

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

Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Frieze

Einfluss zirkulierender Mikropartikel auf  
Wachstum, Metastasierungspotential und Gerinnungsaktivität bei Patientinnen mit  
Ovarialkarzinom

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
Julia Gärth  
aus München

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Bettina Toth
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Gerlinde Debus Prof. Dr. med. Eva-Maria Grischke
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Andreas Rank
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	14.11.2013

*Widmung*  
*meiner Schwester Christine*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1	Ovarialkarzinom .....	8
1.1.1	Epidemiologie.....	8
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese .....	8
1.1.3	Klassifikation.....	9
1.1.4	Diagnostik und Staging.....	10
1.1.5	Therapie .....	10
1.1.6	Prognose und Prognosefaktoren .....	11
1.1.7	Tumormarker .....	12
1.2	Zirkulierende Mikropartikel .....	13
1.2.1	Definition und Kennzeichen .....	13
1.2.2	Entstehungsmechanismus .....	14
1.2.3	Funktionen .....	15
1.3	Hämostase bei Krebserkrankungen .....	17
1.4	Zielsetzung .....	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
2.1	Patientenkollektiv .....	19
2.2	Probengewinnung .....	20
2.3	Durchflusszytometrie .....	20
2.3.1	Technik der Durchflusszytometrie.....	20
2.3.2	Grundlösungen.....	22
2.3.3	Arbeitslösungen .....	23
2.3.4	Verfahren .....	23
2.3.5	Spezifische Antikörper .....	25
2.3.5.1	<i>Annexin V</i> .....	25
2.3.5.2	<i>Immunglobulin G1</i> .....	25
2.3.5.3	<i>Anti-CD61-PE</i> .....	26
2.3.5.4	<i>Anti-CD63-PE</i> .....	26
2.3.5.5	<i>Anti-CD142-PE</i> .....	26
2.3.5.6	<i>Anti-EpCAM-PE</i> .....	27
2.3.5.7	<i>Anti-CD144-FITC</i> .....	28
2.4	Gerinnungsaktivität .....	28
2.5	Statistik.....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
3.1	Patientenkollektiv .....	30
3.2	Mikropartikel.....	32
3.2.1	MP-Konzentrationen im Studienkollektiv .....	32

3.2.2	MP-Konzentrationen in Abhängigkeit vom Tumorstadium .....	35
3.2.3	MP-Konzentrationen prä- und postoperativ .....	40
3.2.4	Sensitivitäts- und Spezifitätsunterschiede zu CA125 und CA72-4 .....	41
3.2.5	Assoziation zwischen MP und D-Dimeren.....	42
3.2.5.1	<i>D-Dimere im Studienkollektiv</i> .....	42
3.2.5.2	<i>D-Dimere in Abhängigkeit vom Tumorstadium</i> .....	44
3.2.5.3	<i>D-Dimere in Vergleich zwischen prä- und postoperativ</i> .....	44
3.2.5.4	<i>Korrelation der MP-Subpopulationen mit der D-Dimer-Konzentration bei den malignen Ovarialtumoren</i> .....	45
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>64</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	64
7.2	Tabellenverzeichnis.....	64
7.3	WHO-Klassifikation der Ovarialkarzinome 2003.....	65
7.4	Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms nach FIGO-Kriterien .....	65
7.5	Einverständniserklärung der Probandinnen .....	66
7.6	Publikation .....	68
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>700</b>

## Alphabetisches Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AnV	Annexin V
APC	Allophycocyanin
ASS	Azetylsalizylsäure
AUC	Area Under The Curve (Fläche unter der Kurve)
BRCA	Breast Cancer Antigen (Brustkrebsantigen)
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein (Brustkrebsresistenzprotein)
BMI	Body Mass Index (Körpermasseindex)
BRCA	Breast Cancer Antigen (Brustkrebsantigen)
BRAF	B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma (B-schnell vermehrtes Fibrosarkom)
CA	Cancer Antigen (Krebsantigen)
CAM	Cell Adhesion Molecule (Zelladhäsionsmolekül)
CapZ	Capping Protein Z
CD	Cluster of Differentiation (Differenzierungsgruppe)
CEA	Carcinoembryonic Antigen (Karzinoembryonales Antigen)
dl	Deziliter
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Endothelial Growth Factor (Endothelialer Wachstumsfaktor)
EMP	Endotheliale Mikropartikel
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule (Epitheliales Zelladhäsionsmolekül)
et al.	et alii (und andere)
F	Faktor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung)
FasL	Fas-Ligand
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
G	Gauge, Grading
G/l	Giga pro Liter
g	Gramm, Erdschwerebeschleunigung
GP, gp	Glykoprotein
HE	Hysterektomie
HIPEC	Hypertherme Intraperitoneale Chemoperfusion
Hsp	Heat shock protein (Hitzeschockprotein)
i.d.R.	in der Regel
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
K-Ras	Kirsten Rat Sarcoma
l	Liter
LMP	Low Malignant Potential (gering bösartiges Potential), Leukozytäre Mikropartikel
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MAC	Membrane Attack Complex
MHC	Major Histocompatibility Complex
miRNA	micro Ribonucleic Acid (Mikro-Ribonukleinsäure)
ml	Milliliter
MLH1	MutL-homologes Protein 1
MMP	Matrixmetalloproteinase
MP	Mikropartikel

mRNA	messenger Ribonucleic Acid (Boten-Ribonukleinsäure)
MSH2	MutS-homologes Protein 2
MUC	Mucin
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OP	Operation
p	p-Wert
PBS	Phosphat-gepuffertes Salin
PCO	Polycystisches Ovar
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatylethanolamin
pH	potentia hydrogenii (Stärke des Wasserstoffs)
PL	Phospholipid
PMP	Platelet-derived Microparticles (Thrombozytäre Mikropartikel)
PS	Phosphatidylserin
PSGL- 1	P-Selektin Glycoprotein Ligand-1
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome 10 (Phosphatase und Tensin Homolog, das auf Chromosom 10 entdeckt wurde)
R	Resektion
r	Korrelationskoeffizient nach Spearman
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and presumably Secreted (Reguliert durch Aktivierung, normalerweise T-Zell-exprimiert und vermutlich sezerniert)
ROC-Kurve	Receiver Operating Characteristic-Kurve (Grenzwertoptimierungskurve)
ROCK	Rho-assoziierte Kinase
R-PE	R-Phycoerythrin
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
SSC	Sideward Scatter (Seitwärtsstreulicht)
TF	Tissue Factor (Gewebefaktor)
TMP	Tumor-derived Microparticle (Mikropartikel, die Tumorzellen entstammen)
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	T = tumor, N = node, M = metastasis
TP	Tumorprotein
u.a.	unter anderem
U/l	Units pro Liter
uPA	Plasminogen Aktivator vom Urokinase Typ
v.a.	vor allem
VE	Vascular endothelium (Gefäßendothel)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
vWF	von Willebrand Faktor
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach

# 1 Einleitung

## 1.1 Ovarialkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom ist die fünfthäufigste Tumorart und die fünfthäufigste tumorbezogene Todesursache der Frau [1]. Die Inzidenz beträgt 15/100.000/Jahr [2]. Etwa 23.000 Frauen erkranken jedes Jahr neu am Ovarialkarzinom, 14.000 Frauen sterben jedes Jahr an den Folgen dieser Krebserkrankung [1].

Bezüglich der Häufigkeit des Ovarialkarzinoms existieren sowohl ethnische als auch geographische Unterschiede. Nordeuropa, die USA und Israel haben die höchsten Inzidenzen, während Japan und die Entwicklungsländer die niedrigste Inzidenz aufweisen [3].

Die meisten Ovarialkarzinome treten sporadisch auf. Im Gegensatz dazu sind 5-10% aller Fälle familiär bedingt, meist als Folge einer Mutation der Tumorsuppressorgene Breast Cancer Antigen (BRCA) 1 oder 2 [4].

Das Ovarialkarzinom ist vor allem eine Erkrankung der peri- und postmenopausalen Frau. Etwa 80-90% der Patientinnen sind über 40 Jahre alt [4], der Erkrankungsgipfel liegt beim 60. Lebensjahr [5]. Erbliche Ovarialkarzinome treten im Mittel ca. 10 Jahre früher auf [6].

### 1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie des Ovarialkarzinoms ist weitgehend unklar. Eine multifaktorielle Genese ist wahrscheinlich [4]. Nach M. F. Fathalla ist die Anzahl der Ovulationen mit repetitivem Aufbrechen und anschließender Reparatur des ovariellen Oberflächenepithels mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für spontane Mutationen und damit einem erhöhten Karzinomrisiko assoziiert [7]. Einer anderen Theorie zufolge spielen eine exzessive Gonadotropinstimulation der Ovarien und / oder erhöhte Androgenlevel für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms eine Rolle [8]. Parmley und Woodruff stellten 1974 die Theorie auf, dass das epitheliale Ovarialkarzinom durch eine Transformation des Oberflächenepithels entsteht, wenn es von Fremdstoffen kontaminiert wird oder Karzinogenen ausgesetzt ist [9].



Der bedeutendste Risikofaktor für das Auftreten eines Ovarialkarzinoms ist eine positive Familienanamnese [4]. Weitere Risikofaktoren sind Infertilität [10] bzw. insbesondere Nulliparität [11] (die Schwangerschaft ist der ausschlaggebende Faktor [4]) und eine späte Menopause (Anzahl der Ovulationen im Leben einer Frau) [12]. Mit einem z.T. nur schwach erhöhten Ovarialkarzinomrisiko gehen u.a. Nikotinkonsum [13], der BMI [14], eine abgelaufene pelvine entzündliche Erkrankung [15] und das Polyzystische Ovarialsyndrom (PCO-Syndrom) [16] einher. Protektive Faktoren sind Multiparität (16-22%ige Risikoreduktion pro Geburt) [17, 18, 19], die Einnahme oraler Kontrazeptiva in Abhängigkeit von der Einnahmedauer [20, 21], eine Tubenligatur und eine Hysterektomie (ca. 67%ige Risikoreduktion) [22, 23].

Auch bezüglich der Pathogenese des Ovarialkarzinoms gibt es kontroverse Meinungen. In der ursprünglichen Theorie entsteht das Karzinom im Ovar und streut ins Becken und Abdomen, bevor es Lymphknoten- und Fernmetastasen bildet [24]. In einer anderen werden die Ovarialkarzinome in zwei Typen eingeteilt. Tumoren vom Typ 1 sind auf das Ovar beschränkt und entwickeln sich aus Vorläuferläsionen. Sie sind genetisch stabil und charakterisiert durch eine Reihe von Mutationen in verschiedenen Genen, einschließlich K-ras, BRAF, PTEN und  $\beta$ -Catenin. Tumoren vom Typ 2 sind sehr aggressiv, entwickeln sich nicht aus Vorläuferläsionen und sind nur selten auf das Ovar beschränkt. Sie weisen eine hohe genetische Instabilität auf und sind charakterisiert durch TP53-Mutationen. Sie streuen schnell oder aber sie entwickeln sich außerhalb des Ovars und involvieren dieses erst sekundär [24].

### 1.1.3 Klassifikation

Unter dem Begriff „Ovarialkarzinom“ fasst man eine heterogene Gruppe unterschiedlicher Tumorarten zusammen, die sich hinsichtlich ihres Ursprungsgewebes unterscheiden. Die histologische Einteilung in die verschiedenen Subtypen erfolgt gemäß der WHO-Klassifikation von 2003 (s. Kapitel 7.3). Eine Sonderform der epithelialen Ovarialkarzinome und – gemäß der Internationalen Vereinigung für Gynäkologie und Geburtshilfe - eigene Entität [25] stellen die Boderline-Tumoren oder Low Malignant Potential- (LMP-) Tumoren dar, die 10-20% der epithelialen Ovarialkarzinome ausmachen [26]. Sie erfüllen die histologischen Malignitätskriterien, haben aber eine deutlich bessere Prognose. Makroskopisch manifestieren sie sich häufig mit einer Peritonealkarzinose, die bei histologischer Aufbereitung aber nicht alle Kriterien einer Tumordinvasion erfüllt. Es zeigt sich weder eine stromale Invasion, noch ein aggressives Metastasierungspotential [27].

#### 1.1.4 Diagnostik und Staging

Das Ovarialkarzinom wird oft erst spät und in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, da das Abdomen dem Tumor ausreichend Platz bietet, um sich ungestört auszubreiten [28]. Es kommt zu einer frühzeitigen lokalen Ausdehnung mit Absiedlung des Tumors im kleinen Becken, im Oberbauch und Zwerchfell, sowie im Omentum majus [29]. Mehr als 50% der Ovarialkarzinome sind beidseitig lokalisiert [29]. Der Tumor metastasiert häufig lymphogen in die pelvinen und paraaortalen Lymphknoten und hämatogen in Leber, Knochen, Lunge und Gehirn [30].

Die Symptomatik ist oft unspezifisch und beinhaltet u.a. Bauchschmerzen, Zunahme des Leibesumfangs, gastrointestinale Beschwerden, Gewichtsabnahme, abnormale Blutungen und Miktionsbeschwerden [31]. In mehr als der Hälfte der Fälle liegt bei Diagnosestellung bereits eine Peritonealkarzinose vor, oft in Verbindung mit Aszites. Zeichen eines fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms ist die tumorbedingte Kachexie mit typischem eingefallenem Gesicht (Facies ovarica) [32].

Nach einer ausführlichen Anamnese und körperlichen Untersuchung mit bimanueller vaginaler Palpation erfolgt eine transvaginale Sonographie, die derzeit wegen ihrer hohen Sensitivität und Spezifität Goldstandard in der Primärdiagnostik ist [33]. Ergänzende Untersuchungen sind Abdomen-Sonographie, Röntgen-Thorax und Mammographie [33, 34]. Unausweichlich in der Diagnostik von malignen Ovarialtumoren ist zudem das intraoperative Staging. Es erfolgt primär durch eine Laparotomie, um eine intraoperative Tumorzellverschleppung zu vermeiden und gleichzeitig eine komplette Tumoresektion anzustreben [33]. Nach Erhalt aller Befunde erfolgt die Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms nach der TNM- oder der FIGO-Klassifikation (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) (siehe Kapitel 7.4).

#### 1.1.5 Therapie

Für die Therapie des Ovarialkarzinoms ist eine systematische chirurgische Exploration und vollständige und radikale Tumoresektion essentiell, um die Überlebens- und Heilungschancen zu verbessern [35]. Die Radikalität der Operation richtet sich nach Histologie und FIGO-Stadium und beinhaltet nach Längsschnittlaparotomie neben der Inspektion, Palpation und Gewinnung von Biopsien auch eine beidseitige hohe Adnexektomie, eine Hysterektomie, Omentektomie (mindestens infrakolisch), Appendektomie (bei muzinösem und unklarem Tumortyp sowie bei makroskopischem

Tumorbefall) und eine beidseitige pelvine und paraaortale Lymphonodektomie bis zur Vena renalis [35]. In den fortgeschrittenen Tumorstadien FIGO IIB-IV erfolgt zusätzlich die Resektion des befallenen (parietalen) Peritoneums einschließlich des Zwerchfellperitoneums (Deperitonealisation). Sind bereits Dünn- oder Dickdarmanteile infiltriert, so erfolgt deren Resektion, wenn dadurch Tumorfreiheit erreichbar ist. Gleiches gilt für die Leber (-kapsel) und die Milz [35].

Beim Boderline-Tumor können prämenopausale Patientinnen mit Kinderwunsch und unilateralem Tumor unter Umständen fertilitätserhaltend operiert werden, indem nur das betroffene Ovar operativ entfernt wird [35].

Im Anschluss an die Operation erhalten die Patientinnen eine mindestens platinhaltige adjuvante Chemotherapie (üblicherweise 6 Zyklen i.v.). Einzige Ausnahme stellen Patientinnen mit Tumoren im Stadium IA G1 und Patientinnen mit Borderline-Tumoren dar [35]. In den fortgeschrittenen Stadien setzt sich das Standardregime aus Carboplatin und Paclitaxel zusammen [35]. Bei FIGO IIIB-IV kann eine zusätzliche Behandlung mit Bevacizumab erwogen werden [36], einem monoklonalen Antikörper, der die Angiogenese hemmt [37, 38]. Neuere Verfahren, wie z.B. die hypertherme intraperitoneale Chemoperfusion (HIPEC), bei welcher zur Therapie der Peritonealkarzinose eine auf 42°C erhitzte Chemotherapeutika-haltige Spüllösung für 30-90 Minuten in die Bauchhöhle perfundiert wird, wurden bisher nicht in die Leitlinien aufgenommen, da noch keine verlässlichen Daten vorliegen. Eine neoadjuvante Chemotherapie konnte die Ergebnisse bislang nicht verbessern [35].

Die Therapie der malignen Keimzelltumoren erfolgt i.d.R. sowohl operativ, als auch medikamentös [35]. Nach kompletter Tumorresektion und adäquatem Staging sollte bei unauffälligem kontralateralem Ovar und Uterus die Fertilität erhalten werden [35].

Bei Keimstrangstromatumoren ist ein operatives Staging mit Resektion des Tumors primäres Ziel [35]. Der Nutzen einer systematischen Lymphonodektomie bei unauffälligen Lymphknoten ist ebenso wenig belegt, wie der Nutzen einer systemischen adjuvanten Strahlen-, Chemo- oder endokrinen Therapie [35].

### 1.1.6 Prognose und Prognosefaktoren

Aufgrund der oft erst späten Diagnose in fortgeschrittenen Stadien hat das Ovarialkarzinom eine hohe Mortalität. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt im FIGO Stadium I bei 93%, im Stadium II bei 70%, im Stadium III bei 37% und im Stadium IV bei nur mehr 25% [39].

Somit ist das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einer der wichtigsten Faktoren, um die Prognose einzuschätzen. Weitere Prognosefaktoren sind u.a. der postoperativ verbliebene Tumorrest [40], die DNA-Ploidie des Tumors [41, 42], das Alter [43], der klinische Zustand der Patientin bei Aufnahme [43] und die Ansprechrate des Tumors auf die Chemotherapie, gemessen an der Geschwindigkeit des CA125-Abfalls [44].

### 1.1.7 Tumormarker

Für das seröse Ovarialkarzinom ist das CA125 der wichtigste Tumormarker mit hoher Sensitivität und Spezifität, für das muzinöse Ovarialkarzinom ist CA72-4 der führende Marker. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und vor der ersten Therapie wird die kombinierte Bestimmung dieser beiden Marker empfohlen [45].

CA125 wird mit einer Gesamtsensitivität von 87% von der Mehrzahl der Ovarialkarzinome freigesetzt. Seine Spezifität wird dadurch eingeschränkt, dass eine CA125-Erhöhung auch bei benignen Erkrankungen, wie z.B. einer Endometriose, Entzündungen oder viralen Infekten auftreten kann [46]. Da CA125 nicht tumor- und organspezifisch ist, ist eine Indikation als Screeningmethode nicht gegeben [45]. Große Bedeutung hat das CA125 jedoch im Rahmen der Verlaufskontrolle bei Patientinnen mit epithelialen Ovarialkarzinomen, jedoch nur, wenn sein Wert zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erhöht ist. Bei einem persistierenden Anstieg auch ohne Krankheitszeichen ist von einem Rezidiv auszugehen [46].

Die Sensitivität des Tumormarkers CA72-4 ist im Gegensatz zu CA125 geringer. Erhöhte Konzentrationen können nicht nur beim Ovarialkarzinom, sondern auch bei anderen Adenokarzinomen (z.B. Mamma, Kolon und Magen) gemessen werden, insbesondere beim muzinösen Subtyp [47]. Leicht erhöhte CA72-4-Werte lassen sich auch bei einer Endometriose, bei benignen Ovarialtumoren und entzündlichen Erkrankungen des Ovars feststellen [48, 49, 50].

Mittels immunhistochemischer Färbung konnte gezeigt werden, dass 1/3 aller muzinösen epithelialen Ovarialkarzinome eine Überexpression an CEA aufweisen. Analog dazu konnten erhöhte Serumkonzentrationen von CEA bei Patientinnen mit muzinösen epithelialen Ovarialkarzinomen dokumentiert werden [51, 52]. Neben Tumoren des Ovars dient CEA auch als Tumormarker beim Kolon-, Ösophagus- und Mammakarzinom [53]. Es konnte gezeigt werden, dass seine Bestimmung im Rahmen des serösen und muzinösen Ovarialkarzinoms weder die diagnostische noch die differentialdiagnostische Aussagekraft von CA125 und CA72-4 steigert [45].

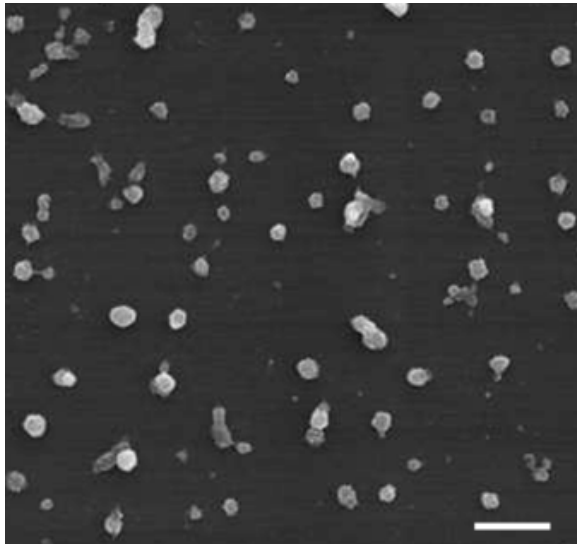
## 1.2 Zirkulierende Mikropartikel

### 1.2.1 Definition und Kennzeichen

In den 40er Jahren wurde festgestellt, dass sich die Gerinnungszeit von Thrombozyten-armem Plasma nach high-speed-Zentrifugation verlängerte. Dies wies auf einen subzellulären gerinnungsfördernden Faktor hin [54]. Erst 1967 entdeckte P. Wolf, dass sich dieser Faktor, den er als „platelet dust“ bezeichnete, aus kleinen Partikeln zusammensetzt, die von aktivierten Thrombozyten stammen. Diese Partikel hatten die gleiche gerinnungsfördernde Aktivität wie aktivierte Thrombozyten [55]. Die klinische Relevanz dieser thrombozytären Partikel zeigte sich im Jahre 1979, als von einer jungen Frau berichtet wurde, die an einer unklaren angeborenen Gerinnungsstörung litt, die später als „Scott-Syndrom“ bezeichnet wurde. Diese seltene Krankheit ist durch eine gestörte Freisetzung von Mikropartikeln gekennzeichnet [56, 57].

Mikropartikel (MP) sind Membranabschnürungen eukaryotischer Zellen mit einer heterogenen Größe von 0,1-1µm [58], die sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Umständen in unterschiedlicher Anzahl im Blut und in anderen extrazellulären Flüssigkeiten, wie dem Speichel [59] zirkulieren. Es sind intakte Vesikel, die von Membranen unterschiedlicher Protein- und Lipidzusammensetzung umhüllt sind [60]. Die genaue Zusammensetzung dieser Membranen hängt von der Art der Ursprungszelle und von der Art des Stimulus ab, der zur Freisetzung der MP führte. So spiegeln MP in gewisser Weise den antigenetischen Phänotyp ihrer Ursprungszelle wider und tragen viele ihrer Biomarker [61]. Die Ursprungszellen sind in der Lage, ihre MP mit spezifischen Antigenen und bioaktiven Agentien auszustatten. Sie enthalten sowohl transmembranäre Proteine und Rezeptoren, als auch zytosolische Komponenten wie z.B. Enzyme, Transkriptionsfaktoren und mRNA ihrer Ursprungszelle [62].

Auch unter physiologischen Bedingungen existieren MP in niedriger Konzentration im Plasma [63]. Durch Erkrankungen, wie insbesondere Infektionen, Autoimmunerkrankungen und Krebserkrankungen sowie deren Progression kann sich die Menge, die Zusammensetzung und die Funktion zirkulierender MP verändern [58]. Es ist bisher allerdings unklar, ob diese MP zur Entstehung der Erkrankung beitragen, oder ob sie als Folge der Erkrankung auftreten [58].



**Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Darstellung von MP bei einer Mammakarzinompatientin [64]. Die Größenmarkierung zeigt die Länge 1µm an.**

### 1.2.2 Entstehungsmechanismus

MP sind unter anderem dadurch gekennzeichnet, dass sie das anionische Phosphatidylserin (PS) an der Außenseite ihrer Membran tragen. Unter physiologischen Bedingungen herrscht an der Zellmembran eine Asymmetrie in der Verteilung von Phospholipiden (PL) mit bevorzugtem Auftreten von Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin an der Außenseite [65] sowie Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) an der Innenseite der Membran [63]. Die Aufrechterhaltung dieser PL-Asymmetrie ist essentiell für die Zelle und wird durch eine komplexe enzymatische Balance aufrechterhalten, an der die fünf Enzyme Gelsolin, Flippase, Floppase, Scramblase und Calpain beteiligt sind [63]. Diese Enzyme werden durch einen Anstieg des zytosolischen Calciums entweder induziert oder gehemmt [63]. Aufgrund des verstärkten Auftretens von PS an der Außenseite der Membran von MP wird vermutet, dass der MP-Freisetzung ein Verlust der PL-Membranasymmetrie der Ursprungszelle vorausgeht. So kommt es z.B. infolge von Zellstimulierung oder -aktivierung zu einem signifikanten zytosomatischen Calciumanstieg aus dem Endoplasmatischen Retikulum oder von außen, die PL-Membranasymmetrie kollabiert und die anionischen Phospholipide, insbesondere PS, treten vermehrt an der Außenseite der Zellmembran auf [63].

Eine weitere Voraussetzung vor der Freisetzung von MP ist eine Veränderung des Zytoskeletts der Ursprungszelle: in Thrombozyten müssen Aktinfilamente, in anderen Zelltypen Aktin-Spektrin-Ankerplätze gespalten werden [63]. In ruhenden Thrombozyten werden die Aktinfilamente von den Proteinen Adducin und CapZ bedeckt, die eine Spaltung verhindern. Erst durch eine Gelsolin-Aktivierung bei einem zytosomatischen Calciumanstieg, wird diese Hemmung aufgehoben, das Zytoskelett kann gespalten und MP

können freigesetzt werden [63]. Im Rahmen der Apoptose fördert die aktivierte Rho-assoziierte Kinase (ROCK I) die Kraftentwicklung zwischen Aktin und Myosin und beeinflusst über die Aktin-Myosin-Kopplung an die Plasmamembran die Vesikelbildung [62].

Wie von Leytin et al. 2009 nachgewiesen, scheint zudem eine Verstärkung der mitochondrialen Permeabilität ein wichtiger Faktor im Rahmen der MP-Freisetzung zu sein [66].

Auslösende Trigger für die Freisetzung von MP sind insbesondere Zellstimulierung, -aktivierung und -apoptose. Auch durch Komplementaktivierung und viele andere Stimuli - meist als Reaktion auf Stresseinwirkung auf die Zelle – kommt es zur verstärkten Freisetzung von MP und damit zu einer erhöhten Anzahl an MP im Blut [63, 67].

### 1.2.3 Funktionen

Die Funktionen von Mikropartikeln sind vielfältig. Sie sind Vektoren im transzellulären Austausch biologischer Informationen, die mit benachbarten oder weiter entfernten Zellen interagieren können [60]. Indem sie Zelltyp-spezifische Adhäsionsrezeptoren oder –liganden exponieren, können sie an bestimmte Zellen binden oder mit ihnen fusionieren und ihre Botschaft übermitteln (z.B. bioaktive Lipide, Zytokine und Wachstumsfaktoren) [68].

Die meistuntersuchte Eigenschaft von MP ist ihre gerinnungsfördernde Wirkung [69]. Vermittelt wird sie durch unterschiedliche Mechanismen. Zum einen fungieren die anionischen PL (insb. PS) an der Oberfläche der MP als Bindungsstellen für diverse Gerinnungsfaktoren (z.B. F.IXa, VIII, Va und IIa) und sind essentiell für die Bildung des Prothrombinase- und Tenasekomplexes [65]. Zum anderen sind einige MP in der Lage, Tissue Factor (TF) auf ihrer Oberfläche zu exprimieren, ihn auf andere Zellen zu transferieren oder durch ihre Bindung an eine Zelle deren TF-Produktion bzw. –Expression zu initiieren [58]. So können sie die Gerinnung über den TF/F.VII-abhängigen Weg verstärken [70]. Dennoch führen erhöhte MP-Level nicht notwendigerweise zu Thrombosen, da sie auch gerinnungshemmende Funktionen innehaben. MP, die von gesunden Kontrollen isoliert werden, fördern eine geringe Thrombinbildung. Dieses Thrombin ist fast vollständig an Thrombomodulin gebunden, was zu einer Aktivierung von Protein C und Inaktivierung der Faktoren Va und VIIIa führt. Das heißt, dass die MP-abhängige Thrombinbildung bei normaler Hämostase eine gerinnungshemmende Funktion hat [70].

Eine weitere für die vorliegende Studie wichtige Funktion zirkulierender MP ist ihre Rolle im Rahmen von Krebserkrankungen. Indem sie z.B. die extrazelluläre Matrix so verändern, dass

ein lokales Fortschreiten des Tumors erleichtert wird [71, 72] und dem Tumor Strategien bieten, dem Immunsystem zu entkommen [73, 74] tragen neben PMP [60, 75, 76, 77, 78], EMP [79] und TF<sup>+</sup>-MP [80, 81, 82] auch Tumor-MP (TMP), die von malignen Tumorzellen selbst freigesetzt werden, zur Tumorprogression, Angiogenese und Metastasierung bei [83, 71, 72]. Durch den horizontalen Transfer von Onkoproteinen, Wachstumsfaktoren, mRNA und miRNA können TMP z.B. den Phänotyp und die Natur von Zellen verändern und so zur Verbreitung der onkogenetischen Aktivität beitragen [84, 85, 86]. Die entscheidende Komponente, mit der nicht nur TMP die Angiogenese stimulieren, scheint Sphingomyelin zu sein, indem es die Endothelzellmigration und -invasion fördert [60]. Zudem können MP die Produktion pro- oder antiangiogenetischer Faktoren induzieren [87] und so die Endothelzellfunktion bezüglich Adhäsion, Migration und Proliferation (die drei Schlüsselschritte für die Bildung neuer Gefäße) verändern [87].

Neben ihrer Rolle für die Blutgerinnung und bei Krebserkrankungen sind MP in der Lage auf verschiedenen Ebenen ins Immunsystem einzugreifen. So tragen sie z.B. eine Reihe von Zytokinen und anderen Agenzien [60], z.B. IL-1 [88] sowie viele Entzündungsmarker, von denen man lange Zeit dachte, sie würden in einer löslichen Form im Plasma vorkommen [69]. Im Rahmen von Entzündungsreaktionen dienen MP als potente proinflammatorische Induktoren, die eine Reihe von Signaltransduktionswegen und Genexpressionsprofilen in Endothelzellen initiieren und dadurch die endotheliale Funktion beeinträchtigen [89]. Zudem tragen sie zu einer verbesserten Interaktion zwischen den an einer Entzündungsreaktion beteiligten Zellen bei [90].

Ebenso sind MP in der Lage, die Endothelfunktion zu beeinflussen [91, 92], eine endotheliale Dysfunktion und Veränderungen im NO- und Prostazyklin-Signalweg auszulösen [93].

Die meisten dieser für MP beschriebenen Funktionen wurden in in vitro-Studien aufgedeckt. Inwieweit diese Funktionen auch in vivo zutreffen, ist – bis auf die gesicherte gerinnungsfördernde Funktion – bisher unklar [58]. Es steht jedoch fest, dass zirkulierende MP für den menschlichen Organismus sowohl „gut“ als auch „schlecht“ sein können. Unter physiologischen Bedingungen tragen sie zur Entwicklung, Angiogenese und Wundheilung von Geweben bei und spielen eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung [60]. Ist jedoch die Balance zwischen Proliferation, Stimulation und Zelltod gestört, so kommt es zu einer pathologischen Veränderung in der Zusammensetzung und Anzahl der verschiedenen zirkulierenden MP [60], was zu unerwünschten Wirkungen führen kann.



### 1.3 Hämostase bei Krebserkrankungen

1865 erkannte der französische Professor Armand Trousseau (1801-1867) als Erster den Zusammenhang zwischen dem Auftreten von (Phlebo-)Thrombosen und malignen Tumoren. Er beschrieb drei Fälle, bei denen das Auftreten von „Phlegmasia alba dolens“ eindeutig an das Grundleiden eines viszeralen Malignoms gekoppelt war. Seitdem wurde der Begriff „Trousseau-Syndrom“ geprägt, der das Auftreten einer Thrombophlebitis als, auch möglicherweise erstes Zeichen, eines viszeralen Malignoms beschreibt [94].

Man vermutet, dass jeder fünfte Fall von symptomatischer tiefer Venenthrombose mit einem malignen Tumor assoziiert ist [95]. Das Risiko, eine Thrombose zu erleiden ist dabei stark von der Art des Tumors abhängig [96]. Malignome von Ovar, Pankreas, Gehirn und Knochen weisen die höchste kumulative Inzidenz venöser Thromboembolien auf [97]. Im Durchschnitt liegt die Inzidenz für ein thromboembolisches Ereignis bei einer Krebserkrankung bei 10-15% [98].

Als Ursachen für die gesteigerte Gerinnungsaktivität bei Krebspatienten gelten verschiedene Faktoren, die von malignen Zellen freigesetzt oder induziert werden und so die Gerinnungskaskade in Gang setzen können. Hierzu zählen z.B. proinflammatorische Zytokine (z.B. TNF-alpha, IFN-gamma) und Akute-Phase-Proteine, die die TF-Expression auf Monozyten oder Endothelzellen induzieren und so die Blutgerinnung verstärken. In immunhistochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass viele Tumoren, die mit einer erhöhten Rate an Thromboembolien einhergehen, TF exprimieren [99]. Ein Zusammenhang zwischen der TF-Expression und dem Auftreten venöser Thromboembolien ist allerdings nicht bewiesen, so dass die An- oder Abwesenheit von TF im Tumorgewebe keine Aussagen über das absolute Risiko venöser Thromboembolien erlaubt [100]. Auch Chemotherapeutika, Operationen und zentrale Venenkatheter liefern einen entscheidenden Beitrag zum Auftreten thrombotischer Ereignisse.

Da die wohl bekannteste Funktion von Mikropartikeln ihre gerinnungsfördernde Wirkung ist, rückten diese in der Vergangenheit zunehmend in den Fokus von Studien rund um das Trousseau-Syndrom. Eine Assoziation zwischen dem Auftreten venöser Thromboembolien (VTE) und erhöhten Konzentrationen an MP bei Krebspatienten wurde bereits mehrfach beschrieben [101, 102, 103, 104, 105]. Es gibt einige Hinweise, dass der prokoagulatorische Zustand bei Krebspatienten zumindest zum Teil auf MP zurückzuführen ist [106]. Die gerinnungsfördernde Wirkung von MP liegt v.a. darin begründet, dass sie eine Membranoberfläche zur Verfügung stellen, die für die Bildung von Komponenten der

Gerinnungskaskade wichtig ist [107]. Diese Aktivität wird verstärkt durch die Expression von Phosphatidylserin, TF und MUC1 [101, 108].

## **1.4 Zielsetzung**

In der vorliegenden Studie wurde bei Ovarialkarzinompatientinnen, Patientinnen mit Borderline-Tumoren und Frauen mit benignen Ovarialtumoren die Konzentration von zirkulierenden Mikropartikeln und verschiedenen MP-Subpopulationen (thrombozytäre MP, endotheliale MP, Tissue Factor tragende MP und spezifische MP, welche Antikörper exprimieren, die ebenso auf Ovarialkarzinomzellen zu finden sind) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit gesunden Probandinnen untersucht.

Ziel der Studie war die Konzentration und Subtypisierung der MP abhängig von der Dignität, dem Tumorstadium und dem Operationsstatus (prä- vs. postoperativ) in den Kollektiven zu analysieren. Zudem wurde die Gerinnungsaktivität (gemessen als D-Dimer-Konzentration) im Studienkollektiv bestimmt und mit der Konzentration der zirkulierenden MP, insbesondere der TMP korreliert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

Bei den Probandinnen handelte es sich um Patientinnen der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Klinikums der Universität München, Großhadern. Eingeschlossen wurden Frauen mit einem histologisch gesicherten primären Ovarialkarzinom, sowie Frauen mit benignen Ovarialtumoren, bei denen die Diagnose mittels Sonographie oder Laparoskopie gestellt wurde.

Als Kontrollgruppe dienten gesunde Frauen mit anamnestischem Ausschluss von Karzinomerkrankungen in der Vorgeschichte, Nikotinkonsum, arteriellem Hypertonus und einer stattgehabten Hormonersatztherapie, bei denen innerhalb der letzten sechs Monate im niedergelassenen Bereich eine transvaginale Sonographie zum Ausschluss von Ovarialtumoren durchgeführt worden war.

Alle Studienteilnehmerinnen wurden ausführlich über den Inhalt, die Art und das Ziel der Studie sowie über die Blutentnahme informiert und unterzeichneten eine schriftliche standardisierte Einverständniserklärung (siehe 7.5). Die Durchführung der Studie wurde durch die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt (Projekt-Nr. 349/02).

Insgesamt wurde bei 64 Patientinnen und 55 gesunden Kontroll-Probandinnen Blut abgenommen. Durch Abnahmefehler, Ausschlusskriterien und Messfehler reduzierte sich die Fallzahl auf 16 Ovarialkarzinompatientinnen und 6 Borderline-Tumor-Patientinnen, 31 Patientinnen mit benignem Ovarialtumor und 50 gesunde Kontrollen.

**Tabelle 1: Ein- und Ausschlusskriterien der Studie**

<b>Einschlusskriterien</b>	<b>Ausschlusskriterien</b>
Schriftliche Einverständniserklärung	Hydrosalpinx
Benigne Ovarialtumore	Abszesse
Histologisch gesicherte Ovarialkarzinome	Ovarialkarzinom-Rezidiv
Borderline-Tumore	Z.n. Mammakarzinom
	Thrombozytopenie
	Z.n. tiefer Venenthrombose und Lungenembolie
	Einnahme von Heparin, ASS
	(Z.n.) Hormonersatztherapie

## **2.2 Probengewinnung**

Die Proben wurden über einen Zeitraum von 13 Monaten gesammelt. Die Blutentnahme erfolgte stets zwischen 8.00-12.00 Uhr, um zu verhindern, dass tageszeitliche Schwankungen in der MP-Anzahl die Ergebnisse beeinflussen.

Aus der Kubitalvene wurden jeweils 5ml Citratblut für die Bestimmung der MP-Konzentration und der D-Dimere und 3ml EDTA-Blut zum Ausschluss einer Thrombozytopenie entnommen. Bei Patientinnen, bei denen im intraoperativen Schnellschnitt die Diagnose eines Ovarialkarzinoms gestellt wurde, wurde zwischen dem 4.-6. postoperativen Tag erneut eine Blutprobe zur Bestimmung der MP-Konzentration, der D-Dimere und der Thrombozytenzahl entnommen.

Die Blutabnahme erfolgte mit einer 20G-Monovette ohne vorhergehende venöse Stauung. Das Citratblut wurde innerhalb von 15 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute 20 Minuten lang bei Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge Hermle ZK380, Gosheim, Deutschland) und der Plasmaüberstand in Proben von je 320µl in flüssigem Stickstoff 15 Minuten lang schockgefroren und anschließend bei -80°C bis zur Messung gelagert. Bevor sie für die Messung aufbereitet werden konnten, wurden die Proben auf Eis langsam innerhalb einer Stunde aufgetaut.

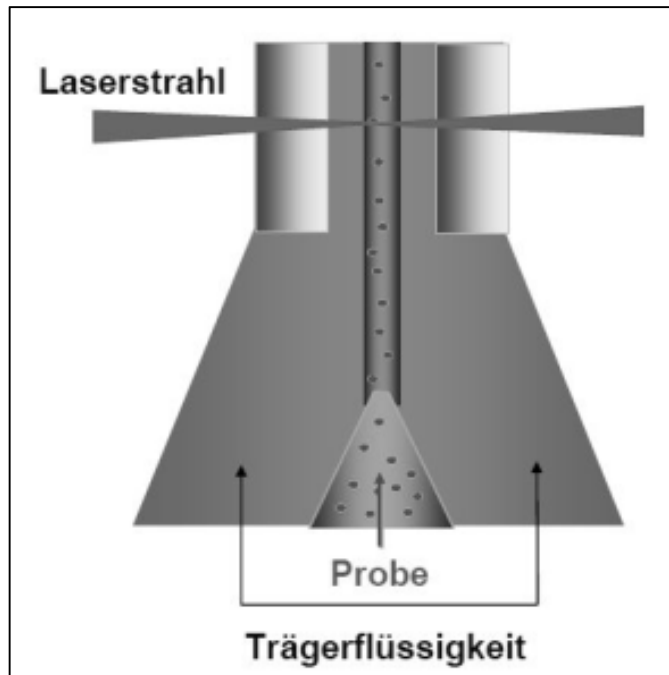
Das EDTA-Blut für ein kleines Blutbild wurde bei -5°C gekühlt, bevor es noch am gleichen Tag für die Messungen verarbeitet wurde. Zur Bestimmung der D-Dimere wurde ebenfalls der vom Citrat-Blut gewonnene und tiefgefrorene Plasmaüberstand herangezogen.

## **2.3 Durchflusszytometrie**

### **2.3.1 Technik der Durchflusszytometrie**

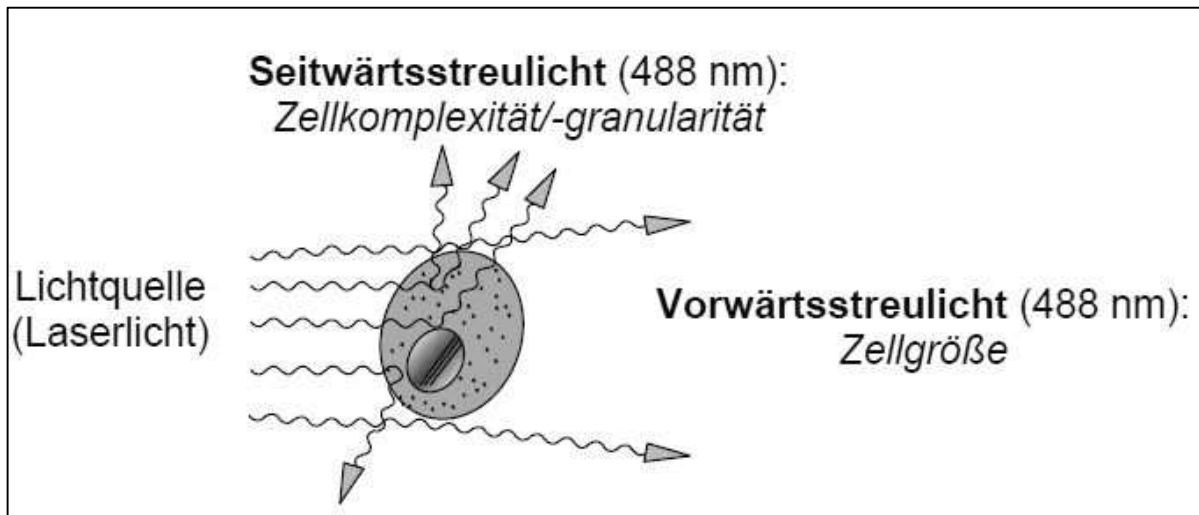
Das Prinzip der Durchflusszytometrie oder Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) beruht auf der Messung optischer Signale von Zellen, die diese beim Passieren eines Laserstrahls aussenden [109]. Es handelt sich hierbei um Lichtstreuung und Fluoreszenz. Die zu untersuchenden Zellen oder Partikel müssen 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 2). Als Lichtquelle dient ein Argonlaser mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 488\text{nm}$ . Die Zellen werden von der Lichtquelle angeregt und emittierten Streulicht, welches vom Photomultiplier erfasst und digital gespeichert wird.



**Abbildung 2: Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung:** Die Probenflüssigkeit wird durch die laminare Strömung der Trägerflüssigkeit im Zentrum der Messküvette fokussiert. Modifiziert nach [110].

Man unterscheidet Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht. 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  $90^\circ$  und stellt als Korrelat des Refraktionsindex ein Maß für Granularität und Struktur des Objekts dar (s. Abbildung 3). Diese Technik wird zur Bestimmung einzelner Zellpopulationen im Vollblut angewandt.



**Abbildung 3: Merkmale des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts im Durchflusszytometer:** Vorwärtsstreulicht wird im Winkel von  $0-1^\circ$  emittiert und liefert Informationen über die Zellgröße; Seitwärtsstreulicht wird im Winkel von  $90^\circ$  emittiert und ermöglicht Rückschlüsse auf die Struktur des Objekts. Modifiziert nach [110].

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 488nm und einem Emissionsmaximum bei 520nm sowie R-Phycoerythrin (R-PE) mit drei Absorptionsmaxima bei 480, 546 und 565nm und einem Emissionsmaximum bei 578nm.

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 (Kapitel in Anlehnung an [64]).

### 2.3.2 Grundlösungen

Zur Herstellung der Phosphat-gepufferten Salin (PBS)-Grundlösung wurden 9g NaCl in 1000ml destilliertem Wasser gelöst (entsprechend 154mmol/l NaCl 0,9%) und 0,25g Hydrogenphosphat-Natrium zugegeben (entsprechend 1,4mmol/l Phosphat). Der pH-Wert der PBS-Grundlösung lag bei 7,5. Für die Calcium-Grundlösung wurden 1,47g  $\text{CaCl}_2$  in 100ml destilliertem Wasser gelöst (entsprechend 0,1mol/l  $\text{CaCl}_2$ ). Die Citrat-Grundlösung bestand

aus 3,2g Trinatriumcitrat, welches in 100ml destilliertem Wasser gelöst wurde (entsprechend 3,2% Trinatriumcitrat) (nach [64]).

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien**

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

### 2.3.3 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 39ml:1ml zusammen, die Citrat-Pufferlösung aus PBS und der Citrat-Grundlösung im Verhältnis 9ml:1ml. Die Kalibrierung der Arbeitslösungen 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 (Minisart, non-pyrogenic, 0,20µm, steril, Sartorius, Göttingen, Deutschland) (nach [64]).

### 2.3.4 Verfahren

Vor der Konzentrationsbestimmung wurden die Proben eine Stunde lang auf Eis aufgetaut und nach Durchmischung mittels Vortex (Vortex Genie 2TM, Firma Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz) 250µl entnommen. Diese wurden bei 17570g und 20°C 30 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge Mikro 22R, Hettich, Tutting, Deutschland). 225µl MP-freier Überstand wurden abpipettiert und verworfen. Die verbleibenden 25µl wurden mit 225µl Citrat-Pufferlösung verdünnt (PBS mit 10,9mmol/Trinatriumcitrat), erneut mittels Vortex gemischt und bei 17570g und 20°C 30 Minuten zentrifugiert.

Danach wurden 225µl Überstand entnommen und die verbleibenden 25µl mit 75µl Citrat-Pufferlösung vermischt. 5µl dieser MP-reichen Suspension wurden jeweils mit 35µl Calcium-Pufferlösung (CaCl<sub>2</sub> 2,5mmol/l in PBS) verdünnt. Zur Detektion der MP wurde 5µl

Allophycocyanin (APC)-markiertes Annexin V zugegeben sowie 5µl eines spezifischen Antikörpers (s.u.) bzw. Kontrollantikörpers. Annexin V und die spezifischen Antikörper wurden zuvor bei 17570g und 20°C 5 Minuten zentrifugiert und mit Calcium-Pufferlösung verdünnt.

Die Proben wurden 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und die Reaktion dann mit 900µl 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 (< 1µm 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 Minute im Durchflusszytometer untersucht, wobei vor jeder Messung der Wassereinzug des Geräts (V) in µl/min 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:  $MP/l = N \times [100/5] \times [950/V] \times [106/250] [70]$ . (Kapitel in Anlehnung an [64])

**Tabelle 3: Verwendete Reagenzien**

Reagenzien	Hersteller
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
CD61-PE	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD63-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD142-PE	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland



**Tabelle 4: Antikörper-Verdünnungen**

<b>Antikörper</b>	<b>Antikörper-Menge</b>	<b>Puffer-Menge</b>
Annexin-FITC	6µl Annexin-FITC	54µl Ca-Puffer
IgG 1-PE	2µl IgG-PE	18µl Ca-Puffer
CD61-PE	2µl CD61-PE	18µl Ca-Puffer
CD63-PE	10µl CD63-PE	10µl Ca-Puffer
CD142-PE	Unverdünnt	
EpCAM-PE	Unverdünnt	
Annexin-PE	2µl Annexin-PE	38µl Ca-Puffer
IgG 1-FITC	2µl IgG-FITC	18µl Ca-Puffer
CD144-FITC	10µl CD144-FITC	10µl Ca-Puffer

### 2.3.5 Spezifische Antikörper

#### 2.3.5.1 Annexin V

Annexin V ist ein Protein der Größe 36kDa, das Calcium-abhängig negativ geladene Phospholipide bindet. Es hat eine hohe Affinität für das anionische Phosphatidylserin, während es nur minimal an Phosphatidylcholin und Sphingomyelin bindet. Da Phospholipide an der Aktivierung der Gerinnungskaskade beteiligt sind, wirkt Annexin V durch seine Phospholipid-Bindung gerinnungshemmend [111].

MP sind u.a. dadurch gekennzeichnet, dass sie Phosphatidylserin an der Außenseite ihrer Membran exponieren. Durch seine starke Affinität und Bindung an PS eignet sich FITC- oder PE-markiertes Annexin V deshalb zum durchflusszytometrischen Nachweis von MP.

#### 2.3.5.2 Immunglobulin G1

Immunglobulin G (IgG) ist ein 150KDa-Protein, bestehend aus zwei leichten und zwei schweren Ketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind [112]. Vier IgG-Subklassen mit homologer Grundstruktur der schweren Ketten sind bekannt [112]. IgG 1 ist die größte Subklasse, gefolgt von 2, 3 und 4 [112]. IgG 1 bindet unspezifisch an MP und eignet sich daher als Isotypen- oder Negativkontrolle bei der durchflusszytometrischen Messung der MP. Da alle verwendeten Antikörper IgG 1-Antikörper sind, wird untersucht, wie stark das Ausmaß der IgG 1-unspezifischen Bindung ist.

#### 2.3.5.3 Anti-CD61-PE

Anti-CD61-PE ist ein monoklonaler Antikörper, der mit R-Phycoerythrin markiert ist. Er setzt sich aus den schweren Ketten und den kappa-Leichtketten des IgG 1 von Mäusen zusammen. Der Antikörper reagiert mit Integrin  $\beta_3$ , einem transmembranen Glykoprotein (105kDa), das auf Thrombozyten, Megakaryozyten, Osteoklasten und Endothelzellen exprimiert wird. Er ist ein selektiver Marker für Thrombozyten und deren Vorläuferzellen. Integrin  $\beta$  bildet mit CD41 einen Komplex, der als Rezeptor für vWF, lösliches Fibrin und Fibronectin fungiert und eine zentrale Rolle in der Plättchenaktivierung, -adhäsion und -aggregation spielt [113]. In der vorliegenden Studie dient Anti-CD61-PE zur Bestimmung der MP-Anzahl, die der Gesamtzahl ruhender Thrombozyten entstammen.

#### 2.3.5.4 Anti-CD63-PE

Anti-CD63-PE ist ein monoklonaler Antikörper, der mit R-Phycoerythrin markiert ist und sich aus den schweren Ketten und den kappa-Leichtketten des IgG 1 von Mäusen zusammensetzt.

CD63 ist ein Glykoprotein mit einer Größe von 53kDa und ein Mitglied der Tetraspanin-Familie. Es wird v.a. auf der Oberfläche und im Zytoplasma verschiedener hämatopoetischer und nicht-hämatopoetischer Zellen (Endothelzellen, Fibroblasten, Osteoklasten, etc.) exprimiert. Die Exposition von CD63 auf der Oberfläche von Zellen erfolgt in der Regel durch die Aktivierung der Zelle. Im Zytoplasma ist es in Endosomen, Lysosomen und sekretorischen Vesikeln vorhanden. CD63 interagiert mit Integrinen und ist in der Lage Phagozytose und Zellmigration auszulösen. Zudem kann die Expression von CD63 genutzt werden, um Aussagen über die Prognose von Karzinomen in frühen Stadien zu machen [114]. In der vorliegenden Studie dient Anti-CD63-PE zur Bestimmung der MP, die von aktivierten Thrombozyten stammen.

#### 2.3.5.5 Anti-CD142-PE

Anti-CD142-PE ist ein monoklonaler Antikörper, der mit R-Phycoerythrin markiert ist und sich aus den schweren Ketten und den kappa-Leichtketten des IgG 1 von Mäusen zusammensetzt.

Anti-CD142 reagiert mit einem Einzelketten-Typ-I-Transmembranprotein (45-47kDa), das auch als Tissue Factor (TF) bekannt ist. TF ist der Initiator des extrinsischen Wegs der Blutgerinnung, der, im Gegensatz zum intrinsischen Weg, tatsächlich in vivo vorkommt. Er

ist der Rezeptor für F.VII/F.VIIa; ihr Komplex aktiviert sowohl F.X, als auch F.IX, um die Blutgerinnung zu initiieren [115]. Im Gegensatz zur Zell-gebundenen Form von TF z.B. auf Zellen der Gefäßwand, glatten Muskelzellen und Perizyten, sind TF<sup>+</sup>-MP eine Quelle für TF innerhalb des Blutflusses. Abgesehen von seiner Lokalisation im und um das Blut, zeigen auch verschiedene Gewebe eine unterschiedlich stark ausgeprägte TF-Expression. Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden konnte festgestellt werden, dass auch Tumore, v.a. solche epithelialen Ursprungs, z.T. hohe TF-Level exprimieren [99].

In der vorliegenden Studie dient Anti-CD142-PE zur Detektion TF<sup>+</sup>-MP.

#### 2.3.5.6 Anti-EpCAM-PE

Anti-EpCAM ist ein monoklonaler Antikörper, der mit R-Phycoerythrin markiert ist und sich aus den schweren Ketten und den lambda-Leichtketten des IgG 1 von Mäusen zusammensetzt. Er ist gegen das menschliche epitheliale zelluläre Adhäsionsmolekül (EpCAM, 40kDa) gerichtet. EpCAM hat neben seiner Funktion als Zelladhäsionsmolekül eine wichtige Rolle bei der Bildung, Entwicklung, Aufrechterhaltung, Reparatur und Funktion von Epithelgeweben [116]. Hierfür ist es an der Regulierung von Prozessen wie Zellmigration, Zellzyklus und Zellsignalisierung beteiligt [116]. Im Gegensatz zu den übrigen CAMs, die ein breites Expressionsmuster aufweisen, wird EpCAM nur auf normalen Epithelzellen exprimiert [116]. Zudem wurde schon früh die EpCAM-Überexpression auf epithelialen Karzinomen beschrieben. Die erhöhten EpCAM-Konzentrationen stören hier die regulatorische Balance und erleichtern die abnorme zelluläre Proliferation und Differenzierung, die für Karzinome typisch ist [116]. Zudem wird vermutet, dass EpCAM an der Metastasierung maligner Tumoren beteiligt ist [117, 118]. Zu den Karzinomen, die eine EpCAM-Überexpression aufweisen, zählt u.a. das Ovarialkarzinom [119]. Hier konnte festgestellt werden, dass die EpCAM-Überexpression mit einem reduzierten Überleben einhergeht [120].

Anwendungsgebiete von Anti-EpCAM sind z.B. die Detektion zirkulierender Tumorzellen während des Vorgangs der Metastasierung und das Ansprechen mikrometastatischer Zellen auf adjuvante Therapien [121]. In der vorliegenden Studie dient Anti-EpCAM zur Detektion derjenigen MP, die epithelialen Ursprungs sind bzw. die von Ovarialkarzinomzellen freigesetzt werden (sog. Tumor-MP oder TMP).

#### 2.3.5.7 Anti-CD144-FITC

Anti-CD144-FITC ist ein monoklonaler Antikörper, der mit Fluoreszein-Isothiocyant markiert ist und sich aus den schweren Ketten sowie den kappa-Leichtketten des IgG 1 von Mäusen zusammensetzt.

CD144 reagiert mit einem Calcium-unabhängigen Epitop auf dem Cadherin-5, einem Mitglied der Cadherin-Familie. Cadherine (Calcium adhering) sind Calcium-abhängige transmembranäre Glykoproteine aus der Familie der Adhäsionsproteine. Sie kommen u.a. in Desmosomen vor und bewirken Zellkontakte in verschiedenen Geweben. Cadherin-5 wird in vivo und in vitro auf Endothel-Zellen exprimiert. Möglicherweise spielt es eine Rolle bei der Organisation lateraler endothelialer Zellverbindungen und bei der Kontrolle von Permeabilitätsfähigkeiten des vaskulären Endothels [122].

In der vorliegenden Studie dient Anti-CD144 zur Detektion endothelialer MP (EMP), die von Endothelzellen bei deren Aktivierung und Apoptose freigesetzt werden [123, 124]. Sie spiegeln also eine Endothelaktivierung oder einen Endothelzellschaden [125] wider, wie z.B. bei Patienten mit Atherosklerose und v.a. Patienten mit Plaque-Instabilität [126, 127]. Da Zytokine, proinflammatorische und prothrombotische Stimuli sowie oxidative Substanzen in vitro zur Freisetzung von EMP führen können [128], spielen sie eine große Rolle im Rahmen von Entzündungen, Gefäßverletzungen, Angiogenese und Thrombosen [125].

## 2.4 Gerinnungsaktivität

Zur Beurteilung der Gerinnungsaktivität wurden die D-Dimer-Konzentrationen im Studienkollektiv bestimmt. D-Dimere sind Fibrin-Spaltprodukte, die im Rahmen der Fibrinolyse entstehen. Ihre Bestimmung im venösen Citratblut bei vermuteter venöser Thrombose oder Thromboembolie hat einen hohen negativ-prädiktiven Wert [129] und findet seit ca. 23 Jahren Verwendung im klinischen Alltag.

Für diese Messung wurde das tiefgefrorene Plasma herangezogen, das auch für die MP-Messungen verwendet wurde. Nach dem Auftauen wurden die Proben mit Hilfe des BCS XP Systems von Siemens Healthcare Diagnostics (Deutschland) unter Verwendung des INNOVANCE-D-Dimer-Sets analysiert. Es handelt sich hierbei um einen voll-automatischen partikelverstärkten, immunoturbidimetrischen Test für die quantitative Bestimmung von D-Dimer im Plasma. Werte  $> 0,55\text{mg/l}$  werden als erhöht angesehen.

Die D-Dimer-Konzentration wurde bei allen 16 Patientinnen mit malignen, allen 6 Patientinnen mit semimalignen, bei 41 Patientinnen mit benignen Ovarialtumoren und 12 gesunden Kontrollen bestimmt. Innerhalb der Gruppe mit malignen Tumoren wurde zusätzlich noch bei 9 Patientinnen die D-Dimer-Konzentration am 4.-6. postoperativen Tag bestimmt.

## **2.5 Statistik**

Parametrisch verteilte Daten werden im Folgenden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) sowie Minimum - Maximum, alle anderen Daten als Median, Minimum - Maximum und Interquartilsabstand (Q1 - Q3) dargestellt.

Die Analyse der nicht-normalverteilten Variablen erfolgte mittels Kruskal-Wallace-Test (nicht-parametrischer Test für  $> 2$  Stichproben), Mann-Whitney-U-Test (nicht-parametrischer Test für 2 unverbundene Stichproben) und Wilcoxon-Test (nicht-parametrischer Test für 2 verbundene Stichproben). Die Analyse der normalverteilten Variablen erfolgte mittels T-Test für unverbundene Variablen.

Zur Analyse der Unabhängigkeit zweier Alternativmerkmale wurde der Chi<sup>2</sup>-Unabhängigkeitstest angewandt.

Zum Vergleich der Sensitivitäten und Spezifitäten der MP-Subpopulationen mit denen der konventionellen Tumormarker für das Ovarialkarzinom (CA125 und CA72-4) wurde für jede MP-Subpopulation eine ROC-Kurve erstellt. Die Flächen unterhalb der ROC-Kurve ermöglichen einen direkten Vergleich mehrerer Diagnoseverfahren.

Um eine Korrelation zwischen der MP-Konzentration und der Gerinnungsaktivität (D-Dimer-Konzentration) zu ermitteln, wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman (r) bestimmt.

P-Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant erachtet. Die Daten wurden mit SPSS für Windows (Version 16.0 und 21.0, Chicago, Illinois, USA) ausgewertet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Patientenkollektiv

Bei 20 Patientinnen mit semimaligen und malignen Ovarialtumoren wurde eine Stadieneinteilung des Tumors entsprechend der FIGO-Klassifikation durchgeführt. 8 Patientinnen (40%) befanden sich im FIGO-Stadium I, 2 Patientinnen (10%) im FIGO-Stadium II, 7 Patientinnen (35%) im FIGO-Stadium III und 3 Patientinnen (15%) im FIGO-Stadium IV. Bei 2 Patientinnen mit malignem Befund war das FIGO-Stadium unbekannt.

Das Alter der Patientinnen mit malignen Ovarialtumoren war signifikant höher als das Alter der Patientinnen mit benignen Ovarialtumoren ( $p = 0,021$ ) bzw. der Patientinnen mit semimaligen Ovarialtumoren ( $p = 0,045$ ). In der Kontrollgruppe existierte ein signifikanter Altersunterschied zu den Patientinnen mit malignen Ovarialtumoren ( $p = 0,045$ ). Die übrigen Studienkollektive unterschieden sich nicht signifikant im Alter.

Bezüglich des Body Mass Index (BMI) und der Hämoglobin-Konzentration zeigten sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb Studienkollektiv.

Die Thrombozytenkonzentration war in der Gruppe der malignen Ovarialtumoren am höchsten und unterschied sich signifikant von der Thrombozytenkonzentration in der Kontrollgruppe ( $p = 0,038$ ).

Die Leukozyten waren in der Kontrollgruppe am niedrigsten, gefolgt von den benignen Ovarialtumoren, den semimaligen Ovarialtumoren und den höchsten Werten bei den malignen Ovarialtumoren. In dieser Gruppe war die Leukozytenzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ( $p = 0,001$ ), jedoch nicht signifikant erhöht im Vergleich zum Kollektiv der benignen Ovarialtumoren ( $p = 0,067$ ).

Das CA125 unterschied sich signifikant zwischen den Patientinnen mit benignen und malignen Ovarialtumoren ( $p < 0,001$ ) sowie zwischen den Patientinnen mit semimaligen und malignen Ovarialtumoren ( $p = 0,017$ ). Auch das CA72-4 zeigte sich im Kollektiv der malignen Ovarialtumoren im Vergleich zur Gruppe der benignen ( $p = 0,001$ ) und zur Gruppe der semimaligen Ovarialtumore ( $p = 0,040$ ) signifikant erhöht.

Alle weiteren Parameter (Nikotinkonsum, Anamnese einer Hysterektomie und Zyklus) unterschieden sich nicht signifikant innerhalb des Studienkollektivs.

**Tabelle 5: Studienkollektiv** - Alter, BMI, Hämoglobin, Thrombozyten-, Leukozytenzahl und konventionelle Tumormarker in der Studienpopulation, bestehend aus Patientinnen mit malignen, semimaligen und benignen Ovarialtumoren, sowie der Kontrollgruppe; Daten präsentiert als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, (Minimum – Maximum) und Anzahl der untersuchten Probandinnen. Bei der Kontrollgruppe wurde keine Tumormarkerbestimmung durchgeführt.

\* = signifikanter Unterschied zwischen malignen Ovarialtumoren und Kontrollgruppe

\*\* = signifikanter Unterschied zwischen malignen und benignen Ovarialtumoren

\*\*\* = signifikanter Unterschied zwischen malignen und semimaligen Ovarialtumoren

Kollektiv	Maligne Tumore	Semimaligne Tumore	Benigne Tumore	Kontrollgruppe
<b>Alter</b>	62,1 $\pm$ 11,6*/**/** (33 - 78) (n = 16)	50,5 $\pm$ 10,5*** (41 - 64) (n = 6)	50,5 $\pm$ 17,4** (15 - 84) (n = 31)	56,6 $\pm$ 8,7* (38 - 78) (n = 50)
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23,9 $\pm$ 2,8 (19,9 - 29,1) (n = 16)	25,3 $\pm$ 5,9 (20,4 - 36,4) (n = 6)	24,6 $\pm$ 4,5 (18,8 - 38,6) (n = 30)	24,7 $\pm$ 3,7 (19,5 - 39,5) (n = 47)
<b>Hämoglobin (g/dl)</b>	13,1 $\pm$ 2,5 (5 - 16) (n = 16)	13,7 $\pm$ 1,0 (12 - 15) (n = 6)	13,8 $\pm$ 1,1 (11 - 16) (n = 30)	13,7 $\pm$ 0,8 (12 - 15) (n = 27)
<b>Thrombozytenzahl (G/l)</b>	351,4 $\pm$ 150,0* (172 - 721) (n = 16)	281,7 $\pm$ 47,8 (213 - 340) (n = 6)	278,2 $\pm$ 69,9 (132 - 405) (n = 29)	267,3 $\pm$ 66,0* (90 - 436) (n = 49)
<b>Leukozytenzahl (G/l)</b>	8,6 $\pm$ 1,7* (6,7 - 11,6) (n = 16)	7,82 $\pm$ 1,0 (6,7 - 9,6) (n = 6)	7,5 $\pm$ 2,2 (4,2 - 13,3) (n = 30)	6,8 $\pm$ 1,9* (3,3 - 11,8) (n = 47)
<b>CA125 (U/ml)</b>	733,3 $\pm$ 1066,5**/** (9 - 4052) (n = 16)	70,7 $\pm$ 81,7*** (11 - 186) (n = 6)	19,5 $\pm$ 13,5** (6 - 57) (n = 28)	(n = 0)
<b>CA72-4 (U/ml)</b>	54,0 $\pm$ 123,1**/** (0,7 - 432) (n = 16)	1,6 $\pm$ 0,8*** (0,6 - 2,6) (n = 6)	1,6 $\pm$ 2,0** (0,4 - 11,1) (n = 27)	(n = 0)

## 3.2 Mikropartikel

### 3.2.1 MP-Konzentrationen im Studienkollektiv

Für die Auswertung der MP-Konzentrationen im Studienkollektiv wurden 16 Patientinnen mit malignen, 6 mit semimalignen, 31 mit benignen Ovarialtumoren und insgesamt 50 gesunde Kontrollen untersucht.

Die Gesamtzahl der MP (Annexin V<sup>+</sup>-MP) zeigte die höchste Konzentration bei Patientinnen mit malignen Ovarialtumoren, ohne jedoch im Vergleich mit der Kontrollgruppe sowie den semimalignen und benignen Ovarialtumoren eine statistische Signifikanz zu erreichen.

Die Plättchen-MP (CD61<sup>+</sup>-MP) zeigten von allen gemessenen MP-Subpopulationen die höchste Konzentration. Die Unterschiede zwischen den Studiengruppen waren jedoch statistisch nicht signifikant. Die höchste Konzentration der PMP, die von aktivierten Thrombozyten stammen (CD63<sup>+</sup>-MP) zeigte die Gruppe mit malignen Ovarialtumoren und die Kontrollgruppe. Der Unterschied zwischen Patientinnen mit malignen und semimalignen Ovarialtumoren erwies sich als statistisch signifikant ( $p = 0,021$ ), ebenso der Unterschied zwischen malignen und benignen Ovarialtumoren ( $p = 0,008$ ). Zudem war die Konzentration an CD63<sup>+</sup>-MP in der Kontrollgruppe signifikant höher als bei semimalignen und benignen Ovarialtumoren ( $p < 0,001$  und  $p = 0,008$ ).

Bezüglich der Tumorzell-spezifischen MP (EpCAM<sup>+</sup>-MP) zeigten sich die höchsten Konzentrationen innerhalb der Kontrollgruppe. Signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe waren die EpCAM<sup>+</sup>-MP in der Gruppe mit malignen Ovarialtumoren ( $p = 0,005$ ), mit semimalignen ( $p < 0,001$ ) und benignen Ovarialtumoren ( $p < 0,001$ ).

Bei den endothelialen MP (CD144<sup>+</sup>-MP) zeigten sich die höchsten Konzentrationen in der Kontrollgruppe, die niedrigsten in der Gruppe der semimalignen Ovarialtumoren. Eine vergleichbare Konzentration fand sich zwischen benignen und malignen Ovarialtumoren. Fasst man die beiden Kollektive „semimaligne und maligne“ zusammen, so fand sich ein signifikanter Unterschied in der Konzentration der EMP im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p = 0,045$ ). Die Konzentration der EMP in der Gruppe der semimalignen Ovarialtumore war statistisch signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,002$ ) und als in der Gruppe der benignen Ovarialtumore ( $p = 0,025$ ). Auch der Unterschied zwischen benignen Ovarialtumoren und Kontrollgruppe erwies sich als statistisch signifikant ( $p = 0,049$ ).

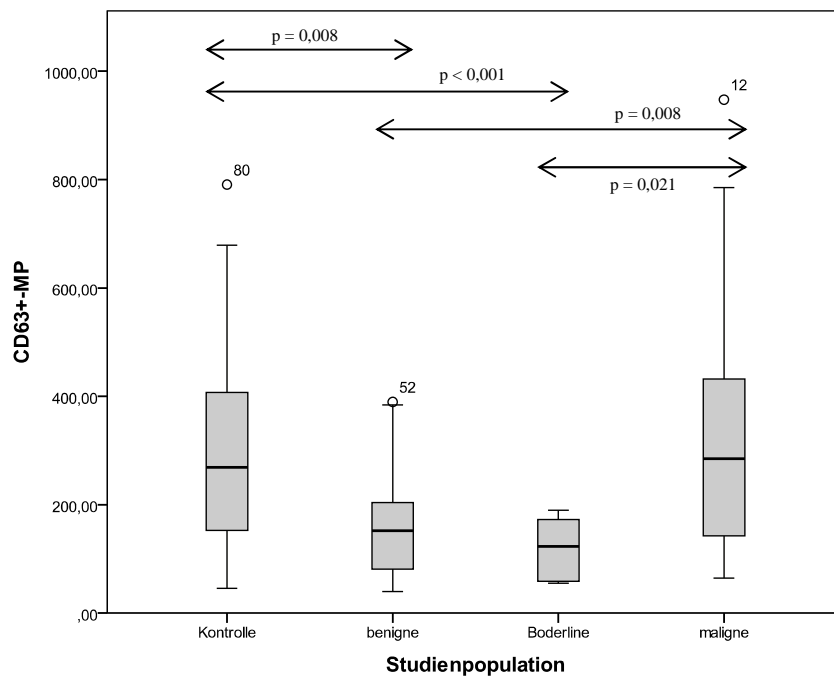


Die Unterschiede TissueFactor<sup>+</sup>-MP (CD142<sup>+</sup>-MP) innerhalb des Studienkollektivs erwiesen sich als statistisch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Die höchste Konzentration an TF<sup>+</sup>-MP ließ sich in der Kontrollgruppe messen, während maligne, semimaligne und benigne Ovarialtumore ähnliche Konzentrationen aufwiesen.

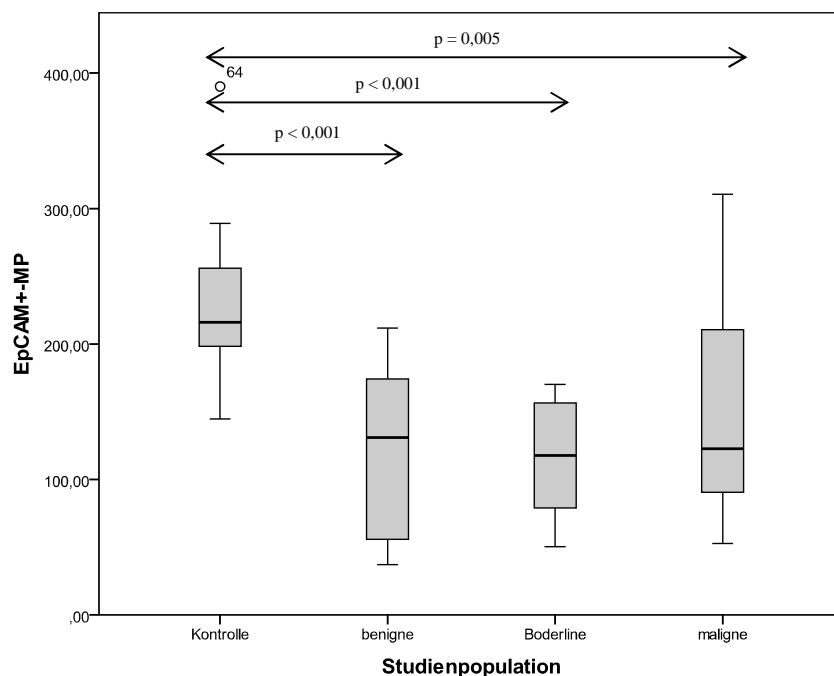
**Tabelle 6: Konzentration der MP-Subpopulationen (jeweils  $\times 10^6/l$ ) in den Studiengruppen** mit malignen, semimalignen und benignen Ovarialtumoren, sowie in der Kontrollgruppe; Daten präsentiert als Median, (Minimum - Maximum) und (Interquartilsabstand Q1 - Q3).

\* = signifikanter Unterschied zwischen malignen Ovarialtumoren und Kontrollgruppe  
 \*\* = signifikanter Unterschied zwischen malignen und benignen Ovarialtumoren  
 \*\*\* = signifikanter Unterschied zwischen malignen und semimalignen Ovarialtumoren  
 \*\*\*\* = signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und semimalignen Ovarialtumoren  
 \*\*\*\*\* = signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und benignen Ovarialtumoren  
 \*\*\*\*\* = signifikanter Unterschied zwischen benignen und semimalignen Ovarialtumoren

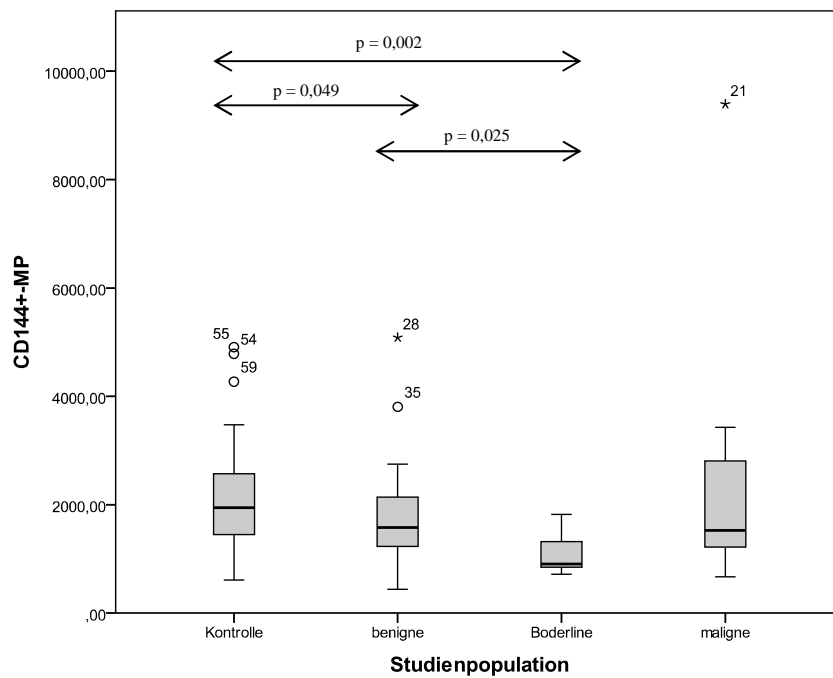
Kollektiv	AnV <sup>+</sup> -MP	CD61 <sup>+</sup> -MP	CD63 <sup>+</sup> -MP	EpCAM <sup>+</sup> -MP	CD142 <sup>+</sup> -MP	CD144 <sup>+</sup> -MP
<b>maligne</b> (n = 16)	5859 (2744 - 26746) (4480 - 8760)	4289 (2242 - 26006) (3420 - 8447)	285*/** (64 - 948) (142 - 432)	123* (53 - 311) (90 - 2239)	215 (118 - 281) (196 - 245)	1528 (671 - 9391) (1208 - 2893)
<b>semi-maligne</b> (n = 6)	4398 (2749 - 10438) (2998 - 6672)	3713 (2387 - 9859) (2543 - 6356)	123****/***** (55 - 190) (58 - 177)	118***** (50 - 170) (72 - 160)	199 (139 - 685) (155 - 365)	905****/***** (8715 - 1818) (8813 - 1443)
<b>benigne</b> (n = 31)	4882 (1434 - 12505) (3599 - 7371)	4231 (1216 - 10188) (2926 - 5899)	152***** (40 - 390) (79 - 212)	131***** (37 - 212) (53 - 177)	226 (106 - 523) (168 - 310)	1579***** (440 - 5083) (1212 - 2146)
<b>Kontrolle</b> (n = 44)	5099 (1343 - 13207) (3074 - 6284)	4513 (995 - 125519) (2673 - 5262)	269 (46 - 791) (152 - 421)	216 (145 - 390) (196 - 259)	272 (77 - 418) (169 - 341)	1945 (609 - 4908) (1434 - 2594)



**Abbildung 4: Konzentration der CD63<sup>+</sup>-MP (x10<sup>6</sup>/l) (y-Achse) in den Studienpopulationen (x-Achse), dargestellt als Boxplot; Daten präsentiert als Median und Interquartilsabstand; 12, 52 und 80 stellen Ausreißer innerhalb der einzelnen Gruppen dar; (p-Wert < 0,05 = signifikant).**



**Abbildung 5: Konzentration der EpCAM<sup>+</sup>-MP (x10<sup>6</sup>/l) (y-Achse) in den Studienpopulationen (x-Achse), dargestellt als Boxplot; Daten präsentiert als Median und Interquartilsabstand; 64 stellt einen Ausreißer innerhalb der Kontrollgruppe dar; (p-Wert < 0,05 = signifikant).**



**Abbildung 6: Konzentration der CD144<sup>+</sup>-MP (x10<sup>6</sup>/l) (y-Achse) in den Studienpopulationen (x-Achse), dargestellt als Boxplot; Daten präsentiert als Median und Interquartilsabstand; 21, 28, 35, 54, 55 und 59 stellen Ausreißer innerhalb der einzelnen Gruppen dar; (p-Wert < 0,05 = signifikant).**

### 3.2.2 MP-Konzentrationen in Abhängigkeit vom Tumorstadium

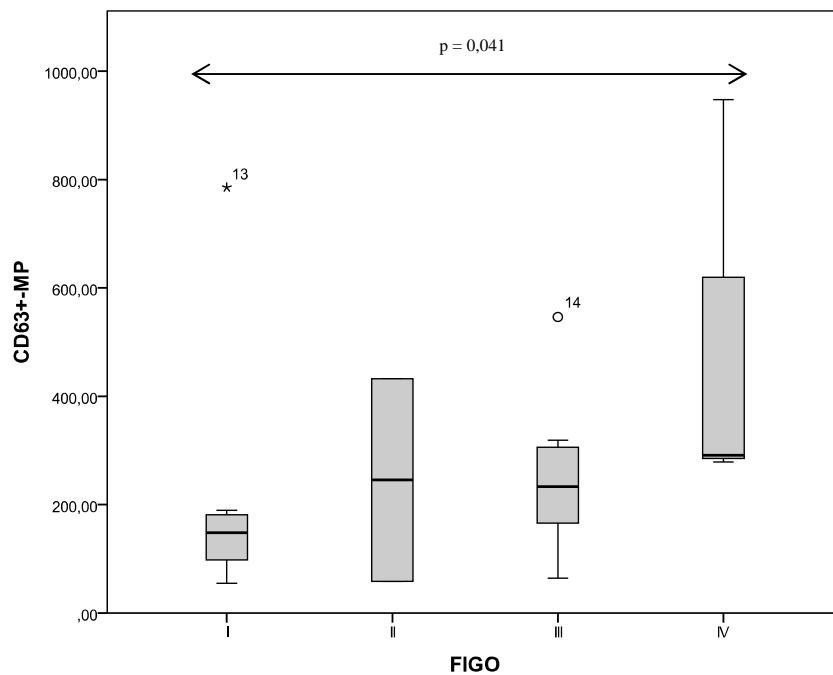
Zur Auswertung der MP-Konzentrationen bei den jeweiligen Tumorstadien konnten 20 Patientinnen herangezogen werden, von denen 15 Patientinnen einen malignen und 5 einen semimaligen Ovarialtumor aufwiesen.

Eine statistische Signifikanz konnte nur für die Konzentrationen der Plättchen-MP (CD63<sup>+</sup>-MP) im Vergleich der Tumorstadien FIGO I und FIGO IV nachgewiesen werden ( $p = 0,041$ ). Die Konzentrationen der Annexin V<sup>+</sup>-MP und der CD61<sup>+</sup>-MP stiegen mit zunehmendem Tumorstadium, jedoch ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen ( $p = 0,163$  und  $0,672$ ). Auch die übrigen MP-Subpopulationen zeigten einen z.T. deutlichen Anstieg ihrer Konzentration im Vergleich zwischen FIGO I und IV, ohne eine weitere Steigung in den Zwischenstadien II und III aufzuweisen.

**Tabelle 7: Konzentration der MP-Subpopulationen ( $\times 10^6/l$ ) nach FIGO;** Daten präsentiert als Median, (Minimum - Maximum) und (Interquartilsabstand Q1 - Q3).

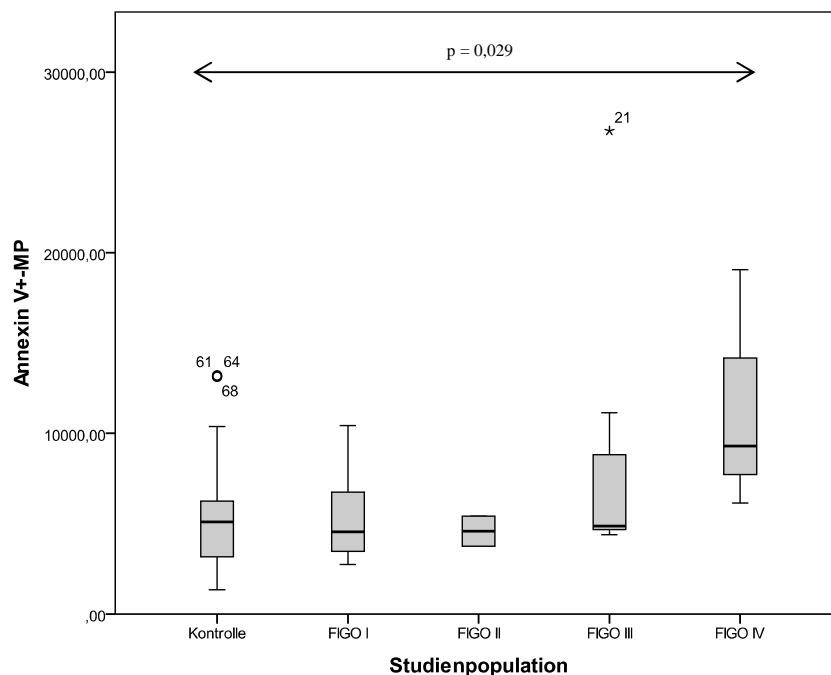
\* = signifikanter Unterschied der MP-Konzentration zwischen Stadium FIGO I und FIGO IV

	AnV <sup>+</sup> -MP	CD61 <sup>+</sup> -MP	CD63 <sup>+</sup> -MP	EpCAM <sup>+</sup> -MP	CD142 <sup>+</sup> -MP	CD144 <sup>+</sup> -MP
<b>FIGO I</b>	4540	4187	148*	137	211	1256
(n = 8)	(2744 - 10438)	(2387 - 9859)	(55 - 785)	(50 - 298)	(161 - 6859)	(715 - 2978)
	(3105 - 6952)	(2652 - 6505)	(96 - 185)	(69 - 167)	(194 - 235)	(974 - 1792)
<b>FIGO II</b>	4581	4249	246	114	188	775
(n = 2)	(3744 - 5417)	(3310 - 5189)	(59 - 433)	(89 - 139)	(118 - 258)	(671 - 878)
<b>FIGO III</b>	4873	4399	233	101	208	1588
(n = 7)	(4391 - 26746)	(2916 - 26006)	(64 - 546)	(59 - 311)	(150 - 278)	(748 - 9391)
	(4550 - 11139)	(3751 - 10361)	(143 - 319)	(90 - 236)	(192 - 246)	(1440 - 2638)
<b>FIGO IV</b>	9295	9028	291*	186	280	3190
(n = 3)	(6138 - 19064)	(2242 - 18008)	(279 - 948)	(80 - 256)	(195 - 281)	(1247 - 3431)

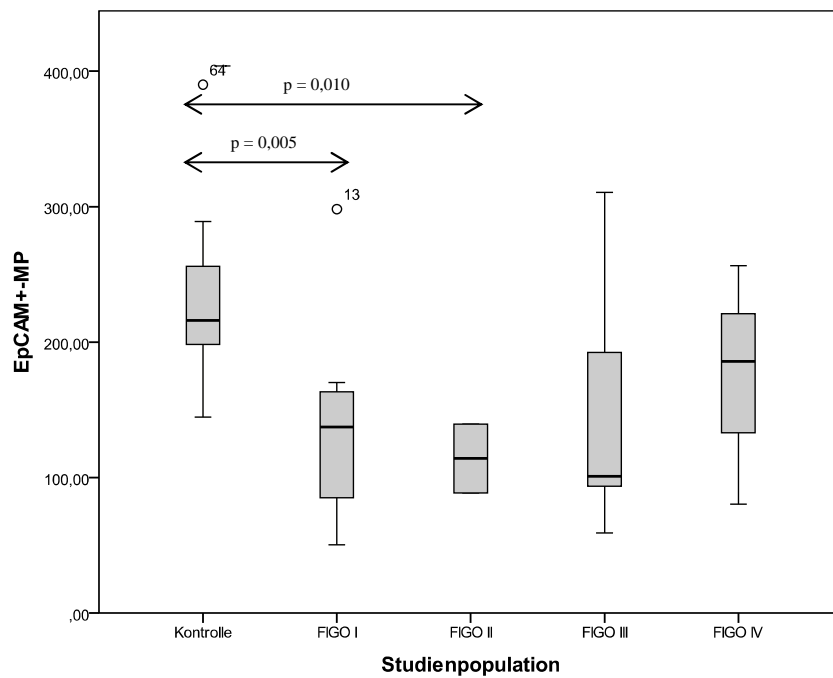


**Abbildung 7: Konzentration der CD63<sup>+</sup>-MP ( $\times 10^6/l$ ) (y-Achse) nach FIGO (x-Achse),** dargestellt als Boxplot; Daten präsentiert als Median und Interquartilsabstand; 13 und 14 stellen Ausreißer innerhalb der Stadien FIGO I und III dar; (p-Wert < 0,05 = signifikant).

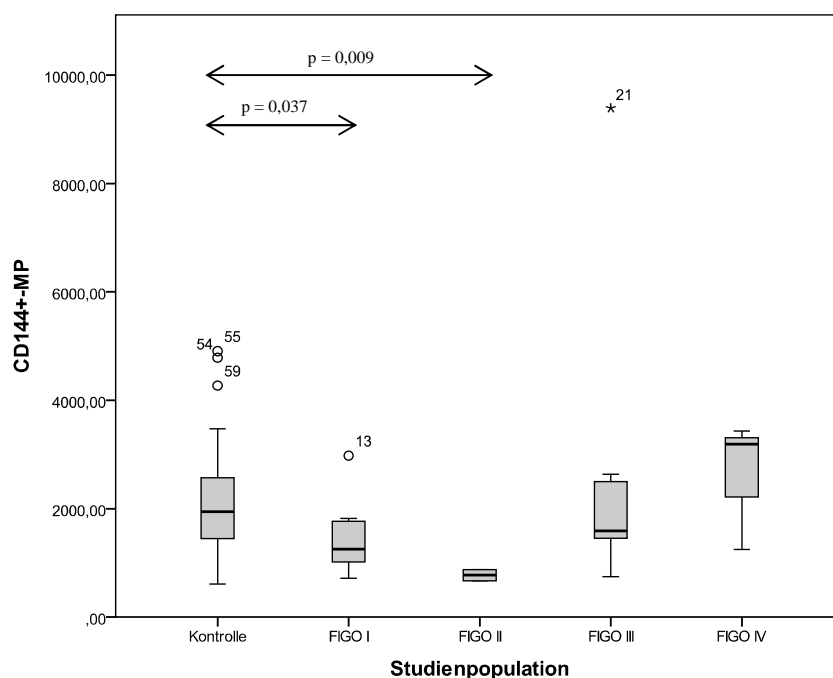
Vergleich man die Konzentration der MP in den Tumorstadien mit der Kontrollgruppe, zeigte sich ein signifikanter Unterschied für die EpCAM<sup>+</sup>-MP sowie für die CD144<sup>+</sup>-MP mit einer höheren Konzentration in der Kontrollgruppe. Die EpCAM<sup>+</sup>-MP waren sowohl im FIGO-Stadium I ( $p = 0,005$ ), als auch im Stadium II ( $p = 0,010$ ) deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe. Gleiches galt für die CD144<sup>+</sup>-MP ( $p = 0,037$  und  $p = 0,009$ ). Zudem zeigten sich die AnnexinV<sup>+</sup>-MP im FIGO-Stadium IV deutlich höher als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,029$ ).



**Abbildung 8: Konzentration der AnnexinV<sup>+</sup>-MP (x10<sup>6</sup>/l) (y-Achse) in der Kontrollgruppe sowie nach FIGO (x-Achse), dargestellt als Boxplot; Daten präsentiert als Median und Interquartilsabstand; 21, 61, 64 und 68 stellen Ausreißer innerhalb dem Stadium FIGO III und der Kontrollgruppe dar; ( $p$ -Wert  $< 0,05$  = signifikant).**

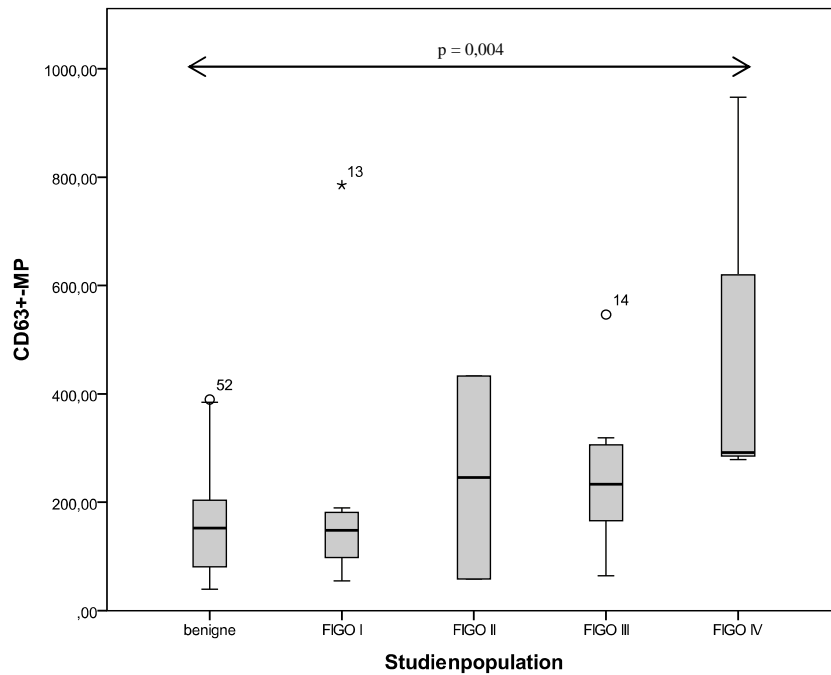


**Abbildung 9: Konzentration der EpCAM<sup>+</sup>-MP (x10<sup>6</sup>/l) (y-Achse) in der Kontrollgruppe sowie nach FIGO (x-Achse), dargestellt als Boxplot; Daten präsentiert als Median und Interquartilsabstand; 13 und 64 stellen Ausreißer innerhalb des Stadiums FIGO I und der Kontrollgruppe dar; (p-Wert < 0,05 = signifikant).**

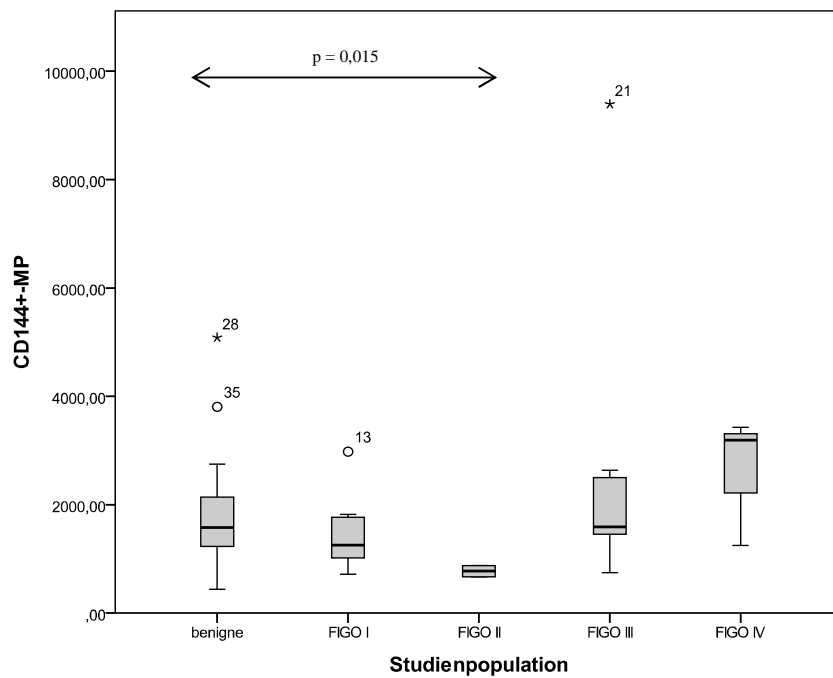


**Abbildung 10: Konzentration der CD144<sup>+</sup>-MP (x10<sup>6</sup>/l) (y-Achse) in der Kontrollgruppe sowie nach FIGO (x-Achse), dargestellt als Boxplot; Daten präsentiert als Median und Interquartilsabstand; 13, 21, 54, 55 und 59 stellen Ausreißer innerhalb des Stadiums FIGO I und III sowie der Kontrollgruppe dar; (p-Wert < 0,05 = signifikant).**

Vergleich man die MP-Subpopulationen in den FIGO-Stadien mit denen der Gruppe der benignen Ovarialtumore, so zeigten sich signifikant höhere Konzentrationen an CD63<sup>+</sup>-MP im FIGO-Stadium IV als in der Gruppe der benignen Ovarialtumore (p = 0,004). Zudem waren die CD144<sup>+</sup>-MP im FIGO-Stadium II signifikant niedriger als in der Gruppe der benignen Ovarialtumore (p = 0,015).



**Abbildung 11: Konzentration der CD63<sup>+</sup>-MP (x10<sup>6</sup>/l) (y-Achse) in der Gruppe der benignen Ovarialtumore und nach FIGO (x-Achse), dargestellt als Boxplot; Daten präsentiert als Median und Interquartilsabstand; 13, 14 und 52 stellen Ausreißer innerhalb der Stadien FIGO I und III sowie der Gruppe der benignen Ovarialtumore dar; (p-Wert < 0,05 = signifikant).**



**Abbildung 12: Konzentration der CD144<sup>+</sup>-MP (x10<sup>6</sup>/l) (y-Achse) in der Gruppe der benignen Ovarialtumore und nach FIGO (x-Achse), dargestellt als Boxplot; Daten präsentiert als Median und Interquartilsabstand; 13, 21, 28 und 35 stellen Ausreißer innerhalb der Stadien FIGO I und III sowie der Gruppe der benignen Ovarialtumore dar; (p-Wert < 0,05 = signifikant).**

### 3.2.3 MP-Konzentrationen prä- und postoperativ

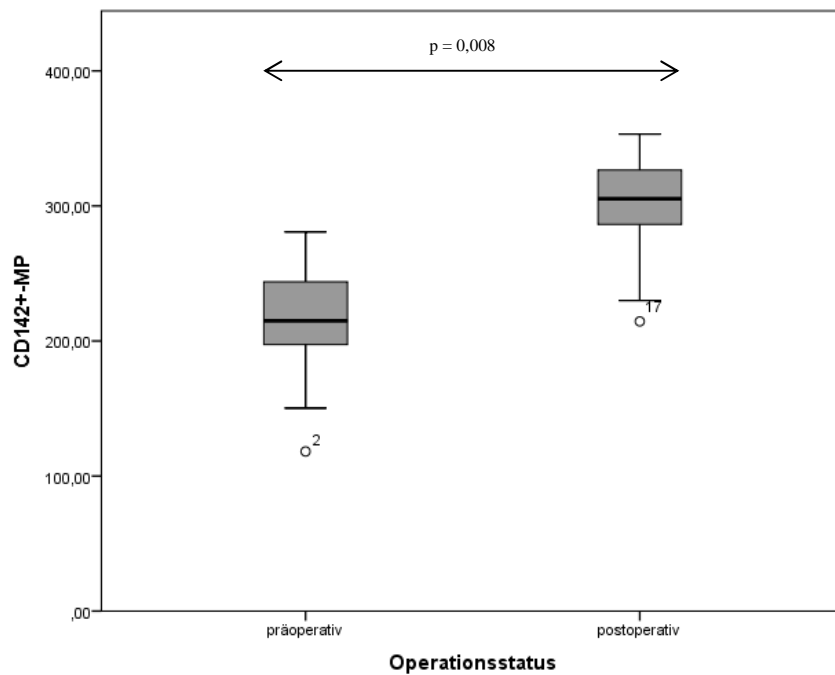
Bei 9 Patientinnen mit malignem Ovarialtumor wurde am 4.-6. postoperativen Tag eine zweite Blutprobe für die MP-Bestimmung entnommen. Im prä- vs. postoperativen Vergleich der MP-Subpopulationen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Konzentration der TF<sup>+</sup>- (CD142<sup>+</sup>-)MP (p = 0,008).

**Tabelle 8: Konzentration der MP-Subpopulationen (x10<sup>6</sup>/l) im prä- und postoperativen Vergleich; Daten präsentiert als Median, (Minimum – Maximum) und (Interquartilsabstand Q1 - Q3) im Kollektiv der malignen Ovarialtumoren.**

\* kennzeichnet signifikante Unterschiede.

	AnV <sup>+</sup> -MP	CD61 <sup>+</sup> -MP	CD63 <sup>+</sup> -MP	EpCAM <sup>+</sup> -MP	CD142 <sup>+</sup> -MP	CD144 <sup>+</sup> -MP
<b>präoperativ</b> (n = 16)	5859 (2744 – 26746) (4480 – 8760)	4289 (2242 – 26006) (3420 – 8447)	285 (64 – 948) (142 – 432)	123 (53 – 311) (90 – 223)	215* (118 – 281) (196 – 245)	1528 (671 – 9392) (1208 – 2893)
<b>postoperativ</b> (n = 9)	6073 (2091 – 13325) (3781 – 10568)	5263 (1823 – 11116) (3300 – 9719)	270 (79 – 1197) (164 – 480)	151 (42 – 195) (127 – 180)	305* (214 – 353) (258 – 336)	1724 (1145 – 6111) (1464 – 3080)





**Abbildung 13: Konzentration der CD142<sup>+</sup>-MP (x10<sup>6</sup>/l) (y-Achse) im prä- und postoperativen Vergleich (x-Achse) als Boxplot; Daten präsentiert als Median und Interquartilsabstand; 2 und 17: Patientinnen mit CD142<sup>+</sup>-MP-Konzentration unterhalb des Interquartilsabstandes; (p-Wert < 0,05 = signifikant).**

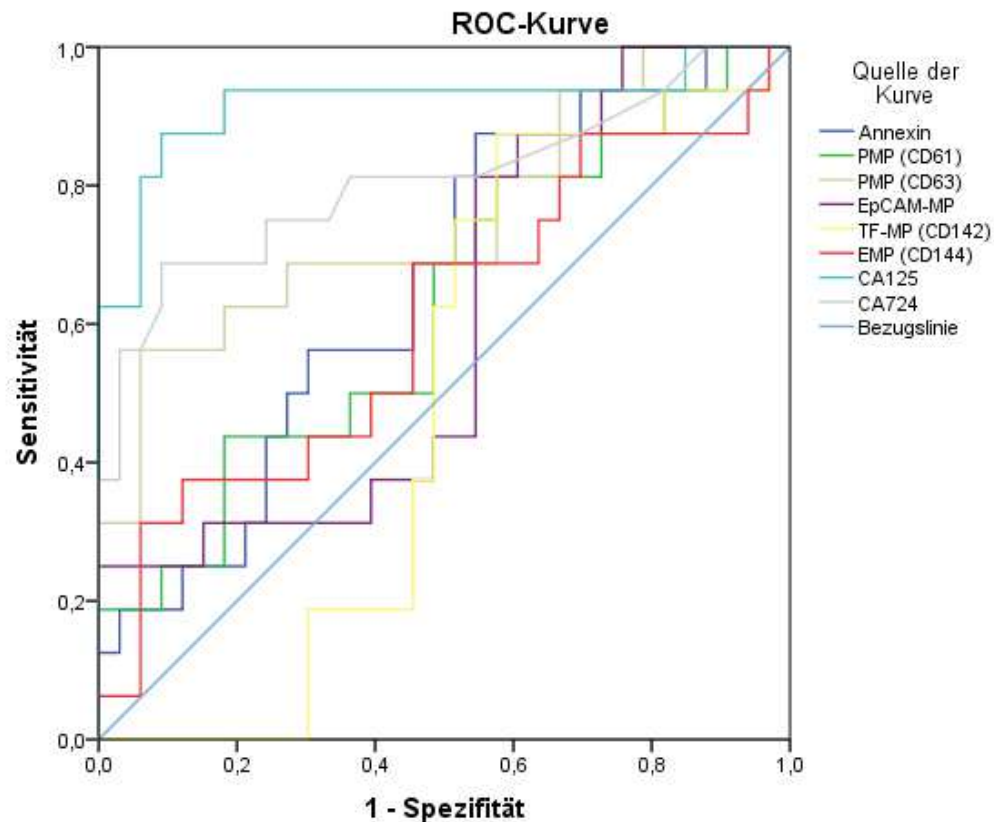
### 3.2.4 Sensitivitäts- und Spezifitätsunterschiede zu CA125 und CA72-4

Im Vergleich der ROC-Kurven zeigt CA125, gefolgt von CA72-4 bezogen auf die Zustandsvariable „Malignität“ die höchste Sensitivität und Spezifität. Sämtliche MP-Subpopulationen zeigen sich im Vergleich zu den konventionellen Tumormarkern als weniger sensitiv. Innerhalb der Mikropartikel weisen die CD63<sup>+</sup>-MP die höchste Sensitivität und Spezifität auf, gefolgt von den AnnexinV<sup>+</sup>-MP und den CD61<sup>+</sup>-MP.

Verarbeitete Fälle: positiv (n = 16), negativ (n = 33), fehlend (n = 58).

**Tabelle 9: Flächen unter der ROC-Kurve (Area under the curve [AUC]) bezogen auf die Zustandsvariable „Malignität“**

	AnV <sup>+</sup> - MP	CD61 <sup>+</sup> - MP	CD63 <sup>+</sup> - MP	EpCAM <sup>+</sup> - MP	CD142 <sup>+</sup> - MP	CD144 <sup>+</sup> - MP	CA125	CA72-4
AUC	0,657	0,623	0,752	0,600	0,489	0,604	0,919	0,808



Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

**Abbildung 14: ROC-Kurven für alle MP-Subpopulationen und die Tumormarker CA125 und CD72-4 für die Zustandsvariable „Malignität“.** Die Bezugslinie stellt das zu erwartende Ergebnis eines Zufallsprozesses (Fläche unter der Kurve von 0,5) dar. (Sensitivität = richtig positive Ergebnisse [y-Achse]; 1-Spezifität = falsch positive Ergebnisse [x-Achse]).

### 3.2.5 Assoziation zwischen MP und D-Dimeren

#### 3.2.5.1 D-Dimere im Studienkollektiv

Es besteht ein signifikanter Unterschied in der Gerinnungsaktivität (gemessen als D-Dimer-Konzentration) bei den einzelnen Studienkollektiven ( $p < 0,001$ ). Der Unterschied der Höhe der D-Dimere erweist sich als statistisch signifikant zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der malignen Ovarialtumoren ( $p < 0,001$ ), zwischen den benignen und malignen Ovarialtumoren ( $p < 0,001$ ) sowie zwischen den semimalignen und den malignen Ovarialtumoren ( $p = 0,001$ ).

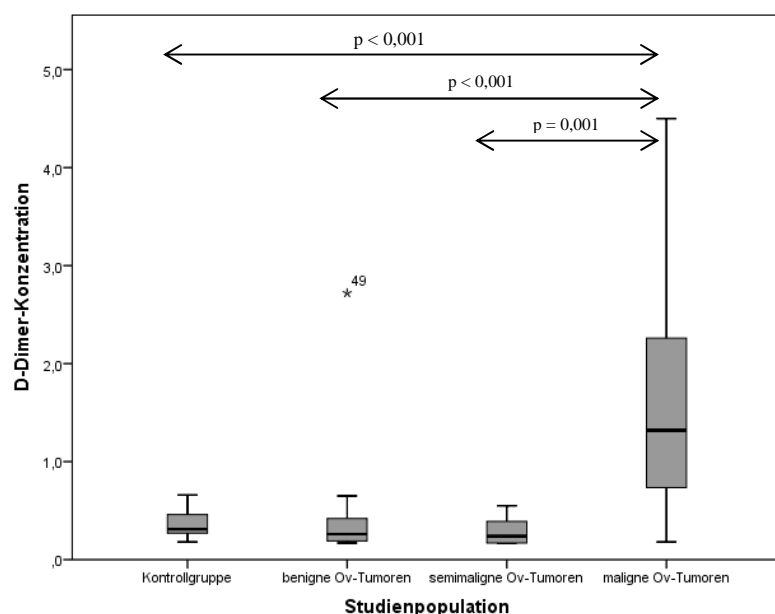
**Tabelle 10: Konzentration der D-Dimere ( $\mu\text{g/ml}$ ) im Studienkollektiv;** Daten präsentiert als Median, (Minimum – Maximum), (Interquartilsabstand Q1 – Q3) und Anzahl der untersuchten Probandinnen.

\* = signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und malignen Ovarialtumoren

\*\* = signifikanter Unterschied zwischen benignen und malignen Ovarialtumoren

\*\*\* = signifikanter Unterschied zwischen semimaligen und malignen Ovarialtumoren

	Kontrollgruppe	benigne Tumore	semimaligne Tumore	maligne Tumore
<b>präoperativ</b>	0,31* (0,2 - 0,7) (0,27 - 0,52) (n = 12)	0,26** (0,2 - 2,7) (0,19 - 0,44) (n = 29)	0,24*** (0,2 - 0,6) (0,17 - 0,43) (n = 6)	1,3*/**/** (0,2 - 4,5) (0,73 - 2,42) (n = 16)
<b>postoperativ</b>			2,48 (2,5 - 2,5) (2,48 - 2,48) (n = 0)	4,49 (3,0 - 4,5) (4,48 - 4,5) (n = 8)



**Abbildung 15: Präoperative D-Dimer-Konzentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) (y-Achse) in den Studienpopulationen (x-Achse) als Boxplot;** Daten präsentiert als Median und Interquartilsabstand; 49 stellt einen Ausreißer innerhalb der Gruppe der benignen Ovarialtumoren dar; (p-Wert < 0,05 = signifikant).

### 3.2.5.2 D-Dimere in Abhängigkeit vom Tumorstadium

Die Konzentration der D-Dimere unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Tumorstadien FIGO I-IV sowohl im prä- als auch im postoperativen Vergleich ( $p > 0,05$ ).

**Tabelle 11: Konzentration der D-Dimere ( $\mu\text{g/ml}$ ) nach FIGO-Stadium;** Daten präsentiert als Median, (Minimum – Maximum), (Interquartilsabstand Q1 – Q3) und Anzahl der untersuchten Probandinnen.

	<b>FIGO I</b>	<b>FIGO II</b>	<b>FIGO III</b>	<b>FIGO IV</b>
<b>präoperativ</b>	0,64 (0,2 - 4,5) (0,17 - 1,66) (n = 8)	0,25 (0,2 - 0,3) (0,18 - 0,25) (n = 2)	1,32 (0,6 - 4,2) (0,61 - 2,57) (n = 7)	1,76 (0,8 - 4,5) (0,75 - 1,76) (n = 3)
<b>postoperativ</b>	4,48 (2,5 - 4,5) (2,48 - 4,48) (n = 3)	(n = 0)	4,5 (4,5 - 4,5) (4,48 - 4,5) (n = 5)	2,96 (3,0 - 3,0) (2,96 - 2,96) (n = 1)

### 3.2.5.3 D-Dimere in Vergleich zwischen prä- und postoperativ

In der Gruppe der malignen Ovarialtumoren unterscheidet sich die Höhe der D-Dimere statistisch signifikant im Vergleich zwischen präoperativ und postoperativ ( $p = 0,018$ ) mit höheren Konzentrationen postoperativ.

**Tabelle 12: Konzentration der D-Dimere ( $\mu\text{g/ml}$ ) in Anhängigkeit vom OP-Zustand;** Daten präsentiert als Median, (Minimum – Maximum), (Interquartilsabstand Q1 – Q3) und Anzahl der untersuchten Probandinnen.

<b>OP-Zustand</b>	<b>präoperativ</b>	<b>postoperativ</b>
<b>D-Dimere (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	1,3 (0,2 - 4,5) (0,73 - 2,42) (n = 16)	4,49 (3,0 - 4,5) (4,48 - 4,5) (n = 8)

#### 3.2.5.4 Korrelation der MP-Subpopulationen mit der D-Dimer-Konzentration bei den malignen Ovarialtumoren

In der Gruppe der malignen Ovarialtumore besteht präoperativ eine Korrelation zwischen der Konzentration an Annexin V<sup>+</sup>-MP ( $r = 0,299$ ,  $p = 0,024$ ), CD63<sup>+</sup>-MP ( $r = 0,421$ ,  $p = 0,001$ ), CD144<sup>+</sup>-MP ( $r = 0,281$ ,  $p = 0,026$ ) und der Gerinnungsaktivität (gemessen als D-Dimer-Konzentration).

Postoperativ kann keine Korrelation zwischen MP-Subpopulationen und D-Dimer-Konzentration nachgewiesen werden.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden prospektiven Fall-Kontroll-Studie wurden zirkulierende MP bei Patientinnen mit benignen und malignen Ovarialtumoren sowie bei einer gesunden Kontrollgruppe analysiert. Zudem wurde erforscht, inwieweit MP als Tumormarker bzw. als Marker für eine vermehrte Gerinnungsaktivität dienen.

Die Konzentration der CD63<sup>+</sup>-MP zeigte sich in der Gruppe der malignen Ovarialtumore signifikant höher als in den beiden anderen Gruppen. Zudem fand sich eine höhere Gesamt-MP-Konzentration bei Ovarialkarzinompatientinnen im Vergleich zu benignen Ovarialtumoren bzw. der Kontrollgruppe. Schlüsselt man die Gruppe der malignen Ovarialtumoren nach Tumorstadium auf, so lassen sich signifikant höhere Annexin V<sup>+</sup>-MP (AnV<sup>+</sup>-MP) im Tumorstadium FIGO IV im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen.

Diese Ergebnisse stützen die bisherige Datenlage, dass MP in Prozesse wie Angiogenese [76, 60, 87, 130, 78] und Metastasierung [77, 131, 132, 133, 134] von Tumoren involviert sind. In der Literatur gibt es bezüglich der AnV<sup>+</sup>-MP bisher widersprüchliche Aussagen. Zahra et al. zeigten 2011 [135], dass sich die Anzahl AnV<sup>+</sup>-MP bei gynäkologischen Tumoren nicht signifikant von einer Kontrollgruppe unterschied. Eine große Studie von Thaler et al. konnte 2011 [136] bei Krebspatienten jedoch signifikant erhöhte AnV<sup>+</sup>-MP im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe feststellen. Insgesamt wurden in dieser Studie 728 Krebspatienten unterschiedlicher Tumorentitäten (u.a. Mammakarzinome, Bronchialkarzinome, Magenkarzinome, Kolorektale Karzinome, Lymphome etc.) eingeschlossen. Möglicherweise liegen die kontroversen Ergebnisse darin begründet, dass nicht bei allen Tumorentitäten erhöhte Gesamt-MP-Konzentrationen vorliegen. Bei beiden Studien wurden verschiedene Tumorerkrankungen untersucht und es erfolgte keine Fokussierung auf eine Tumorentität. Außerdem wurde bei beiden Studien das Tumorstadium nicht berücksichtigt, das, wie unsere Daten zeigen, von entscheidender Bedeutung für das Ergebnis sein kann. In Übereinstimmung mit unseren Daten konnten Liebhardt et al. 2010 bei Mammakarzinompatientinnen mit Lymphknotenmetastasen signifikant höhere Konzentrationen an AnV<sup>+</sup>-, CD66<sup>+</sup>-, BCRP1<sup>+</sup>- und Hsp27<sup>+</sup>- MP feststellen als bei einer gesunden Kontrollgruppe [137].

Thrombozytäre MP (PMP) wie CD61<sup>+</sup>- und CD63<sup>+</sup>-MP, stellen die Hauptpopulation der MP im Plasma dar [83] und sind mit einer Größe von 0,02-0,1µm kleiner als andere MP-Subpopulationen [138]. In unserer Studie zeigten die CD63<sup>+</sup>-MP in der Karzinom-Gruppe

signifikant höhere Werte als in der Gruppe mit den semimaligen und benignen Ovarialtumoren, während sich für die CD61<sup>+</sup>-MP keine Konzentrationsunterschiede zwischen den Studienkollektiven feststellen ließen. Betrachtet man die Werte in Abhängigkeit vom Tumorstadium, so stellt man einen stetigen Anstieg der CD61<sup>+</sup>-MP zwischen Stadium FIGO I und IV fest. Hier konnte allerdings keine statistische Signifikanz erreicht werden. Dies gelang nur für CD63<sup>+</sup>-MP im Stadium IV im Vergleich zum Stadium I. Man könnte also postulieren, dass CD63<sup>+</sup>-MP in den Prozess der Fernmetastasierung involviert sind, was bereits für Thrombozyten gezeigt werden konnte [139, 140] und dass sie als Marker für fortgeschrittene Tumorstadien eingesetzt werden könnten. Tatsächlich wurde bereits in diversen Studien gezeigt, dass PMP in Prozesse wie Tumorprogression, -angiogenese und -metastasierung involviert sind [75, 76, 77, 78]. Kim et al. fanden 2002 erhöhte Konzentrationen an zirkulierenden CD41<sup>+</sup>-PMP, VEGF, IL-6 und RANTES bei Patienten mit Magenkarzinom und stellten einen möglichen Einsatz von PMP für die Detektion bereits metastasierter Karzinompatienten in Aussicht [141].

Die signifikante Erhöhung der CD63<sup>+</sup>-MP als Indikator für eine Thrombozytenaktivierung [142] bei den Ovarialkarzinompatientinnen legt eine Aktivierung der Hämostase nahe, wie durch die Auswertung der D-Dimere mit signifikant erhöhten Werten in der Gruppe der malignen Ovarialtumoren bekräftigt werden konnte. Zudem zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Konzentration CD63<sup>+</sup>-MP und der D-Dimer-Konzentration. Eventuell ist eine erhöhte Konzentration CD63<sup>+</sup>-MP bei Ovarialkarzinompatientinnen ein Faktor, welcher zum erhöhten Risiko für das Auftreten einer VTE beiträgt.

Thrombozytäre MP sind potente Initiatoren des plasmatischen Gerinnungssystems [143]. Sie haben 50-100mal höhere gerinnungsfördernde Fähigkeiten als die identische Oberfläche aktivierter Thrombozyten [143]. Sie tragen neben PS auch F.V/Va, GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, Membranrezeptoren für Gerinnungsfaktoren und signifikante Mengen an vWF an ihrer Oberfläche, die alle zusammen vermutlich zu den prothrombotischen Fähigkeiten von PMP beitragen [144, 69, 145]. Zudem konnte festgestellt werden, dass das Thrombusgewicht mit der PMP-Konzentration korreliert [146]. Ähnlich zu unserem Studienergebnis konnten bei Patientinnen mit Mamma-Karzinom im Vergleich zu einer Gruppe mit benignen Mamma-Tumoren erhöhte Konzentrationen an MP gemessen werden, die Thrombozytenaktivierungsmarker trugen [147]. Auch Caine et al. [148] zeigten eine erhöhte Rate an aktivierten Thrombozyten bei Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomen und stützen die hier vorliegenden Ergebnisse. Insgesamt wurden auch in unserer Studie in der Gruppe der malignen Ovarialtumoren die höchsten Thrombozytenkonzentrationen festgestellt. Diese

unterschieden sich signifikant von denen der Kontrollgruppe, aber nicht signifikant von den Patientinnen mit den semimaligen und benignen Ovarialtumoren. Thrombozyten sind in der Lage, zur Metastasierung und zum Wachstum von Tumoren beizutragen [139, 140], weshalb eine Erhöhung im Blut der Betroffenen nicht verwunderlich ist.

Gegenstand derzeitiger Diskussionen ist der zelluläre Ursprung von „thrombozytären MP“ [149, 150, 151]. Es wird vermutet, dass  $CD61^{+}$ -MP von Megakaryozyten freigesetzt werden [149, 151], während bekräftigt wurde, dass  $CD63^{+}$ -MP von aktivierten Thrombozyten stammen. Da Thrombozyten im Gegensatz zu Megakaryozyten eine Rolle beim Wachstum eines Tumors sowie bei der Metastasierung spielen [139, 140], könnte man postulieren, dass Ähnliches für ihre jeweiligen MP gilt. Wenn also  $CD61^{+}$ -MP in Wahrheit von Megakaryozyten stammen und  $CD63^{+}$ -MP thrombozytären Ursprungs sind, wäre es nicht abwegig, dass lediglich die  $CD63^{+}$ -MP im Rahmen einer Krebserkrankung – in unserem Fall dem Ovarialkarzinom – erhöht sind.

Ein Vergleich unserer Ergebnisse mit denen anderer Studien wird erschwert durch die uneinheitliche Definition thrombozytärer Mikropartikel durch ihre Oberflächenantigene. Häufig verwendete Marker sind CD41, CD42, CD61, CD62P und CD63. Bisherige Studien, bei denen erhöhte PMP-Konzentrationen mit malignen Erkrankungen assoziiert waren, verwendeten oft CD41 und CD42 als thrombozytäre Marker [152, 78]. Zudem muss erwähnt werden, dass es aufgrund der unteren Nachweisgrenze der Durchflusszytometrie von ca. 500nm und der teils sehr geringen PMP-Größe oft zur Messung von falsch niedrigen PMP-Konzentrationen kommt.

Tumorzellen setzen – ebenso wie alle anderen eukaryotischen Zellen – MP (sog. Tumor-MP oder TMP) frei. So wurden in unserer Studie  $EpCAM^{+}$ -MP bestimmt, da Ovarialkarzinome vielfach epithelialen Ursprungs sind. Es konnten keine erhöhten  $EpCAM^{+}$ -MP bei den malignen und semimaligen Tumoren festgestellt werden. Vielmehr zeigten sich signifikant höhere Werte bei der Kontrollgruppe im Vergleich zu den übrigen Kollektiven und auch (nicht signifikant) höhere Werte bei den benignen Tumoren als bei den malignen. Im Vergleich der Kontrollgruppe mit den Karzinompatientinnen waren die  $EpCAM^{+}$ -MP jedoch nur in den frühen Tumorstadien (FIGO I und II) signifikant niedriger, nicht jedoch in den Stadien FIGO III und IV. Hier war der Unterschied nicht signifikant.

TMP haben phänotypische Eigenschaften der entsendenden Tumorzelle und sind mit Onkoproteinen [86], mRNA [153] und anderen bioaktiven Stoffen ausgestattet. Mit Hilfe ihrer Fracht tragen die TMP zur Tumorprogression, -angiogenese und –metastasierung bei



[73, 74, 84, 85, 86]. Möglicherweise entsenden Ovarialkarzinomzellen v.a. in den frühen Tumorstadien EpCAM<sup>+</sup>-MP nicht primär in die Zirkulation, sondern in die lokale Umgebung. Erst kürzlich konnten Press et al. 2012 im Aszites von fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinomen eine hohe Anzahl EpCAM<sup>+</sup>-MP feststellen [154]. Auch in unserer Studie konnten im Tumorstadium FIGO IV, welches durch Fernmetastasen gekennzeichnet ist, deutlich höhere Konzentrationen an EpCAM<sup>+</sup>-MP gemessen werden als im Stadium FIGO I, jedoch ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen. Welche Rolle EpCAM<sup>+</sup>-MP bei der Fernmetastasierung maligner Tumoren spielen, sollte in künftigen Studien weiter untersucht werden.

Um einen möglichen Einfluss von endothelialen MP bei malignen Prozessen, z.B. Tumor-Angiogenese oder –metastasierung zu untersuchen, wurde im vorliegenden Studienkollektiv auch die Konzentration dieser MP-Subpopulation. Die Ergebnisse zeigten, dass die EMP in der Kontrollgruppe signifikant höher waren als in der Gruppe der benignen und der Gruppe der malignen inklusive semimalignen Ovarialtumoren, v.a. in den frühen Tumorstadien FIGO I und II. In der Gruppe der semimalignen Ovarialtumoren ließen sich die niedrigsten EMP-Konzentrationen messen mit signifikantem Unterschied zur Gruppe der benignen Tumoren. Die EMP-Konzentrationen in den Gruppen der malignen und benignen Ovarialtumoren waren ähnlich. Da zur Detektion der EMP der endotheliale Oberflächenmarker CD144 (VE-Cadherin) verwendet wurde, stimmen die vorliegenden Ergebnisse mit denen von Ferdeghini et al. [155] überein, die feststellten, dass die präoperativen Plasmalevel des endothelialen Aktivierungsmarkers E-Selektin ebenfalls keinen Unterschied zwischen Patienten mit gutartigen und bösartigen Ovarialtumoren zeigten [156].

Die höheren EMP-Konzentrationen bei der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Tumor-Kollektiven lassen sich eventuell dadurch erklären, dass der Effekt von EMP auf die Angiogenese dosisabhängig ist, und dass EMP in vitro die Angiogenese in niedrigen Konzentrationen fördern, während sie sie in hohen Konzentrationen hemmen [79]. Der proangiogenetische Effekt wird hierbei vermutlich über Matrixmetalloproteinasen vermittelt [157].

Gewebefaktor (TF) fungiert neben seiner Rolle als Initiator des extrinsischen Wegs der Blutgerinnung als Regulator von Tumorwachstum, -angiogenese und –metastasierung [82]. Er vermittelt die Hochregulierung von EGF (endothelial growth factor), wodurch TF<sup>+</sup>-MP Endothelzellen zur Gefäßbildung stimulieren könnten [83]. TF<sup>+</sup>-MP sind eine Quelle für TF

innerhalb des Blutflusses und werden auch als sog. blood-borne TF bezeichnet. Die meisten TF<sup>+</sup>-MP werden vermutlich von Monozyten [107] und im Rahmen von Krebserkrankungen von Tumorzellen freigesetzt [107, 81, 158]. In der vorliegenden Studie unterschieden sich die Konzentrationen der TF<sup>+</sup>-MP nicht signifikant zwischen den Studienkollektiven. Innerhalb der Gruppe der Ovarialkarzinome zeigten sich die höchsten Werte im Stadium FIGO IV, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen. 1983 demonstrierten Dvorak et al., dass PS<sup>+</sup>- und TF<sup>+</sup>-MP von kultivierten Krebszellen freigesetzt werden [159]. Sie vermuteten, dass diese MP das Tumorstadium begünstigen. Diese Hypothese wurde in einer Vielzahl von Studien bestätigt [81, 160]. Erhöhte TF<sup>+</sup>-MP wurden inzwischen bei diversen Krebserkrankungen, wie z.B. dem Kolorektalen Karzinom entdeckt [101, 102, 104, 161]. Möglicherweise werden aber TF<sup>+</sup>-MP, die im Rahmen maligner Erkrankungen v.a. von Tumorzellen freigesetzt werden [107, 81, 158], wie bereits für die EpCAM<sup>+</sup>-MP vermutet, nicht primär in die Zirkulation entsandt, sondern in die lokale Umgebung des Tumors. Graves et al. fanden 2004 höhere Konzentrationen an MMP- und uPA-reichen MP im Aszites von Patientinnen mit späten Stadien von Ovarialkarzinom als bei Patientinnen mit frühen Stadien [162]. Es wäre also durchaus denkbar, dass abhängig von der Tumormasse und der Progression eine zunehmende Anzahl TF<sup>+</sup>-MP in die lokale Tumorumgebung freigesetzt wird. Es sind weitere Untersuchungen nötig, um diese Vermutung zu bekräftigen.

Zwicker et al. konnten 2009 feststellen, dass in der üblichen Licht-streuenden Durchflusszytometrie wie sie in unserer Studie verwendet wurde, keine erhöhten TF<sup>+</sup>-MP bei Karzinompatienten gemessen werden konnten, während dies durch Nutzung der Impedanz-basierten Durchflusszytometrie sehr wohl der Fall war. So konnte diese Forschergruppe erhöhte TF<sup>+</sup>-MP bei Pankreas-, Mamma-, Kolon- und Ovarialkarzinomen feststellen [163].

Neben oben genannter Rolle von TF<sup>+</sup>-MP für Tumorstadium, -angiogenese und -metastasierung konnte gezeigt werden, dass von Tumorzellen freigesetzte TF<sup>+</sup>-MP gerinnungsfördernde Fähigkeiten haben und mit venösen Thromboembolien assoziiert sind [163, 164, 104, 105, 102, 103]. TF<sup>+</sup>-MP dienen vermutlich der Aufrechterhaltung der Gerinnung und dem Größenwachstum des Thrombus [165, 166]. Hron et al. stellten 2007 zweifach höhere Konzentrationen an TF<sup>+</sup>-MP bei Patienten mit Kolorektalem Karzinom fest als bei der Kontrollgruppe und diese TF<sup>+</sup>-MP korrelierten mit der Höhe der D-Dimere [104]. Beides konnte in unserer Studie beim Ovarialkarzinom nicht bekräftigt werden. Wie bereits oben diskutiert, könnte eine mögliche Ursache für die fehlende Erhöhung der TF<sup>+</sup>-MP in unserer Studie die Wahl der Messmethode und die Wahl des zu untersuchenden Materials (Blut vs. Aszites) sein. Zudem könnten - wie bereits von Rank et al. 2012 [156] gemutmaßt,

die Ergebnisse unserer Studie auf einen Selektions-Bias zurückgeführt werden. Möglicherweise exprimierten die Ovarialkarzinomzellen der in unsere Studie eingeschlossenen Patientinnen nur eine schwache oder fehlende TF-Aktivität, was von der Tatsache gestützt wird, dass keine unserer Patientinnen eine VTE erlitt [156]. Es gab jedoch kein Follow-up, um zu klären, ob künftig VTEs entwickelt wurden. Zwicker et al. untersuchten in einem 2-Jahres-Follow-up 30 Krebspatienten mit VTE und 60 Krebspatienten ohne VTE und konnten feststellen, dass die Anwesenheit TF<sup>+</sup>-MP bei Krebspatienten mit einem 7fach erhöhten Risiko für eine künftige VTE einherging, im Vergleich zu Krebspatienten, die keine TF<sup>+</sup>-MP im Blut aufwiesen [105]. Dies legt nahe, dass erhöhte Konzentrationen an TF<sup>+</sup>-MP als prädiktive Marker für eine VTE bei Krebspatienten dienen könnten [107]. Da die Anzahl TF<sup>+</sup>-MP bei unterschiedlichen Krebsarten variieren, scheinen TF<sup>+</sup>-MP nicht bei allen Krebsarten ein nützlicher Biomarker für das Thromboserisiko zu sein [107].

Der Vergleich der prä- und postoperativen Werte zeigt in der Gruppe der Ovarialkarzinompatientinnen für alle MP-Subpopulationen einen Anstieg am 4.-6. Tag nach operativem Eingriff. Eine statistische Signifikanz konnte jedoch nur für die TF<sup>+</sup>-MP festgestellt werden. Berücksichtigt man die Funktionen von MP, so lassen sich die Ergebnisse mit der postoperativ erhöhten Heilungs- und Gerinnungsaktivität, einem erhöhten Verletzungsgrad des Endothels und einer gesteigerten Entzündungsreaktion erklären und nachvollziehen.

Da der postoperative Zustand bekanntlich ein erhöhtes Risiko für venöse Thromboembolien birgt und sowohl TF selbst als auch TF<sup>+</sup>-MP an der Initiierung und Förderung der Gerinnung beteiligt sind [167, 168] könnten die erhöhten TF<sup>+</sup>-MP Zeichen einer gesteigerten Gerinnungsaktivität postoperativ sein und möglicherweise mit einem erhöhten Risiko für eine VTE einhergehen. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten postoperativ signifikant höhere D-Dimer-Konzentrationen gemessen werden als präoperativ. Dies ist ein Zeichen für eine deutlich gesteigerte Gerinnungsaktivität.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen unserer Studie beobachteten Zwicker et al. 2009 [163], dass die TF<sup>+</sup>-MP bei Patienten mit Pankreaskarzinom nach radikaler Pankreatektomie signifikant abnahmen. Es muss jedoch bedacht werden, dass es sich hier einerseits um eine Studie mit sehr geringer Fallzahl (n = 3) handelt und andererseits die TF<sup>+</sup>-MP erst zwischen dem 26. und 44. postoperativen Tag, also deutlich später als in unserer Studie, gemessen wurden. In dieser Zeit kann es bereits zum Abbau der bei uns erhöht gemessenen TF<sup>+</sup>-MP gekommen sein.

Ikeda et al. stellten 2003 fest, dass PMP bei Tumoren des oberen Gastrointestinaltrakts postoperativ erhöht sind und möglicherweise zu thrombotischen Komplikationen beitragen [169]. Obwohl sich diese Ergebnisse mit unserer Studie decken, muss erwähnt werden, dass hier andere antigenetische Marker zur Detektion der thrombozytären MP, nämlich GPIX, herangezogen wurden, und dass in unserer Studie bezüglich der PMP keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte.

## 5 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom weist eine hohe Mortalität auf, da es meist erst in fortgeschrittenen Stadien symptomatisch wird. Eine gefürchtete und häufige Komplikation stellt die venöse Thromboembolie dar. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob zirkulierende Mikropartikel (MP) – kleine, funktionell aktive Abschnürungen eukaryotischer Zellen - mit dem Tumorstadium und der Gerinnungsaktivität im Zusammenhang stehen und inwiefern MP als Tumormarker für das Ovarialkarzinom einsetzbar sind.

In einem Kollektiv bestehend aus malignen, semimaligen und benignen Ovarialtumoren sowie einer gesunden Kontrollgruppe wurden die Konzentrationen verschiedener MP-Subpopulationen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

CD63<sup>+</sup> thrombozytäre MP (PMP) waren bei Karzinompatientinnen signifikant höher als bei benignen Ovarialtumoren und stiegen signifikant bei Fernmetastasierung an. Passend zu den erhöhten Konzentrationen an CD63<sup>+</sup>-MP, die eine gesteigerte Thrombozytenaktivität widerspiegeln, wurden signifikant erhöhte D-Dimer-Konzentrationen und somit eine gesteigerte Gerinnungsaktivität bei Karzinompatientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. Wenn auch insgesamt weniger sensitiv als die konventionellen Tumormarker CA125 und CA72-4 ließen sich bei fortgeschrittenen, bereits fernmetastasierten Ovarialkarzinomen deutlich höhere Gesamt-MP-Konzentrationen feststellen als bei der Kontrollgruppe. Für die Tumorzell-spezifischen MP (TMP / EpCAM<sup>+</sup>-MP), zeigten sich signifikant niedrigere Werte bei den Karzinomen als in der Kontrollgruppe, v.a. in den frühen Tumorstadien. Diese Tatsache weist darauf hin, dass TMP primär in die lokale Umgebung des Tumors und nicht in die Zirkulation entsandt werden und somit eine Bestimmung im Aszites in fortgeschrittenen Stadien sinnvoll wäre. Auch die endothelialen MP (EMP / CD144<sup>+</sup>-MP) waren bei benignen und malignen Tumoren signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe. Dies stützt die These, dass EMP die Angiogenese dosisabhängig beeinflussen. Hohe Werte scheinen die Angiogenese zu hemmen, während niedrige Werte stimulierend wirken. Für TissueFactor<sup>+</sup>-MP konnte bei Karzinompatientinnen ein signifikanter postoperativer Anstieg festgestellt werden. Auch die D-Dimere waren postoperativ signifikant erhöht.

Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass einzelne MP-Subpopulationen in Abhängigkeit von der Tumorgröße und Metastasierung variieren und dass insbesondere die Konzentration der PMP die Gerinnungsaktivität widerspiegelt. Die Dissertationsstudie könnte Ausgangspunkt sein für weitere prospektive Studien mit einem größeren Patientenkollektiv und zusätzlicher Bestimmung weiterer hämostaseologischer Marker.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA: *Cancer statistics, 2000*. CA Cancer J Clin, 2000. **50**: 7-33.
- [2] Stauber M, Weyerstahl T: *Duale Reihe - Gynäkologie und Geburtshilfe*, 2. Auflage, Thieme-Verlag, 2005. S. 293.
- [3] Coleman MP, Esteve J, Damiecki P, et al.: *Trends in cancer incidence and mortality*. v. 121. Lyon, France: IARC Scientific Publications, 1993. S. 477-498.
- [4] Holschneider CH, et al.: *Ovarian Cancer: Epidemiology, Biology, and Prognostic Factors*. Seminars in Surgical Oncology, 2000. **19**: 3-10.
- [5] Yancik R: *Ovarian cancer. Age contrasts in incidence, histology, disease stage and diagnosis, and mortality [Review]*. Cancer, 1993. **71** (Suppl 2): 517-523.
- [6] Goldberg JM, Piver MS, Jishi MF, Blumenson L: *Age at onset of ovarian cancer in women with a strong family history of ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 1997. **66**: 3-9.
- [7] Fathalla MF: *Incessant ovulation – a factor in ovarian neoplasia?* Lancet, 1971. **2** (7716): 163.
- [8] Helzlsouer KJ, Alberg AJ, Gordon GB, et al.: *Serum gonadotropins and steroid hormones in the development of ovarian cancer*. JAMA, 1995. **274**: 1926-1930.
- [9] Parmley TH, Woodruff JD: *The ovarian mesothelioma*. Am J Obstet Gynecol, 1974. **120**: 234-241.
- [10] Bristow RE, Karlan BY: *Ovulation induction, infertility, and ovarian cancer risk [Review]*. Fertil Steril, 1996. **66**: 499-507.
- [11] Negri E, Franceschi S, Tzonou A, et al.: *Pooled analysis of 3 European case-control studies. I. Reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer*. Int J Cancer, 1991. **49**: 50-56.
- [12] Franceschi S, La Vecchia C, Booth M, et al.: *Pooled analysis of 3 European case-control studies of ovarian cancer: II. Age at menarche and menopause*. Int J Cancer, 1991. **49**: 57-60.
- [13] Doll R, Gray R, Hafner B, et al.: *Mortality in relation to smoking: 22 years' observations on female British doctors*. Br Med J, 1980. **280**(6219): 967-971.
- [14] Purdie D, Green A, Bain C, et al.: *Reproductive and other factors and risk of epithelial ovarian cancer: an Australian case-control study*. Int J Cancer, 1995. **62**: 678-684.
- [15] Risch HA, Howe GR: *Pelvic inflammatory disease and the risk of epithelial ovarian cancer*. Cancer Epidemiol Bio Prev, 1995. **4**: 447-451.
- [16] Schildkraut JM, Schwingl PJ, Bastos E, et al.: *Epithelial ovarian cancer risk among women with polycystic ovary syndrome*. Obstet Gynecol, 1996. **88**(4 Pt 1): 554-559.
- [17] Risch HA, Marrett LD, Howe GR: *Parity, contraception, infertility, and the risk of epithelial ovarian cancer*. Am J Epidemiol, 1994. **140**: 585-597.
- [18] Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ, et al.: *A prospective study of reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer*. Cancer, 1995. **76**: 284-290.
- [19] Adami HO, Hsieh CC, Lambe M, et al.: *Parity, age at first child-birth, and risk of ovarian cancer*. Lancet, 1994. **344**(8932): 1250-1254.
- [20] Schlesselman JJ: *Net effect of oral contraceptive use on the risk of cancer in women in the United States*. Obstet Gynecol, 1995. **85**(5 Pt 1): 793-801.

- [21] Gross TP, Schlesselman JJ: *The estimated effect of oral contraceptive use on the cumulative risk of epithelial ovarian cancer*. Obstet Gynecol, 1994. **83**: 419-424.
- [22] Hankinson SE, Hunter DJ, Colditz GA, et al.: *Tubal ligation, hysterectomy, and risk of ovarian cancer. A prospective study*. JAMA, 1993. **270**: 2813-2818.
- [23] Miracle-McMahill HL, Calle EE, Kosinski AS, et al.: *Tubal ligation and fatal ovarian cancer in a large prospective cohort study*. Am J Epidemiol, 1997. **145**: 349-357.
- [24] Kurman RJ, et al.: *Pathogenesis of Ovarian Cancer: Lessons From Morphology and Molecular Biology and Their Clinical Implications*. Int J Gynecol Pathol, 2008. **27**(2): 151-160.
- [25] Scully RE: *World Health Organization classification and nomenclature of ovarian cancer*. Natl Cancer Inst Monogr, 1975. **42**: 5-7.
- [26] Barakat RR: *Borderline tumors of the ovary*. Obstet Gynecol Clin North Am, 1994. **21**: 93-105.
- [27] Rein D, Arnold N, Niederacher D: *Ovarialkarzinom – Epidemiologie, Genetik und Prävention*. Gynäkologe, 2006. **39**: 420-427.
- [28] Stauber M, Weyerstahl T: *Duale Reihe - Gynäkologie und Geburtshilfe*, 2. Auflage, Thieme-Verlag, 2005, S. 281.
- [29] Stauber M, Weyerstahl T: *Duale Reihe - Gynäkologie und Geburtshilfe*, 2. Auflage, Thieme-Verlag, 2005, S. 294.
- [30] Stauber M, Weyerstahl T: *Duale Reihe - Gynäkologie und Geburtshilfe*, 2. Auflage, Thieme-Verlag, 2005, S. 295.
- [31] Stauber M, Weyerstahl T: *Duale Reihe - Gynäkologie und Geburtshilfe*, 2. Auflage, Thieme-Verlag, 2005, S. 283-284.
- [32] Stauber M, Weyerstahl T: *Duale Reihe - Gynäkologie und Geburtshilfe*, 2. Auflage, Thieme-Verlag, 2005, S. 284.
- [33] Sehoul J, Henrich W, Braicu I, Lichtenegger W: *Präoperative Diagnostik beim Ovarialkarzinom*. Gynäkologe, 2006. **39**: 428-437.
- [34] Stauber M, Weyerstahl T: *Duale Reihe - Gynäkologie und Geburtshilfe*, 2. Auflage, Thieme-Verlag, 2005, S. 283-288.
- [35] Kommission Ovar der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V.: *Empfehlungen für die Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren (S2k Leitlinie)*, 2009.
- [36] Kommission Ovar der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V.: *Aktualisierte Empfehlungen der Kommission Ovar auf der Grundlage der S2k Leitlinie (Version 1.0, Mai 2007)*, Juni 2012.
- [37] Shojaei F: *Anti-angiogenesis therapy in cancer: current challenges and future perspectives*. Cancer Lett, 2012. **320**: 130-137.
- [38] Burger RA, Sill MW, Monk BJ, Greer BE, Sorosky JL: *Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group Study*. J Clin Oncol, 2007. **25**: 5165-5171.
- [39] Trimble EL, Kosary CA, Cornelison TL, et al.: *Improved survival for women with ovarian cancer [Abstract]*. In Proceedings of the Society for Gynecologic Oncology, 1999. **Abstract 136**.
- [40] Eisenkopp SM, Friedman RL, Wang HJ: *Complete cytoreductive surgery is feasible and maximizes survival in patients with advanced epithelial ovarian cancer: a prospective study*. Gynecol Oncol, 1998. **69**: 103-108.

- [41] Vergote IB, Kaern J, Abeler VM, et al.: *Analysis of prognostic factors in stage I epithelial ovarian carcinoma: importance of degree of differentiation and deoxyribonucleic acid ploidy in predicting relapse*. Am J Obstet Gynecol, 1993. **169**: 40-52.
- [42] Silvestrini R, Daidone MG, Veneroni S, et al.: *The clinical predictivity of biomarkers of stage III-IV epithelial ovarian cancer in prospective randomized treatment protocol*. Cancer, 1998. **82**: 159-167.
- [43] Omura GA, Brady MF, Homesley HD, et al.: *Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: the Gynecologic Oncology Group experience*. J Clin Oncol, 1991. **9**: 1138-1150.
- [44] Frasci G, Conforti S, Zullo F, et al.: *A risk model for ovarian carcinoma patients using CA 125: time to normalization renders second-look laparotomy redundant*. Cancer, 1996. **77**: 1122-1130.
- [45] Institut für Klinische Chemie der LMU München: *Sinnvoller Einsatz von Tumormarkern - Ovarialkarzinom [Online]*. <http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Institut-fuer-Klinische-Chemie/Onkologische-Labordiagnostik/de/einsatz-tm/Tumorarten/tumor-ovarial.html>. [Zugriff am 30 03 2013].
- [46] Sehoul J, Akdogan Z, Heinze T, et al.: *Preoperative determination of CASA (Cancer Associated Serum Antigen) and CA-125 for the discrimination between benign and malignant pelvic tumor mass: a prospective study*. Anticancer Res, 2003. **23**(2A): 1115-1118.
- [47] Bayerl B, Meier W, Stieber P, Albiez M, Eirmann W, Fateh-Moghadam A: *Significance of CA72-4 in the diagnosis of ovarian cancer*. Recent results in tumor therapy and diagnosis, 1990. Klapdor R (ed), Zuckschewdt-Verlag, München. S. 111-112.
- [48] Lenhard MS, Nehring S, Nagel D, Mayr D, Kirschenhofer A, Hertlein L, et al.: *Predictive value of CA 125 and CA 72-4 in borderline ovarian tumors*. Clin Chem Lab Med, 2009. **47**: 537-542.
- [49] Negishi Y, Iwabuchi H, Sakamoto M, Okabe B, Sato H, et al.: *Serum and tissue measurements of CA72-4 in ovarian patients*. Gynecol Oncol, 1993. **48**: 148-154.
- [50] Fayed ST, Ahmad SM, Kassim SK, Khalifa A: *The value of CA125 and CA72-4 in management of patients with epithelial ovarian cancer*. Dis Markers, 1998. **14**: 155-160.
- [51] Hogdall EV, Christensen L, Kjaer SK, Blaakaer J, Jarle IC, Gayther S, et al.: *Protein expression levels of carcinoembryonic antigen (CEA) in Danish ovarian cancer patients: from the Danish 'MALOVA' ovarian cancer study*. Pathology, 2008. **40**(5): 487-492.
- [52] Tholander B, Taube A, Lindgren A, Sjöberg O, Stendahl U, Tamsen L: *Pretreatment serum levels of CA-125, carcinoembryonic antigen, tissue polypeptide antigen, and placental alkaline phosphatase in patients with ovarian carcinoma: influence of histological type, grade of differentiation, and clinical stage of disease*. Gynecol Oncol, 1990. **39**(1): 26-33.
- [53] Institut für Klinische Chemie der LMU München: *Sinnvoller Einsatz von Tumormarkern [Online]*. <http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Institut-fuer-Klinische-Chemie/Onkologische-Labordiagnostik/de/einsatz-tm/index.html>. [Zugriff am 30 03 2013].
- [54] Chargaff E, West R: *The biological significance of the thromboplastic protein of blood*. J Biol Chem, 1946. **166**: 189-197.



- [55] Wolf P: *The nature and significance of platelet products in human plasma*. Br J Haematol, 1967. **13**: 269-288.
- [56] Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ: *Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity*. J Biol Chem, 1989. **264**: 17049-17057.
- [57] Weiss HJ, Vicic WJ, Lages BA, Rogers J: *Isolated deficiency of platelet procoagulant activity*. Am J Med, 1979. **67**: 206-213.
- [58] Toth B, Lok CAR, Böing A, Diamant M, van der Post JAM, Friese K, Nieuwland R: *Microparticles and Exosomes: Impact on Normal and Complicated Pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2007. **58**: 389-402.
- [59] Berckmans RJ, Sturk A, van Tienen LM, Schaap MCI, Nieuwland R: *Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva*. Blood, 2011. **117**(11): 3172-3180.
- [60] Freyssinet JM: *Cellular microparticles: what are they bad or good for?* J Thromb Haemost, 2003. **1**: 1655-1662.
- [61] Ahn YS: *Cell-derived microparticles: 'Miniature envoys with many faces'*. J Thromb Haemost, 2005. **3**: 884-887.
- [62] VanWijk MJ, et al.: *Microparticles in cardiovascular diseases*. Cardiovasc Res, 2003. **59**(2): 277-287.
- [63] Piccin A, et al.: *Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications*. Blood Reviews, 2007. **21**: 157-171.
- [64] Liebhardt S: *Neue diagnostische Marker bei Mammakarzinompatientinnen*. Medizinische Dissertation LMU München, 2011.
- [65] Horstman LL, et al.: *Platelet microparticles: a wide-angle perspective*. Critical Reviews in Oncology/Haematology, 1999. **30**: 111-142.
- [66] Leytin V, Allen DJ, Mutlu A, Gyulkhandanyan AV, Mykhaylov S, Freedman J: *Mitochondrial control of platelet apoptosis: effect of cyclosporin A, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore*. Lab Invest, 2009. **89**: 374-384.
- [67] Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T, Kagawa H, Kitada C, et al.: *High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles*. Blood, 1996. **88**: 3456-3464.
- [68] Barry OP, Partico D, Lawson JA, FitzGerald GA: *Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles*. J Clin Invest, 1997. **99**: 2118-2127.
- [69] Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS: *New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles*. Keio J Med, 2004. **53**(4): 210-230.
- [70] Berckmans RJ, Nieuwland R, Böing AN, Romijn FPHTM, Hack CE, Sturk A: *Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation*. Thromb Haemost, 2001. **85**: 639-646.
- [71] D'Souza-Schorey C, Clancy JW. *Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers*. Genes Dev, 2012. **26**: 1287-1299.
- [72] Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C: *Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression*. J Cell Science, 2010. **123**: 1603-1611.
- [73] Albanese J, Meterissian S, Kontogiannea M, Dubreuil C, Hand A, et al.: *Biologically active Fas antigen and its cognate ligand are expressed on plasma membrane-derived*

- extracellular vesicles*. Blood, 1998. **91**: 3862-3874.
- [74] Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, et al.: *Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles*. J Exp Med, 2002. **195**: 1303-1316.
  - [75] Mause SF, Riztel E, Liehn EA, Hristov M, Bidzhekov K, Müller-Newen G, et al.: *Platelet microparticles enhance the vasoregenerative potential of angiogenic early outgrowth cells after vascular injury*. Circulation, 2010. **122**: 494-506.
  - [76] Brill A, Deshevsky O, Rivo J, Gozal Y, Varon D: *Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization*. Cardiovasc Res, 2005. **67**(1): 30-38.
  - [77] Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, et al.: *Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer*. Int J Cancer, 2005. **113**(5): 752-760.
  - [78] Kim HK, Song KS, Chung JH, Lee KR, Lee SN: *Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro*. British Journal of Haematology, 2004. **124**: 376-384.
  - [79] Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, Basire A, Pannell R, Borghi HE, et al.: *Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro*. Blood, 2007. **110**: 2432-2439.
  - [80] Yu J, May L, Milsom C, et al.: *Contribution of host-derived tissue factor to tumor neovascularization*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(11): 1975-1981.
  - [81] Rak J: *Microparticles in cancer*. Semin Thromb Hemost, 2010. **36**: 888-906.
  - [82] Mackman N: *Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**: 1015-1022.
  - [83] Hugel B, Martínez C, Kunzelmann C, Freyssinet JM: *Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin*. Physiology, 2005. **20**: 22-27.
  - [84] Skog J, Würdinger T, van Rijn S, et al.: *Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(12): 1470-1476.
  - [85] Al-Nedawi K, Meehan B, Kerbel RS, Allison AC, Rak J: *Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR*. Proc Natl Acad Sci USA, 2009. **106**(10): 3794-3799.
  - [86] Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, et al.: *Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumor cells*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(5): 619-624.
  - [87] Soleti R, Benameur T, Porro C, Panaro MA, Andriantsitohaina R, et al.: *Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors*. Carcinogenesis, 2009. **30**: 580-588.
  - [88] MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A: *Rapid secretion of interleukin-1 beta by microvesicle shedding*. Immunity, 2001. **15**: 825-835.
  - [89] VanWijk MJ, Nieuwland R, Boer K, van der Post JAM, VanBavel E, Sturk A: *Microparticle subpopulations are increased in preeclampsia: Possible involvement in vascular dysfunction?* Am J Obstet Gynecol, 2002. **187**: 450-456.
  - [90] Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, Kambyashi J: *High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells*. Atherosclerosis, 2001. **158**: 277-287.

- [91] Brodsky SV, Zhang F, Nasjetti A, Gollgorsky MS: *Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**: H1910-H1915.
- [92] Pfister SL: *Role of platelet microparticles in the production of thromboxane by rabbit pulmonary artery*. Hypertension, 2004. **43**: 428-433.
- [93] Martin S, Tesse A, Hugel B, Martinez MC, Morel O, Freyssinet JM, et al.: *Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression*. Circulation, 2004. **109**: 1653-1659.
- [94] Khorana AA, James P: *Malignancy, thrombosis and Trousseau: the case for an eponym*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(12): 2463-2465.
- [95] Heit JA, O'Fallon WM, Petterson TM, et al.: *Relative impact of risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based study*. Arch Intern Med, 2002. **162**: 1245-1248.
- [96] Svendsen E, Karwinski B: *Prevalence of pulmonary embolism at necropsy in patients with cancer*. J Clin Pathol, 1989. **42**: 805-809.
- [97] Blom JW, Vanderschoot JP, Oostindier MJ, Osanto S, van der Meer FJ, et al.: *Incidence of venous thrombosis in a large cohort of 66,329 cancer patients: results of a record linkage study*. J Thromb Haemost, 2006. **4**: 529-535.
- [98] Nijziel MR, et al.: *From Trousseau to angiogenesis: the link between the haemostatic system and cancer*. Neth J Med, 2006. **64**(11): 403-410.
- [99] Rao LVM: *Tissue factor as a tumor procoagulant*. Cancer and Metastasis Reviews, 1992. **11**: 249-266.
- [100] Callander NS, Varki N, Rao LVM: *Immunohistochemical identification of tissue factor in solid tumors*. Cancer, 1992. **70**(5): 1194-1201.
- [101] Aharon A, Brenner B: *Microparticles, thrombosis and cancer*. Best Pract Res Clin Haematol, 2009. **22**(1): 61-69.
- [102] Tesselaar MET, Romijn FPHTM, Van der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S: *Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis?* J Thromb Haemost, 2007. **5**: 520-527.
- [103] Tilley RE, Holscher T, Belani R, Nieva J, Mackman N: *Tissue factor activity is increased in a combined platelet and microparticle sample from cancer patients*. Thromb Res, 2008. **122**(5): 604-609.
- [104] Hron G, Kollars M, Weber H, Sagaster V, Quehenberg P, Eichinger S, Kyrle PA, Weltermann A: *Tissue factor-positive microparticles: Cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer*. Thromb Haemost, 2007. **97**(1): 119-123.
- [105] Zwicker JI: *Predictive value of tissue factor bearing microparticles in cancer associated thrombosis*. Thromb Res, 2010. **125**(Suppl 2): 84-88.
- [106] Zahra S, Anderson JAM, Stirling D, Ludlam CA: *Microparticles, malignancy and thrombosis*. Brit J Haematol, 2011. **152**: 688-700.
- [107] Owens III AP, Mackman N: *Microparticles in Hemostasis and Thrombosis*. Circ Res, 2011. **108**: 1284-1297.
- [108] Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R: *Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease?* Eur J Clin Invest, 2004. **34**(6): 392-401.
- [109] Sack U, Tárnok A, Rothe G: *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendung der Durchflusszytometrie*. Basel, 2007. S. 27-70.

- [110] *Einführung in die Durchflusszytometrie: Trainingsvorbereitung*. Becton Dickinson GmbH, 2005.
- [111] 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): 39-51.
- [112] Papadea C, Check IJ: *Human immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses: biochemical, genetic, and clinical aspects*. Crit Rev Clin Lab Sci, 1989. **27**(1): 27-58.
- [113] GENTAUR GmbH - Molekulare Produkte: *Datenblatt Anti-CD61-PE* [Online]. [http://www.antibody-antibodies.com/de/product2926687-Cytognos-Antibody\\_\\_CD61\\_PE\\_;\\_Clone\\_\\_PM6\\_13\\_;\\_Isotype\\_\\_IgG1.html](http://www.antibody-antibodies.com/de/product2926687-Cytognos-Antibody__CD61_PE_;_Clone__PM6_13_;_Isotype__IgG1.html). [Zugriff am 30.03.2013].
- [114] EXBIO, Prag: *Datenblatt Anti-CD63-PE* [Online]. [http://www.exbio.cz/pdf/data\\_sheet\\_new.py/CLO000000000000057/16/17/datasheet-1Y-343-T025.pdf](http://www.exbio.cz/pdf/data_sheet_new.py/CLO000000000000057/16/17/datasheet-1Y-343-T025.pdf). [Zugriff am 30.03.2013].
- [115] Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ: *Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication*. J Proteomics, 2010. **73**: 1907-1920.
- [116] Trzpis M, McLaughlin PMJ, de Leij LMFH, Harmsen MC: *Epithelial Cell Adhesion Molecule*. American J Pathol, 2007. **171**: 386-395.
- [117] Schmidt DS, Klingbeil P, Schnolzer M, Zoller M: *CD44 variant isoforms associate with tetraspanins and EpCAM*. Exp Cell Res, 2004. **297**: 329-347.
- [118] Claas C, Wahl J, Orlicky DJ, Karaduman H, Schnolzer M, Kempf T, Zoller M: *The tetraspanin D6.1A and its molecular partners on rat carcinoma cells*. Biochem J, 2005. **389**: 99-110.
- [119] Sebastian M, Kuemmel A, Schmidt M, Schmitt A: *Catumaxomab: A bispecific trifunctional antibody*. Drugs Today (Barc), 2009. **45**(8): 589-597.
- [120] Spizzo G, Went P, Dirnhofer S, Obrist P, Moch H, Baeuerle PA, et al.: *Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2006. **103**: 483-488.
- [121] BD Biosciences: *Datenblatt Anti-EpCAM* [Online]. [http://www.bdbiosciences.com/external\\_files/is/doc/tds/Datasheets\\_RUO/live/web\\_enabled/23-5534-00\\_EpCAM\\_ruo.pdf](http://www.bdbiosciences.com/external_files/is/doc/tds/Datasheets_RUO/live/web_enabled/23-5534-00_EpCAM_ruo.pdf). [Zugriff am 30.03.2013].
- [122] BD Biosciences: *Datenblatt Anti-CD144-FITC* [Online]. [http://www.bdbiosciences.com/external\\_files/pm/doc/tds/stem\\_cell/live/web\\_enabled/560411.pdf](http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/stem_cell/live/web_enabled/560411.pdf). [Zugriff am 30.03.2013].
- [123] Combes V, Simon A, Grau G, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al.: *In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant*. J Clin Invest, 1999. **104**: 93-102.
- [124] Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Ahn YS: *Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease*. Br J Haematol, 2001. **112**: 81-90.
- [125] Chironi GN, et al.: *Endothelial microparticles in diseases*. Cell Tissue Res, 2009. **335**: 143-151.
- [126] Simak J, Holada K, Risitano AM, Zivny JH, Young NS, Vostal JG: *Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria*. Brit J Haematol, 2004. **125**(6): 804-813.

- [127] Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, Watanabe K, Fukushima H, et al.: *Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**: 1622-1630.
- [128] Leroyer AS, Tedgui A, Boulanger CM: *Role of microparticles in atherothrombosis*. J Int Med, 2008. **263**: 528-537.
- [129] Di Nisio M, Squizzato A, Rutjes AWS, Büller HR, Zwinderman AH, Bossuyt PM: *Diagnostic accuracy of D-dimer test for exclusion of venous thromboembolism: a systematic review*. J Thromb Haemost, 2006. **5**: 296-304.
- [130] Derogibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, et al.: *Endothelial progenitor cell derived microparticles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA*. Blood, 2007. **110**: 2440-2448.
- [131] Poste G, Nicolson GL: *Arrest and metastasis of blood-borne tumor cells are modified by fusion of plasma membrane vesicles from highly metastatic cells*. Proc Natl Acad Sci, 1980. **77**: 399-403.
- [132] Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, Ratajczak J, Vilaire G, et al.: *Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells*. Exp Hematol, 2002. **30**: 450-459.
- [133] Di Vizio D, Kim J, Hager MH, et al.: *Oncosome formation in prostate cancer: association with a region of frequent chromosome deletion in metastatic disease*. Cancer Res, 2009. **69**(13): 5601-5609.
- [134] Lima LG, Chammas R, Monteiro RQ, Moreira ME, Barcinski MA: *Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner*. Cancer Lett, 2009. **283**(2): 168-175.
- [135] Zahra S, Anderson JAM, Stirling D, Ludlam CA: *Plasma microparticles are not elevated in fresh plasma from patients with gynaecological malignancy - An observational study*. Gynecol Oncol, 2011. **123**: 152-156.
- [136] Thaler J, Ay C, Weinstabl H, Dunkler D, Simanek R, et al.: *Circulating procoagulant microparticles in cancer patients*. Ann Hematol, 2011. **90**: 447-453.
- [137] Liebhardt S, Ditsch N, Nieuwland R, Rank A, Jeschke U, Von Koch F, Friese K: *CEA-, Her2/neu-, BCRP- and Hsp27-positive microparticles in breast cancer patients*. Anticancer Res, 2010. **30**(5): 1707-1712.
- [138] Nomura S: *Function and Clinical Significance of Platelet-Derived Microparticles*. Int J Hematol, 2001. **74**: 397-404.
- [139] Honn KV, Tang DG, Chen YQ: *Platelets and cancer metastasis: more than an epiphenomenon*. Semin Thromb Haemost, 1992. **18**: 392-415.
- [140] Borsig L, Wong R, Feramisco J, et al.: *Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis*. Proc Natl Acad Sci USA, 2001. **98**: 3352-3357.
- [141] Kim HK, Song KS, Park YS, Kang YH, Lee YJ, Kim HK, Ryu KW, Bae JM, Kim S: *Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor*. European Journal of Cancer, 2003. **39**: 184-191.
- [142] Tschöepe D, Spangenberg P, Esser J, Schwippert B, Kehrel B, Roesen P, et al.: *Flow-cytometric detection of surface membrane alterations and concomitant changes in the cytoskeletal actin status of activated platelets*. Cytometry, 1990. **11**: 652-656.
- [143] Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, Pichugin AV, Panteleev MA, et al.: *Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity*

- than activated platelets. *Thromb Haemost*, 2007. **97**(3): 425-434.
- [144] Kim HK, Song KS, Lee ES, Lee YJ, Park YS, Lee KR, Lee SN: *Optimized flow cytometric assay for the measurement of platelet microparticles in plasma: pre-analytic and analytic considerations*. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 2002. **13**: 393-397.
- [145] Reininger AJ, Heijnen HF, Schumann H, Specht HM, Schramm W, Ruggeri ZM: *Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress*. *Blood*, 2006. **107**: 3537-3545.
- [146] Ramacciotti E, Hawley AE, Farris DM, Ballard NE, Wroblewski SK, et al.: *Leukocyte- and platelet-derived microparticles correlate with thrombus weight and tissue factor activity in an experimental mouse model of venous thrombosis*. *Thromb Haemost*, 2009. **101**(4): 748-754.
- [147] Toth B, Liebhardt S, Steinig K, Ditsch N, Rank A, Bauerfeind I, Spannagl M, Friese K: *Platelet-derived microparticles and coagulation activation in breast cancer patients*. *Thromb Haemost*, 2008. **100**(4): 663-669.
- [148] Caine GJ, Harris AL, Christodoulos K, Lip GY, Blann AD: *Analysis of combination anti-angiogenesis therapy on markers of coagulation, platelet activation and angiogenesis in patients with advanced cancer*. *Cancer Lett*, 2005. **219**(2): 163-167.
- [149] Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, Alden E, Patel-Hett SR, et al.: *Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles*. *Blood*, 2009. **113**: 1112-1121.
- [150] Norol F, Guichard J, Breton-Gorius J, Vainchenker W, Massé JM, et al.: *Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand*. *Blood*, 1997. **89**: 2336-2346.
- [151] Rank A, Nieuwland R, Delker R, Köhler A, Toth B, Pihusch V, Wilkowski R, et al.: *Cellular origin of platelet-derived microparticles in vivo*. *Thromb Res*, 2010. **126**(4): 255-259.
- [152] Dashevsky O, Varon D, Brill A: *Platelet-derived microparticles promote invasiveness of prostate cancer cells via upregulation of MMP-2 production*. *Int J Cancer*, 2009. **124**: 1773-1777.
- [153] Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, et al.: *Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes*. *Cancer Immunol Immunother*, 2006. **55**(7): 808-818.
- [154] Press JZ, Reyes M, Pitteri SJ, Pennil C, Garcia R, Goff BA, et al.: *Microparticles from ovarian carcinomas are shed into ascites and promote cell migration*. *Int J Gynecol Cancer*, 2012. **22**(4): 546-552.
- [155] Ferdeghini M, Gadducci A, Prontera C, Annicchiarico C, Galletti O, et al.: *Preoperative serum intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and E-selectin in patients with epithelial ovarian cancer*. *Anticancer Res*, 1995. **15**(5B): 2255-2260.
- [156] Rank A, Liebhardt S, Zwirner J, Burges A, Nieuwland R, Toth B: *Circulating microparticles in patients with benign and malignant ovarian tumors*. *Anticancer Res*, 2012. **32**: 2009-2014.
- [157] Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V: *Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells*. *Am J Pathol*, 2002. **160**: 673-680.
- [158] Haubold K, Rink M, Spath B, Friedrich M, Chun FK, Marx G, et al.: *Tissue factor procoagulant activity of plasma microparticles is increased in patients with early-stage prostate-cancer*. *Thromb Haemost*, 2009. **101**: 1147-1155.

- [159] Dvorak HF, Van deWater L, Bitzer AM, et al.: *Procoagulant activity associated with plasma membrane vesicles shed by cultured tumor cells*. Cancer Res, 1983. **43**: 4434-4442.
- [160] Mueller BM, Reisfeld RA, Edgington TS, Ruf W: *Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis*. Proc Natl Acad Sci USA, 1992. **89**(24): 11832-11836.
- [161] Rauch U, Antoniak S: *Tissue factor-positive microparticles in blood associated with coagulopathy cancer*. Thromb Haemost, 2007. **97**: 9-10.
- [162] Graves LE, Ariztia EV, Navari JR, Matzel HJ, Stack MS, Fishman DA: *Proinvasive properties of ovarian cancer ascites-derived membrane vesicles*. Cancer Res, 2004. **64**: 7045-7049.
- [163] Zwicker JJ, Liebman HA, Neuberg D, Lacroix R, Bauer KA, Furie BC, et al.: *Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(22): 6830–6840.
- [164] Tesselaar ME, Romijn FP, van der Linden IK, Bertina RM, Osanto S: *Microparticles-associated tissue factor activity in cancer patients with and without thrombosis*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(8): 1421-1423.
- [165] Mackman N: *The role of tissue factor and factor viia in hemostasis*. Anesth Analg, 2009. **108**: 1447-1452.
- [166] Hathcock JJ, Nemerson Y: *Platelet deposition inhibits tissue factor activity: in vitro clots are impermeable to factor xa*. Blood, 2004. **104**: 123-127.
- [167] Giesen PLA, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roqué M, Tallon JT, et al.: *Blood-borne tissue factor: Another view of thrombosis*. Proc Natl Acad Sci USA, 1999. **96**: 2311-2315.
- [168] Falati S, Gross P, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B: *Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse*. Nature Medicine, 2002. **8**(10): 1175-1180.
- [169] Ikeda M, Iwamoto S, Imamura H, Furukawa H, Kawasaki T: *Increased platelet aggregation and production of platelet-derived microparticles after surgery for upper gastrointestinal malignancy*. Journal of Surgical Research, 2003. **115**: 174-183.
- [170] Scully R, Sobin LH: *Histological Typing of Ovarian Tumours (World Health Organization). International Histological Classification of Tumours*, 2. Auflage, Springer-Verlag, 1999.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Elektronenmikroskopische Darstellung von Mikropartikeln.....	14
<b>Abbildung 2:</b> Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung.....	21
<b>Abbildung 3:</b> Merkmale des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts im Durchflusszytometer.....	22
<b>Abbildung 4:</b> Konzentration der CD63 <sup>+</sup> -MP in den Studienpopulationen.....	34
<b>Abbildung 5:</b> Konzentration der EpCAM <sup>+</sup> -MP in den Studienpopulationen.....	34
<b>Abbildung 6:</b> Konzentration der CD144 <sup>+</sup> -MP in den Studienpopulationen.....	35
<b>Abbildung 7:</b> Konzentration der CD63 <sup>+</sup> -MP nach FIGO.....	36
<b>Abbildung 8:</b> Konzentration der AnnexinV <sup>+</sup> -MP in der Kontrollgruppe sowie nach FIGO .....	37
<b>Abbildung 9:</b> Konzentration der EpCAM <sup>+</sup> -MP in der Kontrollgruppe sowie nach FIGO.....	38
<b>Abbildung 10:</b> Konzentration der CD144 <sup>+</sup> -MP in der Kontrollgruppe sowie nach FIGO.....	38
<b>Abbildung 11:</b> Konzentration der CD63 <sup>+</sup> -MP in der Gruppe der benignen Ovarialtumore und nach FIGO .....	39
<b>Abbildung 12:</b> Konzentration der CD144 <sup>+</sup> -MP in der Gruppe der benignen Ovarialtumore und nach FIGO .....	40
<b>Abbildung 13:</b> Konzentration der CD142 <sup>+</sup> -MP im prä- und postoperativen Vergleich.....	41
<b>Abbildung 14:</b> ROC-Kurven für alle MP-Subpopulationen, CA125 und CD72-4 .....	42
<b>Abbildung 15:</b> Präoperative D-Dimer-Konzentration in den Studienpopulationen.....	43

### 7.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Ein- und Ausschlusskriterien der Studie .....	19
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Chemikalien .....	22
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Reagenzien .....	24
<b>Tabelle 4:</b> Antikörper-Verdünnungen .....	25
<b>Tabelle 5:</b> Studienkollektiv.....	31
<b>Tabelle 6:</b> Konzentration der MP-Subpopulationen in den Studiengruppen.....	33
<b>Tabelle 7:</b> Konzentration der MP-Subpopulationen nach FIGO .....	36
<b>Tabelle 8:</b> Konzentration der MP-Subpopulationen im prä- und postoperativen Vergleich .....	40
<b>Tabelle 9:</b> Flächen unter der ROC-Kurve.....	41
<b>Tabelle 10:</b> Konzentration der D-Dimere im Studienkollektiv.....	43
<b>Tabelle 11:</b> Konzentration der D-Dimere nach FIGO .....	44
<b>Tabelle 12:</b> Konzentration der D-Dimere in Anhängigkeit vom OP-Zustand.....	44



## 7.3 WHO-Klassifikation der Ovarialkarzinome 2003

<b>1</b>	<b>Oberflächenepithel-Stroma-Tumore (90%)</b>
1.2	Seröse Tumore
1.3	Muzinöse Tumore, endozervix-ähnlich und intestinaler Typ
1.4	Endometrioide Tumore
1.5	Übergangszelltumore
1.6	Plattenepithelkarzinome
1.7	Gemischte epitheliale Tumore
1.8	Undifferenzierte Karzinome
<b>2</b>	<b>Keimstrangstromatumore (6%)</b>
2.1	Granulosazelltumore
2.2	Thekome
2.3	Androblastome / Sertoli-Leydigzell-Tumore
2.4	Gynandroblastome
2.5	Lipidzelltumore
2.6	Andere
<b>3</b>	<b>Keimzelltumore (3%)</b>
3.1	Dysgerminom
3.2	Endodermaler Sinus-Tumor
3.3	Embryonales Karzinom
3.4	Polyembryom
3.5	Chorionkarzinom
3.6	Teratom
3.7	Gemischte Keimzelltumore
<b>4</b>	<b>Andere</b>

modifiziert nach [170]

## 7.4 Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms nach FIGO-Kriterien

FIGO-Stadium	Beschreibung
<b>I</b>	Karzinom auf die Ovarien begrenzt
<b>IA</b>	Nur ein Ovar befallen, kein Aszites, kein Tumor auf der Oberfläche, Kapsel intakt
<b>IB</b>	Beide Ovarien befallen, kein Aszites, kein Tumor auf der Oberfläche, Kapsel intakt
<b>IC</b>	Wie Stadium IA oder IB, aber mit Tumor auf der Oberfläche eines Ovars / beider Ovarien oder mit Kapselruptur oder mit positivem Aszites oder positiver Peritonealspülung
<b>II</b>	Karzinom eines oder beider Ovarien mit Ausdehnung im kleinen Becken
<b>IIA</b>	Ausdehnung / Metastasen auf Uterus oder Tuben
<b>IIB</b>	Ausdehnung auf andere Gewebe im kleinen Becken
<b>IIC</b>	Wie Stadium IIA oder IIB, aber mit Tumor auf der Oberfläche eines Ovars / beider Ovarien oder mit Kapselruptur oder mit positivem Aszites oder positiver Peritonealspülung
<b>III</b>	Karzinom mit intraperitonealer (auch nur histologisch nachweisbarer) Metastasierung außerhalb des kleinen Beckens und / oder positiven retroperitonealen oder inguinalen Knoten, Leberkapselmetastasen
<b>IIIA</b>	Tumor makroskopisch auf das kleine Becken begrenzt ohne retroperitoneale Knoten, aber mit histologisch gesicherter Metastasierung in viszeralem oder parietalem Peritoneum
<b>IIIB</b>	Karzinom eines oder beider Ovarien mit histologisch gesicherten intraabdominalen Metastasen, deren Größe 2cm nicht überschreitet, keine retroperitonealen Knoten
<b>IIIC</b>	Abdominale Metastasen >2cm im Durchmesser und / oder retroperitoneale oder inguinale Knoten
<b>IV</b>	Karzinom eines oder beider Ovarien mit Fernmetastasen, bei Pleuraergüssen nur bei positivem Tumorzellnachweis, Leberparenchymmetastasen

modifiziert nach [30]

## 7.5 Einverständniserklärung der Probandinnen

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

\_\_\_\_\_ **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:

Einfluss von Mikropartikeln auf Wachstum und Metastasierungspotenzial bei Ovarial-Carcinom Patienten

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

Bislang gibt es keine publizierten Untersuchungen bei Frauen mit Eierstockkrebs. 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 Eierstockkrebs zu finden.

Anschrift: D-81377 München • Marchionistraße 15 • Telefon (0 89) 70 95-0 (Vermittlung)  
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. Burges, 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. Burges, 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

## 7.6 Publikation

Aus dieser Dissertation geht folgende Publikation hervor:

Rank A, Liebhardt S, Zwirner J, Burges A, Nieuwland R, Toth B:

*Circulating Microparticles in Patients with Benign and Malignant Ovarian Tumors.*

Anticancer Research, 2012. **32**: 2009-2014.

## 8 Danksagung

Mein herzlichster Dank gebührt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Bettina Toth für die Bereitstellung des Themas und die tolle und motivierende Betreuung während der gesamten experimentellen Phase und weit darüber hinaus.

Vielen Dank an das Team des Instituts für Klinische Chemie und insb. Herrn Dr. med. Peter Göhring für die Erstellung der Blutbilder und die Messung der D-Dimer-Konzentrationen.

Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei allen Patientinnen der gynäkologischen Abteilung des Klinikums Großhadern und allen Frauen der Kontrollgruppe für die Einwilligung zur Teilnahme an der Studie und die Bereitstellung ihrer Blutproben. Die Patientinnen, die trotz der soeben erfolgten Konfrontation mit einer schrecklichen Diagnose dennoch bereit waren, an der Studie teilzunehmen, möchte ich besonders hervorheben.

Ohne Marianne Fileki und Andrea Peichl, die mir im Frauenforschungslabor bereitwillig und freundschaftlich mit Rat und Tat zur Seite standen und mich bei der experimentellen Phase einlerten und unterstützten, wäre die Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank für Eure Geduld!

Hervorheben möchte ich außerdem meine ehemalige Kommilitonin Frau Dr. med. Susanne Grandl, die mich einarbeitete und mich bei der Probengewinnung und bei den Messungen unterstützte. Durch ihre Motivation gelang es mir, während der experimentellen Phase durchzuhalten.

Zudem gebührt natürlich ein sehr großer Dank meiner Familie, insbesondere meinen tollen Eltern, die mir das Studium ermöglichten und stets ermunterten, am Ball zu bleiben. Durch die Hilfe meiner Schwester Christine gelang es mir, den letzten Schritt zur Vollendung der Doktorarbeit zu machen. Sie war mir während des gesamten Studiums und der folgenden Zeit eine große Stütze. Auch bei meinem Ehemann Moritz und meiner guten Freundin Dr. med. Annette Wiedemann möchte ich mich herzlichst für alle Unterstützung bedanken!

## 9 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*Einfluss zirkulierender Mikropartikel auf Wachstum, Metastasierungspotential und Gerinnungsaktivität bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom*

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 23.04.2013

---

Julia Gärth