male (%)	20	30	27
female (%)	9	17	13
cases (n) male	276	277	218
cases (n) female	138	139	109

## References tables:

1. Li X, Cui L, Li Y, et al (2018) Prevalence and geographical variation of Factor V Leiden in patients with cerebral venous thrombosis: A meta-analysis. *PLoS One* 13:1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203309>
2. Gonzalez J V., Barboza AG, Vazquez FJ, Gándara E (2016) Prevalence and Geographical Variation of Prothrombin G20210A Mutation in Patients with Cerebral Vein Thrombosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 11:e0151607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151607>
3. Martinelli I, Battaglioli T, Tosetto A, et al (2006) Prothrombin A19911G polymorphism and the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 4:2582–2586. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02216.x>
4. Douketis J, Tosetto A, Marcucci M, et al (2011) Risk of recurrence after venous thromboembolism in men and women: patient level meta-analysis. *BMJ* 342:d813. <https://doi.org/10.1136/bmj.d813>
5. Kearon C, Parpia S, Spencer FA, et al (2019) Long-term risk of recurrence in patients with a first unprovoked venous thromboembolism managed according to d-dimer results; A cohort study. *J Thromb Haemost* 17:1144–1152. <https://doi.org/10.1111/jth.14458>



**Results:**

**Provoking risk factors at first VTE:** 78.0% of our patients had provoked VTEs (n=789). Provoking risk factors were medical underlying diseases in 113 cases (such as cardiac, hepatic, infectious, metabolic or renal) and 293 index cases suffered from VTE after prolonged immobilization (> 3 days). Obesity (BMI > 27) was documented in 140 cases and 55 female patients were on oral contraceptives at the time of VTE onset. Smoking of more than 10 cigarettes per day was stated in 143 patients and non-classified provoking risks factors prior to VTE occurred in 228 patients. Combinations of risk factors were possible.

**VTE recurrence (secondary study aim):** At VTE recurrence 77% of subjects had in similarity to the first VTE at least on provoking risk factor. Of note, 13 of 178 (7.3%) patients with a first VTE and withdrawal of anticoagulant therapy developed a second VTE under prophylactic low-dose LMWH (n=7), sub-therapeutic intake of vitamin-K-antagonists (n=4) or oral anti-factor Xa inhibitors (n=2), administered for secondary AC in recurring risk situations. In addition, prior to re-thrombosis none of the male or female patients affected had increased d-dimer concentrations.

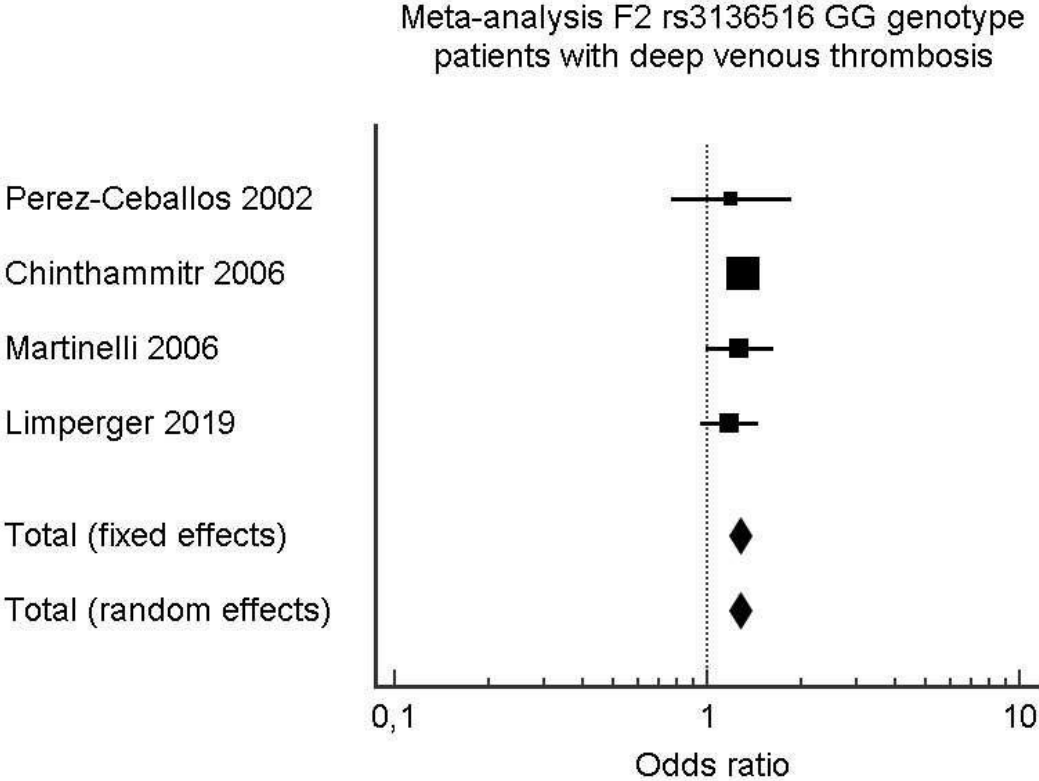
**Meta-analysis (pooled data):** In addition, according to previously published methodologies we have added our data to studies aforementioned [4–6] and have recalculated the risk to contribute to a first VTE onset as pooled ORs (meta-analysis) on the basis of observational studies. [7, 8] For the F2 at rs3136516 genotype total ORs (fixed & random effects) are depicted in a forest plot including study heterogeneity ( $I^2$ ).

Meta-analysis derived from data reported so far with respect to the GG genotype, F2 mutation at rs3136516, [4–6] are depicted in online figure 2: Without significant heterogeneity [ $I^2=0\%$ ] the pooled OR (fixed and random effects model) derived from univariable individual calculations included 6150 patients with VTE and 6588 population-based controls and revealed a modest risk increase in carriers of the GG genotype of 1.3 (1.2-1.4).

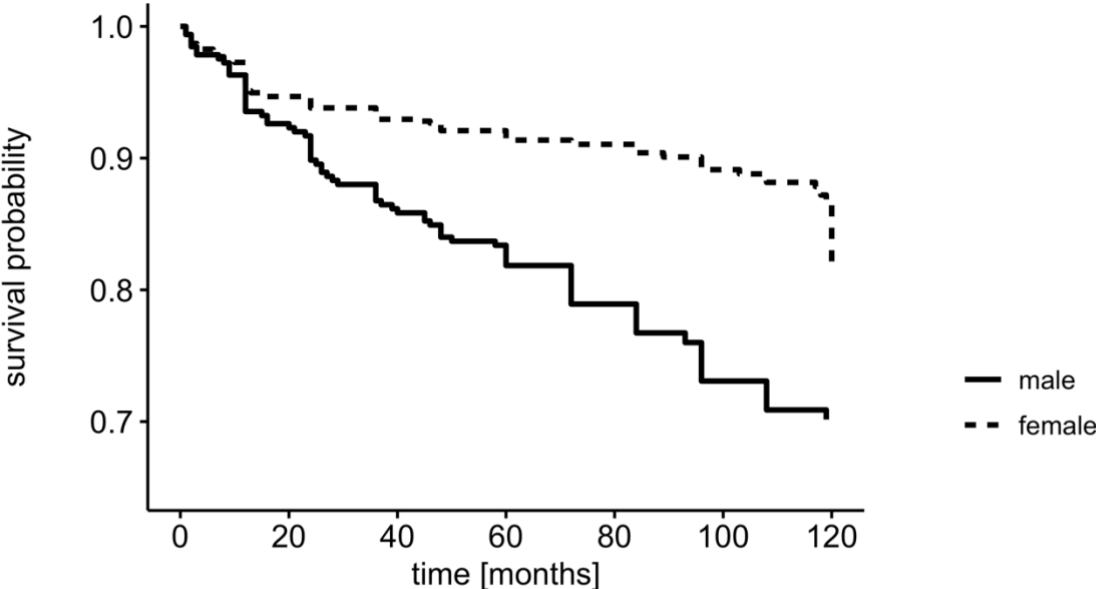
## References:

4. Pérez-Ceballos E, Corral J, Alberca I, et al (2002) Prothrombin A19911G and G20210A polymorphisms' role in thrombosis. *Br J Haematol* 118:610–614. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03624.x>
5. Martinelli I, Battaglioli T, Tosi A, et al (2006) Prothrombin A19911G polymorphism and the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 4:2582–2586. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02216.x>
6. Chinthammitr Y, Vos HL, Rosendaal FR, Doggen CJM (2006) The association of prothrombin A19911G polymorphism with plasma prothrombin activity and venous thrombosis: results of the MEGA study, a large population-based case-control study. *J Thromb Haemost* 4:2587–2592. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02257.x>
7. Franchini M, Mannucci PM (2014) ABO blood group and thrombotic vascular disease. *Thromb Haemost* 112:1103–1109. <https://doi.org/10.1160/th14-05-0457>
8. Douketis J, Tosi A, Marcucci M, et al (2011) Risk of recurrence after venous thromboembolism in men and women: patient level meta-analysis. *BMJ* 342:d813. <https://doi.org/10.1136/bmj.d813>

**Figure 1 (online supplement): Pooled OR (fixed and random effects model) derived from univariate individual calculations included 6150 patients with VTE and 6588 population-based controls are depicted. Horizontal lines correspond to the 95% CI intervals for each single study. The diamond and broke vertical line represent the summary estimate. The unbroken vertical line is at the null value (1) of the odds ratio and is equivalent to no difference.**



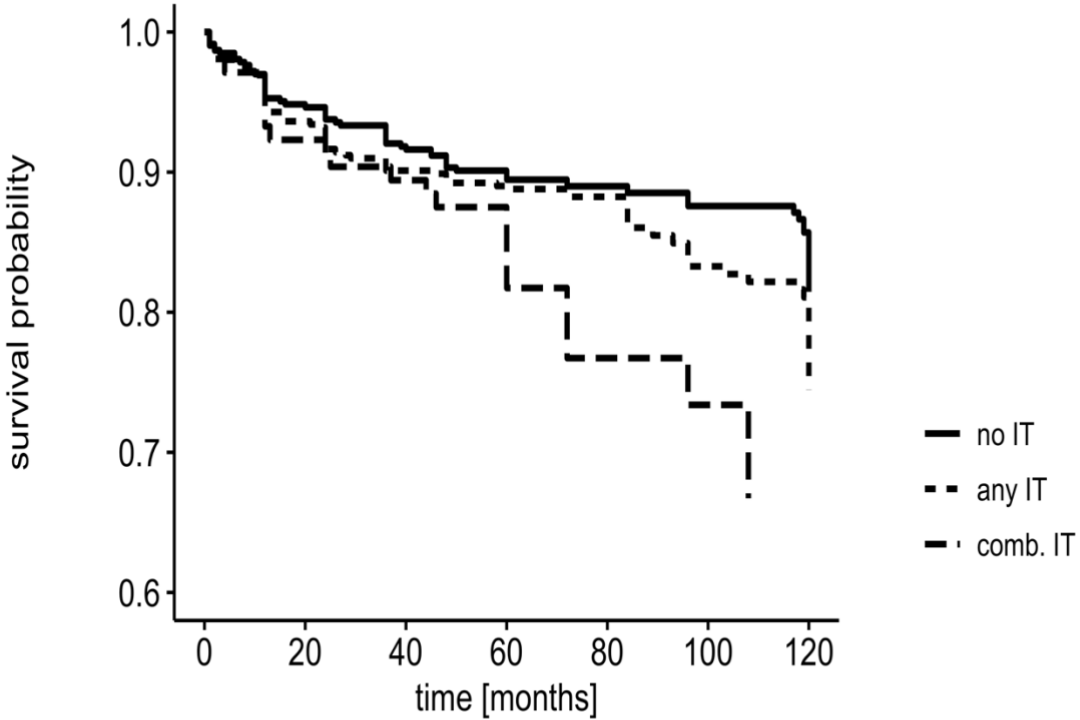
**Figure 1: Probability of recurrence-free survival following a first symptomatic VTE onset is depicted: 13.1% of women compared to 26.5% of men developed a second thrombotic event (log rank value:  $p < 0.0001$ ).**



number at risk

male	325	301	280	271	108	100	96
female	695	658	646	640	284	278	270

**Figure 2: Probability of recurrence-free survival following a first symptomatic VTE onset is depicted: 32.7% of patients carrying combined thrombophilia variants compared to 15.6% without thrombophilia developed a second thrombotic event (log rank value:  $p < 0.0001$ ). In addition, recurrence-free survival in patients with any thrombophilia is depicted.**



number at risk

no IT	465	441	427	419	189	186	182
any IT	455	426	410	405	160	151	147
comb. IT	104	96	93	91	46	44	40

## Tables

**Table 1: VTE manifestations in patients are depicted.**

	<b>Patients with VTE n=1012</b>	<b>Healthy controls n=902</b>
age	36.8 ± 10.9	37.8 ± 14
female	696 (68.8%)	443 (49.1%)
VTE location at onset: n [%]		
- VTE leg	688 [68.0]	-
- VTE&PE	192 [19.0]	-
- CSVT	61 [ 6.0]	-
- Multiple	32 [ 3.1]	-
- VTE & ATE	39 [ 3.9]	-
Recurrent VTE location: N [%]		
- VTE leg	122 [68.5]	-
- VTE&PE	1 [0.6]	-
- CSVT	4 [ 2.2]	-
- PE	47 [ 26.4]	-
- VTE & ATE	4 [ 2.2]	-

**ATE: arterial embolism of venous origin; CSVT: cerebral sinus vein thrombosis; NA: does not apply; n: number; PE: pulmonary embolism; VTE: venous thromboembolism.**

**Table 2: Frequency distribution of single & combined thrombophilic risk factors in patients and controls are summarized.**

	<b>Patients with VTE n=1010</b>	<b>Healthy controls n=902</b>
Thrombophilia RF:	n [%]	n [%]
Single RF		
- F2 rs3136516 GG	261/1010 [25.8%]	206/902 [22.8%]
- F2 rs3136516 GA	518/1010 [51.3%]	452/902 [50.1%]
- F2 rs3136516 AA	231/1010 [22.9%]	244/902 [27.1%]
- F2 rs1799963 GA/AA	41/642 [6.4%]	24/902 [2.7%]
- F5 rs605 GA/AA	275/1010 [27.3%]	50/902 [5.5%]
-		
Combined RF		
- F2 rs3136516 GG & F5 rs605 GA/AA	261/1010 [25.8%] 80/1010 [7.9%]	206/902 [22.8%] 19/902 [2.1%]
- F2 rs3136516 GG & rs1799963 GA/AA	261/1010 [25.8%] -	206/902 [22.8%] -
- F2 rs3136516 GA & F2 rs1799963 GA/AA	23/642 [3.6%]	11/902 [1.2%]

**F2: factor 2; F5: factor 5; n: number; RF: risk factor; VTE: venous thromboembolism**

**Table 3: Uni- and multivariable analysis (logistic regression): Odds Ratios, 95% confidence intervals are depicted.**

Risk factor	Odds Ratio (95% CI)	Odds Ratio (95% CI)
	Univariable analysis	Multivariable analysis
<b>F2 rs3136516 AA</b>	1	
F2 (rs3136516) GG	1.39 (1.04-1.73)	1.48 (1.06-2.06)
F2 (rs3136516) GA	1.21 (0.97-1.51)	1.45 (1.10-1.92)
<b>F2 rs1799963 GG</b>	1	
F2 (rs1799963) GA	2.44 (1.47-4.04)	2.38 (1.35-4.20)
<b>F5 rs6025 GG</b>	1	
F5 (rs6025) GA	6.35 (4.59-8.77)	5.68 (3.94-8.20)
<b>Blood group 0</b>	1	
Blood group non-0	3.77 (3.04-4.69)	2.74 (2.11-3.55)

**F2: factor 2; F5: factor 5**



**Table 4: Incidence rates of recurrent VTE per 100 patient years (gender and inherited thrombophilia) are depicted.**

<b>Type of inherited thrombophilia</b>	<b>Exposure Time (years)</b>	<b>Event (n)</b>	<b>Incidence per 100 PY % (CI 95%)</b>	<b>p-value</b>
Gender: male	2014	87	4.3 (3.4-5.3)	<0.0001
Gender: female	4690	91	1.9 (1.6-2.4)	
Any IT	3578	111	3.1 (2.6-3.7)	0.089
No IT	2860	67	2.4 (1.9-3.0)	
Combined IT	700	34	4.8 (3.4-6.8)	0.0006
<b>Total</b>	<b>6704</b>	<b>178</b>	<b>2.6</b> <b>(2.3-3.1)</b>	

CI= Confidence interval, PY= patient years

## Danksagung

Am Ende möchte ich meinen wissenschaftlichen Kolleginnen und Kollegen Dank dafür aussprechen, Licht in das anfängliche Dunkel meines Vorhabens einer Dissertation im Bereich der Hämostaseologie gebracht zu haben. Die Gerinnungsmedizin bietet der Wissenschaft - aber auch dem oder der klinisch Tätigen - ein nahezu unerschöpfliches Terrain der Möglichkeiten. Gleichzeitig erscheint sie - insbesondere zu Beginn der Beschäftigung mit der Materie- unüberschaubar, ja löst beim klinisch Tätigen in gewissen Situationen ob der Komplexität gar Angst und Schrecken aus.

So bin ich meinem Doktorvater Herrn Professor Junker sehr dankbar, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, den Quereinstieg von der Anästhesiologie und Intensivmedizin in die Welt der Gerinnungsmedizin zu ermöglichen und unter dem Dach des Instituts für Klinische Chemie meine Dissertation zu erarbeiten.

Ebenso freue ich mich, dass ich die Gelegenheit bekam, unter der Leitung von Frau Professor Nowak-Göttl arbeiten zu dürfen, von ihrem unschätzbarem Wissen und ihrer Erfahrung profitieren zu können und mit Rat und Tat während meiner Dissertation betreut zu werden. Vieles, was mir anfänglich unbegreiflich anmutete, erscheint am Ende meiner Dissertation in klarerem Licht. Dafür, und für die freundliche Aufnahme in ihrem Team, danke ich ihr sehr.

Ihr unermüdlicher Einsatz für die Hämostaseologie im Bereich der Wissenschaft, aber auch für die klinisch Tätigen und damit letztlich für die Patient\*innen verdient großen Respekt.

Auch möchte ich Herrn Professor Brandt für seine wertvollen und ausführlichen Hinweise hinsichtlich epidemiologischer oder laborchemischer Aspekte danken. Sie waren mir Ansporn, mich weiter in die Materie einzuarbeiten.

Und natürlich möchte ich herzlichst allen meinen anderen Kolleginnen und Kollegen der Gerinnungsambulanz - aber auch der anderen Institutsbereiche der Klinischen Chemie- für ihre Unterstützung danken. Dafür, dass sie mir stets hilfsbereit und ausführlich mit konstruktiven Hinweisen zur Seite standen und mir somit den Einstieg in die Hämostaseologie erleichtert haben.

Meiner Familie danke ich für ihren Zuspruch, nicht aufzugeben. Und um mit Ovid zu enden: „Der Tropfen höhlt den Stein“.