

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. K. Friese

# **Zirkulierende Mikropartikel bei Patientinnen mit Mammakarzinom**

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

Vorgelegt von

Kerstin Steinig

aus Essen

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Bettina Toth

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Stefan Holdenrieder  
Priv. Doz. Dr. Dorit Nägler  
Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schramm

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2010

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. <u>Einleitung</u></b>	<b>5</b>
1.1 Mikropartikel	
1.2 Mammakarzinom	
1.3 Studienziel	
<b>2. <u>Material und Methodik</u></b>	<b>14</b>
2.1 Studiendesign	
2.1.1 Patientenkollektiv	
2.1.2 Blutentnahme	
2.1.3 Aufbereitung der Blutproben	
2.1.4 Laborwerte	
2.2 Durchflußzytometrie	
2.2.1 Prinzip der Durchflußzytometrie	
2.2.2 Meßgerät und verwendete Fluoreszenzfarbstoffe	
2.2.3 Geräteeinstellung	
2.2.4 Verwendete Antikörper	
2.2.4.1 Annexin V	
2.2.4.2 Immunglobulin G 1 (IgG 1)	
2.2.4.3 CD61	
2.2.4.4 CD63	
2.2.4.5 CD62P	
2.2.4.6 CD62E	
2.2.4.7 CD45	
2.2.5 Prothrombin-Fragment F1+2	
2.3 Versuchsablauf	
2.3.1 Puffer und Grundlösungen	
2.3.2 Arbeitslösungen	
2.3.3 Probenlösung	
2.3.4 Auswertung	
<b>3. <u>Ergebnisse</u></b>	<b>29</b>
3.1 Studienpopulation	
3.2 Zirkulierende Mikropartikel	
3.3 Prothrombin-Fragment 1+2	

<b>4. Diskussion</b>	<b>39</b>
4.1 Leukozytäre Mikropartikel	
4.2 Endotheliale Mikropartikel	
4.3 Thrombozytäre Mikropartikel	
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>48</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>50</b>
<b>7. Einverständnisbogen</b>	<b>58</b>
<b>8. Curriculum</b>	<b>61</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>63</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Mikropartikel

Ziel der modernen Tumorforschung ist es, neue Erkenntnisse über das Wachstum und die Ausbreitung von Tumorzellen zu erlangen, um dadurch neue Therapieansätze zu entwickeln. Neue Tumormarker sollen hierbei Aussagen über Dignität, Stadium oder Metastasierungspotenzial der Erkrankung treffen. Weltweit ist zudem ein steigendes Interesse festzustellen, neue Marker für Koagulation, Fibrinolyse und Tumorangiogenese bei Karzinompatienten zu evaluieren. Dabei konnte in neuesten Studien eine mögliche klinische Relevanz von zirkulierenden **Mikropartikeln** (MP) bei verschiedenen malignen Erkrankungen dargelegt werden, unter anderem beim Magenkarzinom, Bronchialkarzinom, Trousseau-Syndrom, bei Kolorektalen Karzinomen, Lymphomen und bei Patienten mit muzinösen Adenokarzinomen (Mamma- und Pankreaskarzinom) (1-7).

MP sind Membranfragmente von einer Größe kleiner als  $1\mu\text{m}$ , die auf ihrer Oberfläche Antigene tragen, wodurch man sie ihrer Ursprungszelle zuordnen kann. Sowohl jede zirkulierende Blutzelle als auch Endothelzellen sind in der Lage, MP freizusetzen und ins Blut abzugeben. Mehrere unterschiedliche Stimuli können die Freisetzung von MP bewirken. Dazu gehören Aktivierung oder Apoptose der Ursprungszelle, partielle oder komplette Lyse, oxidativer Streß oder Scherstreß, der vor allem bei Endothelzellen einen wichtigen Stimulus darstellt. Dabei scheint jeweils ein Anstieg der Kalziumkonzentration im Zytosol, entweder aus zellinternen Tubuli oder aus dem Plasma, der entscheidende Trigger zu sein. Ein viel diskutiertes Konzept der MP-Freisetzung geht davon aus, dass spezifische Enzyme (Scramblase, Floppase) einen ‚Switch‘ induzieren können, der dazu führt, dass die normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran gelegenen negativ geladenen Phospholipide, wie zum Beispiel **Phosphatidylserin** (PS), auf der Außenseite

der Doppelschichtmembran zu liegen kommen. Dieser Switch wird, so vermutet man, von der Freisetzung von MP begleitet, die dann an ihrer Oberfläche das prokoagulatorisch wirkende PS tragen, was man sich für ihre Detektierung zunutze macht (8-11).

Für die Messung von MP haben sich vor allem die Durchflußzytometrie, der **Enzyme-linked Immunosorbent Assay** (ELISA, ein immunologisches Nachweisverfahren mittels enzymatischer Farbreaktionen) und die Messung der Prothrombinase-Aktivität (PF3) als die Methoden der Wahl etabliert. Als ‚Hilfsmittel‘ für die Quantifizierung von MP nutzt man ihre Bindung an Annexin V in Anwesenheit von Calcium, wobei die Bindungsstelle für Annexin V PS ist. Da aber nur eine gewisse Fraktion von MP Annexin V-positiv ist, werden zusätzliche Marker eingesetzt, die für die jeweilige Ursprungszelle spezifisch sind (12).

Erhöhte Konzentrationen an MP wurden bisher bei verschiedenen Krankheitsbildern wie dem akuten Coronaren Syndrom, kardiovaskulären Erkrankungen, der Rheumatoiden Arthritis, dem Systemischen Lupus erythematodes und der Multiplen Sklerose nachgewiesen (13-17).

Ein Bereich, in dem MP ebenso eine wichtige Rolle spielen, ist die Entzündungsreaktion. **Thrombozytäre MP (TMP)** präsentieren an ihrer Oberfläche Entzündungsmediatoren, von denen man bis vor kurzem annahm, dass sie ungebunden im Blut vorkommen. Nach neueren Erkenntnissen aber liegen sie auch an MP gebunden vor (12). Zu diesen Entzündungsmediatoren gehören unter anderem der **Plättchen-Aktivitäts-Faktor (PAF)**, verantwortlich vor allem für die Modulation der Leukozytenadhäsion am Endothel (18), ‚**Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted**‘ (RANTES, mittlerweile auch bekannt als ‚**Chemocine Ligand 5**‘, CCL5), ein hochwirksamer chemotaktischer Faktor mit Wirkung auf Eosinophile und Basophile, der die Freisetzung von Histamin vermittelt (19), und Thrombospondin, ein Modulator der Komplementaktivierung (20).

Am ausführlichsten sind bisher die TMP untersucht worden. Sie können antikoagulatorisch wirken, indem sie das Protein C-System unterstützen. Dabei können

sie über Thrombin-Thrombomodulin die Aktivierung von Protein C fördern und damit die Faktoren Va und VIIIa inaktivieren (21, 22).

TMP können auch prokoagulatorisch wirken, da sie eine anionische Phospholipidoberfläche haben, an die der Tenase- und Prothrombinase-Komplex andocken kann. Somit können sie passiv die Gerinnung initiieren (23-25). In neueren Studien konnte desweiteren nachgewiesen werden, dass TMP auf ihrer Oberfläche Gewebefaktor (**tissue factor**, TF) tragen und somit auch in der Lage sind, aktiv die Blutgerinnung zu initiieren (25-31). Wenn also eine deutlich erhöhte Anzahl an MP vorliegt, könnte dies eine thrombophile Risikosituation darstellen, welche Einfluss auf die Thromboseentstehung nimmt. Die tumor-assoziierte Thrombose ist die zweithäufigste Ursache für die Mortalität bei Krebspatienten neben der Krankheit selbst (32). Bis zu 10 % der Patienten mit einer unbekannt **tiefen Venenthrombose** (TVT) können ein Karzinom haben; eine idiopathische TVT kann also ein Hinweis auf eine okkulte maligne Erkrankung sein (33). Die Pathogenese der TVT bei Tumorerkrankungen wird allerdings noch nicht vollständig erfasst, aber in mehreren Untersuchungen wurden erhöhte Plasmaspiegel von Gerinnungsfaktoren gefunden (34-36). Weiter gibt es Hinweise, dass gerinnungsfördernde Proteine auf den Tumorzellen selbst exprimiert werden und so die Aktivierung der Gerinnungskaskade bewirken können (37-39). Darüberhinaus fand man eine Verbindung zwischen TF auf Tumorzellen und Hyperkoagulabilität, Tumor-Angiogenese und Tumor-Progression (40). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Plättchenaktivierung und damit verbunden eine Freisetzung von TMP durch Thrombin oder durch die Tumorzelle selbst erfolgen kann. Die dabei freigesetzten MP tragen an ihrer Oberfläche Mediatoren für die Angiogenese, wie zum Beispiel **vascular endothelial growth factor** (VEGF), TF oder Thrombospondin (41-43).

Andere Studien beschäftigen sich seit einiger Zeit mit dem vermehrten Vorkommen von zirkulierenden Endothelzellen bei Tumorpatienten. Auch bei diesen Untersuchungen geht es hauptsächlich um die Frage der Angiogenese und den Stellenwert und die Bedeutung der Endothelzellen bei diesem Prozeß. Dabei konnte festgestellt werden, dass

bei verschiedenen Tumorarten die Anzahl der zirkulierenden Endothelzellen erhöht ist (44) und diese Zunahme als ein Merkmal von fortgeschrittenen Tumorerkrankungen betrachtet werden kann (45, 46). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass TMP die Angiogenese fördern (47). Diese dadurch entstehende vermehrte Durchblutung könnte möglicherweise eine Ursache für verstärktes Tumorwachstum und eine hämatogene Metastasierung sein. Daneben können MP auch selbst das Metastasierungspotenzial verschiedener Tumorzelllinien stimulieren (48).



## 1.2. Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist derzeit der weltweit häufigste bösartige Tumor der Frau. Laut Schätzungen der WHO wird pro Jahr bei über einer Millionen Frauen erstmalig die Diagnose Brustkrebs gestellt. Auch in Deutschland steht das Mammakarzinom immer noch an vorderster Stelle bei den Krebserkrankungen, gefolgt von Kolorektalen Karzinomen, dem Bronchialkarzinom, Karzinomen des Gebärmutterkörpers, dem Magenkarzinom und Ovariakarzinomen. Etwa jede 10. Frau in Deutschland erkrankt somit während ihres Lebens an einem Mammakarzinom. Im Jahr 2000 waren es ca. 47 500 Betroffene, was einen Anteil von 24,4 % an allen weiblichen Krebserkrankungen beträgt. Betrachtet man die Mortalität, so liegt das Mammakarzinom auch dort an erster Stelle; im Jahr 2000 etwa lag die Zahl bei fast 18 000 Sterbefällen in Deutschland. Der Mittelwert des Erkrankungsalters liegt bei 61,4 Jahren, wobei sich mit einer Standardabweichung von 13,1 Jahren und einem Median von 60 Jahren eine fast symmetrische Verteilung ergibt.

Für alle Mammakarzinom-Patientinnen zeigt sich eine 5-Jahres-Überlebensrate von 76,4 %, die nach 10 Jahren noch bei 59,4 % liegt und nach 15 Jahren bei 46,7 %. Als wichtigster Prognosefaktor für das Überleben ist die Anzahl der positiven Lymphknoten zu nennen. Bei einem pN0-Status beträgt das relative Überleben nach 5 Jahren 94,8 % und auch nach 10 Jahren noch 86,4 %. Allerdings sinkt ab 10 und mehr befallenen Lymphknoten das relative Überleben auf nur noch 48,1 % nach 5 beziehungsweise 27,3 % nach 10 Jahren.

Für das histologische Grading des Tumors ergibt sich eine positive Korrelation mit anderen Prognosefaktoren. Beim Hormonrezeptorstatus zeigt sich zu Beginn auch eine positive Abhängigkeit zum relativen Überleben, die sich allerdings nach etwa 15 Jahren relativiert hat.

Ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Mammakarzinoms besteht für Frauen mit einer familiären Belastung hinsichtlich dieser Erkrankung, wobei der Grad der Verwandtschaft eine wichtige Rolle spielt. Ebenso erhöht ist das Risiko für Frauen im Zustand nach einem Mammakarzinom oder mit einer Präkanzerose der Brust. Auch Frauen im höheren Lebensalter sind gefährdeter, an einem Mammakarzinom zu erkranken, was deutlich wird, wenn man die altersspezifische Inzidenz betrachtet, die sich fast symmetrisch verteilt (prozentuales Erkrankungsalter: 32,1 % > 70 Jahre, 49,1 % zwischen 50-69 Jahre und 18,8 % < 50 Jahre). Daneben kann man für einen weiteren sehr großen Teil der weiblichen Bevölkerung ein ‚Gruppenrisiko‘ definieren, das sich aus mehreren Faktoren zusammensetzt, deren einzelne Bedeutungen aber zum Teil unbekannt sind. Zu diesen Faktoren gehören der Menopausenstatus, die Anzahl der Schwangerschaften/Geburten und Zyklus-Charakteristika, eine hohe Brustdichte in der Mammographie, proliferative und präkanzeröse Gewebeveränderungen in der Brust, die Belastung mit Kanzerogenen und konstitutionelle Faktoren wie Ernährungsgewohnheiten, der **Body-Mass-Index** (BMI) und körperliche Aktivität. Zur Früherkennung einer Brustkrebserkrankung zählen neben der Tastuntersuchung sowohl durch den Facharzt als auch durch die Frau selbst vor allem die apparativen Methoden der Mammographie, der Mamma-Sonographie und der **Magnetresonanztomographie** (MRT) sowie die minimal-invasiven Möglichkeiten der Probenentnahme durch Feinnadelpunktion, Stanz- und Vakuumbiopsie.

Um für die Patientinnen die jeweils angemessene Therapie empfehlen zu können, ist es wichtig, den Tumor anhand spezifischer Kriterien zu kategorisieren. Dafür entscheidend ist die histologische Klassifikation, das Grading und die Tumorgröße. Dazu kommen dann das pTNM-Stadium (**p**ostoperative histopathologische Klassifikation von **T**umor, **N**odes = Lymphknoten und **M**etastasen) und die R-Klassifikation (**R**esidualgrenzen) nach einer Operation, der Hormonrezeptorstatus und seit neuerem auch der HER-2/neu-Status (**h**uman **e**pidermal growth factor receptor 2).

Bei der Therapie gibt es zum einen die Möglichkeit der primär operativen Therapie. Dabei werden verschiedene Operationsverfahren angewandt, die **brusterhaltende Therapie** (BET) mit einer Entfernung des Tumors und die **modifiziert radikale Mastektomie** (MRM), wobei der gesamte Brustdrüsenkörper einschließlich der oberflächlichen Schichten der Pectoralisfaszie unter Belassung beider Pectoralismuskeln entfernt wird. Kombiniert wird beides mit einer Entfernung des Sentinellymphknotens und gegebenenfalls einer axillären Lymphonodektomie, je nach Status des Sentinels. Im Anschluß an eine BET muß die Restbrust nachbestrahlt werden. Je nach Klassifikation des Tumors ist eine systemische Therapie im Anschluß an die Operation anzuraten (adjuvante Therapie mit Chemo- und /oder Hormontherapie). Die andere Möglichkeit der Behandlung besteht in der **primär systemischen Therapie** (PST), also einer neoadjuvanten (Chemo-)Therapie, der eine Operation folgen sollte. Hierbei wird häufig der Sentinellymphknoten vor Beginn der neoadjuvanten Therapie entnommen.

Die Nachsorge beim Mammakarzinom sieht, vergleicht man sie mit der Nachsorge bei anderen Karzinomerkkrankungen, einen längeren Zeitraum vor. In den ersten 3 Jahren sollte alle 3 Monate, in den darauf folgenden 2 Jahren alle 6 Monate eine klinische Nachsorge stattfinden, die aus einer Anamnese und einer klinischen Untersuchung besteht. Insgesamt ist ein Zeitraum von 10 Jahren für die Nachsorge beim Mammakarzinom vorgesehen. Im Rahmen der Nachsorge ist eine Mammographie bei BET in den ersten 3 Jahren alle 6 Monate, danach alle 12 Monate geplant.

Lange Zeit galt das **Carzinoembryonale Antigen** (CEA) als der einzige im Blut zirkulierende Tumormarker. Heute benutzt man als hauptsächlichen Tumormarker für das Mammakarzinom das **Cancer-Antigen** (CA) 15-3, ein Produkt des MUC1-Gens. Das Einsatzgebiet beider Tumormarker (CEA und CA 15-3) beinhaltet sowohl die Überwachung von Frauen mit Brustkrebs als auch die Kontrolle der Therapie bei fortgeschrittener Krankheit. Neueste Untersuchungen beschäftigen sich jetzt aber auch mit der Suche nach neuen möglichen Tumor-/Prognosemarkern, wie zum Beispiel zirkulierende MP.

Möchte man eine Prognose zum Verlauf des Mammakarzinoms abgeben, so werden dafür als gesichert geltende relevante Faktoren wie das pTNM-Stadium, die Morphologie des Tumors (Grading und histologische Klassifikation), der Rezeptorstatus (Östrogen-/Progesteronrezeptoren) und der HER-2/neu-Status herangezogen. Als Nachteil ist zu nennen, dass hierbei immer Tumorgewebe untersucht werden muß, welches mithilfe einer vorangehenden Biopsie beziehungsweise Operation gewonnen wird (49).

### 1.3. Studienziel

Bei dieser prospektiven Fall-Kontroll-Studie wurden die Konzentrationen an thrombozytären, endothelialen und leukozytären MP bei Mammakarzinom-Patientinnen und Frauen mit benignen Mammatumoren untersucht.

## **2. Material und Methodik**

### **2.1. Studiendesign**

#### **2.1.1. Patientenkollektiv**

Alle Patientinnen wurden sowohl durch einen standardisierten Einverständnisbogen (siehe Anlage S. 57) als auch durch ein persönliches Gespräch über die Studie aufgeklärt. Durch ihre Unterschrift erteilten die Patientinnen die Erlaubnis, ihre klinischen und labortechnischen Daten zu analysieren. Diese Studie war zuvor bereits durch die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt worden (Projekt-Nr. 349/02).

Die Studienpatientinnen wurden aus dem Patientenkollektiv der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe und des Institutes für Klinische Radiologie des Universitätsklinikums Großhadern der LMU München ausgewählt. Dabei waren Patientinnen eingeschlossen, bei denen ein Mammakarzinom per Stanzbiopsie diagnostiziert worden war, bevor sie einer chirurgischen Therapie zugeführt wurden. Im Anschluß an die Operation wurden die Patientinnen anhand der Tumorgröße, des Nodalstatus und möglicherweise vorhandener Metastasen dem entsprechendem TNM-Stadium zugeteilt (Tabelle 1).

In die Kontrollgruppe wurden Frauen aufgenommen, bei denen histologisch ein benigner Mammabefund gesichert worden war. Dabei konnte vor allem auf Patientinnen der Abteilung für Klinische Radiologie zurückgegriffen werden, bei denen bei sonographischer oder mammographischer Stanzbiopsie ein benigner Tumor nachgewiesen wurde.

Ausgeschlossen wurden Patientinnen, die vor der Blutabnahme eine operative, adjuvante oder neoadjuvante Therapie erhalten hatten, sowie Frauen, die Aspirin, niedermolekulare

Heparine oder Marcumar eingenommen hatten oder Bluthochdruck beziehungsweise eine Thrombose in der Anamnese aufwiesen.

Bei allen Teilnehmerinnen wurden anamnestisch Daten zu Alter, Größe und Gewicht erhoben.

<b>pT0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor
<b>pTis</b>	Carcinoma in situ: <b>duktales</b> (DCIS) oder <b>lobuläres Carcinoma in situ</b> (LCIS) oder Morbus Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor <i>Anmerkung:</i> Der Morbus Paget, kombiniert mit einem nachweisbaren Tumor, wird entsprechend der Größe des Tumors klassifiziert
<b>pT1</b>	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung <b>pT1mic</b> Mikroinvasion von 0,1 cm oder weniger in größter Ausdehnung <b>pT1a</b> mehr als 0,1 cm, aber nicht mehr als 0,5 cm in größter Ausdehnung <b>pT1b</b> mehr als 0,5 cm, aber nicht mehr als 1 cm in größter Ausdehnung <b>pT1c</b> mehr als 1 cm, aber nicht mehr als 2 cm in größter Ausdehnung
<b>pT2</b>	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
<b>pT3</b>	Tumor mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
<b>pT4</b>	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut <i>Anmerkung:</i> Die Brustwand schließt die Rippen, die interkostalen Muskeln und den vorderen Serratusmuskel mit ein, nicht aber die Pectoralis-Muskulatur <b>pT4a</b> mit Ausdehnung auf die Brustwand <b>pT4b</b> mit Ödem (einschließlich Apfelsinenhaut), Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut der gleichen Brust <b>pT4c</b> Kriterien 4a und 4b gemeinsam <b>pT4d</b> entzündliches (inflammatorisches) Karzinom
<b>pNx</b>	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden (zur Untersuchung nicht entnommen oder früher entfernt)
<b>pN0</b>	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen <sup>a</sup>
<b>pN1mic</b>	Mikrometastase (größer als 0,2 mm, aber nicht größer als 2 mm in max. Ausdehnung)
<b>pN1</b>	Metastase(n) in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und/oder ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n), die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden,

	<p>aber nicht klinisch erkennbar<sup>b</sup> waren</p> <p><b>pN1a</b> Metastase(n) in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten, zumindestens eine größer als 2 mm in max. Ausdehnung</p> <p><b>pN1b</b> Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n), die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch erkennbar waren</p> <p><b>pN1c</b> Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n), die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber klinisch nicht erkennbar waren</p>
<b>pN2</b>	<p>Metastase(n) in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in klinisch erkennbaren<sup>c</sup> ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastase</p> <p><b>pN2a</b> Metastasen in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten, zumindestens eine größer als 2 mm in max. Ausdehnung</p> <p><b>pN2b</b> Metastase(n) in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastase</p>
<b>pN3</b>	<p>Metastasen in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten; oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten; oder in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase; oder mehr als 3 axilläre Lymphknotenmetastasen mit klinisch nicht erkennbarer(en), mikroskopisch nachweisbarer(en) Metastase(n) in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna; oder Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten</p> <p><b>pN3a</b> Metastase(n) in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten (zumindest eine größer als 2 mm in max. Ausdehnung) oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten</p> <p><b>pN3b</b> Metastase(n) in klinisch erkennbarem(en) Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei Vorliegen von mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase; oder Metastasen in mehr als 3 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, nachgewiesen durch Sentinellymphknoten-Dissektion, aber nicht klinisch erkennbar</p> <p><b>pN3c</b> Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten</p>
<b>pMx</b>	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
<b>pM0</b>	Keine Fernmetastasen
<b>pM1</b>	Fernmetastasen

**Tabelle 1:** pTNM-Klassifikation des Mammakarzinoms, Quelle: Manual Mammakarzinome (71)



### Anmerkung:

<sup>a</sup> Fälle, bei denen nur isolierte Tumorzellen in regionalen Lymphknoten nachgewiesen werden, werden als pN0 (i+) klassifiziert. Isolierte Tumorzellen sind definiert als einzelne Tumorzellen oder kleine Ansammlungen von Zellen, die in ihrer größten Ausdehnung 0,2 mm nicht überschreiten und gewöhnlich mittels Immunhistochemie oder molekularen Methoden entdeckt werden. Manchmal können sie mittels H&E-Färbung verifiziert werden.

Isolierte Tumorzellen zeigen typischerweise keine Hinweise auf eine metastatische Aktivität, d.h. Proliferation oder Stromareaktion.

<sup>b</sup> Nicht klinisch erkennbar = nicht entdeckt im Rahmen der klinischen Untersuchung oder mit bildgebenden Untersuchungsverfahren (ausgenommen Lymphszintigraphie).

<sup>c</sup> Klinisch erkennbar = entdeckt im Rahmen der klinischen Untersuchung oder mit bildgebenden Untersuchungsverfahren (ausgenommen Lymphszintigraphie) oder makroskopisch vom Pathologen erkannt.

### 2.1.2. Blutentnahme

Die Probengewinnung erfolgte bei den Patientinnen mittels einer weitleumigen Kanüle (20 G) und Vacutain (9 Natriumcitrat 0,105 M, 1:10 verdünnt) bei einem Stauungsdruck von etwa 40 mmHg, der nur für den Einstich aufrechterhalten und danach wieder gelöst wurde. In vorhergegangenen Versuchen konnte festgestellt werden, dass durch diese spezielle Art der Blutabnahme kein Einfluß auf den Aktivierungszustand der Thrombozyten genommen wird. Es wurden insgesamt 3 Röhrchen Blut abgenommen, ein Serumröhrchen, ein EDTA-Blutröhrchen und ein Citratblutröhrchen (alle Monovetten Sarstedt, Nürnberg, Deutschland), welches innerhalb von 30 Minuten weiterverarbeitet wurde. Durch die schnelle Weiterverarbeitung konnte eine Autoaktivierung der Thrombozyten verhindert werden, wie sich in vorhergegangenen Versuchen gezeigt hatte. Zusätzlich wurden ein kleines Blutbild und die relevanten Tumormarker am Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikum Großhadern bestimmt.

### 2.1.3. Aufbereitung der Blutproben

Das Citratröhrchen wurde innerhalb von 30 Minuten im Forschungslabor der Frauenklinik des Klinikum Großhadern weiterverarbeitet. Dafür wurden die Proben 20 Minuten lang bei 1550xg zentrifugiert (Omnifuge 2.ORS, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland). Der Plasmaüberstand wurde bis auf 1 cm abpipettiert, durchmischt und jeweils à 320 µl Probe asserviert. Diese wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dort zur weiteren Stabilisierung für 15 Minuten aufbewahrt. Vor der endgültigen Weiterverarbeitung, die frühestens 2 Tage nach Gewinnung erfolgte, wurden die Proben bei -80°C gelagert.

### 2.1.4. Laborwerte

Für jede Studienteilnehmerin wurden folgende Laborparameter erhoben, angegeben hier mit den zugehörigen Referenzwerten des Institutes für Klinische Chemie am Universitätsklinikum Großhadern:

<i>Thrombozytenzahl</i>	<i>150 – 440 G/l</i>
<i>Hämoglobinwert</i>	<i>12 – 16 g/dl</i>
<i>Leukozytenzahl</i>	<i>4 – 11 G/l</i>
<i>CA 15-3 S</i>	<i>&lt; 28 U/ml</i>
<i>CEA S</i>	<i>&lt; 3,4 ng/ml</i>

## 2.2. Durchflußzytometrie

### 2.2.1. Prinzip der Durchflußzytometrie

Bei der Durchflußzytometrie oder **Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)** werden Eigenschaften von Zellen gemessen, wobei es sich prinzipiell um die Emission von optischen Signalen seitens der Zelle handelt, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Um diesen Vorgang zu ermöglichen, müssen die Zellen in einer Suspension vorliegen. Diese Suspension wird durch Überdruck über eine feine Kapillare in eine Meßkammer transportiert, durch welche ein kontinuierlicher Strom von Trägerflüssigkeit fließt. Trifft die Probensuspension auf die Trägerflüssigkeit, wird sie durch deren laminare Strömung auf die Mitte der Meßküvette konzentriert (Vorgang der hydrodynamischen Fokussierung). Dadurch wird die Probensuspension so stark beschleunigt, dass die Zellen perlschnurartig ein Sensormodul passieren und dort einzeln vom Laserstrahl erfaßt werden können. Jede einzelne Zelle wird durch den Laser angeregt und emittiert Streulicht unterschiedlicher Qualität und Quantität, wodurch es möglich wird, eine Aussage über unterschiedliche Eigenschaften der Zelle zu treffen. Dabei stellen das Vorwärtstreulicht (**Forward Scatter = FSC**) ein Maß für die Zellgröße und das Seitwärtstreulicht (**Side Scatter = SCC**) ein Maß für die Granularität und die Struktur der Zelle dar. Durch diese Nutzung der Durchflußzytometrie lassen sich schon im Vollblut die einzelnen Zellpopulationen (Erythrozyten – Thrombozyten – Leukozyten) voneinander abgrenzen.

Um die Differenzierung noch sensitiver zu gestalten, beziehungsweise bestimmte Oberflächenmembranproteine und –partikel darstellen zu können, verwendet man zusätzlich fluoreszierende Farbstoffe und markiert damit Antigene, um dadurch deren Emissionen in bestimmten Absorptionsspektren darstellen zu können. Das Prinzip beruht darauf, dass der verwendete Laser die Elektronen der Fluoreszenzfarbstoffe anregt und diese dadurch auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Beim Zurückfallen auf ihr ursprüngliches Energieniveau kommt es dann zur Emission von Energie in Form von Photonen, der sogenannten Fluoreszenz. Diese Konzentration an Photonen ist direkt

proportional zur Menge der gebundenen Antikörper bzw. Zellen. Zusätzlich geht auch Energie in Form von Wärme verloren, so dass das Emissionsspektrum energieärmer und damit langwelliger ist als das Anregungsspektrum.

### 2.2.2. Meßgerät und verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Für die Analysen wurde ein Durchflußzytometer (FACScan) der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) benutzt, welches einen monochromatischen Argonlaser mit einer Emissionslinie von 488 nm beinhaltet. Durch den Aufbau des FACScan mit insgesamt 3 Kanälen ließen sich bis zu 3 Farbstoffe zur gleichen Zeit aufzeichnen. Zur Unterscheidung wurden hier Fluoreszein-Isocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) verwendet.

<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>Max. Exzitation</b>	<b>Max. Emission</b>	<b>Farbe</b>
Fluoreszein-Isocyanat (FITC)	488 nm	525 nm	Grün
Phycoerythrin (PE)	488 nm	575 nm	Gelb-rot

**Tabelle 2:** Angabe der Wellenlänge der verwendeten Fluorochrome FITC & PE

Das FACScan zeichnet im Kanal 1 Wellenlängen von 530 nm auf und im Kanal 2 Wellenlängen von 585 nm. Somit ist ersichtlich, dass die verwendeten Fluorochrome ein genau passendes Emissionsspektrum zur Analyse besitzen.

### 2.2.3. Geräteeinstellung

Forward Scatter (FSC) und Side Scatter (SCC) wurden auf eine logarithmische Verstärkung festgelegt. Die Geschwindigkeit, mit der die Proben durch die Meßkammer fließen, wurde auf 60 µl/min festgelegt.

## 2.2.4. Verwendete Antikörper

### 2.2.4.1. Annexin V

Annexin V ist ein Protein mit einer Größe von etwa 36 kD, das  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an anionische Phospholipide von Zellmembranen bindet, vor allem an PS. PS befindet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran, kann aber durch Aktivierung oder Apoptose der Zelle auf die Außenseite gelangen. Annexin V wirkt antikoagulatorisch, indem es den Kontakt von anionischen Phospholipiden auf der Zelloberfläche mit Gerinnungsfaktoren verhindert. Dadurch wird vor allem die Prothrombin-Aktivierung gehemmt und eine Thrombusbildung verhindert.

Es wurden folgende Annexin V-Antikörper verwendet:

- **Annexin V – FITC** der Firma IQ Products
- **Annexin V – PE** der Firma IQ Products (beide von Immuno Quality Products, Groningen, Niederlande)

### 2.2.4.2. Immunglobulin G 1 (IgG 1)

IgG 1 ist ein Immunglobulin mit einer Größe von 146 kD, es stellt die größte Subklasse von IgG dar. IgG 1 ist in der Lage, Komplementfaktoren zu aktivieren, Immunkomplexe zu formieren und an Makrophagen zu binden, wodurch die Phagozytose erleichtert wird.

Es wurden folgende IgG 1-Antikörper verwendet:

- **Mouse IgG 1 – FITC** der Firma Immunotech (Immunotech, Marseille, Frankreich)
- **Isotype control IgG 1 R – PE** der Firma IQ Products (Immuno Quality Products, Groningen, Niederlande)

#### 2.2.4.3. CD61

CD61 ist ein Cystein-reiches Glykoprotein und gehört zur Familie der Integrine B. CD61 selbst bildet einen Calcium-abhängigen Komplex mit dem Glykoprotein GP11b auf ruhenden Thrombozyten. CD61 ist an der Zelladhäsion beteiligt und dient als Vermittler bei der Plättchenaggregation.

Es wurde folgender CD61-Antikörper verwendet:

- **PE anti-human CD61** der Firma BD Pharmingen (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland)

#### 2.2.4.4. CD63

CD63 ist ein Typ 3-Glykoprotein der Tetraspanin-Familie und befindet sich in intrazellulären Granula von Thrombozyten. Bei Aktivierung der Plättchen wird es an die Zelloberfläche transportiert, wodurch es als Marker für Thrombozytenaktivierung dient. CD63 vermittelt Signaltransduktionen, die eine Rolle spielen bei der Regulierung von Zellentwicklung, Zellaktivierung, Wachstum und Beweglichkeit. Zudem wird diskutiert, dass CD63 eine Funktion als Tumorsuppressorgen bei der Ausbreitung von menschlichen Melanomzellen hat.

Es wurde folgender CD63-Antikörper verwendet:

- **Monoclonal Antibody CD63-PE** der Firma Immunotech (Immunotech, Marseille, Frankreich)

#### 2.2.4.5. CD62P

CD62P ist ein P-Selectin Typ 1-Glykoprotein und wird bei Aktivierung von Thrombozyten aus sekretorischen Granula an die Oberfläche transportiert. CD62P besitzt Bindungsstellen für **Epidermal Growth Factor (EGF)** und für **Complement Control**

Binding Protein (CCP). Es vermittelt die Interaktion von Leukozyten mit der Blutgefäßwand.

Es wurde folgender CD62P-Antikörper verwendet:

- **Monoclonal Antibody CD62P-PE** der Firma Immunotech (Immunotech, Marseille, Frankreich)

#### 2.2.4.6. CD62E

CD62E ist ein E-Selectin Typ 1-Glykoprotein und dient als Marker für aktivierte Endothelzellen. Wie CD62P besitzt auch CD62E Bindungsstellen für EGF und CCP. Wie auch die anderen Selektine ist CD62E ein Adhäsionsmolekül und wirkt an der Bindung von Leukozyten an die Gefäßwand mit, was eine wichtige Voraussetzung für den Übertritt von Leukozyten ins Gewebe bei entzündlichen Prozessen darstellt. Weiter wird für CD62E eine Rolle bei der Vermittlung der Tumorzelladhäsion während der hämatogenen Metastasierung diskutiert.

Es wurde folgender CD62E-Antikörper verwendet:

- **PE anti-human CD62E** der Firma BD Pharmingen (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland)

#### 2.2.4.7. CD45

CD45 ist ein Typ 1-Glykoprotein der Tyrosin-Phosphatase-Rezeptor-Familie und besitzt Bindungsstellen für Fibronectin-Typ-III. CD45 ist ein Signalmolekül, das eine Vielzahl von Zellprozessen reguliert, wie Zellwachstum und Differenzierung. CD45 wird vor allem von Leukozyten exprimiert, dabei sind die B- und T-Lymphozyten besonders hervorzustellen.

Es wurde folgender CD45-Antikörper verwendet:

- **CD45-PE** der Firma Immunotech (Immunotech, Marseille, Frankreich)

### **2.2.5. Prothrombin-Fragment F1+2**

Das Prothrombin-Fragment F1+2 ist ein Spaltprodukt des Prothrombins während der Umwandlung in Thrombin. Seine Halbwertszeit im Plasma beträgt 1,5 Stunden. Das Prothrombin-Molekül mit einer Größe von 70 kD wird durch die proteolytische Aktivität des Faktors Xa in ein Thrombin-Molekül mit der Größe von 30 kD gespalten. Dabei entsteht ein Prothrombin-Fragment F1+2, welches die Größe von 35 kD besitzt.

Die Konzentration des Prothrombin-Fragments F1+2 steigt im Blut von Patienten mit akuten venösen Thrombembolien stark an.

Die Bestimmung erfolgt nach ELISA-Enzygnost 1-2 der Firma Boehringer Mannheim, wobei das Peptid F1+2 durch immobilisierte monoklonale Antikörper an eine feste Phase gebunden und mit einem zweiten enzymmarkierten Antikörper detektiert wird.



## 2.3. Versuchsablauf

### 2.3.1. Puffer und Grundlösungen

Die PBS-Grundlösung bestand aus 9 g NaCl gelöst in 1000 ml *aqua destillata* (entsprechend 154 mmol/l NaCl 0,9 %) und zusätzlich 0,25 g Hydrogenphosphat Natrium (entsprechend 1,4 mmol/l Phosphat) mit einem pH von 7,5. Diese Grundlösung war 1 – 2 Wochen bei Raumtemperatur haltbar.

Für die Calcium-Grundlösung wurden 1,47 g  $\text{CaCl}_2$  in 100 ml *aqua destillata* gelöst (0,1 mol/l  $\text{CaCl}_2$  entsprechend). Diese Lösung war bei 2 – 8 ° Celsius für 12 Monate haltbar.

Die Citrat-Grundlösung bestand aus 3,2 g Tri-Natriumcitrat gelöst in 100 ml *aqua destillata* (3,2 % Tri-Natriumcitrat entsprechend). Diese Grundlösung war für 2 Monate bei 2 – 8 ° Celsius haltbar.

### 2.3.2. Arbeitslösungen

Die Arbeitslösungen wurden täglich frisch aus den Grundlösungen hergestellt. Dabei bestand der Calcium-Puffer aus 39 ml PBS-Grundlösung sowie 1 ml Calcium-Grundlösung. Der Citrat-Puffer bestand aus 27 ml PBS-Grundlösung sowie 3 ml Citrat-Grundlösung.

Diese Arbeitslösungen wurden vor jedem Gebrauch noch am pH-Meßgerät (inoLab pH 720, WTW Series, Weilheim, Deutschland) überprüft, ob ein Bereich von pH 7,36 bis 7,43 vorliegt. Um eine Verunreinigung möglichst gering zu halten, wurden die Arbeitslösungen zuletzt noch gefiltert (Minisart, non-pyrogenic, 0,20  $\mu\text{m}$ , steril, Sartorius, Göttingen, Deutschland).

### 2.3.3. Probenlösung

Die Isolation und Analyse der MP wurde auf die Art und Weise durchgeführt, wie sie von *Nieuwland et al.* beschrieben wurde (25).

Die nach der Blutabnahme durch Zentrifugation, Pipettierung und Schockgefrierung gewonnenen Proben wurden langsam auf Eis über ca. 1 – 2 Stunden aufgetaut und 250 µl Probe zur weiteren Benutzung abpipettiert. Danach erfolgte eine erste Zentrifugation für 30 Minuten bei 17,570xg und 20° Celsius (Mikro 22R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland). Ein Überstand von 225 µl wurde verworfen, die restlichen 25 µl Probe wurden mit 225 µl PBS-Tri-Natriumcitrat-Gemisch (Citrat-Puffer) verdünnt und durchmischt. Es erfolgte die zweite Zentrifugation für erneut 30 Minuten bei wieder 17,570xg und 20° Celsius. Wieder wurde ein Überstand von 225 µl abpipettiert und verworfen und der Rest (25 µl) mit 75 µl Citrat-Puffer verdünnt und vermischt.

Die verwendeten Antikörper wurden in jeweils passenden Verhältnissen mit Calcium-Puffer gemischt (s. Tabelle 3) und bis auf die beiden Annexin-Leerproben für 5 Minuten bei 17,570xg und 20° Celsius zentrifugiert (Mikro 22R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland).

<b>Annexine-FITC</b>	6 µl Annexine-FITC	54 µl Ca-Puffer
<b>IgG-PE</b>	2 µl IgG-PE	18 µl Ca-Puffer
<b>CD61-PE</b>	2 µl CD61-PE	18 µl Ca-Puffer
<b>CD63-PE</b>	10 µl CD63-PE	10 µl Ca-Puffer
<b>CD62P-PE</b>	2 µl CD62P-PE	18 µl Ca-Puffer
<b>CD62E-PE</b>	10 µl CD62E-PE	10 µl Ca-Puffer
<b>CD45-PE</b>	4 µl CD45-PE	16 µl Ca-Puffer

<b>Annexine-PE</b>	2 µl Annexine-PE	38 µl Ca-Puffer
<b>IgG-FITC</b>	2 µl IgG-FITC	18 µl Ca-Puffer

**Tabelle 3:** Antikörper-Mischungen

Anschließend wurde ein Überstand von 10 µl abpipettiert.

Für die fertigen Messlösungen wurden jeweils 5 µl des Plasma-Citrat-Gemisches (s.o.) mit je 5 µl der jeweils zell-spezifischen Antikörper und je 35 µl PBS-CaCl<sup>2</sup>-Gemisch (Calcium-Puffer) gemischt. Dazu kamen für die PE-gelabelten Antikörper jeweils 5 µl Annexin-FITC und für die FITC-gelabelten Antikörper jeweils 5 µl Annexin-PE.

Die beiden Annexin-Leerproben wurden mit jeweils 35 µl Citrat-Puffer und 5 µl Plasma-Citrat-Gemisch (s.o.) gemischt, so dass sich zum Schluß folgende Probenverhältnisse ergaben, die denen von *Berckmans et al.* entsprechen (22):

<b>Annexine-FITC-Leerprobe</b>	35 µl Citrat-Puffer	5 µl Annexin-FITC		5 µl Plasma-Citrat-Lösung (= MP)
<b>IgG-PE</b>	35 µl Calcium-Puffer	5 µl Annexin-FITC	5 µl IgG-PE	5 µl Plasma-Citrat-Lösung (= MP)
<b>CD61-PE</b>	35 µl Calcium-Puffer	5 µl Annexin-FITC	5 µl CD61-PE	5 µl Plasma-Citrat-Lösung (= MP)
<b>CD63-PE</b>	35 µl Calcium-Puffer	5 µl Annexin-FITC	5 µl CD63-PE	5 µl Plasma-Citrat-Lösung (= MP)
<b>CD62P-PE</b>	35 µl Calcium-Puffer	5 µl Annexin-FITC	5 µl CD62P-PE	5 µl Plasma-Citrat-Lösung (= MP)
<b>CD62E-PE</b>	35 µl Calcium-Puffer	5 µl Annexin-FITC	5 µl CD62E-PE	5 µl Plasma-Citrat-Lösung (= MP)

<b>CD45-PE</b>	35 µl Calcium-Puffer	5 µl Annexin-FITC	5 µl CD45-PE	5 µl Plasma-Citrat-Lösung (= MP)
<b>Annexine-PE-Leerprobe</b>	35 µl Citrat-Puffer	5 µl Annexin-PE		5 µl Plasma-Citrat-Lösung (= MP)
<b>IgG-FITC</b>	35 µl Calcium-Puffer	5 µl Annexin-PE	5 µl IgG-FITC	5 µl Plasma-Citrat-Lösung (= MP)

**Tabelle 4:** fertige Mischungen

Die fertigen Probenlösungen wurden für 15 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Danach wurden die Annexin-Leerproben mit jeweils 900 µl Citrat-Puffer und die Antikörpermischungen mit jeweils 900 µl Calcium-Puffer verdünnt, um die Reaktion zu stoppen.

### 2.3.4 Auswertung

Zur Auswertung der Mikropartikelmessungen wurde die Cell Quest Software (Becton Dickinson; San Jose, California, USA) benutzt. Für die statistische Auswertung wurde das SPSS-Programm für Windows (Statistical Package for Social Science, Version 15.0, Chicago, Illinois, USA) verwendet. Die parametrisch verteilten Daten wurden als arithmetisches Mittel (+/- Standardabweichung) ausgedrückt, alle anderen Daten als Median. Unabhängige Variablen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test und dem Fisher's exact-Test analysiert. P-Werte <0.05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

## 3. ERGEBNISSE

### 3.1. Studien-Population

Insgesamt wurde bei dieser Studie das periphere Blut von 58 Patientinnen mit einem neu diagnostizierten Mammakarzinom untersucht und die Daten mit denen von 13 Patientinnen mit einem benignen Mammatumor verglichen. Das Durchschnittsalter zwischen den einzelnen Gruppen zeigte keine großen Unterschiede: bei den Patientinnen mit einem Mammakarzinom lag das Durchschnittsalter bei  $59,8 \pm 11,4$  Jahren (Mittelwert  $\pm$  SD 34-85 Jahre) und bei der Kontrollgruppe mit benignem Mammatumor bei  $55,4 \pm 16,5$  Jahren (20-80 Jahre). Lediglich innerhalb der Gruppe der Karzinompatientinnen gab es eine leichte Verschiebung innerhalb des Alters, wobei die Patientinnen mit Fernmetastasen und einem größeren Tumor im Durchschnitt  $8,1 - 9,5$  Jahre älter waren als die Patientinnen mit einem in-situ-Karzinom oder einem kleineren Tumor.

Der BMI-Wert variierte nicht stark zwischen den einzelnen Gruppen:  $24,0 \pm 4,2$  bei der Kontrollgruppe mit benignem Tumor,  $24,6 \pm 3,7$  bei Tis,  $24,9 \pm 3,2$  bei Patientinnen mit einem T1-Tumor und  $23,9 \pm 2,5$  bei einem M1-Stadium. Lediglich die Patientinnen mit einem T2-Stadium wiesen einen leicht höheren BMI-Wert auf:  $27,1 \pm 5,3$ .

Bezüglich des zusätzlich abgenommenen Blutbildes mit der Bestimmung von Hämoglobin, Leukozyten- und Thrombozytenzahl zeigten sich keine großen Unterschiede: weder bei den Hämoglobin-Werten (Durchschnittswerte beim Mammakarzinom bei  $13,8 \pm 1,2$  g/dl (11,3-16,7), bei benignen Tumoren bei  $14,0 \pm 0,7$  g/dl (13,1-15,4)), noch bei der Leukozytenzahl (Mammakarzinom  $7,1 \pm 2,0 \times 10^3/l$  (4-12.8),

benigner Tumor  $7.7 \pm 3.0 \times 10^3/l$  (5.2-16)) oder bei der Thrombozytenzahl (Mammakarzinom  $280 \pm 67 \times 10^3/l$  (146-483), benigner Tumor  $277 \pm 51 \times 10^3/l$  (207-365)).

Desweiteren wurden die beiden Tumormarker CEA und CA 15-3 untersucht, wobei deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachgewiesen werden konnten. Generell ist zu sagen, dass die beiden Tumormarker im Durchschnitt nur bei Vorliegen eines großen Primärtumors (T2) und bei Fernmetastasen (M1) erhöht, also positiv waren. Die höchsten Werte für CEA fanden sich mit  $12,5 \text{ ng/ml} \pm 25,6$  bei den Patientinnen mit Fernmetastasen (M1) im Vergleich zu den Patientinnen mit einem benignen Mammatumor ( $1,0 \text{ ng/ml} \pm 0,7$ ), ebenso wie im Vergleich mit den Patientinnen mit einem in-situ-Karzinom ( $1,7 \text{ ng/ml} \pm 0,5$  bei Tis) und mit einem kleinen Tumor ( $1,8 \text{ ng/ml} \pm 1,8$  bei T1). Das gleiche Ergebnis zeigte sich für den zweiten Tumormarker CA 15-3. Es konnten deutlich erhöhte Werte bei einem Vorliegen von Fernmetastasen (M1:  $77,0 \text{ U/l} \pm 62,8$ ) nachgewiesen werden verglichen mit den gemessenen Werten der Kontrollgruppe ( $15,2 \text{ U/l} \pm 4,9$  bei benignem Tumor) und auch denen der Patientinnen mit einem frühen Krankheitsstadium ( $12,1 \text{ U/l} \pm 6,6$  bei Tis, und  $17,0 \text{ U/l} \pm 6,1$  bei T1).

<b>Parameter</b>	<b>benigne n=13</b>	<b>Tis n=8</b>	<b>T1 n=27</b>	<b>T2 n=16</b>	<b>M1 n=7</b>
<b>Alter (Jahren)</b>	55.4±16.5 (20-80)	57.6±6.9 (46-69)	56.2±10.8 (36-80)	64.3±11.9 (34-78)	65.7±12.4 (47-85)
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	24.0±4.2 (19-29)	24.6±3.7 (19-32)	24.9±3.2 (17-30)	27.1±5.3 (20-37)	23.9±2.5 (21-28)
<b>Hb (g/dl)</b>	14.0±0.7 (13-15)	14.3±1.5 (12-17)	13.7±1.1 (11-16)	13.7±1.3 (11-16)	13.4±1.0 (12-15)
<b>Thrombozyten (G/l)</b>	276.9±50.9 (207-365)	286.6±95.0 (191-483)	275.6±49.7 (196-426)	264.8±76.3 (146-417)	321.0±64.6 (256-417)

<b>Leukozyten</b> (G/l)	7.8±3.0 (5-16)	7.3±2.7 (5-13)	6.6±1.6 (4-12)	7.0±1.8 (4-10)	9.1±2.1 (5-12)
<b>CEA</b> (ng/ml)	1.0±0.7 (0-3)	1.7±0.5 (1-3)	1.8±1.8 (0-9)	5.7±13.5 (1-56)	12.5±25.6 (1-70)
<b>CA 15-3</b> (U/l)	15.2±4.9 (8-24)	12.1±6.6 (1-22)	17.0±6.1 (7-32)	31.4±49.8 (8-212)	77.0±62.8 (8-192)

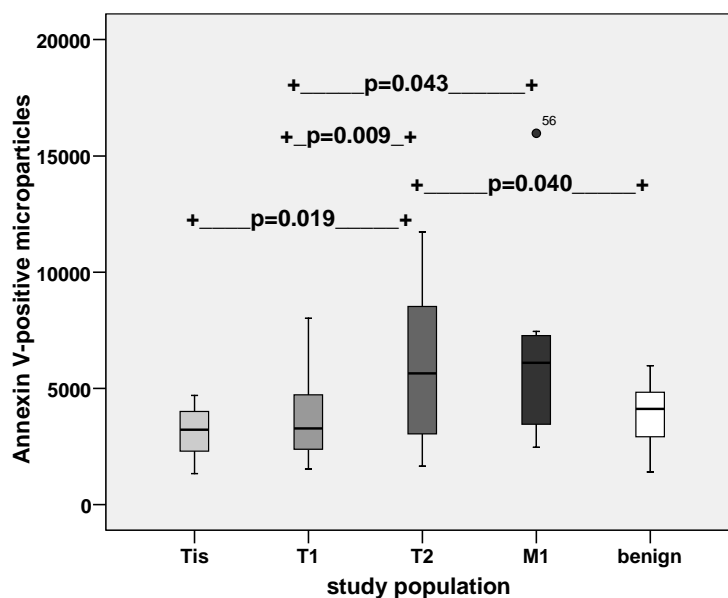
**Tabelle 5:** Dargestellt werden die demographischen Patientendaten, BMI-Werte & Laborbefunde. Die parametrisch verteilten Daten werden präsentiert als Mittelwert +/- Standardabweichung (Minimum-Maximum)

### 3.2. Zirkulierende Mikropartikel

Die Gesamtzahl an zirkulierenden Annexin V-positiven MP war am höchsten bei Mammakarzinom-Patientinnen mit einem großen Primärtumor (T2) und Fernmetastasen (M1). Dabei zeigten sich auf mehreren Ebenen signifikante Unterschiede: für Patientinnen mit einem T2-Stadium zwischen T2 und Tis ( $p=0.019$ ), T2 und T1 ( $p=0.009$ ) und T2 und benignen Befunden ( $p=0.04$ ). Auch zeigte sich Signifikanz bei Patientinnen mit Fernmetastasen zwischen M1 und T1 ( $p=0.043$ ).

Parameter	benigne n=13	Tis n=8	T1 n=27	T2 n=16	M1 n=7
Annexin ( $\times 10^6/l$ )	4108 (2530-4874)	3220** (2277-4124)	3281** (2356-4861)	5637*,** (2852-8613)	6102** (3350-7445)

**Tabelle 6:** Dargestellt wird die Gesamtzahl an zirkulierenden Annexin V-positiven MP. Die Anzahl der MP wird angezeigt als Median (Minimum-Maximum). Zirkulierende MP: ■ kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Frauen mit benignem Brusttumor, \*\* kennzeichnet signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppe der Mammakarzinom-Patientinnen.  $p < 0.05$  = signifikant.



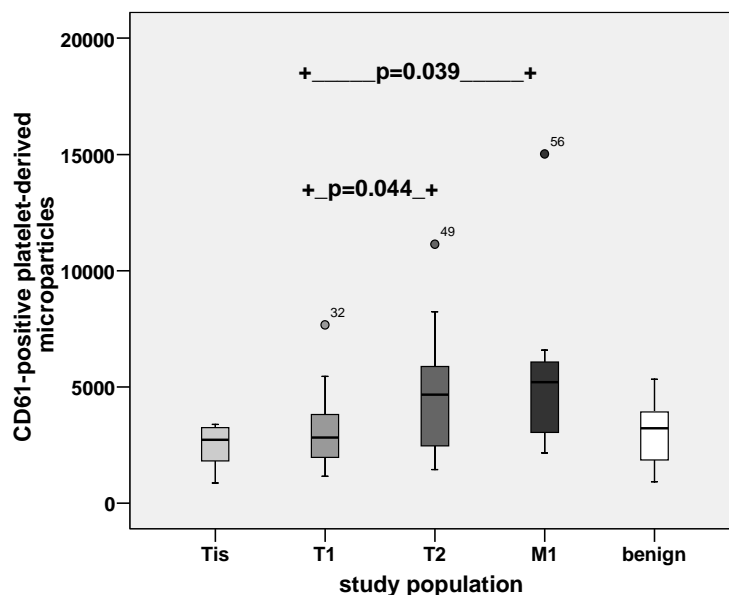
**Abbildung 1:** Verteilung der Gesamtzahl der Annexin V-positiven MP innerhalb der Studienpopulation, analysiert durch Durchflußzytometrie. Daten werden dargestellt als Median,  $p < 0.05$  = signifikant.



Wie sich bei den Untersuchungen nachweisen ließ, stammten die Annexin V-positiven MP hauptsächlich von Thrombozyten (CD61-positive MP), dabei 82,3 % bei den Mammakarzinom-Patientinnen und 79 % bei der Kontrollgruppe mit benignem Mammatumor. Die Anzahl an CD61-positiven MP war am höchsten bei Vorliegen von Fernmetastasen (M1) mit nachgewiesenem signifikanten Unterschied zu Patientinnen mit einer geringen Tumorgröße (T1;  $p=0.039$ ). Zusätzlich ergaben sich signifikante Unterschiede beim Vergleich zwischen Patientinnen mit einem großen und einem kleinen Primärtumor (T2 und T1;  $p=0.044$ ).

Parameter	benigne n=13	Tis n=8	T1 n=27	T2 n=16	M1 n=7
CD61 ( $\times 10^6/l$ )	3226 (1728-3934)	2727 (1806-3261)	2819** (1872-3866)	4660** (2334-5885)	5197** (2984-6576)

**Tabelle 7:** Dargestellt wird die Gesamtzahl der CD61-positiven MP. Die Anzahl der MP wird angezeigt als Median (Minimum-Maximum). Zirkulierende MP: ■ kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Frauen mit benignem Brusttumor, ■ kennzeichnet signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppe der Mammakarzinom-Patientinnen.  $p < 0.05$  = signifikant.

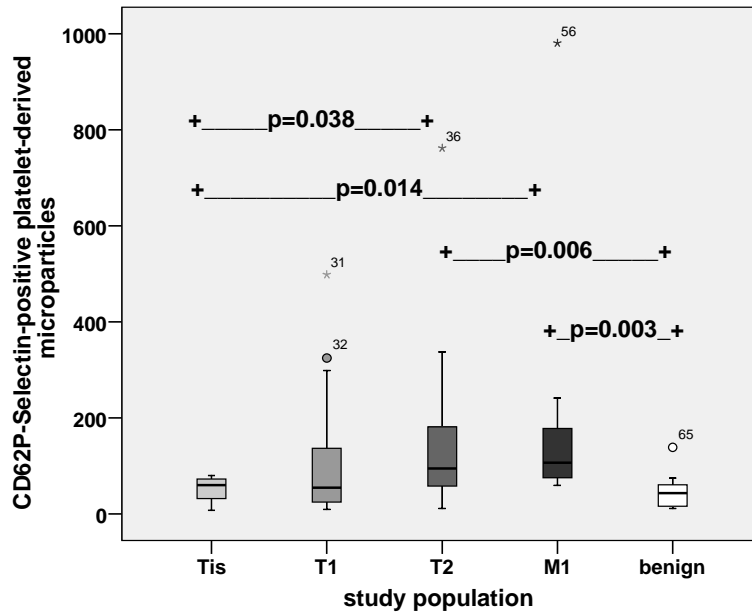


**Abbildung 2:** Durchflußzytometrische Analyse der Thrombozyten-assoziierten MP (CD61 positiv) innerhalb der Studienpopulation.

Um innerhalb der Population der CD61-positiven MP die aktivierten TMP zu identifizieren, wurden die Antikörper CD62P-Selektin und CD63 eingesetzt, die sich als Marker für thrombozytäre Aktivierung an granuläre Membranproteine an der Zelloberfläche anlagern. Dabei zeigte sich, dass bei den Mammakarzinom-Patientinnen nur 2,4 % der CD61-positiven MP auch CD62P-positiv waren und damit von aktivierten Thrombozyten stammten. Bei den Patientinnen mit benignen Tumoren waren es sogar nur 1,3 %, wobei sich eine Signifikanz zeigte in der Gesamtzahl der CD62P-positiven MP zwischen den Karzinompatientinnen und der Kontrollgruppen ( $p=0.024$ ). Deutlich erhöhte Werte an CD62P-positiven MP fanden sich bei höheren Tumorstadien (T2 und M1) im Vergleich zu den anderen Gruppen (M1 zu benignen Tumoren ( $p=0.003$ ), M1 zu Tis ( $p=0.014$ ), T2 zu Tis ( $p=0.038$ ) und T2 zu benignen Tumoren ( $p=0.006$ )).

Parameter	benigne n=13	Tis n=8	T1 n=27	T2 n=16	M1 n=7
CD62P ( $\times 10^6/l$ )	43 (15-64)	60 <sup>*,**</sup> (31-74)	55 (24-142)	94 <sup>*,**</sup> (52-191)	107 <sup>*,**</sup> (68-241)

**Tabelle 8:** Dargestellt wird die Gesamtzahl der CD62P-positiven MP. Die Anzahl der MP wird angezeigt als Median (Minimum-Maximum). Zirkulierende MP: \* kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Frauen mit benignem Brusttumor, \*\* kennzeichnet signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppe der Mammakarzinom-Patientinnen.  $p < 0.05$  = signifikant.



**Abbildung 3:** Verteilung der P-Selektin-positiven thrombozytären MP (CD62P) innerhalb der Studienpopulation.

Ein weiterer Marker für die Degranulation, damit also für die Aktivierung von Thrombozyten, der untersucht wurde, war CD63. Auch für diesen Marker zeigte sich, dass nur wenige zirkulierende TMP von aktivierten TMP stammten: bei den Mammakarzinom-Patientinnen 7,5 % und bei den Frauen mit benignen Tumoren 8,8 % der CD61-positiven MP. Die größte Menge an CD63-positiven MP fand sich bei einem Vorliegen von Fernmetastasen (M1), allerdings zeigte sich in keinem Vergleich mit den anderen Gruppen eine Signifikanz.

Parameter	benigne n=13	Tis n=8	T1 n=27	T2 n=16	M1 n=7
CD63 (x10 <sup>6</sup> /l)	286 (92-498)	227 (205-314)	208 (129-348)	264 (185-425)	348 (102-811)

**Tabelle 9:** Dargestellt wird die Gesamtzahl der CD63-positiven MP. Die Anzahl der MP wird angezeigt als Median (Minimum-Maximum). Zirkulierende MP: ■ kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Frauen mit benignem Brusttumor, \*\* kennzeichnet signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppe der Mammakarzinom-Patientinnen. p<0.05 = signifikant.

Eine weitere Beobachtung galt den MP, die von aktivierten Endothelzellen freigesetzt werden, also den CD62E-positiven MP. Deren Anzahl war am höchsten bei Patientinnen mit Fernmetastasen (M1). Dabei war zum einen eine Signifikanz zu beobachten zwischen diesen Patientinnen und der Kontrollgruppe, zum anderen innerhalb der Gruppe der Mammakarzinom-Patientinnen (benigne, Tis, T1 und T2; jeweils  $p < 0.05$ ).

Parameter	benigne n=13	Tis n=8	T1 n=27	T2 n=16	M1 n=7
CD62E (x10 <sup>6</sup> /l)	418 (269-629)	467 (377-672)	466 <sup>**</sup> (325-596)	646 <sup>*,**</sup> (516-894)	944 (263-1239)

**Tabelle 10:** Dargestellt wird die Gesamtzahl an CD62E-positiven MP. Die Anzahl der MP wird angezeigt als Median (Minimum-Maximum). Zirkulierende MP: <sup>\*</sup> kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Frauen mit benignem Brusttumor, <sup>\*\*</sup> kennzeichnet signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppe der Mammakarzinom-Patientinnen.  $p < 0.05$  = signifikant.

Auch für die MP, die von Leukozyten stammen, also den CD45-positiven MP, konnte eine erhöhte Anzahl bei Mammakarzinom-Patientinnen mit vorliegenden Fernmetastasen festgestellt werden (M1 257x10<sup>6</sup>/l MP), signifikant bei jeweils  $p < 0.05$  zu den Frauen aus der Kontrollgruppe (143x10<sup>6</sup>/l MP) und innerhalb der Patientinnengruppe (Tis 148x10<sup>6</sup>/l MP, T1 188x10<sup>6</sup>/l MP und T2 249x10<sup>6</sup>/l MP). Für die CD45-positiven MP zeigte sich allerdings zusätzlich noch eine Besonderheit: die Messungen ergaben signifikante Korrelationen zwischen der Anzahl der LMP und dem Vorhandensein von peripheren Metastasen ( $p = 0.046$ ), dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen ( $p = 0.001$ ) und der Höhe des Tumormarkers CA15-3 ( $p = 0.01$ ).

Parameter	benigne n=13	Tis n=8	T1 n=27	T2 n=16	M1 n=7
CD45 (x10 <sup>6</sup> /l)	143 (112-214)	148 <sup>**</sup> (132-175)	188 <sup>**</sup> (157-221)	249 <sup>*,**</sup> (149-317)	257 <sup>*,**</sup> (213-449)

**Tabelle 11:** Dargestellt wird die Gesamtzahl der CD45-positiven MP. Die Anzahl der MP wird angezeigt als Median (Minimum-Maximum). Zirkulierende MP: <sup>\*</sup> kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Frauen mit benignem Brusttumor, <sup>\*\*</sup> kennzeichnet signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppe der Mammakarzinom-Patientinnen.  $p < 0.05$  = signifikant.

Zusammenfassend konnte man feststellen, dass sowohl bei der Gesamtzahl der MP als auch bei allen untersuchten zellulären Untergruppen die höchsten Konzentrationen an MP bei Patientinnen mit einem hohen Tumorstadium, also einem großen Primärtumor, und/oder bei Patientinnen mit Fernmetastasierung vorlagen. Die vorliegenden Unterschiede waren dabei zum großen Teil auch signifikant.

### 3.3. Prothrombin-Fragment 1+2

Auch für das Prothrombin-Fragment 1+2 zeigte sich eine Korrelation zwischen der Prothrombin-Konzentration und der Größe des Tumors. Dabei konnte die höchste Konzentration bei Patientinnen mit einem großen Tumor (T2) nachgewiesen werden, die niedrigste Konzentration wiesen Patientinnen mit einem benignen Mammatumor auf. Ebenso zeigten Patientinnen mit einem Tis eine geringe Konzentration an Prothrombin-Fragment 1+2, wobei die Unterschiede sowohl zwischen einem benignen Tumor als auch einem Tis im Vergleich mit einem T2-Tumor signifikant waren (bei beiden  $p < 0.04$ ).

Parameter	benigne n=13	Tis n=8	T1 n=27	T2 n=16	M1 n=7
Prothrombin F1+2 (pmol/L)	190.4±105.9 (83-417)	201.0±71.8 (119-342)	231.2±84.6 (120-388)	275.5±87.8 (167-479)	237.4±124.4 (99-441)

**Tabelle 12:** Dargestellt wird die Prothrombin-Fragment 1+2-Konzentration. Die parametrisch verteilten Daten werden präsentiert als Mittelwert +/- Standardabweichung (Minimum-Maximum)

Die Höhe des Prothrombin-Fragments 1+2 korrelierte ebenfalls signifikant mit der Höhe der MP, insbesondere der CD63-positiven, der CD62P-positiven und der CD45-positiven MP (bei allen Gruppen  $p < 0.04$  und  $r > 0.32$ ). Desweiteren waren signifikante Korrelationen zwischen Prothrombin-Fragment 1+2 und dem Alter der Patientinnen und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen zu erkennen (auch hier  $p < 0.04$  und  $r > 0.32$ ).

## 4. Diskussion

Ziel dieser prospektiven Fall-Kontroll-Studie war die Bestimmung der Konzentration an thrombozytären, leukozytären und endothelialen MP bei Frauen mit einem neu diagnostizierten Mammakarzinom, wobei ein Augenmerk auf einem möglichen Zusammenhang zum Krankheitsstadium lag. Desweiteren beschäftigte sich diese Studie mit der Frage, inwieweit erhöhte MP ein Hinweis für eine verstärkte Gerinnungsaktivierung sein können, und ob es auch hier einen Zusammenhang gibt zwischen Tumorstadium und vermehrter Gerinnung.

## 4.1 Leukozytäre Mikropartikel

Patientinnen mit Fernmetastasen hatten erhöhte Werte für LMP. Dabei zeigte sich hinsichtlich der Anzahl der LMP eine signifikante Erhöhung sowohl gegenüber der Kontrollgruppe, als auch innerhalb der Gruppe der Karzinompatientinnen (Tis, T1 und T2). Dies konnte auch durch Kanazawa et al. in ihrer Studie nachgewiesen werden, die eine signifikant erhöhte Anzahl an Monozyten-assoziierten MP (MAMP) bei Patienten mit einem Bronchialkarzinom feststellten (2). Das Ergebnis ihrer Studie lässt darauf schließen, dass diese erhöht vorhandenen MAMP eine vermehrte Ausbildung von Blutgefäßen bewirken. Dabei stützten sich Kanazawa et al. auch auf andere Studienergebnisse, wonach in einer Kultur von Leukozyten und Endothelzellen die Endothelisierung und Entzündungsanregung durch MP von aktivierten Leukozyten vermittelt werden (50). Der Zusammenhang zwischen erhöhten LMP und der Angiogenese, und damit auch der Tumorprogression als Folge einer zunehmenden Gefäßneubildung, könnte auch durch die weiteren Ergebnisse der hier vorliegenden Studie gestützt werden, da die Konzentration an CD45-positiven MP mit dem Vorhandensein von peripheren Metastasen und Lymphknotenmetastasen und der Höhe des Tumormarkers CA15-3 korrelierten. Allerdings korrelierte die Anzahl an LMP nicht mit der gemessenen Anzahl an Leukozyten. Dies könnte möglicherweise ein Hinweis darauf sein, dass die Bildung von LMP nicht allein durch Aktivierung von Leukozyten ausgelöst wird, sondern vielmehr durch den Tumor oder die Tumorprogression zu erklären ist und es sich damit um einen *Circulus vitiosus* handelt.

Es gibt Hinweise, dass LMP ebenso bei der Gerinnungsaktivierung eine Rolle spielen. So konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass LMP TF an Blutplättchen übermitteln und damit womöglich in der Lage sind, aktiv an der Thrombinbildung mitzuwirken (24, 51, 52). Die Studienergebnisse zeigten, dass die LMP, vielmehr als die Leukozyten selbst, TF an den wachsenden Thrombus weitergeben (53, 54). TF-tragende TMP zirkulieren



kontinuierlich im Blut. Ihr Auftreten ist bei einer Entzündungsantwort oder Apoptose vermehrt zu beobachten; ebenso kann die Interaktion zwischen P-Selektin und Leukozyten zu einer erhöhten Konzentration von LMP führen (55).

## 4.2 Endotheliale Mikropartikel

Die Beobachtung der aktivierten endothelialen MP (EMP), also der CD62E-positiven MP, zeigte ebenfalls eine signifikante Erhöhung bei Mammakarzinom-Patientinnen mit Fernmetastasen im Vergleich sowohl mit der Kontrollgruppe als auch innerhalb der Tumorgruppe. Eine mögliche Erklärung dafür könnte eine vermehrte Aktivierung von Endothelzellen *in vivo* sein, die vermutlich durch die zunehmende tumorbedingte Angiogenese zustande kommt. Bei verschiedenen malignen Erkrankungen wurden signifikant erhöhte Konzentrationen an zirkulierenden Endothelzellen gefunden, vor allem bei Patienten mit einem höheren Tumorstadium. Entscheidend für Tumorwachstum und -progression ist die Neoangiogenese, welche gekennzeichnet ist durch eine Funktionsstörung der vaskulären Endothelisierung. Die Messung der Konzentrationen an zirkulierenden Endothelzellen wird als eine mögliche neue Methode angesehen, um besser vaskuläre Schäden und Dysfunktionen oder die vaskuläre endotheliale Funktion bei Karzinomerkkrankungen einschätzen zu können (56, 57). Dies scheint im Hinblick auf eine mögliche Überwachung von Therapien immanent, da in Studien ein deutlicher Rückgang der erhöhten Konzentrationen an zirkulierenden Endothelzellen nach einer Behandlung (BET, Chemotherapie) zu beobachten war (58, 59). Zudem könnte die Zunahme an EMP eine prokoagulatorische Veränderung widerspiegeln, die sich während des Tumorwachstums entwickelt.

In mehreren Studien wurde ein weiterer Marker für die endotheliale Zellaktivierung untersucht: der von-Willebrand-Faktor (vWF). Dabei zeigte sich, dass Frauen mit einem Mammakarzinom erhöhte Konzentrationen an vWF aufwiesen, verglichen mit Frauen mit einem gutartigen Tumor beziehungsweise gesunden Frauen. Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass zusätzlich auch eine positive Korrelation besteht zwischen der Höhe des vWF im Blut und dem Tumorprogress bei Brustkrebspatientinnen (60-62).

In einer weiteren Studie wurden bei Patienten mit einem Bronchialkarzinom im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erhöhte Konzentrationen von löslichem, also nicht an Zellen oder MP gebundenem, E-Selektin nachgewiesen. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Aktivierung von Endothelzellen ein generelles Phänomen bei Karzinompatienten darstellt (2), deren Bedeutung noch weiter geklärt werden sollte.

### 4.3 Thrombozytäre Mikropartikel

Die Konzentration an CD62P-positiven MP zeigte signifikant höhere Werte bei der Gruppe der Mammakarzinom-Patientinnen im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit benignen Tumoren. Kim et al. konnte zeigen, dass bei Patienten mit Magenkarzinom im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikante erhöhte Werte für TMP vorlagen, obwohl andere Antikörper zur Bestimmung verwendet wurden als in unserer Studie (1). Zusätzlich konnte die hier vorliegende Studie die Ergebnisse von Kim et al. bestätigen, wonach auch eine Signifikanz bestand zwischen Patienten mit einem metastasierten Karzinom (Stadium IV) im Vergleich zu den Patienten mit einem niedrigeren Tumorstadium (Stadium I und II/III). Darüberhinaus zeigte Kim et al., dass ab einer bestimmten Plasmakonzentration der TMP ( $> 2.70 \times 10^9/\text{ml}$ ) mit einer hohen Sensitivität (93.3 %) und einer hohen Spezifität (91.1 %) eine Metastasierung anzunehmen sei. Daher könnte die Bestimmung der PMP eine nicht-invasive Möglichkeit sein, um Patienten in einem fortgeschrittenen Tumorstadium möglichst frühzeitig zu identifizieren und ihnen dann eine effektive Therapie empfehlen zu können. Zusätzlich bestimmten sie auch noch die Konzentrationen für Interleukin-6 (IL-6), VEGF und RANTES, die, ebenso wie die TMP, bei den Tumorpatienten signifikant erhöht waren. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis für die Interaktion zwischen Koagulation, Angiogenese und Entzündungsreaktionen, wobei alle 3 Komponenten an Tumorwachstum und –ausbreitung beteiligt sind.

Eine Thrombose ist eine der schwerwiegenden Komplikationen bei Krebserkrankungen, und es gibt zahlreiche durch Studien belegte Anhaltspunkte für einen klaren Zusammenhang zwischen malignen Erkrankungen und venösen thrombembolischen Problemen. Der genaue pathophysiologische Mechanismus bleibt aber weiterhin ungeklärt. Es gibt viele mögliche Thesen, die bereits in mehreren Studien untersucht wurden, die sich vor allem mit der möglichen Rolle des TF beschäftigen (63), unter

anderem mit der Expression von TF durch die Tumorzellen, mit der Freisetzung des TF während des Zelltodes in Folge einer Chemotherapie oder mit der Rolle von MP, wobei man zur Zeit von einer multifaktoriellen Ursache ausgeht. Es kristallisiert sich aber aktuell vor allem die Rolle von TF-positiven MP als eine mögliche Mitursache für die Hyperkoagulabilität im Blut bei Karzinompatienten heraus. In der Studie von Hron et al. konnten signifikant erhöhte Werte von TF-positiven MP bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom gefunden werden im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe. Zudem zeigte sich ebenso eine Korrelation zwischen TF-positiven MP und erhöhten D-Dimer-Spiegeln, was auf eine Aktivierung der Gerinnung hinweist (4).

Bezugnehmend auf die erhöhten Konzentrationen von D-Dimer bei Hron et al. konnte auch hier in dieser Studie nachgewiesen werden, dass die Patientinnen mit einem Mammakarzinom, vor allem mit einem großen Primärtumor und einer Metastasenbildung, signifikant erhöhte Werte an Prothrombin-Fragment F1+2 aufweisen. Dies ist gleichermaßen, wie die Erhöhung der D-Dimer-Konzentrationen, als deutliches Zeichen für eine Aktivierung der Blutgerinnung zu werten.

Zur Detektion von MP nutzt man ihre Bindung an Annexin V, wobei die Bindungsstelle für Annexin V PS ist. Dieses PS stellt einen Marker für die Zellaktivierung dar. In unserer Studie wurde eine große Zahl an MP gefunden, die PS exprimieren, damit also Annexin V-positiv sind. Um diese Annexin V-positiven MP hinsichtlich ihrer Ursprungszelle zuzuordnen, wurden weitere Marker zur Identifizierung eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass sowohl bei den Mammakarzinom-Patientinnen als auch bei der Kontrollgruppe der deutlich überwiegende Teil der MP von Blutplättchen stammt, also CD61-positiv ist. Allerdings konnten diese Ergebnisse nicht auf die Plättchenaktivierung, also die Degranulation, übertragen werden; MP von aktivierten Plättchen machten nur einen geringen Teil der TMP aus. Bei dem Prozess der Plättchenaktivierung werden intrazellulär gelegene granuläre Membran-Glykoproteine (GP) freigelegt. Zu diesen GP gehören unter anderem P-Selektin (CD62P) und gp55 (CD63), die wir auch in unserer Studie benutzten, um aktivierte TMP zu quantifizieren. Auch in anderen Studien wurden

dieses GP verwendet, um die Plättchen-Aktivierung zu messen. So vermuteten Van der Zee et al. in ihrer Studie, dass es eine brauchbare und zuverlässige Methode sein könnte, die TMP zu messen, die P-Selektin oder CD63 exprimieren, um darüber den Aktivitätszustand der Blutplättchen *in vivo* festzustellen. Bei ihren Messungen an Patienten mit peripheren arteriellen Erkrankungen und myokardialen Infarkten waren sowohl P-Selektin-positive als auch CD63-positive MP erhöht (64). Bei unserer Studie an Mammakarzinom-Patientinnen konnte zwar festgestellt werden, dass der überwiegende Teil der MP thrombozytären Ursprungs ist, aber nur weniger als 10 % von aktivierten Plättchen stammen, also CD62P- und CD63-positiv sind. Die Auslöser für die Aktivierung der Blutplättchen kann man aufteilen in schwache und starke Agonisten, wobei für die Expressierung von CD62P schwache und für die Expressierung von CD63 starke Agonisten verantwortlich sind. Interessanterweise konnten mehr CD63-positive MP bei unserer Studie nachgewiesen werden als CD62P-positive MP. Auch in der Arbeit von Michelson et al. beschäftigten sich die Autoren mit der Frage, warum relativ wenig CD62P-positive MP im peripheren Blut gefunden wurden, obwohl für diese Expressierung nur schwache Agonisten nötig sind, was eigentlich zu einer deutlichen Überexpression führen sollte. Durch die Ergebnisse ihrer Studie lieferten sie eine mögliche Erklärung; sie fanden heraus, dass sich P-Selektin von der Oberfläche der Blutplättchen ablösen kann. Die Blutplättchen sind aber auch danach noch in der Lage, für einige Tage im Blut zu zirkulieren und ihre Funktion auszuüben (65). Natürlich ist es auch möglich, dass sich das P-Selektin nicht nur von der Oberfläche der Plättchen lösen kann, sondern auch von der Oberfläche der MP. Dies könnte eine mögliche Erklärung sein, dass CD62P-positive MP nicht vermehrt nachgewiesen werden können, da sie bereits ihren Identifikationsmarker, das P-Selektin, verloren haben. Die Frage nach dem löslichen im Blut zirkulierenden P-Selektin beschäftigte auch Blann et al. in ihrer Studie. Sie konnten während ihrer Untersuchungen an Patienten mit hämatologischen Karzinomkrankungen und Mammakarzinom-Patientinnen herausfinden, dass diese Gruppe erhöhte Werte an löslichem P-Selektin im Blut aufwies im Vergleich zur Kontrollgruppe (61). Damit würden ihre Ergebnisse zu der verbreiteten These passen, dass im Blut von

Karzinompatienten P-Selektin nur in einer kleinen Fraktion membrangebunden an TMP vorkommt, und dass der weitaus größere Teil in löslicher Form zirkulierend im Blut vorliegt.

Zusammengefasst kann man sagen, dass im Blut von Mammakarzinom-Patientinnen signifikant erhöhte Werte für zirkulierende MP zu finden sind im Vergleich zu den Frauen der Kontrollgruppe mit einem benignen Tumor, wobei sich diese Signifikanz nicht nur auf die TMP beschränkt. Zusätzlich ist festzuhalten, dass diese MP zum Teil störend in die hämostatische Balance eingreifen können und damit in der Lage sind, eine Veränderung in der Gerinnung zugunsten der Hyperkoagulation zu bewirken. Dies könnte damit eine mögliche Erklärung für die bereits zu Beginn angesprochene tumorassoziierte Thrombose bei Karzinompatienten sein, wobei jedoch die komplette Pathogenese auch durch diese Thesen nicht vollständig erklärt ist. Inwiefern aber erhöhte MP eine Risikogruppe definieren und damit Patienten mit einer Tumorerkrankung von der Gabe einer prophylaktischen Antikoagulation mit niedermolekularen Heparinen profitieren könnten, muß an großen Fall-Kontroll-Studien weiter untersucht werden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In der Tumorforschung wird weltweit nach neuen Therapieansätzen und Prognosefaktoren gesucht. Dabei sind in den letzten Jahren zirkulierende MP in das Zentrum der Aufmerksamkeit gerückt, da sie auch schon bei anderen Krankheitsbildern bestimmt wurden und generell als Indikatoren für Zellverletzung, Streß, Thrombose und Entzündungen gelten. Da bisher bereits in mehreren Studien bei verschiedenen Karzinomerkkrankungen eine erhöhte Anzahl an MP gefunden werden konnten, wurde in dieser prospektiven Fall-Kontroll-Studie die Anzahl der MP bei Patientinnen mit einem neu diagnostizierten Mammakarzinom untersucht. Ziel war es, eine Korrelation zwischen der MP-Anzahl bei Mammakarzinom-Patientinnen im Vergleich zu Frauen mit einem benignen Tumor zu erforschen.

Anhand der Daten zeigte sich, dass sowohl bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom als auch bei Patientinnen mit einem benignen Mammatumor zirkulierende MP im peripheren Blut nachweisbar sind, wobei der Hauptanteil bei beiden Gruppen von Thrombozyten stammt. Allerdings konnte eine signifikante Erhöhung bei der Gesamtzahl der zirkulierenden MP zwischen den beiden Gruppen und auch innerhalb der Gruppe der Mammakarzinom-Patientinnen festgestellt werden. Bei den CD61-positiven MP, also den TMP, konnte die signifikante Erhöhung der MP-Anzahl nur innerhalb der Karzinomgruppe nachgewiesen werden. Es wurde aber nicht nur die Gesamtzahl der TMP betrachtet, sondern auch ihre Subpopulationen, die MP von aktivierten Plättchen. Dabei zeigte sich einerseits eine signifikante Erhöhung der CD62P-positiven MP bei Mammakarzinom-Patientinnen im Vergleich zu den Frauen mit einem benignen Tumor. Andererseits bestand auch eine Signifikanz innerhalb der Gruppe der Karzinompatientinnen zwischen höheren und niedrigeren Tumorstadien. Für die CD63-



positiven MP konnte eine erhöhte Anzahl der MP bei Frauen mit vorliegenden Fernmetastasen nachgewiesen werden, aber keine Signifikanz zu den anderen Gruppen.

Für die MP der anderen beiden Zellpopulationen - Leukozyten und Endothelzellen – ließ sich sowohl für die CD45-positiven als auch für die CD62E-positiven MP eine Signifikanz zwischen der Kontrollgruppe und den Patientinnen mit einem Mammakarzinom nachweisen, zusätzlich auch jeweils innerhalb der Gruppe der Karzinompatientinnen im Vergleich zwischen einem höheren und einem niedrigeren Tumorstadium.

Für den zusätzlich betrachteten Parameter, das Prothrombin-Fragment 1+2, zeigte sich ebenfalls eine positive Korrelation innerhalb der Gruppe der Mammakarzinom-Patientinnen und auch zwischen den beiden Gruppen. Desweiteren konnten wir signifikante Korrelationen zwischen der Konzentration an Prothrombin-Fragment und den Konzentrationen der CD63-, CD45- und CD62P-positiven MP feststellen sowie dem Alter der Patientinnen und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen.

Damit bestätigt diese Studie die Ergebnisse anderer Studien, die erhöhte Werte für MP bei Karzinompatienten nachwiesen, und liefert damit die Grundlage für die Erforschung von Folgefragen, wie zum Beispiel, ob allein über den Nachweis von MP im zirkulierenden Blut eine Stadieneinteilung möglich ist (Benignität, großer Primärtumor, Metastasierung), ob eine prophylaktische Heparinisierung einen möglichen Schutz vor tumor-assoziiierter Thrombose darstellt oder ob die Messung der MP-Zahl im Blut zur Verlaufskontrolle beispielsweise während einer adjuvanten Therapie als möglicher Prognosefaktor einsetzbar ist. Dies muss erst durch zahlreiche weitere Fall-Kontroll-Studien geklärt werden. Damit sind durch die vorgelegte Studie neue Ansätze in der Diagnostik, Therapie und Nachsorge von Karzinomerkrankungen aufgezeigt worden, die es wert sind, intensiv weiter erforscht zu werden.

## 6. LITERATUR

Diese Doktorarbeit basiert auf den Journal-Artikeln

**„Platelet-derived microparticles and coagulation activation in breast cancer patients’** (Toth B, Liebhardt S, Steinig K, Ditsch N, Rank A, Bauerfeind I, Spannagl M, Friese K, Reininger AJ, *Thromb Haemost* 2008)

und

**„Circulating microparticles in breast cancer patients: a comparative analysis with established biomarkers’** (Toth B, Nieuwland R, Liebhardt S, Ditsch N, Steinig K, Stieber P, Rank A, Göhring P, Thaler CJ, Friese K, Bauerfeind I, *Anticancer Res* 2008)

(1) Kim HK, Song KS, Park YS, et al.: Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *European Journal of Cancer* 2003; **39**: 184-191

(2) Kanazawa S, Nomura S, Kuwana M, et al.: Monocyte-derived microparticles may be a sign of vascular complication in patients with lung cancer. *Lung Cancer* 2003; 145-149

(3) Del Conde I, Bharwani LD, Dietzen DJ, et al.: Microvesicle-associated tissue factor and Trousseau’s syndrome. *J Thromb Haemost* 2007; 70-74

(4) Hron G, Kollars M, Weber H, et al.: Tissue factor-positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *J Thromb Haemost* 2007; 119-123

(5) Savasan S, Buyukavci M, Buck S, et al.: Leukaemia/lymphoma cell microparticles in childhood mature B cell neoplasmas. *J Clin Pathol* 2004; 651-653

(6) Pihusch V, Rank A, Steber R, et al.: Endothelial cell-derived microparticles in allogenic hematopoietic stem cell recipients. *Transplantation* 2006; **81 (10)**: 1405-1409

- (7) Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, et al.: Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost* 2007; 520-527
- (8) Horstman LL: New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J Med* 2004; **53 (4)**: 210-230
- (9) Zhou Q, Zhao J, Stout JG, Luhm RA, Wiedmer T, Sims PJ: Molecular cloning of human plasma membrane phospholipids scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *Journal of Biology and Chemistry* 1997; **272**: 18240–18244
- (10) Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM: Platelet procoagulant activity and microvesicle formation. Its putative role in hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1180**: 1–8
- (11) Zwaal RF, Schroit AJ: Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997; **89**: 1121-1132
- (12) Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Ahn YS: Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Front Biosci* 2004; **9**: 1118-1135
- (13) Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A: Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000; **101**: 841-843
- (14) Van Wijk MJ, Van Bavel E, Sturk A Nieuwland R: Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 2003; **59 (2)**: 277-287
- (15) Knijff-Dutmer EA, Koerts J, Nieuwland R, Kalsbeek-Batenburg EM, Van de Laar MA: Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; **46 (6)**: 1498-1503

- (16) Combes V, Simon AC, Grau GE, et al.: In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1999; **104** (1) : 93-102
- (17) Minagar A, Jy W, Jimenez JJ, et al.: Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis. *Neurology* 2001; **56** (10): 1319-1324
- (18) Iwamoto S, Kawasaki T, Kambayashi J, Ariyoshi H, Monden M: Platelet microparticles: a carrier of platelet-activating factor? *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **218**: 940-944
- (19) Kameyoshi Y, Schroder JM, Christophers E, Yamamoto S: Identification of the cytokine RANTES released from platelets as an eosinophil chemotactic factor. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; **104**: 49-51
- (20) White JG: Platelet membrane ultrastructure and its changes during platelet activation. In: Jamieson GA, ed: Platelet Membrane Receptors: Molecular Biology, Immunology, Biochemistry and Pathology. NY: Alan R. Liss Inc, 1988: 1-32
- (21) Tans G, Rosing J, Thomassen MC, Heeb MJ, Zwaal RF, Griffin JH: Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles. *Blood* 1991; **77**: 2641-2648
- (22) Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A: Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* 2001; **85**: 639-646
- (23) Horstman LL, Ahn YS: Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999; **30** (2): 111-142
- (24) Furie B, Furie BC: Role of platelet P-selectin and microparticlePSGL-1 in thrombus formation. *Trends Mol Med* 2004; **10**(4): 171-178

- (25) Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, et al.: Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation* 1997; **96** (10): 3534-3541
- (26) Muller I, Klocke A, Alex M, Kotsch M, Luther T, Morgenstern E, Zieseniss S, Zahler S, Preissner K, Engelmann B: Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J* 2003; **17**: 476-478
- (27) Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A, Siddiqui TF, Meyer T, Amaya M, Francis JL: Platelet microparticles from healthy donors contain tissue factor. *Blood* 2002; **100** (11): 497a #1936
- (28) Yu JL, Rak JW: Shedding of tissue factor(TF)-containing microparticles rather than alternatively spliced TF ist he main source of TF activity released from human cancer cells. *J Thromb Haemost* 2004; **2**: 2065-2067
- (29) Biro E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GM, et al.: Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J Thromb Haemost* 2003; **1** (12): 2561-2568
- (30) Falati S, Liu Q, Gross P, et al.: Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* 2003; 1585-1598
- (31) Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, et al.: Tissue factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 2005; **106** (5): 1604-1611
- (32) Pruemer J: Prevalence, causes, and impact of cancer-associated thrombosis. *Am J Health Syst Pharm* 2005; S4-6
- (33) Lee AY: Thrombosis and cancer: the role of screening for occult cancer and recognizing the underlying biological mechanisms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 438-443

- (34) Iversen LH, Okholm M, Thorlaciu-Ussing O: Pre- and postoperative state of coagulation and fibrinolysis in plasma of patients with benign and malignant colorectal disease – a preliminary study. *J Thromb Haemost* 1996; 523-528
- (35) Sallah S, Husain A, Sigounas V, et al.: Plasma coagulation markers in patients with solid tumors and venous thromboembolic disease receiving oral anticoagulation therapy. *Clin Cancer Res* 2004; 7238-7243
- (36) Oya M, Akiyama Y, Okuyama T, et al.: High preoperative plasma D-dimer level is associated with advanced tumor stage and short survival after curative resection in patients with colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2001; 388-400
- (37) Callander NS, Varki N, Rao LV: Immunohistochemical identification of tissue factor in solid tumors. *Cancer* 1992; 1194-1201
- (38) Nakasaki T, Wada H, Shigemori C, et al.: Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol* 2002; 247-254
- (39) Boccaccio C, Sabatino G, Medico E, et al.: The MET oncogene drives a genetic programme linking cancer to haemostasis. *Nature* 2005; 396-400
- (40) Rauch U, Antoniak S: Tissue factor-positive microparticles in blood associated with coagulopathy in cancer. *J Thromb Haemost* 2007; 9-10
- (41) Amirkhosravi A, Meyer T, Sackel D, Desai H, Biddinger R, Amaya M, Francis JL: Platelet microparticles upregulate TF and VEGF in endothelial and melanoma cells in a CD40 ligand-dependent manner: possible role in angiogenesis and metastasis. *Blood* 2002; 100(11): 63b # 3721
- (42) Belting M, Dorrell M, Sandgren S, Ahamad J, Dorfleutner A, Carmeliet P, Mueller B, Friedlander M, Ruf W: Tissue factor signalling in angiogenesis. *Blood* 2003; 102 (11): 13a #33

- (43) Taraboletti G, Roberts D, Liotta LA, Giavazzi R: Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory. *J Cell Biol* 1990; **111**: 765-772
- (44) Mancuso P: Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood* 2001; **Vol 97**, No.11: 3658-3661
- (45) Beerepoot LV: Increased levels of viable circulating endothelial cells are an indicator of progressive disease in cancer patients. *Annals of Oncology* 2004; **15**: 139-145
- (46) Manusco P, Calleri A, Cassi C, Gobbi A, Capillo M, Pruneri G, Martinelli G, Bertolini F: Circulating endothelial cells as a novel marker of angiogenesis. *Adv Exp Med Biol* 2003; **522**: 83-97
- (47) Kim HK, Song KS, Chung JH, Lee KR, Lee NS: Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. *Br J Haematol* 2004 Feb; **124 (3)**: 376-384
- (48) Janowska-Wieczorek A, Kijowski J, Marquez LA, Ratajczak J, Ratajczak MZ: Microvesicles derived from activated platelets: an under-appreciated modulator of the metastatic potential of tumor cells. *Blood* 2003; **102 (11)**: 73b #3998
- (49) Manual Mammakarzinome – Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge; Bandherausgeber: PD Dr. med. Wolfgang Janni, 11. überarbeitete Auflage 2007; Herausgeber: Tumorzentrum München
- (50) Mesri M, Altieri DC: Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol* 1998; **161**: 4382-4387
- (51) Rauch U, Bondermann D, Bohrmann B, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, Nemerson Y: Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood* 2000; **96 (1)**: 170-175
- (52) Myers DD, Hawley AE, Farris DM, Wroblewski SK, Thanaporn P, Schaub RG, Wagner DD, Kumar A, Wakefield TW: P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis. *J Vasc Surg* 2003; **38 (5)**: 1075-1089

- (53) Furie B, Furie BC: Cancer-associated thrombosis. *J BCMD* 2005; **36**: 177-181
- (54) Gross P, Furie BC, Merrill-Skoloff G, Chou J, Furie B: Leukocyte- versus microparticle-mediated tissue factor transfer during arteriolar thrombus development. *J Leuk Biol* 2005; **115**: 3355-3362
- (55) Hrachovinova II, Cambien B, Hafezi-Moghadam A, Kappelmayer J, Camphausen RT, Widom A, Xia L, Kazazian HH, Schaub RG, McEver RP, Wagner DD: Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A. *Nat Med* 2003; **9**: 1020-1025
- (56) Goon, PKY, Boos CJ, Stonelake PS, Lip GYH: Circulating endothelial cells in malignant disease. *Future Oncol* 2005; **1 (6)**: 813-820
- (57) Goon PKY, Lip GYH, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD: Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer. *Neoplasia* 2006; **8(2)**: 79-88
- (58) Manusco P, Burlini A, Pruneri G, Goldhirsch A, Martinelli G, Bertolini F: Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood* 2001; **97(11)**: 3658-3661
- (59) Bertolini F, Paul S, Manusco P, Monestiroli S, Gobbi A, Shaked Y, Kerbel RS: Maximum tolerable dose and low-dose metronomic chemotherapy have opposite effects on the mobilization and viability of circulating endothelial progenitor cells. *Cancer Res* 2003; **63**: 4342-4346
- (60) Rohsig LM, Damin DC, Stefani SD, Castro CG Jr, Roisenberg I, Schwartzmann G: von Willebrand factor antigen levels in plasma of patients with malignant breast disease. *Braz J Med Biol Re* 2001; **34**: 1125-1129
- (61) Blann AD, Gurney D, Wadley M, Bareford D, Stonelake P, Lip GY: Increased soluble P-selectin in patients with haematological and breast cancer: a comparison with with fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and von Willebrand factor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; **12 (1)**: 43-50



- (62) Blann AD, Baidam AD, Howell A, Miller JP: Tamoxifen increases von Willebrand factor in women who underwent breast cancer surgery. *Thromb Haemost* 2001; **85** (5): 941-942
- (63) Del Cone I, Bharwani LD, Dietzen DJ, Pendurthi U, Thiagarajan P, Lopez JA: Microvesicle-associated tissue factor and Trousseau's syndrome. *Thromb Haemost* 2006; **5**: 70-74
- (64) van der Zee PM, Biro E, Ko Y, de Winter RJ, Hack CE, Sturk A, et al.: P-selectin and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction. *Clin Chem* 2006.
- (65) Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J, 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** (21): 11877-82

# Klinikum der Universität München

Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und  
Geburtshilfe – Großhadern  
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Friese

---

Dr. Nina Ditsch  
Dr. Bettina Toth  
Tel. 7095-2843/ 6800  
Tel. Zentrale 7095-0

München, den

---

## Patienteninformation und Einverständniserklärung

**Sehr geehrte Patientin,**

wir möchten Sie heute über eine Studie zur Erforschung von Mikropartikeln - neue Marker in der Gerinnungsdiagnostik, welche möglicherweise einen Einfluss auf das Wachstum von Krebszellen und die Möglichkeit der Metastasierung haben - informieren.

Der Titel dieser Studie lautet:

- 1) Einfluss von Mikropartikel auf Wachstum und Metastasierungspotenzial bei Mamma-  
karzinom-Patienten

Neue Forschungsergebnisse aus dem Bereich der Inneren Medizin und der Geburtshilfe legen nahe, dass Mikropartikel eine wichtige Rolle im Gerinnungssystem spielen. So konnten Forscher ein erhöhtes Vorkommen von Mikropartikeln sowohl bei Patientinnen mit Angina pectoris (Herzschmerzen bei drohendem Herzinfarkt) als auch bei Typ 2 Diabetes und akutem Rheuma nachweisen. Darüberhinaus fand sich ein erhöhtes Vorkommen von Mikropartikeln bei Krebspatienten.

Bislang gibt es keine publizierten Untersuchungen bei Frauen mit Brustkrebs. Ebenso ist unklar, ob ein vermehrtes Vorkommen von Mikropartikeln mit der Bösartigkeit des Tumors korreliert oder etwas über das Risiko von Metastasen aussagt.



Durch die Teilnahme an dieser Studie helfen Sie mit, diese Parameter zu erforschen und damit möglicherweise neue Erkenntnisse über Brustkrebs zu finden.

Leider kann bisher noch keine klare Therapieempfehlung aus den durchgeführten Untersuchungen abgeleitet werden. Sollte sich dies ändern, werden wir Sie allerdings gerne informieren.

**Bei dieser Studie werden die Vorschriften über den Datenschutz und die ärztliche Schweigepflicht eingehalten. Es werden persönliche Daten (wie Alter, Anzahl der bisherigen Schwangerschaften, Größe, Gewicht) und Befunde (Tumorgroße, Beschaffenheit) über Sie erhoben, gespeichert und nur in verschlüsselter Form festgehalten, d.h. weder Ihr Name, noch Ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode. Es kann Einsicht in die Originaldaten durch autorisierte Personen (Oberarzt Dr. Bauerfeind, Chefarzt Prof. Dr. Friese) genommen werden, vor allem zur Überwachung der Studiensicherheit.**

**Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Im Falle eines Widerrufs der Einwilligung werden die gespeicherten Daten nicht weiter verwendet.**

**Der Zugang zu den Originaldaten ist auf folgende Personen beschränkt: Dr. Ditsch, Dr. Toth, Dr. Bauerfeind, Prof. Friese. Die Unterlagen werden in der Frauenklinik Großhadern für mindestens zwei Jahre aufbewahrt. In etwaigen Veröffentlichungen der Daten dieser Studie werden Sie nicht namentlich genannt, so dass die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährt wird.**

Ablauf der Studie:

Im Rahmen der Blutentnahme werden Ihnen 5 ml Vollblut entnommen. Diese werden umgehend weiterverarbeitet und die Anzahl an Mikropartikel bestimmt.

Wenn Sie es wünschen, werden wir Sie jederzeit über die Untersuchungsergebnisse informieren.

Sie erreichen uns unter folgenden Telefonnummern:

**Frau Dr. Ditsch und Frau Dr. Toth: Frauenpoliklinik Tel.: 7095-6820 Fax: 7095-6840**

Ich erkläre hiermit, dass ich von \_\_\_\_\_ (Name der/des Ärztin/Arztes bzw. der medizinischen Doktorandin) ausführlich über die Studie aufgeklärt und meine offenen Fragen beantwortet wurden. Ich erteile meine Zustimmung zur Speicherung meiner Daten unter Berücksichtigung des oben ausgeführten Datenschutzes.

Mit meiner Unterschrift erkläre ich mich bereit, an der Studie teilzunehmen.

Ort, Datum, Unterschrift der Patientin

Ort, Datum, Unterschrift der/s aufklärenden Ärztin/Arztes/ bzw. der med. Doktorandin

## 8. Curriculum

### Persönliches

Geburtsdatum & - ort: 18.07.1977 in Essen  
Eltern: Studiendirektor Peter Steinig  
Dr. med. Anneliese Piepenbring-Steinig  
Geschwister: Helge-Jan Steinig

### Ausbildung

1984 – 1988: Gemeinschaftsgrundschule Westfalendamm Schwelm  
1988 – 1997: Märkisches Gymnasium Schwelm  
Abschluß mit der Allgemeinen Hochschulreife  
WS 1997/98: Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
Studium der Volkswirtschaftslehre regional  
(Schwerpunkt Japan)  
SS 1999 – WS 2001/02: Johannes-Gutenberg-Universität Mainz  
Studium der Humanmedizin – vorklinischer Abschnitt  
Physikum im März 2002  
SS 2002 – WS 2004/05: Westfälische-Wilhelms-Universität Münster  
Studium der Humanmedizin – klinischer Abschnitt  
1. Staatsexamen März 2003  
2. Staatsexamen März 2005  
Seit SS 2005: Ludwig-Maximilians-Universität München  
Studium der Humanmedizin – Praktisches Jahr  
Erstes Tertial: Innere Medizin in der 3. Medizinischen  
Abteilung des Krankenhauses München-Schwabing  
Zweites Tertial: Chirurgie in der Abteilung für  
Allgemein- & Viszeralchirurgie, Unfallchirurgie und  
Chirurgische Nothilfe des Krankenhauses München-  
Schwabing  
Drittes Tertial: Gynäkologie & Geburtshilfe in der  
Frauenklinik des Krankenhauses München-  
Neuperlach  
3. Staatsexamen im Juni 2006

### Praktika/Famulaturen

April-Mai & Juni-Juli 1998:	Pflegepraktikum im Marienhospital Schwelm
Juli-August 2002:	Famulatur in der Abteilung für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin & Schmerztherapie im EN-Süd-Klinikum Schwelm
Dezember 2002:	Famulatur in der Abteilung für Plastische Chirurgie im Klinikum Rechts der Isar München
Mai-Juni 2003:	Famulatur in der Abteilung für Psychiatrie im St.Vinzenz-Hospital Rhede
August 2003:	Famulatur in der Lungenfunktionsabteilung im Universitätsklinikum Münster
September-Oktober 2003:	Famulatur in der geburtshilflich-gynäkologischen Abteilung im St.Franziskus-Hospital Münster
Februar-März 2004:	Famulatur in einer dermatologischen Facharztpraxis in Schwelm
März 2004:	Famulatur in der internistischen Ambulanz im Universitätsklinikum Münster
August 2004:	Famulatur in der dermatologischen Fachklinik Hornheide

### Tätigkeiten neben dem Studium

Juni 2002 – Februar 2005:	studentische Pflegeaushilfe im Clemenshospital Münster
Mai 2005 – Juni 2006:	studentische Sitzwache im Universitätsklinikum München

### Beruf

Februar 2007 – Mai 2010:	Assistenzärztin in der Abteilung für Gynäkologie & Geburtshilfe im Klinikum Traunstein
Seit Juni 2010:	Assistenzärztin an der Frauenklinik im Klinikum Fürstentfeldbruck

### Promotion

Seit Juni 2006:	Zirkulierende Mikropartikel bei Patientinnen mit Mammakarzinom Betreuerin: PD Dr. med. Bettina Toth, Klinik & Poliklinik für Frauenheilkunde & Geburtshilfe – Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München
-----------------	--

## 9. Danksagungen

Ganz herzlich danken möchte ich zuallererst PD Dr. Bettina Toth für das Thema dieser Dissertation und für ihre unermüdliche Betreuung, Beratung und Unterstützung während jedes Abschnittes der gesamten Promotionsphase.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Nina Ditsch und den Ärzten und Ärztinnen der Frauenklinik-Großhadern und des Institutes für Klinische Radiologie für die Unterstützung bei der Probengewinnung.

Mein Dank gilt hier auch den Patientinnen, die mir so bereitwillig ihre (Blut-)Spende für meine Arbeit zur Verfügung gestellt haben.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen des Forschungslabores der Frauenklinik-Großhadern, allen voran bei Frau Marianne Fileki und Frau Andrea Peichel, die mich bei allen Fragen und Problemen immer tatkräftig unterstützt haben.

Ein Dank auch an meine Mit-Doktorandinnen für die gute Einarbeitung und Hilfe bei Problemen.

Vor allem aber möchte ich meinen Eltern und meinem Lebensgefährten Rainer danken für ihre nie enden wollende moralische Hilfe. Durch ihr geduldiges Zuhören, ihre Ermutigungen und ihr Aufbauen, aber auch ihr Antreiben, wenn nötig, konnte diese Arbeit entstehen. Ohne sie wäre ich nicht soweit gekommen. Danke.