

**Veränderung der Thrombozytenfunktion  
und -aktivierung  
nach Regionaler Hyperthermie**

**Sonja Mitrenga**

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der Ludwig-Maximilians-  
Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann

Veränderung der Thrombozytenfunktion  
und -aktivierung  
nach Regionaler Hyperthermie

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sonja Mitrenga

aus

Göttingen

2005

Mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. E. Hiller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. W. Siess

PD. Dr. med. A. J. Reininger

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: PD. Dr. med. R. Pihusch

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2005

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	BEDEUTUNG DER HYPERTHERMIE .....	1
1.2	WIRKUNGSMECHANISMEN DER HYPERTHERMIE.....	3
1.2.1	<i>Zytotoxischer Effekt.....</i>	3
1.2.2	<i>Wirkungsverstärkung der Chemotherapie.....</i>	4
1.2.3	<i>Hitzeschockproteine .....</i>	4
1.2.4	<i>Einfluss der Hyperthermie auf die Mikrozirkulation .....</i>	5
1.2.5	<i>Hämostase und Hyperthermie .....</i>	6
1.3	FRAGESTELLUNG .....	6
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>8</b>
2.1	PATIENTENKOLLEKTIV .....	8
2.2	MESSZEITPUNKTE .....	8
2.3	PROBENGEWINNUNG.....	9
2.4	IN VITRO-BLUTUNGSZEIT .....	9
2.4.1	<i>Messprinzip.....</i>	9
2.4.2	<i>Durchführung.....</i>	10
2.5	AGGREGOMETRIE .....	11
2.5.1	<i>Messprinzip.....</i>	11
2.5.2	<i>Durchführung.....</i>	11
2.6	THROMBELASTOGRAPHIE.....	12
2.6.1	<i>Messprinzip.....</i>	12
2.6.2	<i>Durchführung.....</i>	13
2.7	ELISA .....	13
2.7.1	<i>Prinzip des ELISA .....</i>	14
2.7.2	<i>Durchführung des TAT-ELISA.....</i>	14
2.7.3	<i>Durchführung des Prothrombinfragment ELISA.....</i>	15
2.8	THROMBOZYTEN-DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....	15
2.8.1	<i>Oberflächenrezeptoren der Thrombozyten.....</i>	15
2.8.2	<i>Thrombozytäre Granula .....</i>	19
2.8.3	<i>Thrombozytenaktivatoren .....</i>	21
2.8.4	<i>Mikropartikel .....</i>	21
2.8.5	<i>Aggregate.....</i>	22

2.8.6	<i>Messprinzip</i> .....	22
2.8.7	<i>Durchführung</i> .....	23
2.9	BESTIMMUNG VON D-DIMER UND FIBRINOGEN.....	25
2.10	DATENAUSWERTUNG .....	26
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>27</b>
3.1	PATIENTENKOLLEKTIV .....	27
3.2	UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE.....	28
3.2.1	<i>In vitro-Blutungszeit</i> .....	28
3.2.2	<i>Aggregometrie</i> .....	30
3.2.3	<i>Thrombelastographie</i> .....	30
3.2.4	<i>Prothrombinfragmente und TAT-Komplexe</i> .....	32
3.2.5	<i>Thrombozytäre Oberflächenrezeptoren und Granula</i> .....	34
3.2.6	<i>Bestimmung der D-Dimere und der Fibrinogenspaltprodukte</i> .....	39
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>41</b>
4.1	Bedeutung und Durchführung der Durchflusszytometrie.....	41
4.1.1	<i>Bedeutung der Durchflusszytometrie</i> .....	41
4.1.2	<i>Durchführung der Durchflusszytometrie</i> .....	42
4.2	DISKUSSION DER MESSERGEBNISSE.....	43
4.2.1	<i>Veränderungen der Oberflächenrezeptoren der Thrombozyten</i> .....	43
4.2.2	<i>Veränderung der thrombozytären Granula</i> .....	46
4.2.3	<i>In vitro-Blutungszeit</i> .....	51
4.2.4	<i>Messung der TAT Komplexe und der Fibrinogenspaltprodukte</i> .....	53
4.2.5	<i>Chemotherapieeinfluss</i> .....	54
4.3	AUSBLICK .....	55
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>56</b>
	<b>ANHANG</b> .....	<b>58</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>60</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>73</b>
	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>74</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Therapieverlauf.....	9
Abbildung 2: PFA-100 .....	10
Abbildung 3: TEG.....	12
Abbildung 4: Thrombozyt im Ruhezustand .....	16
Abbildung 5: Thrombozyt in aktiviertem Zustand .....	17
Abbildung 6: Dotplot mit Thrombozytenwolke .....	23
Abbildung 7: In vitro-Blutungszeit nach Stimulation mit Kollagen/ADP und Kollagen/Epinephrin.....	29
Abbildung 8: R-Zeit, k-Zeit und Maximale Amplitude des TEG.....	31
Abbildung 9: TAT-Komplexe und Prothrombinfragmente bei einem Patienten im Verlauf...	33
Abbildung 10: Fluoreszenz des Rezeptors CD 41 und des Rezeptors CD 61 .....	34
Abbildung 11: Fluoreszenz des Rezeptors CD 29 und CD 49 .....	35
Abbildung 12: Aktivität des GPIb-V-IX Rezeptorkomplexes.....	36
Abbildung 13: Thrombozytäre Granula .....	37
Abbildung 14: Fibrinogenkonzentration von 10 Patienten vor und nach der Hyperthermietherapie .....	39
Abbildung 15: D-Dimerkonzentration von 10 Hyperthermiepatienten vor und nach der Therapie .....	40

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Pipettierschema.....	25
Tabelle 2: Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Tumoren.....	27
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Chemotherapieprotokolle .....	27
Tabelle 4: Häufigkeitsverteilung der verwendeten Chemotherapieprotokolle in der Hyperthermie- und der Chemotherapiegruppe.....	28
Tabelle 5: Hämatokrit und Anzahl der Thrombozyten .....	30
Tabelle 6: Ergebnisse der PFA-Zeit, der TEG-Bestimmung und der Aggregometrie .....	32
Tabelle 7: Messergebnisse des ELISA.....	33
Tabelle 8: Zusammenfassung Thrombozytenmarker .....	38
Tabelle 9: Messergebnisse für Mikropartikel und Aggregate .....	39
Tabelle 10: Messergebnisse differenziert nach Chemotherapie .....	58
Tabelle 11: Messergebnisse differenziert nach Chemotherapie .....	59

## **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AK	Antikörper
BSA	Albumin Bovine Fraction
CD	Cluster of Differentiation
DIC	Disseminated intravascular coagulation
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FSC	Forward Angle Light Scatter
GP	Glykoproteinkomplex
HSP	Heat Shock Protein
PFA	Platelet -Function-Analyzer
PPP	Platelet-Poor-Plasma
PRP	Platelet-Rich Plasma
RHT	Regional Hyperthermia (regionale Hyperthermie)
SSC	Side Scatter
TAT-Komplexe	Thrombin-Antithrombin-Komplexe
TEG	Thrombelastographie
TRAP-6	Thrombinrezeptor-Aktivator-Protein-6
WBH	Whole-Body Hyperthermia (Ganzkörperhyperthermie)
VWF	Von-Willebrand-Faktor



# 1 Einleitung

In der Behandlung von malignen Tumoren ist die Hyperthermie in den letzten Jahren zu einem wichtigen Bestandteil von multimodalen Therapiekonzepten geworden. Seit der Entdeckung der Hyperthermie als neue Therapieoption vor über hundert Jahren hat sich die Methode dank der technischen Möglichkeiten und der Grundlagenforschung in klinischen Studien etabliert.

## 1.1 *Bedeutung der Hyperthermie*

Hyperthermie kann als über die normale Körpertemperatur erhöhte Temperatur definiert werden (Hornback 1989). Die heilende Wirkung von Wärme ist schon seit vielen Jahrhunderten bekannt. Vor über hundert Jahren entstand die Idee einer Krebsbehandlung mit Hitze, als Busch 1866 den Rückgang eines Gesichtssarkoms bei einer Patientin nach wiederholter Erysipel-Infektion beobachtete. Seitdem wurde Wärme als Behandlungsmaßnahme in verschiedenen Bereichen Beachtung geschenkt. Zur Jahrhundertwende wurden die ersten wissenschaftlichen Untersuchungen zur therapeutischen Wirkung von lokaler Wärmeapplikation bei Uterus- und Zervixtumoren von Percy (1916) und Mayo (1913, 1915) durchgeführt (Hornback 1989).

In den sechziger Jahren begannen erste Arbeitsgruppen, sich mit den thermobiologischen Effekten der Hitze auf Tumorzellen zu beschäftigen. Zudem wurde in klinischen Studien die Wirksamkeit von Hitze auf maligne Tumoren untersucht. Ende der sechziger Jahre wurde von Stehlin et al. eine Perfusionstherapie mit Hyperthermie und zytostatischen Medikamenten simultan bei Melanompatienten durchgeführt. Diese Behandlungsmethode zeigte ein größeres Ansprechen und eine höhere fünf Jahresüberlebensrate als vorherige Therapien (Di Filippo et al. 1998). Seitdem hat sich Hyperthermiebehandlung zu einem Bestandteil der Behandlung maligner Tumoren verschiedener Entitäten, wie z.B. Weichteilsarkome, Cervixcarcinome, Rectumcarcinome, Ösophaguscarcinome, Hals- und Kopftumoren, Melanome und Mammacarcinomen, entwickelt und wird bei lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Tumoren mit kurativem und palliativem Ziel in klinischen Studien eingesetzt (Falk et al. 2001).

Grundsätzlich werden drei verschiedene Hyperthermiemethoden in der internistischen Onkologie unterschieden, die je nach Tumortiefe, -größe und Metastasierungsgrad in der Behandlung von malignen Tumoren eingesetzt werden:

1. die Regionale Hyperthermie (RHT)
2. die lokale Hyperthermie (beinhaltet die oberflächliche Hyperthermie und interstitielle Hyperthermie)
3. die Ganzkörperhyperthermie (WBH).

Die Applikation der Wärme kann mit verschiedenen Techniken erfolgen. Zum einen besteht die Möglichkeit, Erwärmung durch elektromagnetische Felder hervorzurufen. Zudem werden Ultraschall oder die Perfusions-Methode angewendet. Die Messung der Temperatur im erwärmten Gewebe erfolgt derzeit über thermosensitive Katheter, die vor der Behandlung entweder CT gesteuert oder operativ im Tumorgewebe bzw. in der Nähe des Tumors platziert werden müssen, da noch keine geeignete Nicht-Invasive Methode etabliert ist (Falk et al. 2001).

In der klinischen Anwendung wird die Hyperthermie mit anderen Therapiemodalitäten kombiniert:

1. Hyperthermie und zytostatische Behandlung
2. Hyperthermie und Radiatio
3. Dreifachkombination aus Hyperthermie mit Radio- und Chemotherapie.

Die Wirksamkeit der Kombination von Hyperthermie und systemischer Chemotherapie konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden. In einer Phase II Studie wurden Patienten mit Weichteilsarkomen mit einer neoadjuvanten Kombinationstherapie aus Hyperthermie und einer Chemotherapie behandelt. Es folgte die Operation mit Bestrahlung und erneuter adjuvanter Chemotherapie. Es konnte gezeigt werden, dass das Ansprechen auf die präoperative Therapie prädikativ für ein besseres lokalrezidivfreies Überleben war und dieses auch Auswirkungen auf das Gesamtüberleben hatte (Wendtner et al. 2002). Im Rahmen einer derzeit laufenden Phase III Studie sollen nun die neoadjuvante Hyperthermie/Chemotherapie mit der alleinigen Chemotherapie verglichen werden, um den Einfluss der Hyperthermie auf die Tumorkontrolle und das Überleben zu bestimmen (Issels et al. 2001).

Schon 1909 schlug Schmidt vor, Hyperthermie mit Röntgenstrahlung zu kombinieren, um eine höhere Strahlensensibilität zu erreichen. In aktuellen Untersuchungen konnte dieser Effekt ebenfalls nachgewiesen werden. Eine Studie an Lymphknoten-positiven Hals-Nasen-

Ohren Plattenepithelkarzinomen ergab für die Patienten, die eine Kombination aus Strahlen- und Wärmebehandlung erhielten, einen signifikant höheren Anteil an Remissionen gegenüber alleiniger Strahlentherapie (Valdagni et al. 1988). In der Behandlung von Zervixkarzinomen konnten ebenfalls positive Ergebnisse für die gemeinsame Behandlung mit Radiatio und Hyperthermie im Vergleich zu konventioneller Radiatio gezeigt werden (van der Zee et al. 2000).

Auch für die Dreifachkombination gibt es positive Ergebnisse bei der Behandlung von Rektum- und Ösophaguskarzinomen (Issels 1999).

## **1.2 Wirkungsmechanismen der Hyperthermie**

In den letzten 20 Jahren wurde ein großer Schwerpunkt auf die Erforschung der Wirkungsmechanismen der Hyperthermie gelegt. Zum einen wird dem direkten zytotoxischen Effekt eine Wirkung zugeschrieben. Zum anderen ergeben sich indirekte Auswirkungen, die für die positiven Ergebnisse der Hyperthermiebehandlung verantwortlich gemacht werden. Die Wärmezufuhr führt zu einer Verstärkung der Radio- und Chemotherapiesensibilität. Außerdem ergeben sich aus der Veränderung der Durchblutung, des pH-Wertes und dem Einfluss auf die Hämostase weitere verstärkende Effekte. Neueste Erkenntnisse sprechen der Hyperthermie auch eine immunmodulatorische Eigenschaft zu.

Im Folgenden werden die direkten und indirekten Wirkungsmechanismen und Effekte der Hyperthermiebehandlung vorgestellt.

### **1.2.1 Zytotoxischer Effekt**

Erwärmung bewirkt eine direkte Zytotoxizität auf die Zellen, die allerdings einen relativ geringen Anteil an der Wirksamkeit der Hyperthermiebehandlung in der Krebstherapie hat. Die Zytotoxizität ist abhängig von der erreichten Temperatur, der Expositionsdauer und der Phase des Zellzyklusses, in der sich die Zelle gerade befindet. Besonders sensibel auf Hitze reagieren die Zellen in der S-Phase und der Mitose (Engin 1996, Feyerabend et al. 1999). Zudem wird die Hitzesensibilität der Zellen von Umgebungsfaktoren beeinflusst, wie dem pH-Wert und der Oxygenierung (Issels 1999). Eine Erhöhung der Temperatur auf über 43°C führt in Abhängigkeit der Dauer zum Zelltod (Nekrose) durch Denaturierung der Proteine (Engin 1996). Diese Temperaturen werden in der Hyperthermietherapie typischerweise im weniger durchblutetem Tumorgewebe erreicht, da die Wärmekonvektion in minderdurchblutetem Gewebe geringer ist (Issels 1999). Zudem sind hypoxische Zellen hitzesensibler, als ausreichend oxigenierte Zellen (Dewey et al. 1980). Werden keine

ausreichend hohen Temperaturen erreicht (Temperaturen  $<42^{\circ}\text{C}$ ), kann dies zu einer Thermoresistenz der Tumorzellen führen (Engin 1996, Issels 1999).

### **1.2.2 Wirkungsverstärkung der Chemotherapie**

Neben der direkten zytotoxischen Wirkung der Hyperthermie wird dieser Behandlung ein chemotherapiesensibilisierender Effekt zugeschrieben (Issels 1999). Die Toxizität von bestimmten Zytostatikern kann durch die Hyperthermie erhöht werden. In *in vitro* und *in vivo* Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Effektivität von Alkylantien wie z. B. Cyclophosphamid, Ifosfamid und Melphalan, gesteigert werden kann. Bei Melphalan besteht eine lineare Korrelation zwischen der erreichten Temperatur und der Wirksamkeit der Kombinationstherapie (Di Filippo et al. 1998). Die Interaktion der Zytostatika mit Hyperthermie kann in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden: 1. unabhängige Wirkung (z.B. 5-Fluorouracil und Methotrexat), 2. Additive Wirkung (z.B. Cyclophosphamid und Ifosfamid) und 3. eine synergistische Wirkung (z.B. Cisplatin und Carboplatin) (Issels 1999). Zusätzlich zur Erhöhung der Toxizität führt die Hyperthermie dazu, dass bestehende Resistenzen auf chemotherapeutische Agenzien durch die Applikation von Wärme zum Teil reversibel sind (Di Filippo et al. 1998, Feyerabend et al. 1999, Issels 1999). Die Erwärmung bewirkt bis zu einer bestimmten Temperatur in gut vaskularisiertem Gewebe zunächst eine Durchblutungssteigerung und führt damit zu einer Erhöhung der lokalen Wirkstoffkonzentration der Chemotherapie. Außerdem wird der Hemmung von Reparaturmechanismen zur Beseitigung therapieinduzierter DNA-Schäden eine Rolle zugeschrieben (Engin 1996). Des Weiteren existieren neue Therapieansätze, in denen hitzesensible Liposomen eingesetzt werden sollen, um eine hohe lokale Wirkstoffkonzentration von zytostatischen Substanzen im Tumor zu erreichen (Hildebrandt et al. 2004, Kong et al. 2000, Issels 1999)

### **1.2.3 Hitzeschockproteine**

Hitzeschockproteine (HSP) sind eine Gruppe von Stressproteinen, die auf vielen Zellen zu finden sind. Sie werden vermehrt exprimiert, wenn die Zellen verschiedenen Arten von Stress ausgesetzt werden (z.B. Hitze, Infektion, toxische Stoffe, Ischämie und Alterung) und haben die Aufgabe, die zellulären Funktionen zu schützen (Polanowska-Grabowska et al. 2000).

HSP können außerdem als Antigen wirksam sein und als Immunstimulator fungieren. Während der Hyperthermie kommt es zu einer vermehrten Expression bestimmter HSP. Bestimmte Tumoren weisen erhöhte Konzentrationen von HSP auf, bzw. zeigen abnorme Expressionsformen dieser Proteine (Fuller et al. 1994).

HSP sind unter anderem in Thrombozyten zu finden. Während der Plättchenaktivierung kommt es zu Veränderungen der verschiedenen HSP.

#### **1.2.4 Einfluss der Hyperthermie auf die Mikrozirkulation**

Ein weiterer indirekter hyperthermieinduzierter Faktor der Tumorschädigung ist die Mikrozirkulationsstörung. In mehreren histologischen Untersuchungen nach Hyperthermiebehandlung zeigten sich dilatierte Gefäße mit Hämorrhagien und Stase, Nekrosen, Endothelschädigungen und Gefäßrupturen. Es wurde auch eine erhöhte Adhäsionsneigung der Leukozyten an das Endothel der Tumorgefäße beobachtet (Emami et al. 1984). Diese eindeutigen Zeichen von Mikrozirkulationsstörungen bestätigten Bogovic et al. in Befunden von Osteosarkomen nach der Behandlung mit neoadjuvanter lokaler Hyperthermie in Kombination mit einer Chemo- und Radiotherapie (Bogovic et al. 2001).

Es können drei verschiedene Mechanismen unterschieden werden, welche die hyperthermieinduzierte Stase beeinflussen: rheologische Faktoren, intravaskuläre und endotheliale Veränderungen, sowie lokale, hämodynamische Veränderungen (Reinhold et al. 1986).

Im Tumorgewebe ist die Blutversorgung schon primär durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Zu nennen sind die Gefäßarchitektur mit pathologischem Wandaufbau, dilatierte bzw. komprimierte Kapillaren, heterogene Durchblutung mit über- und unterversorgten Arealen, Gefäßshunts mit arteriovenösen Kurzschlußverbindungen, Fehlen der Basalmembran, Endothelödem und nekrotische Areale mit niedrigem pH-Wert (Reinhold et al. 1986). Als wichtiger Unterschied zum gesunden Gewebe wird die gesteigerte Endothelproliferation der Tumorgefäße mit folgender Instabilität gesehen. Eine Endothelzellschädigung resultiert in einer Inhibition der Gefäßproliferation (Fajardo et al. 1994).

Dudar et al. und Derwhirst et al. kamen in experimentellen Studien zu dem Ergebnis, dass eine Stase eher in Tumorgefäßen mit geringer Wärmezufuhr erfolgt, als in den Gefäßen gesunden Gewebes. Initial führt Wärme zu einer Steigerung des Blutflusses, die bei Erreichen einer bestimmten Temperatur und einer bestimmten Dauer der Temperaturerhöhung in eine Verringerung des Blutflusses umschlägt. Je nach Höhe kann auch eine vaskuläre Stase mit Verschluss der Gefäße erreicht werden. In gesundem Gewebe liegt die zu erreichende Temperatur signifikant höher als in Tumorgewebe (Dudar et al. 1984, Reinhold et al. 1986). Song et al. und Emami et al. stellten in ihren Experimenten keine Zunahme des Blutflusses bei Temperaturen um 40-41 ° C fest. Die Autoren wiesen jedoch ebenfalls eine Reduktion der

Durchblutung bei höheren Temperaturen in malignem Gewebe nach (Song 1984, Emami et al. 1984).

Bicher et al. zeigten, dass es mit dem initialen Anstieg der Durchblutung auch zu einer Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks im erwärmten Gewebe kommt, welcher mit Verringerung des Blutflusses auch wieder korrelativ abnimmt. Es wurde zudem eine Abnahme des pH-Wertes im Tumorgewebe bei erhöhten Temperaturen beobachtet (Bicher et al. 1981, Song 1984). Erklärbar ist dies durch die Mangel durchblutung mit verminderter Oxygenierung, die wiederum zu anaerober Glycolyse mit Anhäufung von Laktat und resultierender Abnahme des pH-Wertes führt (Reinhold et al. 1986, Engin 1996, Feyerabend et al. 1999).

### **1.2.5 Hämostase und Hyperthermie**

Wie zuvor beschrieben, bewirkt die Erwärmungsbehandlung eine Veränderung der Mikrozirkulation im erwärmten Gebiet. In Resektaten nach Hyperthermiebehandlung wurden histologische Veränderungen im Sinne einer Stase und Nekrose gefunden (Emami et al. 1984, Bogovic et al. 2001). Es konnten Endothelzellschädigungen mit Formation von Thromben beobachtet werden (Fajardo et al. 1994).

Strother et al. stellten in einer Studie, die verschiedene Gerinnungsparameter während und nach Ganzkörpererwärmung untersuchte, fest, dass es zu einer Aktivierung der Thrombozyten in vivo und zu einer Stimulation des Fibrinolyse systems kommt (Strother et al. 1986). Vorherige Untersuchungen der hämostaseologischen Arbeitsgruppe des Klinikums Großhadern bestätigen die Ergebnisse Strothers durch den Nachweis eines Anstiegs von Fibrinopeptid A und Plättchenfaktor 4 als Zeichen einer Plättchenaktivierung nach regionaler Hyperthermie (Peleska 1989).

Es wird zudem ein direkter Effekt auf Endothelzellen vermutet, der mit der Erhöhung des Plasminogen-activator-inhibitor 1 Antigens (PAI-1) einhergeht und einen negativen Effekt auf die Fibrinolyse hat (Fajardo et al. 1994, Fukao et al. 1995, Tamura et al. 1996).

### **1.3 Fragestellung**

An den in Abschnitt 1.2 vorgestellten Mechanismen der Hyperthermie ist erkennbar, dass viele Effekte die Wirkung der Behandlung beeinflussen. Das komplexe Zusammenspiel ist jedoch nur zum Teil erforscht. Besonders der Effekt der Hyperthermie auf das Gerinnungssystem und die Thrombozyten wurde bisher nur wenig untersucht.

Die oben genannten Ergebnisse lassen jedoch die Hypothese zu, dass es während der Hyperthermietherapie zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems, insbesondere der

Thrombozyten kommt. Da bei Tumorpatienten eine erhöhte Thrombophilieneigung besteht, hätte dies große klinische Relevanz (Prandoni et al. 1999, Sallah et al. 2002).

Ziel dieser Arbeit ist es, zum besseren Verständnis der Hyperthermieeffekte *in vivo* beizutragen. Der Schwerpunkt soll hierbei auf die Auswirkungen der Wärme auf das Gerinnungssystem und die Thrombozyten gelegt werden. Mit Hilfe der neuartigen Untersuchung der Thrombozyten-Durchflusszytometrie soll der Aktivierungsgrad der Thrombozyten vor und nach der Hyperthermiebehandlung bestimmt werden. Zudem werden weitere globale Gerinnungstests, wie die *in vitro*-Blutungszeit, die Aggregometrie und die Thrombelastographie, durchgeführt.

## **2 Material und Methoden**

Im Folgenden werden der Studienaufbau und die verwendeten Untersuchungsmethoden detailliert dargestellt.

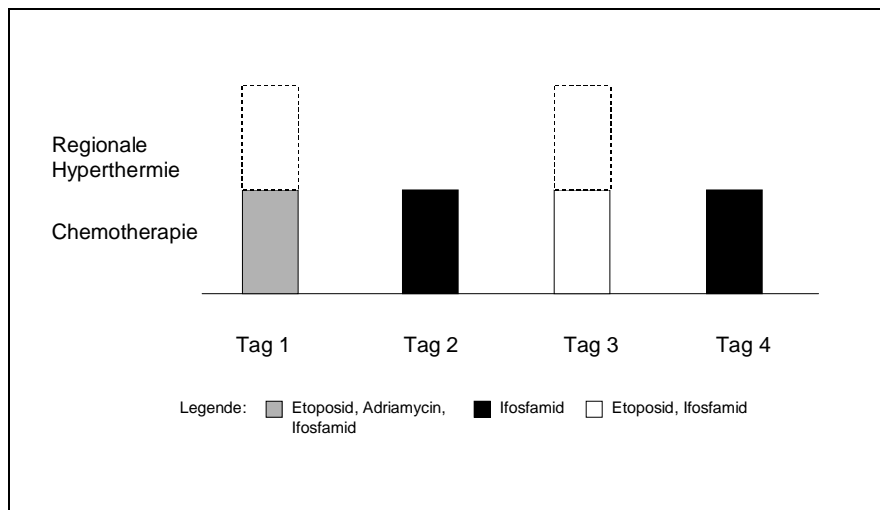
### **2.1 *Patientenkollektiv***

In die Studie wurden insgesamt 43 Patienten der 3. Medizinischen Klinik des Klinikums Großhadern der LMU München aufgenommen, wovon einige mehrfach eine Blutprobe abgaben. Eingeschlossen wurden Patienten mit soliden, zum Teil metastasierten Tumoren, die sich einer kombinierten Behandlung mit regionaler Hyperthermie und systemischer, Ifosfamid-basierter Chemotherapie unterzogen. Als Vergleichsgruppe wurden Patienten gewählt, die nur eine systemische Chemotherapie mit zytostatischen Substanzen gleicher Gruppe erhielten. Ausgeschlossen wurden Patienten, die bis zu zehn Tage vor der Messung Medikamente mit Einfluss auf die Thrombozytenfunktion (z.B. Acetylsalicylsäure) eingenommen hatten. Die Studie wurde vor Beginn von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU München bewilligt. Die Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zu der Untersuchung.

### **2.2 *Messzeitpunkte***

Bei jedem Patienten wurden zwei Messungen durchgeführt. Eine Blutabnahme erfolgte vor der Therapie (kombinierte Hyperthermie und Chemotherapie bzw. nur zytostatische Therapie). Die zweite Blutuntersuchung erfolgte nach der jeweiligen Behandlung. In Abbildung 1 ist schematisch der Ablauf einer Hyperthermiebehandlung am Beispiel des EIA-Protokolls dargestellt. Je nach Tumorentität wird die Hyperthermie mit verschiedenen zytostatischen Regimen kombiniert.





**Abbildung 1: Therapieverlauf**

## **2.3 Probengewinnung**

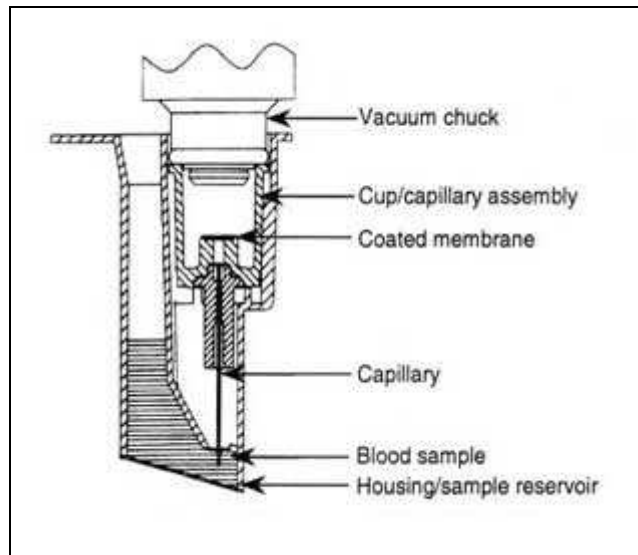
Die Blutabnahme erfolgte direkt vor Beginn der Therapie mit einer weitlumigen Kanüle (21G) bei einem Stauungsdruck von ca. 40 mmHg. Für die durchflusszytometrische Messung der Thrombozytenfunktion wurde ein Zitratröhrchen (0,43 ml Zitrat-Lösung, Firma Kabe) verwendet, welches unmittelbar nach der Abnahme in einen Eiswasserbehälter gestellt und innerhalb von 30 Minuten verarbeitet wurde. Diese Vorgehensweise sollte eine Autoaktivierung der Thrombozyten verhindern. Zwei weitere Zitratröhrchen wurden für die Aggregationsmessung und die Erstellung eines Thrombelastogramms abgenommen. Für die Messung der in vitro-Blutungszeit wurde ein mit 0,129 M Natriumzitrat gepuffertes Gerinnungsröhrchen der Firma Dade Behring (Schwalbach) benötigt.

## **2.4 In vitro-Blutungszeit**

### **2.4.1 Messprinzip**

Die in vitro-Blutungszeit ist ein relativ neues Verfahren, das versucht, die in vivo Bedingungen der Gefäße nachzuahmen, um so Störungen der primären Hämostase wie z.B. der Thrombozytenadhäsion und -aggregation zu erkennen. Das System des Platelet-Function-Analyzer (PFA) besteht aus einer Kapillare, durch welche das Probenblut unter konstantem Sog zu einer mit Kollagen beschichteten Membran mit zentraler Öffnung transportiert wird. In der Kapillare werden die hämodynamischen Bedingungen einer Arteriole und mit der Membranöffnung eine verletzte Gefäßwand simuliert. Der Kontakt der Thrombozyten mit dem Kollagen führt zur Aktivierung der Thrombozyten. Des Weiteren ist die Membran mit

den Thrombozytenagonisten Epinephrin oder ADP bestückt. Nach der Plättchenaktivierung kommt es durch Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten zur Ausbildung eines Blutgerinnsels an der Membran, welches zu einer Minderung des Blutflusses führt. Die Öffnung in der Membran wird immer mehr verengt, bis der Blutfluss vollständig zum Erliegen kommt. Das PFA-System überwacht kontinuierlich den Blutstrom und das Blutvolumen vom ersten Kontakt mit der Membran bis zum kompletten Verschluß der Öffnung. Dieses Zeitintervall wird als Verschlusszeit bezeichnet und gilt als Indikator für die Thrombozytenfunktion in der untersuchten Probe. Die Verschlusszeit wird außerdem von der Thrombozytenzahl, dem Hämatokrit und Medikamenten beeinflusst (Harrison 2005). Abbildung 2 zeigt den Aufbau des verwendeten PFA.



**Abbildung 2: PFA-100**

### **2.4.2 Durchführung**

Für die Messung der *in vitro*-Blutungszeit wurde das PFA 100 System der Firma Dade Behring verwendet. Vor den Messungen wurde täglich eine Selbsttestung des Gerätes durchgeführt. Die Blutabnahme erfolgte, wie oben beschrieben, in ein Röhrchen mit 3,8% gepuffertem Natriumcitrat. 800 µl der Probe wurden in eine DADE PFA 100 Messzelle pipettiert, auf 37° C erwärmt und unter konstantem Unterdruck von 20 mmHG durch eine Kapillare (Durchmesser 150 µm) aspiriert. Am Ende der Kapillare befand sich eine Membran, die entweder mit 2 µg Kollagen, Typ I (Pferd) und 10 µg Epinephrin-Bitartrat oder mit 50µg Adenosin-5`-Diphosphat benetzt war. Diese Kollagen/Epinephrin bzw. Kollagen/ADP Membran wurde vor Beginn der Messung mit Dade PFA Start-Lösung, bestehend aus 0,9%

Natriumchloridlösung, angefeuchtet. Das System registriert die Verschlusszeit, den Blutfluss pro Sekunde und das Blutvolumen, das bis zum Kapillarverschluß benötigt wurde.

## **2.5 Aggregometrie**

### **2.5.1 Messprinzip**

Thrombozyten reagieren auf eine Vielzahl von Reizen durch Änderung der Form, Aneinanderlagerung und Aggregation. Die Thrombozytenaggregation kann in vitro mit Hilfe der turbidometrischen Aggregometrie nach Born bestimmt werden. Durch Zugabe von thrombozytären Agonisten, wie z.B. Kollagen und ADP in unterschiedlichen Konzentrationen, wird eine Thrombozytenstimulation indiziert. Die voranschreitende Aggregation führt zu der Formation von Plättchenaggregaten, die eine Zunahme der Lichttransmission bewirken. Diese wird fortlaufend photometrisch erfasst. Aus der Änderung der Lichttransmission lässt sich das Maß für Aggregabilität der Thrombozyten ableiten. Die Aggregometrie kann zwar eine Veränderung der Thrombozytenreaktivität in einer bestimmten klinischen Situation zeigen, es ist jedoch keine Differenzierung einer direkten Aktivierung möglich (Michelson 1993).

### **2.5.2 Durchführung**

Das Blut für die Aggregometrie wurde, wie oben beschrieben, in ein Citratröhrchen entnommen. Nach vorsichtigem Wenden wurde das Citratblut bei Raumtemperatur bei 1200 Umdrehungen/min (200 G) für zehn Minuten zentrifugiert. Das plättchenreiche Plasma wurde abpipettiert und nach Bestimmung der Plättchenzahl mit dem Cell Counter (H 6000 Analyser, Coulter, USA) bei Raumtemperatur aufbewahrt, um eine sekundäre Aktivierung der Thrombozyten durch Kälte zu verhindern. Das restliche Citratblut wurde bei 5000 Umdrehungen/min (400 G) zehn Minuten scharf abzentrifugiert. Der verbleibende Plasmaüberstand, das plättchenarme Plasma (PPP = Platelet Poor Plasma), wurde entnommen. Durch entsprechende Verdünnung mit dem PPP wurde das plättchenreiche Plasma auf 200.000 Thrombozyten/ $\mu$ l eingestellt. Dieses standardisierte Plasma wird im Folgenden PRP (Platelet Rich Plasma) genannt.

Die Messung erfolgte eine Stunde nach der Blutabnahme, um zu vermeiden, dass die bei Gefäßwandverletzung frei werdenden Hemmstoffe der Thrombozytenaggregation, wie z. B. Prostacyclin, in der Probe aktiv sind und die Ergebnisse beeinflussen. Zur Messung der Aggregation wurde das Aggregometer Labor APACT verwendet. Als Referenzwert diente plättchenarmes Plasma, welches den 100%-Wert der Lichttransmission darstellte. Die

Änderung der Lichttransmission unter ständiger Bewegung mit einem Magnetrührer wurde im zeitlichen Verlauf als Kurve registriert. Die Aggregation der Thrombozyten wurde als Zunahme der Lichttransmission erfasst. Durch Zugabe von den Aggregationsinduktoren Kollagen und ADP in verschiedenen Konzentrationen wurde die Schwellendosis des jeweiligen Agonisten bestimmt, die eine 50% Aggregation auslöst.

## 2.6 Thrombelastographie

### 2.6.1 Messprinzip

Die Thrombelastographie (TEG) ist eine Untersuchung, die einen globalen Überblick über das Gerinnungssystem gibt, der sowohl den humoralen sowie den thrombozytären Teil erfasst. Das TEG besteht aus einem oszillierenden Zylinder (Cup), der auf 37° C erwärmt wird. In den Cup wird zu Beginn der Untersuchung Citratblut unter Zugabe von Calcium pipetiert. Ein Stift (PIN), der an einem Torsionsdraht befestigt ist, wird frei hängend in die Küvette herabgelassen. Der Torsionsdraht ist mit einem elektromagnetischen Aufnehmer verbunden, der die Auslenkung des Pins auf einem Papier registriert. In Abbildung 3 ist der Aufbau eines Thrombelastographen und eine normale TEG-Kurve schematisch dargestellt.

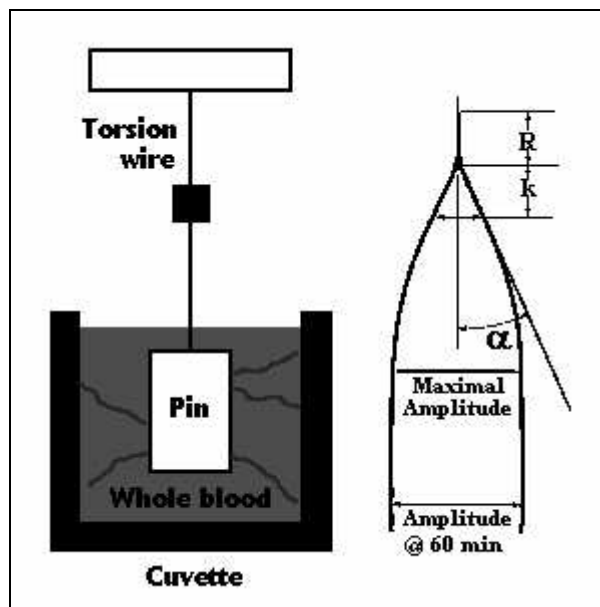


Abbildung 3: TEG

Während das Blut noch flüssig ist, hat die Oszillation der Küvette keinen Effekt auf den Pin. Beginnt jedoch das Blut zu gerinnen, überträgt sich die Rotation durch die Fibrinfäden und Scherkräfte auf den Pin. Diese Auslenkung und damit die kinetischen Veränderungen der

Blutprobe werden durch den Schreiber registriert. Es gibt vier Parameter, die zur Interpretation des TEG herangezogen werden.

1. R-Zeit (Reaktionszeit) ist der Zeitraum von der Gabe der Probe in die Küvette bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Amplitude des TEG 2 mm beträgt. Dies ist als Zeichen einer signifikanten Gerinnungsbildung zu bewerten.
2. K-Zeit ist der Zeitraum vom Ende der R-Zeit bis die Amplitude auf 20 mm angewachsen ist. Sie repräsentiert die Zeit, die benötigt wird, um eine bestimmte Elastizität des Fibrinthrombus zu erreichen und ist abhängig von intrinsischen Gerinnungsfaktoren, Fibrin und der Thrombozytenzahl und -funktion.
3. Der Winkel  $\alpha$  ist ein weiterer Parameter, der die Zeit der Thrombusbildung widerspiegelt. Er wird vom Beginn der K-Zeit an das TEG angelegt.
4. MA (Maximale Amplitude) beschreibt die größte Amplitude des TEG und stellt somit die maximale Festigkeit des Gerinnsels dar. Die Stabilität des Blutgerinnsels setzt sich aus den Komponenten Fibrinogen (20%) und der Thrombozytenzahl und -aktivität (80%) zusammen. Danach beginnt die Fibrinolyse und die Amplitude des TEG verringert sich wieder.

## **2.6.2 Durchführung**

Von jedem Patienten wurden innerhalb einer Stunde nach Blutabnahme 340  $\mu$ l einer Blutprobe (Zitratröhrchen) mit 20 $\mu$ l einer 0,2 molaren Calciumchloridlösung in einem Cup vermischt. Als Verdunstungsschutz wurde die Lösung noch mit 200 $\mu$ l Parafinöl beschichtet. Für die Messung wurde der Thrombelastograph Thrombomed der Firma D Helling verwendet. Der Papiervorschub betrug zwei mm pro Minute. Die Messung wurde nach eindeutigem Überschreiten der Maximalen Amplitude und Beginn der Fibrinolyse beendet.

## **2.7 ELISA**

Zur Untersuchung einer intravasalen Gerinnungsaktivierung wurden die Konzentrationen von Thrombin/Antithrombin III-Komplexen (TAT-Komplexe) und Prothrombinfragment mittels ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) bestimmt.

TAT-Komplexe entstehen bei der Aktivierung des Gerinnungssystems mit Bildung von Thrombin aus Prothrombin. Thrombin, das Schlüsselenzym für die Fibrinbildung aus Fibrinogen, wird durch den physiologischen Inhibitor Antithrombin III (AT III) kontrolliert. AT III bildet dabei mit Thrombin gerinnungsaktive TAT-Komplexe, die bei präthrombotischen Zuständen und DIC erhöht im Blut nachweisbar sind.

Erhöhte Prothrombinfragmentspiegel sind ebenfalls ein Zeichen für Hyperkoagulabilität, sie reflektieren eine erhöhte in vivo Thrombinbildung. Prothrombinfragmente entstehen bei der Umwandlung von Prothrombin in Thrombin, welches eine Schlüsselfunktion in der gemeinsamen Endstrecke des extrinsischen und intrinsischen Gerinnungssystems einnimmt. Es werden zwei Fragmente unterschieden: Fragment eins enthält den Calcium- und Phospholipid-bindenden Anteil des Prothrombins. Fragment zwei sorgt für die Interaktion mit Faktor V (Hiller et al. 2002). Man findet eine höhere Konzentration dieser Fragmente bei tiefer Beinvenenthrombose, peripherer arterieller Verschlusskrankheit und bei Lungenembolien (Woller et al. 1999).

### **2.7.1 Prinzip des ELISA**

Mit einem ELISA können spezifische Antigene, Antikörper und Haptene quantitativ nachgewiesen werden. Bei der sogenannten Sandwich-Technik, bei der zwei Antikörper verwendet werden, ist der eine Antikörper an eine feste Phase (z.B. Zellulose oder Polystyrol) gebunden. Das zu untersuchende Material mit unbekannter Antigenkonzentration wird hinzugefügt. Im ersten Inkubationsschritt bindet das Antigen an diesen im Überschuss vorliegenden Antikörper. Nach Auswaschen des Überstandes wird in einem weiteren Inkubationsschritt ein zweiter Enzym-markierter Antikörper hinzugegeben. Dieser ist gegen ein weiteres Epitop des Antigens gerichtet. Es entsteht ein Sandwichkomplex, der das Antigen von beiden Seiten umschließt. Die enzymatische Aktivität des zweiten Antikörpers kann im Probenansatz durch Zugabe eines chromogenen Substrates bestimmt werden und ist proportional zu der Konzentration des gebundenen Antigens.

### **2.7.2 Durchführung des TAT-ELISA**

Zur Durchführung des TAT-ELISA wurde eine ELISA-Kit Enzymgnost® TAT micro der Firma DAD Behring eingesetzt.

Zunächst wurden 50 µl des Puffers (Tris Pufferlösung (100mmol/l), Tween (10ml/l) EDTA (37g/l)) und 50 µl der Proben in die mit Antikörper gegen Human-Thrombin beschichtete Mikrotitrationsplatte pipettiert. Nach Durchmischen und einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 37°C wurde der Ansatz drei mal mit der Waschlösung POD (Tween-haltig (18g/l) Phosphatpufferlösung (90 mmol/l)) gewaschen, um den Überschuss zu entfernen. Danach wurden 100 µl der Konjugatlösung (Anti-Human-ATIII, Peroxidase konjugiert) pipettiert. Der Ansatz wurde im Anschluss 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Überstand erneut dreimal ausgewaschen. Nun wurden dem Ansatz 100 µl Chromogene

Substratlösung (o-Phenylendiamin-dihydrochlorid) hinzugefügt. Nach 30-minütiger Inkubationszeit bei 20-25°C an einem lichtgeschütztem Ort wurde der Ansatz mit 100 µl 0,5 N Schwefelsäure gestoppt. Innerhalb einer Stunde wurde die Absorption im ELISA-Reader (MRX, Fa Dynatech Laboratories, Channel Islands, UK) bei einer Messwellenlänge von 492 nm bestimmt. Zur Erstellung der Standardkurve wurden vier mitgelieferte Standardproben und ein Kontrollplasma mit bekannter TAT Konzentration in gleicher Weise angesetzt und gemessen. Die zugehörigen Adsorptionswerte wurden erfasst und anhand der Bezugskurve konnten die Konzentrationen der Proben bestimmt werden.

### **2.7.3 Durchführung des Prothrombinfragment ELISA**

Zur Bestimmung der Prothrombinfragmente wurde der ELISA-Kit Enzygnost® F1+F2 der Firma DADE Behring verwendet.

Zuerst wurden 50 µl des Probenpuffers (Tween-haltige Tris-Pufferlösung, Kochsalz) in die mit Antikörpern gegen menschliches Prothrombinfragment 1+2 beschichtete Mikrotitrierplatte vorgelegt. Anschließend wurden 50 µl der Proben hinzu pipettiert. Der Ansatz wurde nach gutem Durchmischen bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Nach zweimaligem Auswaschen des Überstandes wurden 100 µl der mit Peroxidase konjugierten Anti-Human Prothrombin Lösung hinzugegeben. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 15 Minuten bei 37°C wurde der Ansatz dreimal gewaschen, bevor 100 µl o-Phenylendiamin-dihydrochlorid hinzu pipettiert wurden. Bei Raumtemperatur wurde der Ansatz nun für 15 Minuten lichtgeschützt inkubiert und dann mit 100 µl verdünnter Schwefelsäure(0,5 N) gestoppt.

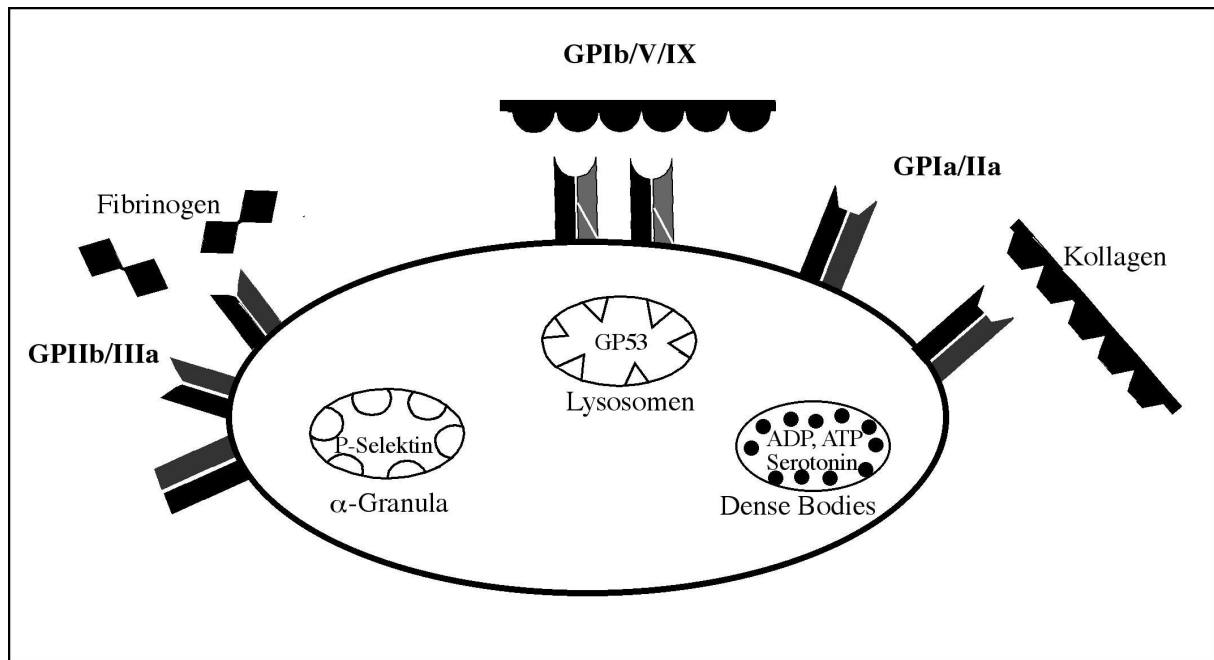
## **2.8 Thrombozyten-Durchflusszytometrie**

### **2.8.1 Oberflächenrezeptoren der Thrombozyten**

Auf den Thrombozyten befinden sich viele membranständige Glykoproteine, welche die thrombozytäre Adhäsion und Aggregation und die Interaktion mit plasmatischen Gerinnungsfaktoren, Endothelzellen und Leukozyten vermitteln. Die thrombozytären Adhäsionsrezeptoren können aufgrund ihre Molekülstruktur in vier Gruppen eingeteilt werden: die Integrine, die leuzinreichen Glykoproteine, Selektine und Rezeptoren vom Typ der Immunglobuline (Gawaz 1999). Diese Rezeptoren sind durch spezifische Antikörper auf ruhenden Thrombozyten nachweisbar. Da sich die Anzahl und Konformation der Oberflächenrezeptoren bei Stimulation der Blutplättchen verändert (Abrahams et al. 1991),

kann der Aktivierungsgrad der Thrombozyten mit Hilfe der Glykoproteinrezeptoren bestimmt werden.

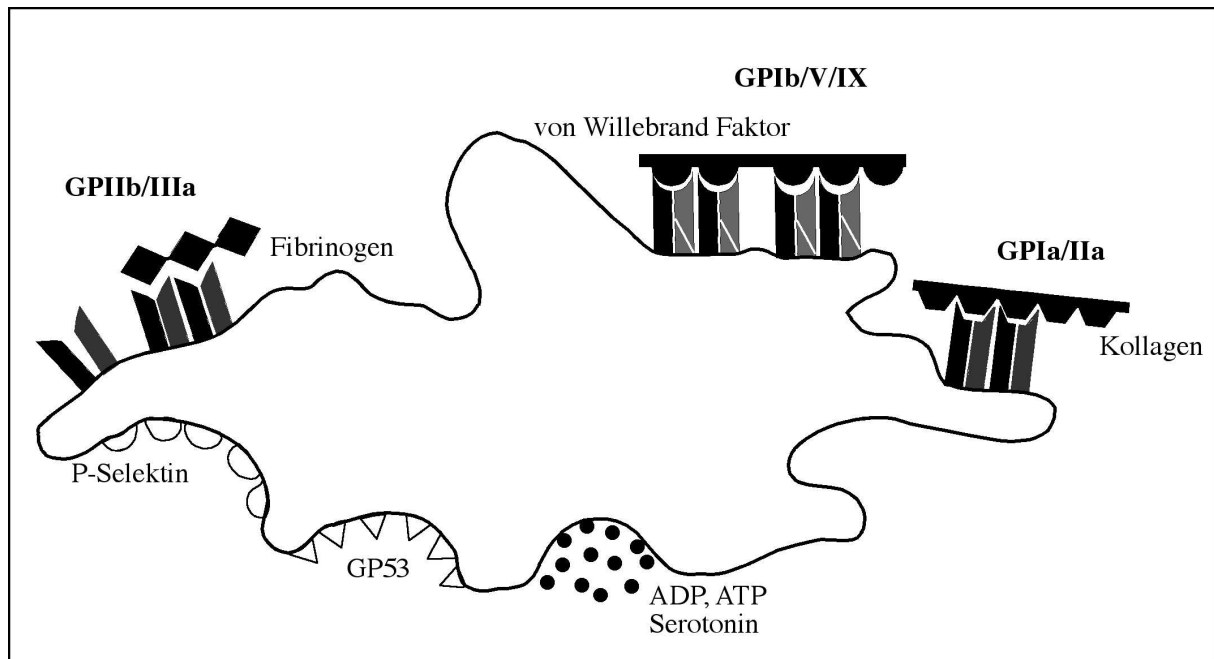
Im Inneren der Thrombozyten finden sich außerdem drei verschiedene Granulatypen, die  $\alpha$ -Granula, Lysosomen und die Dense bodies. Sie besitzen spezifische Inhaltstoffe, die bei Aktivierung der Blutplättchen an die Oberfläche transportiert werden. Abbildung 4 zeigt einen Thrombozyt im Ruhezustand.



**Abbildung 4: Thrombozyt im Ruhezustand**

In Abbildung 5 ist ein Thrombozyt im aktivierten Zustand dargestellt. Im Unterschied zum Ruhezustand haben sich Pseudopodien gebildet und die Membranrezeptoren werden in verminderter bzw. erhöhter Anzahl auf der Oberfläche der Blutplättchen präsentiert. Die Granula setzen ihre Inhaltstoffe durch Exozytose frei.





**Abbildung 5: Thrombozyt in aktiviertem Zustand**

Im Folgenden werden die wichtigsten Oberflächerezeptoren der Thrombozyten und die Granulainhaltsstoffe vorgestellt, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

### 2.8.1.1 GPIIb-IIIa

Der heterodimere Glykoproteinrezeptorkomplex GPIIb-IIIa gehört der Gruppe der Integrine an und besteht, wie alle Integrinrezeptoren, aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit (Phillips et al. 1988). Diese beiden Untereinheiten sind über Calciumbrücken nicht-kovalent miteinander verbunden. Bei dem Rezeptor handelt es sich um einen transmembranären Rezeptor, der einen extrazellulären Bereich und eine intrazelluläre Verbindung zum Zytoskelett besitzt. Der extrazelluläre Kopf beinhaltet eine Bindungsstelle für die Aminosäure-Sequenz Arginin-Glycin-Asparagin (RGD), die allen Adhäsivproteinen, wie Fibronectin, Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor, Vitronectin und Thrombospondin, gemeinsam ist. Diese wird jedoch erst nach Thrombozytenaktivierung und folgender Konformationsänderung des Rezeptors für die Liganden zugänglich. Neben der Adhäsion besteht die Hauptaufgabe des GPIIb-IIIa in der Vermittlung der Thrombozytenaggregation. Wichtigster Vermittler dieses Vorgangs ist das Fibrinogen (Beer 1992).

Der Rezeptorkomplex hat die höchste Dichte der Glykoproteinrezeptoren mit ungefähr 50000 Kopien pro Thrombozyt. Davon sind etwa 70% an der Thrombozytenmembran unstimulierter Plättchen lokalisiert, während 30% im Thrombozyteninneren im surface-connected-system und in den  $\alpha$ -Granula befinden (Gawaz 1999). Kommt es zu einer Plättchen Stimulation, werden diese an die Oberfläche exprimiert.

Zur quantitativen Darstellung des GPIIb-IIIa Komplexes wurden zwei verschiedene Antikörper verwendet. Mit Hilfe des Anti-CD 41 - Antiköpers ( Klon SZ 22) wurde die GPIIb Domäne markiert. Für die Demarkierung des GPIIIa wurde der IgG 1 Anti-CD 61 - Antikörper (Klon SZ21) verwendet. Beide Antikörper wurden als FITC-gelabelte IgG1-Antikörper von der Firma Immunotech (Hamburg) bezogen. Die jeweiligen Fluoreszenzmaxima lagen bei:

Anti-CD 41-Antikörper	5 µg/ml
Anti-CD 61-Antikörper	2 µg/ml.

### **2.8.1.2 GPIa-IIa, GPIc-IIa, GPc'-IIa**

Ebenfalls in die Gruppe der Integrine gehören der Kollagenrezeptor GPIa-IIa, der Fibronectinrezeptor GPIc-IIa und der Lamininrezeptor GPc'-IIa. Sie besitzen dieselbe  $\beta$ 1-Untereinheit, so dass dies Rezeptoren strukturell in einer Gruppe zusammengefasst werden können (Gawaz 1999). Während der Integrinrezeptor IIB-IIIa nur auf Megakaryozyten und Thrombozyten zu finden ist, sind diese Rezeptoren auch auf anderen Zellen, wie z. B. auf Lymphozyten und Fibroblasten verankert (Scharf 1997). Alle drei Rezeptoren sind mit 1.000-2.000 Kopien pro Thrombozyt nur in geringer Anzahl vertreten. Es wird vermutet, dass sie eine supportive Rolle in der Thrombozytenadhäsion spielen. Bis jetzt ist die genaue Funktion und Wirkungsweise nur für die GPIa-IIa vermittelte Plättchenadhäsion über Bindung mit dem Kollagen Typ I-IV der subendothelialen Matrix erforscht (Saelman et al. 1994).

Zur Markierung der GPIIa-Domäne fand der Anti-CD 29 –FITC Antikörper (Klass IgG 2a, Klon K20) Verwendung. Das GPIa des Kollagenrezeptors wurde mit Hilfe des Anti-CD 49b-FITC Antiköpers (Klasse IgG1, Klon Gi9) dargestellt. Beide Antikörper lieferte die Firma Immunotech, Hamburg.

Das jeweilige Fluoreszenzmaximum lag bei folgender Konzentration:

Anti-CD 29-Antikörper	5 µg/ml
Anti-CD 49b-Antikörper	2 µg/ml.

### **2.8.1.3 GPIb-V-IX**

Der Glykoproteinrezeptorkomplex GPI-V-IX ist der wichtigste Adhäsionsrezeptor der Thrombozyten und gehört in die Gruppe der leucinreichen Glycoproteine. Der Komplex befindet sich mit ungefähr 25.000 Kopien auf der Thrombozytenoberfläche und setzt sich aus vier Polypeptidketten zusammen (Beer 1992). Die Rezeptorkomponente GPIb besteht aus

einer großen  $\alpha$ -Untereinheit und einer kleinen, phosphorylierten  $\beta$ -Untereinheit. Letztere stellt den wichtigsten Teil des Rezeptorkomplexes dar. Die aminoternale globuläre Domäne des GPIb $\alpha$  besitzt eine essentiellen Bindungsstelle für den VWF und für Thrombin und vermittelt darüber die Adhäsion an die subendotheliale Matrix, insbesondere unter hohen Scherkräften (Clementson et al. 2001). Der von-Willebrand-Faktor kann jedoch erst nach einer Konformationsänderung oder nach Reduktion der elektrischen Ladung des GPIb an die Domäne andocken (Beer 1992).

Die Markierung des GP Ib-V-IX –Komplexes erfolgte mit dem IgG2a Antikörper anti-CD 42a-FITC und dem IgG1 Antikörper anti-CD42b-FITC (Firma Immunotech, Hamburg). Der monoklonale Antikörper anti-CD 42a-FITC bindet spezifisch an den GPIIX, sofern dieser im Komplex mit GPIb vorliegt. Anti-CD42b-FITC lagert sich an die GPIb Domäne an.

Die für das Fluoreszenzmaximum verwendeten Konzentrationen lagen bei:

Anti-CD 42a-FITC-Antikörper	5 $\mu$ g/ml
Anti-CD 42b-FITC-Antikörper	5 $\mu$ g/ml

## **2.8.2 Thrombozytäre Granula**

### **2.8.2.1 $\alpha$ -Granula**

$\alpha$ -Granula sind Speicherorganellen, die sich im Inneren der Thrombozyten befinden und einen Anteil von 15% des Plättchenvolumens ausmachen. Sie speichern unter anderem Fibrinogen, „platelet-derived growth factor“ (PDGF), „transforming growth factor- $\beta$ “ (TGF- $\beta$ ), Thrombospondin, Vitronektin, VWF, P-Selektin, GPIIb-IIIa, Faktor V und Faktor VIII, Plasminogen, Plättchen Faktor 4, Plasminogenaktivatorinhibitor-1, Immunglobuline und Komplementfaktoren. Durch die Vielzahl von Speicherproteinen spielen sie eine wichtige Rolle in den Thrombozytenreaktionen, so wie der Aggregation und Interaktion mit anderen Zellen, der Gerinnung, der Fibrinolyse und in Entzündungs- und Immunreaktionen (Harrison et al. 1993, Morgenstern 1998).

Zur Evaluation der  $\alpha$ -Granula wurde das P-Selectin herangezogen. Es handelt sich hierbei um ein Glycoprotein, welches in unstimulierten Thrombozyten in der Membran der  $\alpha$ -Granula zu finden ist. Nach Thrombozytenaktivierung kommt es bei der Exozytose der  $\alpha$ -Granula zur Fusion der Granulamembran mit der Thrombozytenmembran. Zudem geben die Granula durch Verschmelzung mit dem offenen kanalikulären System ihre Inhaltsstoffe in den Extrazellulärraum ab (Gawaz 1999). Während P-Selektin auf ruhenden Thrombozyten nur in

geringer Anzahl (<1.000) nachgewiesen werden kann, finden sich auf stimulierten Plättchen bis zu 10.000 P-Selektin Proteine. P-Selektin wird die Vermittlung der Interaktion zwischen aktivierten Thrombozyten mit Neutrophilen und Monozyten zugeschrieben. Es kann somit inflammatorische Reaktionen in Leukozyten triggern (Abrahams et al. 1991).

Zur Detektion des P-Selectin wurde der Anti-CD 62P-Antikörper (Klon CLB-Thromb/6) verwendet in einer Konzentration von:

Anti-CD 62P-Antikörper                      5 µg/ml.

### **2.8.2.2 Lysosomen**

Lysosomen sind ebenfalls intrazelluläre Organellen der Blutplättchen, die Hydrolasen, Kathepsin und Glukosidasen in ihrem Inneren speichern. Um eine Sekretion der Lysosomen hervorzurufen, bedarf es eines stärkeren Stimulus mit hohen Thrombin- oder Kollagenkonzentrationen, als zur Degranulation der  $\alpha$ -Granula und Dense Bodies. Ist die Aktivierung ausreichend, kommt es zur Expression von intralysosomalen Membranproteinen auf der Oberfläche der Thrombozyten. Inzwischen wurden drei dieser Proteine näher beschrieben: LIMP-CD 63, Lamp-1 und Lamp-2 (Metzelaar et al. 1992). CD 63, welcher als erstens identifiziert wurde, kann als spezifischer Marker einer abgelaufenen Thrombozytenaktivierung herangezogen werden (De Groot et al. 1998). Es wurde mit Anti-CD63-Antikörper (Klon CLB-gran12) markiert, in einer Konzentration von:

Anti-CD 63-Antikörper                      5 µg/ml.

### **2.8.2.3 Dense bodies**

„Dense bodies“ sind Speicherorganellen der Thrombozyten, die niedrig-molekulare, elektronenoptisch dichte Substanzen wie Serotonin, ATP, ADP und Calcium speichern. Diese werden beim Aktivierungsprozess aus den Speichern freigesetzt, aktivieren zirkulierende Plättchen und verstärken dadurch die Aggregation (Gawaz 1999, McNicol et al. 1999). Mepacrin ist ein spezifischer Fluoreszenzmarker der die Fähigkeit besitzt, durch die Zellmembran zu permeieren und von den Dense bodies gespeichert zu werden. Kommt es zu einer Aktivierung der Thrombozyten, so wird das Mepacrin aus den Dense bodies freigesetzt, und es kommt zu einer verminderten Fluoreszenz der Plättchen (Wall et al. 1995).

In dieser Arbeit wurde das in PBS-Puffer gelöste Mepacrin der Firma Sigma (Deisenhofen) verwendet in einer Konzentration von:

Mepacrin                                      5 µmol/l.

### **2.8.3 Thrombozytenaktivatoren**

Es gibt starke und schwache Thrombozytenaktivatoren. Zu den starken Thrombozytenaktivatoren zählt neben Calcium-Inophor und Thrombin auch das Thrombin-Rezeptor-Aktivator Peptid (TRAP). Hierbei handelt es sich um ein Peptid, bestehend aus sechs Aminosäuren, das den Thrombinrezeptor direkt aktivieren kann. Der Thrombinrezeptor besteht aus sieben transmembranären Domänen, an deren extrazellulärem Anteil sich die Thrombinbindungsstelle befindet (Brass et al. 1992). Wenn sich Thrombin an den Rezeptor anlagert, kommt es zu einer Spaltung des Rezeptors mit Freilegung eines neuen Liganden für die Rezeptoraktivierung (Brass et al. 1994). TRAP entspricht in seiner Aminosäuresequenz diesem Liganden und kann so eine Aktivierung hervorrufen, ohne den Thrombinrezeptor zu spalten. Durch die Vermittlung von „second-messenger“ kommt es dann zu einer intrazellulären Calciummobilisation mit folgender Aggregation und Exocytose von Granulainhaltsstoffen (Gawaz 1999). Bei der Stimulation der Blutplättchen durch TRAP entsteht jedoch im Unterschied zu Thrombin keine Fibringerinnsel, so dass es gut in der Durchflusszytometrie als Aktivatorsubstanz herangezogen werden kann (Michelson 1996). TRAP-6 wurde von der Firma Bachem (Bubendorf, Schweiz) bezogen. Die Substanz wurde in PBS-Puffer gelöst bei  $-30^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Adenosindiphosphat (ADP) stellt im Gegensatz zu TRAP nur einen schwachen Plättchenaktivator dar. Es vermittelt im Wesentlichen über zwei purinerge Rezeptoren (P2X1 und P2Y1) die Freisetzung von intrazellulärem Calcium, was dann weitere Aktivierungsschritte in Gang setzt (Gawaz 1999). Es wurde von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen, in PBS-Puffer gelöst und bei  $-30^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die verwendeten Konzentrationen der Thrombozytenaktivatoren sind dem Pipetierschema der Tabelle 1 zu entnehmen.

### **2.8.4 Mikropartikel**

Nach starker Stimulation der Thrombozyten kommt es zu einer Abschnürung von Zytoplasmafragmenten. Diese zeigen eine starke prokoagulatorische Wirkung, da sie Oberflächenkomponenten von aktivierten Thrombozyten aufweisen (Morgenstern 1998). Das Ausmaß der Mikropartikelbildung korreliert mit der plättchenabhängigen prokoagulatorischen Aktivität und kann ebenfalls in der Durchflusszytometrie anhand des charakteristischen Streulichtes und der plättchenspezifischen Immunreaktivität bestimmt werden.

### **2.8.5 Aggregate**

Ein Teil der Thrombozyten adhärirt nach Aktivierung an zirkulierende Leukozyten und Endothelzellen und entgeht so der durchflusszytometrischen Analyse. Die Anzahl der Leukozyten- und der Thrombozytenaggregate wurden bestimmt, um Aussagen über das Ausmaß der gebildeten Aggregate machen zu können.

### **2.8.6 Messprinzip**

Die Durchflusszytometrie ist ein Analyseverfahren, in dem die physikalischen und biochemischen Parameter von Zellen in einer Suspension gemessen werden. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass jede einzelne Zelle beim Passieren eines fokussierenden Lichtstrahls von diesem erfasst wird. Das einfallende Licht wird gestreut und die Art des Streulichtes erlaubt es, Aussagen über die Zellen zu treffen. Der Anteil des Vorwärtstreulichtes (Forward Angle Light Scatter – FSC) ist sensitiv für die Querschnittsfläche der Zelle und gibt dadurch Informationen über die Zellgröße. Das Streulicht, das im rechten Winkel zum einfallendem Licht gestreut wird, bezeichnet man als Seitwärtstreulicht (Side Scatter- SSC) und ist abhängig von der Granularität, der Zelldichte, der Membranfaltung und der äußeren Form der Zelle (Hilbe et al. 1994). Die Analyse wird dann durch die Summe der vielen Einzelmessungen vorgenommen. So können in einer Vollblutprobe die verschiedenen Zellpopulationen differenziert werden. Um noch spezifischere Informationen zu einzelnen Zellgruppen zu bekommen, werden diese vor der Messung mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern beladen. Dieser Farbstoff wird durch die Lichtquelle angeregt und die Emission des Farbstoffes gemessen (Raffael et al. 1994).

Abbildung 6 zeigt die mittels CD 41-PE detektierte Thrombozytenwolke, Thrombozytenaggregate und Mikropartikel. Im rechten unteren Quadranten befinden sich die Erythrozyten. Aufgetragen ist die Fluoreszenz zwei gegen den Side Scatter (SSC).

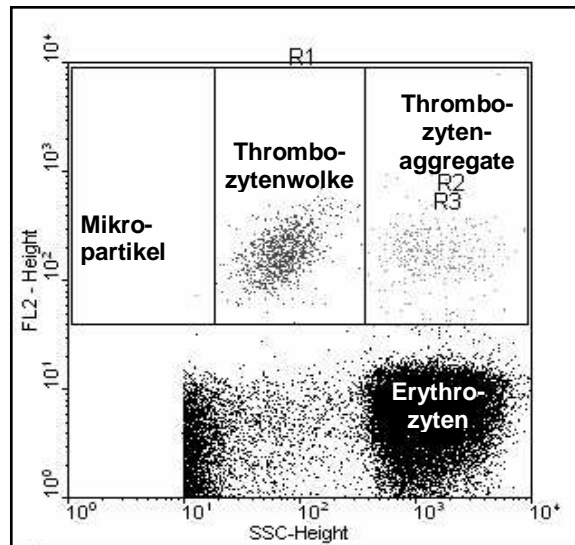


Abbildung 6: Dotplot mit Thrombozytenwolke

In der Thrombozytendurchflusszytometrie werden mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Oberflächenantikörper verwendet (Abrahams et al. 1991, Wall et al. 1995). Dazu wird ein Antikörper benötigt, der vom Aktivierungsgrad der Thrombozyten unabhängig ist und so zur Erkennung der Zellpopulation dient. Gleichzeitig werden aktivierungsabhängige Antikörper eingesetzt, die gegen Oberflächenproteine gerichtet sind, die je nach Funktionszustand der Plättchen ihre Anzahl und Konformation ändern. Die vom Fluoreszenzdetektor gemessene Fluoreszenzstärke spiegelt die Rezeptordichte auf den Thrombozyten wieder. Diese Methode erfasst sehr sensitiv kleine Veränderungen der Oberflächenmarker und erlaubt es, Aussagen über den Funktionszustand der Thrombozyten zu treffen (Ault 2001).

### 2.8.7 Durchführung

Alle durchflusszytometrischen Messungen der Thrombozyten wurden an unfixiertem Vollblut durchgeführt. Das für die Durchflusszytometrie abgenommene Zitratblut wurde sofort nach der Gewinnung in Eiswasser gelagert und innerhalb von 45 Minuten bearbeitet, um eine ex vivo Aktivierung der Thrombozyten zu verhindern. Die Messansätze wurden in auf Eis gelagerten Falcon Röhrchen (Falcon Tubes Firma Becton Dickinson Labware, USA) pipettiert, das genaue Pippetierschema ist in

Tabelle 1 abgebildet. Nach Bestimmung der Thrombozytenzahl mit dem Cell Counter (H 6000 Analyser, Coulter, USA), wurden die Thrombozyten auf 10 G/l durch Verdünnung mit in PBS Puffer (Apotheke Klinikum Innenstadt der LMU-München) gelöstem BSA (Albumin,

Bovine Fraction V der Firma Sigma (Deisenhofen)) eingestellt. In zehn Röhrchen wurde zunächst eine bestimmte Menge des verdünnten Vollblutes vorgelegt. In jeden Messansatz wurde dann der zu bestimmende Antikörper pipettiert und der Thrombozytendetektionsantikörper IgG1-Anti-CD41-AK in einer Konzentration von 5 µg/ml (Klon P2, PE-gelabelt, Firma Becton Dickinson, Heidelberg) hinzugefügt. Die Ansätze inkubierten bei 37 °C fünf Minuten lang unter Lichtschutz. Danach wurde die Reaktion mit 2 ml Paraformaldehyd (PFA; 0,2% Paraformaldehyd in PBS-Puffer (0,1M, ph 7,3-7,4); Apotheke Klinikum Innenstadt LMU-München) gestoppt. Es wurden drei Messungen durchgeführt, bei denen die Thrombozyten zuerst mit ADP stimuliert wurden. Das verdünnte Vollblut wurde nach Zugabe von ADP zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der zu bestimmenden Antikörper und der Thrombozyten markierenden Antikörper. Nach erneuter Inkubationszeit von fünf Minuten wurde der Ansatz ebenfalls mit zwei ml PFA gestoppt. Zwei Messansätze wurden nach Vorgabe des Vollblutes und des Detektionsantikörpers mit Mepacrin gefärbt. Dies ist ein Farbstoff, welcher intrazellulär an die dense bodies der ruhenden Thrombozyten bindet. Die Ansätze wurden jeweils 30 Minuten bei 37°C inkubiert, bevor der erste Ansatz mit 250 µl PFA gestoppt wurde. Der zweite Ansatz wurde zusätzlich mit TRAP-6 (Thrombinrezeptor-Aktivator-Protein-6; Firma Bachem, Bubendorf, Schweiz) stimuliert, weitere zehn Minuten inkubiert und dann ebenfalls mit PFA gestoppt. Tabelle 1 zeigt die Konzentrationen der verschiedenen Antikörper und Stimulantien, die dem Vollblut der Patienten hinzugefügt wurden.



Antikörper	Antikörper-Menge	CD 41 PE	Adenosin-diphosphat	Thrombin-rezeptor-Aktivator-Protein-6	Vollblut
IgG1	5µl	5µl	-	-	24µl
CD 29	5µl	5µl	-	-	40µl
CD 49	2µl	5µl	-	-	43µl
CD 41	5µl	5µl	-	-	40µl
CD 61	2µl	5µl	-	-	43µl
CD 42 a	10µl	5µl	-	-	35µl
CD 42 b	10µl	5µl	-	-	35µl
CD 62 P	5µl	5µl	-	-	40µl
CD 62 P	5µl	5µl	4(100µM) µl	-	36µl
CD 63	10µl	5µl	-	-	35µl
CD63	10µl	5µl	9(100µM) µl	-	26µl
CD154	20µl	5µl	-	-	25µl
CD45	10µl	5µl	-	-	35µl
Mepacrin	5µl	5µl	-	-	40µl
Mepacrin	5µl	5µl	-	10(1mM)µl	30µl

Tabelle 1: Pipettierschema

Die Messung der Thrombozytären-Antikörper erfolgte mit dem Durchflusszytometer FACScan TM.Cytometer der Firma Becton Dickinson GmbH des Gerinnungslabors, Forschungslabor A, Klinikum Großhadern. Hierbei handelt es sich um ein Fünfparameter-Durchflusszytometer, welches simultan das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht mit einem Argonlaser (15 mW bei 488nm) misst. Das Zellanalysegerät besitzt 1024 Kanäle zur Signalauflösung, welche vier Dekaden logarithmisch verstärkt gemessen werden.

Um Tagesschwankungen der Messungen herauszufiltern, wurde täglich die Messung von vier Normbeads der Firma Wak Chemie durchgeführt und der MESF, der absolute Bezugswert, bestimmt. Mit diesem wurden die Messergebnisse verrechnet.

## **2.9 Bestimmung von D-Dimer und Fibrinogen**

Bei einem kleinen Kollektiv der Hyperthermiepatienten (zehn Patienten) wurden im Gerinnungslabor der Klinischen Chemie, Klinikum Großhadern, zusätzlich die Konzentration des D-Dimers und des Fibrinogen vor und nach der Hyperthermiebehandlung bestimmt. D-Dimere sind Fibrinspaltprodukte, die Rückschlüsse auf eine Hyperfibrinolyse geben können. Es ist z.B. bei Beinvenenthrombose und bei Lungenembolie erhöht. Der Fibrinogespiegel kann ebenfalls auf eine gesteigerte Fibrinolyse hinweisen. Die Konzentration würde durch den erhöhten Verbrauch absinken.

## **2.10 Datenauswertung**

Die Werte wurden zunächst in dem Programm Microsoft Excel erfasst und anschließend in SPSS Version 10.0 für Windows NT exportiert, womit die statistische Auswertung erfolgte. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Wilcoxon-Test. Das statistische Signifikanzniveau lag bei  $p \leq 0,05$ .

Um die Tagesschwankungen des FACS-Laseres herauszufiltern wurden die Mittelwerte der gemessenen Fluoreszenzwerte mit einem zusätzlich bestimmten Tagesfaktor dividiert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Patientenkollektiv

In die Studie wurden 43 Patienten der 3. Medizinischen Klinik des Klinikums Großhadern der LMU München aufgenommen, von denen sich einige zur mehrmaligen Blutentnahme bereit erklärten, so dass insgesamt 57 Messungen durchgeführt wurden. Der Hyperthermiearm setzte sich aus 40 Patienten zusammen, mit einem mittleren Alter von 49,6 Jahren ( $\sigma = 13,6$ ; Range: 24-70 Jahre), darunter 16 weibliche und 24 männliche Patienten. Die Vergleichsgruppe umfasste 17 Patienten, 4 Frauen, 13 Männer, mit einem durchschnittlichen Alter von 54,6 Jahren ( $\sigma = 11,4$ ; Range: 33-67 Jahre). Alle Patienten waren an einem soliden Weichteiltumor unterschiedlicher Histologie erkrankt (vgl. Tabelle 2).

Tumorentität	Hyperthermiepatienten	Chemotherapiepatienten
Liposarkom	11 (27,5%)	1 (5,9%)
Leiomyosarkom	5 (12,5%)	
MFH	10 (25,0%)	8 (47,1%)
Ewing Sarkom	1 (2,5%)	
Schwannom	4 (10%)	
Solide Karzinome	2 (5,0%)	3 (17,6)
Sonstige	7 (17,5%)	5 (29,4%)

**Tabelle 2: Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Tumore**

Die Chemotherapieprotokolle, mit denen die Patienten behandelt wurden, zeigt Tabelle 3.

Protokolle	Inhaltsstoffe	Konzentration (mg/m <sup>2</sup> )
Mini-ICE	Etoposid	150 mg/m <sup>2</sup> als Kurzinfusion in 250 ml 0,9% NaCL
	Ifosfamid	1500 mg/m <sup>2</sup> in 1000 ml 0,9% NaCL
	Carboplatin	100 mg/m <sup>2</sup> in 500 ml 0,9% NaCL
EIA	Etoposid	125 mg/m <sup>2</sup>
	Ifosfamid	1500 mg/m <sup>2</sup> in 1000 ml 0,9% NaCL
	Adriamycin	50 mg/m <sup>2</sup>
EI	Etoposid	125 mg/m <sup>2</sup> in
	Ifosfamid	1500 mg/m <sup>2</sup> in 1000 ml 0,9% NaCL
AI-G	Adriamycin	75 mg/m <sup>2</sup>
	Ifosfamid	1500 mg/m <sup>2</sup>

**Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Chemotherapieprotokolle**

In Tabelle 4 ist eine Häufigkeitsverteilung der verwendeten zytostatischen Regime aufgezeigt. Es wurde darauf geachtet, dass die Patienten bis zu 10 Tage vor der Messung keine Medikamente eingenommen hatten, die Einfluss auf die Blutgerinnung oder die

Thrombozytenfunktion haben könnten. Wenn in der Vorwässerung oder während der Chemotherapie die Gabe von Heparin notwendig war, so wurde dieses dokumentiert und berücksichtigt.

<b>Chemotherapien</b>	<b>Hyperthermiepatienten</b>	<b>Chemotherapiepatienten</b>
EIA	19 (47,5%)	4 (23,5%)
EI	13 (32,5%)	2 (11,8%)
Mini-ICE	6 (15%)	2 (11,8%)
AI-G	1 (2,5%)	4 (23,5%)
Ifosfamid	1 (2,5%)	4 (23,5%)
Adriamycin		1 (5,9%)

**Tabelle 4: Häufigkeitsverteilung der verwendeten Chemotherapieprotokolle in der Hyperthermie- und der Chemotherapiegruppe**

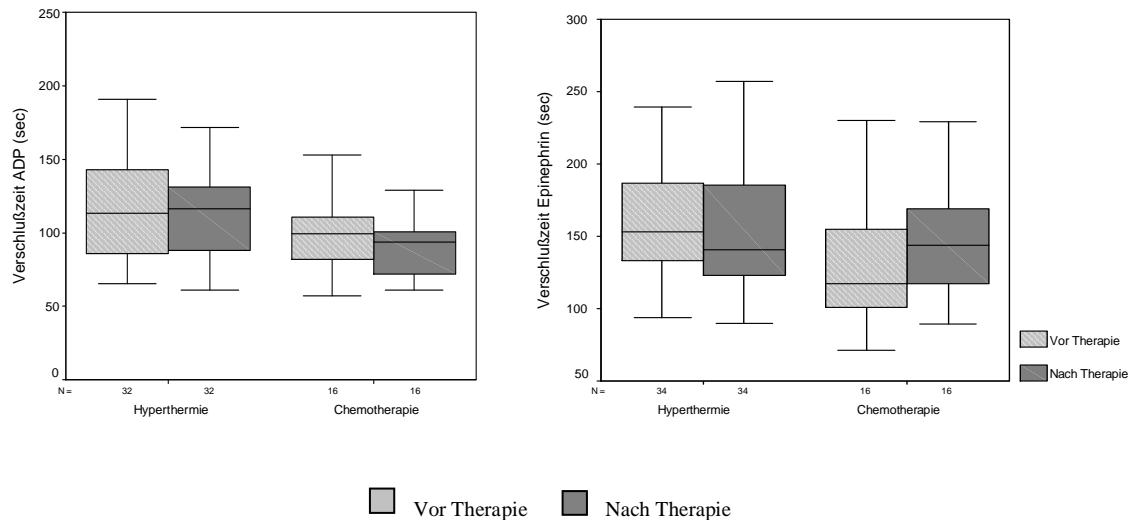
Um einen Einfluss der verschiedenen Chemotherapien auszuschließen, wurde das Studienkollektiv zunächst nach den Chemotherapien aufgeteilt. Die Analyse der verschiedenen Parameter zeigte keine Unterschiede zwischen den Chemotherapiegruppen. Deshalb wurde das Patientenkollektiv in zwei Gruppen aufgeteilt. Ein Arm mit und ein Arm ohne Hyperthermiebehandlung, ohne zusätzlich zwischen den Chemotherapieprotokollen zu unterscheiden. Die Ergebnisse der Auswertung nach Chemotherapie sind in Tabelle 10 und in Tabelle 11 im Anhang aufgelistet.

## **3.2 Untersuchungsergebnisse**

### **3.2.1 In vitro-Blutungszeit**

Die in vitro-Blutungszeit mit ADP ergab bei beiden Patientenkollektiven vor und nach der Therapie keine signifikante Veränderung. Es fiel jedoch auf, dass besonders in der Hyperthermiegruppe die Verschlusszeit häufig über den angegebenen Referenzwerten lag. Die Verschlusszeit nach Epinephrin-Stimulation in der Hyperthermiegruppe war unauffällig ( $p=0,726$ ), während in der Chemotherapiegruppe die Verschlusszeit tendenziell verlängert war. Diese Beobachtung war jedoch nicht statistisch signifikant ( $p=0,098$ ).

In Abbildung 7 ist die Blutungszeit mit Medianwerten und Spannweite in Sekunden dargestellt.



**Abbildung 7: In vitro-Blutungszeit nach Stimulation mit Kollagen/ADP und Kollagen/Epinephrin**

Angegeben sind Boxplots mit Medianwert, Minimum und Maximum, jeweils für die Hyperthermie- und die Chemotherapiegruppe vor und nach der Therapie. \* = signifikant zum Ausgangswert ( $p > 0,05$ ).

Die Referenzwerte der Verschlusszeit liegen bei 85-165 Sekunden für die Kollagen/Epinephrin Messzelle und bei 71-118 Sekunden für die Kollagen/ADP Messung. Es fiel auf, dass in der Hyperthermiegruppe die Verschlusszeiten bei einem großen Anteil der Patienten verlängert waren. Vor der Therapie wiesen 29% eine verlängerte in vitro Blutungszeit in der Epinephrin/Kollagen Messung auf, nach der Behandlung 38%. In der ADP/Kollagen- Messung ergab sich eine prolongierte Verschlusszeit bei 38% vor der Therapie und 50% nach der Therapie. In der Chemotherapiegruppe lagen 13% der Probanden über 165 Sekunden der Epinephrin- Verschlusszeit vor der Behandlung und 5% nach der Behandlung. In der Messung der ADP stimulierten in vitro Blutungszeit ergab sich eine Verlängerung in 18% der Fälle vor der Chemotherapie und in 23% nach der Behandlung. Diese Ergebnisse zeigten jedoch keine statistische Signifikanz im Chi-Quadrat-Test ( $p > 0,05$ ).

Da für die Bestimmung der in vitro Blutungszeit der Hämatokritwert und die Thrombozytenzahl einen wichtigen Einflussfaktor darstellen, wurden in beiden Gruppen diese Werte bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 aufgelistet sind.

	Hyperthermiegruppe	Chemotherapiegruppe
Hämatokrit (in %)	29,3 (18,6-44,3)	28,3 (21,8-37,5)
Thrombozyten (Anzahl pro dl)	286.700 (66.000-507.000)	316.430 (125.000-584.000)

**Tabelle 5: Hämatokrit und Anzahl der Thrombozyten.**

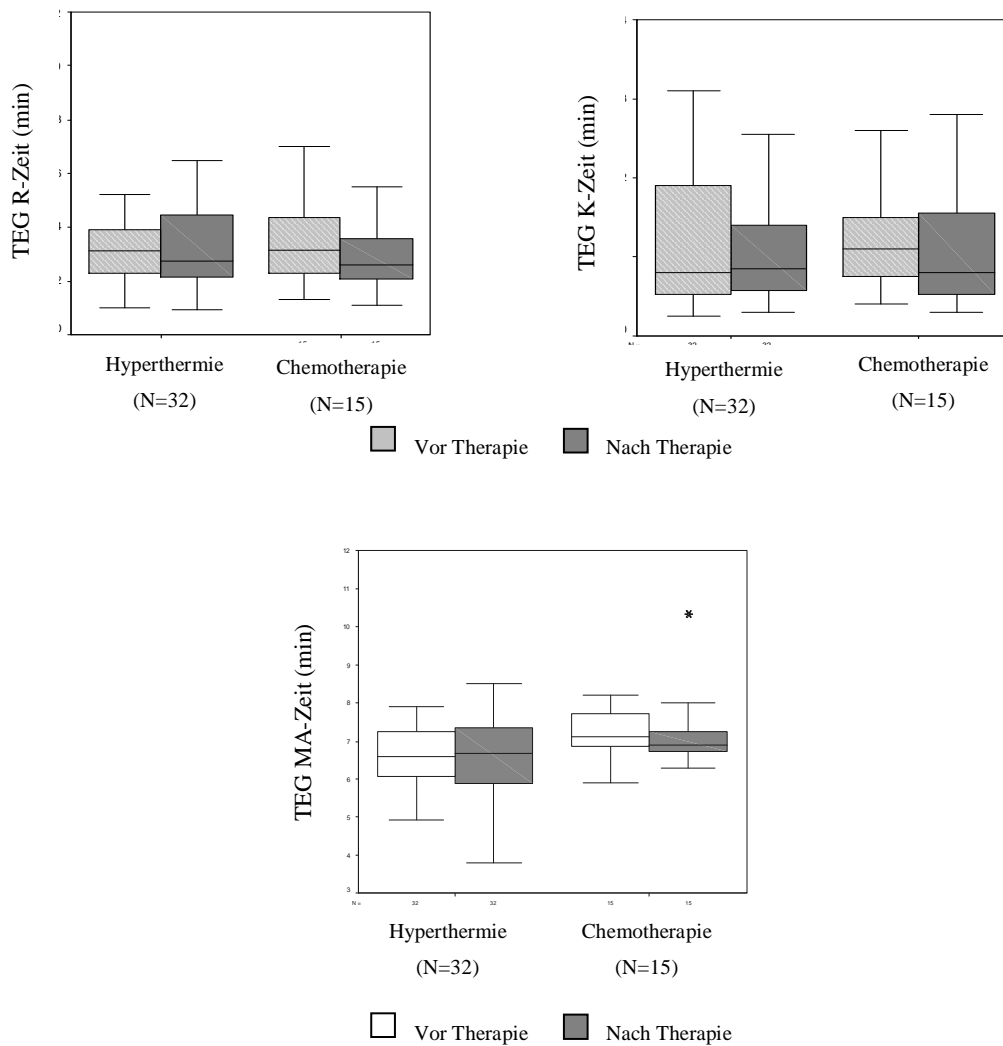
Angegeben Medianwert, Minimum und Maximum.

### 3.2.2 Aggregometrie

Die Untersuchung der Aggregationseigenschaft der Thrombozyten vor und nach der Hyperthermiebehandlung und vor und nach Chemotherapie zeigte keine signifikante Veränderung. Die Zugabe der Aggregationsinduktoren ADP und Kollagen um eine 50% Aggregation zu erreichen, erfolgte in den meisten Fällen in der gleichen Konzentration vor und nach der Behandlung. Die Daten der Aggregometrie sind in Tabelle 6 aufgelistet.

### 3.2.3 Thrombelastographie

Die Bestimmung der R-Zeit und der K-Zeit im TEG zeigte keine signifikanten Veränderungen vor und nach der Therapie, weder in der Hyperthermie- noch in der Chemotherapiegruppe. In der Chemotherapiegruppe nahm die MA-Zeit signifikant ( $p = 0,015$ ) ab, während die Hyperthermiegruppe keine bedeutende Ab- oder Zunahme zeigte. Die Bestimmung wurde nur bei den Patienten durchgeführt, die kurz vor und während der Therapie keine Wässerung mit Heparin erhielten. Die Medianwerte und die Spannweite der bestimmten Parameter sind in Tabelle 6 aufgelistet. Die folgende Abbildung zeigt die R-Zeit, k-Zeit und die maximale Amplitude für die Patientengruppe der Hyperthermie und der Chemotherapie, angegeben in Boxplots mit Medianwerten und Spannweite.



**Abbildung 8: R-Zeit, k-Zeit und Maximale Amplitude des TEG**

Angegeben sind Boxplots mit Medianwert, Minimum und Maximum, jeweils für die Hyperthermie- und die Chemotherapiegruppe vor und nach der Therapie. \* = signifikant zum Ausgangswert ( $p \leq 0,05$ )

	Hyperthermie		Chemotherapie	
	Vor	Nach	Vor	Nach
PFA Epinephrin [sec]	153 (94-300)	140,5 (90-300)	117,5 (71-230)	143 (89-229)
PFA ADP [sec]	111 (66-191)	117 (61-256)	99 (57-153)	94 (61-129)
R-Zeit [mm]	3,1 (1,0-9,60)	2,8 (0,95-10,5)	3,15 (1,3-11)	2,6 (1,1-8,4)
K-Zeit [mm]	0,8 (0,25-4,50)	0,9 (0,3-5,4)	1,1 (0,4-6,9)	0,8 (0,3-6,2)
MA-Zeit [mm]	6,6 (3,0-8,2)	6,5 (3,8-8,5)	7,1 (5,0-8,2)	6,9* (4,3-8,0)
Aggregation ADP [μl]	0,33 (0,0-2,0)	0,36 (0,0-2,0)	0,25 (0,06-0,63)	0,25 (0,13-0,5)
Aggregation Kollagen [μl]	0,25 (0,03-1,5)	0,5 (0,0-2,0)	0,25 (0,06-0,63)	0,36 (0,13-0,5)

**Tabelle 6: Ergebnisse der PFA-Zeit, der TEG-Bestimmung und der Aggregometrie.**

Angegeben Medianwert, Minimum und Maximum. \* = signifikant zum Ausgangswert ( $p \leq 0,05$ )

### 3.2.4 Prothrombinfragmente und TAT-Komplexe

Bei der Auswertung des Prothrombinfragment-ELISA zeigte sich kein bedeutsamer Anstieg der Prothrombinfragmentkonzentration nach Hyperthermiebehandlung in Kombination mit einer Chemotherapie und bei der Chemotherapie allein. Die Konzentrationsnorm gesunder Erwachsener liegt im Referenzbereich von 0,4-1,1 nm/l. Der Median beträgt 0,7 nmol/l. Es zeigte sich keine Abweichung der Patientengruppen zu den angegebenen Referenzwerten.

Auch die Thrombin-Antithrombinkomplexe nahmen in beiden Gruppen unter der jeweiligen Therapie nicht zu. Es zeigte sich jedoch, dass die Patienten der Studie deutlich höhere Konzentrationen des TAT Komplexes aufwiesen als die angegebenen Referenzwerte von gesunden Erwachsenen. Diese liegen bei 1,0-4,1 μg/l mit dem Median von 1,5 μg/l. Der Median der Hyperthermiegruppe beträgt 3,03 μg/l vor der Therapie und 4,1 μg/l nach der Erwärmungsbehandlung. In der Chemotherapiegruppe zeigte sich ein Median von 2,6 μg/l vor und nach der zytostatischen Behandlung. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der ELISA-Messungen dargestellt.

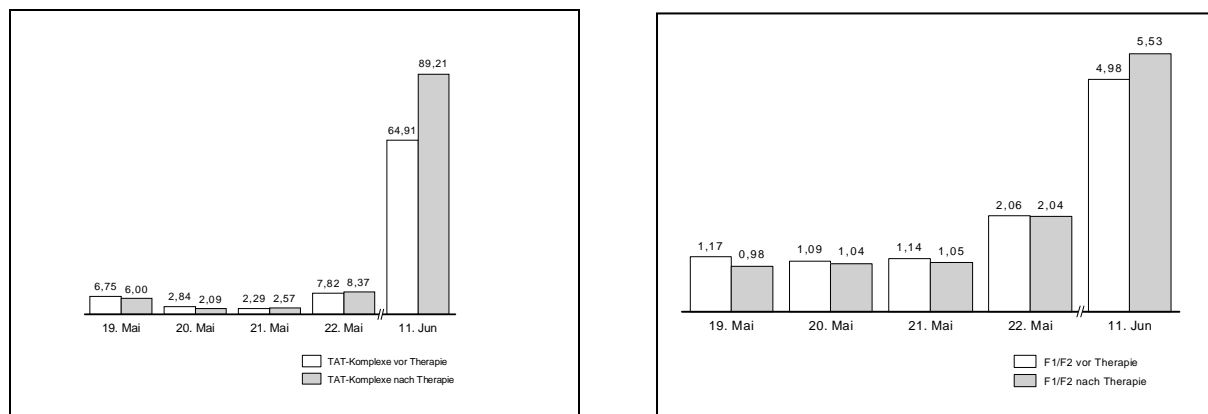


ELISA	Hyperthermie		Chemotherapie	
	Vor	Nach	Vor	Nach
TAT-Komplexe	3,03 (1,08-36,0)	4,1 (0,75-27,25)	3,6 (0,62-100,12)	2,5 (0,55-89,21)
Fibrinogenspalt- produkte	0,93 (0,2-2,4)	0,9 (0,2-2,8)	1,17 (0,8-4,98)	1,04 (0,63-5,53)

**Tabelle 7: Messergebnisse des ELISA**

Angegeben Medianwert, Minimum und Maximum.

Bei einem Patienten der Chemotherapiegruppe, der während zwei Behandlungszyklen innerhalb von 3 Wochen untersucht wurde, zeigte sich bei der Bestimmung der TAT Komplexe und der Fibrinogenspaltprodukte mittels ELISA ein starker Anstieg. Die Werte der TAT Komplexe stiegen von 2-8  $\mu\text{g/l}$  während der ersten Messreihe auf Werte von 64  $\mu\text{g/l}$  vor der Therapie und 89 $\mu\text{g/l}$  nach der Behandlung drei Wochen später. Auch die Fibrinogenspaltprodukte stiegen in den drei Wochen signifikant an. Im klinischen Verlauf traten keine Besonderheiten oder Komplikationen während dieser Zeitspanne auf. Der Patient erhielt von seinem Hausarzt in der Zeit zwischen den Messungen Neupogen (G-CSF) und Erythropoetin. G-CSF wurde dem Patienten jedoch auch schon vor der ersten Messung verabreicht. Im November 2001 trat bei dem Patienten ein zweites Lokalrezidiv auf. Zur Zeit der Studienmessung und auch im Oktober desselben Jahres gab es jedoch noch keinen Anhaltspunkt für dieses Rezidiv.

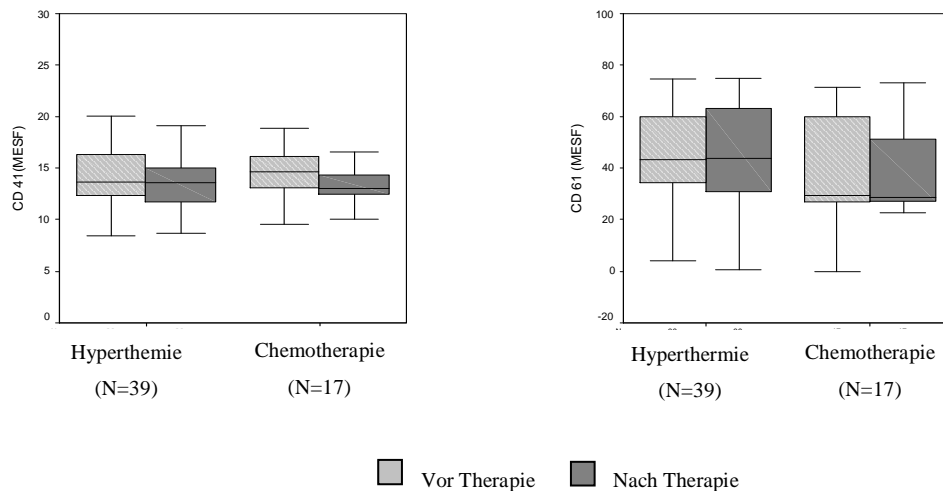


**Abbildung 9: TAT-Komplexe und Prothrombinfragmente bei einem Patienten im Verlauf**

## 3.2.5 Thrombozytäre Oberflächenrezeptoren und Granula

### 3.2.5.1 Fibrinogen Rezeptor GP IIb/IIIa

Die Abbildung 10 zeigt, dass es zu keiner signifikanten Expressionsänderung des GPIIb/IIIa Rezeptorkomplexes nach der Hyperthermiebehandlung (CD 41  $p=0,610$ ; CD 61  $p=0,214$ ) und nach der reinen Chemotherapie (CD 41  $p=0,170$  ; CD 61  $p=0,332$ ) kam.

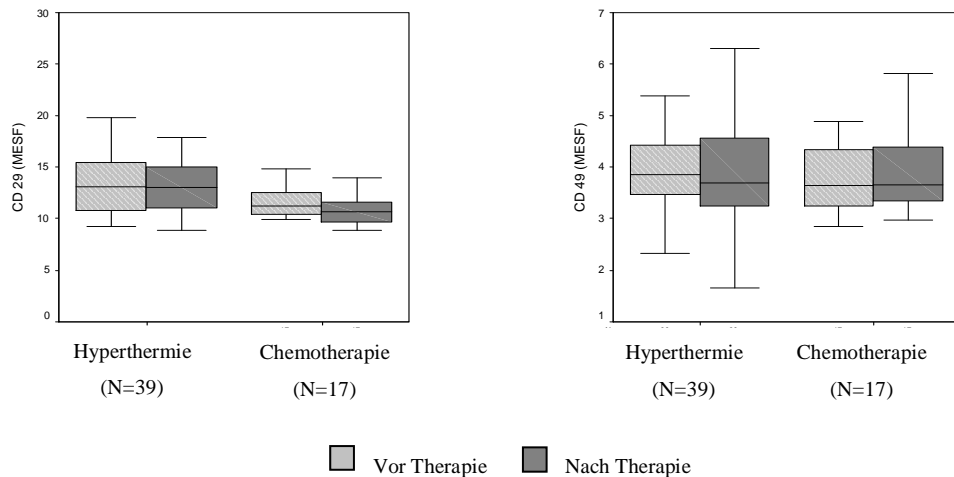


**Abbildung 10: Fluoreszenz des Rezeptors CD 41 und des Rezeptors CD 61**

Angegeben sind Boxplots mit Medianwert, Minimum und Maximum, jeweils für die Hyperthermie- und die Chemotherapiegruppe vor und nach der Therapie. \* = signifikant zum Ausgangswert ( $p \leq 0,05$ )

### 3.2.5.2 GPIa-IIa; GPIc-IIa; GPc'-IIa

Zur Darstellung der GPIIa-Domäne dieser Gruppe der Integrinrezeptoren wurde der Anti-CD29-Antikörper verwendet. Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der Fluoreszenz dieses Antikörpers vor und nach der jeweiligen Therapie (Hyperthermie: CD 29  $p=0,295$ ; Chemotherapie:  $p=0,233$ ) (Vgl. Abbildung 11). Auch der Anti-CD49-Antikörper, dargestellt in Abbildung 11, wies keine veränderte Bindung an die GPIb Domäne auf (Hyperthermie: CD 49  $p=0,233$ ; Chemotherapie:  $p=0,236$ ).

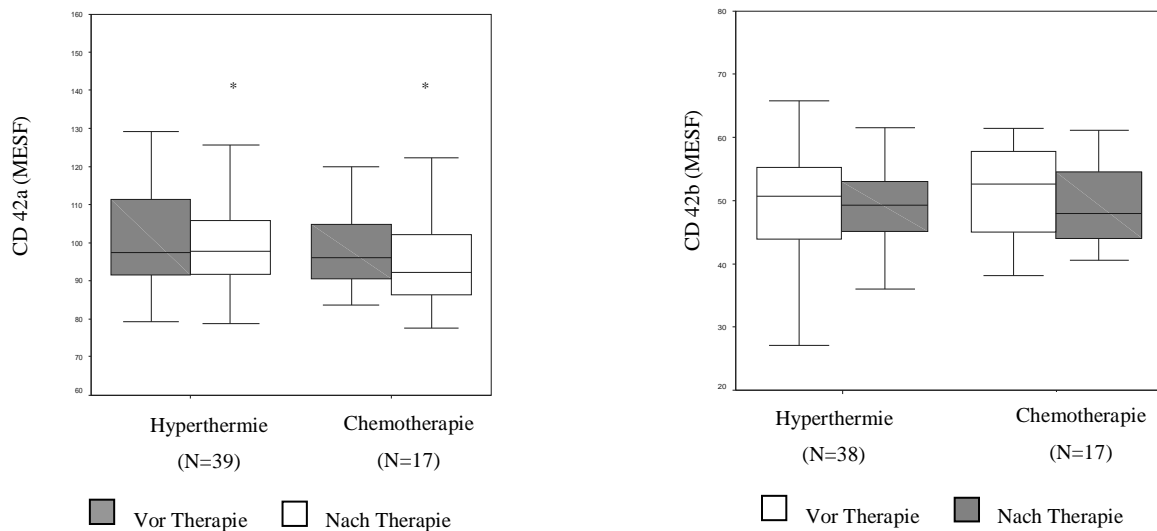


**Abbildung 11: Fluoreszenz des Rezeptors CD 29 und CD 49**

Angegeben sind Boxplots mit Medianwert, Minimum und Maximum, jeweils für die Hyperthermie- und die Chemotherapiegruppe vor und nach der Therapie. \* = signifikant zum Ausgangswert ( $p \leq 0,05$ )

### 3.2.5.3 GPIb-V-IX

Der GPIb-V-IX-Rezeptorkomplex wurde zum einen mit CD 42a FITC-markierten Antikörpern dargestellt. Dieser bindet an den GPIX-Teil des Komplexes. Zum anderen wurde ein CD42b-FITC-markierter Antikörper verwendet, der den GPIb-Teil demarkiert. In der Hyperthermiegruppe zeigte sich bei der Untersuchung des CD42a-Rezeptors eine signifikante Reduktion der Fluoreszenz ( $p=0,044$ ). Die Messung des CD42b-Rezeptors ergab keine signifikante Veränderung der Oberflächenexpression des Rezeptors ( $p=0,153$ ). Auch in der Chemotherapiegruppe ergab die Darstellung der GPIX Domäne mit CD 42a eine Abnahme der Fluoreszenz des Rezeptors, die signifikant war ( $p=0,005$ ). Die Messung des CD 42b Rezeptors zeigte in dieser Gruppe ebenfalls keine Auffälligkeiten.



**Abbildung 12: Aktivität des GPIIb-V-IX Rezeptorkomplexes**

Angegeben sind Boxplots mit Medianwert, Minimum und Maximum, jeweils für die Hyperthermie- und die Chemotherapiegruppe vor und nach der Therapie. \* = signifikant zum Ausgangswert ( $p < 0,05$ )

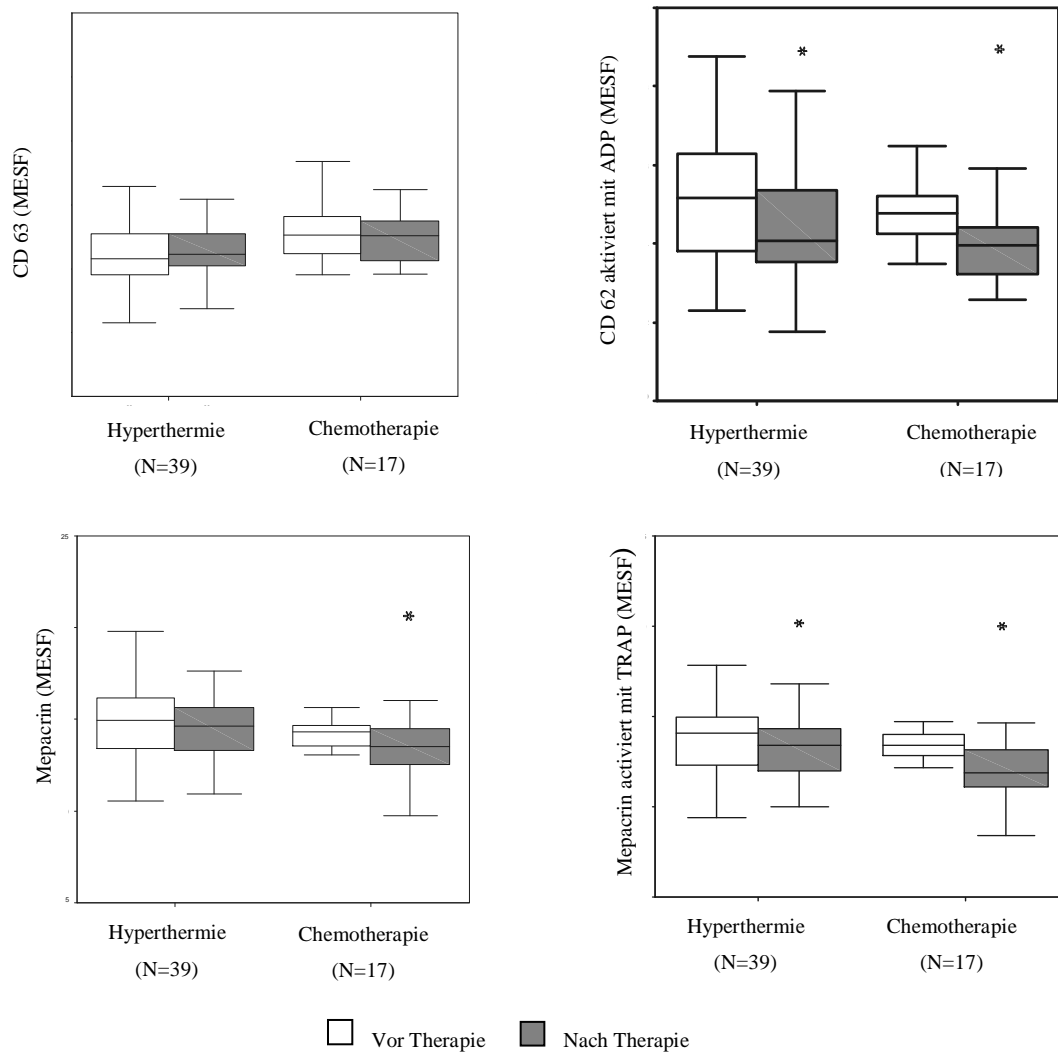
### 3.2.5.4 Thrombozytäre Granula

Nach Stimulation mit ADP wurde in der Gruppe der Hyperthermiepatienten ein signifikanter Abfall der Oberflächendichte von P-Selektin, markiert mit Anti-CD 62, nach der Hyperthermiebehandlung nachgewiesen ( $p=0,047$ ). In der Chemotherapiegruppe war ebenfalls eine Verminderung des CD 62 Rezeptors nach Stimulation mit ADP sichtbar ( $p=0,049$ ).

In der Hyperthermiegruppe kam es zu einer signifikant verminderten Mepacrinfärbung nach Stimulation mit TRAP im Vergleich zu den Messungen vor der Therapie ( $p=0,026$ ). Ohne Stimulation war die Mepacrinfärbung nach Therapie ebenfalls tendenziell vermindert.

In der Chemotherapiegruppe zeigte sich eine signifikant verminderte Mepacrinfärbung, sowohl ohne Stimulation ( $p=0,028$ ) als auch nach Stimulation mit TRAP ( $p=0,01$ ).

Ein vermehrte Expression des CD 63 Rezeptors konnte in beiden Gruppen nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Darstellung der Thrombozytären Granula sind in Abbildung 13 dargestellt.



**Abbildung 13: Thrombozytäre Granula**

- (a) Darstellung des Rezeptors CD 63 vor und nach Therapie**
- (b) Darstellung der Fluoreszenz des Rezeptors CD 62 vor und nach Therapie nach Stimulation mit ADP**
- (c) Fluoreszenz des Farbstoffes Mepacrin vor und nach Therapie**
- (d) Fluoreszenz des Farbstoffes Mepacrin nach Stimulation der Thrombozyten mit TRAP**

Angegeben sind Boxplots mit Medianwert, Minimum und Maximum, jeweils für die Hyperthermie- und die Chemotherapiegruppe vor und nach der Therapie. \* = signifikant zum Ausgangswert ( $p \leq 0,05$ )

Tabelle 8 fasst die Messergebnisse für die Thrombozytenmarker zusammen.

Thrombozytenrezeptoren	Hyperthermie		Chemotherapie	
	Vor	Nach	Vor	Nach
CD 29	13,2 (9,3-19,8)	13,1 (8,9-17,9)	11,3 (10,0-16,3)	10,7 (8,9-14)
CD49	3,9 (1,8-5,9)	3,7 (1,7-6,3)	3,6 (2,9-6,5)	3,7 (3-6,4)
CD 41	13,6 (8,5-25,4)	13,7 (4,6-25,9)	14,7 (9,6-22,8)	13,0 (10-18,7)
CD 61	43,41 (3,9-74,6)	43,9 (0,65-74,8)	30,8 (22,5-71,7)	28,8 (22,7-72,9)
CD 42a	98,1 (79,3-129,2)	97,91* (78,7-129,4)	96,1 (83,7-187)	92,4* (77,6-122,1)
CD42 b	50,8 (14,1-65,9)	49,5 (36,0-61,5)	52,7 (0,51-61,4)	47,9 (40,6-61)
CD 62P	1,3 (0,5-2,6)	1,3 (0,8-3,53)	1,4 (1,14-2,0)	1,3 (1,0-1,49)
ADP Stimulation	5,14 (2,3-10,0)	4,1* (1,8-8,7)	4,8 (3,5-6,5)	3,9* (2,6-6,8)
CD 63	2,17 (0,7-20,3)	2,2 (1,4-4,72)	2,5 (1,9-3,7)	2,5 (1,9-3,2)
ADP Stimulation	3,8 (1,0-7,8)	3,4 (2,2-7,5)	5,3 (2,7-9,8)	3,9 (2,9-7,8)
CD 154	1,3 (0,71-3,1)	1,3 (0,73-5,9)	1,3 (1,0-1,5)	1,4 (1,1-1,6)
Mepacrin	15,0 (10,6-19,8)	14,7 (10,9-19,64)	14,3 (10,4-20,0)	13,6* (9,8-18,7)
TRAP Stimulation	14,1 (9,4-17,8)	13,9* (10,8-18,9)	13,4 (8,6-19,2)	11,9* (8,4-16,8)

**Tabelle 8: Zusammenfassung Thrombozytenmarker**

Angegeben Medianwert, Minimum und Maximum. \* = signifikant zum Ausgangswert ( $p \leq 0,05$ )

### 3.2.5.5 Aggregate und Mikropartikel

Sowohl während der Hyperthermiebehandlung, als auch während der Chemotherapiebehandlung kam es zu keinem Anstieg der Mikropartikel.

Ebenso konnte keine gesteigerte Aggregatbildung aus Thrombozyten/Thrombozyten und Thrombozyten/Leukozyten festgestellt werden. Die Zahl der Aggregate unter Therapie blieb konstant. Tabelle 9 zeigt die Messergebnisse für Mikropartikel und Aggregate.

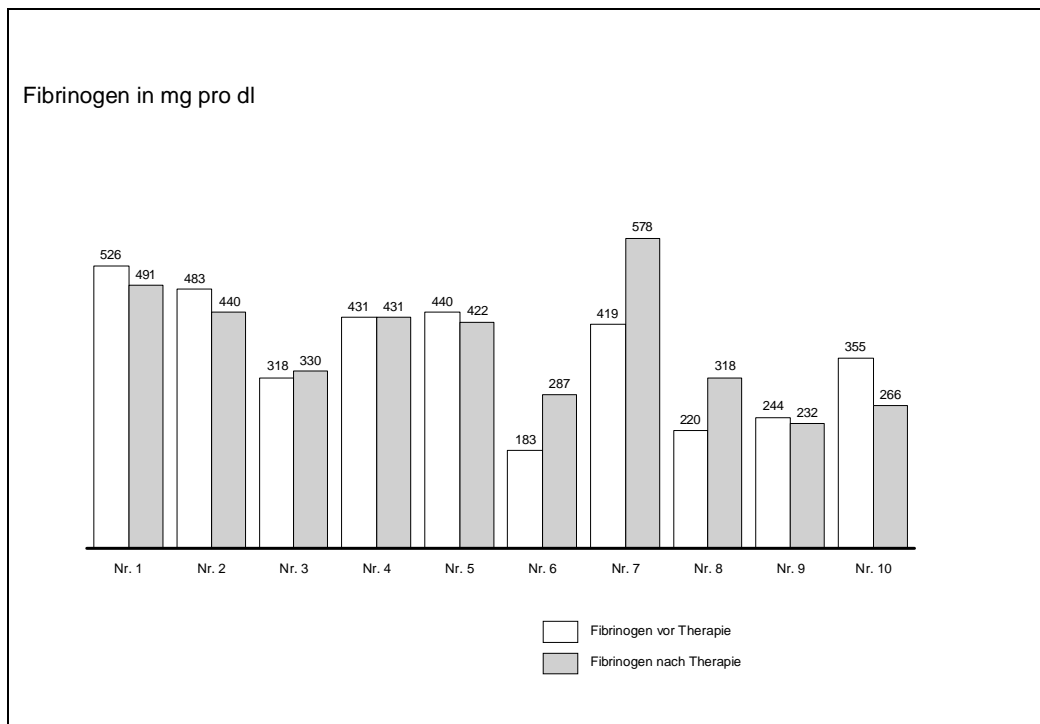
Mikropartikel und Aggregate	Hyperthermie		Chemotherapie	
	Vor	Nach	Vor	Nach
Mikropartikel	0,16 (0-0,55)	0,16 (0,02-1,1)	0,17 (0,01-0,57)	0,144 (0,03-0,35)
Gesamtaggregate	1,02 (0,1-2,63)	1,3 (0,45-4,15)	1,02 (0,55-1,91)	1,00 (0,5-2,32)
L-T-Aggregate	0,36 (0,01-1,73)	0,48 (0,08-3,49)	0,32 (0,08-0,65)	0,30 (0,11-0,67)
T-T-Aggregate	0,68 (0,1-1,44)	0,81 (0,37-3,57)	0,65 (0,26-1,33)	0,67 (0,19-1,66)

**Tabelle 9: Messergebnisse für Mikropartikel und Aggregate**

Angegeben Medianwert, Minimum und Maximum. \* = signifikant zum Ausgangswert ( $p \leq 0,05$ )

### 3.2.6 Bestimmung der D-Dimere und der Fibrinogenspaltprodukte

Bei einer kleinen Gruppe der Hyperthermiepatienten wurden zusätzlich die Fibrinogen- und D-Dimer-Konzentrationen vor und nach der Erwärmungstherapie bestimmt. Abbildung 14 zeigt, dass sich der Fibrinogenspiegel nicht signifikant veränderte.



**Abbildung 14: Fibrinogenkonzentration von 10 Patienten vor und nach der Hyperthermietherapie**

Ebenso blieb die D-Dimerkonzentration im Blut der gemessenen Patienten in der normalen Schwankungsbreite. Die Normwerte für Fibrinogen liegen im Bereich von 160-400 mg/dl und der Referenzwert für D-Dimer ist  $<0,5 \mu\text{m/ml}$ . Es zeigte sich, dass fünf der Patienten einen

erhöhten Fibrinogenspiegel im Blut aufwiesen. Die D-Dimerkonzentration lag bei zwei Patienten leicht über dem Normbereich. Ein Patient wies eine stark erhöhte Konzentration dieses Fibrinogenspaltproduktes auf (Vgl. Abbildung 15).

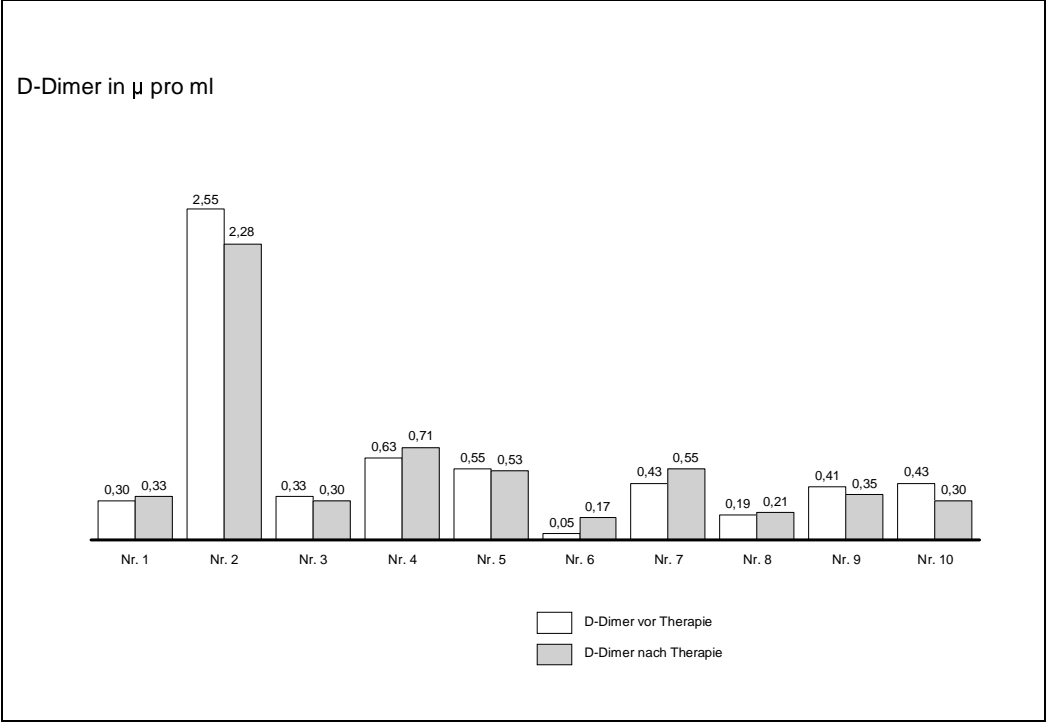


Abbildung 15: D-Dimerkonzentration von 10 Hyperthermiepatienten vor und nach der Therapie



## **4 Diskussion**

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Studie in die schon bestehende Literatur eingeordnet. Zunächst wird die Bedeutung der Durchflusszytometrie hervorgehoben, dann erfolgt die Darstellung der Ergebnisse der Thrombozytenfunktionsuntersuchung. Nach Darstellung der Ergebnisse der in vitro-Blutungszeit und des ELISA wird der Einfluss der Chemotherapie auf die Thrombozytenfunktion diskutiert.

### **4.1 Bedeutung und Durchführung der Durchflusszytometrie**

#### **4.1.1 Bedeutung der Durchflusszytometrie**

In den letzten Jahren hat die Durchflusszytometrie von Thrombozyten einen wachsenden Stellenwert in der Analyse von Thrombozytenfunktionsstörungen erhalten.

Die Methode ermöglicht es zum einen, die Oberflächendichte von thrombozytären Glykoproteinen zu bestimmen. Zum anderen können Aussagen über den Aktivierungsgrad der Plättchen getroffen werden, da durch die Durchflusszytometrie Strukturen, die den funktionellen Status der Plättchen reflektieren, an der Plättchenoberfläche exprimiert werden können.

Die Diagnosestellung der verschiedenen Typen der Thrombasthenie Glanzmann, bei denen ein Mangel des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa auf der Thrombozytenoberfläche zu einer verminderten oder fehlenden Aggregation führt, ist durch diese Methode möglich (Kannan et al. 2003). Ebenso ist die Durchflusszytometrie inzwischen die bevorzugte Methode zum Nachweis des Bernard-Soulier Syndroms (Fabris et al. 1989). Hier liegt ein Defekt des Glykoprotein Ib/IX- und des Glykoprotein V-Komplexes zugrunde, der durch die verminderte Bindung der spezifischen Antikörper an die Komplexe nachgewiesen wird.

Eine wichtige Rolle spielt die Thrombozytendurchflusszytometrie in der Erkennung einer Hyperreaktivität der Thrombozyten bei verschiedenen Erkrankungen. Eine erhöhte Thrombozytenaktivität konnte z.B. bei Patienten mit akuter cerebraler Ischämie (Zeller et al. 1999, Meiklejohn et al. 2001), bei Patienten mit Diabetes Mellitus (Tschöep et al. 1991), mit diabetischer, kardiovaskulärer Neuropathie (Rauch et al. 1999) und bei Patienten mit Arteriosklerose und Depression (Musselmann et al. 2002) nachgewiesen werden. Fateh-Moghadam et al. zeigten, dass es bei diffuser Transplantatvaskulopathie nach Herztransplantation zu einer vermehrten Expression von Glykoproteinrezeptoren wie LIPS-1 und P-Selectin auf den Thrombozyten kommt, die mit einer erhöhten Plättchenaktivität assoziiert sind (Fateh-Moghadam et al. 2000).

Aber auch zur Diagnostik einer Thrombozytenhyporeaktivität kann die Methode herangezogen werden. Gawaz et al. zeigten, dass die Neigung von urämischen Patienten zur hämorrhagischen Diathese aufgrund einer Dysfunktion des GPIIb/IIIa Rezeptors entsteht, die durch Dialyse wieder reversibel ist. (Gawaz et al. 1994) Zudem konnte eine verminderte Mepacrinfluoreszenz bei Patienten mit Nierenfunktionsstörung gefunden werden. Dies impliziert entweder eine reduzierte Anzahl oder eine gestörte Speicherfunktion der Dense Bodies (Gawaz et al. 1993). Eine Hyporeagibilität der Thrombozyten konnte bei untergewichtigen Frühgeborenen im Vergleich zu Erwachsenen nachgewiesen werden (Michelson 1996). Hypothermie, wie sie bei kardialen Bypass-Operationen angewandt wird, führt ebenfalls zu einer Dysfunktion der Thrombozyten mit verminderter Aggregationsfähigkeit und verminderter P-Selektin Expression (Michelson et al. 1999). In der klinischen Anwendung könnte die Durchflusszytometrie in Zukunft eine wichtige Rolle in der Überwachung der Therapie mit GPIIb-IIIa Antagonisten (Gawaz et al. 2000, Michelson 1996, Sack et al. 2000) und in der Diagnose der heparininduzierten Thrombozytopenie spielen (Tomer et al. 1999).

#### **4.1.2 Durchführung der Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie wurde in den letzten Jahren vermehrt eingesetzt, wobei sich besonders die Methode der Vollblutuntersuchung, die von Shattil et al. entwickelt wurde, durchsetzte (Shattil et al. 1987). Diese Methode weist im Vergleich zu Untersuchungen in plättchenreichem Plasma einige Vorteile auf. Für die Untersuchung im Vollblut wird nur eine kleine Blutprobe benötigt, so dass auch thrombozytopenische Patienten und Kinder untersucht werden können. Durch minimale Manipulation (z.B. keine Zentrifugation) kann eine sekundäre Aktivierung der Thrombozyten und somit eine Verfälschung der Ergebnisse verhindert werden. So kann auch die Selektion unterschiedlich großer Thrombozyten vermieden werden. Zudem können Thrombozytensubpopulationen, die sich in ihrem Aktivierungsverhalten unterscheiden, differenziert werden (Shattil et al. 1987, Michelson 1996).

Die Thrombozyten werden mit Phycoerythrin-markierten Antikörpern gegen ein thrombozytenspezifisches Antigen detektiert. Dadurch kann der Aktivierungsgrad der zirkulierenden Thrombozyten und die Reaktivität der Plättchen im Blut bestimmt werden. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wird die Bindung des Antikörpers an die verschiedenen Glykoproteinrezeptoren durch ihre Fluoreszenzstärke gemessen.

Von der europäischen Arbeitsgruppe für klinische Zellanalyse wurde 1998 ein Konsensusprotokoll mit Empfehlungen für die Durchführung von Thrombozyten-durchflusszytometrie erstellt, dem das Vorgehen in dieser Arbeit entspricht.

In dieser Studie wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie der Einfluss von Hyperthermie auf den Aktivierungsgrad der Thrombozyten untersucht.

## **4.2 Diskussion der Messergebnisse**

### **4.2.1 Veränderungen der Oberflächenrezeptoren der Thrombozyten**

Es wurden drei verschiedene Gruppen von Thrombozytenrezeptoren untersucht. Im Folgenden wird auf die Veränderung des Adhäsionsrezeptors GPIb-V-IX und des Aggregationsrezeptors GPIIa-IIIb eingegangen, da für die dritte Gruppe keine signifikanten Ergebnisse gefunden wurden.

Der Glykoproteinrezeptor Komplex GPIb-V-IX ist der wichtigste Thrombozytenadhäsionsrezeptor, der für die initiale Adhäsion der Plättchen an das Subendothel bei Verletzung verantwortlich ist. Der Komplex gehört in die Gruppe der leucinreichen Membranproteine. Während der GPIX nur aus einer Kette besteht, setzt sich der Ib-Komplex aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette zusammen. Die  $\alpha$ -Kette fungiert als Rezeptor für den von-Willebrand Faktor (VWF) und beinhaltet eine Bindungsstelle für Thrombin (Hourdillé et al. 1990, De Groot et al. 1998). Bei der verantwortlichen Erkennungssequenz handelt es sich wahrscheinlich um eine „anionic/sulfated tyrosin sequenze“ (Andrews et al. 1997). Die Bindung an das Endothel wird über den VWF vermittelt. Um an die Ib-Domäne des Rezeptorkomplexes binden zu können, muss sich entweder der Rezeptor oder der VWF einer Konformationsänderung unterziehen. Nach der Bindung des VWF öffnen sich Calcium-Kanäle, die zu einem Einstrom von extrazellulärem Calcium führen. Dies initiiert die Plättchenaktivierung mit Mobilisierung von intrazellulärem GPIIb-IIIa, an den wiederum VWF bindet und die Plättchenaggregation vermittelt (Ikeda et al. 1993, Nomura et al. 2000). Beim Bernard-Soulier-Syndrom, bei dem der GPIb-V-IX Komplex fehlt oder funktionsunfähig ist, kommt es zu einer herabgesetzten Adhäsion der Thrombozyten, da diese nicht mit dem VWF interagieren können. Dies führt zu einer verlängerten Blutungszeit, bei normaler Aggregation (Clementson et al. 1997). Es müssen jedoch über 50% des GPIb-Rezeptors fehlen, damit die verminderte Adhäsionsfähigkeit klinisch auffällig wird (Escolar et al. 2000). Der Komplex ist über ein Aktin-bindendes Protein des zytoplasmatischen Anteils der  $\alpha$ -Kette des GPIb mit dem Zytoskelett der Thrombozyten verbunden. Es wird unter

anderem für die Formerhaltung der Thrombozyten verantwortlich gemacht. Das Fehlen könnte die Ursache für die großen und abnormal geformten Thrombozyten beim Bernard-Soulier-Syndrom sein (De Groot et al. 1998, López et al. 1992).

In der Studie wurde der Glykoproteinrezeptorkomplex auf der Thrombozytenoberfläche mit dem Antikörper anti-CD 42a, der spezifisch an den GPIX bindet, und mit Anti-CD42b, der sich an die GPIb-Domäne anlagert, bestimmt. In beiden untersuchten Patientengruppen, der Hyperthermie und der Chemotherapiegruppe, zeigte sich eine reduzierte Oberflächendichte der GPIX-Moleküle nach der jeweiligen Therapie. Diese Beobachtung könnte auf eine Aktivierung der Thrombozyten hinweisen. Die Untersuchung der GPIb Domäne mit Anti-CD 42a-Antikörper ergab in beiden Patientengruppen keine Veränderung im Vergleich zur Dichte vor der jeweiligen Therapie.

Die Bestandteile GPIb und GPIX des Rezeptorkomplexes liegt in ruhenden Thrombozyten im Verhältnis 1:1 vor (Michelson et al. 1987). Der GPV liegt nur mit der Hälfte der Kopien auf der Membran vor, so dass von einem nicht kovalenten Komplex im Verhältnis von 1:2 auf den Thrombozyten ausgegangen wird. Die Funktion dieses Rezeptoranteils ist noch nicht erforscht. Es wird jedoch vermutet, dass er unter anderem die Aufgabe hat, den Rezeptorkomplex zu stabilisieren (Andrews et al. 1997, De Groot et al. 1998, Escolar et al. 2000).

Michelson et al. wiesen in einer in vitro-Untersuchung, in der Thrombozyten mit Thrombin stimuliert wurden, eine Verminderung des Ib- und des IX-Bestandteils des Adhäsionsrezeptors nach. Die Abnahme der beiden Glykoproteine erfolgt in einem 1:1 Verhältnis. Der Rezeptorkomplex wird bei Aktivierung in das „surface-connected-system internalisiert (Hourdillé et al. 1990, Nurden 1997). Dieser Vorgang ist jedoch reversibel. Innerhalb einer Zeit von 30 Minuten bis zu zwei Stunden (Differenzen in verschiedenen Studien) nach Aktivierung der Plättchen kommt es zu einer Reexpression des Komplexes auf der Thrombozytenoberfläche (Escolar et al. 2000). Diese „recyclten“ Glycoproteine besitzen weiterhin die Fähigkeit, VWF zu binden und dadurch die Thrombozytenadhäsion zu vermitteln (Michelson et al. 1994). Die Bestimmung des GPIb-IX Komplexes ist demnach abhängig vom Zeitpunkt der Probengewinnung und dadurch nur eingeschränkt zu bewerten.

In den bisherigen Studien zeigte sich im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit kein unterschiedliches Verhalten der Glykoproteindomänen nach Aktivierung. Der Rezeptorkomplex wird von Lopez et al. und von Du et al. als Einheit beschrieben, die für die volle Funktion des Rezeptors alle drei Untereinheiten erfordert (Du et al. 1987, López et al. 1992). Meyer et al. gehen jedoch von einer funktionellen Unabhängigkeit des Ib- $\alpha$ -

Untereinheit aus, die nicht mit einer Koexpression der GPIIb- $\beta$ -Untereinheit oder dem GPIIX Fragment einhergehen muss (Meyer et al. 1993).

Escolar und White diskutieren in einer Arbeit unter anderem die bestehenden Arbeiten zu dem GPIIb-V-IX Rezeptorkomplex. Insgesamt besteht eine große Diskrepanz in den verschiedenen Untersuchungen die Anzahl der Rezeptorkomplexe auf der Thrombozytenoberfläche nach Aktivierung betreffend (Escolar et al. 2000).

Ein weiterer wichtiger Rezeptor als Marker für die Thrombozytenaktivierung ist der GPIIb-IIIa Rezeptor. Wie bereits beschrieben führt eine Plättchenaktivierung zu einer Zunahme der Anzahl des Glykoproteinrezeptors GPIIb-IIIa auf der Thrombozytenoberfläche. Der Rezeptorkomplex wird nach Stimulation aus dem „dense tubular system“ und den  $\alpha$ -Granula an die äußere Membran exprimiert (Ruf et al. 1997, Gawaz 1999, Nurden 1997). Bei der Aktivierung kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors mit Freilegung einer Ligandenbindungstasche. In diesem Zustand ist der Rezeptor fähig, freies Fibrinogen, VWF, Fibronectin und Vitronectin zu binden. Die Ligandenbindung führt zu einer weiteren Konformationsänderung mit Freilegung einer „Ligand-induced binding-site“(LIBS) (Abrahams et al. 1991). Während unter geringen Scherkräften Fibrinogen der Hauptligand des GPIIa-IIIb Rezeptors ist und die Aggregation vermittelt, ist unter hohen Scherkräften der von Willebrand Faktor dafür verantwortlich (Ruggeri 1993, Ruf et al. 1997).

Pasha et al. zeigten in einer in vitro Studie, dass es nach Inkubation mit 40°C und höheren Temperaturen zu einer signifikanten Abnahme von Glykoproteinrezeptoren kam. Am eindrücklichsten war die Abnahme des GPIIa-IIIb Rezeptors unter Hitze, die bei einer Temperatur von 44°C zu einer 93,8% -tigen Reduktion führte. Es wurde zudem ein fast völliges Fehlen der Aggregation unter diesen Temperaturen beobachtet (Pasha et al. 1995). Frühere Untersuchungen von White et al. unterstützen die Hypothese, dass Wärme zu einer verminderten ADP induzierten Plättchenaggregation führt. Bereits 1968 wiesen White et al. in einer elektronenmikroskopischen Untersuchung nach Erwärmung eine Veränderung der Thrombozytenform und Aggregationseigenschaften nach. Bei Temperaturerhöhung über 42 °C kommt es zu einem Verlust der diskoiden Form der Zellen und zu einer Konzentration und Fusion der intrazellulären Granula in der Zellmitte. Diese Veränderungen gehen mit einer verminderten Aggregationsfähigkeit einher (White 1968).

Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchung an Patienten, die sich einer Hyperthermie-Therapie unterzogen hatten, konnte im Gegensatz dazu keine signifikante Veränderung der Dichte des GPIIb-IIIa Rezeptors, dargestellt durch die Bindung von CD41 und CD61, auf der

Thrombozytenoberfläche nach der Hyperthermiebehandlung nachgewiesen werden. Diese differierenden Ergebnisse sind möglicherweise durch den unterschiedlichen Versuchsaufbau zu erklären. Pasha führte einen in vitro-Versuch durch, in dem plättchenreiches Plasma unter verschiedenen Temperaturen inkubiert wurde. Es wurde somit eine direkte Erwärmung aller untersuchten Thrombozyten durchgeführt. Auch White beobachtete die Thrombozyten nach direkter Inkubation. Während der regionalen Hyperthermie wird jedoch nur eine Region des Körpers erwärmt und das Blut fließt durch das erhitzte Gebiet. Während der Zirkulation im Kreislauf kommt es zu einer Abkühlung.

Es gibt im Versuchsaufbau von in vivo und in vitro Untersuchungen wichtige Unterschiede, welche die Ergebnisse zu einem großen Anteil beeinflussen können. Zum einen sind die aktivierenden oder deaktivierende Substanzen in in vitro Versuchen meist konzentrierter und die regulierenden Mechanismen der Antagonisten können nicht eingreifen. Auch fehlt die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen und die mögliche Elimination von Aggregaten nach Aktivierung durch die Milz und andere Organe (Escolar et al. 2000). Zudem besteht ein Unterschied in der Untersuchung von Thrombozyten in Suspension und in Vollblut, wie Michelson et al. in einer Vergleichsuntersuchung beobachten konnten. Dabei zeigte sich, dass die Abnahme des GPIIb/IIIa nach Aktivierung mit Thrombin zu einem geringeren Anteil in der Vollblutprobe erfolgt als auf der Thrombozytenmembran der Plättchen in der Suspension (Michelson et al. 1994).

Allerdings ist die Methode der Durchflusszytometrie so sensibel, dass es möglich sein sollte, auch eine kleine Population aktivierter Thrombozyten neben unaktivierten oder funktionsunfähigen Zellen nachzuweisen (Johnston et al. 1987). Eine Abnahme des Rezeptorkomplexes als Zeichen einer verminderten Aggregationsfähigkeit, wie sie Pasha et al. beschrieben haben, hätte sich darstellen müssen.

#### **4.2.2 Veränderung der thrombozytären Granula**

Während der Thrombozytenstimulation durch Substanzen wie ADP oder Thrombin bzw. durch Thrombozytenadhäsion kommt es zur calciumabhängigen Exocytose intrazellulärer Speicherorganellen. Diese setzen verschiedene Substanzen frei und präsentieren ihre Membranproteine an der Thrombozytenoberfläche. Es können drei verschiedene thrombozytäre Granula unterschieden werden: die Dense Bodies, die  $\alpha$ -Granula und die Lysosomen. Die Expression von granulären Membranproteinen auf der äußeren Thrombozytenmembran oder der Nachweis der Sekretionsprodukte können als Beleg einer Plättchenaktivierung herangezogen werden.

Dense bodies sind intrathrombozytäre Speicherorganellen, die nach Aktivierung der Plättchen ihre Inhaltsstoffe freisetzen, indem sie zunächst an der inneren Membran der Thrombozyten andocken und dann mit dieser fusionieren. Zu den Inhaltsstoffen der Dense bodies gehören Serotonin, ADP, ATP, Pyrophosphat und Calcium. Freigesetztes ADP führt zum Formwandel und gilt als wichtiger Mediator für die Aggregation. Serotonin aus den Dense bodies verstärkt viele Mechanismen der Hämostase und trägt möglicherweise zur lokalen Vasokonstriktion bei. Auf der Membran der Dense Bodies sind inzwischen einige Membranproteine identifiziert worden, die zunächst nur den anderen Speicherorganellen zugeschrieben wurden. Dazu gehört z.B. GPIb, GPIIb-IIIa, P-Selektin, CD 63, LAMP-I und LAMP II. Ein kongenitales Fehlen der Dense Bodies wird als Storage Pool disease bezeichnet, die in verschiedenen Ausprägungen assoziiert mit einigen Syndromen (z.B. dem Hermansky-Pudlak Syndrom) auftreten kann. Meist resultiert daraus eine moderat verlängerte Blutungszeit, die mit einer Blutungsneigung einhergeht (Morgenstern 1998, McNicol et al. 1999).

Die Dense Bodies wurden in dieser Studie mittels Mepacrinfärbung dargestellt. Es konnte in der Hyperthermiegruppe sowie in der Patientengruppe, die nur eine Chemotherapie erhielt, eine signifikant verminderte Mepacrinfärbung nach der jeweiligen Therapie und nach Stimulation mit TRAP nachgewiesen werden. Die Proben ohne zusätzliche Stimulation zeigten in der Chemotherapiegruppe auch eine signifikante Abnahme, während in der Hyperthermiegruppe nur eine tendenzielle Reduktion der Färbung zu beobachten war. TRAP ist ein Peptidfragment des Thrombinrezeptors, das Thrombozyten direkt aktivieren kann (Gawaz 1999). Es wurde zur Stimulation der Thrombozyten verwendet, um eine weitere Aktivierbarkeit der Thrombozyten zu erfassen. Die Ergebnisse lassen auf eine Aktivierung der Thrombozyten mit vermehrter Ausschüttung der Dense bodies schließen.

Die  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten sind Speicherorganellen für eine Vielzahl verschiedener Proteine. Dazu zählen zum einen die Gerinnungsproteine, wie Faktor V und XI, Fibrinogen, Plasminogenaktivatorinhibitor-1 und  $\beta$ -Thromboglobulin. Zu nennen sind außerdem die Adhäsivproteine, wie der VWF, Fibronectin, Thrombospondin und Vitronectin, sowie Plasmaproteine, wie z.B. Immunglobulin und Albumin, und Wachstumsfaktoren, wie Platelet-derived-Growth-Faktor und Plättchenfaktor 4. Diese Proteine werden nach Stimulation der Thrombozyten freigesetzt und spielen eine wichtige Rolle in Hämostase, Inflammation, Wundheilung und in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen (z.B. Atherosklerose) (Harrison et al. 1993, Morgenstern 1998). Die Membran der  $\alpha$ -Granula beinhaltet verschiedene Rezeptoren wie z.B. den GPIIb-IIIa Rezeptor. Zudem ist dort das Protein P-

Selektin verankert, welches nach Verschmelzung der Granula mit der Thrombozytenmembran an dessen Oberfläche erscheint. P-Selektin gehört einer Gruppe neuer Adhäsionsrezeptoren an, die eine Adhäsion der Plättchen mit Leukozyten und Endothelzellen vermittelt (Michelson 1996, André 2004). Deshalb ist eine erhöhte Expression nicht nur Marker einer vermehrten Plättchenaktivierung, sondern kann auch ein Hinweis auf vermehrte Neutrophilen-Rekrutierung sein (Tschoep et al. 1985, Tschoep et al. 1991).

P-Selektin ist auch in gelöster Form im Plasma zu finden, besonders bei Patienten mit thrombotischen Erkrankungen oder Arteriosklerose. Dabei handelt es sich zum großen Teil um P-Selektin, das zuvor auf der Thrombozytenmembran verankert war und dann abgeschert wird (André 2004). In vivo kommt es zunächst zu einer Degranulation der  $\alpha$ -Granula, bevor es zu einer Release-Reaktion der Dense bodies kommt (Strano et al. 1991), so dass die Bestimmung von P-Selektin an der Thrombozytenoberfläche als früher Marker einer Aktivierung herangezogen werden kann. Es wird jedoch auch sehr rasch wieder von der Oberfläche abgeschert (Michelson et al. 1996).

In den beiden untersuchten Patientengruppen konnte eine Abnahme der P-Selektin Dichte nach Stimulation mit dem Agonisten ADP auf der thrombozytären Oberfläche nachgewiesen werden. Dieses spricht für eine verminderte Mobilisierbarkeit der  $\alpha$ -Granula nach Hyperthermiebehandlung und Chemotherapie. Auf die P-Selektin Konzentration der unstimulierten Thrombozyten hatte die jeweilige Therapie jedoch keinen Einfluss. Sie blieb konstant. Diese Beobachtung würde gegen eine vermehrte Plättchenaktivierung unter Chemotherapie und Hyperthermie/Chemotherapie sprechen.

GP53 ist ein lysosomales Membranprotein, das zur Gruppe der Tetra-Span-TM4-Superfamilie gehört. Es ist neben basophilen und zytotoxischen T-Zellen, Endothelzellen und Megakaryozyten unter anderem auf Thrombozyten identifiziert worden (Metzelaar et al. 1991). Es wird in der Thrombozytenfunktionsdiagnostik als Aktivierungsmarker der Plättchen herangezogen, da es auf ruhenden Plättchen nur sehr wenig exprimiert wird, jedoch nach Aktivierung vermehrt auf der Zellmembran nachgewiesen werden kann. Die Menge des exprimierten Proteins korreliert mit der Exozytose der lysosomalen Speicher nach Zellaktivierung (Metzelaar et al. 1992). Die genaue Rolle dieses Membranproteins konnte bislang nicht identifiziert werden, ihm wird jedoch eine Funktion in der transmembranären Signaltransduktion mittels Tyrosinphosphatase zugeschrieben. Zudem wird diskutiert, dass das Protein eine Aufgabe in der Regulierung der Zellproliferation und Differenzierung



verschiedener Zelltypen (z.B. NK-Zellen, Monozyten, B-Lymphozyten etc.) hat (Carmo et al. 1995).

Die Sekretion der Lysosomen bedarf eines stärkeren Stimulus, als die Sekretion der Dense bodies und der  $\alpha$ -Granula. Zudem verläuft die Degranulation von thrombozytären Lysosomen im Vergleich zu den anderen Granula langsamer und unvollständiger (Metzelaar et al. 1992). In der hier durchgeführten Untersuchung konnte in keiner der beiden Gruppen eine vermehrte Expression des CD63 Rezeptors auf der Thrombozytenmembran nachwiesen werden. Eine vermehrte Ausschüttung der Lysosomen durch eine Thrombozytenaktivierung hat demnach weder in der Hyperthermiegruppe noch in der Chemotherapiegruppe stattgefunden.

Proteine, die mit CD-63 markiert werden können, finden sich zudem noch auf der Plasmamembran einiger maligner Tumoren, wie dem malignem Melanom, neuroendokrinen Tumoren und Adenocarcinomen (Metzelaar et al. 1992). In dem untersuchten Patientenkollektiv fand sich jedoch keines dieser Malignomen, so dass eine generelle Erhöhung dieses Markers nicht zu erwarten war.

Die Ergebnisse der verschiedenen Thrombozytengranula in unserer Studie sind widersprüchlich. Zum einen spricht die verminderte Mepacrinfärbung nach Stimulation für eine vermehrte Stimulierbarkeit der Dense bodies, zum anderen zeigte die Abnahme der P-Selektindichte eine Reduktion der  $\alpha$ -Granula Mobilisierbarkeit. Im Hinblick auf die Thrombozytendegranulation konnte kein Unterschied zwischen der Hyperthermiegruppe und der Chemotherapiegruppe dargestellt werden. Damit ist ein systemischer Einfluss der Hyperthermie auf die Thrombozyten unwahrscheinlich. Dieses widerspricht den Ergebnissen die Take et al. und Strother et al. in in vivo Versuchen erzielten. Beide zeigten, dass es nach Erwärmungsbehandlung, entweder durch einer Ganzkörperhyperthermiebehandlung oder einem heißen Bad (47° C), zu einem signifikanten Anstieg des  $\beta$ -Thromboglobulins und des PF4, als Zeichen einer  $\alpha$ -Granula Ausschüttung, kommt (Take et al. 1996, Strother et al. 1986). Zu diskutieren ist, ob der Effekt der regionalen Hyperthermie, die bei dem hier untersuchten Patientenkollektiv verwendet wurde, stark genug ist, um zu einer Degranulation der Plättchen zu führen. Während bei der Regionalem Hyperthermie ein Teil des Körpers entweder mit der Perfusions-Methode oder wie in dieser Studie mit einem wassergefüllten Ringapplikator appliziert wird, so wird bei der Ganzkörperhyperthermie (WBH) die Gesamtkörpertemperatur erhöht. Dies kann zum einen durch Erwärmung von außen mittels Wasser, Wachs oder Bestrahlung erfolgen. Es gibt derzeit auch Ansätze, eine Erhitzung durch extrakorporale Zirkulation zu erreichen. Für beide Methoden ist jedoch eine Sedierung des

Patienten zum Teil mit Intubation und Beatmung notwendig. Die WBH ist somit eine wesentlich belastendere Therapie mit starken Auswirkungen auf den gesamten Kreislauf (van der Zee 2002, Vertrees et al. 2002).

In den Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe stellte sich unter Regionaler Hyperthermie ebenfalls eine Plättchendegranulation mit Erhöhung des PF4 und des  $\beta$ -Thromboglobulin dar, so dass dies für einen systemischen Effekt der Regionalen Hyperthermie spricht. PF4 und Thromboglobulin sind leicht zu analysieren und werden schon nach geringer Plättchenaktivierung aus den  $\alpha$ -Granula freigesetzt. Sie sind aber sehr sensible Parameter. Die PF4 Konzentration kann im Blut durch Heparin um den Faktor 20 erhöht werden. PF4 und  $\beta$ -Thromboglobulin werden über die Niere ausgeschieden, so dass eine verminderte Nierenfunktion ebenfalls zu erhöhten Konzentrationen im Blut führen und dadurch eine Plättchenaktivierung vorgetäuscht werden kann (Gurney et al. 2002). In den Voruntersuchungen des Labors wurde eine Beeinflussung durch Heparin ausgeschlossen und Take et al. zeigten die Erhöhung der intragranulären Proteine an einer Gruppe gesunder Probanden ohne Vormedikation, so dass hier nicht von einer Beeinflussung durch die Nierenfunktion oder eine Heparinbehandlung ausgegangen werden kann (Take et al. 1996, Peleska 1989).

Eine Erklärung dafür, dass in dieser Untersuchung kein Effekt auf die Thrombozytenfunktion durch die Erwärmung nachgewiesen werden konnte, könnte im Zeitpunkt der Messung liegen. Zum einen verlieren zirkulierende aktivierte Thrombozyten das exprimierte P-Selectin relativ schnell wieder von ihrer Oberfläche (Michelson 1996), so dass es keinen idealen Marker der Thrombozytenaktivierung in der Durchflusszytometrie darstellt. Die Messung ist abhängig vom Zeitpunkt der Plättchenstimulation und Blutabnahme. Da im Rahmen dieser Arbeit die Blutabnahme erst nach Beendigung der Behandlung (das bedeutet mindestens 90 Minuten nach Beginn der Hyperthermie) erfolgte, ist dies ggf. eine Ursache für die abweichenden Ergebnisse.

Zum anderen wurde beobachtet, dass einige Effekte der Hyperthermie erst mit einer gewissen Latenzzeit nach der Behandlung auftreten. Badylak et al. untersuchten die Veränderungen in Tumorgewebe und in gesundem Gewebe, die sich nach Hyperthermie vollziehen. Die Autoren beobachteten, dass es zunächst im malignem Gewebe zu unspezifischen Veränderungen mit Ödembildung und Hämorrhagien kommt, gefolgt von spezifischen Reaktionen mit der Ausbildung von Thrombosen und Makrophageninfiltration. Diese traten erst mit einer Latenzzeit von 6-48 Stunden auf. Es wird vermutet, dass diese verspätete

Reaktion eine Folge von Ischämie und Thrombose ist, die nach der Behandlung auftritt (Badylak et al. 1985). Demzufolge könnte es unter Erwärmungsbehandlung zu einer indirekten Thrombozytenaktivierung durch Endothelzellschädigung kommen, die jedoch erst nach einiger Zeit auftritt. Da im Tumorgewebe eine gesteigerte Angiogenese stattfindet, ist hier eine erheblich größere Anzahl an proliferierenden Endothelzellen zu finden. Die Tumorgefäße sind deshalb auch nicht so stabil, wie Gefäße im gesunden Gewebe (Fajardo et al. 1994). Endrich et al. untersuchten die ultrastrukturellen Veränderungen von Tumorkapillaren nach Inkubation mit 42,5°C. Sie konnten zeigen, dass es erst nach einer Latenzzeit von ca. 40 Minuten zu Veränderungen, wie der Zerstörung des Endothels mit Verlust der Kontinuität, Erythrozytenaggregaten und endothelialen Thrombozytenanlagerungen kommt (Endrich et al. 1988). Die regionale Hyperthermiebehandlung dauert in der Regel 90 Minuten. Zunächst erfolgt die Aufwärmphase, bis zum Erreichen einer Temperatur von 42°C in einer Lokalisation im Tumor (ca. 30 min), dann startet die therapeutische Phase mit Zugabe der Chemotherapie. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Messung direkt nach Beendigung der therapeutischen Phase, d.h. nach ca. 60 Minuten. Nach Endrich et al. hätten demnach schon Veränderungen festgestellt werden müssen.

Auch die Bildung von Hitzeschockproteinen beginnt nach den Ergebnissen von Fukao et al. erst mit einer Latenzzeit von 30 Minuten und erreicht ihr Maximum nach 90 Minuten (Fukao et al. 1995). Es ist also durchaus möglich, dass die hier vorgenommenen Messungen die Veränderungen der Thrombozytenfunktion nicht erfasst haben, da die Messung zu früh nach der Behandlung durchgeführt wurde.

Dewirst et al. sind der Meinung, dass in klinischen Studien die Temperaturen, die zu einer direkten vaskulären Schädigung führen, meist nicht erreicht werden (Dewhirst 1994), so dass ein weiterer Grund für die nicht nachweisbare Thrombozytenaktivierung eine zu niedrige Temperatur sein könnte.

Um den möglichen Einfluss einer indirekten Aktivierung der Thrombozyten durch Endothelzellschädigung zu untersuchen, ist eine weitere Studie mit mehreren Messungen nach der Behandlung sinnvoll.

### **4.2.3 In vitro-Blutungszeit**

Die in vitro-Blutungszeit ist eine neue, einfache Methode zur Erfassung der Plättchenfunktion. Es wird die Zeit bestimmt, die benötigt wird, um unter hohen Scherkräften und dem Zusatz von Plättchenaktivatoren den Verschluss einer Kapillare durch einen Plättchenthrombus zu erreichen. Damit wird hauptsächlich die primäre Hämostase erfasst, die

zum Großteil von der Thrombozytenfunktion abhängt. Eine verlängerte Verschlusszeit kann ein Hinweis auf einen VWF-Mangel, eine medikamentös verursachte oder eine angeborene Plättchenfunktionsstörung sein. Der Test wird jedoch auch durch andere Faktoren beeinflusst, wie den Hämatokrit und die Thrombozytenzahl (Kundu et al. 1996). Die in vitro-Blutungszeit ist jedoch nicht sensitiv für andere hämostaseologische Erkrankungen, wie z. B. die Hämophilie, die Afibrinogenämie und Defekte der Gerinnungsfaktoren V, VII, XI und XII. Deshalb sollte der Test nur als Screeningtest in einer Reihe von anderen Untersuchungen angewendet werden (Harrison 2005).

Der VWF wird im Endothel synthetisiert und bei Schädigung der Endothelzellen freigesetzt. Des Weiteren wird er bei Plättchenaktivierung aus den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten ins Blut abgegeben. Er vermittelt über den Glykoproteinrezeptor Ib/V/IX bei der Plättchenaktivierung die Thrombozytenadhäsion an das subendotheliale Kollagen (Gawaz 1999). Der VWF, als weiterer Einflussfaktor auf die in vitro-Blutungszeit, wurde in dieser Studie nicht bestimmt, so dass darüber keine Aussage getroffen werden kann.

In unseren Patientenkollektiven fand sich besonders in der Gruppe der Hyperthermiepatienten verlängerte Verschlusszeit über den Referenzwerten. Der Einfluss der Thrombozytenzahl auf die verlängerte Verschlusszeit bei den Hyperthermiepatienten erscheint nicht ausschlaggebend, da nur bei sechs der Patienten eine Thrombozytopenie (Thrombozytenzahl  $< 150\ 000/\mu\text{l}$ ) bestand. In der Chemotherapiegruppe wies nur einer der Patienten eine erniedrigte Thrombozytenzahl auf.

Eine verlängerte in vitro Blutungszeit, verursacht durch die Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern, wirkt sich nur auf eine Verlängerung der Verschlusszeit der Kollagen/Epinephrin-Messung aus. Die Ergebnisse der ADP/Kollagen-Messung sind normal (Kundu et al. 1996), so dass durch den Vergleich der beiden Messungen eine medikamentös verursachte Thrombozytenfunktionsstörung ermittelt werden kann. In der durchgeführten Untersuchung zeigte sich kein Unterschied zwischen der Epinephrin und der ADP Messung, so dass dies gegen einen medikamentösen Einfluss spricht. Auch wurde in einer ausführlichen Anamnese die Einnahme von Acetylsalicylsäure und anderen Thrombozytenaggregationshemmern ausgeschlossen.

Ein erniedrigter Hämatokrit führt zu einer erhöhten Blutungsneigung, was schon vor längerer Zeit in klinischen Untersuchungen gezeigt werden konnte (Hellem et al. 1961, Livio et al. 1982, Fernandez et al. 1985, Anand et al. 1994). Dabei ist der Einfluss, den die Erythrozyten auf die Hämostase haben, noch nicht genau bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass thrombozytenaktivierendes ADP, welches aus den Erythrozyten freigesetzt wird, eine

wichtige Rolle spielt (Truitto et al. 1979, Boneu et al. 1987). Unter Chemotherapie kommt es häufig zu Veränderungen des Blutbildes. In diesem Patientenkollektiv stellte sich bei fast allen Patienten ein erniedrigter Hämatokritwert dar. Dieses könnte die Verlängerung der in vitro-Blutungszeit in beiden Patientenkollektiven erklären.

#### **4.2.4 Messung der TAT Komplexe und der Fibrinogenspaltprodukte**

Zur Messung einer Hyperkoagulation wurden in der Studie die TAT-Komplexe und die Fibrinogenspaltprodukte mittels ELISA bestimmt.

TAT Komplexe sind Ausdruck einer vermehrten intravasalen Thrombinbildung und dienen als Hyperkoagulabilitätsparameter. Die Prothrombinfragmente 1 und 2 entstehen bei der Spaltung von Prothrombin und Thrombin und eine erhöhte Konzentration dieser Peptide reflektiert ebenfalls eine erhöhte Thrombinbildung in vivo. Eine Erhöhung dieser Parameter findet sich bei septischen Zuständen, bei der DIC, nach Operationen und bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit (Woller et al. 1999, Hiller et al. 2002).

In der Untersuchung der TAT-Komplexe zeigte sich eine deutlich über der Norm liegende Konzentration in beiden Patientengruppen. Bei Tumorpatienten ist eine erhöhte Thrombophilieneigung bekannt (Nand et al. 1987, Luzzatto et al. 1990). Zum einen können neoplastische Zellen das Hämostasesystem direkt aktivieren, zum anderen findet eine Aktivierung der mononukleären Zellen statt, die vermehrt prokoagulatorische Substanzen synthetisieren und exprimieren, wie z.B. den Tissue-Factor und Faktor X Aktivatoren. Außerdem werden die Endothelzellen durch verschieden freiwerdende Zytokine (z.B. Tumor Nekrose Faktor und Interleukine) aktiviert (Prandoni et al. 1999, Falanga et al. 2001). Johnson et al. wiesen nach, dass bei Tumorpatienten die Fibrinogenkonzentration, der Spiegel des Faktor VII und die Konzentration der TAT- Komplexe und der Fibrinogenspaltprodukte signifikant erhöht ist (Johnson et al. 1999). Im Gegensatz zu den in dieser Studie ebenfalls erhöhten TAT-Komplexen, lagen die Fibrinogenspaltprodukte der Patienten jedoch im Normbereich.

Besonders auffällig war zudem, dass es bei einem Patienten zu einem starken Anstieg der TAT Komplexe und der Fibrinogenspaltprodukte innerhalb einer Zeitspanne von drei Wochen während der Chemotherapiepause kam. Bei dem Patienten ergab sich in dieser Zeit kein Hinweis auf ein akutes Ereignis wie eine Thrombose, eine DIC oder einen akuten peripheren arteriellen Verschluss. Zwischen den Messungen hatte er jedoch wegen eines erniedrigten Hämoglobinwertes und erniedrigter Leukozytenzahl vom Hausarzt Erythropoetin und G-CSF erhalten. Malyszko et al., die den prokoagulatorischen Effekt von Erythropoetin untersuchten,

konnten keine Erhöhung der TAT Komplexe und der Prothrombinfragment Konzentrationen unter Behandlung mit Erythropoetin nachweisen (Malyszko et al. 2002). Im Gegensatz dazu wurde für G-CSF eine Erhöhung der prokoagulatorischen Parameter beschrieben (Kuroiwa et al. 1996, LeBlanc et al. 1999). Eine Normalisierung der Parameter wurde nach einer Woche beobachtet (Falanga et al. 1999). Der Patient hatte jedoch auch schon vor der ersten Messung G-CSF erhalten. Hier lagen die Werte z.T. etwas über dem Normbereich. Da leider die genauen Zeitabstände zwischen der G-CSF Gabe und der Chemotherapie nicht genau dokumentiert sind, bleibt hier ein Einfluss des G-CSF auf die Hämostase nur zu vermuten.

#### **4.2.5 Chemotherapieeinfluss**

In unserer Studie konnten keine Unterschiede zwischen der Hyperthermiegruppe und der Chemotherapiegruppe in der Thrombozytenaktivierung und in den hämostaseologischen Funktionstests gefunden werden. Die Ergebnisse lassen jedoch eine erhöhte Plättchenaktivität vermuten.

Für einige Chemotherapien ist ein Einfluss auf das Gerinnungssystem bekannt. Unter Chemotherapie wurde schon mehrfach ein erhöhtes Risiko für thrombembolische Ereignisse beschrieben (Weiss et al. 1981, Goodnought et al. 1984, Levine et al. 1988, Tempelhoff et al. 1996). Die genaue Ursache für diese Beobachtung ist dabei jedoch noch nicht erforscht. Ein direkter aktivierender Effekt auf die Thrombozytenaktivität wurde bisher nur von Togna et al. für Cisplatin beschrieben (Togna et al. 2000). Für die in dieser Studie verwendeten zytotoxischen Substanzen gibt es bisher keine Daten, die eine direkte Aktivierung der Blutplättchen belegen.

Es existieren jedoch inzwischen viele Untersuchungen, die der Chemotherapie einen prokoagulatorischen Effekt nachweisen, der über eine indirekte Aktivierung des Gerinnungssystems erfolgt. Pihusch et al. wiesen in einer Studie an Patienten, die sich einer Hochdosismchemotherapie unterzogen, eine erhöhte Expression von CD 62, eine verminderte Mepacrinfärbung und eine verminderte Expression von CD 42b (Teil des GPIb/V/IX-Komplex) nach. Diese Ergebnisse deuten auf eine irreversible Thrombozytenaktivierung hin. Außerdem wurde eine erhöhte Konzentration von thrombozytären Mikropartikeln gefunden. Am ehesten beruht die Thrombozytenaktivierung auf einer Endothelzellschädigung durch die Chemotherapie (Pihusch et al. 2002, Prandoni et al. 1999). Nicolsen et al. wiesen unter Chemotherapieeinfluss einen vermehrten Untergang von Endothelzellen mit Freilegung von subendothelialer Matrix in einem Zellkulturmodell nach. Es zeigte sich nachfolgend eine vermehrte Plättchenadhäsion an das Subendothel. (Nicolson et al. 1985). Es wird vermutet,

dass während der Chemotherapie freierwerdender TNF- $\alpha$  und Interleukine über verschiedenen Mechanismen zu dieser Endothelzellschädigung führen (Bertomeu et al. 1990, Prandoni et al. 1999). Parades et al. zeigten, dass es zu einer Erhöhung der Thrombinmobilisierung und einem vermehrten Prothrombinverbrauch unter Chemotherapieeinfluss in Endothelzellkulturen kommt. Besonders ausgeprägt waren die Ergebnisse für Vincristin und Adriamycin (Paredes et al. 2003). Zusätzlich wird die plasmatische Gerinnung aktiviert, die konsekutiv zur Erhöhung der Konzentrationen von TAT Komplexen, Prothrombinfragmenten und D-Dimeren und zur Verminderung der inhibitorischen Proteinen, wie dem Protein C und S führt (Rogers II et al. 1988, Piccioli et al. 1996, Prandoni et al. 1999).

Für das in dieser Studie eingesetzte Ifosfamid wurde in der Kombination mit Vincristin ein Einfluss auf die plasmatische Gerinnung ausgeschlossen. Daten über einen Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung und den Einfluss auf die Endothelzellen gibt es für diese Substanz bisher nicht.

### **4.3 Ausblick**

In der durchgeführten Studie konnte kein direkter aktivierender Effekt der Erwärmung auf die Plättchenfunktion nachwiesen werden, wie in der Literatur beschrieben (Take et al. 1996, Strother et al. 1986).

Damit ist eine Veränderung der Thrombozytenfunktion unter Hyperthermie jedoch nicht völlig ausgeschlossen. In weiteren Forschungsvorhaben sollten multiple Messungen während und nach der Behandlung durchgeführt werden, da zu vermuten ist, dass einige Effekte der Hyperthermie erst mit einer gewissen Latenzzeit auftreten. Eine indirekte Aktivierung des Hämostasesystems mit Auswirkung auf die Thrombozytenfunktion kann deshalb möglicherweise erst Stunden später erfasst werden.

Um einen direkten Einfluss der Hitze auf die Blutplättchen und ihre Oberflächenrezeptoren zu untersuchen, können durchflusszytometrische in vitro Studien mit direkter Inkubation der Thrombozyten weitere Erkenntnisse liefern.

Zum anderen erscheint es interessant, in nachfolgenden Untersuchungen ein besonderes Augenmerk auf Hitzeschockproteine (HSP) zu legen. Aktuelle Forschungsergebnisse deuten daraufhin hin, dass HSP eine Rolle in der Beeinflussung der Thrombozytenaktivierung spielen und ihrer Funktion durch Hitze beeinflusst wird (Fukao et al. 1995, Feyerabend et al. 1999, Polanowska-Grabowska et al. 2000)

## 5 Zusammenfassung

Die Hyperthermiebehandlung hat sich in den letzten Jahren zu einem wichtigen Bestandteil multimodaler Therapiekonzepte in der Behandlung von malignen Tumoren entwickelt.

Die genauen Wirkmechanismen der Erwärmungstherapie sind jedoch noch nicht vollständig erforscht. Ein indirekter Effekt der Hyperthermie wird dem Einfluss auf das Gerinnungssystem zugeschrieben, da in Tumorresektaten nach Erwärmungsbehandlung eine vermehrte Gerinnselbildung beobachtet wurde.

Um den Einfluss der regionalen Hyperthermie auf das Gerinnungssystem, insbesondere auf die Thrombozytenfunktion zu untersuchen, wurde anhand verschiedenen Gerinnungstests und der Thrombozytendurchflusszytometrie die Hämostase von Patienten vor und nach einer Hyperthermiebehandlung verglichen. Um die Rolle der zusätzlich verabreichten zytostatischen Therapie zu bestimmen, wurden die Untersuchungen auch an einem Patientenkollektiv durchgeführt, das sich nur einer Chemotherapie unterzog. Dabei zeigten sich folgende Ergebnisse:

- In der Thromboelastographie als einem globalen Gerinnungstest zeigte sich kein Unterschied vor und nach der Behandlung in der Hyperthermiegruppe. In der Gruppe der Chemotherapiepatienten war die maximale Amplitude nach der Chemotherapie etwas verringert.
- Die *in vitro* Blutungszeit zeigte keine Veränderung vor und nach der jeweiligen Behandlung. Es ergab sich jedoch im Vergleich zu den Normwerten bei einem Teil der Patienten eine verlängerte Blutungszeit. Verantwortlich hierfür könnte der bei den Patienten deutlich erniedrigte Hämatokrit sein.
- Bei der durchflusszytometrischen Analyse der Thrombozytenfunktion der beiden Patientengruppen zeigte sich eine signifikante Abnahme des GPIIb/IIIa Rezeptors als Zeichen einer Thrombozytenaktivierung, mit Internalisierung des Rezeptorkomplexes. Zudem zeigte sich eine signifikant verringerte Anfärbbarkeit mit Mepacrin in der Gruppe der Chemotherapiepatienten und eine tendenzielle Verminderung der Mepacrinfärbung in der Hyperthermiegruppe. Dies weist auf eine Entleerung der Dense bodies hin. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine Abnahme der P-Selektin-Dichte an der Thrombozytenoberfläche, was gegen eine Sekretion der  $\alpha$ -Granula sprechen würde. Da in beiden Gruppen die Veränderungen gleichsinnig waren, ist hier von einem Einfluss der Chemotherapie auf die Thrombozyten auszugehen.



- Bei der Bestimmung der TAT-Komplexe und der Fibrinogespaltprodukte ergab sich in beiden Gruppen keine Veränderung vor und nach der jeweiligen Therapie. In der Studiengruppe fiel jedoch eine über die Norm erhöhte TAT Konzentration auf. Bei einem Patienten der Chemotherapiegruppe zeigte sich im Verlauf von drei Wochen zwischen zwei Therapiezyklen ein deutlicher Anstieg der TAT-Komplexe. Diese Erhöhung ist wahrscheinlich erklärbar durch die Gabe von Erythropoetin und G-CSF.

## Anhang

	EIA		EI		Mini ICE		Ifosfamid		Adriamycin		Adriamycin+ Ifosfamid	
	vor	nach	Vor	Nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach
PFA Epinephrin [sec]	150 (99- 300)	143 (90- 300)	151 (104- 300)	144 (104- 300)	119 (94- 239)	153 (91- 300)	100 (71- 166)	117 (94- 119)	123	91	154 (71- 230)	131 (89- 162)
PFA ADP [sec]	115 (66- 185)	111 (70- 172)	110 (79- 191)	111 (76- 256)	84 (80- 156)	108 (89- 171)	88 (57- 99)	81 (61- 99)	114	87	105 (57- 117)	99 (61- 129)
R-Zeit [mm]	3,1 (1,15- 9,60)	2,35 (0,95- 8,10)	3,1 (1,0- 7,0)	4,0 (1,10- 10,5)	3,4 (2,0- 11,0)	5,3 (5,2- 8,25)	2,7 (1,8- 4,7)	2,25 (2,2- 8,4)	5,0	2,4	2,7 (1,3- 7,0)	2,7 (1,9- 4,00)
K-Zeit [mm]	1,0 (0,3- 4,5)	0,7 (0,35- 3,25)	0,8 (0,25- 2,2)	1,3 (0,3- 5,4)	1,25 (0,5- 6,9)	2,7 (1,65- 6,2)	1,0 (0,4- 2,6)	0,6 (0,55- 2,1)	1,6	0,9	1,0 (0,4- 1,8)	0,5 (0,3- 2,8)
MA-Zeit [mm]	6,4 (3,0- 7,9)	6,7 (5,0- 8,5)	7,0 (3,5- 7,9)	6,4 (3,8- 7,9)	6,6 (4,9- 8,2)	5,0 (4,3- 6,9)	7,2 (6,1- 8,2)	7,02 (6,8- 7,8)	7,8	7,1	7,5 (6,35- 8,2)	7,25 (6,7- 8,0)
Aggregation ADP [μl]	0,25 (0,0- 1,5)	0,5 (0,0- 1,0)	0,25 (0,6- 2,0)	0,13 (0,0- 2,0)	0,31 (0,06- 0,5)	0,31 (0,13- 0,75)	0,33 (0,25 - 0,38)	0,13 (0,13- 0,13)	0,25	0,38	0,38 (0,25- 0,63)	0,38 (0,25- 0,75)
Aggregation Kollagen [μl]	0,25 (0,03- 0,75)	0,5 (0,0- 2,0)	0,25 (0,06- 1,5)	0,19 (0,0- 2,0)	0,25 (0,06- 0,75)	0,31 (0,06- 0,75)	0,25 (0,25 - 0,38)	0,375 (0,25- 0,5)	0,25	0,5	0,38 (0,25- 0,75)	0,38 (0,38- 0,5)

**Tabelle 10: Messergebnisse differenziert nach Chemotherapie**

Angegeben Medianwert, Minimum und Maximum. \* = signifikant zum Ausgangswert ( $p \leq 0,05$ )

	EIA		EI		Mini ICE		Ifosfamid		Adriamycin		Adriamycin+ Ifosfamid	
	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach
CD29	13,81 (10,33- 19,8)	13,05 (8,86- 17,87)	12,39 (9,29- 15,92)	12,44 (8,9- 15,49)	12,17 (10,05- 15,77)	12,43 (9,14- 15,25)	11,91 (10,16- 15,12)	10,35 (8,96- 13,96)	11,68	10,66	13,8 (11,27- 16,25)	12,18 (11,44- 12,81)
CD49	3,88 (1,75- 5,39)	3,7 (1,65- 6,3)	3,82 (2,41- 5,92)	3,47 (2,37- 5,48)	3,62 (2,33- 4,51)	3,76 (2,10- 4,07)	4,36 (2,98- 5,99)	3,92 (3,15- 6,39)	3,36	3,14	5,04 (2,86- 6,54)	4,55 (4,4- 5,81)
CD41 P	20,41 (4,89 90,58)	16,77 (5,33- 92,17)	52,08 (6,29- 124,65)	22,2 (5,94- 126,75)	52,41 (5,75- 123,7)	57,8 (5,42- 129,6)	33,87 (15,89- 89,76)	21,21 (14,49- 88,20)	25,79	23,85	29,74 (16,07- 76,67)	15,22 (13,65- 20,14)
CD41 F	15,95 (8,45- 25,39)	13,73 (4,67- 27,91)	14,52 (9,51- 20,07)	13,95 (9,84- 19,08)	15,25 (10,35- 24,05)	13,43 (10,82- 20,42)	12,92 (9,6- 16,14)	11,93 (10,02- 13,98)	13,9	12,47	13,77 (12,1- 15,31)	13,01 (11,06- 18,29)
CD61	46,14 (3,88- 74,62)	46,56 (0,65- 74,75)	44,37 (24,6- 73,94)	34,64 (24,38- 66,13)	39,33 (19,85- 66,81)	30,22 (21,7- 61,54)	31,62 (26,83- 43,32)	28,12 (22,68- 31,13)	65,4	59,21	52,19 (29,4- 71,67)	41,69 (28,68- 72,92)
CD42a	103,2 (79,28- 125,88)	100,3 (78,84- 125,9)	95,85 (82,19- 129,24)	92,28 (77,84- 129,41)	100,5 (79,92- 120,2)	99,16 (83,02- 107,24)	93,33 (83,70- 105,98)	88,04 (77,6- 92,79)	111,2	102,1	117,2 (91,89- 187)	103,4 (91,92- 122,1)
CD42b	48,26 (27,06- 65,85)	47,44 (37,03- 61,47)	49,96 (14,14- 56,58)	50,37 (37,36- 56,11)	50,75 (40,31- 62,85)	47,26 (36,04- 61,03)	54,3 (46,28- 58,72)	53,89 (53,13- 55,46)	54,81	47,89	42,47 (0,51- 59,24)	49,31 (41,69- 60,54)
CD62 P	1,53 (0,54- 2,56)	1,33 (0,8- 3,53)	1,29 (0,92- 1,6)	1,29 (0,89- 1,53)	1,2 (0,95- 1,34)	1,2 (0,93- 1,34)	1,3 (1,18- 1,47)	1,28 (1,11- 1,40)	1,42	1,49	1,45 (1,08- 2,02)	1,2 (0,91- 1,47)
ADP Stimulation	4,81 (2,29- 7,91)	4,06 (1,77- 7,88)	5,4 (2,85- 9,99)	4,42 (3,19- 8,66)	5,58 (3,23- 8,77)	4,12 (3,13- 7,09)	4,51 (3,76- 4,9)	3,93 (2,8- 5,2)	4,26	3,79	4,6 (3,07- 6,48)	3,11 (2,54- 4,27)
CD63	2,37 (0,69- 3,68)	2,27 (1,79- 4,72)	2,21 (1,33- 3,3)	2,21 (1,60- 3,08)	2,19 (1,15- 2,8)	2,17 (1,37- 2,55)	2,5 (2,04- 2,85)	2,49 (2,02- 2,93)	2,14	2,08	6,28 (2,5- 20,16)	2,61 (1,83- 3,24)
ADP Stimulation	4,06 (1,02- 6,48)	3,65 (2,32- 7,39)	4,21 (2,34- 6,83)	3,37 (2,53- 7,81)	4,89 (2,19- 9,81)	3,68 (2,19- 7,63)	4,41 (2,66- 5,74)	4,34 (2,97- 5,63)	2,91	2,88	4,74 (3,07- 6,37)	3,6 (2,46- 4,28)
CD154	1,44 (0,86- 3,14)	1,38 (1,15- 5,92)	1,29 (0,86- 1,68)	1,4 (1,14- 1,55)	1,25 (0,71- 1,73)	1,25 (0,73- 1,81)	1,38 (1,24- 1,62)	1,29 (1,10- 1,37)	1,47	1,52	1,37 (1,24- 1,49)	1,31 (1,2- 1,59)
Mepacrin	14,78 (10,38- 19,77)	14,77 (9,79- 19,64)	14,42 (12,5- 16,71)	14,49 (10,92- 16,35)	15,45 (12,39- 20,02)	13,92 (11,38- 18,64)	14,57 (13,75- 16,39)	13,9 (9,94- 15,62)	13,24	13,28	14,95 (13,23- 17,83)	13,9 (12,26- 16,06)
TRAP- Stimulation	13,71 (8,57- 17,82)	13,85 (8,41- 18,90)	13,48 (10,81- 16,36)	12,84 (10,02- 16,83)	14,68 (12,24- 19,22)	13,29 (11,89- 16,83)	13,44 (12,4- 15,05)	12,44 (10,81- 14,65)	13,11	12,99	13,89 (11,39- 17,36)	11,65 (10,86- 13,81)

**Tabelle 11: Messergebnisse differenziert nach Chemotherapie**

Angegeben Medianwert, Minimum und Maximum. \* = signifikant zum Ausgangswert ( $p \leq 0,05$ )

## Literaturverzeichnis

- Abrahams C, Shattil SJ. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb. Haemost.* (1991) 65(5): 467-473.
- Anand A, Feffer SE. Hematocrit and bleeding time: an update. *South. Med. J.* (1994) 87(3): 299-301.
- André P. P-Selectin in haemostasis. *Br. J. Haematol.* (2004) 126: 298-306.
- Andrews RK, López JA, et al. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (1997) 29(1): 91-105.
- Ault KA. The clinical utility of flow cytometry in the study of platelets. *Semin. Hematol.* (2001) 38(2): 160-168.
- Badylak SF, Babbs CF, et al. Hyperthermia-induced vascular injury in normal and neoplastic tissue. *Cancer* (1985) 56: 991-1000.
- Beer JH. Plättchenrezeptoren: Nomenklatur - Struktur - Funktion. *Schweiz. Med. Wochenschr.* (1992) 122(34): 1249-1263.
- Bertomeu MC, Gallo S, et al. Chemotherapy enhances endothelial cell reactivity to platelets. *Clin. Exp. Metastasis* (1990) 8(6): 511-518.
- Bicher HI, Mitagvaria N. Circulatory responses of malignant tumors during hyperthermia. *Microvasc. Res.* (1981) 21: 19-26.
- Bogovic J, Douwes F, et al. Posttreatment histology and microcirculation status of osteogenic sarcoma after neoadjuvant chemo- and radiotherapy in combination with local electromagnetic hyperthermia. *Onkologie* (2001) 24: 55-58.
- Boneu B, Fernandez F. The role of the hematocrit in bleeding. *Transfus. Med. Rev.* (1987) 1: 182-185.

- Brass LF, Pizarro S, et al. Changes in the structure and function of the human thrombin receptor during receptor activation, internalization, and recycling. *J. Biol. Chem.* (1994) 269(4): 2943-2952.
- Brass LF, Vassallo RR, et al. Structure and function of the human platelet thrombin receptor. *J. Biol. Chem.* (1992) 267: 13795-13798.
- Carmo AM, Wright MD. Association of the transmembrane 4 superfamily molecule CD 53 with tyrosine phosphate activity. *Eur. J. Immunol.* (1995) 25: 2090-2095.
- Clementson KJ, Clementson MJ. Platelet collagen receptors. *Thromb. Haemost.* (2001) 86: 189-187.
- Clementson KJ, Polgár J. Platelet adhesion and aggregation receptors. In: *Platelet glycoproteins*. Georg JN, Nurden AT und Phillips DR (eds.), Springer Verlag, New York.(1997): 155-179.
- De Groot PG, Sixma JJ. Glykoproteinrezeptoren der Thrombozytenmembran: Biochemie, Molekularbiologie und Physiologie. In: *Hämostaseologie*. Müller-Berghaus G und Pötzsch B (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin.(1998): 15-25.
- Dewey WC, Freemann ML, et al. Cell biology of hyperthermia and radiation. *Radiation Biology in Cancer Research* (1980): 589-612.
- Dewhirst MW. Future directions in hyperthermia biology. *Int. J. Hyperthermia* (1994) 10(3): 339-345.
- Di Filippo F, Anzà M, et al. The application of hyperthermia in regional chemotherapy. *Semin. Surg. Oncol.* (1998) 14.
- Du X, Beutler L, et al. Glycoprotein Ib and glycoprotein IX are fully complexed in the intact platelet membrane. *Blood* (1987) 69(5): 1524-1527.

- Dudar TE, Jain R. Differential response of normal and tumor microcirculation to hyperthermia. *Cancer Res.* (1984) 44: 605-612.
- Emami B, Song CW. Physiological mechanisms in hyperthermia: a review. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* (1984) 10: 289-295.
- Endrich B, Hammersen F, et al. Hyperthermia induced changes in tumor microcirculation. In: *Application of hyperthermia in the treatment of cancer.* Issels R und Wilmanns W (eds.)(1988): 32-43.
- Engin K. Biological rationale and clinical experience with hyperthermia. *Control. Clin. Trials* (1996) 17: 316-342.
- Escobar G, White JG. Changes in glycoprotein expression after platelet activation: differences between in vitro and in vivo studies. *Thromb. Haemost.* (2000) 83: 371-386.
- Fabris F, Casonato A, et al. The use of fluorescence flow cytometry in the characterisation of Bernard-Soulier syndrome and Glanzmann's thrombasthenia. *Haematologica* (1989) 74: 39-44.
- Fajardo LF, Prionas SD. Endothelial cells and hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia* (1994) 10: 347-353.
- Falanga A, Donati B. Pathogenesis of thrombosis in patients with malignancy. *Int. J. Hematol.* (2001) 73(2): 137-144.
- Falanga A, Marchetti M, et al. Neutrophil activation and hemostatic changes in healthy donors receiving granulocyte colony stimulating factor. *Blood* (1999) 93(8): 2506-2514.
- Falk MH, Issels RD. Hyperthermia in oncology. *Int. J. Hyperthermia* (2001) 17(1): 1-18.

- Fateh-Moghadam S, Bocksch W, et al. Changes in surface expression of platelet membrane glycoproteins and progression of heart transplant vasculopathy. *Circulation* (2000) 102: 890-897.
- Fernandez F, Goudable C, et al. Low haematocrit and prolonged bleeding time in uraemic patients: effect of red blood cell transfusion. *Br. J. Haematol.* (1985) 59(1): 139-148.
- Feyerabend T, Wiedemann GJ, et al. Hyperthermia as an adjunct to standard treatment of neoplastic diseases: few cures but some advances. *Onkologie* (1999) 22: 122-127.
- Fukao H, Hagiya Y, et al. Effect of heat shock on the expression of urokinase-type plasminogen activator receptor in human umbilical vein endothelial cells. *Thromb. Haemost.* (1995) 75(2): 352-358.
- Fuller KJ, Issels RD, et al. Cancer and the heat shock response. *Europ. J. Cancer* (1994): 1884-1891.
- Gawaz M. Das Blutplättchen: Physiologie und Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, (1999).
- Gawaz M, Ruf A, et al. Incomplete inhibition of platelet aggregation and glycoprotein IIb-IIIa receptor blockage by abciximab: importance of internal pool of glycoprotein IIb-IIIa receptors. *Thromb. Haemost.* (2000) 83: 915-922.
- Gawaz MP, Dobos G, et al. Impaired function of platelet membrane glycoprotein IIb IIIa in end stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* (1994) 5: 36-46.
- Gawaz RP, Bogener C, et al. Flow-cytometric analysis of mepacrine-labelled platelets in patients with end-stage renal failure. *Haemostasis* (1993) 23: 284-292.

- Goodnought LT, Saito H, et al. Increased incidence of thrombembolism in stage IV breast cancer patients treated with a five drug chemotherapy regime. *Cancer* (1984) 54: 1264-1268.
- Gurney D, Lip GYH, et al. A reliable plasma marker of platelet activation : does it exist? *Am. J. Hematol.* (2002) 70: 139-144.
- Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Rev.* (2005) 19(2): 111-123.
- Harrison P, Ceamer EM. Platelet alpha granules. *Blood Rev.* (1993) 7(1): 52-62.
- Hellem AJ, Borchrevink CF, et al. The role of red cells in hemostasis: the relation between haematocrit, bleeding time and platelet adhesiveness. *Br. J. Haematol.* (1961) 7: 42-50.
- Hilbe W, Eisterer W, et al. Durchflußzytometrie. In: *Methoden der diagnostischen Hämatologie.* Huber H, Löffler H und Faber V (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin.(1994).
- Hildebrandt B, Rau B, et al. Lokoregionäre Hyperthermie: Standards und neue Entwicklung. *Wien. Med. Wochenschr.* (2004) 154(7-8): 148-158.
- Hiller E, Riess H. *Hämorrhagische Diathese und Thrombose.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. Stuttgart, (2002).
- Hornback NB. Historical aspects of hyperthermia in cancer therapy. *Radiol. Clin. North Am.* (1989) 27(3): 481-488.
- Hourdillé P, Heilmann E, et al. Thrombin induces a rapid redistribution of glycoprotein Ib-IX complexes within the membrane systems of activated human platelets. *Blood* (1990) 76(8): 1503-1513.



- Ikeda Y, Handa M, et al. Transmembrane calcium influx associated with von Willebrand Faktor binding to GP Ib in the initiation of shear-induced platelet aggregation. *Thromb. Haemost.* (1993) 69(5): 496-502.
- Issels R. Hyperthermia combined with chemotherapy- biological rationale, clinical application, and treatment results. *Onkologie* (1999) 22: 374-381.
- Issels RD, Abdel-Rahman S, et al. Neoadjuvant chemotherapy combined with regional hyperthermia (RHT) for locally advanced primary or recurrent high-risk adult soft-tissue sarcomas (STS) of adults: long term results of a phase II study. *Eur. J. Cancer* (2001) 37: 1599-1608.
- Johnson MJ, Walker ID, et al. Abnormal coagulation and deep venous thrombosis in patients with advanced cancer. *Clin. Lab. Haematol.* (1999) 21(1): 51-54.
- Johnston GI, Pickett EB, et al. Heterogeneity of platelet secretion in response to thrombin demonstrated by fluorescence flow cytometry. *Blood* (1987) 69(5): 1401-1403.
- Kannan, M, Ahmed RPH, et al. Typ I Glanzmann thrombasthenia: most common subtypes in north india. *Am. J. Hematol.* (2003) 74: 139-141.
- Kong G, Anyarambhatla G, et al. Efficacy of liposomes and hyperthermia in human tumor xenograft model: importance of triggered drug release. *Cancer Res.* (2000) 60: 6950-6957.
- Kundu SK, Heilmann EJ, et al. Characterisation of an in vitro platelet function analyzer, PFA-100. *Clin Appl Thrombosis/ Hemostasis* (1996) 2(4): 241-249.
- Kuroiwa M, Okamura T, et al. Effects of granulocyte colony-stimulating factor on the hemostatic system in healthy volunteers. *Int. J. Hematology* (1996) 63(4): 311-316.
- LeBlanc R, Demers C, et al. A prospective study of G-CSF effects on hemostasis in allogeneic blood stem cell donors. *Bone Marrow Transplant.* (1999) 23(10): 991-996.

- Levine MN, Gent M, et al. The thrombogenic effect of anticancer drug therapy in women with stage II breast cancer. *N. Engl. J. Med.* (1988) 318(7): 404-407.
- Livio M, Gotti E, et al. Uraemic bleeding. Role of anaemia and beneficial effect of red cell transfusion. *Lancet* (1982) 8306(2): 1013-1015.
- López JA, Leung B, et al. Efficient plasma membrane expression of a functional platelet glycoprotein Ib-IX complex requires the presence of its three subunits. *J. Biol. Chem.* (1992) 267: 12851-12859.
- Luzzatto G, Schafer AI. The prethrombotic state in cancer. *Semin. Oncol.* (1990) 17: 147-159.
- Malyszko J, Suchowierska E, et al. Some aspects of hemostasis in CAPD patients treated with erythropoietin. *Kidney Blood Press. Res.* (2002) 25: 240-244.
- McNicol A, Israels SJ. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb. Res.* (1999) 95: 1-18.
- Meiklejohn DJ, Vickers MA, et al. In vivo platelet activation in atherothrombotic stroke is not determined by polymorphisms of human platelet glycoprotein IIIa or Ib. *Br. J. Haematol.* (2001) 112(3): 621.
- Metzelaar MJ, Clevers HC. Lysosomal membrane glycoproteins in platelets. *Thromb. Haemost.* (1992) 68(4): 378-382.
- Metzelaar MJ, Wijngaard PLJ, et al. CD 63: novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for extracellular antigens in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* (1991) 266(5): 3239-3245.
- Meyer S, Kresbach G, et al. Expression and characterization of functionally active fragments of the platelet glycoprotein (GP) Ib-Ix complex in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* (1993) 268(27): 20555-20562.

- Michelson AD. Platelet activation by thrombin can be directly measured in whole blood through the use of the peptide GPRP and flow cytometry: methods and clinical applications. *Blood Coagul. Fibrinolysis* (1993) 5: 121-131.
- Michelson AD. Flow cytometry: A clinical test of platelet function. *Blood* (1996) 87(12): 4925-4936.
- Michelson AD, Barnard MR. Thrombin-induced changes in platelet membrane glycoproteins Ib, IX, and IIb-IIIa complex. *Blood* (1987) 70(5): 1673-1678.
- Michelson AD, Barnard MR, et al. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1996) 93: 11877-11882.
- Michelson AD, Barnard MR, et al. The effects of aspirin and hypothermia on platelet function. *Br. J. Haematol.* (1999) 104: 64-68.
- Michelson AD, Benoit SE, et al. The activation-induced decrease in the platelet surface expression of the glycoprotein Ib-IX complex is reversible. *Blood* (1994) 83(12): 3562-3573.
- Morgenstern E. Morphologie der Thrombozyten. In: *Hämostaseologie*. Müller-Berghaus G und Pötzsch B (Hrsg.), Springer, Stuttgart.(1998): 5-13.
- Musselmann DL, Marzec U, et al. Platelet activation and secretion in patients with major depression, thoracic aortic atherosclerosis, or renal dialysis treatment. *Depress. Anxiety* (2002) 15: 91-101.
- Nand S, Fischer SG, et al. Hemostatic abnormalities in untreated cancer: incidence and correlation with thrombotic and hemorrhagic complications. *J. Clin. Oncol.* (1987) 5: 1998-2003.

- Nicolson GL, Custead SE. Effects of chemotherapeutic drugs on platelet and metastatic tumor cell-endothelial cell interactions as a model for assessing vascular endothelial integrity. *Cancer Res.* (1985) 45: 331-336.
- Nomura S, Nakamura T, et al. Cytometric analysis of high shear-induced platelet microparticles and effect of cytokines on microparticle generation. *Cytometry* (2000) 40: 173-181.
- Nurden P. Bidirectional trafficking of membrane glycoproteins following platelet activation in suspension. *Thromb. Haemost.* (1997) 78: 1305-1315.
- Paredes N, Xu L, et al. The effect of chemotherapeutic agents on the regulation of thrombin on cell surface. *Br. J. Haematol.* (2003) 120(2): 315-324.
- Pasha R, Benavides M, et al. Reduced expression of platelet surface glycoprotein receptor IIb/IIIa at hyperthermic temperatures. *Lab. Invest.* (1995) 73(3): 403-408.
- Peleska H (1989). Regionale Hyperthermie und Chemotherapie: Hämostaseveränderungen. Dissertation, Medizinischen Klinik III, Ludwig-Maximilians-Universität. Muenchen
- Phillips DR, Charo IF, et al. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* (1988) 71(4): 831-843.
- Piccioli A, Prandoni P, et al. Cancer and venous thrombembolism. *Am. Heart J.* (1996) 132: 850-855.
- Pihusch R, Höhnberg B, et al. Platelet flow cytometric findings in patients undergoing conditioning therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am. J. Hematol.* (2002) 81: 454-461.
- Polanowska-Grabowska R, Gear ARL. Heat-shock proteins and platelet function. *Platelets* (2000) 11: 6-22.

- Prandoni P, Piccioli A, et al. Cancer and venous thrombembolism: an overview. *Haematologica* (1999) 84(5): 437-445.
- Raffael A, Nebe CT, et al. Grundlagen der Durchflußzytometrie. In: *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Schmitz G und Rothe G (Hrsg.), Schattauer, Stuttgart.(1994).
- Rauch U, Ziegler D, et al. Platelet Activation in diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. *Diabet. Med.* (1999) 16(10): 848-852.
- Reinhold HS, Endrich B. Invited review: tumor microcirculation as a target for hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia* (1986) 2: 111-137.
- Rogers II JS, Murgo AJ, et al. Chemotherapy for breast cancer decreases plasma protein C and protein S. *J. Clin. Oncol.* (1988) 6(2): 276-281.
- Ruf A, Frojmovic MM, et al. Platelet aggregation. In: *Platelet glycoproteins*. Georg JN, Nurden AT und Phillips DR (eds.), Springer Verlag, New York.(1997): 83-98.
- Ruggeri ZM. Mechanism of shear-induced platelet adhesion and aggregation. *Thromb. Haemost.* (1993) 70(1): 119-123.
- Sack U, Rothe G, et al. Durchflußzytometrie in der klinischen Diagnostik. *J. Lab. Med.* (2000) 24(6/7): 277-297.
- Saelman EU, Nieuwenhuis HK, et al. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIIb/IIIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood* (1994) 83(5): 1244-1250.
- Sallah S, Wan JY, et al. Venous thrombosis in patients with solid tumors: determinations of frequency and characteristics. *Thromb. Haemost.* (2002) 87: 575-579.
- Scharf RE. Thrombozytäres System. In: *Hämatologie und Onkologie*. Ostendorf PC und Seeber S (Hrsg.), Urban und Schwarzenberg, München.(1997): 49-63.

- Shattil SJ, Cunningham M, et al. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies in flow cytometry. *Blood* (1987) 70(1): 307-315.
- Song CW. Effect of local hyperthermia on blood flow and microenvironment: a review. *Cancer Res.* (1984) 44: 4721-4730.
- Strano A, Giovanni D, et al. In vivo platelet activation in diabetes mellitus. *Semin. Thromb. Hemost.* (1991) 17(4).
- Strother SV, Bull JMC, et al. Activation of coagulation during therapeutic whole body hyperthermia. *Thromb. Res.* (1986) 43: 353-360.
- Take H, Kubota K, et al. Activation of circulating platelets by hyperthermal stress. *Eur. J. Med. Res.* (1996) 1: 562-564.
- Tamura K, Kubota K, et al. Effects of hyperthermal stress on the fibrinolytic system. *Int. J. Hyperthermia* (1996) 12(1): 31-36.
- Tempelhoff GF, Dietrich M, et al. Blood coagulation during adjuvant epirubicin/cyclophosphamid chemotherapy in patients with primary operable breast cancer. *J. Clin. Oncol.* (1996) 14: 2560-2568.
- Togna GI, Togna AR, et al. Cisplatin triggers platelet activation. *Thromb. Res.* (2000) 99: 503-509.
- Tomer A, Masalunga C, et al. Determination of heparin-induced thrombocytopenia: a rapid flow-cytometric assay for direct demonstration of antibody-mediated platelet activation. *Am. J. Hematol.* (1999) 61(53-61).
- Truitto VT, Weiss HJ. Rheological factors influencing platelet interaction with vessel surfaces. *J Rheology* (1979) 23: 35-49.

- Tschoep D, Roesen P, et al. Large platelets circulate in an activated state in diabetes mellitus. *Semin. Thromb. Hemost.* (1991) 17: 433.
- Tschoep D, Schwippert B. Platelet flow cytometry - adhesive proteins. In: *Platelet glycoproteins*. Georg JN, Nurden AT und Phillips DR (eds.), Springer Verlag, New York.(1985): 619-629.
- Valdagni R, Amichetti M, et al. Radical radiation alone vs. radical radiation plus microwave hyperthermia for N3 neck-nodes: a prospective randomized clinical trial. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* (1988) 15: 13-24.
- van der Zee J. Heating the patient: a promising approach? *Ann. Oncol.* (2002) 13: 1173-1184.
- van der Zee J, Gonzales D, et al. Comparison of radiotherapy alone with radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumors: a prospective, randomized, multicenter trial. Dutch Deep Hyperthermia Group. *Lancet* (2000) 355: 1119-1125.
- Vertrees RA, Leeth A, et al. Whole-body hyperthermia: a review of theory, design and application. *Perfusion* (2002) 17: 279-290.
- Wall JE, Buijs-Wilts M, et al. A flow cytometric assay using mepacrine for studying of uptake and release of platelet dense granula Contents. *Br. J. Haematol.* (1995) 89: 380-385.
- Weiss RB, Tormey DC, et al. Venous thrombosis during multimodal treatment of primary breast carcinoma. *Cancer Treat. Rep.* (1981) 65: 677-679.
- Wendtner C-M, Abdel-Rahman S, et al. Response to neoadjuvant chemotherapy combined with regional hyperthermia predicts long-term survival for adult patients with retroperitoneal and visceral high risk soft tissue sarcomas. *J. Clin. Oncol.* (2002) 20: 3156-3164.
- White JG. Effects of heat on platelet structure and function. *Blood* (1968) 32(2): 324-335.

Woller T, Lawall H, et al. Comparison of haemostatic parameters in arterial and venous blood from patients with peripheral arterial occlusive disease. *Vasa* (1999) 28: 10-14.

Zeller JA, Tschoep D, et al. Circulating platelets show increased activation in patients with acute cerebral ischemia. *Thromb. Haemost.* (1999) 81: 373-7.



## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD. Dr. med. Rudolf Pihusch (Medizinische Klinik III Klinikum Großhadern, LMU München) für die Überlassung des Dissertationsthemas und die kompetente Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Erhard Hiller (Leiter des Forschungslabors Hämostaseologie der Medizinischen Klinik III des Klinikum Großhadern) möchte ich sehr herzlich für die Möglichkeit, die Arbeit in seinem Labor durchführen zu können, und für die Vertretung meiner Dissertation danken.

Besonderer Dank gilt auch dem gesamten Team der Hyperthermieabteilung im Klinikum Großhadern, die mir sehr bei der Rekrutierung der Patienten geholfen haben. Insbesondere Herr Dr. med Markus Schlemmer hat mich hierbei und in fachlichen Fragen sehr unterstützt.

Großer Dank gebührt Frau Brigitte Reinhardt (Forschungslabor Hämostaseologie des Klinikum Großhadern) für die Einarbeitung in die Methode, die Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen und die ständige Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Erfolg der Versuche beigetragen hat.

# Lebenslauf

Geburtsdatum/ -ort	<b>Sonja Mitrenga</b> 10.12.1976 in Göttingen
Adresse	Wackersbergerstr. 33 81371 München
1983-1989	<b>Schulausbildung</b> Bonifatiuschule I und II, Göttingen Grundschule und Orientierungsstufe
1989-1996	Felix-Klein-Gymnasium, Göttingen Abschluss mit dem Abitur
1993/94	Bath High-School Lima, Ohio USA
WS96-SS97	<b>Hochschulausbildung</b> Universität Göttingen Pädagogik, Soziologie, Wirtschafts- und Sozialpsychologie Magisterstudium
SS97-SS99	Universität Marburg Humanmedizin, Vorklinisches Studium
03/99	Ärztliche Vorprüfung
SS99-WS03	Ludwig-Maximilians Universität München Humanmedizin, Klinisches Studium
03/00	1.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/02	2.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/03	3.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/99	<b>Famulaturen</b> Klinikum Bayreuth Medizinische Klinik II, Kardiologie
04/00-07/00	Stellenbosch Hospital, Südafrika Lehrkrankenhaus der Universität Stellenbosch Tätigkeit in den Bereichen Anästhesie, Chirurgie, Innere Medizin und Pädiatrie
08/00	Praxisfamulatur Pädiatrie Dr. E. von Delft, Stellenbosch, Südafrika
10/02-02/03	<b>Praktisches Jahr</b> Anästhesiologie Abteilung für Anästhesiologie Klinikum Großhadern
02/03-06/03	Innere Medizin, Abteilung für Hämatologie und Onkologie Städt. Krankenhaus München-Neuperlach
06/03-09/03	Chirurgie, Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Abteilung für Unfall-Hand und Wiederherstellungschirurgie Krankenhaus München Schwabingen
02/04-09/04 seit 10/04	<b>Berufstätigkeit</b> Ärztin im Praktikum, II. Medizinische Abteilung KH München Bogenhausen Assistenzärztin, II Medizinische Abteilung KH München Bogenhausen
	<b>Promotion</b> Veränderungen der Thrombozytenaktivität und -funktion nach Regionaler Hyperthermie Prof. Dr. med. E. Hiller Medizinischen Klinik und Poliklinik III, Klinikum Großhadern