

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

Direktor: Prof. Dr. med. K. Friese

Neue diagnostische Marker bei Mammakarzinompatientinnen

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

Vorgelegt von
Susanne Liebhardt
aus
Augsburg

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Bettina Toth
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Heiko Hermeking

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Thomas Mussack
Prof. Dr. Werner Meier

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

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

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2011

Widmung

meiner Schwester Anja

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Mammakarzinom	9
1.1.1	Epidemiologie	9
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese	9
1.1.3	Pathomorphologie	10
1.1.4	Diagnostik	11
1.1.5	Therapie	11
1.1.6	Tumormarker	12
1.2	Schilddrüsendysfunktion beim Mammakarzinom	12
1.3	Hämostase bei Krebserkrankungen	13
1.3.1	Mechanismen	13
1.3.2	Mikropartikel	14
1.3.3	Von Willebrand Faktor	15
1.4	Zielsetzung	17
1.4.1	Schilddrüsenfunktion	17
1.4.2	Hämostase	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Patientenkollektiv gesamt	19
2.2	Probengewinnung	19
2.3	Schilddrüsenfunktion	20
2.3.1	Kollektiv	20
2.3.2	Schilddrüsenfunktionsparameter	20
2.4	Durchflusszytometrie	21
2.4.1	Kollektiv	21
2.4.2	Technik der Durchflusszytometrie	21
2.4.3	Grundlösungen	23
2.4.4	Arbeitslösungen	24
2.4.5	Verfahren	24
2.4.6	spezifische Antikörper	26
2.4.6.1	Annexin V	26
2.4.6.2	Immunglobulin G 1	26
2.4.6.3	Anti-Her-2/neu	26
2.4.6.4	Anti-BCRP	27
2.4.6.5	Anti-Hsp27	28
2.4.6.6	Anti-CD66 (CEA)	29

2.5	Elektronenmikroskopie.....	30
2.6	Prothrombin Fragment (PF 1+2).....	30
2.7	Thrombin Generation Assay (TGA).....	31
2.8	Von Willebrand Faktor Antigen (vWF Ag).....	31
2.9	Statistik.....	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Schilddrüsenfunktion.....	33
3.1.1	Patientenkollektiv.....	33
3.1.2	Schilddrüsenvorerkrankungen.....	33
3.1.3	Schilddrüsenfunktionsparameter.....	34
3.2	Mikropartikel.....	37
3.2.1	Patientenkollektiv.....	37
3.2.2	Mikropartikel.....	37
3.3	Elektronenmikroskopie.....	42
3.4	Prothrombin Fragment, Thrombin generation Assay.....	44
3.5	Von Willebrand Faktor Antigen.....	44
4	Diskussion.....	45
4.1	Diskussion der Schilddrüsenfunktionsparameter.....	45
4.2	Diskussion der Hämostaseparameter.....	47
4.2.1	Mikropartikel.....	47
4.2.2	Prothrombin Fragment, Thrombin generation Assay.....	49
4.2.3	Von Willebrand Faktor Antigen.....	49
5	Zusammenfassung.....	51
6	Anhang.....	53
6.1	TNM-Einteilung für das Mammakarzinom.....	53
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	54
6.3	Tabellenverzeichnis.....	54
6.4	Einverständniserklärung.....	55
7	Literaturverzeichnis.....	60
8	Danksagung.....	66
9	Publikationen.....	67

Alphabetisches Abkürzungsverzeichnis

ABC	Adenosin Triphosphat binding cassette
ALH	Atypische lobuläre Hyperplasie
ATM	Ataxia teleangiektatika
ATP	Adenosin Triphosphat
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BET	Brusterhaltende Therapie
BGP	Biliäres Glykoprotein, CD66a
BMI	Body mass index
BRCA	Breast Cancer Antigen
CA 15-3	Cancer Antigen 15-3
CEA	Carcinoembryonic antigen, Carcinoembryonales Antigen
Cis	Carcinoma in situ
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DFS	Disease-free survival, krankheitsfreie Überlebenszeit
EGF	Epidermal growth factor, epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermal growth factor receptor, epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
EMP	Endothelial cell-derived microparticles, endotheliale Mikropartikel
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting, Durchflusszytometrie
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FNP	Feinnadelpunktion
FSC	Forward scatter, Vorwärtsstreulicht
fT3	Freies Trijodthyronin
fT4	Freies Tetrajodthyronin
Her-2/neu	Human epidermal growth factor receptor, humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
Hsp	Heat shock protein, Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin G
Il-1 β	Interleukin 1 beta
LCB	Large Core Biopsy, Hochgeschwindigkeits-Stanzbiopsie
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ

Alphabetisches Abkürzungsverzeichnis

LMP	Leucocyte-derived microparticles, leukozytäre Mikropartikel
MDR	Multi-Drug-Resistance
MP	Mikropartikel
MRM	modifiziert radikale Mastektomie
MRT	Magnetresonanztomographie
MUC 1	Mucin 1
NCA	Nichtspezifisches kreuzreagierendes Antigen, CD66c
NDF	Neu differentiation factor, Heregulin
OS	Overall survival, Überlebenszeit
PAI-1	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator Inhibitor
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepuffertes Salin
PF	Prothrombin Fragment
PMP	Platelet-derived microparticles, thrombozytäre Mikropartikel
PS	Phosphatidylserin
ROCK I	Rho-assoziierte Kinase
R-PE	R-Phycoerythrin
SD	Standardabweichung
SEM	scanning electron microscopy, Rasterelektronenmikroskopie
SLNB	Sentinel Lymph Node Biopsy, Sentinellymphonodektomie
SSC	Sideward scatter, Seitwärtsstreulicht
TDLE	terminale duktulo-lobuläre Einheit
TF	Tissue factor, Faktor III, Gewebsthromboplastin
TG	Thyreoglobulin
TG AK	Anti-Thyreoglobulin Antikörper
TGA	Thrombin generation Assay, Thrombinbildungsassay
TGF α	Transforming growth factor alpha
TGT	Thrombin generation time, Thrombinbildungszeit
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TPO AK	Thyreoperoxidase Antikörper
TRAK	TSH-Rezeptor Autoantikörper
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
Upa	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
VEGF	Vascular endothelial growth factor, vaskulärer endothelialer

Alphabetisches Abkürzungsverzeichnis

	Wachstumsfaktor
vWF	Von Willebrand Faktor
vWF Ag	Von Willebrand Faktor Antigen
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Mit mehr als einer Million Neuerkrankungen jährlich ist das Mammakarzinom der weltweit häufigste bösartige Tumor der Frau [1, 2]. In Deutschland liegt die Inzidenz nach Schätzungen des Tumorregisters München bei über 60000 pro Jahr [2]. Die Lebenszeitinzidenz für die Entwicklung eines Mammakarzinoms bei allen Frauen beträgt etwa zehn Prozent [2]. Das Mammakarzinom stellt hierzulande mit 27% die häufigste Krebserkrankung der Frau und mit 17455 Sterbefällen im Jahr 2005 die häufigste Krebstodesursache dar [2]. Der Anteil an der krebsbedingten Mortalität beträgt 17,6% [2].

Das mittlere Erkrankungsalter liegt mit 63 Jahren sechs Jahre unterhalb desjenigen für Krebserkrankungen insgesamt [1, 2]. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt in der Bundesrepublik Deutschland für alle Tumorstadien gemittelt bei 83,6% [2].

Seit 1970 ist in Deutschland eine steigende Inzidenz an Mammakarzinomen zu verzeichnen, begleitet von einer sinkenden Mortalität, welche möglicherweise durch Früherkennungsprogramme und eine Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten bedingt ist [2].

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Bei der Tumorgenese des Mammakarzinoms spielen verschiedene Risikofaktoren eine Rolle: Dichte der Brust in der Mammographie, Vorerkrankungen der Brust (das Karzinomrisiko ist bei Mastopathie Grad III 5-fach, bei Grad II 2-fach erhöht), Kinderlosigkeit bzw. höheres Alter bei Erstgeburt, Hormonersatztherapie sowie eine positive Familienanamnese für das Mamma- oder Ovarialkarzinom [3].

Eine erhöhte Exposition durch endogene Östrogene wird durch eine frühe Menarche oder späte Menopause bedingt sowie durch Adipositas, da im Fettgewebe durch Aromatisierung von Androgenen Östrogene gebildet werden [4]. Durch eine menopausale Hormonersatztherapie exogen zugeführte Östrogene erhöhen ebenfalls das Mammakarzinomrisiko, abhängig von der Dauer der Einnahme [3].

Mutationen der Tumorsuppressorgene Breast Cancer Antigen 1 (BRCA1, Chromosom 17q21) und BRCA2 (Chromosom 13q12-13) erhöhen das Mammakarzinomrisiko um 65 bzw. 45%, Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 (Chromosom 17q13) um 90% und des Ataxia teleangiectatika-Gens (ATM; Chromosom 11q23) um 15% [3]. Der Anteil der hereditären Mammakarzinome an der Gesamtzahl der Mammakarzinome beträgt lediglich 3-5% [5].

1.1.3 Pathomorphologie

Die histologische Einteilung der Mammakarzinome richtet sich nach der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) [6]: Die lobuläre Neoplasie ist als fakultative Präkanzerose auf die terminalen duktulo-lobulären Einheiten (TDLE) begrenzt und fasst die Begriffe atypische lobuläre Hyperplasie (ALH) und lobuläres Carcinoma in situ (LCIS) zusammen [6]. Das duktales Carcinoma in situ (DCIS) ist ebenfalls eine fakultative Präkanzerose, gekennzeichnet durch eine erhöhte duktales Epithelproliferation und Zellatypien [6].

Bei den invasiven Karzinomen unterscheidet man das invasiv duktales Karzinom mit einer Häufigkeit von 40-75% aller Mammakarzinome, das invasiv lobuläre (5-15%), das medulläre (1-7%), tubuläre (1-2%), muzinöse (1-2%) und das papilläre (1-2%) Karzinom sowie seltene Karzinomformen mit einer Häufigkeit von insgesamt unter 1% [6].

Die histologische Graduierung der invasiven Mammakarzinome erfolgt nach Elston und Ellis und hat eine prognostische Relevanz [6]. Man unterscheidet abhängig von der Ausprägung der drei Merkmale Tubulusbildung, Kernpleomorphie und Mitoserate zwischen gut (Grad 3-5), mäßig (Grad 6-7) und schlecht (Grad 8-9) differenzierten Tumoren [6].

1.1.4 Diagnostik

Zur Früherkennung des Mammakarzinoms wird die monatliche Selbstuntersuchung und die jährliche ärztliche Tastuntersuchung der Brust sowie für Frauen zwischen 50 und 79 Jahren die Mammographie in zwei Ebenen alle zwei Jahre empfohlen [7]. Zusätzliche Möglichkeiten der bildgebenden Diagnostik bieten die Mammasonographie und Magnetresonanztomographie (MRT) [8].

Zur Diagnosesicherung dienen minimalinvasive Methoden wie die Hochgeschwindigkeits-Stanzbiopsie (Large Core Biopsy, LCB) oder – seltener – die Feinnadelpunktion (FNP) [7, 9].

1.1.5 Therapie

Die operative Therapie des primären Mammakarzinoms beinhaltet zwei Alternativen: einerseits die brusterhaltende Therapie (BET) mit Sentinellymphonodektomie (Sentinel Lymph Node Biopsy, SLNB) und/oder Axilladisektion und anschließender Bestrahlung der Restbrust, andererseits die Mastektomie oder modifiziert radikale Mastektomie (MRM) mit SLNB und/oder Axilladisektion. Letztere wird bei großen oder inflammatorischen Karzinomen, Multizentrität und bestehender Kontraindikation zur Nachbestrahlung angewandt [10].

In Abhängigkeit von der Risikokonstellation und dem Rezeptorprofil einer Patientin kann im Anschluss an die Operation eine adjuvante Chemotherapie und/oder eine Hormontherapie durchgeführt werden [11]. Eine primär systemische Therapie ist bei Patientinnen mit inflammatorischem oder weit fortgeschrittenem Karzinom indiziert, sowie um bei großen Tumoren im Anschluss eine brusterhaltenden Operation zu ermöglichen [12].

Bei einer Überexpression des humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (human epidermal growth factor receptor, Her-2/neu, s. 2.4.6.3) ist zusätzlich zur primär systemischen oder adjuvanten Chemotherapie eine einjährige Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) indiziert [11].

1.1.6 Tumormarker

Als Tumormarker für das Mammakarzinom haben sich die im Blut zirkulierenden Biomarker Cancer Antigen 15-3 (CA 15-3) und Carcinoembryonales Antigen (carcinoembryonic antigen, CEA, s. 2.4.6.6) etabliert [13]. Mit dem CA 15-3 – Assay werden über monoklonale Antikörper bestimmte Epitope auf dem Mucin 1 (MUC 1)- Molekül gebunden und dadurch die Serumkonzentration von MUC 1 bestimmt [14]. MUC 1 ist ein Glykoprotein, welches auf der apikalen Zellseite der Epithelzellen in den Gängen und Azini der Brust exprimiert und in die Muttermilch sezerniert wird [14]. Bei karzinomatöser Entartung wird die Polarisation der Epithelzelle gestört und MUC 1 in die Blutbahn freigesetzt [14]. CEA ist ein Protein aus der Immunglobulingen-Überfamilie (s. 2.4.6.6), welches in erhöhter Konzentration bei Patienten mit Mamma-, Bronchial-, Ovarial-, Prostata-, hepatozellulärem- und Pankreaskarzinom vorkommt [15]. Wegen ihrer relativ geringen Sensitivität eignen sich die beiden Tumormarker nicht zur Frühdiagnose des Mammakarzinoms, sondern dienen zur Therapieüberwachung und Rezidivfrüherkennung [16-18].

1.2 Schilddrüsendysfunktion beim Mammakarzinom

Mehrere Studien weisen auf einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung eines Mammakarzinoms und dem Vorliegen einer Schilddrüsendysfunktion hin. So wurde eine erhöhte Inzidenz von Schilddrüsenerkrankungen bei Mammakarzinompatientinnen im Vergleich zu gesunden Kontrollen gezeigt. Hierbei handelte es sich um eine Hashimoto-Thyreoiditis [19-21], Hypo- und Hyperthyreose [22], erhöhte Prävalenz von Autoantikörpern gegen Thyroxin-Peroxidase (TPO AK) und Thyreoglobulin (TG AK) [19, 20, 22-25] sowie ein vergrößertes Schilddrüsenvolumen [26].

In einer Studie von Smyth et al. konnte eine Korrelation zwischen einer Schilddrüsenvergrößerung und dem Tumorstadium des Mammakarzinoms nachgewiesen werden [27]. Park et al. wiesen eine hohe Inzidenz von Schilddrüsenkarzinomen bei Mammakarzinompatientinnen nach [28]. Außerdem ergaben sich Hinweise sowohl auf erhöhte als auch auf verminderte Schilddrüsenhormonkonzentrationen bei Frauen mit einem Mammakarzinom [29-32]. In einer

Studie von Thomas et al. waren die Werte von freiem Tetrajodthyronin (fT4) bei Mammakarzinompatientinnen präoperativ signifikant höher als 12 Monate postoperativ [33]. Bei postmenopausalen Frauen mit einer Hypothyreose und niedrig-normalem fT4 zeigte sich ein erhöhtes Mammakarzinomrisiko [34]. Demgegenüber finden sich auch Hinweise auf ein reduziertes Mammakarzinomrisiko bei Frauen mit Schilddrüsenadenomen [35] und primärem Hypothyreoidismus [36]. Eine Schilddrüsendysfunktion scheint auch die Prognose einer Mammakarzinomerkrankung zu beeinflussen. So hatten Mammakarzinompatientinnen mit Schilddrüsenenerkrankungen signifikant mehr Lymphknotenmetastasen sowie größere Tumoren im Vergleich zu Patientinnen mit einer normalen Schilddrüsenfunktion [29].

1.3 Hämostase bei Krebserkrankungen

Mit einer Inzidenz von 10-15% zählen thromboembolische Ereignisse zu den Hauptkomplikationen von Krebserkrankungen [37]. Thrombosen können sich auch als Erstsymptom einer Krebserkrankung präsentieren: 10 bis 20% aller Patienten mit einer idiopathischen Thrombose erkranken in den folgenden Jahren an Krebs [37]. Dies ist einerseits auf die Begleitumstände der Krebserkrankung wie Stase durch eine tumorbedingte Gefäßinfiltration und -kompression, Immobilisierung der Patienten, operative Therapie und Chemotherapie zurückzuführen, andererseits findet eine direkte Interaktion zwischen Tumor und Gerinnungssystem statt [38].

1.3.1 Mechanismen

Thrombozyten sind in der Lage, vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) freizusetzen, was für die Angiogenese und das Tumorwachstum essentiell ist [37]. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass die Bindung von Tumorzellen an aktivierte Thrombozyten eine Voraussetzung für den Metastasierungsvorgang ist [37]. Tumorzellen können zudem direkt die Gerinnungskaskade aktivieren sowie prokoagulatorische Ei-

genschaften von Endothelzellen, Thrombozyten, Monozyten und Makrophagen verstärken [38].

Die Hauptkomponenten tumorassoziierter Gerinnungsaktivität sind Zytokine, Tissue factor (TF, Faktor III, Gewebsthromboplastin) [38], zirkulierende Mikropartikel (MP, s. 1.3.2) [39] und Cancer procoagulant, welches mit Ausnahme von Amnion- und Chorionzellen nur von malignen Geweben gebildet wird und direkt den Gerinnungsfaktor X aktiviert [38, 40].

TF ist ein transmembranäres Glykoprotein von 47 kDa mit einer extrazellulären Faktor-VII-bindenden Domäne, welches in extravaskulären Zellen vieler Gewebe exprimiert wird und im Blut in Form TF-tragender MP vorkommt [38]. Bei vielen Tumorarten ist die TF-Expression gesteigert, was sich in einer atypischen TF-Expression auf Monozyten und Endothelzellen sowie in einer direkten TF-Synthese durch Tumorzellen und Freisetzung in Form von TF-haltigen MP äußert [38]. Kommt TF mit Blut in Kontakt, bindet er den Gerinnungsfaktor VII. Der entstandene Komplex aktiviert Faktor X und IX und leitet so über die Gerinnungskaskade die Bildung von Thrombin und letztendlich Fibrin ein [40].

Zytokine wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), Interleukin 1 beta (IL-1 β) und VEGF werden von Tumorzellen freigesetzt und entfalten ihre prothrombotische Wirkung über Endothelzellen und Monozyten [40].

1.3.2 Mikropartikel

MP sind zelluläre Membranvesikel der Größe 0,05-1 μm , die im Rahmen einer Zellaktivierung oder Apoptose sowie unter der Wirkung von Scherkräften freigesetzt werden und im Blut zirkulieren [41, 42]. Grundsätzlich können alle Zelltypen MP bilden, die Mehrzahl der MP entstammt jedoch zirkulierenden Zellen (Thrombozyten, Leukozyten, Erythrozyten) und Endothelzellen [41, 42]. Die Bildung von MP wird über einen Anstieg der zellulären Calciumkonzentration getriggert mit nachfolgender Aktivierung von Kinasen und der calciumabhängigen Proteinase Calpain und Inhibierung von Phosphatasen. Calpain spaltet Talin, ein Bestandteil des Zytoskeletts und beeinflusst so direkt die Freisetzung von MP [43]. Die MP-Bildung im Zuge der Apoptose wird über die Rho-assoziierte Kinase (ROCK I) vermittelt [43]. ROCK I wird durch aktivierte Caspasen gespalten und dadurch aktiviert [43]. Aktivierte ROCK I fördert die Kraftentwicklung

zwischen Aktin und Myosin und beeinflusst über die Aktin-Myosin-Kopplung an die Plasmamembran die Vesikelbildung [43]. Wie alle Körperzellen sind MP von einer Phospholipiddoppelmembran umgeben. Sie exponieren jedoch im Gegensatz zu diesen die negativ geladenen Phospholipide Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin in der äußeren und nicht in der inneren Membran [43]. MP tragen spezifische Antigene ihrer Ursprungszellen, anhand derer ihre zelluläre Herkunft identifizierbar ist [41].

Toth et al. untersuchten thrombozytäre MP (platelet microparticles, PMP) bei Mammakarzinompatientinnen im Vergleich zu gesunden Frauen [44]. Dabei wiesen Mammakarzinompatientinnen signifikant höhere PMP-Plasmakonzentrationen auf als die Kontrollgruppe [44]. Ebenso zeigte sich eine Korrelation zwischen der Tumorgroße und der Konzentration an zirkulierenden PMP [44]. Patientinnen mit Fernmetastasen (M1) wiesen die höchsten PMP-Konzentrationen auf [44]. 82,3% der MP bei Mammakarzinompatientinnen waren thrombozytären Ursprungs, 14,6% entstammten aktivierten Endothelzellen (endothelial cell-derived microparticles, endotheliale MP, EMP) und 0,3% Leukozyten (leucocyte-derived microparticles, leukozytäre MP, LMP) [44]. Zudem zeigten sich signifikante Unterschiede in der Konzentration an LMP zwischen Mammakarzinompatientinnen und der Kontrollgruppe [45]. Die Sensitivitäts-Spezifitäts-Profile von LMP ähnelten denen des etablierten Tumormarkers CA 15-3 [45].

1.3.3 Von Willebrand Faktor

Von Willebrand Faktor (vWF) wird von Megakaryozyten und Endothelzellen gebildet und spielt eine Schlüsselrolle bei der Interaktion von Thrombozyten sowie bei der Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel [46]. An Endothelläsionen bindet vWF über seine A3-Domäne an exponiertes Kollagen. Über eine Konformationsänderung wird die A1-Domäne exponiert, welche wiederum als Bindungsstelle für das auf der Thrombozytenoberfläche befindliche Glykoprotein 1b α fungiert [47]. Erhöhte Plasmakonzentrationen des vWF Antigens (vWF Ag) finden sich im Rahmen verschiedener Krebserkrankungen wie zum Beispiel Larynx- und Prostatakarzinom und sind assoziiert mit einem verstärkten Endothelwachstum im Rahmen der Angiogenese [48]. Einige Autoren wiesen bei

Patientinnen mit Mammakarzinom erhöhte Konzentrationen von vWF Ag im Vergleich zu gesunden Frauen bzw. Frauen mit einer benignen Brustkrankung [48, 49] nach, wobei Röhsig et al. einen Zusammenhang zwischen der vWF-Plasmakonzentration und dem Tumorstadium fanden [48].

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Risikofaktoren bei Patientinnen mit einem invasiven Mammakarzinom, einem Carcinoma in situ (Cis) und benignen Brusterkrankungen sowie in einer gesunden Kontrollgruppe untersucht.

1.4.1 Schilddrüsenfunktion

Bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom, Cis, einer benignen Brusterkrankung und bei gesunden Frauen wurden anamnestische Daten zu Schilddrüsen-erkrankungen erhoben. Außerdem wurden die Schilddrüsenhormone freies Trijodthyronin (fT3), fT4, und Thyroidea stimulierendes Hormon (TSH) sowie TPO AK, TG AK, und Antikörper gegen den TSH-Rezeptor (TRAK) im Serum bestimmt. Ziel der Arbeit war es, die Inzidenz an Schilddrüsen-erkrankungen im Patienten- und Kontrollkollektiv zu ermitteln und hinsichtlich einer möglichen Korrelation zum Tumorstadium der Patientinnen zu überprüfen.

1.4.2 Hämostase

Mehrere Studien weisen auf eine erhöhte MP-Konzentration bei Mammakarzinompatientinnen hin [39, 44, 45], wobei bisher hauptsächlich PMP, LMP und EMP untersucht wurden. MP tragen Oberflächenproteine ihrer Ursprungszelle [41]. Tumorzellen sind in der Lage, MP ins Blut freizusetzen [42]. Zielsetzung dieser Arbeit war es daher, durchflusszytometrisch anhand epithelialer und mammakarzinomspezifischer Marker zirkulierende MP zu detektieren, welche möglicherweise von den Tumorzellen selbst freigesetzt werden. Unser Fokus lag dabei auf der Plasmakonzentration der MP bei Mammakarzinompatientinnen und Frauen mit einer benignen Brusterkrankung.

Hämostaseologische Veränderungen im Studien- und Kontrollkollektiv wurden anhand der Bestimmung des Prothrombin Fragment (PF 1+2) sowie der Thrombinbildungszeit (Thrombin generation time, TGT) mittels Thrombinbildungsassay (Thrombin generation Assay, TGA) untersucht. Zusätzlich wurde vWF Ag als Marker für eine Endothelzellaktivierung gemessen.

Zur weiteren Ergänzung der MP-Diagnostik und insbesondere zur besseren Darstellung von zirkulierenden MP wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie des Universitätsklinikums München, Großhadern (Prof. Dr. med. Armin J. Reiningger) eine raster-elektronenmikroskopische Untersuchung (scanning electron microscopy, SEM) der MP sowohl in der Studien- als auch in der Kontrollgruppe durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv gesamt

Als Probandinnen wurden Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom vor einer chirurgischen Intervention sowie Patientinnen mit einer benignen Brusterkrankung (Mastopathie, Fibroadenome, duktale und tubuläre Adenome, Fibrolipomatose) an der Universitäts-Frauenklinik München, Großhadern, rekrutiert. Die Mammakarzinompatientinnen wurden nach TNM-Stadien klassifiziert (s. Anhang 6.1). Bei den Patientinnen mit einer benignen Brusterkrankung wurde ein Karzinom stanziobiotisch ausgeschlossen. Als Kontrollgruppe dienten gesunde Frauen mit anamnestischem Ausschluss von Karzinomerkrankungen, bei denen ein unauffälliger Mammographiebefund innerhalb der vergangenen sechs Monate diagnostiziert worden war. Ausschlusskriterien waren Nikotinkonsum, ein arterieller Hypertonus und eine Hormonersatztherapie.

Nach ausführlicher Aufklärung über die Studie (standardisiertes Formular zur Einverständniserklärung s. Anhang 6.4) erklärten die Teilnehmerinnen schriftlich ihre Zustimmung zur Erhebung der relevanten klinischen und laborchemischen Daten. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt (Projekt-Nr. 349-2 und 185-07).

2.2 Probengewinnung

Die Blutabnahme erfolgte stets innerhalb derselben Zeitspanne (zwischen 9 und 12 Uhr), um den Einfluss von Tagesschwankungen auf die MP-Konzentration auszuschließen.

Den Teilnehmerinnen wurden 5 ml Citratblut aus einer Kubitalvene entnommen. Die Blutabnahme erfolgte mit einer 20 G-Monovette ohne vorhergehende venöse Stauung. Innerhalb von 15 Minuten nach der venösen Blutentnahme wurden die Citrat-Blutproben bei 3000/min 20 Minuten lang bei Zimmertemperatur zentrifugiert (Zentrifuge Hermle ZK380, Gosheim, Deutschland) und der Plasmaüberstand in Proben von 320 µl in flüssigem Stickstoff 15 Minuten lang schockgefroren und anschließend bei -80°C bis zur Messung gelagert.

2.3 Schilddrüsenfunktion

2.3.1 Kollektiv

Eingeschlossen wurden Frauen mit einem invasiven Mammakarzinom (n = 65) oder einem Cis (n = 13), benignen Brusterkrankungen (n = 27), sowie gesunde Frauen als Kontrollgruppe (n = 38).

Von den 65 eingeschlossenen Mammakarzinompatientinnen befanden sich 32 (49,2%) im Tumorstadium T1, 25 (38,5%) im Stadium T2, 4 (6,2%) im Stadium T3 und 1 (1,5%) im Stadium T4. Drei Patientinnen (4,6%) wiesen Fernmetastasen (M1) auf. Vierundzwanzig Patientinnen (36,9%) hatten Lymphknotenmetastasen (N1), 39 (60%) waren nodalnegativ (N0).

2.3.2 Schilddrüsenfunktionsparameter

Das Auftreten von Schilddrüsenerkrankungen sowie die Einnahme von Schilddrüsenmedikamenten wurden anamnestisch erfasst. Im Serum aller Frauen wurden folgende Parameter bestimmt:

<u>Parameter</u>	<u>Normwert</u>
freies Tetrajodthyronin (fT4)	0,9-1,7 ng/dl
freies Trijodthyronin (fT3)	2,5-4,3 pg/ml
Thyroidea stimulierendes Hormon (TSH)	0,44-3,80 µU/ml
Thyreoperoxidase Antikörper (TPO AK)	< 40 IU/ml
TSH-Rezeptor Autoantikörper (TRAK)	< 1,0 mIU/ml
Thyreoglobulin Antikörper (TG AK)	< 100 IU/ml

TSH, fT4, fT3, TPO AK, TG AK und TRAK wurden mit einem automatischen Immunoassay (Roche Cobas, Mannheim, Deutschland) auf der Basis von Elektrochemolumineszenz quantifiziert. TSH-Werte > 3,80 µU/ml wurden als hypothyreot und < 0,44 µU/ml als hyperthyreot eingestuft, wobei Werte zwischen 3,8-10,0 µU/ml als latente und Werte > 10 µU/ml als manifeste Hypothyreose qualifiziert wurden. Bei TPO AK-Werten > 40 IU/ml, TRAK-Werten > 1,0 mIU/ml

sowie TG AK-Werten > 100 IU/ml wurde eine Autoimmunerkrankung der Schilddrüse diagnostiziert.

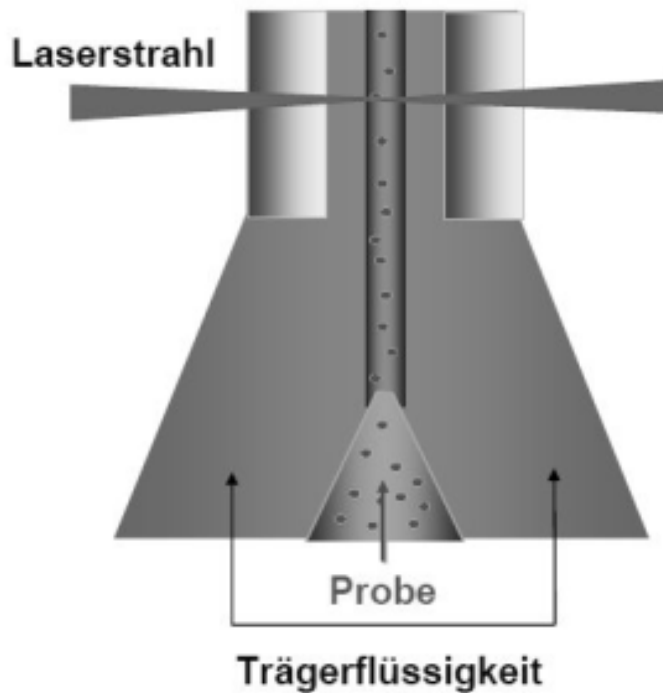
2.4 Durchflusszytometrie

2.4.1 Kollektiv

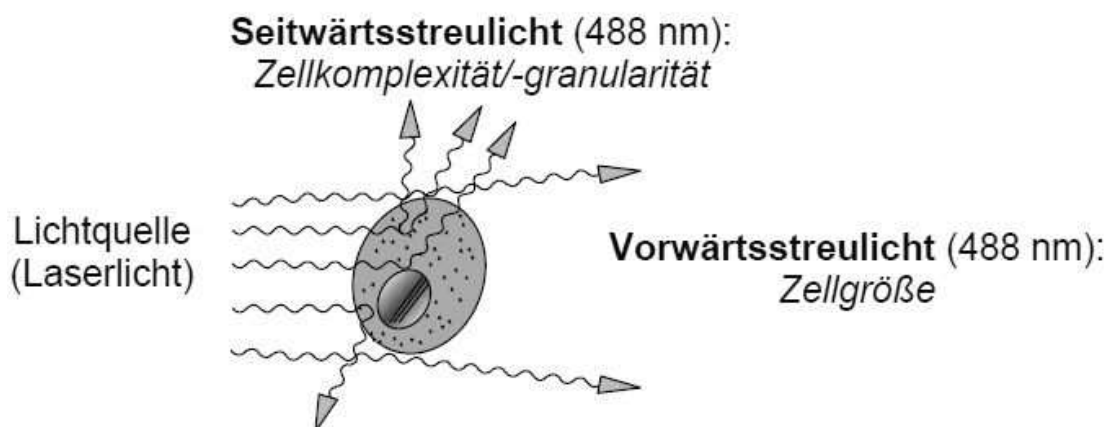
Die Konzentration an zirkulierenden MP wurde mit Hilfe der in 2.4.6 beschriebenen Antikörper bei 34 Mammakarzinompatientinnen bestimmt, von denen sich 19 im Stadium T1 und 15 im Stadium T2 befanden. Als Kontrollgruppe dienten Frauen mit einer benignen Brustkrankung ($n = 19$).

2.4.2 Technik der Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie oder Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) beruht auf der Messung optischer Signale von Zellen, die diese beim Passieren eines Laserstrahls aussenden [50]. Es handelt sich hierbei um Lichtstreuung und Fluoreszenz. Die zu untersuchenden Zellen oder Partikel müssen in Suspension vorliegen, welche über eine Kapillare in eine Messkammer transportiert und dort von der Trägerflüssigkeit erfasst wird. Nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung wird durch die laminare Strömung der Trägerflüssigkeit die Suspension im Zentrum der Messküvette konzentriert, so dass die Zellen bzw. Partikel nacheinander die Lichtquelle passieren und dabei jede Zelle einzeln erfasst wird (s. Abbildung 1). Als Lichtquelle dient ein Argonlaser mit einer Wellenlänge von $\lambda = 488$ nm. Die Zellen werden von der Lichtquelle angeregt und emittieren daraufhin Streulicht, welches vom Photomultiplier erfasst und digital gespeichert wird. Man unterscheidet Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (s. Abbildung 2). Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) wird im Winkel von $0-1^\circ$ zum Laserstrahl emittiert und liefert Informationen über die Querschnittsfläche des zu untersuchenden Objekts und somit indirekt über seine Größe. Seitwärtsstreulicht (sideward scatter, SSC) bezeichnet die Lichtstreuung im Winkel von 90° und stellt als Korrelat des Refraktionsindex ein Maß für die Granularität und Struktur des Objekts dar. Diese Technik wird zur Bestimmung einzelner Zellpopulationen im Vollblut angewandt.

Abbildung 1: Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung

Legende Abbildung 1: Die Probenflüssigkeit wird durch die laminare Strömung der Messflüssigkeit im Zentrum der Messkuvette fokussiert. *Modifiziert nach [51].*

Abbildung 2: Merkmale des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts im Durchflusszytometer

Legende Abbildung 2: Merkmale der Lichtstreuung einer Zelle; Vorwärtsstreu-licht wird im Winkel von 0-1° emittiert und liefert Informationen über die Zellgröße; Seitwärtsstreu-licht wird im Winkel von 90° emittiert und ermöglicht Rückschlüsse auf die Struktur des Objekts. *Modifiziert nach [51].*

Zusätzlich ist es möglich, bestimmte Oberflächenmoleküle auf Zellen oder Partikeln mit fluoreszierenden Antikörpern zu markieren. Dabei werden Fluorochrome durch das Laserlicht angeregt. Diese emittieren Licht einer für sie charakteristischen Wellenlänge. In der vorliegenden Arbeit fanden folgende Fluorochrome Verwendung: Fluoresceinisothiocyanat (FITC) mit einem Absorptionsmaximum bei 488 nm und einem Emissionsmaximum bei 520 nm, sowie R-Phycoerythrin (R-PE) mit drei Absorptionsmaxima bei 480, 546 und 565 nm und einem Emissionsmaximum bei 578 nm.

Während der Datenaufnahme wurde ein sogenannter Schwellenwert (threshold) definiert, oberhalb dessen ein Signal erst detektiert wird. Damit wurden Störsignale ausgeblendet und die Messung auf die Signale der zu bestimmenden Objekte fokussiert.

2.4.3 Grundlösungen

Tabelle 1: Chemikalien

CaCl ₂ (Calciumchlorid)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl (Natriumchlorid)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (Trinatriumcitrat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaOH (Natronlauge) 1 mol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
HCl (Salzsäure) 1 mol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland

Zur Herstellung der Phosphat-gepufferten Salin (PBS) – Grundlösung wurden 9 g NaCl in 1000 ml destilliertem Wasser aufgelöst (entsprechend 154 mmol/l NaCl 0,9%) und 0,25 g Na₂HPO₄ zugegeben (entsprechend 1,4 mmol/l Phosphat). Der pH-Wert der PBS-Grundlösung lag bei 7,5. Für die Calcium-Grundlösung wurden 1,47 g CaCl₂ in 100 ml destilliertem Wasser aufgelöst (entsprechend 0,1 mol/l CaCl₂). Die Citrat-Grundlösung bestand aus 3,2 g Na₃C₆H₅O₇, welches in 100 ml destilliertem Wasser aufgelöst wurde (entsprechend 3,2% Na₃C₆H₅O₇).

2.4.4 Arbeitslösungen

Die Arbeitslösungen wurden vor jeder Messung aus den Grundlösungen frisch hergestellt. Die Calcium-Pufferlösung setzte sich aus PBS und der Calcium-Grundlösung im Verhältnis 39 ml : 1 ml zusammen, die Citrat-Pufferlösung aus PBS und der Citrat-Grundlösung im Verhältnis 9 ml : 1 ml. Die Kalibrierung der Arbeitslösungen unter Zugabe von NaOH bzw. HCl auf einen pH-Wert zwischen 7,36 und 7,44 erfolgte mit einem pH-Meter der Firma inoLab pH 720, WTW Series, Weilheim, Deutschland. Vor der Verwendung wurden die Arbeitslösungen filtriert, um eine Verunreinigung zu vermeiden (Filter Minisart, non-pyrogenic, 0,20 µm, steril, Sartorius, Göttingen, Deutschland).

2.4.5 Verfahren

Vor der Konzentrationsbestimmung wurden die Proben auf schmelzendem Eis eine Stunde lang aufgetaut und nach Durchmischung mittels Vortex (Vortex Genie 2TM, Firma Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz) 250 µl entnommen. Diese wurden bei 17570 g und 20°C 30 min zentrifugiert (Zentrifuge Mikro 22R, Hettich, Tutting, Deutschland). 225 µl MP-freier Überstand wurden abpipettiert und verworfen. Die verbleibenden 25 µl wurden mit 225 µl Citrat-Pufferlösung verdünnt, erneut mittels Vortex gemischt und bei 17570 g und 20°C 30 min zentrifugiert (Schritt 1).

Danach wurden 225 µl Überstand entnommen und die verbleibenden 25 µl mittels Vortex mit 75 µl Citrat-Pufferlösung vermischt. 5 µl dieser MP-reichen Suspension wurden jeweils mit 35 µl Calcium-Pufferlösung verdünnt. Zur Detektion der MP wurde 5 µl Annexin V (s. 2.4.6.1) zugegeben sowie 5 µl eines spezifischen Antikörpers bzw. Kontrollantikörpers (s. 2.4.6.2 – 2.4.6.6). Annexin V und die spezifischen Antikörper wurden zuvor bei 17570 g und 20°C 5 min zentrifugiert und mit Calcium-Pufferlösung verdünnt (s. Tabelle 3).

Die Proben wurden 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und die Reaktion dann mit 900 µl Calcium-Pufferlösung (bei der Annexin V– Kontrollprobe mit Citrat-Pufferlösung) gestoppt.

Zur Analyse wurde ein FACScan-Durchflusszytometer der Marke Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) unter Verwendung der Cell Quest Software

(Becton Dickinson; San Jose, CA, USA) genutzt. FSC und SSC wurden in einen logarithmischen Maßstab gesetzt. MP wurden anhand ihrer Größe ($< 1 \mu\text{m}$ Durchmesser), Dichte sowie Annexin V Bindung identifiziert. Die Annexin V Messergebnisse wurden um die Autofluoreszenz korrigiert. Die Fluoreszenzen der spezifischen Antikörper wurden mit Hilfe isotyp-spezifischer Kontrollantikörper gleicher Konzentration korrigiert.

Die Proben wurden über 1 min im Durchflusszytometer untersucht, wobei vor jeder Messung der Wassereinzug des Geräts bestimmt und der Messwert um den aktuellen Wassereinzug korrigiert wurde. Zur Ermittlung der MP-Konzentration wurde die Zahl der MP (N) im oberen rechten Quadranten (FL1 vs FL2) um Isotypkontrolle und Autofluoreszenz korrigiert und die Werte wurden in folgende Formel eingefügt:

$$\text{MP/L} = N \times (100/5) \times (355/150) \times (106/250) \text{ [52].}$$

Tabelle 2: Reagenzien

Annexin-FITC	Immuno Quality Products, Groningen, Niederlande
Annexin-PE	Immuno Quality Products, Groningen, Niederlande
IgG 1-FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
IgG 1-PE	Immuno Quality Products, Groningen, Niederlande
CD66-PE	BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA
Her-2/neu-PE	BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA
BCRP1-FITC	Chemicon International, Billerica, USA
Hsp27-FITC	Stressgen, Victoria, Canada

Tabelle 3: Antikörper-Verdünnungen

Annexin-FITC	4 μl Annexin-FITC	36 μl Ca-Puffer
IgG 1-PE	2 μl IgG-PE	18 μl Ca-Puffer
CD66-PE	unverdünnt	
Her-2/neu-PE	10 μl Her-2/neu-PE	10 μl Ca-Puffer
Annexin-PE	2 μl Annexin-PE	38 μl Ca-Puffer
IgG 1-FITC	2 μl IgG-FITC	18 μl Ca-Puffer
BCRP1-FITC	5 μl BCRP1-FITC	20 μl Ca-Puffer
Hsp27-FITC	5 μl Hsp27-FITC	20 μl Ca-Puffer

2.4.6 spezifische Antikörper

2.4.6.1 Annexin V

Annexin V ist ein Protein der Größe 36 kDa, das vor allem in der Plazenta gebildet wird [53]. Annexin V bindet spezifisch und in Anwesenheit von Calciumionen an Phosphatidylserin (PS), ein anionisches Phospholipid [53]. Da Phospholipide an der Aktivierung der Gerinnungskaskade beteiligt sind, wirkt Annexin V durch seine Phospholipid-Bindung antikoagulatorisch [54]. In der Lipiddoppelmembran ruhender Zellen sind die Phospholipide asymmetrisch verteilt und PS befindet sich in der inneren Membran [43]. Während der MP-Bildung wird jedoch die asymmetrische Verteilung der Phospholipide innerhalb der Lipiddoppelmembran gestört, so dass PS in der äußeren Lipidmembran der MP positioniert wird [43]. Durch seine spezifische Bindung an PS eignet sich FITC- oder PE-markiertes Annexin zum durchflusszytometrischen Nachweis von MP.

2.4.6.2 Immunglobulin G 1

Immunglobulin G (IgG) ist ein 150 kDa-Protein, bestehend aus jeweils zwei leichten und schweren Ketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind [55]. Vier IgG-Subklassen mit homologer Grundstruktur der schweren Ketten sind bekannt [55]. IgG 1 ist die größte Subklasse gefolgt von IgG 2, 3 und 4 [55]. IgG 1 bindet unspezifisch an MP und eignet sich daher zur Negativkontrolle bei der durchflusszytometrischen Messung von MP.

2.4.6.3 Anti-Her-2/neu

Her-2/neu ist ein transmembranärer Tyrosinkinase-Rezeptor aus der Familie der Wachstumsfaktorrezeptoren (epidermal growth factor receptor, EGFR). Die Bezeichnung „neu“ leitet sich von Neuroblastomen der Ratte ab, bei denen das Her-2/neu-Gen erstmals identifiziert wurde [56]. Das Molekulargewicht von Her-2/neu beträgt 185 kDa und es wird durch das Her-2/neu-Onkogen (c-erbB2-Onkogen) auf Chromosom 17q21 kodiert [57]. Her-2/neu besteht aus drei Domänen, einer intrazellulären (C-terminaler Anteil mit Tyrosinkinase-Aktivität), einer transmembranären und einer mehrfach glykosylierten extrazellulären und weist eine signifikante Homologie zu EGFR auf [58]. Die EGFR-Familie besteht

aus vier Mitgliedern, erbB-1 (Her1, EGFR), erbB-2 (Her-2/neu), erbB-3 (Her3) und erbB-4 (Her4), mit starker Homologie besonders in der intrazellulären Domäne [59]. Nach Bindung eines Liganden an ein Mitglied der EGFR-Familie kommt es zur Dimerisierung mit einem gleichartigen Rezeptor (Homodimerisierung) oder mit einem anderen Rezeptor aus der EGFR-Familie (Heterodimerisierung) [59]. Die Tyrosinkinaseaktivität führt zur Autophosphorylierung des Rezeptors und vermittelt die weitere Signaltransduktion [59]. Ein spezifischer Ligand für Her-2/neu ist nicht bekannt, ebensowenig ein Her-2/neu-Her-2/neu-Homodimer. Jedoch wurden sogenannte Hereguline (neu differentiation factors, NDF) als Liganden von Her-3 und Her-4 identifiziert, die auch eine Heterodimerisierung mit Her-2/neu und damit dessen Aktivierung induzieren [58]. Eine Bindung des Epidermalen Wachstumsfaktors (epidermal growth factor, EGF) oder des Transforming growth factor alpha (TGF α) kann ebenfalls eine Heterodimerbildung zwischen EGFR und Her-2/neu auslösen [60]. Man vermutet, dass Her-2/neu als bevorzugter Partner bei Heterodimerisierungen mit Her1, Her3 und Her4 fungiert [60, 61]. Über Her-2/neu werden Zellwachstum und -differenzierung sowie Angiogenese gesteuert [58].

In 10-34% der invasiven Mammakarzinome liegt eine meist durch Genamplifikation verursachte Überexpression von Her-2/neu vor, welche mit einer signifikant kürzeren Überlebenszeit (overall survival, OS) sowie signifikant kürzerer krankheitsfreier Überlebenszeit (disease-free survival, DFS) korreliert [58, 62, 63]. Außerdem haben Her-2/neu-positive Tumore eine schlechtere Ansprechrate auf verschiedene Chemotherapeutika wie Cyclophosphamid, Methotrexat, Fluoruracil sowie auf das Antiöstrogen Tamoxifen, jedoch eine bessere Ansprechrate auf Anthrazykline als Her-2/neu-negative Tumore [58]. Andererseits stellt Her-2/neu ein Therapieziel für den spezifischen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) dar. Da Her-2/neu in vielen epithelialen Geweben exprimiert wird, ist es nicht spezifisch für das Mammakarzinom.

2.4.6.4 *Anti-BCRP*

Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2, ABCP, MXR1) ist ein in der Plasmamembran lokalisiertes 72 kDa Protein aus der Familie der ABC-Transporter (Adenosin Triphosphat binding cassette, ATP binding cassette),

dessen Gen sich auf Chromosom 4q22 befindet und sich über 66kb erstreckt [64]. BCRP wurde ursprünglich in Doxorubicin-resistenten Mammakarzinomzellen entdeckt [65]. Eine BCRP-Überexpression in Tumoren ist mit einer verminderten Sensibilität gegenüber Anthrazyklinen, Mitoxantron, Bisantren und Camptothecinen assoziiert [66]. Eine endogene Expression von BCRP findet sich in hohem Maße in der Plazenta, aber auch in der Leber, dem Darm, dem Ovar, den Gefäßen sowie in den Ductuli und Lobuli der Brust [66]. Die BCRP-Überexpression spielt vor allem bei der Multi-Drug-Resistance (MDR) von Tumoren eine Rolle [66]. Die Expression von BCRP wurde in verschiedenen soliden Tumoren, unter anderem dem Mammakarzinom festgestellt [67]. Das Protein enthält sechs Transmembran-Domänen und eine ATP-Bindungsstelle [65] und wirkt als Halb-Transporter, der wahrscheinlich nach Dimerisierung aktiv körpereigene oder -fremde Stoffe ein- und ausschleust [65, 66].

2.4.6.5 *Anti-Hsp27*

Hitzeschockproteine (heat shock proteins, Hsp) wurden nach ihrer Induktion durch erhöhte Temperaturen benannt, werden aber ebenso durch andere physikalische, chemische und biologische Stimuli im Rahmen der Stressantwort von Zellen induziert [68]. Hsp vermitteln als Chaperone Transport und Faltung von Proteinen und wirken zytoprotektiv [68]. Man unterscheidet fünf Familien anhand der Molekülgröße: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 und die kleinen Hsp mit einer Molekülgröße zwischen 15 und 30 kDa, zu denen Hsp27 gehört [69]. Hsp27 besitzt wie alle kleinen Hsp eine konservierte Region, die α -crystallin-Domäne mit IgG-ähnlicher Struktur am C-Terminus des Proteins [68]. Hsp27 wird im Gegensatz zu einigen anderen Hsp nur in geringem Maße konstitutiv exprimiert sondern hauptsächlich als Reaktion der Zelle auf Stressoren wie Hitze, oxidativen Stress oder Chemotherapeutika [68, 70]. Hsp27 tritt vor allem in Form von Oligomeren bis 1000 kDa auf, deren Bildung phosphorylierungsabhängig erfolgt [70]. Hsp27 kann katalysiert durch die MAPKAP-Kinasen 2 und 3 an drei Serinresten phosphoryliert werden, die Dephosphorylierung fördert die Oligomerisierung [70]. Die zytoprotektive Funktion von Hsp27 besteht in verschiedenen Wirkungsweisen:

1. Als molekulares Chaperon verhindert Hsp27 ATP-unabhängig eine unspezifische Proteinaggregation und bewirkt die Reparatur oder Zerstörung fehlgefalteter Proteine [68].
2. Hsp27 wirkt über die Hemmung der Caspase-Kaskade an verschiedenen Stellen antiapoptotisch [68].
3. Durch Interaktion mit Aktinfilamenten stabilisiert Hsp27 auf bisher ungeklärte Weise das Zytoskelett [68].
4. Hsp27 schützt die Zelle vor oxidativem Stress [68].

In verschiedenen Karzinomen findet sich eine erhöhte Expression von Hsp27, darunter das Mamma-, Ovarial-, Kolon-, hepatozelluläre, Nierenzell-, nichtkleinzellige Lungen- und Prostatakarzinom [71]. Beim Mammakarzinom korreliert die Expression von Hsp27 mit dem Östrogenrezeptorstatus und ist mit einer geringen Tumorgroße assoziiert [68]. Andererseits steht die Hsp27-Expression mit einer schlechten Prognose und einer höheren Chemotherapie Resistenz in Zusammenhang [69].

2.4.6.6 *Anti-CD66 (CEA)*

CEA bildet eine Familie aus über 30 Zelloberflächenproteinen, die von 10 Genen auf Chromosom 19 kodiert werden [14]. Es wird aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zur schweren γ -Kette des IgG zur Immunglobulingen-Überfamilie gezählt [14]. CEA ist ein 150-300 kDa schweres einkettiges Glykoprotein aus 641 Aminosäuren [14]. CEA-Proteine spielen wahrscheinlich bei Zellerkennungsprozessen, Zelladhäsion und -abstoßung eine Rolle, was auf ihre Bedeutung bei der Tumorentwicklung, -ausbreitung und -therapie hinweist [14, 72].

Zur CEA-Genfamilie gehören zwei Unterfamilien:

1. Die eigentliche CEA-Familie (CD66), bestehend aus dem klassischen CEA (CD66e), dem nichtspezifischen kreuzreagierenden Antigen (NCA, CD66c), dem biliären Glykoprotein (BGP, CD66a) und den CEA-gene-family-members 1 (CGM1, CD66d), 2 (CGM2), 6 (CGM6, NCA95) und 7 (CGM7).
2. Die schwangerschaftsspezifischen Glykoproteine (pregnancy-specific glycoproteins, PSG, CD66f) [72].

CEA findet sich im embryonalen Entoderm und wurde erstmals bei Patienten mit Kolorektalem Karzinom beschrieben [73]. Erhöhte CEA-Konzentrationen wurden jedoch auch bei Patienten mit Mamma-, Lungen-, Ovarial-, Prostata-, Leberzell- und Pankreaskarzinom nachgewiesen [15].

Carcinoembryonales Antigen ist heute neben CA15-3 der meistgebrauchte Tumormarker für das Mammakarzinom. Wegen seiner niedrigen Sensitivität für frühe Tumorstadien wird es aber nicht zur Früherkennung sondern hauptsächlich zum Therapiemonitoring und zur Detektion von Rezidiven angewandt [14].

2.5 Elektronenmikroskopie

Nach Probenaufbereitung bis Schritt 1 (s. 2.4.5) wurden anhand einer Plasmaprobe von einer Mammakarzinompatientin sowie einer Frau aus der Kontrollgruppe elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Für die SEM mussten die MP auf Deckgläsern fixiert werden. Hierzu wurden die Deckgläser mit 10 µg/ml vWF beschichtet, das Untersuchungsmaterial darauf gegeben und über eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Bindung der MP an den fixierten vWF zu ermöglichen. Die gebundenen MP wurden über 15 min mit 2,5% Glutaraldehyd fixiert, das im Folgenden durch PBS (pH 7,4) ersetzt wurde. Es folgte die Entwässerung in einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration bis 100%. Die Proben wurden mit CO₂ oberhalb des kritischen Punktes getrocknet und mit Platin metallisiert. Die Untersuchung der MP erfolgte mit einem JSM-6300F Elektronenmikroskop (JEOL, Eching, Deutschland) bei 5 kV Strahlbeschleunigung. Die Bindung von PMP wurde auf 8 repräsentativen SEM-Bildern mittels Matrox Inspector (version 8.9; Matrox Electronic Systems Ltd., Dorval, Quebec, Kanada) quantifiziert.

2.6 Prothrombin Fragment (PF 1+2)

Die Serumkonzentrationen von PF1+2 wurden mittels eines automatisierten Immunoassays (Roche Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) bestimmt.

Referenzbereich: 69-229 pmol/l

2.7 Thrombin Generation Assay (TGA)

Der TGA wurde mit einem automatischen Random Access Analyzer (ACL 9000, Instrumentation Laboratory, Kirchheim, Deutschland) durchgeführt. Optische Signale wurden bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert. Die Gerinnungskaskade wurde mit 25 mM CaCl₂ und rekombinatem TF (1,44 ng/ml, PT reagent Recombiplastin, Instrumentation Laboratories, Kirchheim, Deutschland), gelöst in Barbitonpuffer (Stago, Asnières, Frankreich, pH 7,4) gestartet. Als Quelle für die im Assay benötigten Phospholipide dienten PMP. Die Thrombinbildung wurde mittels eines 250 µm chromogenen Substrats detektiert, das durch Thrombin umgewandelt wird (H-D-CHG-Ala-Arg.pNa-2AcOH, Michaelis Konstante KM = 15,9 µM, „fast substrate“, Pentapharm, Kirchheim, Deutschland). Als Messpunkt galt der Zeitpunkt der maximalen Umwandlungsgeschwindigkeit des Thrombinsubstrats. Zur Verhinderung der Fibrinvernetzung diente ein Fibrin-Polymerisationsinhibitor (H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH·AcOH, Pentapharm, Basel, Schweiz). Der Variationskoeffizient für die Kontrollmessungen (definiert als Standardabweichung : Mittelwert) lag bei 10,4%.

2.8 Von Willebrand Faktor Antigen (vWF Ag)

Die Serumkonzentration des vWF Ag wurde bei 26 Mammakarzinompatientinnen mit unterschiedlichen TNM-Stadien (T1: n = 10, T2: n = 10, M1: n = 6) sowie bei 10 gesunden Frauen als Kontrolle mittels Latex-amplifizierter Immuno-Turbidimetrie (Dade, Behring, Marburg, Deutschland) bestimmt.

Normbereich: 50-160%

2.9 Statistik

Parametrisch verteilte Daten werden im Folgenden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) (Minimum-Maximum), alle anderen Daten als Median (Q1-Q3 = Interquartilsabstand) dargestellt. Die Analyse unabhängiger Variablen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test, die aller anderen Variablen mittels Chi-Quadrat-Test und Fisher's exakt Test. P-Werte < 0.05 wurden als statistisch signifikant erachtet. Die Daten wurden mit SPSS für Windows (Version 16.0, Chicago, Illinois, USA) ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Schilddrüsenfunktion

3.1.1 Patientenkollektiv

Die Gruppen unterschieden sich nicht signifikant bezüglich des Alters (Tabelle 4). Das Tumor-Grading wurde bei 59 Patientinnen bestimmt. 4 davon (6,8%) hatten G1-Tumore, 37 (62,7%) G2-Tumore und 18 (30,5%) G3-Tumore.

Bei 62 Patientinnen mit einem invasiven Mammakarzinom wurde der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus bestimmt. Neun Patientinnen (14,5%) hatten hormonrezeptorpositive Tumore, alle anderen waren rezeptornegativ. Zwölf von 61 Patientinnen (19,7%) waren Her-2/neu positiv. Die Konzentration der Tumormarker CEA und CA15-3 war bei 17 von 64 (26,6%) bzw. 11 von 64 (17,2%) Patientinnen erhöht.

3.1.2 Schilddrüsenvorerkrankungen

Bei 16 der 65 Mammakarzinompatientinnen (24,6%) wurden anamnestisch Schilddrüsenvorerkrankungen eruiert: 7 Patientinnen berichteten von einer Hypo-, 2 von einer Hyperthyreose, 1 von einem heißen Knoten und 6 hatten Schilddrüsenoperationen (wegen eines Schilddrüsenkarzinoms, eines autonomen Adenoms oder multipler Zysten) in der Vorgeschichte. Bei Mammakarzinompatientinnen fanden sich signifikant häufiger Operationen der Schilddrüse in der Vorgeschichte als bei Frauen mit einer benignen Brustkrankung sowie bei der Kontrollgruppe ($p < 0.05$).

Vier der 13 Patientinnen mit einem Cis (30,8%) berichteten von Schilddrüsenvorerkrankungen (Autonomes Adenom, $n = 1$, Schilddrüsenoperation wegen Schilddrüsenkarzinom oder kalter Knoten, $n = 3$). Sechs (22,2%) der 27 Frauen mit einer benignen Brustkrankung berichteten ebenso von Schilddrüsenvorerkrankungen (Hypothyreose, $n = 5$, Schilddrüsenoperation bei autonomem Ade-

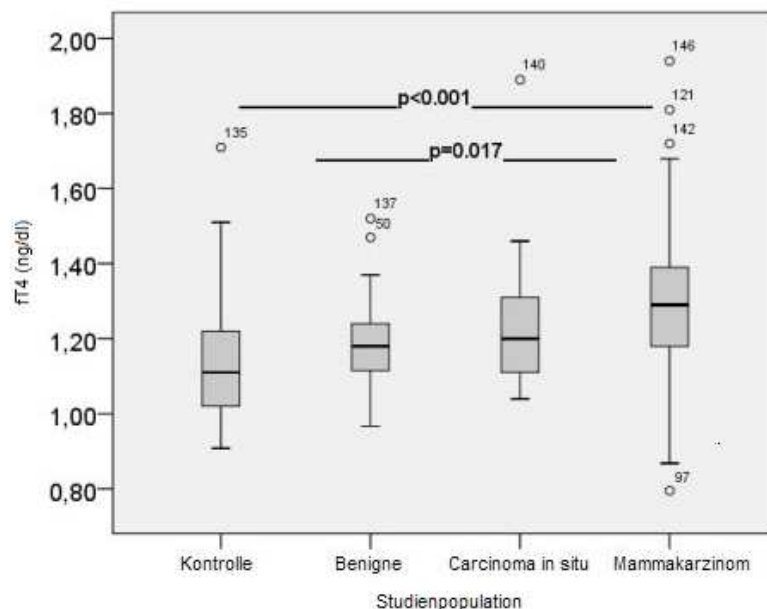
nom, n = 1). In der Kontrollgruppe fanden sich bei 3 Frauen (7,9%) Schilddrüsenerkrankungen (Hypothyreose) in der Anamnese.

3.1.3 Schilddrüsenfunktionsparameter

Die Schilddrüsenfunktionsparameter der Studien- und Kontrollgruppe sind in Abbildung 3 sowie in den Tabellen 4 bis 7 zusammengefasst.

Bei insgesamt im Normbereich liegenden fT3- und fT4- Konzentrationen im gesamten Kollektiv (Mittelwert \pm SD) unterschieden sich dennoch beim Vergleich der Schilddrüsenhormonkonzentrationen die Mammakarzinompatientinnen signifikant von den Patientinnen mit einer benignen Brusterkrankung (fT4: $p = 0.017$, fT3: $p = 0.021$) und von der Kontrollgruppe ($p < 0.001$). Zudem wurden bei Mammakarzinompatientinnen die höchsten TRAK-Konzentrationen nachgewiesen mit einem signifikanten Unterschied zu Patientinnen mit einer benignen Brusterkrankung ($p = 0.048$). Patientinnen mit Cis zeigten signifikant höhere fT3-Konzentrationen als die Kontrollgruppe ($p = 0.028$).

Abbildung 3: fT4-Konzentrationen in der Studienpopulation



Legende Abbildung 3: fT4-Konzentrationen in der Studienpopulation, dargestellt als Boxplot; Y-Achse: fT4-Konzentration (ng/dl), x-Achse: Studienpopulation. 135, 137, 50, 140, 146, 121, 142: Patientinnen mit fT4-Konzentrationen oberhalb des Interquartilsabstandes ($p < 0.05 =$ signifikant).

Tabelle 4: Alter, fT4, fT3, TSH, TPO AK, TRAK, TG AK in der Studienpopulation

Parameter (Einheit) Normwert	Karzinom Mittelwert±SD	Cis Mittelwert±SD	Benigne Mittelwert ±SD	Kontrolle Mittelwert±SD	p-Wert
Alter (Jahre)	58,60±13,50	58,08±5,80	54,42±14,43	53,20±9,60	n.s.
fT4 (ng/dl) (0,9-1,7)	1,28±0,20ab	1,27±0,23	1,19±0,13a	1,15±0,18b	p < 0.05ab
fT3 (pg/ml) (2,5-4,3)	3,05±0,46a	2,95±0,40d	2,87±0,34c	2,66±0,36c,d	p < 0.05acd
TSH (µU/ml) (0,44-3,80)	1,37±0,87	1,24±1,04	1,28±0,73	1,55±1,2	n.s.
TPO AK (IU/ml) (< 40)	128,81±190,32	28,88±14,40	39,35±60,72	84,62±255,35	n.s.
TRAK (mIU/ml) (< 1,0)	2,26±0,81ab	nicht bestimmt	1,37±0,17a	1,44±0,28b	p < 0.05ab
TG AK (IU/ml) (< 100)	64,37±133,18	85,38±177,28	140,94±318,07	98,83±202,18	n.s.

Legende Tabelle 4: dargestellt sind die Konzentrationen an fT4, fT3, TSH, TPO AK, TRAK, TG AK bei Mammakarzinompatientinnen (Karzinom), Patientinnen mit Cis (Cis), benigner Brusterkrankung (Benigne) und der Kontrollgruppe (Kontrolle); die jeweiligen Normwerte sind jeweils in Klammern aufgeführt, Daten präsentiert als Mittelwert±SD (Standardabweichung); Die Buchstaben a bis d zeigen die Signifikanz zwischen den jeweiligen Gruppen an: a = Signifikanz zwischen Mammakarzinompatientinnen und Patientinnen mit benignen Tumoren, b = Signifikanz zwischen Mammakarzinompatientinnen und Kontrolle; c = Signifikanz zwischen Patientinnen mit benignen Tumoren und Kontrolle; d = Signifikanz zwischen Cis und Kontrolle, n.s. nicht signifikant (p < 0.05 = signifikant).

Tabelle 5: fT3-Werte innerhalb der Studienpopulation

	Werte innerhalb Referenzbereich	erhöhte Werte	erniedrigte Werte	Gesamt
Mammakarzinom	59 (89,4%)	3 (4,5%)	4 (6,1%)	66 (100%)
Cis	11 (84,6%)	0	2 (15,4%)	13 (100%)
benigne Tumoren	26 (96,3%)	0	1 (3,7%)	27 (100%)
Kontrollgruppe	30 (78,9%)	0	8 (21,1%)	38 (100%)
Gesamt	127 (88,2%)	3 (2,1%)	14 (9,7%)	144 (100%)

Legende Tabelle 5: Dargestellt ist die Anzahl der innerhalb und außerhalb des Referenzbereichs liegenden fT3-Werte; Referenzbereich von fT3: 2,5-4,3 pg/ml.

Tabelle 6: fT4 Werte innerhalb der Studienpopulation

	Werte innerhalb Referenzbereich	erniedrigte Werte	Gesamt
Mammakarzinom	64 (97,0%)	2 (3,0%)	66 (100%)
Cis	13 (100%)	0	13 (100%)
benigne Tumoren	27 (100%)	0	27 (100%)
Kontrollgruppe	38 (100%)	0	38 (100%)
Gesamt	142 (98,6%)	2 (1,4%)	144 (100%)

Legende Tabelle 6: Dargestellt ist die Anzahl der innerhalb und außerhalb des Referenzbereichs liegenden fT4-Werte; Referenzbereich fT4: 0,9-1,7 ng/dl.

Tabelle 7: TRAK-Werte innerhalb der Studienpopulation

	Werte innerhalb Referenzbereich	erhöhte Werte	Gesamt
Mammakarzinom	64 (97,0%)	2 (3,0%)	66 (100%)
Cis	13 (100%)	0	13 (100%)
benigne Tumoren	16 (59,3%)	11 (40,7%)	27 (100%)
Kontrollgruppe	25 (65,8%)	13 (34,2%)	38 (100%)
Gesamt	118 (81,9%)	26 (18,1%)	144

Legende Tabelle 7: Dargestellt ist die Anzahl der innerhalb und außerhalb des Referenzbereichs liegenden Werte; Referenzbereich TRAK: < 1,0 mIU/ml.

3.2 Mikropartikel

3.2.1 Patientenkollektiv

Zwischen Patientinnen- und Kontrollgruppe bestand kein signifikanter Unterschied hinsichtlich Alter, Body mass index (BMI), Hämoglobinkonzentration (Hb), Thrombozytenzahl, Leukozytenzahl, CEA und CA15-3 (Tabelle 8).

Tabelle 8: Patientenkollektiv MP-Messungen

	Alter (Jahre)	BMI (kg/m²)	Hb (g/dl)	TZ (G/l)	LZ (G/l)	CEA (ng/ml)	CA15-3 (U/l)
S (n=34)	59,2±13,8 (26-83)	25,4±3,8 (17,2-33,6)	13,3±1,2 (11,3-15,7)	281,9±61,6 (178-426)	6,7±1,3 (4,5-9,0)	4,1±10,6 (0,4-56,1)	18,6±9,4 (5,6-58,0)
K (n=19)	51,3±16,2 (19-80)	23,4±4,2 (18,6-30,8)	13,7±0,9 (12,3-15,4)	281,8±49,4 (199-366)	7,6±2,5 (4,9-16,0)	1,9±1,2 (0,7-3,8)	18,9±7,0 (7,5-27,7)

Legende Tabelle 8: Demographische Daten der Studien- und Kontrollgruppe; Parametrisch verteilte Daten dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung (Minimum-Maximum), S = Studiengruppe, K = Kontrollgruppe; TZ = Thrombozytenzahl, LZ = Leukozytenzahl.

3.2.2 Mikropartikel

Die Ergebnisse der MP-Messungen der Studien- und Kontrollgruppe sind in den Tabellen 9 und 10 zusammengefasst.

Bei allen Patientinnen (T1/T2) war die Konzentration an Annexin V+MP höher im Vergleich zur Kontrollgruppe, jedoch ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen. Bei der Betrachtung der MP-Subpopulationen zeigten sich höhere Werte für CD66+MP, Her-2/neu+MP, BCRP+MP und Hsp27+MP bei den Patientinnen im Vergleich zu den Kontrollen, ebenfalls ohne Signifikanz. Patientinnen mit T1-Tumoren hatten signifikant höhere Konzentrationen an Annexin V+MP ($p = 0.004$), CD66+MP ($p = 0.025$), BCRP+MP ($p = 0.008$) und Hsp27+MP ($p = 0.020$) als die Frauen der Kontrollgruppe.

Die Korrelation der MP-Konzentrationen mit dem Lymphknotenstatus ergab signifikant höhere Annexin V+MP-Werte bei Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen (N1) als bei den Kontrollen ($p = 0.042$). Ebenso fanden sich signifikant

erhöhte Konzentrationen an CD66+MP ($p = 0.045$), BCRP+MP ($p = 0.025$) und Hsp27+MP ($p = 0.034$) bei N1-Patientinnen verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Anzahl Her-2/neu+MP war bei N1-Patientinnen erhöht, jedoch ohne eine Signifikanz zu erreichen.

Die Konzentration der Annexin V+MP wie auch die aller gemessenen MP-Subpopulationen war bei Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen am höchsten und unterschied sich ebenfalls zwischen Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen und der Kontrollgruppe (jeweils $p > 0.05$).

Tabelle 9: Konzentration von Annexin V+MP, CD66+MP, Her-2/neu+MP, BCRP+MP und Hsp27+MP ($\times 10^6/l$) in der Studienpopulation

	Annexin V	CD66	Her-2/neu	BCRP	Hsp27
S (n=34)	7296 (1717-17455) (4316-7296)	998 (367-2662) (732-1621)	30 (10-229) (19-67)	728 (246-2012) (562-1299)	2825 (891-8447) (1869-4741)
T1 (n=19)	9353* (1717-17455) (6563-11240)	1167* (506-2628) (848-1656)	34 (10-207) (22-90)	769* (407-1399) (639-1301)	3585* (891-8447) (2702-5119)
T2 (n=15)	5707 (1904-13643) (2565-8701)	790 (367-2662) (606-1461)	23 (11-229) (16-52)	651 (246-2012) (371-1280)	2267 (1072-6227) (1572-3541)
K (n=19)	5468 (1900-9834) (4306-6624)	835 (219-1507) (610-1065,8)	26 (6-106) (20-43)	600 (251-1720) (453-715)	2344 (608-5060) (1763-3258)

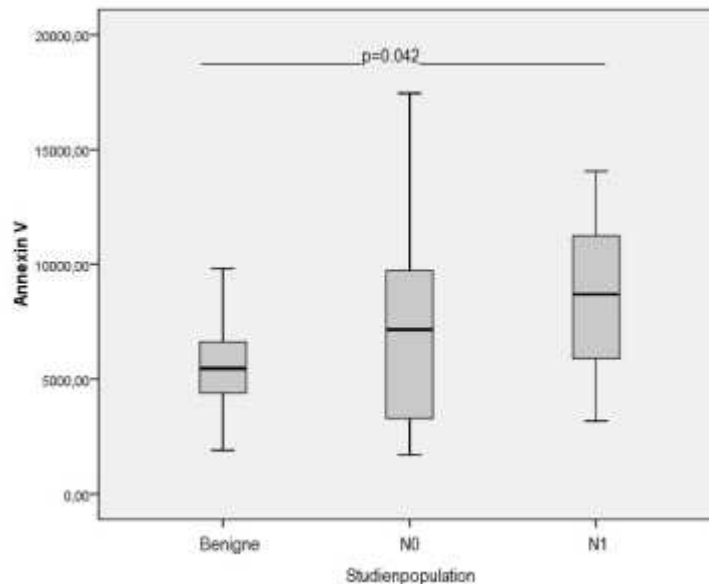
Legende Tabelle 9: Konzentration von Annexin V+MP, CD66+MP, Her-2/neu+MP, BCRP+MP und Hsp27+MP (jeweils $\times 10^6/l$) in der Studien- und Kontrollgruppe sowie unterteilt nach Tumorstadium; Daten präsentiert als Median (Minimum-Maximum), (Interquartilsabstand Q1-Q3), * signifikant erhöhte Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe, S = Studiengruppe, K = Kontrollgruppe ($p < 0.05 =$ signifikant).

Tabelle 10: Konzentration von Annexin V+MP, CD66+MP, Her-2/neu+MP, BCRP+MP und Hsp27+MP ($\times 10^6/l$) in der Studienpopulation

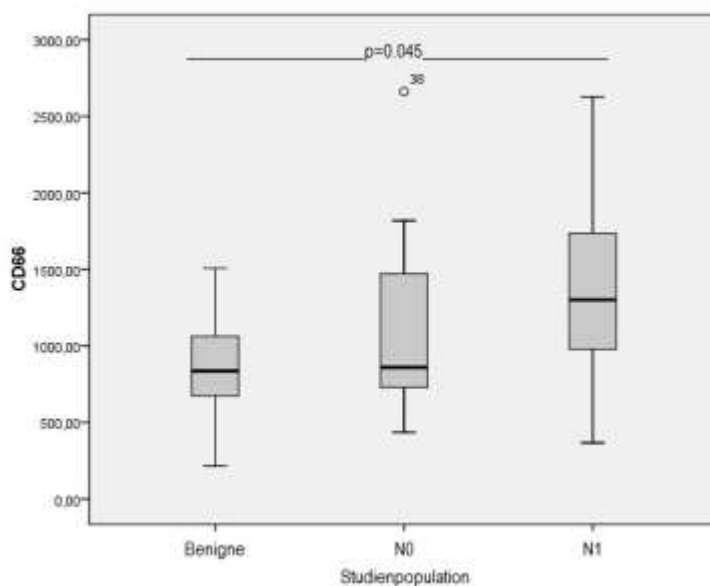
	Annexin V	CD66	Her-2/neu	BCRP	Hsp27
N1 (n=9)	8707* (3191-14056) (5502-12565)	1301* (367-2628) (997-1453)	34 (10-229) (22-163)	796* (246-1797) (689-1481)	3943* (1626-6381) (2571-5486)
N0 (N=23)	7161 (1717-17455) (2565-9787)	859 (435-2662) (726-1534)	27 (11-125) (16-66)	700 (329-2012) (433-997)	2634 (891-8447) (1665-2634)
K (n=19)	5468 (1900-9834) (4306-6624)	835 (219-1507) (610-1066)	26 (6-106) (20-43)	600 (251-1720) (453-715)	2344 (608-5060) (1763-3258)

Legende Tabelle 10: Konzentration von Annexin V+MP, CD66+ MP, BCRP+ MP und Hsp27+ MP (jeweils $\times 10^6/L$) in der Studien- und Kontrollgruppe bei nodalpositiven (N1) und nodalnegativen (N0) Patientinnen, verglichen mit der Kontrollgruppe; Daten präsentiert als Median (Minimum-Maximum), (Interquartilsabstand Q1-Q3), * signifikant erhöhte Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe, K = Kontrollgruppe ($p < 0.05$ = signifikant).

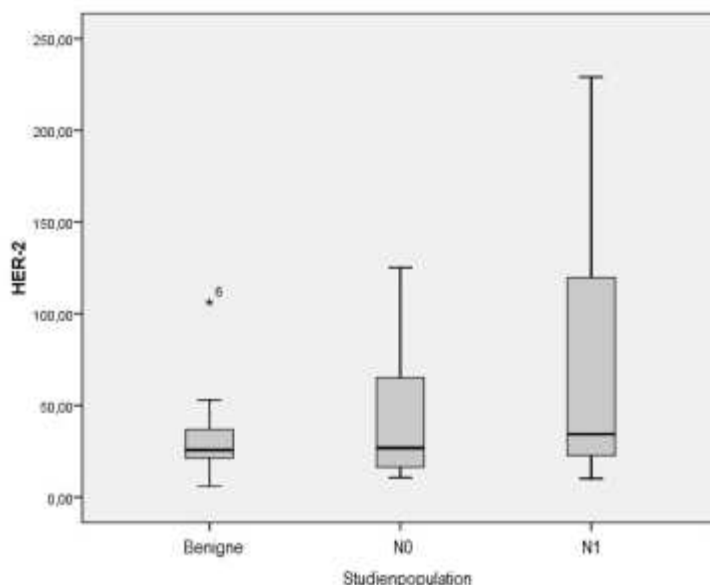
Abbildung 4: Konzentration von Annexin V+MP in der Studienpopulation



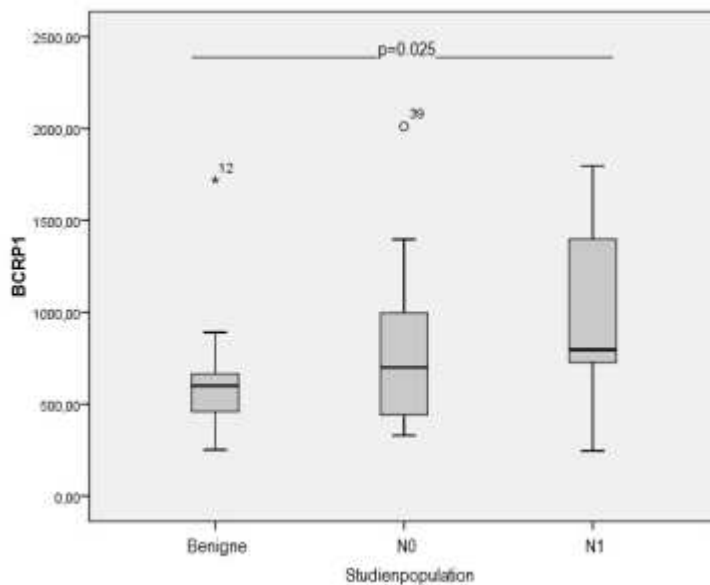
Legende Abbildung 4: Konzentration von Annexin V+MP ($\times 10^6/l$) (y-Achse) in der Studienpopulation (x-Achse), dargestellt als Boxplot. Daten präsentiert als Median und Interquartilsabstand ($p < 0.05$ = signifikant).

Abbildung 5: Konzentration von CD66+MP in der Studienpopulation

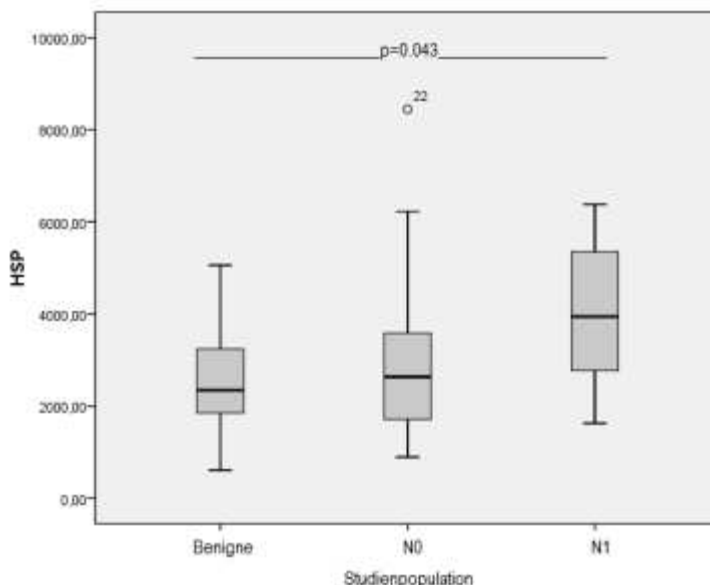
Legende Abbildung 5: Konzentration von CD66+MP ($\times 10^6/l$) (y-Achse) in der Studienpopulation (x-Achse), dargestellt als Boxplot. Daten präsentiert als Median und Interquartilsabstand. 38: Patientin mit CD66+MP-Konzentration oberhalb des Interquartilsabstandes ($p < 0.05 =$ signifikant).

Abbildung 6: Konzentration von Her-2/neu+MP in der Studienpopulation

Legende Abbildung 6: Konzentration von Her-2/neu+MP ($\times 10^6/l$) (y-Achse) in der Studienpopulation (x-Achse), dargestellt als Boxplot. Daten präsentiert als Median und Interquartilsabstand, 6: Patientin mit Her-2/neu+MP-Konzentration oberhalb des Interquartilsabstandes ($p < 0.05 =$ signifikant).

Abbildung 7: Konzentration von BCRP+MP in der Studienpopulation

Legende Abbildung 7: Konzentration von BCRP+MP ($\times 10^6/l$) (y-Achse) in der Studienpopulation (x-Achse), dargestellt als Boxplot. Daten präsentiert als Median und Interquartilsabstand, 12, 39: Patientinnen mit BCRP+MP-Konzentrationen oberhalb des Interquartilsabstandes ($p < 0.05 =$ signifikant).

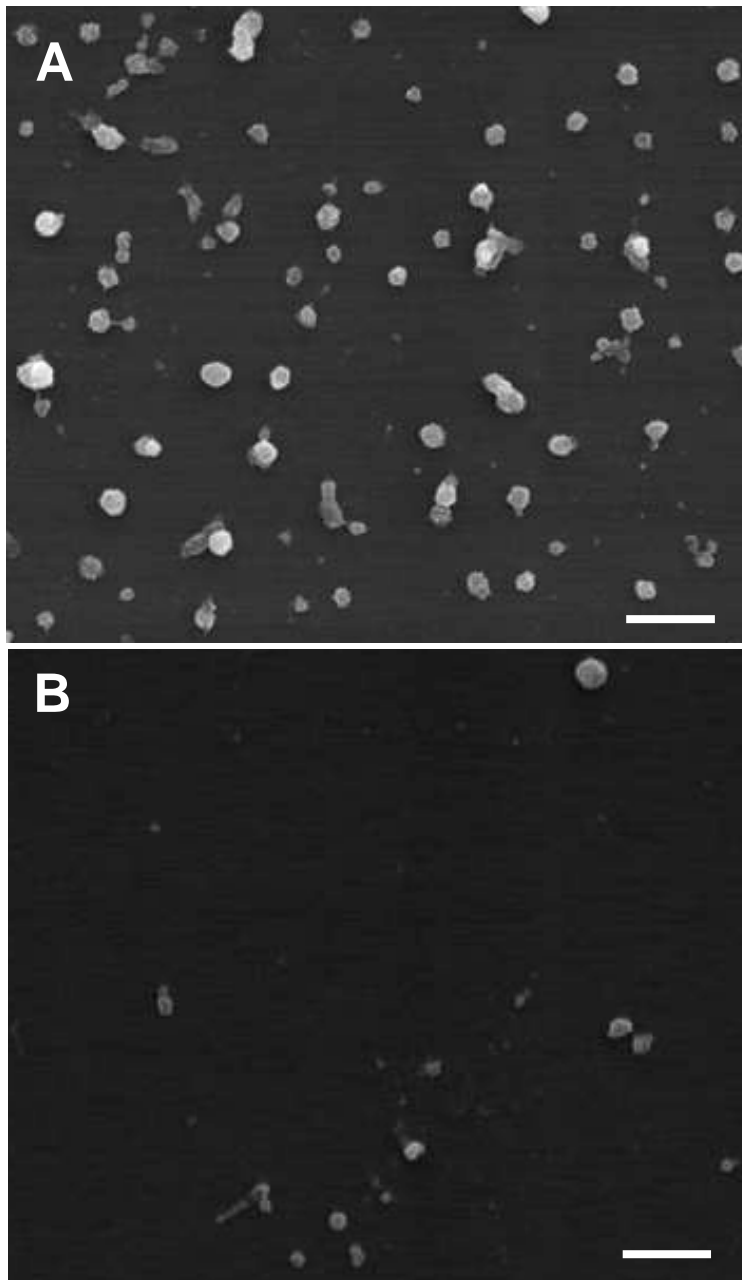
Abbildung 8: Konzentration von Hsp27+MP in der Studienpopulation

Legende Abbildung 8: Konzentration von Hsp27+MP ($\times 10^6/l$) (y-Achse) in der Studienpopulation (x-Achse), dargestellt als Boxplot. Daten präsentiert als Median und Interquartilsabstand, 22: Patientin mit Hsp27+MP-Konzentration oberhalb des Interquartilsabstandes ($p < 0.05 =$ signifikant).

3.3 Elektronenmikroskopie

In Zusammenarbeit mit der Abteilung für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie des Universitätsklinikums München, Großhadern (Prof. Dr. med. Armin J. Reiningger) gelang es, MP sowohl in der Studien- als auch in der Kontrollgruppe elektronenmikroskopisch darzustellen (s. Abbildung 9).

Mittels SEM war es möglich, die MP bezüglich Morphologie, Anzahl und Adhäsionseigenschaften zu untersuchen. Der Durchmesser der MP betrug 0,1-0,3 μm . Die MP-Konzentration der Mammakarzinompatientin war 3,5-fach höher im Vergleich zur Kontrolle (163 \pm 10,3 MP vs 47 \pm 6,5 MP pro Gesichtsfeld). Die Adhäsion der MP an immobilisierten vWF zeigte, dass die Rezeptoren funktionsfähig waren.

Abbildung 9: PMP in elektronenmikroskopischer Aufnahme

Legende Abbildung 9: A: Mammakarzinompatientin; B: Kontrolle. In A deutlich höhere MP-Konzentration als in B. Die Größenmarkierung zeigt die Länge 1 µm an.

3.4 Prothrombin Fragment, Thrombin generation Assay

Die Werte für PF 1+2 und die TGT sind in Tabelle 11 dargestellt. Patientinnen mit T2-Tumoren zeigten die höchsten PF-Konzentrationen und Frauen mit einer benignen Brustkrankung die niedrigsten. Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen T2-Patientinnen und Patientinnen mit einem Cis ($p = 0.036$) sowie zwischen T2-Patientinnen und Frauen mit einer benignen Brustkrankung ($p = 0.012$).

Die TGT variierte stark innerhalb der Studienpopulation, jedoch ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen. Bei den Patientinnen fanden sich unabhängig vom Tumorstadium niedrigere Werte im Vergleich zur Kontrolle.

Tabelle 11: Prothrombin Fragment, Thrombinbildungszeit

Parameter	benigne n=13	Cis n=8	T1 n=27	T2 n=16	M1 n=7
PF1+2 (pmol/l)	190.4±105.9 (83-417) ^b	201.0±71.8 (119-342) ^a	231.2±84.6 (120-388)	275.5±87.8 (167-479) ^{ab}	237.4±124.4 (99-441)
TGT (s)	160.3±16.6 (147-186)	138.5±19.1 (125-152)	136.4±18.3 (114-169)	138.1±20.2 (111-161)	137.5±16.3 (114-154)

Legende Tabelle 11: Prothrombin Fragment (PF1+2) und Thrombinbildungszeit (TGT) bei Patientinnen mit einer benignen Brustkrankung (benigne), Patientinnen mit Cis (Cis) und Mammakarzinompatientinnen in verschiedenen Tumorstadien (T1, T2, M1). Daten präsentiert als Mittelwert ± Standardabweichung (Minimum-Maximum), die Buchstaben a und b zeigen die Signifikanz zwischen den jeweiligen Gruppen an: a = Signifikanz zwischen Patientinnen mit T2-Tumor und Cis, b = Signifikanz zwischen Patientinnen mit T2-Tumor und Frauen mit einer benignen Brustkrankung ($p < 0.05 =$ signifikant).

3.5 Von Willebrand Faktor Antigen

Die Konzentration des vWF Ag unterschied sich nicht zwischen den Patientinnen und der Kontrollgruppe. Patientinnen im Stadium T2 und M1 wiesen jedoch signifikant höhere vWF Ag-Konzentrationen auf als Patientinnen im Stadium T1 ($p = 0.019$ bzw. $p = 0.001$). Zudem zeigten Patientinnen mit Fernmetastasen (M1) signifikant höhere Konzentrationen als die Kontrollgruppe ($p = 0.005$).

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Schilddrüsenfunktionsparameter

Die Schilddrüsenfunktionsparameter lagen für die Studien- und Kontrollgruppe weitgehend im Normbereich. Dennoch ergaben sich Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Mammakarzinompatientinnen wiesen signifikant höhere fT3- und fT4-Konzentrationen auf als Patientinnen mit einer benignen Brusterkrankung bzw. die Kontrollgruppe. Zudem waren bei den Mammakarzinompatientinnen die TRAK-Konzentrationen innerhalb des Gesamtkollektivs am höchsten mit einem signifikanten Unterschied zu Patientinnen mit einer benignen Brusterkrankung. Bei Mammakarzinompatientinnen fanden sich zudem die höchsten TPO AK- und die niedrigsten TG AK-Konzentrationen innerhalb der Studienpopulation.

Verschiedene Studien weisen auf eine erhöhte Mammakarzinom-Inzidenz bei Patientinnen mit Schilddrüsendysfunktion im Vergleich zu gesunden Kontrollen hin [24, 25, 74-76]. Zudem wurden Zusammenhänge zwischen Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse und dem Vorliegen eines Mammakarzinoms nachgewiesen [19, 75, 77]. Giani et al. konnten eine erhöhte Prävalenz von TPO AK und einer Autoimmun-Hypothyreose bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom und nicht-malignen Brusttumoren im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachweisen [19].

Bei den meisten dieser Studien erfolgte die Analyse der Schilddrüsenhormone jedoch nach einer chirurgischen oder neoadjuvanten Therapie. Dies erscheint umso mehr von Bedeutung, als das Immunsystem durch äußere Einflüsse wie Chemotherapie oder operative Eingriffe beeinflusst werden kann und dadurch Autoimmunerkrankungen möglicherweise ausgelöst oder verstärkt werden [23, 78-81]. Aus diesem Grund wurden in die vorliegende Studie nur Patientinnen mit neu diagnostiziertem Mammakarzinom vor einer operativen, Chemo- oder Strahlentherapie eingeschlossen.

In in-vitro-Modellen förderte eine Stimulation mit T3 dosisabhängig die Proliferation bestimmter Mammakarzinom-Zelllinien und induzierte die Expression von Progesteronrezeptoren [82, 83]. Im Mausmodell konnte die Brustentwicklung durch T4 induziert und durch Herbeiführen eines hypothyreoten Zustands gehemmt werden [84]. Dennoch finden sich auch widersprüchliche Ergebnisse bezüglich des Zusammenhangs zwischen Schilddrüsenfunktion und Mammakarzinomrisiko: Simon und Franceschi fanden keinen Zusammenhang zwischen einer Schilddrüsenerkrankung und der Entwicklung eines Mammakarzinoms [85, 86], wohingegen in einer Studie von Brinton et al. eine Hypothyreose mit leicht erniedrigtem und die Supplementierung von Schilddrüsenhormonen ohne Vorliegen einer Schilddrüsenerkrankung (zur Gewichtsreduktion und im Rahmen einer Fertilitätsbehandlung) mit einem leicht erhöhtem Mammakarzinomrisiko assoziiert war [87].

TSH ist der wichtigste Marker für die Diagnose einer Hypo- und Hyperthyreose, da bereits bei normalen fT3 und fT4-Konzentrationen erhöhte bzw. erniedrigte TSH-Werte eine latente Hypo- bzw. Hyperthyreose anzeigen können. Kuijpers et al. konnten keinen Unterschied zwischen Mammakarzinompatientinnen und der Kontrollgruppe bezüglich der TSH-Werte feststellen [34], wohingegen Limanova et al. und Jiskra et al. bei etwa 20% der Mammakarzinompatientinnen erhöhte TSH-Werte nachwiesen [20, 88]. In der vorliegenden Studie lagen 10% der TSH-Werte bei Mammakarzinompatientinnen unterhalb des Normbereichs. Ebenso fand sich bei den Mammakarzinompatientinnen anamnestisch häufiger eine medikamentös ausgeglichene Hypothyreose als bei Patientinnen mit einem Cis, einer benignen Brustkrankung und den Kontrollen. Durch eine Substitutionsbehandlung konnte bei den meisten dieser Patientinnen der TSH-Wert in den Normbereich verlagert werden.

Bei Mammakarzinompatientinnen fanden sich im Mittel die höchsten Konzentrationen an TRAK mit einem signifikanten Unterschied zu Frauen mit benignen Brustkrankungen, wobei nur zwei Mammakarzinompatientinnen pathologische TRAK-Werte aufwiesen. Zudem waren bei Mammakarzinompatientinnen die höchsten TPO AK- und die niedrigsten TG AK-Konzentrationen messbar.

Eine hohe Prävalenz von TPO AK beim Mammakarzinom ist mehrfach vorbeschrieben [19, 24, 75, 76].

Bisher wurden in Studien zum Thema Mammakarzinom und Schilddrüsendiffunktion keine Patientinnen mit einem Cis einbezogen. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich signifikant erhöhte fT3-Konzentrationen bei Patientinnen mit einem Cis im Vergleich zur Kontrollgruppe. Möglicherweise könnte sich hieraus ein therapeutischer Ansatz zur Progression eines Cis in einen invasiven Tumor ergeben. Insgesamt ist jedoch festzuhalten, dass es sich in unserer Studien- gruppe um ein kleines Patienten- und Kontrollkollektiv handelt, was möglicherweise erklärt, dass nur in Subgruppen signifikante Unterschiede sichtbar waren. Daher ist die Weiterführung der dargestellten Studienprotokolle an einem größeren Kollektiv geplant.

4.2 Diskussion der Hämostaseparameter

4.2.1 Mikropartikel

Die vorliegende prospektive Fall-Kontroll-Studie ist die erste Arbeit, die sich mit der Detektion möglicher tumorspezifischer Marker auf zirkulierenden MP im Serum von Mammakarzinompatientinnen und Frauen mit einer benignen Brust- erkrankung befasst. Die Gesamtzahl der MP sowie drei der vier gemessenen MP- Subpopulationen (CD66+ MP, BCRP+ MP und Hsp27+ MP) waren bei Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Von Tumorzellen freigesetzte MP tragen zu Wachstum und Metastasierung bei, somit spiegeln MP, die tumorassoziierte Marker exprimieren, möglicherweise die Aktivität der Erkrankung wider. Bislang gibt es nur wenige Untersuchungen zur MP-Expression bei Mammakarzinompatientinnen [39, 44, 45]. Dabei wurde die durchflusszytometrische Analyse von PMP, LMP und EMP bei Mammakarzinompatientinnen beschrieben [44, 45]. Die Gesamtkonzentration der MP sowie die Konzentration der PMP waren bei Patientinnen signifikant höher als in der Kontrollgruppe, stiegen außerdem mit wachsender Tumorgöße und waren

am höchsten bei Patientinnen mit Fernmetastasen [44]. Desweiteren fanden sich signifikante Unterschiede in der LMP-Konzentration zwischen Mammakarzinompatientinnen und der Kontrollgruppe, welche möglicherweise das Krankheitsstadium dieser Patientinnen widerspiegelt [45]. LMP wiesen ähnliche Sensitivitäts-Spezifitäts-Profile auf wie der etablierte Tumormarker CA15-3 [45].

MP exprimieren Oberflächenproteine ihrer Ursprungszellen [41]. Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, unter Verwendung von karzinom- und epithel-spezifischen Markern MP im Plasma von Mammakarzinompatientinnen und Frauen mit einer benignen Brustkrankung zu detektieren, die möglicherweise von Tumorzellen freigesetzt werden. Patientinnen mit einem T1-Tumor wiesen signifikant höhere Konzentrationen an Annexin V+MP, CD66+MP, BCRP+MP und Hsp27+MP auf als Frauen mit einem benignen Brusttumor. Bei nodalpositiven Patientinnen fanden sich die höchsten MP-Konzentrationen mit einem signifikanten Unterschied in der Konzentration an Annexin V+MP, CD66+MP, BCRP+MP und Hsp27+MP im Vergleich zu den Frauen mit einem benignen Brusttumor. Allerdings werden die verwendeten Marker nicht ausschließlich im Mammakarzinomgewebe, sondern zum Teil auch in gesundem Brustgewebe sowie in Karzinomen anderer Organe, wie z.B. Lunge, Ovar, Prostata, Leber und Pankreas exprimiert. Insbesondere eine erhöhte Expression von Hsp27 findet sich in verschiedenen Stress-Situationen, wie z.B. Hitze, oxidativem Stress oder Chemotherapie [68, 70], was den hohen Prozentsatz Hsp27+ MP an der Gesamtzahl der MP erklären könnte.

Bisher haben sich als prognostische Faktoren beim Mammakarzinom der axilläre Lymphknotenstatus, das Alter und die Tumorlast sowie verschiedene histologische Parameter etabliert [89]. Neue Marker sind der Urokinase-Typ plasminogen Aktivator (uPA) und sein Inhibitor (PAI-1), die zu Invasivität und Metastasierungspotential von Tumorzellen beitragen [90] sowie das Vorhandensein von Mikrometastasen im Knochenmark [91]. Die meisten der bislang etablierten prognostischen Parameter erfordern die Gewinnung von Tumorgewebe, Lymphknoten oder Knochenmark, also invasive Methoden. Die Detektion von Tumormarkern im peripheren Blut wäre somit von großem Wert für Patienten und Untersucher. Es wurden bereits Versuche unternommen, disseminierte

Tumorzellen mittels verschiedener Marker im peripheren Blut zu detektieren, darunter CEA und Her-2/neu [92]. Die vorliegenden Daten zeigen Unterschiede in der Konzentration zirkulierender MP, die diese Marker exprimieren, zwischen Patientinnen und Kontrollgruppe. Weitere Untersuchungen an einem größeren Studienkollektiv sind geplant, um die Wertigkeit von tumorspezifischen zirkulierenden MP als Prognosemarker bei Mammakarzinompatientinnen weiter zu erforschen. Dabei sollten künftige Untersuchungen zur MP-Konzentration bei Mammakarzinompatientinnen das Follow-up und die Überlebensraten der Patientinnen einschließen.

4.2.2 Prothrombin Fragment, Thrombin generation Assay

PMP sind prokoagulatorisch wirksam [93], daher wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl die TGT als auch PF 1+2 als Hinweis auf eine Verschiebung der Hämostase hin zu einer vermehrten Gerinnungsaktivität bestimmt. Die Konzentration von PF 1+2 war bei Patientinnen im Stadium T2 am höchsten mit signifikantem Unterschied im Vergleich zu Patientinnen mit einem Cis und Frauen mit einem benignen Tumor. Die TGT variierte stark innerhalb der Studienpopulation, wobei Patientinnen mit einem T1-Tumor die kürzeste und die Kontrollgruppe die längste TGT aufwies. Die Werte für die TGT in der Gruppe der Mammakarzinompatientinnen unterlagen im Gegensatz zu den anderen Subgruppen großen interindividuellen Schwankungen.

Villmow et al. fanden bei Patienten mit einem Myeloproliferativen Syndrom erhöhte PMP-Konzentrationen und vermuteten, dass diese MP eine katalytische Oberfläche für die Thrombinbildung bieten [94]. Um das koagulatorische Potential von (P)MP noch besser beurteilen zu können sind weitere Studien an einem größeren Kollektiv geplant.

4.2.3 Von Willebrand Faktor Antigen

Es zeigten sich signifikant erhöhte vWF-Konzentrationen bei Patientinnen im Stadium T2 und M1 im Vergleich zu Patientinnen im Stadium T1 bzw. bei M1-Patientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

In einer Studie von Röhsing et al. war die Konzentration an vWF Ag bei Mammakarzinompatientinnen sowohl im Vergleich zu Patientinnen mit einem benignen Brusttumor als auch im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht [48]. Erhöhte vWF-Konzentrationen korrelierten außerdem mit der Tumorprogression bei Mammakarzinompatientinnen [48]. Die Ergebnisse unserer Studie weisen ebenfalls auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines Mammakarzinoms und einer Endothelzellaktivierung hin, was jedoch anhand eines größeren Kollektivs im Rahmen weiterer Studien abgeklärt werden sollte.

5 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist mit über einer Million Neuerkrankungen jährlich weltweit der häufigste bösartige Tumor der Frau und hierzulande trotz verbesserter diagnostischer und therapeutischer Möglichkeiten die häufigste Krebstodesursache der Frau. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher verschiedene Aspekte des Krankheitsgeschehens beim Mammakarzinom beleuchtet:

1. Zusammenhang zwischen Schilddrüsenerkrankungen und Mammakarzinom
2. Gerinnungsparameter bei Patientinnen mit Mammakarzinom einschließlich der Untersuchung von MP, die tumorassoziierte Oberflächenmarker tragen.

Mammakarzinompatientinnen wiesen signifikant höhere fT3- und fT4- Konzentrationen auf als Patientinnen mit einer benignen Brustkrankung und als die Kontrollgruppe. Ebenso wurden bei Mammakarzinompatientinnen die höchsten TRAK-Konzentrationen nachgewiesen mit einem signifikantem Unterschied zu Patientinnen mit einer benignen Brustkrankung. Somit legen unsere Ergebnisse einen Zusammenhang zwischen einer Schilddrüsendysfunktion und der Entstehung eines Mammakarzinoms nahe.

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Konzentration an zirkulierenden MP bestimmt, welche die folgenden tumor-assoziierten Oberflächenmarker tragen: CD66, Her-2/neu, BCRP und Hsp27. Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen wiesen signifikant höhere Konzentrationen an MP, CD66+ MP, BCRP+ MP und Hsp27+ MP auf als die Kontrollgruppe. Zudem zeigten T1 Patientinnen signifikant höhere Konzentrationen an MP, CD66+ MP, BCRP+ MP und Hsp27+MP als die Kontrollgruppe. Es gelang uns, MP elektronenmikroskopisch darzustellen und hierbei deutlich höhere MP-Konzentrationen bei Mammakarzinompatientinnen im Vergleich zur Kontrolle nachzuweisen.

Um die Bedeutung der MP auf Wachstum und Metastasierungspotential beim Mammakarzinom zu spezifizieren, sind weitere Studien an einem größeren Patientenkollektiv geplant.

Zudem zeigten sich Hinweise auf ein mögliches (pro-)koagulatorisches Potential der zirkulierenden MP im TGA und in der Bestimmung von PF 1+2 insbesondere bei Patientinnen in fortgeschrittenen Tumorstadien.

6 Anhang

6.1 TNM-Einteilung für das Mammakarzinom

pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden	
pTis	Carcinoma in situ	
pT1	Tumor ≤ 2 cm in größter Ausdehnung	
	pT1mic	Mikroinvasion $\leq 0,1$ cm in größter Ausdehnung
	pT1a	Tumor $> 0,1$ cm und $\leq 0,5$ cm in größter Ausdehnung
	pT1b	Tumor $> 0,5$ und ≤ 1 cm in größter Ausdehnung
	pT1c	Tumor > 1 cm und ≤ 2 cm in größter Ausdehnung
pT2	Tumor > 2 cm und ≤ 5 cm in größter Ausdehnung	
pT3	Tumor > 5 cm in größter Ausdehnung	
pT4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut	
	pT4a	Ausdehnung auf Brustwand
	pT4b	mit Ödem, Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut der gleichen Brust
	pT4c	Kriterien pT4a und pT4b gemeinsam
	pT4d	entzündliches (inflammatorisches) Karzinom
pNX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden	
pN0	keine regionären Lymphknotenmetastasen	
pN1	pN1mi	Mikrometastase $> 0,2$ und ≤ 2 mm in maximaler Ausdehnung
	pN1a	Metastase(n) in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten, mindestens eine > 2 mm in maximaler Ausdehnung
	pN1b	Lymphknoten entlang A. mammaria interna mit mikroskopischen Metastasen, die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch erkennbar waren
	pN1c	Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und pN1b
pN2	pN2a	Metastase(n) in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten
	pN2b	Metastase(n) in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
pN3	pN3a	Metastase(n) in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang A. mammaria interna bei Vorliegen von mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase od. Metastasen in > 3 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang A. mammaria interna, nachgewiesen durch Sentinel Lymphknotendissektion, aber nicht klinisch erkennbar
		Metastase(n) in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei Vorliegen von mindestens 1 axillären Lymphknotenmetastase; oder Metastasen in mehr als 3 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, nachgewiesen durch Sentinel Lymphknotendissektion, aber nicht klinisch erkennbar
	pN3c	Metastase(n) in ipsilateralen supraclaviculären Lymphknoten
pMX	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden	
pM0	keine Fernmetastasen	
pM1	Fernmetastasen	

modifiziert nach [6]

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung	22
Abbildung 2: Merkmale des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts im Durchflusszytometer	22
Abbildung 3: fT4-Konzentrationen in der Studienpopulation	34
Abbildung 4: Konzentration von Annexin V+MP in der Studienpopulation	39
Abbildung 5: Konzentration von CD66+MP in der Studienpopulation	40
Abbildung 6: Konzentration von Her-2/neu+MP in der Studienpopulation.....	40
Abbildung 7: Konzentration von BCRP+MP in der Studienpopulation.....	41
Abbildung 8: Konzentration von Hsp27+MP in der Studienpopulation	41
Abbildung 9: PMP in elektronenmikroskopischer Aufnahme	43

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien	23
Tabelle 2: Reagenzien.....	25
Tabelle 3: Antikörper-Verdünnungen.....	25
Tabelle 4: Alter, fT4, fT3, TSH, TPO AK, TRAK, TG AK in der Studienpopulation.....	35
Tabelle 5: fT3-Werte innerhalb der Studienpopulation	36
Tabelle 6: fT4 Werte innerhalb der Studienpopulation.....	36
Tabelle 7: TRAK-Werte innerhalb der Studienpopulation	36
Tabelle 8: Patientenkollektiv MP-Messungen	37
Tabelle 9: Konzentration von Annexin V+MP, CD66+MP, Her-2/neu+MP, BCRP+MP und Hsp27+MP (x106/l) in der Studienpopulation.....	38
Tabelle 10: Konzentration von Annexin V+MP, CD66+MP, Her-2/neu+MP, BCRP+MP und Hsp27+MP (x106/l) in der Studienpopulation.....	39
Tabelle 11: Prothrombin Fragment, Thrombinbildungszeit.....	44

6.4 Einverständniserklärung

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

_____ **LMU**
 Ludwig _____
 Maximilians -
 Universität _____
 München _____

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 Mikropartikeln auf Wachstum und Metastasierungspotenzial bei Mamma-
karzinompatientinnen

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.

Anschrift: D-81377 München • Marchioninstraße 15 • Telefon (0 89) 70 95-0 (Vormittlung)
 Verkehrsverbindung: U6, 34, 67, 266, 268 oder 269 bis Haltestelle Klinikum Großhadern



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 (Tumorgröße, Beschaffenheit) über Sie erhoben, gespeichert und nur in verschlüsselter Form, d.h. weder Ihr Name, noch Ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode festgehalten. 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

Klinikum der Universität München
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und
Geburtshilfe – Großhadern
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Friese

LMU
Ludwig-Maximilians-
Universität
München

Dr. med. Bettina Toth

Tel. 7095-2843/ 6800
Tel. Zentrale 7095-0

Patienteninformation und Einverständniserklärung

Sehr geehrte Damen und Herren,

wir möchten Sie heute über eine Studie zur Erforschung des Einflusses von Schilddrüsenerkrankungen auf die Entwicklung von Brustkrebs informieren.

Der Titel dieser Studie lautet:

Schilddrüsenerkrankungen bei Mamma-Ca

Das Mammakarzinom ist weltweit der häufigste bösartige Tumor der Frau. In Deutschland erkrankt etwa jede zehnte Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom. Mögliche Ursachen sind genetische Prädisposition, Einfluss von Hormonen, Ernährung und körperlicher Aktivität.

Verschiedene Studien sprechen dafür dass Frauen mit Schilddrüsenfunktionsstörungen häufiger Brustkrebs entwickeln.

In der Frauenklinik Großhadern werden seit vielen Jahren Frauen mit Brustkrebs betreut. Gemeinsam mit der Klinischen Chemie, Med. Klinik II und der Pathologie soll der Zusammenhang zwischen Mammakarzinom und Schilddrüsenfunktionsstörungen untersucht werden.

Hierbei werden verschiedene Schilddrüsenerkrankungen untersucht: Struma, Schilddrüsenknoten, Über- und Unterfunktion sowie Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse.

Durch die Teilnahme an dieser Studie helfen Sie mit, den Einfluss von Schilddrüsenerkrankungen auf die Entwicklung von Brustkrebs weiter zu erforschen und damit möglicherweise neue Therapieansätze zu finden.

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über den Datenschutz und die ärztliche Schweigepflicht eingehalten. Es werden persönliche Daten (wie Alter, Größe, Gewicht) und Befunde (Tumorstadium, aktuelle und frühere Erkrankungen der Schilddrüse, Einnahme von Schilddrüsenmedikamenten) erhoben und auf Wunsch werden Ihnen die Ergebnisse der Schilddrüsenuntersuchung mitgeteilt. Anschließend werden die Daten gespeichert und irreversibel anonymisiert. Von den Blutproben bzw. den Daten kann dann nicht mehr auf Ihre Person rückgeschlossen werden. Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig.

In etwaigen Veröffentlichungen der Daten dieser Studie werden Sie aufgrund der irreversiblen Anonymisierung 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. Darin werden verschiedene Schilddrüsenparameter (Schilddrüsenhormone, Schilddrüsenautoantikörper) bestimmt. Ebenso führen wir eine Ultraschalluntersuchung Ihrer Schilddrüse durch. Wenn Sie es wünschen, werden wir Sie jederzeit über die Untersuchungsergebnisse informieren.

Sie erreichen uns unter folgender Telefonnummer:

Frau Dr. Toth: Frauenklinik Tel.: 7095-6820 Fax: 7095-6840

Doktorandin Susanne Liebhardt: Tel.: 0176/20190059

Ich erkläre hiemit, dass ich von _____ (Name der/des Ärztin/Arztes bzw. der 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.

**Über die datenschutzrechtlichen Vorgehensweisen wurde ich informiert und erteile
hierzu explizit meine Einwilligung.**

Ort, Datum, Unterschrift der Patientin

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

Ort, Datum, Unterschrift der Patientin

Ort, Datum, Unterschrift der/s aufklärenden Ärztin/Arztes/Doktorandin

7 Literaturverzeichnis

1. Bertz, J., et al., *Krebs in Deutschland 2003-2004*. 2008, Robert Koch Institut: Berlin.
2. Engel, J., et al., *Epidemiologie*, in *Manual Tumorzentrum München: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Mammakarzinome*, W. Janni, Editor. 2007. p. 1-11.
3. Santen, R.J., et al., *Critical assessment of new risk factors for breast cancer: considerations for development of an improved risk prediction model*. *Endocr Relat Cancer*, 2007. **14**(2): p. 169-87.
4. Key, T.J., *Serum oestradiol and breast cancer risk*. *Endocrine-Related Cancer*, 1999. **6**: p. 175-180.
5. Sarin, R., *A decade of discovery of BRCA1 and BRCA2: Are we turning the tide against hereditary breast cancer?* *J Can Res Ther*, 2006. **2**: p. 157-8.
6. Nährig, J., et al., *Pathologie des Mammakarzinoms*, in *Manual Tumorzentrum München: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Mammakarzinome*, W. Janni, Editor. 2007. p. 49-76.
7. Perlet, C., et al., *Mammographie-Screening, bildgebende und minimalinvasive Diagnostik*, in *Manual Tumorzentrum München: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Mammakarzinome* W. Janni, Editor. 2007. p. 12-29.
8. Pfeleiderer, A., et al., *Maligne Tumoren*, in *Gynäkologie und Geburtshilfe*, A. Pfeleiderer, M. Breckwoldt, and G. Martius, Editors. 2001, Georg Thieme Verlag: Stuttgart.
9. Sittek, H., et al., *[Minimally invasive surgical procedures of the breast: comparison of different biopsy systems in a breast parenchymal model]*. *Radiologe*, 2002. **42**(1): p. 6-10.
10. Funke, I., et al., *Operative Therapie des primären Mammakarzinoms und Rekonstruktionsverfahren*, in *Manual Tumorzentrum München: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Mammakarzinome*, 11. Auflage, W. Janni, Editor. 2007. p. 104-113.
11. Harbeck, N., et al., *Adjuvante Systemtherapie*, in *Manual Tumorzentrum München: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Mammakarzinome* W. Janni, Editor. 2007. p. 138-163.
12. Bauerfeind, I., et al., *Primär systemische Therapie*, in *Manual Tumorzentrum München: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Mammakarzinome* W. Janni, Editor. 2007. p. 128-137.
13. Rack, B., et al., *Prognostische und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom*, in *Manual Tumorzentrum München: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Mammakarzinome*, W. Janni, Editor. 2007. p. 85-91.
14. Seregini, E., et al., *Circulating tumour markers in breast cancer*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2004. **31 Suppl 1**: p. S15-22.
15. Cheung, K.L., et al., *Tumour marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer*. *Cancer Treat Rev*, 2000. **26**(2): p. 91-102.

16. Ebeling, F.G., et al., *Serum CEA and CA 15-3 as prognostic factors in primary breast cancer*. Br J Cancer, 2002. **86**(8): p. 1217-22.
17. Ebeling, F.C., et al., *Tumour markers CEA and CA 15-3 as Prognostic factors in breast cancer--univariate and multivariate analysis*. Anticancer Res, 1999. **19**(4A): p. 2545-50.
18. Sliwowska, I., et al., *Diagnostic value of measuring serum CA 15-3, TPA, and TPS in women with breast cancer*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2006. **60**: p. 295-9.
19. Giani, C., et al., *Relationship between Breast Cancer and Thyroid Disease: Relevance of Autoimmune Thyroid Disorders in Breast Malignancy*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1996. **81**(3): p. 990-994.
20. Jiskra, J., et al., *Autoimmune Thyroid Diseases in Women with Breast Cancer and Colorectal Cancer*. Physiol. Res. , 2004. **53**: p. 693-702.
21. Gogas, J., et al., *Autoimmune thyroid disease in women with breast carcinoma*. European Journal of Surgical Oncology, 2001. **27**: p. 626-630.
22. Saraiva, P.P., et al., *Profile of thyroid hormones in breast cancer patients*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2005. **38**: p. 761-765.
23. Giustarini, E., et al., *Thyroid autoimmunity in patients with malignant and benign breast diseases before surgery*. European Journal of Endocrinology, 2006. **154**: p. 645-649.
24. Rasmusson, B., et al., *Thyroid function in patients with breast cancer*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1987. **23**(5): p. 553-6.
25. Shering, S., et al., *Thyroid disorders and breast cancer*. Eur J Cancer Prev, 1996. **5**(6): p. 504-6.
26. Smyth, P.P., et al., *A direct relationship between thyroid enlargement and breast cancer*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(3): p. 937-41.
27. Smyth, P., *Thyroid disease and breast cancer*. J Endocrinol Invest, 1993. **16**(5): p. 396-401.
28. Park, J.S., et al., *Sonographic Detection of Thyroid Cancer in Breast Cancer Patients*. Yonsei Medical Journal, 2007. **48**(1): p. 63-68.
29. Cengiz, Ö., et al., *The Relationship Between Prognostic Factors of Breast Cancer and Thyroid Disorders in Turkish Women*. Journal of Surgical Oncology, 2004. **87**: p. 19-25.
30. Lemaire, M. and L. Bagniet-Mahieu, *Thyroid function in women with breast cancer*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1986. **22**(3): p. 301-7.
31. Perry, M., et al., *Thyroid function in patients with breast cancer*. Ann R Coll Surg Engl, 1978. **60**(4): p. 290-3.
32. Thomas, B.S., et al., *Thyroid function in early breast cancer*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1983. **19**(9): p. 1213-9.
33. Thomas, B.S., *Thyroid Function and Breast Cancer*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1986. **22**(12): p. 1541-1542.
34. Kuijpers, J., et al., *Hypothyroidism might be related to breast cancer in post-menopausal women*. Thyroid, 2005. **15**(11): p. 1253-9.
35. Talamini, R., et al., *Selected medical conditions and risk of breast cancer*. Br. J. Cancer, 1997. **75**(11): p. 1699-703.
36. Cristofanilli, M., et al., *Thyroid Hormone and Breast Carcinoma*. Cancer, 2005. **103**(6): p. 1122-8.

37. Nijziel, M.R., et al., *From Trousseau to angiogenesis: the link between the haemostatic system and cancer*. Neth J Med, 2006. **64**(11): p. 403-10.
38. Franchini, M., et al., *Pathogenesis, clinical and laboratory aspects of thrombosis in cancer*. J Thromb Thrombolysis, 2007. **24**(1): p. 29-38.
39. Tesselaar, M.E., et al., *Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis?* J Thromb Haemost, 2007. **5**(3): p. 520-7.
40. Winter, P.C., *The pathogenesis of venous thromboembolism in cancer: emerging links with tumour biology*. Hematol Oncol, 2006. **24**(3): p. 126-33.
41. Martínez, M.C., et al., *Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**: p. 1004-1009.
42. Mostefai, H.A., et al., *Plasma membrane microparticles in angiogenesis: role in ischemic diseases and in cancer*. Physiol Res, 2008. **57**(3): p. 311-20.
43. VanWijk, M.J., et al., *Microparticles in cardiovascular diseases*. Cardiovasc Res, 2003. **59**(2): p. 277-87.
44. Toth, B., et al., *Platelet-derived microparticles and coagulation activation in breast cancer patients*. Thromb Haemost, 2008. **100**(4): p. 663-9.
45. Toth, B., et al., *Circulating microparticles in breast cancer patients: a comparative analysis with established biomarkers*. Anticancer Res, 2008. **28**(2A): p. 1107-12.
46. Reininger, A.J., *VWF attributes--impact on thrombus formation*. Thromb Res, 2008. **122 Suppl 4**: p. S9-13.
47. De Meyer, S.F., et al., *von Willebrand factor to the rescue*. Blood, 2009. **113**(21): p. 5049-57.
48. Rohsig, L.M., et al., *von Willebrand factor antigen levels in plasma of patients with malignant breast disease*. Braz J Med Biol Res, 2001. **34**(9): p. 1125-9.
49. Blann, A.D., et al., *Increased soluble P-selectin in patients with haematological and breast cancer: a comparison with fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and von Willebrand factor*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2001. **12**(1): p. 43-50.
50. Sack, U., et al., *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendung der Durchflusszytometrie*. 2007, Basel. 27-70.
51. *Einführung in die Durchflusszytometrie: Trainingsvorbereitung*. 2005, Becton Dickinson GmbH.
52. Berckmans, R.J., et al., *Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation*. Thromb Haemost, 2001. **85**(4): p. 639-46.
53. Dachary-Prigent, J., et al., *Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups*. Blood, 1993. **81**(10): p. 2554-65.
54. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. J Immunol Methods, 1995. **184**(1): p. 39-51.

55. Papadea, C. and I.J. Check, *Human immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses: biochemical, genetic, and clinical aspects*. Crit Rev Clin Lab Sci, 1989. **27**(1): p. 27-58.
56. Shih, C., et al., *Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts*. Nature, 1981. **290**: p. 261-4.
57. Coussens, L., et al., *Tyrosine Kinase Receptor with Extensive Homology to EGF Receptor Shares Chromosomal Location with neu Oncogene*. Science, 1985. **230**: p. 1132-9.
58. Kaptain, S., L.K. Tan, and B. Chen, *Her-2/neu and Breast Cancer*. Diagnostic Molecular Pathology, 2001. **10**(3): p. 139-152.
59. Reese, D.M. and D.J. Slamon, *HER-2/neu Signal Transduction in Human Breast and Ovarian Cancer*. Stem Cells, 1997. **15**: p. 1-8.
60. Earp, H.S., et al., *Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: A new signaling paradigm with implications for breast cancer research*. Breast Cancer Research and Treatment, 1995. **35**: p. 115-132.
61. Tzahar, E., et al., *A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor*. Mol Cell Biol, 1996. **16**: p. 5276-87.
62. Pauletti, G., et al., *Detection and quantification of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization*. Oncogene, 1996. **13**: p. 63-72.
63. Slamon, D.J., et al., *Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/neu Oncogene*. Science, 1987. **235**: p. 177-182.
64. Perez-Tomas, R., *Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment*. Curr Med Chem, 2006. **13**(16): p. 1859-76.
65. Ishikawa, T., et al., *Transport mechanism-based drug molecular design: novel camptothecin analogues to circumvent ABCG2-associated drug resistance of human tumor cells*. Curr Pharm Des, 2006. **12**(3): p. 313-25.
66. Ejendal, K.F. and C.A. Hrycyna, *Multidrug resistance and cancer: the role of the human ABC transporter ABCG2*. Curr Protein Pept Sci, 2002. **3**(5): p. 503-11.
67. Diestra, J.E., et al., *Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material*. J Pathol, 2002. **198**(2): p. 213-9.
68. Concannon, C.G., A.M. Gorman, and A. Samali, *On the role of Hsp27 in regulating apoptosis*. Apoptosis, 2003. **8**(1): p. 61-70.
69. Garrido, C., et al., *HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors*. Cell Cycle, 2003. **2**(6): p. 579-84.
70. Schmitt, E., et al., *Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(1): p. 15-27.
71. Arrigo, A.P., et al., *Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets*. FEBS Lett, 2007. **581**(19): p. 3665-74.
72. Egawa, K., et al., *The carcinoembryonic antigen (CEA) family (CD66) expressed in melanocytic naevi is not expressed in blue naevus cell naevi in dendritic type*. J Cutan Pathol, 2000. **27**(7): p. 351-8.

73. Stearns, V., H. Yamauchi, and D.F. Hayes, *Circulating tumor markers in breast cancer: accepted utilities and novel prospects*. Breast Cancer Res Treat, 1998. **52**(1-3): p. 239-59.
74. Schernhammer, E.S., et al., *Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(20): p. 1563-8.
75. Smyth, P.P., et al., *Serum thyroid peroxidase autoantibodies, thyroid volume, and outcome in breast carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(8): p. 2711-6.
76. Turken, O., et al., *Breast cancer in association with thyroid disorders*. Breast Cancer Res, 2003. **5**(5): p. R110-3.
77. Fierabracci, P., et al., *Absence of interference of serum IgGs from patients with breast cancer and thyroid autoimmunity on the function of human iodide symporter gene stably transfected in CHO cells*. J Endocrinol Invest, 2004. **27**(9): p. 862-5.
78. Barbesino, G. and L. Chiovato, *The genetics of Hashimoto's disease*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2000. **29**(2): p. 357-74.
79. Dayan, C.M. and G.H. Daniels, *Chronic autoimmune thyroiditis*. N Engl J Med, 1996. **335**(2): p. 99-107.
80. Forsen, T., et al., *Growth in utero and during childhood among women who develop coronary heart disease: longitudinal study*. Bmj, 1999. **319**(7222): p. 1403-7.
81. Strieder, T.G., et al., *Risk factors for and prevalence of thyroid disorders in a cross-sectional study among healthy female relatives of patients with autoimmune thyroid disease*. Clin Endocrinol (Oxf), 2003. **59**(3): p. 396-401.
82. Dinda, S., A. Sanchez, and V. Moudgil, *Estrogen-like effects of thyroid hormone on the regulation of tumor suppressor proteins, p53 and retinoblastoma, in breast cancer cells*. Oncogene, 2002. **21**(5): p. 761-8.
83. Nogueira, C.R. and M.M. Brentani, *Triiodothyronine mimics the effects of estrogen in breast cancer cell lines*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1996. **59**(3-4): p. 271-9.
84. Vonderhaar, B.K. and A.E. Greco, *Lobulo-alveolar development of mouse mammary glands is regulated by thyroid hormones*. Endocrinology, 1979. **104**(2): p. 409-18.
85. Simon, M.S., et al., *Do thyroid disorders increase the risk of breast cancer?* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2002. **11**(12): p. 1574-8.
86. Franceschi, S., et al., *Breast cancer risk and history of selected medical conditions linked with female hormones*. Eur J Cancer, 1990. **26**(7): p. 781-5.
87. Brinton, L.A., et al., *Relationship of thyroid disease and use of thyroid supplements to breast cancer risk*. J Chronic Dis, 1984. **37**(12): p. 877-93.
88. Limanova, Z., J. Barkmanova, and Z. Friedmanova, *[Frequent incidence of thyropathies in women with breast carcinoma]*. Vnitr Lek, 1998. **44**(2): p. 76-82.
89. Engel, J., et al., *The process of metastatisation for breast cancer*. Eur J Cancer, 2003. **39**(12): p. 1794-806.

-
90. Look, M.P., et al., *Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(2): p. 116-28.
 91. Braun, S., et al., *A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(8): p. 793-802.
 92. Gilbey, A.M., et al., *The detection of circulating breast cancer cells in blood*. J Clin Pathol, 2004. **57**(9): p. 903-11.
 93. Reininger, A.J., et al., *Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3537-45.
 94. Villmow, T., B. Kemkes-Matthes, and A.C. Matzdorff, *Markers of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in patients with myeloproliferative syndromes*. Thromb Res, 2002. **108**(2-3): p. 139-45.

8 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Bettina Toth für die Überlassung des Themas und die herausragende Betreuung, die Unterstützung, Förderung und Ermutigung während der gesamten Promotion.

Ganz herzlich danken möchte ich auch Frau Dr. Nina Ditsch für ihre Hilfe bei der Probengewinnung und Herrn Dr. Andreas Rank für die Unterstützung bei technischen Fragen.

Vielen Dank an die Ärzte und das Schwesternteam der Frauenklinik Großhadern und sowie des Instituts für Klinische Radiologie für die Unterstützung bei der Patientenrekrutierung.

Weiterhin danke ich den MitarbeiterInnen des Forschungslabors der Frauenklinik Großhadern, vor allem Frau Marianne Vogel und Frau Andrea Peichl, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Bedanken möchte ich mich bei meinen Mit-Doktorandinnen Kerstin Steinig und Julia Zwirner für die Hilfe bei der Probengewinnung und bei den Messungen.

Herzlichen Dank natürlich an alle Patientinnen, die mir ihre Zeit und ihr Blut zur Verfügung gestellt und damit diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Vor allem möchte ich mich bei meiner Familie bedanken:

bei meinen lieben Eltern für ihre Förderung und Unterstützung in jedweder Hinsicht während meiner Ausbildung und den Rückhalt in jeder Lebenslage

bei meinem Partner Mathias für die Durchsicht meiner Arbeit, die Hilfe bei technischen Schwierigkeiten, die Unterstützung und nahezu grenzenlose Geduld.

Danke

9 Publikationen

Originalarbeiten

Toth B., **Liebhardt S.**, Steinig K., Ditsch N., Rank A., Bauerfeind I., Spannagl M., Friese K., Reiningger AJ.

Platelet-derived microparticles and coagulation activation in breast cancer patients

Thromb Haemost. 2008 Oct;100(4):663-9

Toth B., Nieuwland R., **Liebhardt S.**, Ditsch N., Steinig K., Stieber P., Rank A., Göhring P., Thaler CJ., Friese K., Bauerfeind I.

Circulating microparticles in breast cancer patients: a comparative analysis with established biomarkers

Anticancer Res. 2008 Mar-Apr;28(2A):1107-12

Liebhardt S., Ditsch N., Nieuwland R., Rank A., Jeschke U., von. Koch F., Friese K., Toth B.

CEA-, Her-2/neu-, BCRP- and Hsp27- positive microparticles in breast cancer patients

Anticancer Res. 2010 May;30(5):1707-12.

Ditsch N., **Liebhardt S.**, von. Koch F., Lenhard M., Vogeser M., Spitzweg C., Gallwas J., Toth B.

Thyroid function in breast cancer patients

Anticancer Res. 2010 May;30(5):1713-7.

Rank A., Nieuwland R., **Liebhardt S.**, Iberer M., Grützner S., Toth B., Pihusch R.

Apheresis platelet concentrates contain platelet derived and endothelial cell derived microparticles

Vox Sanguinis, in press

Abstracts

Liebhardt S., Toth B., Ditsch N., Thaler C.J., Bauerfeind I., Friese K.
Zirkulierende Mikropartikel als Biomarker bei Brustkrebspatientinnen
Geburtshilfe Frauenheilkunde, 2008, 68, Mai, 554

Liebhardt S., Ditsch N., Göhring P., Friese K., Bauerfeind I., Toth B.
Mikropartikel als möglicher Biomarker bei Patientinnen mit Mammakarzinom
Geburtshilfe Frauenheilkunde, 2008, 68, September, S103

Toth B., **Liebhardt S.**, Ditsch N., Reiningger A., Friese K., Bauerfeind I.
Einfluss von Plättchen-Mikropartikeln auf die Gerinnungsaktivität bei Patientinnen mit Mammakarzinom
Geburtshilfe Frauenheilkunde, 2008, 68, September, S172

Liebhardt S., Ditsch N., Rank A., von Koch F., Friese K., Toth B.
CEA-, Her-2/neu-, BCRP- und Hsp27- positive Mikropartikel bei Brustkrebspatientinnen
Geburtshilfe Frauenheilkunde, 2009; 69, Mai, 469

Vorträge und Poster

Kongress der Bayerischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Frauenheilkunde, Augsburg, 2008

Zirkulierende Mikropartikel als Biomarker bei Brustkrebspatientinnen
(Vortrag)
Doktorandenförderpreis

Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, 2008

Zirkulierende Mikropartikel als Biomarker bei Brustkrebspatientinnen
(Poster)

Tumormarkersymposium, Hamburg, 2008

CEA-, Her-2/neu-, BCRP- and Hsp27-positive microparticles in breast cancer patients
(Vortrag)

Kongress der Österreichischen und Bayerischen Gesellschaft für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Wien, 2009

CEA-, Her-2/neu-, BCRP- und Hsp27- positive Mikropartikel bei Brustkrebspatientinnen
(Poster)