

**Perioperative Untersuchung der  
systemischen Gerinnungsfaktor-Aktivitäten von  
neurochirurgisch behandelten Patienten mit  
intrakraniellen Tumorerkrankungen**

**- eine prospektive klinisch-experimentelle Kohortenstudie -**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

**Linn Luise Handel**

geboren am 28.06.1984 in Dresden

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Rolf Kalff, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. med. Gabriele Schackert, Universitätsklinikum Dresden
3. Prof. Dr. med. Jürgen Meixensberger, Universitätsklinikum Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung: 7. September 2010

## Abkürzungsverzeichnis

AT III	<b>Antithrombin III</b>
AVM	<b>Avian Myeloblastosis Virus</b>
BrdU	<b>5-Bromo-2'-deoxy-Uridin</b>
cDNA	<b>copy deoxyribonucleic acid</b>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CP	<b>cancer procoagulant</b>
DMEM	<b>Dulbecco's modified eagle medium</b>
FCS	<b>fetal calb serum</b>
GF	<b>Gerinnungsfaktor</b>
HMWH	<b>high molecular weight heparin</b>
iNOS	<b>inducible nitric oxide</b>
LMWH	<b>low molecular weight heparin</b>
mRNA	<b>messenger ribonucleic acid</b>
NAD	<b>Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid</b>
NADH	<b>Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Hydroeen</b> (reduziertes NADH)
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
NO	<b>nitric oxide</b> (Stickstoffmonoxid)
p	<b>p-Wert</b> (Überschreitungswahrscheinlichkeit)
PAR	<b>Protease-aktivierter Rezeptor</b>
PCR	<b>polymerase chain reaction</b> (Polymerasekettenreaktion)
PTT	<b>partial thromboplastin time</b> (partielle Thromboplastinzeit)
TF	<b>tissue factor</b>
TPZ	<b>Thromboplastinzeit</b>
VEGF	<b>vascular endothelial growth factor</b>
vWF	<b>von Willebrandt Faktor</b>
ZNS	<b>Zentrannervensystem</b>

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>IV</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
2.1. Intrakranielle Tumore	1
2.1.1. Intrakranielle Tumore im Allgemeinen	1
2.1.2. Gliome	3
2.1.2.1. Astrozytome	4
2.1.3. Meningeome	5
2.1.4. Hirnmetastasen peripherer Malignome	6
2.2. Physiologie der Blutgerinnung	7
2.3. Gerinnung und Hirntumore	10
2.3.1. Thrombose und Hirntumore	10
2.3.2. Tissue factor und Hirntumore	12
2.3.3. Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR's)	13
<b>3. Ziele der Arbeit .....</b>	<b>15</b>
<b>4. Materialien, Patienten und Methodik .....</b>	<b>17</b>
4.1. Studiendesign	17
4.2. Ablauf der Studie	17
4.3. Patienten	18
4.3.1. Einschluss- und Ausschlusskriterien	18
4.3.2. Patientenstatistik	19
4.4. Material und Geräte	22
4.5. Methodik	24
4.5.1. Bestimmung der Gerinnungsfaktor-Aktivität	24
4.5.1.1. Prinzip der photometrischen Methode	24
4.5.1.2. Durchführung der Bestimmung der Gerinnungsfaktor-Aktivität	27
4.5.2. Bestimmung der D-Dimere	29
4.5.2.1. Prinzip der Methode	29
4.5.2.2. Durchführung der turbidimetrischen D-Dimer-Bestimmung	29
4.5.3. Bestimmung von Antithrombin III und Fibrinogen	30

4.5.4.	Gliom-Zellkulturen	31
4.5.5.	Aufbereitung der zellulären RNA und reverse Transkription	31
4.5.6.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
4.5.7.	Immunozytochemische Analyse der PAR-Expression in vitro auf lebenden humanen Glioblastomzellen	32
4.5.8.	Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO)	32
4.5.9.	Zellproliferationsassay mittels Inkorporation und Detektion von 5'-Bromodeoxyuridin (BrdU)	33
4.6.	Dokumentation und statistische Methoden	34
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
5.1.	Vergleich der systemischen Gerinnungsparameter von Patienten mit einem Glioblastom WHO IV° und Kontrollpatienten	35
5.2.	Vergleich der systemischen Gerinnungsparameter von Patienten mit einem niedriggradigen Gliom und Kontrollpatienten	45
5.3.	Vergleich der systemischen Gerinnungsparameter von Patienten mit einem Glioblastom WHO IV° und Patienten mit einem niedriggradigen Gliom	52
5.4.	Vergleich der systemischen Gerinnungsparameter von Patienten mit einem Meningeom WHO I° und II° sowie Kontrollpatienten	55
5.5.	Vergleich der systemischen Gerinnungsparameter von Patienten mit einem Meningeom WHO I° und Kontrollpatienten	60
5.6.	Vergleich der systemischen Gerinnungsparameter von Patienten mit einer intrazerebralen Karzinometastase und Kontrollpatienten	69
5.7.	Thrombembolische Komplikationen im postoperativen Zeitraum	77
5.8.	Gesamtüberleben der Hirntumorpatienten	81
5.9.	Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion	81
5.10.	Immunozytochemische Analyse der PAR-Expression in vitro auf lebenden humanen Glioblastomzellen	82
5.11.	Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO)	82
5.12.	Zellproliferationsassay mittels Inkorporation und Detektion von 5'-Bromodeoxyuridin (BrdU)	83

<b>6.</b>	<b>Diskussion..</b> .....	<b>85</b>
6.1.	Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren	85
6.2.	Multipel erhöhte Gerinnungsfaktor-Aktivitäten und Mehrfacherhöhungen der Aktivität von Gerinnungsfaktoren	89
6.3.	Auswirkungen der erhöhten Gerinnungsfaktor-Aktivitäten	92
6.4.	Von der lokalen zur systemischen Thrombose	95
6.5.	Antithrombin III, Fibrinogen und D-Dimere	97
6.6.	Thromboseprophylaxe bei Patienten mit einem Hirntumor	100
<b>7.</b>	<b>Schlussfolgerungen</b> .....	<b>104</b>
<b>8.</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis</b> .....	<b>106</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>115</b>

## 1. Zusammenfassung

Patienten mit einem intrakraniellen Tumor gehören zu denjenigen Patienten mit dem höchsten Thromboserisiko. Bei 20 - 30 % der Patienten mit einem Glioblastom WHO IV° tritt im weiteren Verlauf eine klinisch relevante tiefe Beinvenenthrombose auf. Ein derart hohes Risiko findet man nur bei Glioblastompatienten; niedriggradige Tumore gehen mit einem geringeren Thromboserisiko einher.

Einige Risikofaktoren sind für thrombembolische Ereignisse bei Hirntumorpatienten schon lange bekannt. Neben diesen Risikofaktoren stellten sich mittels immunohistochemischer Methoden weitere Ursachen heraus. Gerinnungsaktivatoren, allen voran der „tissue factor“ sowie Thrombin liegen im Hirntumorgewebe in signifikant höheren Konzentrationen vor als im tumorfreien Hirngewebe und beweisen somit zumindest die lokale Hochregulierung von Gerinnungskomponenten. Jedoch beobachtet man nicht nur eine vermehrte Thrombenbildung im Hirntumorgewebe selbst sondern auch in fernab gelegenen Körperregionen.

Im Rahmen dieser Arbeit galt es daher, den plasmatischen Gerinnungsstatus im systemischen Blut sowohl zunächst prä- als dann auch am ersten und vierten postoperativen Tag zu untersuchen. Mithilfe der photometrischen Methode wurden die Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII und XIII im peripheren Blut von Patienten mit einem intrakraniellen Tumor sowie von Kontrollpatienten, welche den untersuchten Tumorpatienten in Alter, Geschlecht und Karnofsky-Index ähneln, gemessen und statistisch ausgewertet. Zudem wurden die Konzentrationen der D-Dimere beider Patientengruppen mittels der turbidimetrischen Methode bestimmt. Die Aktivitäten von Antithrombin III sowie die Konzentrationen von Fibrinogen im peripheren Blut der untersuchten Patienten wurden ermittelt und ebenfalls statistisch bewertet. Die erhobenen Ergebnisse waren daraufhin mit dem klinisch manifesten Auftreten von thrombembolischen Komplikationen und dem Gesamtüberleben der eingeschlossenen Patienten zu korrelieren. Letztlich wurden die Daten einer in vitro durchgeführten immunozytochemischen Analyse der PAR-Expression auf lebenden humanen Glioblastomzellen, einer Sekretionsstudie für Stickstoffmonoxid durch humane Glioblastomzellen sowie eines Zellproliferationsassays nach Stimulation der Glioblastomzellen mit einem Gerinnungsfaktor ausgewertet und vor dem Hintergrund der anderen Ergebnisse diskutiert.

Für fast alle Patienten mit einem Hirntumor lassen sich im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollpatienten erhöhte Aktivitäten der getesteten Gerinnungsfaktoren nachweisen. Dabei liegen insbesondere die Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren II, VIII, IX, X und XI bei Patienten mit einem Glioblastom WHO IV° sowohl prä- als auch postoperativ häufiger in erhöhter Aktivität gegenüber der Kontrollgruppe vor. Patienten mit einem niedriggradigen Gliom, einer intrazerebralen Karzinometastase oder mit einem Meningeom weisen weniger markante Veränderungen auf. Neben den Erhöhungen einzelner Gerinnungsfaktor-Aktivitäten lassen sich bei Patienten mit einem Hirntumor außerdem öfter mehrere gleichzeitig in pathologisch erhöhter Aktivität vorliegende Gerinnungsfaktoren beobachten. Zudem zeigen Patienten mit einem Glioblastom WHO IV° signifikant häufiger Kombinationen der Faktoren II & V, II & IX sowie II & X, welche gleichzeitig in über die Normgrenze hinaus erhöhter Aktivität vorliegen. Diese multiplen Aktivitätserhöhungen münden letztendlich immer in einer gesteigerten Bildung des aktiven Thrombins aus seiner Vorstufe Prothrombin. Bezüglich der Aktivitäten von Antithrombin III wurden bei Hirntumorpatienten stets eindeutig höhere Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen. Dabei weisen Patienten mit einem niedriggradigen Gliom höhere Aktivitäten von Antithrombin III auf als Glioblastompatienten.

Bei der Recherche nach thrombembolischen Komplikationen im postoperativen Zeitraum zeigten sich bei den Hirntumorpatienten signifikant häufiger klinisch manifeste tiefe Venenthrombosen als bei den Kontrollpatienten. Die Häufigkeit thrombembolischer Komplikationen nahm mit dem WHO-Grad zu.

Humane Glioblastomzellen exprimieren messenger RNA für den Protease-aktivierten Rezeptor Typ 1. Durch Thrombin oder seine Agonisten findet eine reduzierte Synthese von Stickstoffmonoxid in humanen U373MG Glioblastomzellen statt. Thrombin und die PAR-Agonisten verursachen einen signifikanten Anstieg der DNS-Synthese in humanen U373MG Glioblastomzellen und damit eine deutliche Zunahme der Proliferation.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen einen Zusammenhang zwischen thrombembolischen Komplikationen selbst, der systemischen Gerinnungsaktivität und einer erhöhten Tumoraggressivität vermuten. Eine prophylaktische Antikoagulation, besonders für Patienten mit einem Glioblastom WHO IV°, ist daher zu diskutieren. Eine lokale Hemmung der Gerinnungsfaktor-Rezeptoren im Hirntumor selbst könnte einen therapeutischen Ansatz darstellen.

## 2. Einleitung

### 2.1. Intrakranielle Tumore

#### 2.1.1. Intrakranielle Tumore im Allgemeinen

##### Definition

Als primäre Hirntumore werden alle primär im Gehirn entstehenden Gewebswucherungen bezeichnet (Schlegel *et al.* 2003). Sie können sich aus den Nervenzellen, der Glia, den Meningen, den Hirnanhangsgebilden, den Hirngefäßen sowie den Plexus choroidei bilden. Auch im ZNS entstandene Lymphome sind den primären Hirntumoren zuzuordnen (Schlegel *et al.* 2003).

##### Epidemiologie

Die Inzidenz primärer Hirntumore wird auf 11 - 12 pro 100.000 Einwohner pro Jahr geschätzt (Schlegel *et al.* 2003). Von diesen Tumoren ist circa die Hälfte maligne und betrifft 1 % der Krebsneuerkrankungen pro Jahr. Bei Kindern stellen die Hirntumore mit einer Inzidenz von 3/100.000/Jahr die zweithäufigste Neubildung dar (Legler *et al.* 1999). Nach diesem ersten Häufigkeitsgipfel im Kindesalter ist die Inzidenz zwischen dem 15. und 24. Lebensjahr rückläufig und steigt dann bis zum 70. Lebensjahr wieder an. Dabei nimmt besonders der Anteil maligner Hirntumore zu (Schlegel *et al.* 2003).

##### Ätiopathogenese

Neben dem Lebensalter korrelieren auch Geschlecht und sozialer Status mit dem Entstehen von Hirntumoren. So treten zum Beispiel Gliome ungefähr doppelt so häufig bei Männern, Meningeome dagegen zweimal mehr bei Frauen auf (Schlegel *et al.* 2003). Bezüglich des sozialen Status wurde ein statistisch signifikant höheres Risiko für die Bildung primärer Hirntumore bei Personen mit höherem Lebensstandard nachgewiesen (Preston-Martin 1996). Als weiterer Risikofaktor gilt die Strahlenexposition (Salminen *et al.* 1999, Schlegel *et al.* 2003). Selbst therapeutisch durchgeführt ist sie als eine der Hauptursachen für die Entstehung weiterer Hirntumoren zu sehen. Auch langanhaltende Immunsuppression begünstigt die Entstehung von Hirnneoplasien (Rosenblum *et al.* 1988, Schlegel *et al.* 2003).

Die vielfach in den Medien diskutierte Korrelation zwischen der Entstehung von Hirntumoren durch vorangegangene Exposition elektromagnetischer Felder ist dagegen wissenschaftlich bisher nicht bewiesen.

### WHO-Klassifikation

Nach ihrer Histogenese werden die Hirntumore in verschiedene Entitäten unterteilt. Dafür gilt die WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems als die gängigste Methode. Anhand einer vierstufigen Skala liefert sie eine praxisrelevante Beurteilung der biologischen Wertigkeit der Geschwülste. Tumore mit dem WHO-Grad I bestehen aus hoch differenzierten Zellen mit langsamem Wachstum, haben eine günstige Prognose und gelten daher als „gutartig“. Dagegen fällt ein hochmaligner, wenig differenzierter Tumor mit schneller Wachstumstendenz und ungünstiger Prognose in die Kategorie WHO-Grad IV und gilt damit als „böartig“ (Schlegel *et al.* 2003). Da jedoch jede Raumforderung im ZNS durch Verdrängung des umliegenden Gewebes zu einem erhöhten Hirndruck beziehungsweise zur Einengung lebenswichtiger Zentren führen kann, ist die Unterscheidung zwischen gut- und böartigen Tumoren nicht immer befriedigend.

### Klinische Symptomatik

In Abhängigkeit von Tumorlokalisation, Tumorart, Wachstumsgeschwindigkeit sowie Ausprägung des peritumoralen Ödems können Hirntumore eine sehr vielgestaltige Symptomatik verursachen. Das häufigste Krankheitszeichen stellen Kopfschmerzen, verursacht durch eine Hirndruckerhöhung entweder durch das Tumorgewebe selbst und/oder durch Ausbildung peritumoraler Ödeme beziehungsweise Liquorabflussstörungen dar (Forsyth und Posner 1993, Schlegel *et al.* 2003). Weitere Auswirkungen der intrakraniellen Drucksteigerung können Übelkeit, Erbrechen, Schwindel, Müdigkeit, Leistungsminderung, Konzentrations- sowie psychische Störungen sein. Eine akute Zunahme des Hirndrucks kann gelegentlich zu Bewusstseinsstörungen führen und damit eine lebensbedrohliche Situation darstellen. Befällt ein Tumor ein Hirnareal, das für bestimmte sensorische, motorische oder kognitive Funktionen voraussetzend ist, so kommt es zu entsprechenden neurologischen Ausfällen. Auch epileptische Anfälle führen häufig zur Diagnose eines Hirntumors (Schlegel *et al.* 2003).

### Diagnostik

Diagnostisch werden heute bildgebende Verfahren wie die Computertomografie (CT) oder die Magnetresonanztomografie (MRT) durchgeführt. Mithilfe verschiedener Sequenzen und Schichtführungen des MRTs lassen sich bereits konkrete Aussagen beispielsweise über die Lokalisation des Tumors sowie dessen Wachstumsverhalten treffen. Die Methoden der digitalen Subtraktionsangiografie sowie der Myelo- und Zisternografie verlieren dagegen zunehmend an Bedeutung. Auch eine invasive stereotaktische Biopsie ist heutzutage nur dann angezeigt, wenn sich der Tumor mit weniger invasiven Methoden nicht diagnostizieren lässt, eine genaue Diagnosestellung jedoch essentiell für die richtige Therapie des Patienten ist (Schlegel *et al.* 2003, Weller 2004).

### Therapie

Wie die klinische Symptomatik richtet sich auch die Therapie primärer Hirntumore nach deren Art, Lokalisation, Ursprungsgewebe sowie dem Allgemeinzustand des Patienten. In der Regel steht bei Hirntumoren die Operation im Vordergrund. Bei niedriggradigen Tumoren kann auch das Prinzip von „watch and wait“ verfolgt werden (Schlegel *et al.* 2003). Ziele der chirurgischen Verfahren sind vor allem die Gewinnung von Gewebeproben zur konkreten histopathologischen Tumordiagnose, die Erhaltung neurologischer Funktionen sowie das Sichern der Lebensqualität. Das primäre Ziel ist es dabei, so viel Tumormasse wie möglich zu entfernen, ohne dem Patienten zu schaden. Eine Strahlentherapie wird in der Neuroonkologie nur selten primär sondern vielmehr adjuvant verwendet. Weniger bedeutsam als Operation und Strahlentherapie ist bei der Behandlung primärer Hirntumore die Chemotherapie. Lediglich bei primären ZNS-Lymphomen und bei Gliomen WHO III° und IV° gibt es vielversprechende chemotherapeutische Konzepte (Schlegel *et al.* 2003, Weller 2004, Kuhn *et al.* 2009).

#### **2.1.2. Gliome**

Gliome gehören zu den Tumoren neuroepithelialen Ursprungs. Sie entstehen aus entarteten Gliazellen und werden je nach vermutlicher Art ihres Ursprungsgewebes benannt. Die große Gruppe der Gliome umfasst sowohl Astrozytome,

Oligodendrogliome, Mischgliome, Ependymome, Tumoren des Plexus choroideus sowie seltene Tumoren unklarer Genese.

### **2.1.2.1. Astrozytome**

Mit einem Anteil von über 60 % sind die Astrozytome die häufigsten Vertreter der Gliome. Nach der WHO-Klassifikation unterteilt man sie in weitere vier Gruppen.

Pilozytische Astrozytome des WHO-Grades I stellen die häufigsten Hirntumoren im Kindesalter dar. Sie sind in 85 % der Fälle im Kleinhirn lokalisiert (Schlegel *et al.* 2003). Entsprechend ihres WHO-Grades ist die Raumforderung pilozytischer Astrozytome meist relativ umschrieben und gut gegen das Nachbargewebe abgegrenzt. Der Hirntumor gilt trotz ausgeprägter Polymorphie der Tumorzellen sowie pathologischer Gefäßproliferationen als benigne und ist operativ sogar prinzipiell heilbar (Schlegel *et al.* 2003).

Die diffusen Astrozytome des WHO-Grades II machen etwa 5 % der Hirntumoren aus und finden sich meist in den Großhirnhemisphären (Schlegel *et al.* 2003). Ihr Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr. Im Gegensatz zum pilozytischen Astrozytom ist hier die Grenze zu benachbartem Hirngewebe makroskopisch nicht genau zu erkennen. Mikroskopisch sind die diffusen Astrozytome durch mäßig zellreiches aber gut differenziertes astrozytäres Tumorgewebe gekennzeichnet. Bei einem diffusen Astrozytom besteht bereits die Möglichkeit zur malignen Progression (Schlegel *et al.* 2003).

Auch die anaplastischen Astrozytome vom WHO-Grad III machen etwa 5 % aller Hirntumoren aus, indem sie entweder de novo oder durch Malignisierung eines Astrozytoms WHO-Grad II entstehen (Schlegel *et al.* 2003). Anaplastische Astrozytome befinden sich bei Erwachsenen meist in den Großhirnhemisphären, bei Kindern im Hirnstamm. In der mikroskopischen Beurteilung fällt eine gegenüber den Astrozytomen vom WHO-Grad II erhöhte Zelldichte, eine verstärkte nukleäre und zelluläre Polymorphie sowie eine erhöhte Mitosenanzahl auf (Schlegel *et al.* 2003).

Das multiforme Glioblastom vom WHO-Grad IV ist das höchstgradige Astrozytom und tritt mit einer Inzidenz von etwa drei Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr am häufigsten auf (Schlegel *et al.* 2003, [www.cbtrus.org](http://www.cbtrus.org)). Derzeit noch unheilbar, beträgt die mediane Überlebenszeit nach Standard- und adjuvanter

Therapie nur 50 Wochen (Rong *et al.* 2005). Durch eine adjuvante Chemotherapie mit Temozolomid konnte die Überlebenszeit signifikant gesteigert werden (Stupp *et al.* 2009). Charakteristischerweise entsteht dieser Tumor in sehr kurzer Zeit. Verglichen mit niedriggradigen Astrozytomen weist er zehnfach schnellere Wachstumsraten auf (Rong *et al.* 2005). Gründe für das explosive Wachstum von Glioblastomen sind noch nicht völlig erforscht. Bei der Transformation zu Glioblastomen kommt es zu einer dramatischen Erhöhung bestimmter Wachstumsfaktoren – bis auf das Zehnfache verglichen mit Astrozytomen vom WHO-Grad II (Van Meir und Brat 2004). Seinem Namen entsprechend erscheint das Glioblastom sehr multiform. Vitales Tumorgewebe kann an Nekrosen grenzen, Einblutungen an Zysten und/oder narbige Veränderungen. Obwohl das Glioblastom mit bloßem Auge oft scharf gegen das umliegende Gewebe abgegrenzt erscheint, bestätigt sich dieser Verdacht mikroskopisch nie. Insbesondere die pathologischen mikrovaskulären Proliferate sowie Tumorgewebsnekrosen sind typisch für aus Glioblastomen gewonnene Histologien und sprechen für deren hohe Malignität. Desweiteren fallen mikroskopisch eine hohe Zelldichte, sehr pleomorphe Zellen und Kerne sowie eine hohe mitotische Aktivitäten auf. Die Gefäßproliferate neigen zudem oft zur Thrombosierung (Schlegel *et al.* 2003, Van Meir und Brat 2004).

### **2.1.3. Meningeome**

Mit einem Anteil von 25 % gehören die Meningeome neben den Gliomen und intrazerebralen Metastasen zu den häufigsten intrakraniellen Tumoren. Im Gegensatz zu allen anderen Hirntumoren treten Meningeome mit einem Verhältnis von 3:2 bis 2:1 häufiger bei Frauen als bei Männern auf (Schlegel *et al.* 2003). Meist betreffen sie Erwachsene ab dem 50. Lebensjahr. Typische Lokalisationen sind die Falx cerebri, die Hirnhäute im Bereich der Großhirnkrümmung, die Frontobasis, der Keilbeinflügel, die basalen Zisternen sowie der Kleinhirnbrückenwinkel (Schlegel *et al.* 2003). Charakteristischerweise liegt das Tumorgewebe breitbasig der Dura mater auf. Ein sogenannter „dural tail“ ist im MRT diagnostisch hilfreich (Gasparetto *et al.* 2007). Die Tumorgrenzen meist scharf einhaltend komprimieren und verdrängen sie das umliegende gesunde Hirngewebe (Schlegel *et al.* 2003). Die WHO-Klassifikation sieht für die Tumorentität der Meningeome drei verschiedene Grade vor.

Meningeome vom WHO-Grad I sind gutartige Tumoren mit einem niedrigen Risiko für aggressives Wachstum und Rezidivbildung und damit einer günstigen Prognose nach Resektion. Sie betreffen bis zu 80 % der Patienten.

Ist das Meningeom durch aggressiveres Wachstum und/oder eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für Rezidivbildung gekennzeichnet, so wird es laut WHO-Klassifikation in den Grad II eingestuft (Schlegel *et al.* 2003). Das atypische Meningeom grenzt sich durch seine erhöhte Mitoseaktivität von den niedriggradigeren Meningeomen ab. Vom umliegenden gesunden Gewebe zeigt es keine scharfe Abgrenzung mehr.

Die kleinste Gruppe der Meningeome bilden die anaplastischen Meningeome WHO-Grad III. Sie zeichnen sich mikroskopisch durch Anaplasiezeichen und großflächige Nekrosen aus. Klinisch bieten sie aufgrund ihres invasiven Wachstums, einer hohen Rezidivrate sowie der Fähigkeit zur Metastasenbildung – sogar hämatogen in außerhalb des ZNS gelegene Organe – eine sehr ungünstige Prognose (Perry *et al.* 1999, Schlegel *et al.* 2003). Postoperative Überlebenszeiten von zwei Jahren werden im Mittel kaum erreicht (Perry *et al.* 1999).

#### **2.1.4. Hirnmetastasen peripherer Malignome**

Auch Metastasen extrakranieller Tumoren zählen zu den häufigsten Tumorentitäten. Sie machen etwa 20 - 30 % aller Hirntumoren aus (Schlegel *et al.* 2003). Als Primärtumor liegt in 40 - 60 % der Fälle ein Bronchialkarzinom vor, gefolgt von Mammakarzinomen und malignen Melanomen (Schackert 2002). Bei 10 - 20 % der Patienten wird eine intrazerebrale Metastasierung diagnostiziert, ohne dass ein Primärtumor bereits bekannt ist (Schackert 2002). Prinzipiell können sich ZNS-Metastasen in allen Bereichen ansiedeln. Dabei bevorzugen sie im Gehirn die Rinden-Mark-Grenze im Bereich der Großhirnhemisphären (Schlegel *et al.* 2003). Meist weist das Metastasengewebe mikroskopisch eine hohe Mitoseaktivität, große Tumorgewebsnekrosen, randständige Gefäßproliferationen und weitere Malignitätsmerkmale auf (Schlegel *et al.* 2003). Gegen das benachbarte Gewebe gilt es als relativ scharf abgegrenzt, obwohl neuere Forschungsprojekte und Kongressberichte eine höhere Invasivität vermuten (Fidler *et al.* 1999, Schlegel *et al.* 2003).

## 2.2. Physiologie der Blutgerinnung

Die Blutgerinnung (Hämostase) erfüllt die für den Organismus ganz wesentliche Aufgabe der Kontrolle des Blutstroms. So würde jede Verletzung des Blutgefäßsystems unter Umständen zu einem tödlichen Blutverlust führen, könnte die Hämostase die Blutung nicht stoppen und einen übermäßigen Austritt von Blut aus dem Kreislauf verhindern.

Die Blutgerinnung erfordert ein komplexes Zusammenspiel von Endothelzellen der Gefäßwand, Thrombozyten, plasmatischen Gerinnungsfaktoren und des fibrinolytischen Systems.

In der zellulären (primären) Hämostase kommt es initial nach Verletzung der Gefäßwand zur vaskulären Kontraktion und damit zur Verringerung des Blutflusses aus dem geschädigten Gefäß (Löffler 2000). Anschließend binden die Thrombozyten über Rezeptoren auf ihrer Oberfläche entweder direkt an freigelegte subendotheliale Strukturen oder werden über den von-Willebrand-Faktor (vWF) mit ihnen verbunden. Durch diese Adhäsion kommt es zur Thrombozytenaktivierung (Thomas 2005). Die Thrombozyten setzen aus Granula die Plättchenfaktoren Adenosindiphosphat, Serotonin, Thromboxan und andere frei, welche ihrerseits die Gefäßkontraktion sowie die Aktivierung der Thrombozyten verstärken (Löffler 2000). Durch Adenosindiphosphat induzierte Veränderungen der Oberflächenrezeptoren ermöglichen zudem weitere Haftstellen für Fibrinogen sowie vWF und führen damit zur Thrombozytenaggregation. Der initial entstandene, instabile und lockere „weiße Thrombus“ verfestigt sich schnell unter Einbau von Leukozyten und Erythrozyten zu einem stabilen „roten Thrombus“ (Löffler 2000).

Das Ziel der plasmatischen (sekundären) Hämostase ist die Bildung von Fibrin. Dieser unlösliche Blutfaserstoff ermöglicht eine Verklebung des verletzten Gefäßes bis zum Abschluss der Wundheilung. Seine Bildung beginnt mittels proteolytischer Abspaltung zweier Peptide aus dem noch löslichen Fibrinogen durch die Serinprotease Thrombin (Barthels und von Depka 2003). Anschließend können die freigelegten Spaltstellen mit denen benachbarter Fibrinmoleküle in Verbindung treten. Es entstehen polymere Fibrinaggregate. Schließlich induziert der als Transglutaminase wirkende aktivierte Faktor XIII kovalente Quervernetzungen im Fibrin und sorgt damit für dessen endgültige Stabilität (Barthels und von Depka 2003).

Thrombin (aktivierter Faktor II) wird seinerseits durch proteolytische Abspaltung aus Prothrombin gebildet (Löffler 2000). Prothrombin wird mithilfe von Vitamin K in der Leber synthetisiert und durch proteolytische Spaltung an der Plasmamembran vor allem von Thrombozyten aktiviert (Löffler 2000). Für diese Spaltung ist die sogenannte Prothrombinase, ein Komplex aus den aktivierten Gerinnungsfaktoren V und X verantwortlich (Löffler 2000). Während der Faktor V durch einen Rezeptor der Thrombozytenmembran aktiviert wird, ist für die Aktivierung des ebenfalls als Serinprotease wirkenden Faktors X das intravaskuläre beziehungsweise extravaskuläre System der Blutgerinnung verantwortlich (**Abb. 1**) (Löffler 2000).

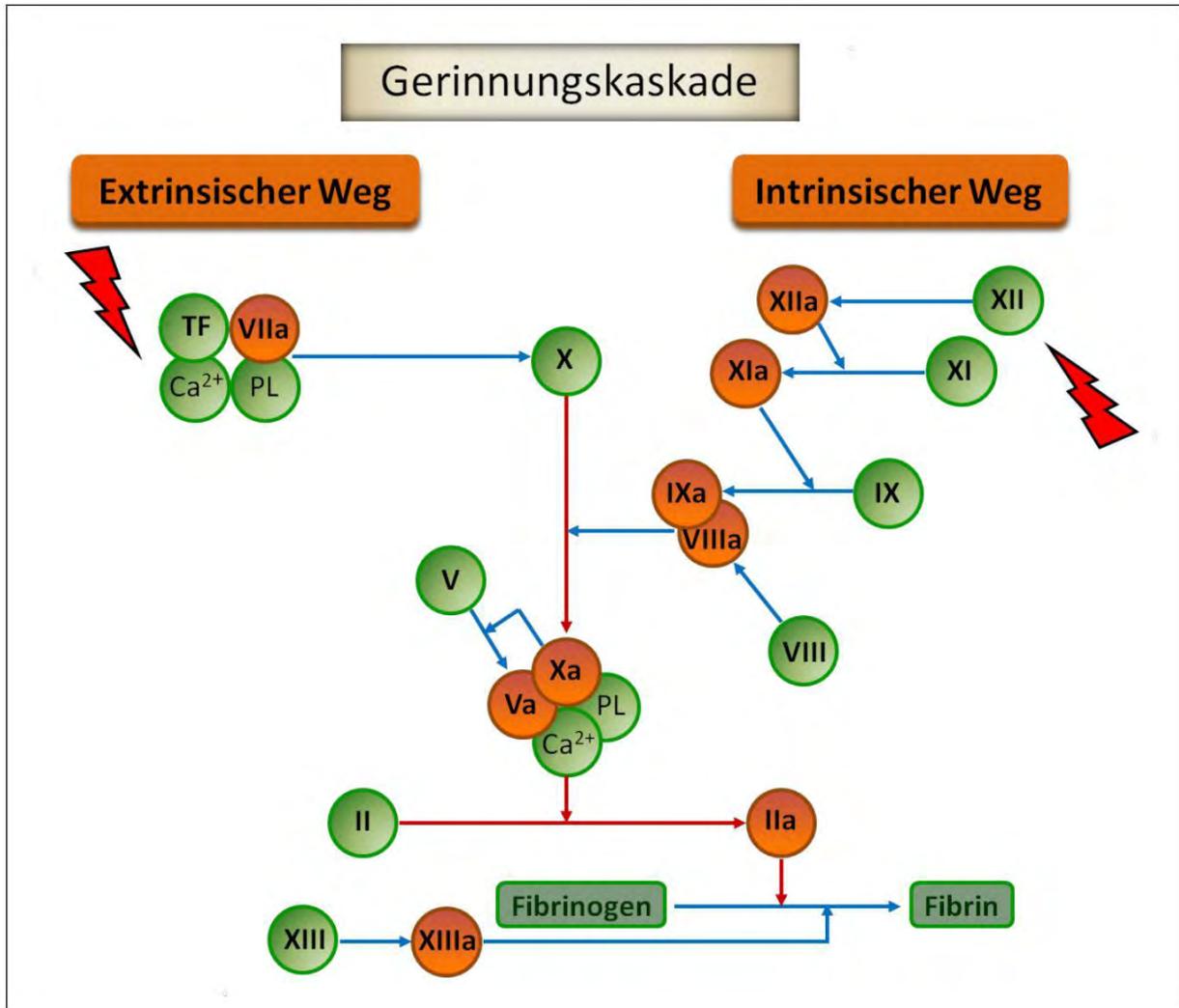
Das extravaskuläre (extrinsische) System gewährleistet eine rasche Blutstillung nach Verletzungen. Durch die Schädigung der Gefäßwand wird Gewebethromboplastin (tissue factor, Faktor III) aus dem subendothelialen Bindegewebe freigelegt (Löffler 2000). Daraufhin bindet und aktiviert es den Gerinnungsfaktor VII. Der Komplex aus aktiviertem Faktor VII und dem Faktor III bildet eine Serinprotease, die den Faktor X aktiviert (Löffler 2000).

Das intravaskuläre (intrinsische) System verläuft etwas langsamer. Dafür ermöglicht es eine Blutgerinnung auch im intakten Gefäßsystem (Löffler 2000). Im ersten Schritt wird der Faktor XII aktiviert, wofür außer Kontakt mit dem Endothel auch in der Leber synthetisiertes Kallikrein notwendig ist. Der aktivierte Faktor XII spaltet den Faktor XI, welcher seinerseits im nun aktivierten Zustand den Faktor IX spaltet und aktiviert. Der aktivierte Faktor IX ist daraufhin in der Lage, den Faktor X proteolytisch zu aktivieren. Diese Reaktion erfolgt nur sehr langsam. Sie kann jedoch durch Bindung des aktivierten Faktors VIII wesentlich beschleunigt werden, nachdem dieser durch Thrombin oder den aktivierten Faktor XI gespalten und damit aktiviert wurde (**Abb. 1**) (Keil und Fiedler 2000, Löffler 2000, Barthels und von Depka 2003).

Die Gerinnungsfaktoren werden normalerweise in der Leber synthetisiert und können teilweise auch in Thrombozyten (Faktor V) und Endothelien (Faktor VIII) gespeichert werden. Nach ihrer Freisetzung zirkulieren die Gerinnungsfaktoren als inaktive Proenzyme im Blut und funktionieren bei ihrer Aktivierung mit Ausnahme des Faktors XIII als Serinproteasen. Ihre Wirkung kann durch Bildung von Komplexen mit Calciumionen und Phospholipiden beschleunigt werden (Katalysatoreffekt) (Löffler 2000).

Um die Ausbreitung der lokalen Blutgerinnung sowie ein vollständiges Erliegen der Blutzirkulation zu verhindern, enthält das Blut neben den Gerinnungsaktivatoren

auch einige Inhibitoren. So kann das Protein Antithrombin III (AT III) durch Bindung an die aktivierten Faktoren IX, X, XI, XII sowie Thrombin deren Wirkung hemmen (Thomas 2005). Durch Komplexbildung mit Heparinen – stark sulfatierten Glycosaminoglycanen – kann diese Wirkung noch erheblich gesteigert werden (Löffler 2000, Thomas 2005). Die aktivierten Faktoren V und VIII können durch die Proteine C und S ebenfalls inaktiviert werden.



**Abb. 1** Gerinnungskaskade (modifiziert nach Löffler 2000). In dieser Studie erfolgte die Untersuchung der rot unterlegten Gerinnungsfaktoren.

Da für eine erfolgreiche Wundheilung nicht nur die Fibrinbildung, sondern auch dessen Auflösung mit anschließender Rekanalisierung des Blutgefäßes notwendig ist, existiert das fibrinolytische System. Schlüsselenzym dieses Systems ist die Protease Plasmin, die wie die Gerinnungsaktivatoren als Proenzym (Plasminogen) im Blut zirkuliert. Durch spezifische Serinproteasen kann auch das Plasminogen

proteolytisch gespalten und somit aktiviert werden. Sogenannte Plasminogen-Aktivatoren sind zum einen der aus dem Endothel sezernierte Gewebefibrinogen-Aktivator (tPA) und zum anderen die vorwiegend aus dem Urogenitaltrakt stammende Urokinase (uPA) (Keil und Fiedler 2000). Wird Fibrin durch Plasmin gespalten, so entstehen spezifische Spaltprodukte, sogenannte D-Dimere. Können sie im Blut eines Patienten nachgewiesen werden, so kann das bedeuten, dass irgendwo im Körper ein Prozess mit Gerinnung und Fibrinolyse abgelaufen ist (Löffler 2000).

## **2.3. Gerinnung und Hirntumore**

### **2.3.1. Thrombose und Hirntumore**

Bereits 1861 beschrieb der Pariser Arzt Armand Trousseau (1801-1867) in „Clinique médicale de l'Hôtel-Dieu de Paris“ Zusammenhänge zwischen Tumoren und dem Hämostasesystem (Hach-Wunderle und Hach 1999). Trousseaus Ansicht nach besteht „...bei jeder Cachexie eine Verminderung der rothen Blutkörperchen und Vermehrung des Faserstoffs sowie des Serumantheiles... Daraus zog ich nun den Schluss, dass jeder cachektische Zustand, der nicht mit Tuberculose oder mit dem Puerperium in Verbindung zu bringen ist, mit grösster Wahrscheinlichkeit auf einen Krebstumor deutet.“ (Hach-Wunderle und Hach 1999). Trousseau musste 1867 schließlich bei sich selbst den von ihm beschriebenen Symptomenkomplex des paraneoplastischen Syndroms diagnostizieren. Er schloss daraus, an einem Magenkarzinom zu leiden, an dem er ein halbes Jahr später verstarb (Hach-Wunderle und Hach 1999). Die Koinzidenz der Phlebothrombose mit einem Tumor wird seither als Trousseau-Syndrom bezeichnet (Hach-Wunderle und Hach 1999).

Der erste Bericht über ein pathologisches Gerinnungssystem bei Patienten mit Gehirntumoren wurde 1952 von Nathanson und Savitsky veröffentlicht (Sawaya und Ligon 1994). Sie hatten eine erhöhte Thrombozytenadhäsion bei sechs von acht Patienten mit einem Gehirntumor beobachtet (Nathanson und Savitsky 1952). Auch mit modernsten (peri-) operativen Möglichkeiten gilt die venöse Thromboembolie nach der Tumorerkrankung selbst noch heute als die zweithäufigste Todesursache bei Malignompatienten (Pruemer 2005, Mousa 2006). Schätzungen zufolge stirbt

jeder siebte stationäre Tumorpatient an einer pulmonalen Embolie. Damit ist das Risiko, an einer venösen Thromboembolie zu sterben für Tumorpatienten dreifach höher als für Patienten ohne tumoröse Erkrankungen (Pruemer 2005).

Oftmals geschehen die thrombembolischen Ereignisse noch bevor die Erstdiagnose eines Hirntumors gestellt wird. Man fand bei 7,3 % der Patienten mit idiopathischer Thrombose im Rahmen einer halbjährigen Nachbeobachtungszeit eine maligne Erkrankung (Hettiarachchi *et al.* 1998). Eine Krebserkrankung, die bis zu einem Jahr nach beziehungsweise zur gleichen Zeit mit einer venösen Thromboembolie diagnostiziert wird, ist zudem mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium und einer schlechteren Prognose assoziiert (Sørensen *et al.* 2000). Höchste Inzidenzen für venöse Thromboembolien findet man bei Patienten mit Gliomen (Simanek *et al.* 2007). So beträgt das Risiko für eine klinisch manifeste tiefe Beinvenenthrombose bei Patienten mit Glioblastomen 20 - 30 % (Rong *et al.* 2005). Niedriggradige Astrozytome gehen mit einem niedrigeren Risiko einher (Rong *et al.* 2005). Addiert man zu den klinischen noch die subklinischen Fälle, beträgt die Wahrscheinlichkeit sogar bis zu 60 %, dass Patienten, die wegen ihrem Hirntumor operiert werden, in den ersten sechs postoperativen Wochen venöse Thromben entwickeln (Ornstein *et al.* 2002). 85 % aller thrombembolischen Komplikationen treten innerhalb der ersten drei postoperativen Monate auf und sind bei Patienten mit höhergradigen Gliomen signifikant häufiger als bei Patienten mit niedriggradigen Tumoren (Kuhn *et al.* 2009). In ständigem Bestreben der Medizin nach bestmöglichen Ergebnissen stellt sich die Frage nach Gründen und Ursachen dieser hohen Assoziation zwischen Hirntumoren und thrombembolischen Ereignissen. Zahlreiche krankheits- und behandlungsbedingte Risikofaktoren sind dafür lange bekannt. Hierzu gehören die Freisetzung prokoagulatorischer Substanzen während der Operation, in der postoperativen Phase sowie durch eine Strahlen- oder Chemotherapie, Immobilität, eine reduzierte Muskelpumpe durch Paresen, zentrale Regulationsstörungen des Kreislaufs und/oder der Vasomotoren sowie weitere allgemeine Risikofaktoren wie Nikotinabusus, orale Kontrazeptiva und eine familiäre oder erworbene Thrombophilie (Quevedo *et al.* 1994, Marras *et al.* 2000, Otten *et al.* 2000, Schlegel *et al.* 2003).

### 2.3.2. Tissue factor und Hirntumore

Auch auf molekularer Ebene konnten einige Mechanismen aufgezeigt werden, welche für das hohe Vorkommen tiefer Venenthrombosen verantwortlich sind. Besonders die Bedeutung des tissue factors (TF) nahm in der Malignombiologie während der letzten Jahre zu – sowohl beim Tumorwachstum, der Metastasierung als auch der Angiogenese. Während im gesunden Hirnparenchym hauptsächlich Astrozyten den tissue factor produzieren, kann er auch von Gliomzellen exprimiert werden, wobei seine Konzentration mit dem WHO-Grad zunimmt (Marras 2000, Ornstein *et al.* 2002, Deitcher 2003, Van Meir und Brat 2004, Rong *et al.* 2005). In Studien wurde zum Beispiel gefunden, dass die TF-mRNA 500 x stärker in Astrozytomen als in tumorfreiem Hirngewebe vorliegt (Ornstein *et al.* 2002).

Der tissue factor (Gewebethromboplastin) ist einer der wirksamsten Gerinnungsförderer. Er wird am stärksten von den hypoxischen, die zentrale Tumornekrose umgebenden Zellen exprimiert (Rong *et al.* 2005). Normalerweise ist TF ein 47 kDa großer Transmembranrezeptor, der von perivaskulären Stromazellen exprimiert wird aber auch in löslicher Form existiert. Kommt es zu vaskulärer Schädigung, interagiert TF mit dem Gerinnungsfaktor VII/VIIa, welcher wiederum die Gerinnungskaskade in Gang setzt und zur Hämostase führt (Ogiichi *et al.* 2000, Rong *et al.* 2005). Das hat auch zur Folge, dass in über 50 % der Glioblastome Gefäße vorliegen, deren zentrales Lumen entweder durchgängig, degeneriert oder thrombosiert ist (Van Meir und Brat 2004).

Der tissue factor hat eine pleiotrope Wirkung (**Abb. 2**). Er nimmt an einer Reihe intrazellulärer Signalprozesse teil. So ist er zum Beispiel an der Tumorzelladhäsion und Migrationsreaktionen beteiligt (Korte 2000, Ornstein *et al.* 2002). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Blutgefäße in Tumoren mit für TF positivem Endothel signifikant dichter waren als in jenen, deren Endothel negativ für TF war (Ornstein *et al.* 2002). Auch Rickles *et al.* beobachteten durch den tissue factor induzierte, VEGF ähnliche Funktionen. Sie stellten fest, dass Tumorzellen, die TF-komplementäre DNS enthalten, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein maligneres Verhalten zeigen und schlossen daraus, dass erhöhte TF-Expressionen in Tumoren mit einer schlechteren Prognose, erhöhten Angiogenese sowie „multidrug-resistance“ korrelieren (Rickles *et al.* 2003).



und Thrombosierung aber auch bei Entzündung und Gefäßproliferation (Coughlin 2005). Mehrere Studien konnten zudem eine Überexpression der PAR's in verschiedenen Malignomen nachweisen (Even-Ram *et al.* 1998, Kaufmann *et al.* 1998, Darmoul *et al.* 2003, Fernandes *et al.* 2006, Kuhn *et al.* 2009), deren Ausprägung direkt mit dem Tumorgrad korreliert (Kuhn *et al.* 2009). Im Tumorgewebe leiten die PAR's Signale als Antwort auf Tumor-generierte Proteasen weiter und fördern sowohl Tumorwachstum, -invasion als auch die Metastasierung. (Boire *et al.* 2005, Arora *et al.* 2007). Außerdem konnte eine Induktion der Freisetzung von Stickstoffmonoxid durch PAR-1 an Rattengliomzellen nachgewiesen werden (Meli *et al.* 2001). Auch eine PAR-1 vermittelte Verstärkung der Expression inflammatorischer Zytokine sowie eine Erhöhung des intrazellulären Calciums wurde in Gliomzellen beobachtet (Okamoto *et al.* 2001, Fan *et al.* 2005). Die Aktivierung des Prototyps PAR-1 erfolgt vor allem durch Thrombin und den aktivierten Gerinnungsfaktor X (Arora *et al.* 2007). Während Thrombin PAR-vermittelt die Thrombenbildung und Tumorprogression fördert, spaltet der aktivierte Faktor X ebenfalls mithilfe des PAR-1 proteolytisch Prothrombin zu Thrombin und verstärkt somit die prokoagulatorischen und Tumor-proliferativen Effekte. Auch eine Aktivierung des PAR-1 durch antikoagulatorische Proteasen wie das aktivierte Protein C und Plasmin wurde beobachtet (Bae und Rezaie 2008).

### 3. Ziele der Arbeit

Vieles spricht dafür, dass neben der bereits bekannten lokalen auch eine systemische Hochregulierung von Faktoren des Gerinnungssystems bei Patienten mit einem intrakraniellen Tumor besteht und dass deren Ausprägung mit dem WHO-Grad korreliert. Unter der Voraussetzung, dass es mehrere Arbeiten über die Interaktion zwischen dem Auftreten von Thrombosen sowie Gerinnungsstörungen im Hirntumorgewebe selbst gibt, soll in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf dem plasmatischen Gerinnungsstatus bei Patienten mit einem intrakraniellen Tumor liegen. Darüber hinaus soll gezeigt werden, dass es für den Hirntumor einen Vorteil bringt, wenn Gerinnungskomponenten auf die Tumorzellen einwirken.

- (1) Zunächst war für diese Studie ein Antrag bei der Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität zu erarbeiten und zu stellen.
- (2) In der Arbeit galt es zu untersuchen, inwiefern sich der systemische Gerinnungsstatus von Patienten mit Gehirntumoren sowohl präoperativ als auch früh postoperativ verändert.
- (3) Im Speziellen sollte herausgefunden werden, ob im peripheren Blut von Patienten mit einem intrakraniellen Tumor präoperativ pathologische beziehungsweise im Vergleich mit einer Kontrollgruppe erhöhte Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII und/oder des Antithrombins III sowie erhöhte Konzentrationen der D-Dimere und Fibrinogen nachweisbar waren. Wenn das der Fall war, sollte ermittelt werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Tumorentität und der Art und Weise der Veränderungen der Gerinnungsfaktoren besteht.
- (4) Desweiteren sollte ermittelt werden, ob bei Patienten mit einem intrakraniellen Tumor mehrere Gerinnungsfaktoren gleichzeitig in erhöhter Aktivität vorliegen und welche Faktoren besonders häufig erhöht aktiviert sind beziehungsweise welche Kombinationen der Mehrfacherhöhungen auftreten.

- (5) Die erhobenen Ergebnisse waren anschließend mit dem klinisch manifesten Auftreten von thrombembolischen Komplikationen und dem Gesamtüberleben der eingeschlossenen Patienten zu korrelieren.
  
- (6) Letztlich waren die Daten einer in vitro durchgeführten immunozytochemischen Analyse der PAR-Expression auf lebenden humanen Glioblastomzellen, einer Sekretionsstudie für Stickstoffmonoxid durch humane Glioblastomzellen sowie eines Zellproliferationsassays nach Stimulation der Glioblastomzellen mit einem Gerinnungsfaktor zu werten und vor dem Hintergrund der anderen Ergebnisse zu diskutieren.

## **4. Materialien, Patienten und Methodik**

### **4.1. Studiendesign**

Die vorliegende Arbeit beruht auf einer prospektiven klinisch-experimentellen Studie, in der durch Messung von Gerinnungsparametern im Blut der systemische Gerinnungsstatus von Patienten mit Hirntumoren mit dem von Patienten ohne Tumorleiden verglichen wird. Für die Blutentnahmen und ihre anschließende laborante Untersuchung lag eine Genehmigung der lokalen Ethikkommission (Medizinische Fakultät der FSU Jena) vor. Alle Patienten willigten nach einer Aufklärung schriftlich in die Studie ein.

Die Studie ist in zwei Phasen unterteilt. Bei der ersten Phase handelt es sich um eine Korrelationsstudie. Für sie wurden ausschließlich die präoperativen Werte der Gerinnungsfaktoren, D-Dimere, AT III und Fibrinogen aus dem peripheren Blut von Patienten mit einem Hirntumor mit den Werten von Kontrollpatienten verglichen.

Um auch Einblicke in den postoperativen Status der Gerinnungswerte zu gewinnen, wurde die Studie nach dem ersten Jahr durch eine zweite Phase ergänzt. Hierfür wurden die Konzentrationen der Gerinnungsfaktoren, D-Dimere, AT III sowie Fibrinogen im Rahmen einer prospektiven Kohortenstudie nicht nur präoperativ, sondern auch am ersten und vierten postoperativen Tag bestimmt.

### **4.2. Ablauf der Studie**

Nach stationärer Aufnahme wurden die Patienten zunächst über das Anliegen aufgeklärt sowie Ein- und Ausschlusskriterien anhand eines vorher erstellten Fragebogens ermittelt und der Karnofsky-Index bestimmt. Aus dem entnommenen Blut wurden anschließend im Labor des Institutes für Klinische Chemie des Uniklinikums Jena die Konzentrationen der Gerinnungsfaktoren II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII sowie der D-Dimere bestimmt. Als weitere, das Thromboserisiko charakterisierende Blutwerte wurden neben den Gerinnungsfaktoren und den D-Dimeren auch die Konzentrationen von Fibrinogen und die Aktivitäten von Antithrombin III präoperativ sowie am ersten und vierten postoperativen Tag dokumentiert. Außerdem gaben die Krankenblätter Aufschluss über Alter und

Vorerkrankungen der Patienten. Der pathologische Befund lieferte die genaue Tumordiagnose. Sowohl Krankenblätter als auch pathologische Befunde wurden dem SAP-System sowie dem Archiv entnommen beziehungsweise direkt in den entsprechenden Instituten erfragt. Schließlich wurde nach Beendigung der Gerinnungsfaktor-Bestimmungen und mit einem zeitlichen Abstand von sechs Monaten zum letzten untersuchten Patienten die postoperative Häufigkeit von thrombembolischen Komplikationen ermittelt. Dies geschah durch Befragung der Patienten; Verlaufsberichte nach stationären Aufenthalten sowie Arztbriefe dienten als zusätzliche Informationsquellen.

### **4.3. Patienten**

#### **4.3.1. Einschluss- und Ausschlusskriterien**

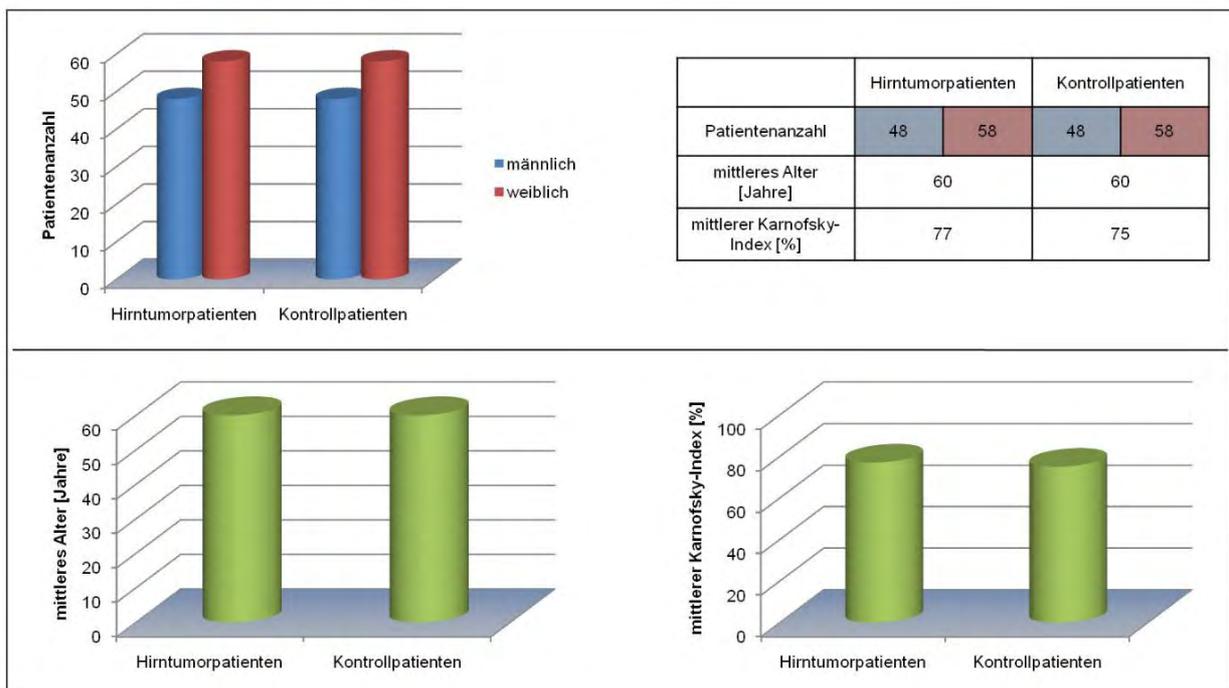
In die Studie eingeschlossen wurden Patienten mit primären Hirntumoren oder intrazerebralen Karzinometastasen, welche im Zeitraum von Juni 2006 bis Juli 2008 in der Klinik für Neurochirurgie des Uniklinikums Jena operiert wurden. Auch bei Patienten mit zunächst unklaren Raumforderungen des ZNS erfolgte präoperativ eine Blutentnahme. Falls durch die histologische Beurteilung des Tumorgewebes der Verdacht auf einen primären Hirntumor oder eine intrazerebrale Karzinometastase nicht bestätigt werden konnte, wurden die Untersuchungen bei diesen Patienten abgebrochen. Die Kontrollgruppe bestand aus neurochirurgischen Patienten ohne Tumorleiden, welche in oben genanntem Zeitraum an der Wirbelsäule, meist wegen eines Bandscheibenvorfalles, operiert wurden. Die Kontrollpatienten ähneln den Tumorpatienten in Alter, Geschlecht und Karnofsky-Index, um bei der statistischen Auswertung ein confounding der Ergebnisse zu vermeiden. Die Gruppen der Tumorpatienten und der Kontrollpatienten unterschieden sich in diesen Kriterien nicht signifikant voneinander.

Ausgeschlossen von der Studie wurden Tumorpatienten mit konservativer Behandlung, da von ihnen keine Histologien gewonnen werden konnte, Patienten im postoperativen Zustand sowie Patienten, die bis zu vier Wochen vor der Blutentnahme Gerinnungshemmer oder -aktivatoren (zum Beispiel ASS, Falithrom, Konaktion et cetera) einnahmen. Da einige Patienten keine genauen Angaben zu

ihren medikamentösen Behandlungen machen konnten, wurden sie nach erlittenen Herzinfarkten und Schlaganfällen gefragt, um dadurch indirekt einen Hinweis auf eventuell eingenommene Medikamente, die das Gerinnungssystem beeinflussen, zu erlangen. Kontrollpatienten wurden ausgeschlossen, sofern sie neben oben genannten Kriterien bisher mindestens eine Thrombose oder Embolie erlitten, andere Tumor-, Lebererkrankungen und/oder vererbte Störungen des Gerinnungssystems aufwiesen sowie Alkoholabusus oder die Einnahme von Kontrazeptiva angaben.

### 4.3.2. Patientenstatistik

Unter Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien konnten die Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren sowie die Konzentrationen der D-Dimere von 106 Patienten mit einem intrakraniellen Tumor sowie 106 Kontrollpatienten untersucht werden. Darunter befanden sich in beiden Patientengruppen 58 Frauen und 48 Männer. Das Alter schwankte zwischen 16 und 86 Jahren bei den Tumor- beziehungsweise zwischen 18 und 86 Jahren bei den Kontrollpatienten und betrug im Mittel jeweils 60 Jahre  $\pm$  15 Jahre bei den Hirntumorkontrollpatienten beziehungsweise  $\pm$  14 Jahre bei den Hirntumorpatienten (**Abb. 3**).

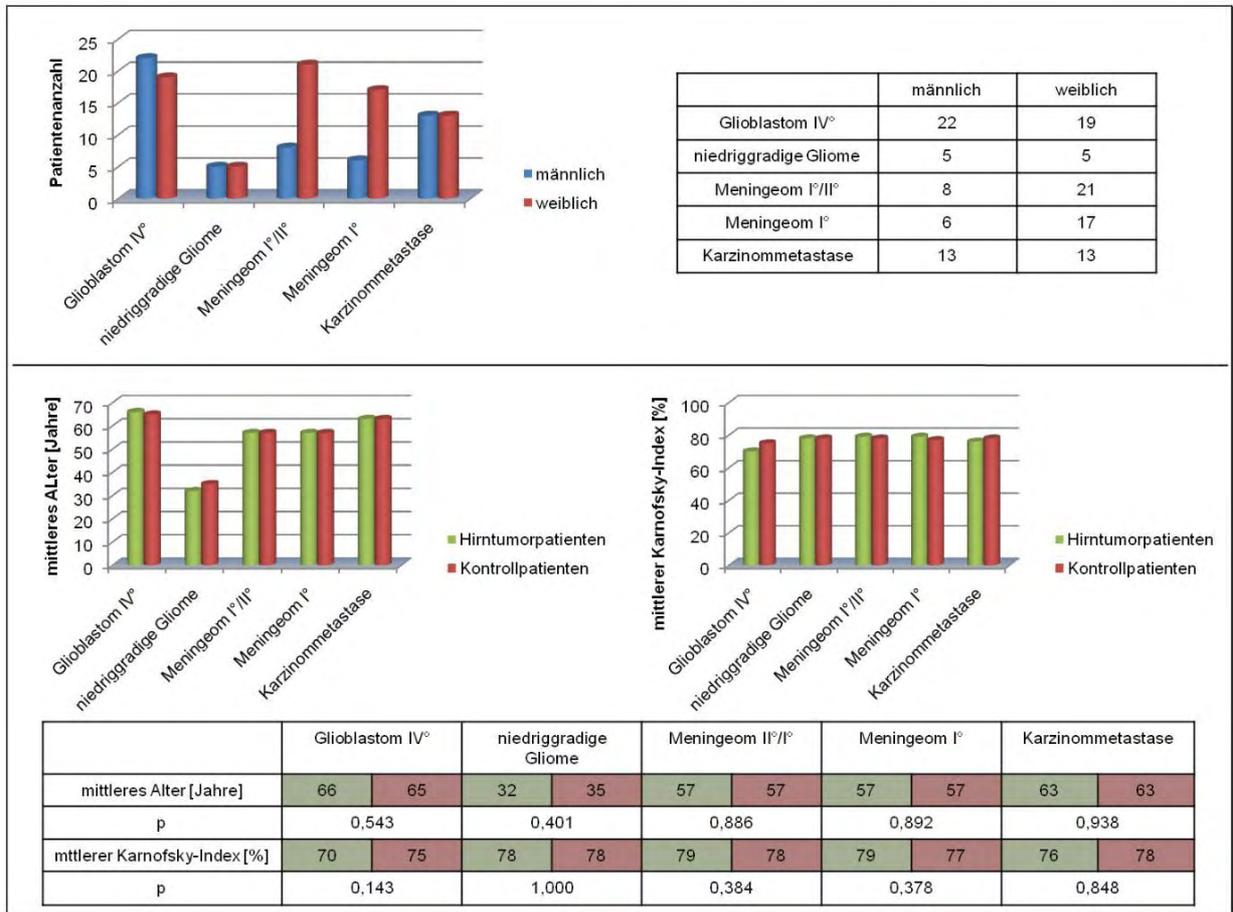


**Abb. 3** Geschlechterverteilung sowie mittlere Alter und Karnofsky-Indices aller eingeschlossenen Patienten.

Von den präoperativ untersuchten Tumorpatienten litten 41 (19 Frauen, 22 Männer) an einem Glioblastoma multiforme WHO IV°. Zehn Patienten (fünf Frauen, fünf Männer) hatten ein pilozytisches Astrozytom WHO I°, ein diffuses Astrozytom WHO II°, ein Gangliozytom WHO I° oder ein Gangliogliom WHO II° und wurden in die Patientengruppe mit niedriggradigen Gliomen zusammengefasst. 29 Patienten (21 Frauen, acht Männer) hatten ein Meningeom WHO I° oder II° und wurden ebenfalls zu einer Patientenkohorte zusammengefasst. Bei 23 Patienten (17 Frauen, sechs Männer) wurde ein Meningeom WHO I° diagnostiziert. An einer Karzinommetastase litten insgesamt 26 Patienten (13 Frauen, 13 Männer) (**Abb. 4**). Jedem Tumorpatienten wurde ein Kontrollpatient mit demselben Geschlecht zugeordnet.

Entsprechend der verschiedenen Häufigkeitsgipfel der Tumorentitäten findet sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten eine unterschiedliche Altersverteilung. So schwankt das Alter bei den Glioblastompatienten zwischen 37 und 86 Jahren und beträgt im Mittel 66 Jahre  $\pm$  10 Jahre. Bei den Patienten mit einem niedriggradigen Gliom schwankt es zwischen 16 und 66 Jahren und beträgt im Mittel 32 Jahre  $\pm$  16 Jahre. Die Patienten mit einem Meningeom WHO I° oder II° waren zur Untersuchung zwischen 20 und 78 Jahre alt (Mittelwert: 57 Jahre  $\pm$  14 Jahre) und die mit einem Meningeom WHO I° ebenfalls zwischen 20 und 78 Jahre (Mittelwert: 57 Jahre  $\pm$  14 Jahre). Das mittlere Alter bei den Patienten mit einer intrazerebralen Karzinommetastase betrug 63 Jahre  $\pm$  11 Jahre und schwankte zwischen 22 und 79 Jahren. Die miteinander verglichenen Patientengruppen unterschieden sich nicht signifikant in Alter und Karnofsky-Index (**Abb. 4**).

Zusätzlich zur präoperativen erfolgte eine postoperative Bestimmung der Gerinnungsfaktoren sowie der D-Dimere von insgesamt 33 Patienten. Darunter befanden sich 12 Glioblastompatienten (sieben Frauen, fünf Männer). Von den vier Patienten mit einem niedriggradigen Gliom waren zwei weiblich und zwei männlich. Untersucht wurden desweiteren 12 Patienten (acht Frauen, vier Männer) mit einem Meningeom WHO I° oder II° sowie neun Patienten (sieben Frauen, zwei Männer) mit einem Meningeom WHO I°. Fünf Patienten (zwei Frauen, drei Männer) litten an einer Karzinommetastase (**Abb. 5**). Der Anteil der weiblichen und männlichen Patienten der Kontrollgruppe entspricht dem der jeweiligen Tumorgruppe. Die Patientengruppen unterscheiden sich wiederum hinsichtlich Geschlecht, Alter und Karnofsky-Index nicht signifikant voneinander (**Abb. 5**).

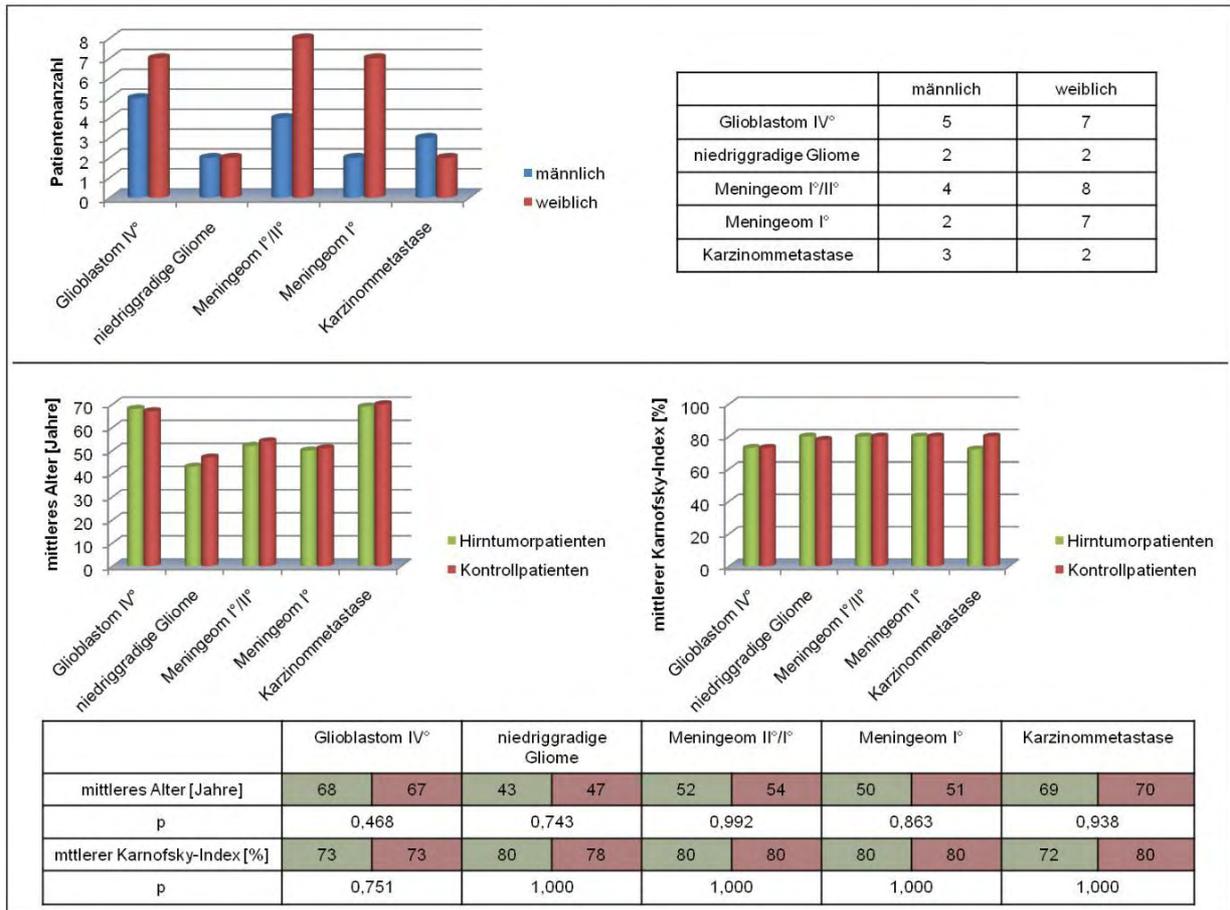


**Abb. 4** Geschlechterverteilung sowie mittlere Alter und Karnofsky-Indices der präoperativ untersuchten Tumorpatienten.

Die präoperativen sowie die am ersten und vierten postoperativen Tag bestimmten Werte von Antithrombin III und Fibrinogen lagen von jeweils 52 Tumor- und Kontrollpatienten vor. Unter den Tumorpatienten befanden sich 21 Glioblastompatienten und sechs Patienten mit einem niedriggradigen Gliom. Bei 16 Patienten wurde ein Meningeom WHO I° oder II° diagnostiziert, bei 14 Patienten ein Meningeom WHO I°. Neun Patienten litten an einer Karzinometastase. Die Patienten der Tumor- und ihren Kontrollgruppen entsprachen sich wiederum im Geschlecht. Die Alters- und Unterschiede im Karnofsky-Index zwischen den untersuchten Patientengruppen waren nicht signifikant.

Schließlich konnte die Frage nach postoperativen thrombembolischen Ereignissen bei insgesamt 68 Tumorpatienten und 71 Kontrollpatienten beantwortet werden. Unter den Tumorpatienten befanden sich 24 Glioblastompatienten und neun Patienten mit einem niedriggradigen Gliom. 24 Patienten hatten ein Meningeom WHO I° oder II° und 11 Patienten litten an einer Karzinometastase. Die hohe lost to

follow up - Rate ist vor allem durch Tod, fehlende Telefonnummern sowie zu diesem Aspekt nicht ausreichende Informationen aus den Patientenakten bedingt.



**Abb. 5** Geschlechterverteilung sowie mittlere Alter und Karnofsky-Indices der prä- und postoperativ untersuchten Tumorpatienten.

#### 4.4. Material und Geräte

Die folgenden Materialien und Geräte dienen der Bestimmung der Gerinnungsfaktoren sowie der D-Dimere (**Tab. 1**).

Materialienname	Firma	Herstellungsort
<b>Reagenzien</b>		
Gerinnungsfaktor II-Mangelplasma (human) 3 x 1 ml	Dade Behring	Marburg, Deutschland
Gerinnungsfaktor V-Mangelplasma (human) 8 x 1 ml	Dade Behring	Marburg, Deutschland
Gerinnungsfaktor VII-Mangelplasma (human) 3 x 1 ml	Dade Behring	Marburg, Deutschland
Gerinnungsfaktor VIII-Mangelplasma (human) 3 x 1 ml	Dade Behring	Marburg, Deutschland

Gerinnungsfaktor IX-Mangelplasma (human) 3 x 1 ml	Dade Behring	Marburg, Deutschland
Gerinnungsfaktor X-Mangelplasma (human) 3 x 1 ml	Dade Behring	Marburg, Deutschland
Gerinnungsfaktor XI-Mangelplasma (human) 3 x 1 ml	Dade Behring	Marburg, Deutschland
Gerinnungsfaktor XII-Mangelplasma (human) 3 x 1 ml	Dade Behring	Marburg, Deutschland
Berichrom F XIII mit - NADH-Reagenz 3 x 5 ml - Aktivator-Reagenz 3 x 5 ml - Nachweis-Reagenz 3 x 5 ml	Dade Behring	Marburg, Deutschland
D-Dimer PLUS mit - D-Dimer PLUS Reagenz 6 x 4 ml - D-Dimer Akzelerator 6 x 5 ml - D-Dimer Plus Rekonstitutionsmedium 1 x 25 ml	Dade Behring	Marburg, Deutschland
<b>Zusätzliche Reagenzien</b>		
Dade <sup>®</sup> Innovin <sup>®</sup> 10 x 10 ml	Dade Behring	Marburg, Deutschland
Pathrombin**SL 20 Flaschen à 5 ml	Dade Behring	Marburg, Deutschland
Calciumchlorid-Lösung 10 x 15 ml	Dade Behring	Marburg, Deutschland
<b>Kalibrator</b>		
Standard-Human-Plasma 30 Flaschen à 1 ml	Dade Behring	Marburg, Deutschland
D-Dimer PLUS Standard-Plasma 6 x 1 ml Standard-Plasma, 6 Leerflaschen für Standard niedrig	Dade Behring	Marburg, Deutschland
<b>Qualitätskontrollmaterial</b>		
Kontroll-Plasma N, Kontroll-Plasma P je 10 x 1 ml	Dade Behring	Marburg, Deutschland
D-Dimer Kontroll-Plasma mit: - D-Dimer Kontroll-Plasma I 6 x 1 ml - D-Dimer Kontroll-Plasma II 6 x 1 ml	Dade Behring	Marburg, Deutschland
D-Dimer Kontroll-Plasma I 1:4 verdünnt	eigene Herstellung aus D-Dimer Kontroll-Plasma I	Jena, Deutschland
<b>Gebrauchslösung für das Kontrollmaterial</b>		
Aqua dest		
Natriumchlorid	Sigma Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
<b>Geräte</b>		
Behring Coagulation Timer BCT <sup>®</sup>	Dade Behring	Marburg, Deutschland
Behring Coagulation Analyzer BCS <sup>®</sup>	Dade Behring	Marburg, Deutschland

**Tab. 1** Materialien der Bestimmung der Gerinnungsfaktoren und der D-Dimere.

Die **Tabelle 2** enthält alle Materialien und Geräte für die Expressionsstudien und die funktionellen Tests an humanen Glioblastomzellen.

Materialienname	Firma	Herstellungsort
<b>Reagenzien</b>		
Gliomzelllinie U373MG	PD Dr. med. Goldbrunner, Klinik für Neurochirurgie der Ludwig-Maximilians-Universität	München, Deutschland
DMEM	Biochrom AG Seromed <sup>®</sup>	Berlin, Deutschland
FCS, je 10 %	Biochrom AG Seromed <sup>®</sup>	Berlin, Deutschland
L-Glutamin, je 2 mM	Biochrom AG Seromed <sup>®</sup>	Berlin, Deutschland
Penicillin, je 100 U/ml	Biochrom AG Seromed <sup>®</sup>	Berlin, Deutschland

Streptomycin, je 11 µg/ml	Biochrom AG Seromed®	Berlin, Deutschland
RNA	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot, Deutschland
rekombinante Taq DNA Polymerase	Invitrogen™ Life Technologies	Karlsruhe, Deutschland
AVM	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot, Deutschland
TRIZOL® Reagenz	Invitrogen™ Life Technologies	Karlsruhe, Deutschland
Rnase-Inhibitor	Roche Molecular Biochemicals	Mannheim, Deutschland
Reaktionspuffer jeweils aus 50 µg/ml oligo(dt) <sub>12-18</sub> und 50 U AVM	Sigma Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
Argarosegel, je 1 %	Sigma Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
Primer	Sigma Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
PBS, je 0,1 M	Sigma Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
Paraformaldehyd, je 4 %	Sigma Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
PAR-1-Agonist (H-2938)	Bachem Biochemica GmbH	Heidelberg, Deutschland
PAR-1-Antagonist (H-1674)	Bachem Biochemica GmbH	Heidelberg, Deutschland
PAR-2-Agonist (H-4624)	Bachem Biochemica GmbH	Heidelberg, Deutschland
PAR-3-Agonist (H-4452)	Bachem Biochemica GmbH	Heidelberg, Deutschland
PAR-4-Agonist (H-4348)	Bachem Biochemica GmbH	Heidelberg, Deutschland
polyklonaler PAR-1-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg, Deutschland
polyklonaler PAR-2-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg, Deutschland
polyklonaler PAR-3-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg, Deutschland
polyklonaler PAR-4-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg, Deutschland
Sekundär-Antikörper von der Maus	Molekularproben	Eugene, Oregon, USA
Komponenten des Griess Reagenz	Sigma Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
Thrombin	Sigma Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
BrdU	Roche Molecular Biochemicals	Mannheim, Deutschland
Ethanol	Sigma Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
Nukleasen	Roche Molecular Biochemicals	Mannheim, Deutschland
monoklonale Primär-Antikörper	Roche Molecular Biochemicals	Mannheim, Deutschland
lösliches Chromogen	Roche Molecular Biochemicals	Mannheim, Deutschland
<b>Geräte</b>		
Petrischalen, 6 cm	Costar	Bodenheim, Deutschland
Deckgläschen	Costar	Bodenheim, Deutschland
96-Well Platten	Costar	Bodenheim, Deutschland
24-Well Platten	Costar	Bodenheim, Deutschland
Thermo Cycler	Perkin Elmer	Turku, Finnland
Mikroplatten-Reader 1420 VICTOR Light Luminescence Counter	Perkin Elmer	Turku, Finnland
BrdU Labeling und Detection Kit III	Roche Molecular Biochemicals	Mannheim, Deutschland

**Tab. 2** Materialien und Geräte für die Expressionsstudien und die funktionellen Tests an humanen Glioblastomzellen.

## 4.5. Methodik

### 4.5.1. Bestimmung der Gerinnungsfaktor-Aktivität

Die Bestimmung der Gerinnungsfaktoren erfolgte mithilfe der photometrischen Methode.

#### 4.5.1.1. Prinzip der photometrischen Methode

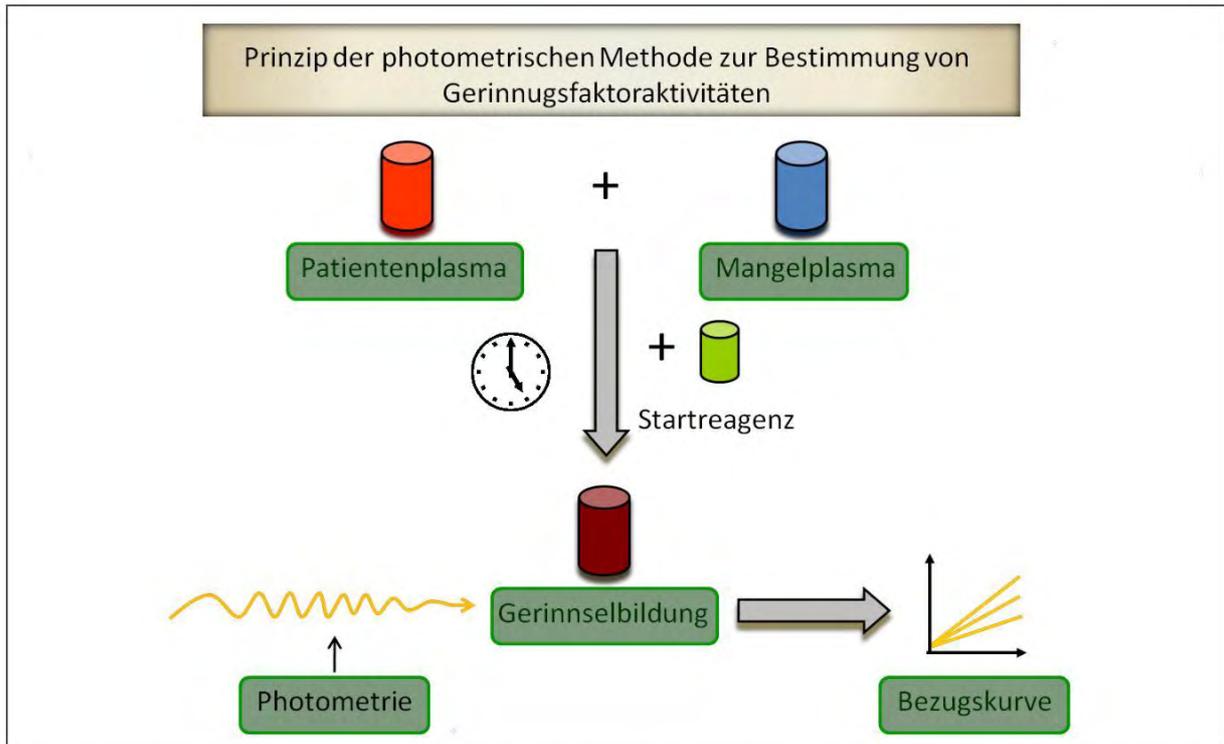
Die photometrische Methode bedient sich des Faktes, dass jede Erhöhung von Gerinnungsfaktoren im Blut zu einer verkürzten Gerinnungszeit führt. Im speziellen ist das bei der Faktor II-, V-, VII- und X-Bestimmung die Thromboplastinzeit (TPZ)

und bei der Bestimmung der Faktoren VIII, IX, XI und XII die partielle Thromboplastinzeit (PTT). Die photometrische Bestimmung des Faktors XIII erfolgt anhand der enzymatischen Messung von  $\text{NH}_3$  mit Hilfe der Glutamat-Dehydrogenase-Reaktion.

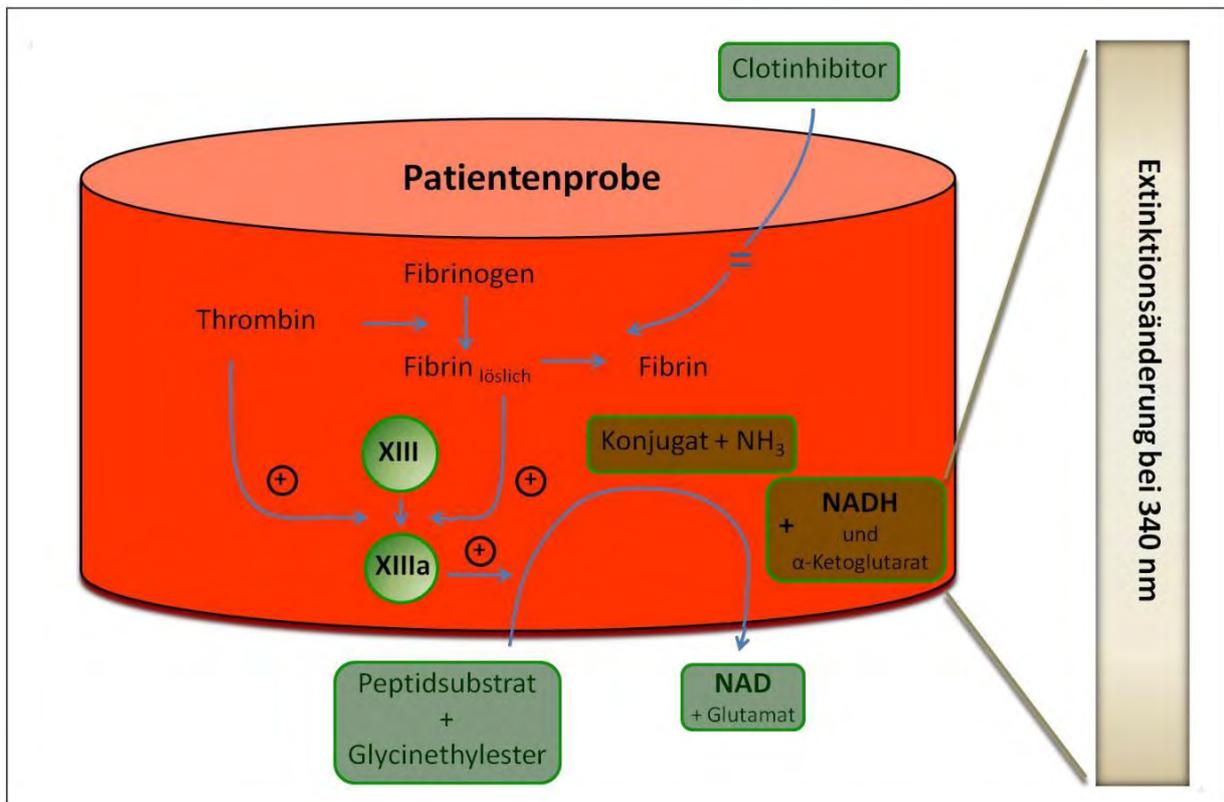
Um die Plasmakonzentration eines einzelnen Faktors zu ermitteln, wird die Gerinnungszeit (TPZ beziehungsweise PTT) einer Mischung aus dem Patientenplasma mit einem entsprechenden Mangelplasma gemessen. Ein Mangelplasma ist in diesem Fall ein lyophilisiertes Standardhumanplasma, in dem alle Gerinnungsfaktoren in erhöhter Konzentration vorliegen außer der zu Bestimmende. Folglich ist die Gerinnungszeit lediglich von diesem Gerinnungsfaktor abhängig und gibt damit Aufschluss über seine Konzentration im Patientenplasma.

Als Nachweisreaktion dient die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin nach Zugabe eines Startreagenz (Dade<sup>®</sup> Innovin<sup>®</sup> bei Faktor II, V, VII, X beziehungsweise Calciumchlorid-Lösung bei Faktor VIII, IX, XI, XII). Der Behring Coagulation Timer (BCT<sup>®</sup>) misst daraufhin eine Reduktion der optischen Dichte, die durch die entsprechende Nachweisreaktion verursacht wird. Das führt zu einer Reduktion der Lichtdurchlässigkeit, welche photometrisch gemessen wird. Über eine durch Verdünnungen von Standard-Human-Plasma erstellte Bezugskurve wird schließlich die Aktivität des Gerinnungsfaktors in Prozent der Norm ermittelt (**Abb. 6**) (Dade Behring 1999).

Die Bestimmung der Aktivität des Gerinnungsfaktors XIII beruht ebenfalls auf der photometrischen Methode, allerdings mit einem anderen Prinzip. Dafür wird zunächst der in der Probe enthaltene Faktor XIII durch Thrombin zu Faktor XIIIa aktiviert. Das ebenfalls durch Thrombin gebildete Fibrin beschleunigt diese Reaktion. Es wird vor der Messung jedoch nicht entfernt, da das mit einem Verlust an Faktor XIII verbunden wäre. Stattdessen wird das durch die Thrombineinwirkung gebildete Fibrin durch ein aggregationshemmendes Peptid (Clotinhibitor) in Lösung gehalten und somit an der Ausbildung eines Gerinnsels gehindert. Der Faktor XIIIa verknüpft ein spezifisches Peptidsubstrat mit Glycinehylester unter Freisetzung von Ammoniak. Dieser wird in einer parallel ablaufenden enzymatischen Reaktion bestimmt. Gemessen wird die Abnahme an NADH über die Extinktionsänderung bei 340 nm (**Abb. 7**) (Dade Behring 1999, Thomas 2005).



**Abb. 6** Prinzip der Aktivitätsbestimmung der Gerinnungsfaktoren II, V, VII, VIII, IX, X, XI und XII.



**Abb. 7** Prinzip der Methode für die Aktivitätsbestimmung des Gerinnungsfaktors XIII.

#### 4.5.1.2. Durchführung der Bestimmung der Gerinnungsfaktor-Aktivität

##### Probe:

Die die Probe enthaltende 3 ml-Zitratmonovette wurde 10 min bei 1500 x g zentrifugiert. Das Probenvolumen betrug 10 µl bei den Faktoren VIII, IX, XI und XII, 20 µl bei den Faktoren II, V, VII und X beziehungsweise 30 µl bei dem Faktor XIII.

##### Reagenzien (Gerinnungsfaktoren II, V, VII und X):

Für den Ansatz wurden 150 µl Dade<sup>®</sup> Innovin<sup>®</sup> in 10 ml destilliertem Wasser ohne Schaumbildung gelöst, vorsichtig geschwenkt und 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Inhalt eines Fläschchens (30 µl) mit Faktor II-, V-, VII- oder X-Mangelplasma wurde mit 1 ml destilliertem Wasser ohne Schaumbildung gelöst und nach leichtem Schwenken 15 min bei Raumtemperatur beiseite gestellt, danach nochmals vorsichtig geschwenkt.

##### Reagenzien (Gerinnungsfaktoren VIII, IX, XI und XII):

Es wurden 50 µl des jeweiligen Faktor-Mangelplasmas in 1 ml destilliertem Wasser ohne Schaumbildung gelöst und nach vorsichtigem Schwenken für 15 min bei Raumtemperatur beiseite gestellt, danach nochmals leicht geschüttelt. Nach Zugabe von 75 µl Pathrombin SL und 75 µl Calciumchlorid-Lösung wurde dieser Ansatz für 115 - 125 s inkubiert.

##### Reagenzien (Gerinnungsfaktor XIII):

Hier wurde für den Ansatz das NADH-Reagenz in 5 ml destilliertem Wasser gelöst und 10 min stehen gelassen. Dann wurde es in das Aktivatorreagenz (75 µl) überführt und 15 min inkubiert. Daraufhin wurde das Reagenz gut gemischt und in 5 ml Sekundärflaschen mit Barcode gefüllt. Aus dem Nachweisreagenz wurden ebenfalls 75 µl in 5 ml destilliertem Wasser gelöst und 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es wurde in 5 Portionen à 1 ml in Eppendorfcups eingefroren. Nach dem Auftauen wurde es gut gemischt und in eine 5 ml Sekundärflasche mit Barcode umgefüllt. Der Ansatz wurde 290 - 310 s inkubiert.

Kalibration:

Es wurde 1 ml destilliertes Wasser auf das Lyophilisat des Standard-Human-Plasmas pipettiert und 10 min bei 15 - 25 °C stehen gelassen. Anschließend wurden das Standard-Human-Plasma sowie das entsprechende, gelöste Mangelplasma in Reagenzienracks in den BCT<sup>®</sup> geladen. Die Befehle „Kalibration“ und „Neu“ wurden nacheinander angewählt und der zu bestimmende Gerinnungsfaktor gewählt. Danach erfolgte die Auswahl der jeweiligen Chargen für Standard-Human-Plasma, Innovin (bei den Gerinnungsfaktoren II, V, VII, X) beziehungsweise Pathrombin SL (bei den Gerinnungsfaktoren VIII, IX, XI, XII) und Mangelplasma sowie der Befehl „Kurve messen“. Durch Nutzung des BCT<sup>®</sup> verliefen alle weiteren Schritte vollautomatisch. Nach Fertigstellung der Kalibrationskurve wurde diese beurteilt und mittels einer Messung der Kontrollplasmen N (Normalbereich) und P (pathologischer Bereich) überprüft.

Kontrollen:

Für den Ansatz der Kontrollplasmen wurde 1 ml destilliertes Wasser auf das Lyophilisat pipettiert. Am Gerät wurden die Anforderungen für die jeweilige Proben-ID schließlich abgefragt und als rotes Kreuz ins Laborjournal übertragen. Der Analyser begann daraufhin selbständig seine Arbeit.

Auswertung (Gerinnungsfaktoren II, V, VII, VIII, IX, X, XI und XII):

Die Konzentration des Gerinnungsfaktors wurde anhand der Bezugskurve in % der Norm abgelesen. Betrag der angegebene Sollwert im Standard-Human-Plasma nicht 100 % der Norm, sondern beispielsweise nur 95 %, so wurde das abgelesene Ergebnis mit 0,95 multipliziert. Bei Gerinnungszeiten, die einem Faktorengehalt von mehr als 150 % der Norm entsprachen, waren weitere Bestimmungen mit höheren Probenverdünnungen erforderlich.

Auswertung (Gerinnungsfaktor XIII):

Die Geschwindigkeit der Extinktionsänderung nach Erreichen der linearen Phase ist proportional zur Faktor XIII-Aktivität und somit auch zu dessen Konzentration. Ausgewertet wurde über die Bezugskurve. Zur Faktorenermittlung wurde Standard-Human-Plasma als Probe in Doppelbestimmung eingesetzt. Für die Erstellung der

Bezugskurve wurde Standard-Human-Plasma in verschiedenen Verdünnungsstufen in Doppelbestimmung eingesetzt.

Referenzbereiche:

Faktor II:	70 - 120 %	Faktor VIII:	70 - 150 %	Faktor XI:	70 - 120 %
Faktor V:	70 - 140 %	Faktor IX:	70 - 120 %	Faktor XII:	70 - 150 %
Faktor VII:	70 - 130 %	Faktor X:	70 - 140 %	Faktor XIII:	70 - 140 %

## 4.5.2. Bestimmung der D-Dimere

### 4.5.2.1. Prinzip der Methode

Polysterolpartikel, kovalent an einen Antikörper (DD5) gegen die Quervernetzungsregion quervernetzter Fibrinsspaltprodukte (D-Dimer) gebunden, agglutinieren, wenn sie mit D-Dimer-enthaltenden Proben gemischt werden.

Die Quervernetzung ist spiegelsymmetrisch aufgebaut, so dass das Epitop für den monoklonalen Antikörper doppelt vorhanden ist. Daher genügt ein Antikörper, um Agglutinationsreaktionen auszulösen, die über eine Trübungszunahme turbidimetrisch detektiert werden kann.

### 4.5.2.2. Durchführung der turbidimetrischen D-Dimer-Bestimmung

Probe:

Innerhalb von 30 min nach Eingang wurde die Probe zentrifugiert und während der nächsten 90 min bearbeitet. Das Probenvolumen betrug 50 µl.

Reagenzien:

Zunächst erfolgte die Lösung von 85 µl des D-Dimer PLUS Reagenz bei D-Dimer low beziehungsweise 100 µl bei high/ultrahigh in 4 ml Rekonstitutionsmedium. Nach 5-minütigem Stehenlassen unter gelegentlichem Schwenken wurde von dem D-Dimer-Akzelerator 10 µl in 5 ml Wasser gelöst und für 15 min ebenfalls stehen gelassen. Das D-Dimer PLUS Rekonstitutionsmedium war bereits gebrauchsfertig.

Kalibration:

Auf das Lyophilisat des D-Dimer PLUS Plasmas wurde 1 ml destilliertes Wasser pipettiert, es anschließend 20 min bei 15 - 25 °C stehen gelassen. Auch auf das D-Dimer PLUS Standard wurde zuerst 1 ml destilliertes Wasser pipettiert und dieses 20 min bei 15 - 25 °C stehen gelassen. Anschließend wurde ein Aliquot D-Dimer PLUS Standard Plasma mit physiologischer Kochsalzlösung in der Leerflasche verdünnt. Vor Gebrauch wurde das Reagenz leicht geschüttelt. Bei D-Dimer high wurde das Reagenz- sowie das Kalibrationsmaterial „D-Dimer PLUS Standard Plasma“ nach Vorschrift gelöst und mit den zusätzlichen Reagenzien D-Dimer-Akzelerator und D-Dimer PLUS Reagenz kalibriert. Bei D-Dimer low wurde ein Aliquot D-Dimer PLUS Standard Plasma mit physiologischer Kochsalzlösung in der Leerflasche verdünnt. Nach Ermittlung der Kalibrationskurve erfolgte deren Beurteilung. Überprüft wurde sie durch Messung der D-Dimer Kontrollplasmen I und II sowie des D-Dimer Kontrollplasmas I verdünnt 1:4 mit Natriumchlorid.

Kontrollen:

Für den Ansatz wurde 1 ml destilliertes Wasser auf das Lyophilisat des D-Dimer Kontrollplasmas I pipettiert. Selbiges Verfahren wurde auch für das D-Dimer Kontrollplasma II angewandt. Für die Herstellung des verdünnten D-Dimer-Kontrollplasmas wurden 200 µl D-Dimer Kontrollplasma I mit 600 µl NaCl verdünnt. Letztlich begann der Analyzer selbständig seine Arbeit.

Referenzbereich:

D-Dimere:	< 190 µg/l
-----------	------------

**4.5.3. Bestimmung von Antithrombin III und Fibrinogen**

Die Aktivitätsmessung für Antithrombin III erfolgte indirekt mittels des amidolytischen chromogenen Verfahrens im Institut für Klinische Chemie der Uniklinik Jena. Die Bestimmung der Konzentrationen von Fibrinogen wurde anhand der Methode nach Clauss ebenfalls im Institut für Klinische Chemie der Uniklinik Jena durchgeführt.

Referenzbereiche:

Antithrombin III:	86 - 122 %
Fibrinogen:	1,8 - 3,5 g/l

#### 4.5.4. Gliom-Zellkulturen

Die Gliom-Zellkulturen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) gezüchtet und mit 10 % fetalem Kalbserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin ergänzt. Ein Wechsel des Mediums fand jeden zweiten Tag statt. Sobald die Zellen konfluent wurden, wurden Zellpassagen durchgeführt. Für die NO-Experimente und die Proliferationstests wurden die Zellen in 96-Well-Platten mit einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml (entspricht einer Dichte von  $1 \times 10^4$  Zellen pro Well) gegeben. Für die Färbungen wurden die Zellen mit einer Dichte von  $4 \times 10^4$  Zellen/ml auf Glas-Deckgläschen gegeben und zur Präparation der RNA bei einer Dichte von  $4 \times 10^4$  Zellen/ml in 6 cm-Petrischalen gesetzt.

#### 4.5.5. Aufbereitung der zellulären RNA und reverse Transkription

Die Gesamt-RNA wurde aus den U373MG Glioblastomzellen mittels TRIZOL<sup>®</sup> Reagenz präpariert. Die Benutzerhinweise des Herstellers wurden angewendet. Für die Synthese von copyDNA (cDNA) wurde 1 µg der Gesamt-RNA denaturiert und in einem Reaktionspuffer bei 55 °C im Thermo Cycler revers transkribiert, der 50 µg/ml oligo(dT)<sub>12-18</sub> und 50 U AVM reverse Transkriptase (reverse Transkriptase vom Avian Myeloblastosis Virus stammend) enthielt.

#### 4.5.6. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation der cDNA mittels PCR (94 °C für 1 min, 55 °C für 1 min, und 72 °C für 1 min, über 30 Zyklen) wurde im Thermo Cycler durchgeführt. Die durch PCR amplifizierten Proben wurden auf ein 1 %iges Argarose Gel aufgetragen, durch Anlage einer Spannung aufgeschlüsselt und mittels Ethidiumbromid visualisiert. Die genutzten Primer wurden bereits früher beschrieben (Miike *et al.* 2001). Sie sind in der **Tabelle 3** dargestellt. Die Experimente wurden dreifach wiederholt.

<b>PAR 1 sense</b>	CAG	TTT	GGG	TCT	GAA	TTG	TGT	CG
<b>PAR 1 antisense</b>	TGC	ACG	AGC	TTA	TGC	TGC	TGA	C
<b>PAR 2 sense</b>	TGG	ATG	AGT	TTT	CTG	CAT	CTG	TCC
<b>PAR 2 antisense</b>	CGT	GAT	GTT	CAG	GGC	AGG	AAT	G
<b>PAR 3 sense</b>	TCC	CCT	TTT	CTG	CCT	TGG	AAG	
<b>PAR 3 antisense</b>	AAA	CTG	TTG	CCC	ACA	CCA	GTC	CAC
<b>PAR 4 sense</b>	AAC	CTC	TAT	GGT	GCC	TAC	GTG	C
<b>PAR 4 antisense</b>	CCA	AGC	CCA	GCT	AAT	TTT	TG	
<b>G3PDH sense</b>	GTC	AAC	GGA	TTT	GGT	CGT	ATT	
<b>G3PDH antisense</b>	AGT	CTT	CTG	GGT	GGC	AGT	GAT	

**Tab. 3** Verwendete Primer für die PCR (Miike *et al.* 2001).

#### 4.5.7. Immunozytochemische Analyse der PAR-Expression in vitro auf lebenden humanen Glioblastomzellen

Die auf den Deckgläschen kultivierten Glioblastomzellen der Linie U373MG wurden in 0,1 M Phosphat-gepufferter Salzlösung für 30 min bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchte im Zellkulturschrank mit dem polyklonalen Primärantikörper vom Kaninchen in einer Verdünnung von 1:500 für die Protease-aktivierten Rezeptoren der Typen 1 bis 4 im lebenden Zustand inkubiert. Nach Waschen der Zellen wurde der Cy3-gekoppelte Sekundärantikörper aus der Maus in einer Verdünnung von 1:1000 hinzu gegeben und unter den gleichen Bedingungen ebenfalls für 30 min mit den Zellen inkubiert. Nach nochmaligem Waschen der Zellen wurden diese nun mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Nach Eindecken der Zellen konnte nun die PAR-Immunoreaktion unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 594 nm monochromatischem Fluoreszenzlicht begutachtet werden. Die Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

#### 4.5.8. Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO)

Die Produktion und Freisetzung von Stickstoffmonoxid durch die Gliomzellen der Linie U373MG wurde in 24-Well Platten mit 2 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml bestimmt. Die NO-Produktion wurde als Akkumulation von Nitrit im Überstand mittels Griess Reagenz (Aggarwal und Mehta 1996) bestimmt. Die Zellen wurden mit Thrombin in steigenden Konzentrationen von 0,1; 1,0 und 10.0 U/ml für 24 Stunden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchte im Zellkulturschrank inkubiert. 100 µl des Überstands der Zellen wurden mit 100 µl des Griess Reagenz versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur

inkubiert. Die Absorption von Licht wurde im Mikroplatten-Reader bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen und die Mittelwerte von zwei voneinander unabhängigen Experimenten statistisch ausgewertet.

#### **4.5.9. Zellproliferationsassay mittels Inkorporation und Detektion von 5'-Bromodeoxyuridin (BrdU)**

Um die zelluläre Proliferation nach Stimulation mit Thrombin zu messen, wurde die Markierung der DNS mit 5-Bromo-2'-deoxy-Uridin (BrdU) und ihrer Detektion mittels des BrdU Labeling und Detection Kit III entsprechend der Benutzungshinweise ausgeführt. Die U373MG Zellen wurden mit 0,1 und 10 U/ml Thrombin beziehungsweise mit den PAR-Agonistenpeptiden und den PAR-Antagonistenpeptiden in einer Dosierung von jeweils 500 µM in DMEM ohne FCS-Zusatz für 24 Stunden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchte im Zellkulturschrank stimuliert. Zellen mit DMEM mit 10 % FCS dienten als Positivkontrolle. Zellen mit DMEM ohne Zusätze und ohne Thrombin oder PAR-Peptide dienten als Negativkontrolle. BrdU in einer Konzentration von 10 µM wurde zu den Zellen in 96-Well Platten für zwei Stunden gegeben, bevor die Inkubation gestoppt wurde. So konnte BrdU in die DNS eingebaut werden. Anschließend wurden die Zellen mit -20 °C kaltem Ethanol bei -20 °C im Tiefkühlschrank für 30 min fixiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit Nukleasen bei 37 °C inkubiert, um einen teilweisen Verdau der DNS zu erreichen. Dadurch wurde das BrdU für entsprechende monoklonale Antikörper erreichbar und die Antikörper konnten an das anstelle von Thymidin in die DNS eingebaute BrdU binden. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde das daran gebundene Konjugat mittels eines löslichen Chromogens visualisiert. Die Menge der synthetisierten DNS wurde durch die Messung der Extinktion von monochromatischem Licht bei einer Messwellenlänge von 490 nm in einem Mikroplatten-Reader quantifiziert. Alle Experimente wurden jeweils dreimal und voneinander unabhängig durchgeführt.

#### 4.6. Dokumentation und statistische Methoden

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mittels der Programme SPSS<sup>®</sup> (Version 14.0) und Microsoft<sup>®</sup> Excel<sup>®</sup> für Windows.

Für die statistischen Tests zum Vergleich der Patientengruppen wurde der exakte, zweiseitige Mann-Whitney-Test mit einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  verwendet.

Die Werte der absoluten Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren sowie von Antithrombin III, Fibrinogen und den D-Dimeren sind metrisch, unzensiert, jedoch nicht normal verteilt und wurden aus zwei voneinander unabhängigen Grundgesamtheiten ermittelt. Daher erfolgte die statistische Auswertung dieser Daten ebenfalls mittels des exakten, zweiseitigen Mann-Whitney-Tests, wobei p-Werte  $\leq 0,05$  als signifikant gelten.

Für den statistischen Vergleich der Patientenhäufigkeiten (zum Beispiel bezüglich pathologisch erhöhter Gerinnungsfaktor-Aktivitäten, multipler Erhöhungen beziehungsweise thrombembolischen Ereignissen im postoperativen Zeitraum) wurde der Chi<sup>2</sup>-Test, im speziellen der exakte, zweiseitige Test nach Fischer genutzt, da die ermittelten Werte zwar ebenfalls aus zwei voneinander unabhängigen Grundgesamtheiten stammen, jedoch weder metrisch noch ordinal mit vielen möglichen Werten sind. Das Signifikanzniveau wurde wiederum auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt.

Schließlich wurde für den statistischen Vergleich der mittleren Fibrinogen-Konzentrationen innerhalb einer Patientengruppe sowie für die statistische Auswertung der Sekretionsstudie und der funktionellen Tests der exakte, zweiseitige Wilcoxon-Test verwendet, da die Auswertung aus einer gepaarten Grundgesamtheit mit metrischen, symmetrischen, jedoch nicht normalverteilten Daten erfolgte. Als statistisch signifikant gelten bei den mittleren Konzentrationen von Fibrinogen p-Werte  $\leq 0,05$ . Bei den zellulären Tests mit einer geringen Standardabweichung gelten p-Werte  $\leq 0,01$  als statistisch signifikant.

## 5. Ergebnisse

Nach einer Gegenüberstellung der absoluten Aktivitätswerte der Gerinnungsfaktoren von Hirntumor- sowie Kontrollpatienten folgen Vergleiche der pathologischen Einzelerhöhungen über die Normgrenze hinaus von Gerinnungsfaktoren sowie deren pathologische Mehrfacherhöhungen über die obere Normgrenze. In der Auswertung der Patienten mit einem Glioblastom wird anschließend auf bestimmte Kombinationen erhöhter Gerinnungsfaktoren eingegangen, die besondere Relevanz hinsichtlich eines erhöhten Thromboserisikos und der Tumorbiologie zeigen könnten. Zusätzlich zu den Veränderungen der Gerinnungsfaktoren wurden die Werte von Antithrombin III, Fibrinogen und D-Dimeren der Patientengruppen ausgewertet.

### 5.1. Vergleich der systemischen Gerinnungsparameter von Patienten mit einem Glioblastom WHO IV° und Kontrollpatienten

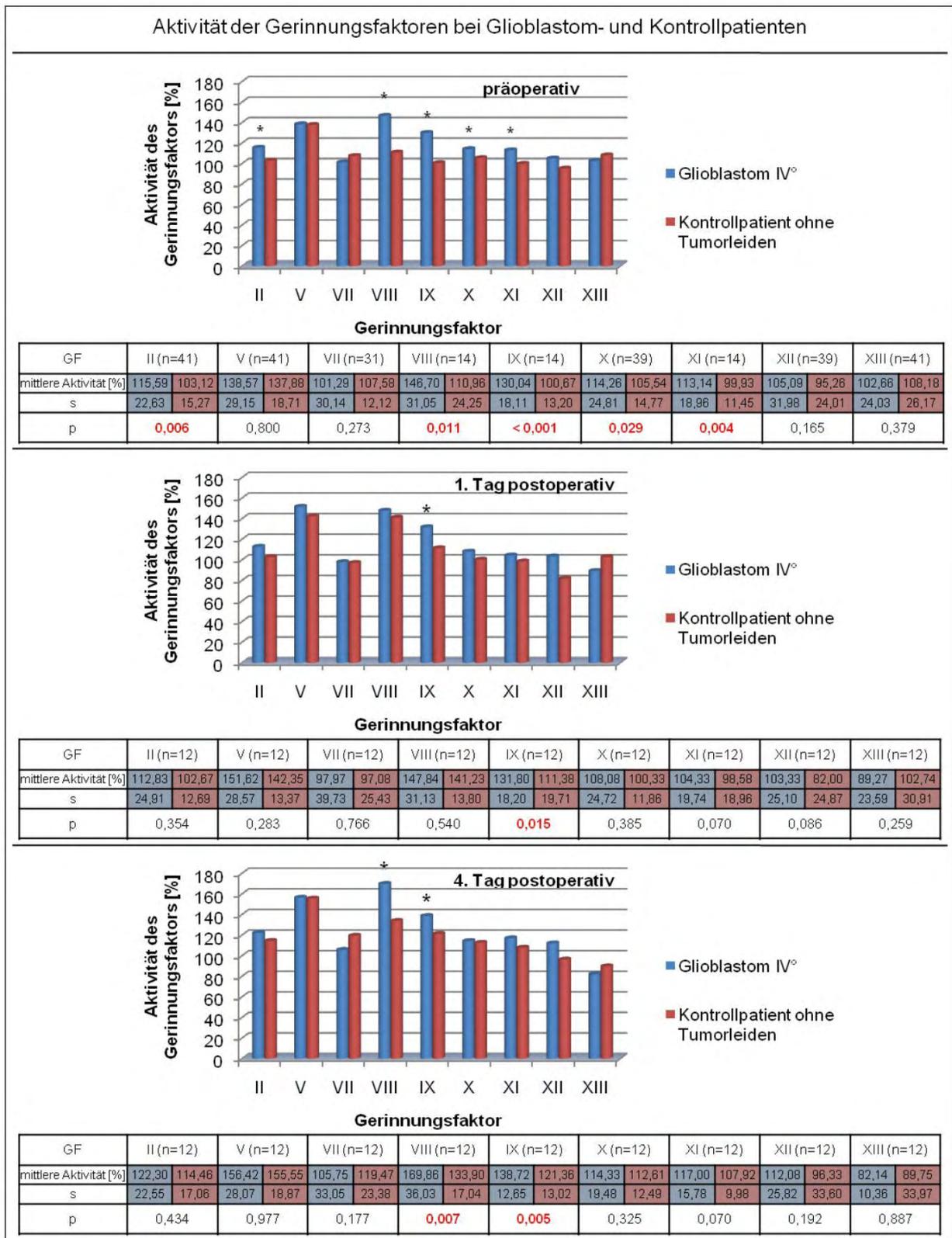
#### Vergleich der absoluten Aktivitätswerte der Gerinnungsfaktoren ohne Bewertung der Normgrenzen

Fast alle Gerinnungsfaktoren der Glioblastompatienten liegen verglichen mit der Kontrollgruppe in erhöhter Aktivität vor. Lediglich für den Faktor XIII sowie den Faktor VII am ersten und vierten postoperativen Tag wurden höhere Aktivitäten bei den Kontrollpatienten gemessen, welche jedoch nicht signifikant sind. Signifikante Unterschiede finden sich dagegen vor allem präoperativ sowie am vierten postoperativen Tag bei mehreren Gerinnungsfaktoren der Patientengruppe mit einem Glioblastom. So beträgt die mittlere Aktivität des präoperativ gemessenen Faktors II bei den Glioblastompatienten 115,59 % versus 103,12 % in der Kontrollgruppe ( $p=0,006$ ). Der mittleren Aktivität des Faktors VIII von 146,70 % bei den Tumorpatienten steht eine Aktivität von 110,96 % bei den Kontrollpatienten gegenüber ( $p=0,011$ ). Die mittlere Aktivität des Faktors IX der Glioblastompatienten von 130,04 % liegt nicht nur oberhalb der laborinternen oberen Normgrenze, sondern unterscheidet sich außerdem hochsignifikant von der des Faktors IX von 100,67 % bei den Kontrollpatienten ( $p<0,001$ ). Auch die mittlere Aktivität des Faktors X ist mit 114,26 % signifikant erhöht gegenüber der von 105,54 % der Kontrollgruppe ( $p=0,029$ ). Schließlich wurde für den Faktor XI eine mittlere Aktivität von 113,14 %

gemessen, welche im Vergleich zu einem Wert von 99,93 % in der Kontrollgruppe signifikant erhöht vorliegt ( $p=0,004$ ). Nach dem operativen Eingriff scheinen sich die mittleren Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren beider Patientengruppen einander anzunähern. Zwar liegen die bei den Glioblastompatienten gemessenen Werte bis auf die des Faktors XIII tendenziell höher, ein signifikanter Unterschied ergibt sich hierbei jedoch nur für die mittlere Aktivität des Faktors IX, welche mit 131,80 % signifikant erhöht gegenüber der von 111,38 % der Kontrollgruppe ist ( $p=0,015$ ). Am vierten postoperativen Tag liegen die Gerinnungsfaktoren beider Gruppen insgesamt in höheren mittleren Aktivitäten vor als im Vergleich zu früheren Zeitpunkten. Sowohl die mittlere Aktivität des Faktors VIII von 169,86 % als auch die des Faktors IX von 138,72 % ist über der oberen Grenze des Referenzbereichs angesiedelt und signifikant erhöht verglichen mit den Werten der Kontrollgruppe von 133,90 % für den Faktor VIII ( $p=0,007$ ) sowie 121,36 % für den Faktor IX ( $p=0,005$ ). Auch die Aktivitäten der übrigen Gerinnungsfaktoren (wiederum ausgenommen die der Faktoren VII und XIII) sind im Mittel erhöht bei den Hirntumorpatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe (**Abb. 8**).

#### Über die obere Normgrenze hinaus pathologisch erhöhte Aktivitätswerte einzelner Gerinnungsfaktoren

Es sind vor allem die Faktoren des intrinsischen Weges der Gerinnungskaskade sowie der Endstrecke, die im venösen Blut von Glioblastompatienten eine pathologisch über die Normgrenze erhöhte Aktivität aufweisen. Das belegen die Diagramme der **Abbildung 9**, in denen prä- sowie teilweise auch postoperativ die Faktoren II, VIII, IX, X, XI und XII jeweils bei der gleichen oder einer größeren Anzahl an Glioblastompatienten pathologisch erhöhte Aktivitäten aufzeigen als in der Kontrollgruppe. Signifikante Unterschiede ergeben sich präoperativ für die Faktoren II, IX und X, die öfter bei Glioblastompatienten in einer Aktivität vorliegen, welche über der oberen Grenze des Normbereiches liegt, als bei Kontrollpatienten ( $p=0,007$  für Faktor II,  $p=0,004$  für Faktor IX,  $p=0,005$  für Faktor X). Am ersten postoperativen Tag kann bei zehn der 12 Glioblastom- sowie bei zwei der 12 Kontrollpatienten ein pathologisch aktivierter Faktor IX nachgewiesen werden, so dass sich ein signifikanter Unterschied von  $p=0,003$  ergibt. Vier Tage nach der Operation zeigen 11 der 12 Glioblastompatienten einen Faktor IX, der mit pathologisch erhöhter Aktivität vorliegt.



**Abb. 8** Darstellung der mittleren Aktivitätswerte der gemessenen Gerinnungsfaktoren bei Glioblastom- und Kontrollpatienten (oben: präoperativ, Mitte: erster postoperativer Tag, unten: vierter postoperativer Tag). Die signifikanten Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet. n=Patientenanzahl je Gruppe, s=Standardabweichung.  
**Beachte:** Bei Glioblastompatienten signifikant höhere Aktivitätswerte (rot) der GF II und VIII - XI präoperativ, des GF IX am ersten sowie der GF VIII und IX am vierten postoperativen Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe.

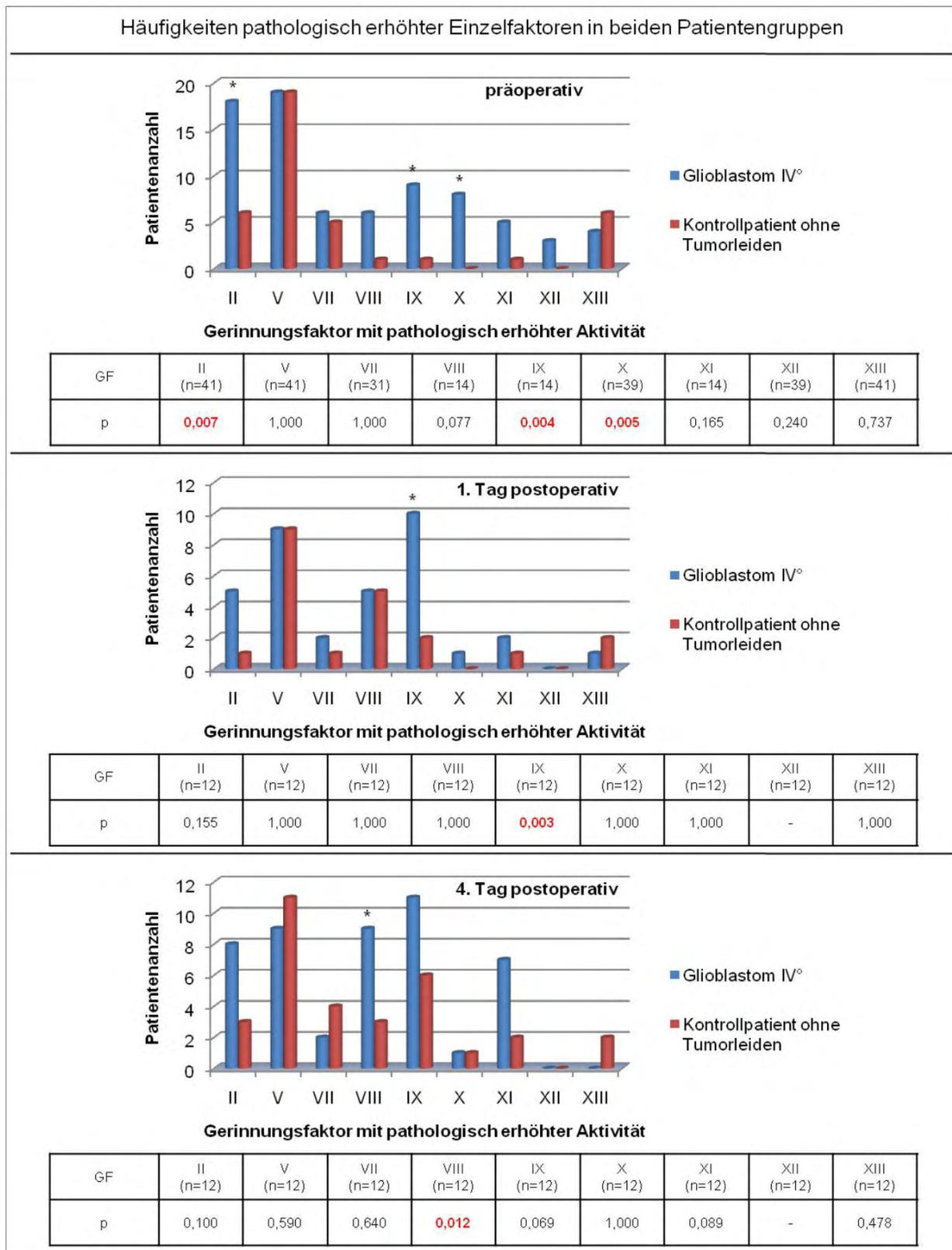
Allerdings ergibt sich aufgrund der ebenfalls größeren Anzahl von Kontrollpatienten mit demselben Merkmal kein signifikanter Unterschied. Dagegen liegt der Gerinnungsfaktor VIII bei neun und damit signifikant mehr Hirntumorpatienten in pathologisch erhöhter Aktivität vor verglichen mit drei Kontrollpatienten ( $p=0,012$ ) (**Abb. 9**).

#### Über die obere Normgrenze hinaus pathologische Erhöhungen der Aktivitätswerte von multiplen Gerinnungsfaktoren

Glioblastompatienten weisen im Vergleich zu Kontrollpatienten öfter mehrere pathologisch erhöhte Aktivitäten von Gerinnungsfaktoren auf als Kontrollpatienten. Diese signifikante Differenz ist präoperativ zu beobachten, wird am ersten postoperativen Tag verschleiert und bildet sich anschließend erneut aus. Da sich vor der Operation bei 20 der 41 Glioblastompatienten mehr als ein sowie bei 13 mehr als zwei Gerinnungsfaktoren mit pathologisch erhöhten Aktivitäten nachweisen lassen, ergeben sich im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Unterschiede von  $p=0,038$  beziehungsweise  $p=0,001$ . Auch die anderen Mehrfacherhöhungen von Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren finden sich bei Glioblastompatienten tendenziell öfter als bei Kontrollpatienten. Signifikante Unterschiede lassen sich hier aufgrund der geringen Patientenzahlen nicht feststellen. Am ersten postoperativen Tag unterscheiden sich die Patientenzahlen mit in pathologisch erhöhter Aktivität vorliegenden Gerinnungsfaktoren nicht mehr signifikant. Erst am vierten postoperativen Tag finden sich bei sieben der 12 Glioblastom- versus einem der 12 Kontrollpatienten mehr als drei Faktoren in pathologisch erhöhter Aktivität und stellen somit einen signifikanten Unterschied dar ( $p=0,027$ ). Der Anteil an Glioblastompatienten, der mehr als zwei pathologisch aktivierte Faktoren aufweist, ist mit 11 von 12 Glioblastompatienten beziehungsweise sechs von 12 Kontrollpatienten nicht signifikant, jedoch deutlich erhöht ( $p=0,069$ ) (**Abb. 10**).

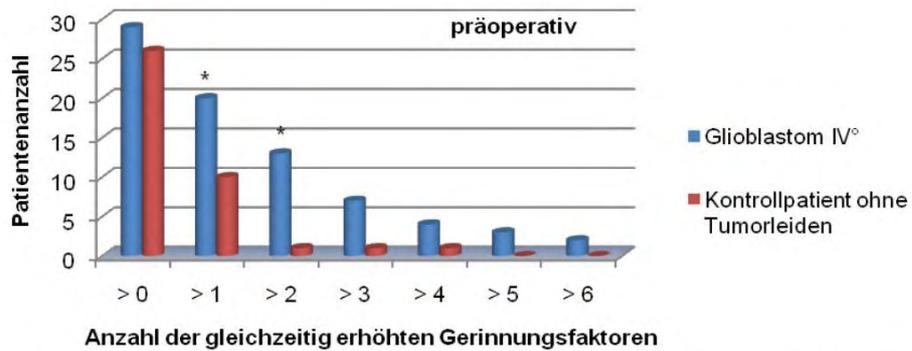
#### Kombinationen aus Gerinnungsfaktoren mit pathologisch erhöhter Aktivität

Präoperativ fallen in der Gruppe der Glioblastompatienten mehrere Kombinationen aus pathologisch über die obere Normgrenze erhöht aktivierten Gerinnungsfaktoren auf. Zum Beispiel ist bei sieben Tumorpatienten und keinem Kontrollpatienten eine Kombination pathologisch erhöhter Aktivitäten der Faktoren II & X festzustellen ( $p=0,012$ ). 12 Glioblastom- versus zwei Kontrollpatienten zeigen die Kombination pathologisch erhöhter Aktivitäten der Faktoren II & V ( $p=0,007$ ).

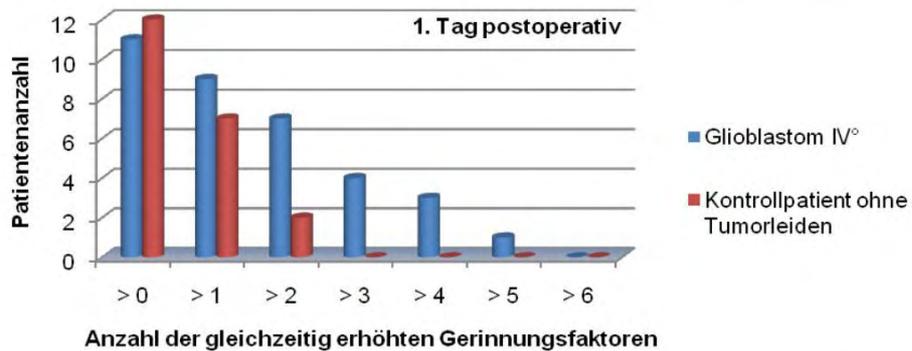


**Abb. 9** Darstellung der Faktoren, die im venösen Blut bei Glioblastom- beziehungsweise Kontrollpatienten einzeln pathologisch erhöhte Aktivitäten aufweisen (oben: präoperativ, Mitte: erster postoperativer Tag, unten: vierter postoperativer Tag). n=Patientenanzahl je Gruppe. Signifikante Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet.

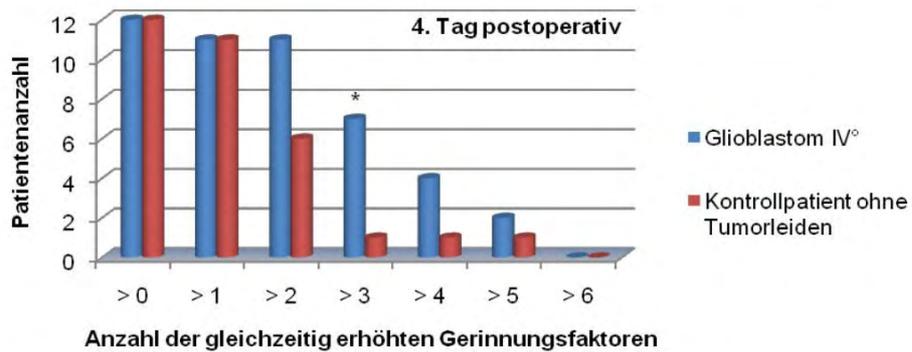
Multiple Erhöhungen der Gerinnungsfaktoren in beiden Patientengruppen



Anzahl pathologisch erhöhter GF	>0	>1	>2	>3	>4	>5	>6
p	0,639	0,038	0,001	0,057	0,359	0,241	0,494



Anzahl pathologisch erhöhter GF	>0	>1	>2	>3	>4	>5	>6
p	1,000	0,667	0,089	0,093	0,217	1,000	-



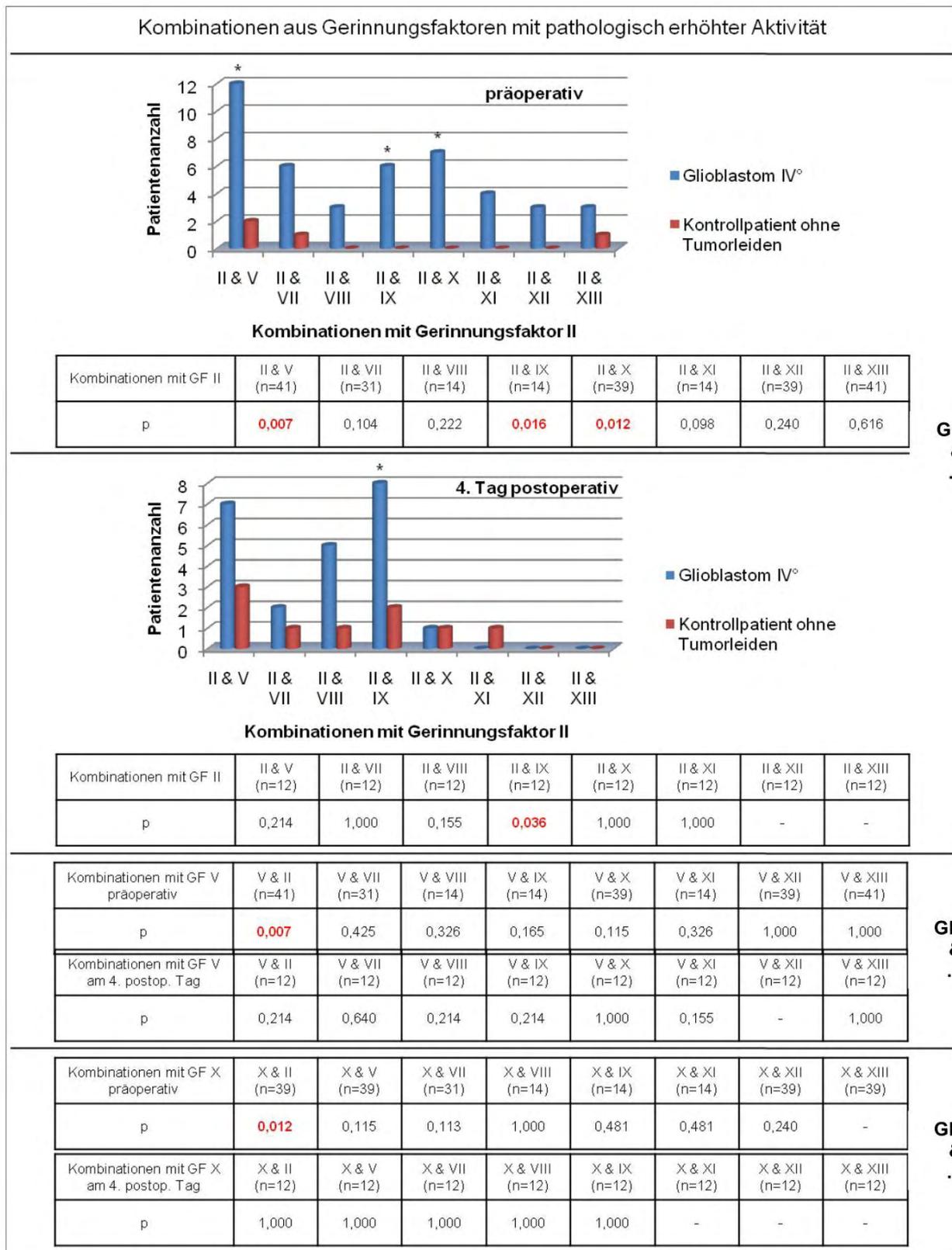
Anzahl pathologisch erhöhter GF	>0	>1	>2	>3	>4	>5	>6
p	1,000	1,000	0,069	0,027	0,317	1,000	-

**Abb. 10** Vergleich der Patientenanzahlen, welche mehrere Gerinnungsfaktoren gleichzeitig in pathologisch erhöhter Aktivität aufweisen (oben: präoperativ, n=41; Mitte: erster postoperativer Tag, n=12; unten: vierter postoperativer Tag, n=12). n=Patientenanzahl je Gruppe. Signifikante Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet.

Die Kombination pathologisch erhöhter Aktivitäten aus den Faktoren II & IX wird präoperativ bei sechs Hirntumorpatienten beobachtet und damit signifikant häufiger, verglichen mit der Kontrollgruppe ( $p=0,016$ ). Nachdem am ersten postoperativen Tag keine signifikanten Unterschiede nachweisbar sind, zeigen drei Tage später acht der 12 Tumorpatienten und zwei der Kontrollpatienten die Kombination aus den pathologisch aktivierten Faktoren II & IX, so dass sich ein signifikanter Unterschied von  $p=0,036$  ergibt. Die Kombination aus den anderen Gerinnungsfaktoren mit erhöhten Aktivitäten zeigt keine bedeutsamen Aspekte (**Abb. 11**).

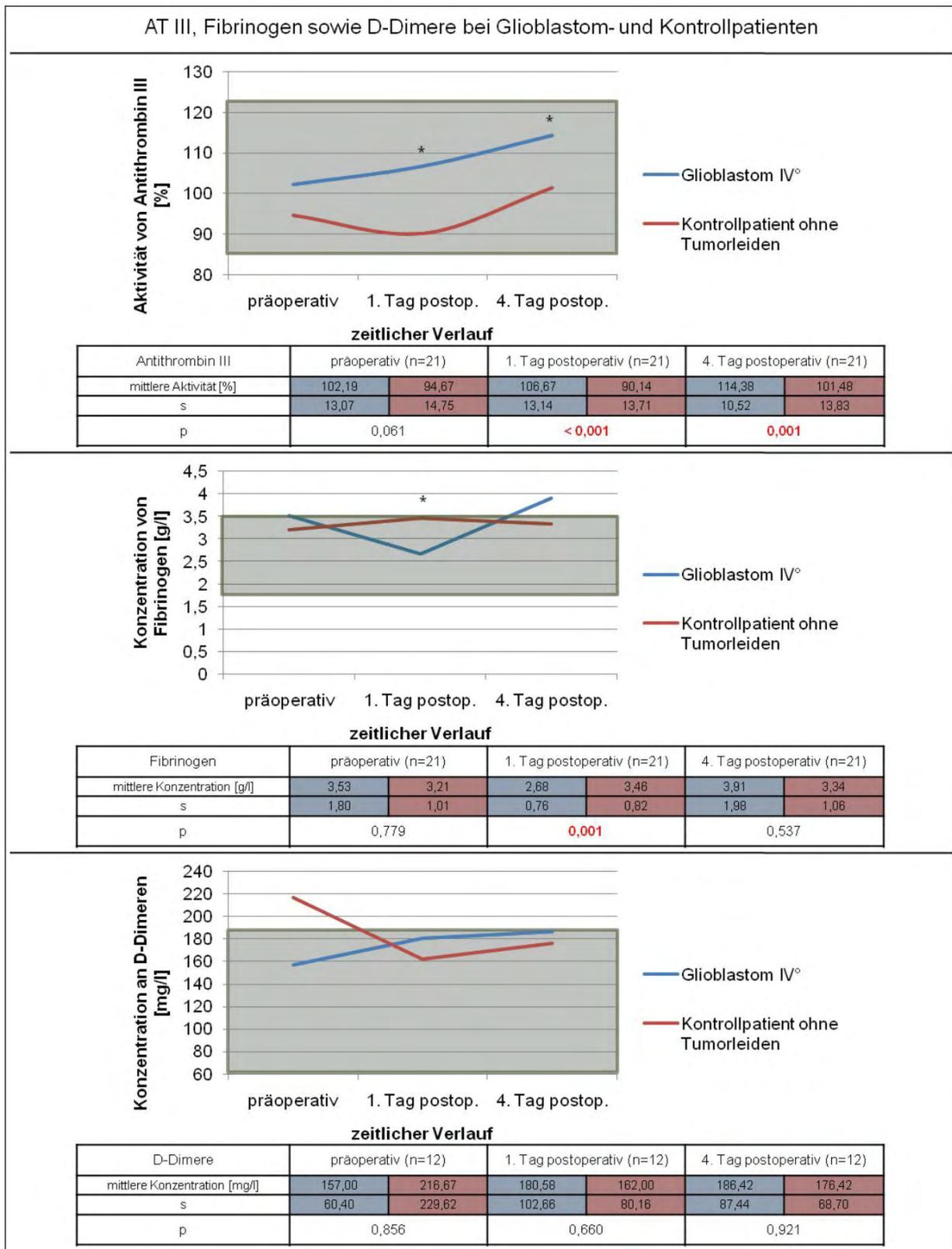
#### Antithrombin III, Fibrinogen und D-Dimere

Während die Aktivitäten des Antithrombins III bereits präoperativ zwar nicht signifikant aber dennoch deutlich über denen der Kontrollgruppe liegen ( $p=0,061$ ), sind die hochsignifikanten Unterschiede zwischen beiden Patientengruppen im frühen postoperativen Zeitraum hervorzuheben. Mit mittleren Aktivitäten von 106,67 % am ersten sowie 114,38 % am vierten postoperativen Tag bei den Glioblastompatienten versus 90,14 % und 101,48 % bei den Kontrollpatienten entstehen signifikante Unterschiede von  $p<0,001$  (erster postoperativer Tag) und  $p=0,001$  (vierter postoperativer Tag) (**Abb. 12**). Desweiteren liegen die Werte von Antithrombin III zu beiden postoperativen Messzeitpunkten häufiger bei den Patienten mit einem Glioblastom in pathologisch erhöhter Aktivität vor als bei den Kontrollpatienten ( $p=0,021$  am ersten postoperativen Tag,  $p<0,001$  am vierten postoperativen Tag) (**Abb. 13**). Die mittlere Konzentration von Fibrinogen beträgt präoperativ 3,53 g/l bei den Tumorpatienten versus 3,21 g/l bei den Kontrollpatienten. Sie steigt am ersten postoperativen Tag in der Kontrollgruppe im Mittel auf 3,46 g/l an und liegt somit hochsignifikant über jener der Glioblastompatienten von 2,68 g/l, bei denen eher ein Konzentrationsabfall zu beobachten ist ( $p=0,001$ ). Während sich am vierten postoperativen Tag bei den Kontrollpatienten ähnliche Werte für die Konzentration an Fibrinogen finden, so zeigen sich in der Tumorgruppe nun wesentlich höhere, oberhalb des Referenzbereiches liegende Werte um 3,91 g/l. Der Anstieg des Fibrinogens vom ersten zum vierten postoperativen Tag bei den Patienten mit einem Glioblastom ist signifikant ( $p=0,002$ ). Bei der Auswertung der D-Dimere fallen im Verlauf keine wesentlichen Unterschiede zwischen Tumor- und Kontrollgruppe auf. Im Mittel liegen die Werte in beiden Patientengruppen im oberen Referenzbereich (**Abb. 12**).

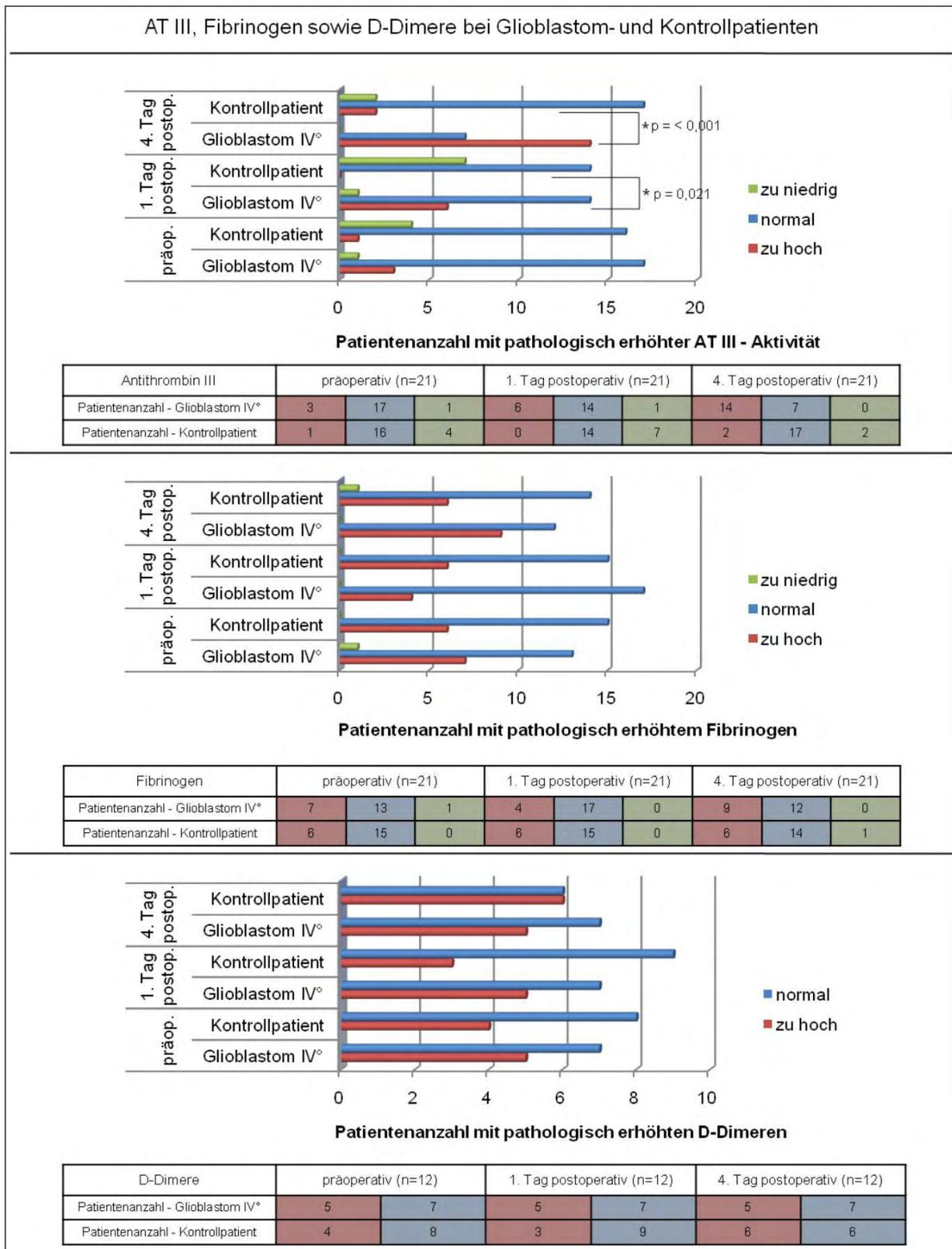


**Abb. 11** Darstellung der Patientenzahlen, die verschiedene Kombinationen aus Gerinnungsfaktoren mit pathologisch erhöhter Aktivität aufweisen (jeweils präoperativ sowie am vierten postoperativen Tag). n=Patientenzahl je Gruppe.

**Beachte:** Bei Patienten mit einem Glioblastom signifikant häufiger Kombinationen der über die obere Normgrenze erhöhten GF II & V, II & IX sowie II & X präoperativ und Kombinationen der GF II & IX am vierten postoperativen Tag.



**Abb. 12** Auswertung der anderen das Gerinnungssystem kennzeichnenden Werte bei Glioblastom- sowie Kontrollpatienten (oben: Aktivität von Antithrombin III, Mitte: Konzentration an Fibrinogen, unten: Konzentration an D-Dimeren). n=Patientenanzahl je Gruppe, s=Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet. Die hellblau unterlegten Diagrammfelder markieren die jeweiligen Normbereiche.



**Abb. 13** Auswertung der anderen das Gerinnungssystem kennzeichnenden Werte bei Glioblastom- sowie Kontrollpatienten in Bezug auf die entsprechenden Referenzbereiche (oben: Aktivität von Antithrombin III, Mitte: Konzentration an Fibrinogen, unten: Konzentration an D-Dimeren). n=Patientenzahl je Gruppe, s=Standardabweichung.

**Beachte:** Bei den Glioblastompatienten signifikant häufiger (\*) pathologisch erhöhte Aktivitätswerte von AT III am ersten und vierten postoperativen Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe.

## 5.2. Vergleich der systemischen Gerinnungsparameter von Patienten mit einem niedriggradigen Gliom und Kontrollpatienten

### Vergleich der absoluten Aktivitätswerte der Gerinnungsfaktoren ohne Bewertung der Normgrenzen

Auch Patienten mit einem niedriggradigen Gliom weisen verglichen mit Kontrollpatienten erhöhte mittlere Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren II, V (am ersten und vierten postoperativen Tag) sowie der Faktoren VIII - XII auf. Präoperativ ist lediglich eine signifikant erhöhte Aktivität des Faktors II nachweisbar, die bei den Patienten mit einem niedriggradigen Gliom im Mittel 123,90 % versus 109,20 % bei den Kontrollpatienten beträgt ( $p=0,030$ ). Am ersten postoperativen Tag liegen wiederum die Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren des intrinsischen Signalweges der Gerinnungskaskade und des Faktors X bei den Gliompatienten deutlich über denen der Kontrollgruppe. Auch die mittlere Aktivität des Faktors VII ist bei den Gliompatienten mit 119,25 % signifikant erhöht gegenüber der von 82,25 % bei den Kontrollpatienten ( $p=0,029$ ). Weitere drei Tage später sind die Gerinnungsfaktoren II, V und VIII - XII mit höherer mittlerer Aktivität bei den Tumorpatienten nachweisbar. Mit 110,50 % liegt die mittlere Aktivität des Faktors XII signifikant über der von 72,50 % aus der Kontrollgruppe ( $p=0,029$ ) (**Abb. 14**).

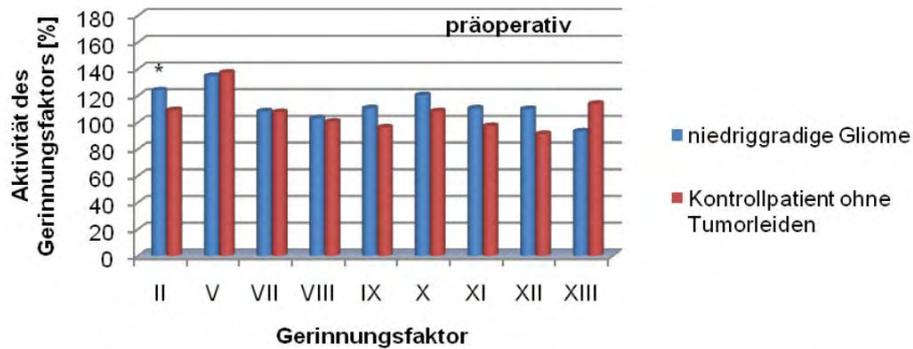
### Über die obere Normgrenze hinaus pathologisch erhöhte Aktivitätswerte einzelner Gerinnungsfaktoren

Es weisen stets mindestens genauso viele Patienten mit einem niedriggradigen Gliom Gerinnungsfaktoren auf, deren Aktivitäten oberhalb des Referenzbereiches liegen wie Kontrollpatienten. Das gilt präoperativ nicht für den Faktor XII sowie prä- und postoperativ für den Faktor XIII (**Abb. 15**).

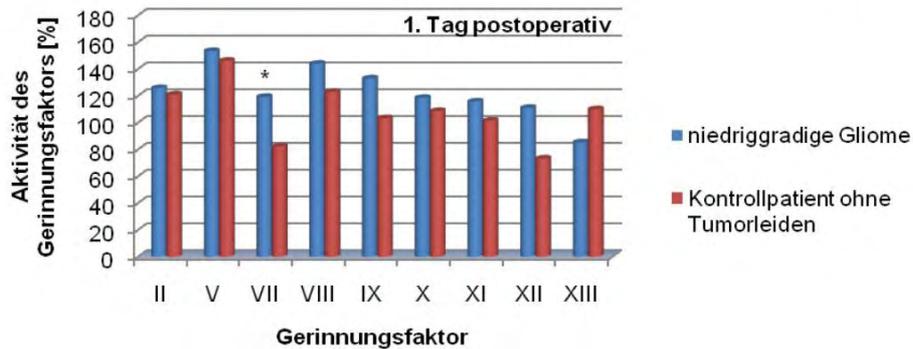
### Über die obere Normgrenze hinaus pathologische Erhöhungen der Aktivitätswerte von multiplen Gerinnungsfaktoren

Pathologische Erhöhungen von Aktivitäten multipler Gerinnungsfaktoren sind bei Patienten mit einem niedriggradigen Gliom tendenziell öfter zu beobachten als in der Kontrollgruppe.

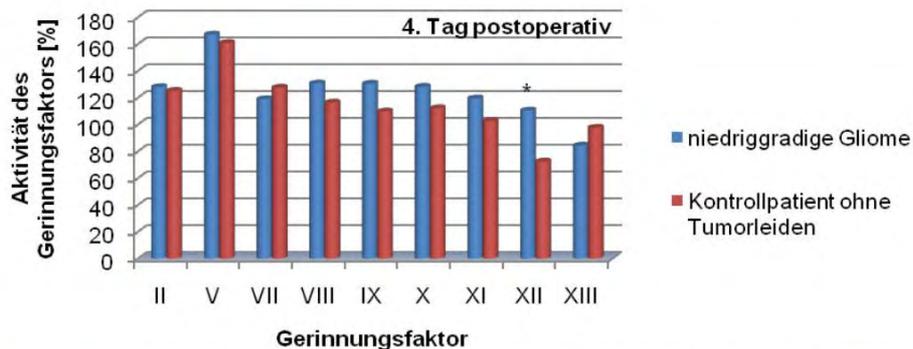
Aktivität der Gerinnungsfaktoren bei Patienten mit einem niedriggradigen Gliom und Kontrollpatienten



GF	II (n=10)		V (n=10)		VII (n=9)		VIII (n=4)		IX (n=4)		X (n=10)		XI (n=4)		XII (n=10)		XIII (n=10)	
mittlere Aktivität [%]	123,90	109,20	134,67	137,20	108,22	107,67	103,08	100,50	110,58	96,25	120,40	108,30	110,50	97,25	100,00	91,30	93,19	113,89
s	17,41	9,21	19,14	23,71	28,27	28,16	21,29	34,81	6,73	16,56	19,63	14,48	16,98	15,26	23,79	32,89	27,92	23,64
p		<b>0,030</b>		0,753		0,983		1,000		0,343		0,159		0,343		0,324		0,075

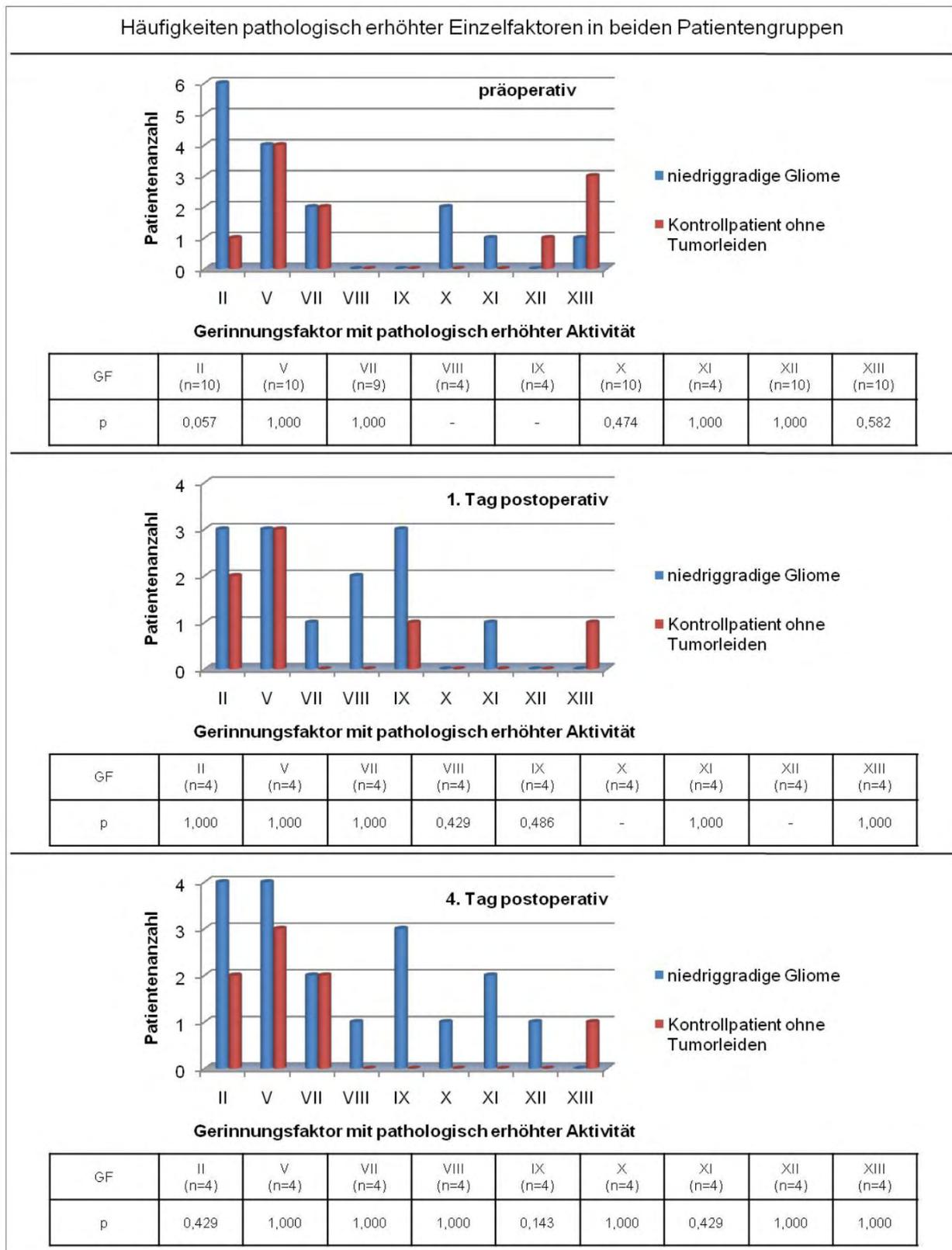


GF	II (n=4)		V (n=4)		VII (n=4)		VIII (n=4)		IX (n=4)		X (n=4)		XI (n=4)		XII (n=4)		XIII (n=4)	
mittlere Aktivität [%]	125,75	121,00	153,42	146,20	119,25	82,25	143,95	122,98	132,95	103,33	118,50	108,75	115,75	101,50	111,00	73,25	85,33	109,98
s	14,68	8,29	21,54	12,22	19,16	3,77	19,99	22,48	17,98	20,64	5,80	17,63	12,50	7,77	20,43	16,74	22,69	29,53
p		0,743		0,686		<b>0,029</b>		0,343		0,114		0,343		0,114		0,057		0,343



GF	II (n=4)		V (n=4)		VII (n=4)		VIII (n=4)		IX (n=4)		X (n=4)		XI (n=4)		XII (n=4)		XIII (n=4)	
mittlere Aktivität [%]	128,00	125,25	167,17	160,85	119,00	127,60	130,70	116,48	130,55	109,83	128,25	112,25	119,50	102,75	110,50	72,50	84,38	97,70
s	1,63	21,09	21,25	32,97	17,36	32,57	17,41	23,86	28,13	2,35	17,35	2,06	23,70	3,69	28,02	14,06	20,02	31,54
p		1,000		0,914		0,943		0,486		0,343		0,286		0,314		<b>0,029</b>		0,686

**Abb. 14** Darstellung der mittleren Aktivitäten der gemessenen Gerinnungsfaktoren bei Patienten mit einem niedriggradigen Gliom und Kontrollpatienten (oben: präoperativ, Mitte: erster postoperativer Tag, unten: vierter postoperativer Tag). n=Patientenanzahl je Gruppe, s=Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet.



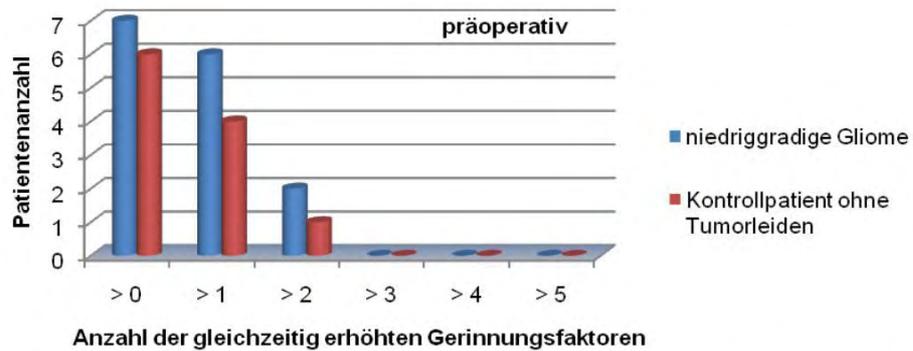
**Abb. 15** Darstellung der Patientenanzahlen, die im venösen Blut einen Gerinnungsfaktor mit pathologisch erhöhter Aktivität aufweisen (oben: präoperativ, Mitte: erster postoperativer Tag, unten: vierter postoperativer Tag). n=Patientenanzahl je Gruppe, s=Standardabweichung.

Während sich für den präoperativen sowie für den ersten postoperativen Messpunkt keine signifikanten Unterschiede ergeben, so liegen am vierten postoperativen Tag bei allen Gliompatienten – und damit signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe – mehr als zwei Gerinnungsfaktoren in pathologisch erhöhter Aktivität vor ( $p=0,029$ ) (**Abb. 16**).

#### Antithrombin III, Fibrinogen und D-Dimere

Auch Patienten mit einem niedriggradigen Gliom zeigen deutlich höhere Aktivitäten an Antithrombin III gegenüber der Kontrollgruppe. Die gemessenen mittleren Aktivitäten betragen präoperativ 117,17 %, am ersten postoperativen Tag 114,83 % und am vierten postoperativen Tag 121,00 %. Somit liegen sie im oberen Normbereich, jedoch noch nicht signifikant über jenen der Kontrollpatienten ( $p=0,208$  präoperativ,  $p=0,063$  am ersten postoperativen Tag und  $p=0,061$  am vierten postoperativen Tag) (**Abb. 17**). Auch im Vergleich der Aktivitätswerte von AT III in Bezug auf die entsprechenden Referenzbereiche ergeben sich zwar deutliche, jedoch keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,061$  am vierten postoperativen Tag) (**Abb. 18**). Während präoperativ und am ersten postoperativen Tag ähnliche Fibrinogen-Konzentrationen in beiden Patientengruppen gemessen wurden, so zeigen sich in der Tumorgruppe am vierten postoperativen Tag höhere und oberhalb des Referenzbereiches liegende Werte um 4,03 g/l, die jedoch nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe sind. Dagegen steigt die gemessene mittlere Konzentration von Fibrinogen innerhalb der Tumorgruppe vom ersten zum vierten postoperativen Tag signifikant an ( $p=0,031$ ). Als besonders markant erscheinen die immer oberhalb des Referenzbereiches liegenden mittleren Konzentrationen der D-Dimere bei den Gliompatienten. Mit einem mittleren Wert von 235,50 mg/l ist die präoperative Konzentration an D-Dimeren bei den Hirntumorpatienten am eindrücklichsten, jedoch noch nicht signifikant erhöht gegenüber dem von 117,75 mg/l in der Kontrollgruppe ( $p=0,057$ ) (**Abb. 17**).

Multiple Erhöhungen der Gerinnungsfaktoren in beiden Patientengruppen



Anzahl pathologisch erhöhter GF	> 0	> 1	> 2	> 3	> 4	> 5
p	1,000	0,656	1,000	-	-	-



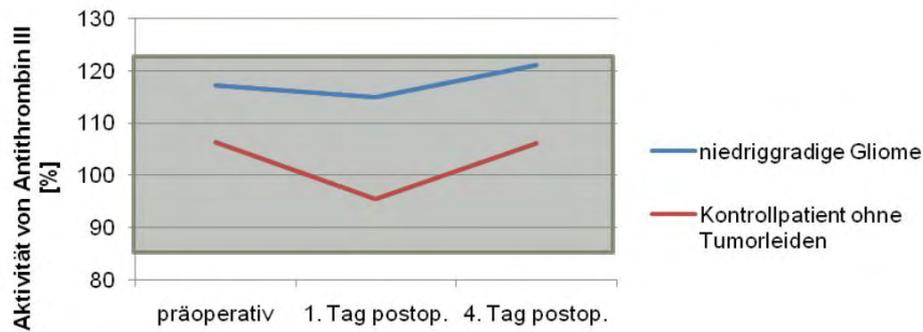
Anzahl pathologisch erhöhter GF	> 0	> 1	> 2	> 3	> 4	> 5
p	-	1,000	0,143	1,000	1,000	-



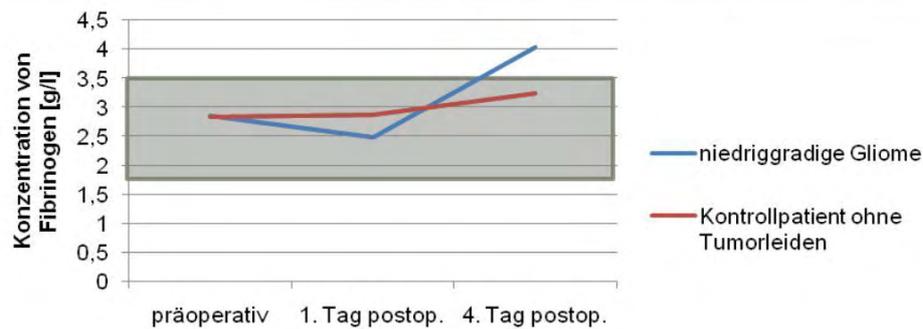
Anzahl pathologisch erhöhter GF	> 0	> 1	> 2	> 3	> 4	> 5
p	-	-	0,029	0,143	0,429	1,000

**Abb. 16** Vergleich der Patientenanzahlen, welche mehrere Gerinnungsfaktoren gleichzeitig in pathologisch erhöhter Aktivität aufweisen (oben: präoperativ, n=10; Mitte: erster postoperativer Tag, n=4; unten: vierter postoperativer Tag, n=4). n=Patientenanzahl je Gruppe. Die signifikanten Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet.

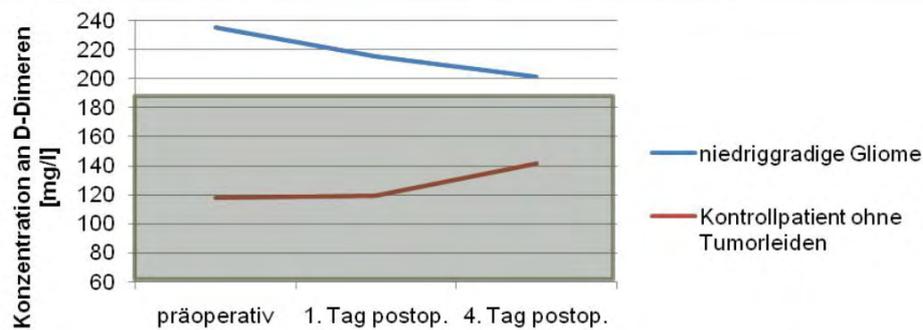
AT III, Fibrinogen sowie D-Dimere bei Patienten mit einem niedriggradigen Gliom und Kontrollpatienten



Antithrombin III	präoperativ (n=6)		1. Tag postoperativ (n=6)		4. Tag postoperativ (n=6)	
mittlere Aktivität [%]	117,17	106,33	114,83	95,50	121,00	106,17
s	4,07	13,17	7,91	14,90	0,00	16,81
p	0,208		0,063		0,061	



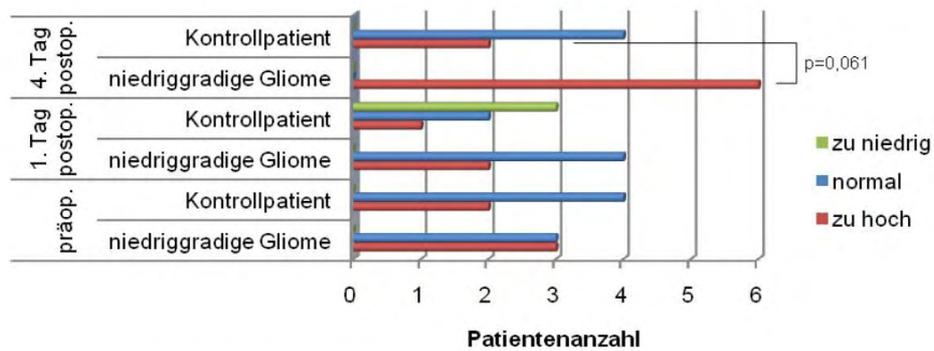
Fibrinogen	präoperativ (n=6)		1. Tag postoperativ (n=6)		4. Tag postoperativ (n=6)	
mittlere Konzentration [g/l]	2,85	2,83	2,48	2,87	4,03	3,25
s	0,79	0,56	0,51	0,44	1,20	1,33
p	0,844		0,273		0,223	



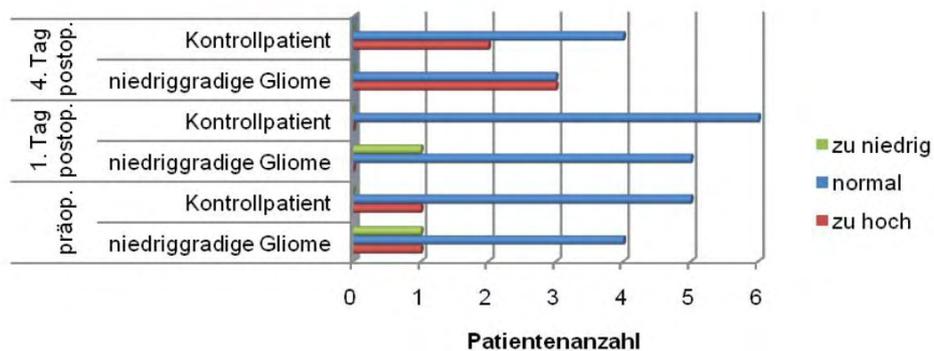
D-Dimere	präoperativ (n=4)		1. Tag postoperativ (n=4)		4. Tag postoperativ (n=4)	
mittlere Konzentration [mg/l]	235,50	117,75	215,25	119,50	201,25	141,25
s	92,07	40,87	77,89	52,02	69,21	87,45
p	0,057		0,200		0,486	

**Abb. 17** Auswertung der anderen das Gerinnungssystem beeinflussenden Werte bei Patienten mit einem niedriggradigen Gliom sowie Kontrollpatienten (oben: Aktivität von Antithrombin III, Mitte: Konzentration an Fibrinogen, unten: Konzentration an D-Dimeren). n=Patientenanzahl je Gruppe, s=Standardabweichung. Die hellblau unterlegten Diagrammfelder markieren die jeweiligen Normbereiche.

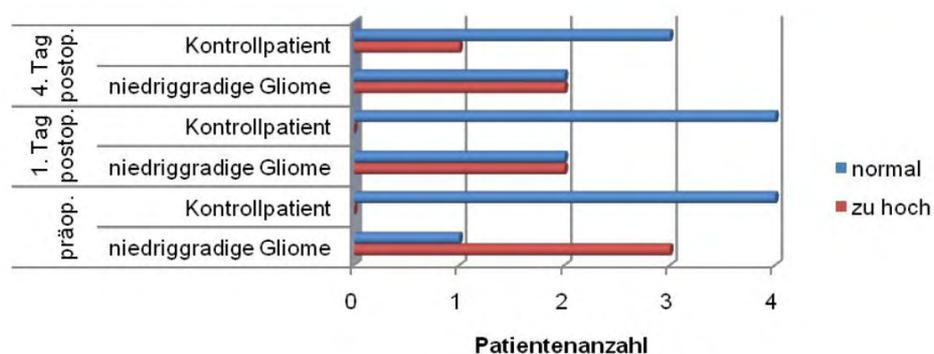
AT III, Fibrinogen sowie D-Dimere bei Patienten mit einem niedriggradigen Gliom und Kontrollpatienten



Antithrombin III	präoperativ (n=6)			1. Tag postoperativ (n=6)			4. Tag postoperativ (n=6)		
Patientenzahl - Gliom I°/II°	3	3	0	2	4	0	6	0	0
Patientenzahl - Kontrollpatient	2	4	0	1	2	3	2	4	0



Fibrinogen	präoperativ (n=6)			1. Tag postoperativ (n=6)			4. Tag postoperativ (n=6)		
Patientenzahl - Gliom I°/II°	1	4	1	0	5	1	3	3	0
Patientenzahl - Kontrollpatient	1	5	0	0	6	0	2	4	0



D-Dimere	präoperativ (n=4)		1. Tag postoperativ (n=4)		4. Tag postoperativ (n=4)	
Patientenzahl - Gliom I°/II°	3	1	2	2	2	2
Patientenzahl - Kontrollpatient	0	4	0	4	1	3

**Abb. 18** Auswertung der anderen das Gerinnungssystem beeinflussenden Werte bei Patienten mit einem niedriggradigen Gliom sowie Kontrollpatienten in Bezug auf die entsprechenden Referenzbereiche (oben: Aktivität von Antithrombin III, Mitte: Konzentration an Fibrinogen, unten: Konzentration an D-Dimeren). n=Patientenzahl je Gruppe, s=Standardabweichung.

**Beachte:** Bei den Patienten mit einem niedriggradigen Gliom deutlich häufiger pathologisch erhöhte Aktivitätswerte von AT III am 4. postoperativen Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe.

### 5.3. Vergleich der systemischen Gerinnungsparameter von Patienten mit einem Glioblastom WHO IV° und Patienten mit einem niedriggradigen Gliom

Aufgrund der tumorspezifischen Altersverteilungen können die Patienten mit einem Glioblastom mit den an einem niedriggradigen Gliom erkrankten Patienten nicht hinreichend gematcht werden. Daher hat der Vergleich der Daten beider Patientengruppen nur eine eingeschränkte Aussagekraft.

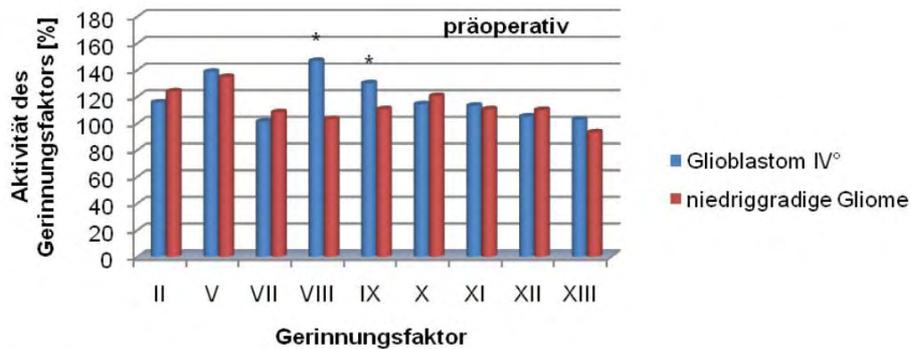
#### Vergleich der absoluten Aktivitätswerte der Gerinnungsfaktoren ohne Bewertung der Normgrenzen

Im Vergleich der absoluten Aktivitäten zeigen die Patienten mit einem Glioblastom präoperativ signifikant höhere Aktivitätswerte der Faktoren VIII und IX als die Patienten mit einem niedriggradigen Gliom. So betragen die mittleren Aktivitäten des Faktors VIII 146,70 % sowie des Faktors IX 130,04 % bei den Patienten mit einem Glioblastom, bei den Patienten mit einem niedriggradigen Gliom 103,08 % sowie 110,58 %. Es ergeben sich signifikante Unterschiede von  $p=0,012$  (für den Faktor VIII) und  $p=0,024$  (für den Faktor IX) (**Abb. 19**).

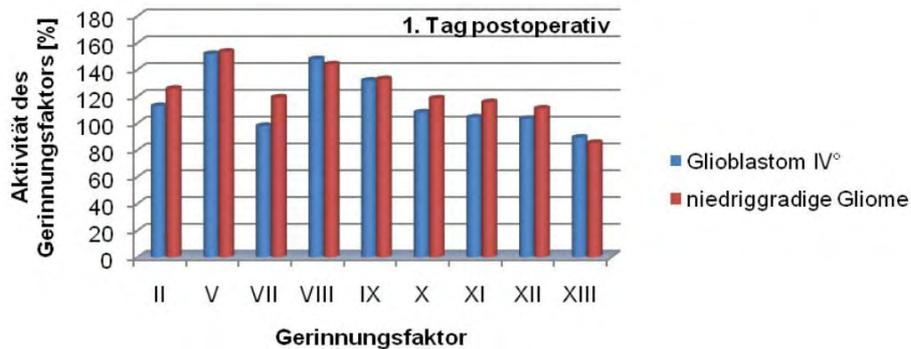
#### Antithrombin III, Fibrinogen und D-Dimere

Bei Patienten mit einem niedriggradigen Gliom wurden zu jedem Messzeitpunkt höhere Aktivitäten von Antithrombin III gemessen als bei den Glioblastompatienten. Dabei liegen die Aktivitäten von Antithrombin III präoperativ mit einem mittleren Wert von 117,17 % signifikant über jenen der Glioblastompatienten ( $p=0,003$ ). Während für Fibrinogen postoperativ ähnliche Konzentrationen in beiden Patientengruppen gemessen wurden, so weisen die Patienten mit einem Glioblastom präoperativ weitaus höhere Werte mit einem Mittelwert von 3,53 g/l auf. Sie liegen damit aber nicht signifikant über denen der Patientengruppe mit einem niedriggradigen Gliom. Die Konzentrationen der D-Dimere sind zu allen drei Messzeiten bei den Patienten mit einem niedriggradigen Gliom höher als bei den Glioblastompatienten. Auch hier finden sich die deutlichsten Unterschiede präoperativ, bevor die gemessenen Werte ab dem ersten postoperativen Tag „zusammen fließen“ (**Abb. 20**).

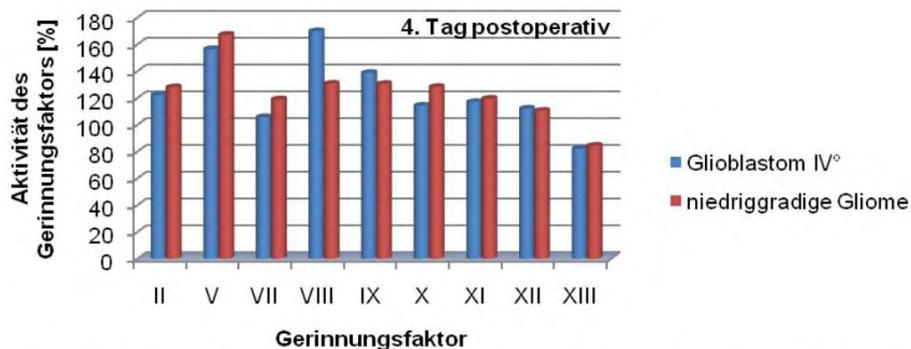
Aktivität der Gerinnungsfaktoren bei Glioblastom- und Patienten mit einem niedriggradigen Gliom



GF	II	V	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII									
mittlere Aktivität [%]	115,59	123,90	138,57	134,87	101,29	108,22	146,70	103,08	130,04	110,58	114,26	120,40	113,14	110,50	105,09	100,00	102,86	93,19
s	22,63	17,41	29,15	19,14	30,14	28,27	31,05	21,29	18,11	6,73	24,81	19,63	18,96	16,98	31,98	23,78	24,03	27,92
p	0,282	0,428	0,448	<b>0,012</b>	<b>0,024</b>	0,489	0,561	0,709	0,246									



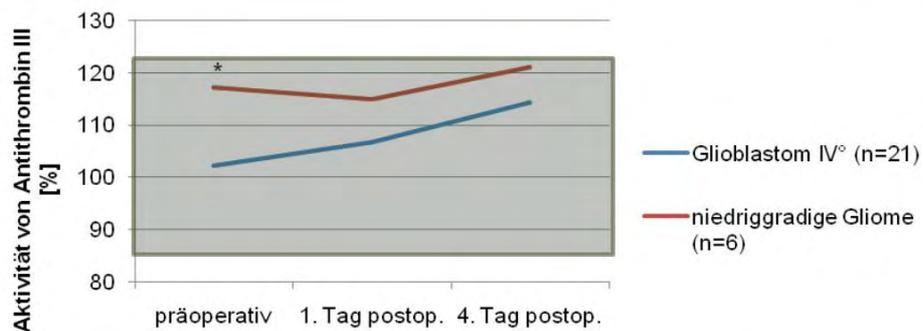
GF	II (n=12)	V (n=12)	VII (n=12)	VIII (n=12)	IX (n=12)	X (n=12)	XI (n=12)	XII (n=12)	XIII (n=12)									
mittlere Aktivität [%]	112,83	125,75	151,62	153,42	97,97	119,25	147,84	143,95	131,80	132,95	108,08	118,50	104,33	115,75	103,33	111,00	89,27	85,33
s	24,91	14,68	28,57	21,54	39,73	19,16	31,13	19,99	18,20	17,98	24,72	5,80	19,74	12,50	25,10	20,43	23,59	22,69
p	0,331	0,953	0,098	0,862	0,979	0,536	0,331	0,429	0,953									



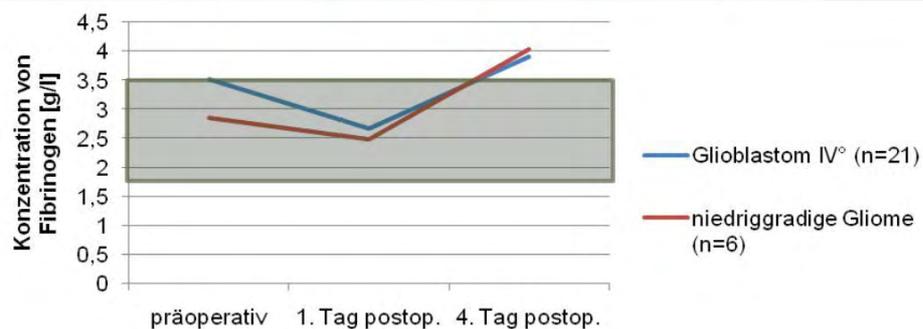
GF	II (n=12)	V (n=12)	VII (n=12)	VIII (n=12)	IX (n=12)	X (n=12)	XI (n=12)	XII (n=12)	XIII (n=12)									
mittlere Aktivität [%]	122,30	128,00	156,42	167,17	105,75	119,00	169,86	130,70	138,72	130,55	114,33	128,25	117,00	119,50	112,08	110,50	82,14	84,38
s	22,55	1,63	28,07	21,25	33,05	17,36	36,03	17,41	12,65	28,13	19,48	17,35	15,78	23,70	25,82	28,02	10,36	20,02
p	0,753	0,519	0,336	0,058	1,000	0,203	0,789	0,929	0,684									

**Abb. 19** Darstellung der mittleren Aktivitäten der gemessenen Gerinnungsfaktoren bei Glioblastom- und Patienten mit einem niedriggradigen Gliom (oben: präoperativ, n=41 beziehungsweise 12; Mitte: erster postoperativer Tag, n=12 beziehungsweise 4; unten: vierter postoperativer Tag, n=12 beziehungsweise 4). n=Patientenanzahl je Gruppe, s=Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet.

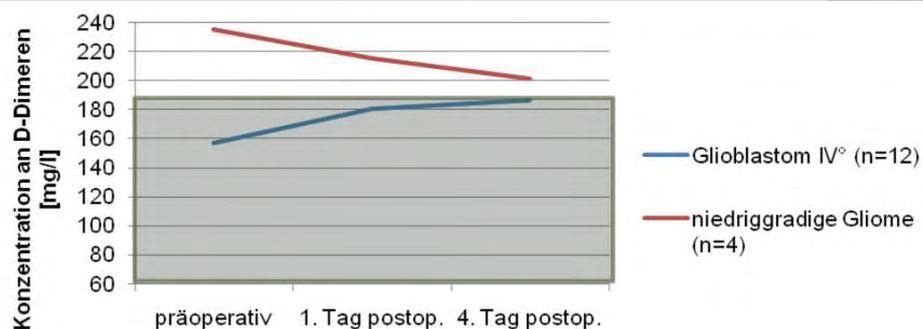
AT III, Fibrinogen sowie D-Dimere bei Glioblastom- und Patienten mit einem niedriggradigen Gliom



Antithrombin III	präoperativ		1. Tag postoperativ		4. Tag postoperativ	
mittlere Aktivität [%]	102,19	117,17	106,67	114,83	114,38	121,00
s	13,07	4,07	13,14	7,91	10,52	0,00
p	0,003		0,159		0,056	



Fibrinogen	präoperativ		1. Tag postoperativ		4. Tag postoperativ	
mittlere Konzentration [g/l]	3,53	2,85	2,88	2,48	3,91	4,03
s	1,80	0,79	0,76	0,51	1,98	1,20
p	0,667		0,688		0,870	



D-Dimere	präoperativ		1. Tag postoperativ		4. Tag postoperativ	
mittlere Konzentration [mg/l]	157,00	235,50	180,58	215,25	186,42	201,25
s	60,40	92,97	102,66	77,69	87,44	69,21
p	0,133		0,521		0,582	

**Abb. 20** Auswertung der anderen das Gerinnungssystem beeinflussenden Werte bei Patienten mit einem niedriggradigen Gliom sowie Glioblastompatienten (oben: Aktivität von Antithrombin III, Mitte: Konzentration an Fibrinogen, unten: Konzentration an D-Dimeren). n=Patientenanzahl je Gruppe, s=Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet. Die hellblau unterlegten Diagrammfelder markieren die jeweiligen Normbereiche.

#### 5.4. Vergleich der systemischen Gerinnungsparameter von Patienten mit einem Meningeom WHO I° und II° sowie Kontrollpatienten

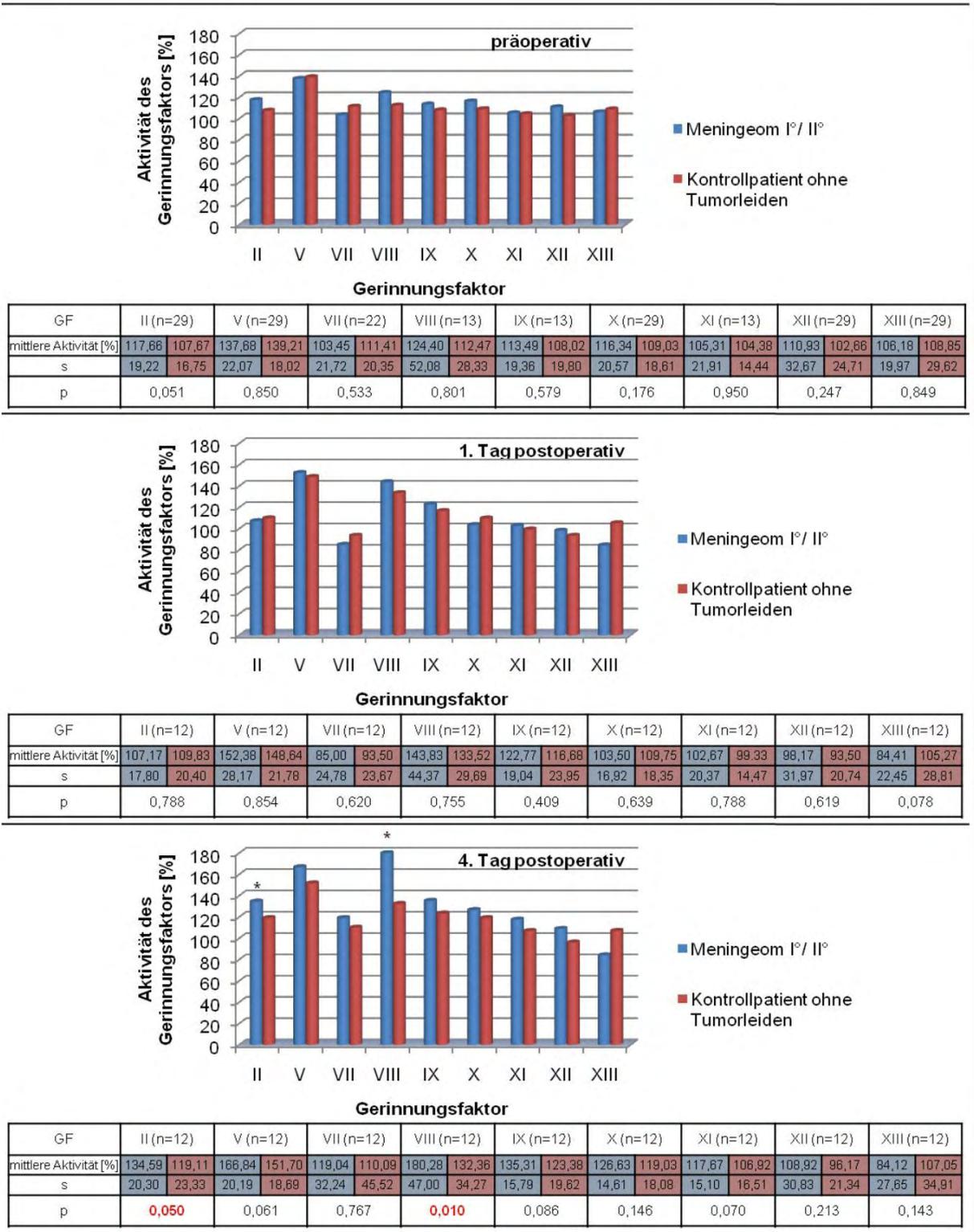
##### Vergleich der absoluten Aktivitätswerte der Gerinnungsfaktoren ohne Bewertung der Normgrenzen

Während präoperativ sowie am ersten postoperativen Tag in beiden untersuchten Patientengruppen etwa gleiche Aktivitätswerte der Gerinnungsfaktoren gemessen wurden, so zeigen sich am vierten postoperativen Tag bei den Patienten mit einem Meningeom deutliche, teils signifikant erhöhte mittlere Aktivitätswerte. Tendenziell liegen die Gerinnungsfaktoren II, VIII, IX, X, XI sowie XII bei den Meningeompatienten bereits präoperativ in erhöhter Aktivität vor. Von jenen zeigt sich insbesondere der Faktor II mit einem Mittelwert von 117,66 % deutlich stärker aktiviert als in der Kontrollgruppe. Ein signifikanter Unterschied besteht jedoch nicht ( $p=0,051$ ). Am ersten postoperativen Tag sind erhöhte Aktivitäten der Faktoren des intrinsischen Weges der Gerinnungskaskade (Faktoren VIII, IX, XI und XII) sowie des Faktors V bei den Meningeompatienten festzustellen. Signifikante Unterschiede ergeben sich hierbei nicht. Am vierten postoperativen Tag liegen bei den Meningeompatienten schließlich bis auf den Faktor XIII alle Faktoren in höherer Aktivität vor als in der Kontrollgruppe. Mit mittleren Aktivitäten von 134,59 % sowie 180,28 % liegen die Faktoren II und VIII der Meningeompatienten deutlich über dem jeweiligen Normbereich und außerdem signifikant über denen der Kontrollpatienten ( $p=0,050$  für den Faktor II und  $p=0,010$  für den Faktor VIII) (**Abb. 21**).

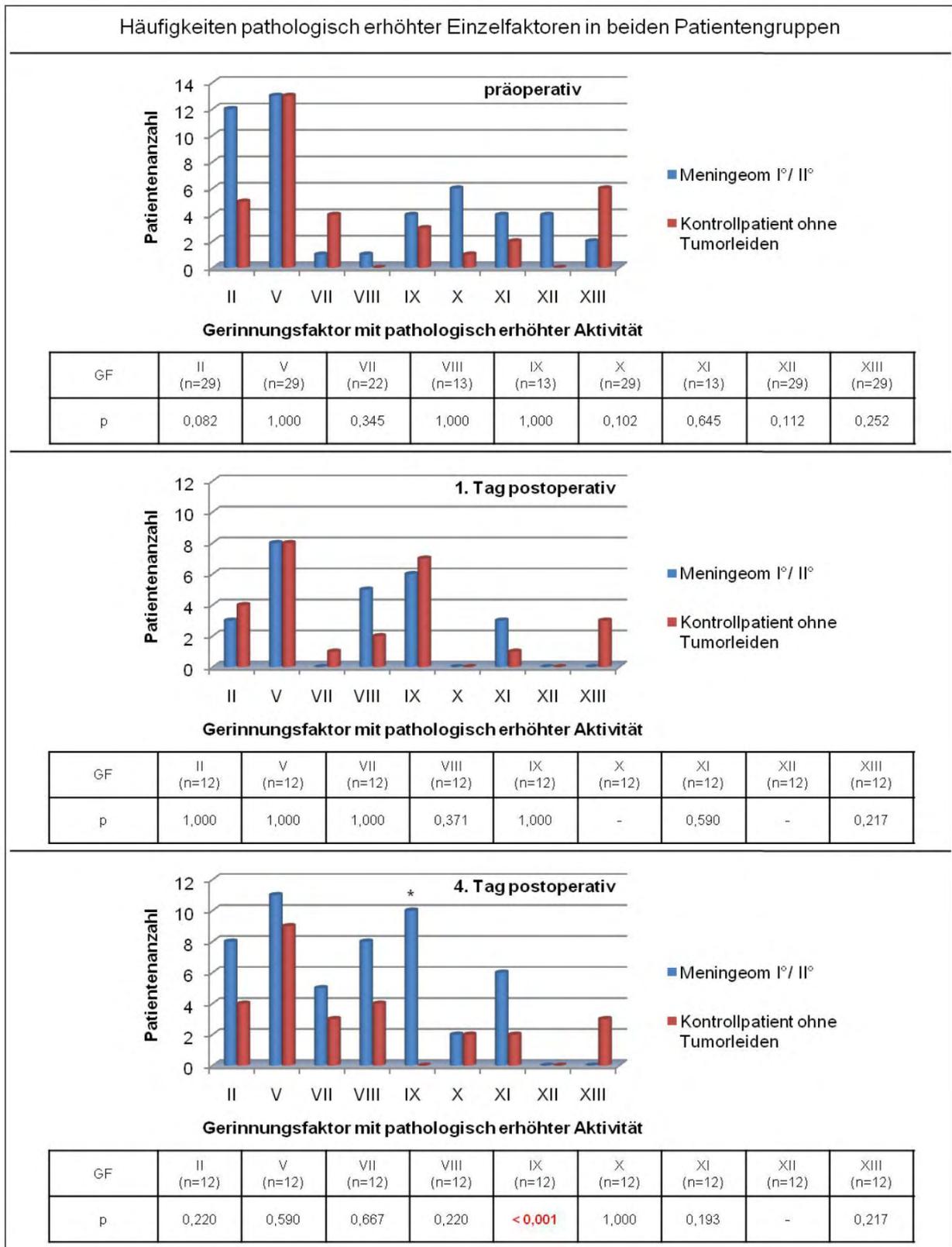
##### Über die obere Normgrenze hinaus pathologisch erhöhte Aktivitätswerte einzelner Gerinnungsfaktoren

Meningeompatienten weisen tendenziell mehr Gerinnungsfaktoren mit pathologisch über die obere Normgrenze hinaus erhöhter Aktivität auf als Kontrollpatienten. Präoperativ sowie ein Tag nach der Operation ergeben sich aber keine signifikanten Unterschiede. Am vierten postoperativen Tag ist die Aktivität des Gerinnungsfaktors IX bei zehn Patienten mit einem Meningeom WHO I° oder II° pathologisch erhöht und damit signifikant häufiger im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p<0,001$ ) (**Abb. 22**).

Vergleich der Gerinnungsfaktoren bei Patienten mit einem Meningeom I°/ II° und Kontrollpatienten



**Abb. 21** Darstellung der mittleren Aktivitäten der gemessenen Gerinnungsfaktoren bei Patienten mit einem Meningeom WHO I° oder II° und Kontrollpatienten (oben: präoperativ, Mitte: erster postoperativer Tag, unten: vierter postoperativer Tag). n=Patientenanzahl je Gruppe, s=Standardabweichung. Die signifikanten Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet.



**Abb. 22** Darstellung der Patientenanzahlen, die im venösen Blut einen Gerinnungsfaktor mit pathologisch erhöhter Aktivität aufweisen (oben: präoperativ, Mitte: erster postoperativer Tag, unten: vierter postoperativer Tag). n=Patientenanzahl je Gruppe. Die signifikanten Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet.

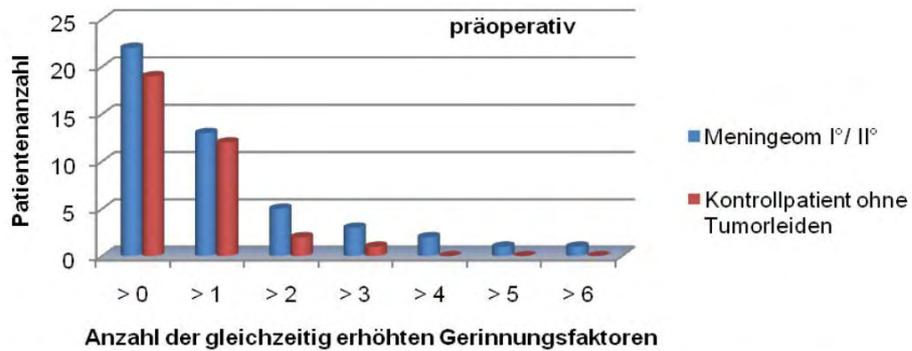
### Über die obere Normgrenze hinaus pathologische Erhöhungen der Aktivitätswerte von multiplen Gerinnungsfaktoren

Pathologische Erhöhungen der Aktivitätswerte multipler Gerinnungsfaktoren sind bei Meningeompatienten bereits präoperativ öfter zu beobachten als in der entsprechenden Kontrollgruppe. Dagegen zeigt sich am ersten postoperativen Tag nur in den Kategorien von mehr als zwei sowie mehr als drei gleichzeitig pathologisch erhöhten Aktivitätswerten multipler Gerinnungsfaktoren eine größere Anzahl bei den Meningeompatienten. Die Situation des vierten postoperativen Tages scheint sich der präoperativen Situation wieder anzunähern, indem die Patienten mit einem Meningeom stets häufiger gleichzeitig pathologisch erhöhte Aktivitätswerte multipler Gerinnungsfaktoren im peripheren Blut aufweisen als die Kontrollpatienten. Desweiteren liegen bei den Meningeompatienten signifikant häufiger mehr als drei sowie mehr als vier Gerinnungsfaktoren in pathologisch erhöhter Aktivität vor als in der Kontrollgruppe ( $p=0,012$  für mehr als zwei beziehungsweise  $p=0,036$  für mehr als drei Gerinnungsfaktoren mit pathologisch erhöhten Aktivitätswerten) (**Abb. 23**).

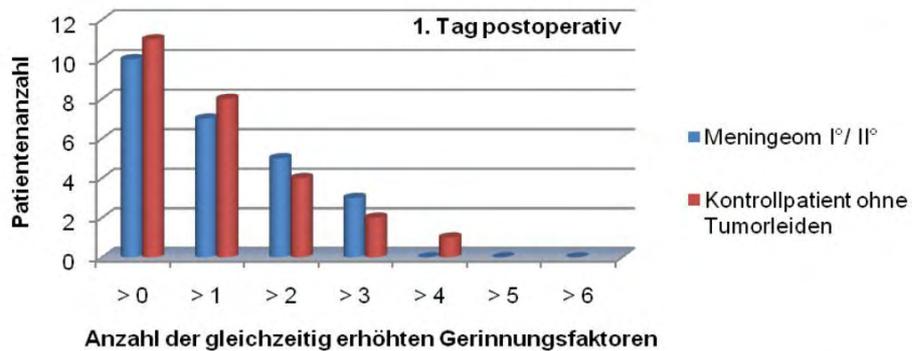
### Antithrombin III, Fibrinogen und D-Dimere

Die Patienten mit einem Meningeom WHO I°/II° weisen zu den postoperativen Messzeiten im Mittel signifikant höhere Aktivitäten von Antithrombin III als die Kontrollpatienten auf. So beträgt der mittlere präoperative Wert bei den Meningeompatienten 102,94 % und bei den Kontrollpatienten 98,56 % ( $p=0,395$ ). Am ersten postoperativen Tag findet sich eine mittlere Aktivität von 105,38 % bei den Hirntumorpatienten versus 89,94 % in der Kontrollgruppe, so dass sich ein p-Wert von 0,003 ergibt. Am vierten postoperativen Tag beträgt der p-Wert 0,010, da die mittlere Aktivität von AT III der Meningeompatienten 114,94 %, die der Kontrollpatienten dagegen 105,06 % beträgt (**Abb. 24**). Zudem können in der Gruppe der Meningeompatienten am ersten und vierten Tag nach der Operation häufiger pathologisch erhöhte Aktivitätswerte von AT III als bei den Kontrollpatienten nachgewiesen werden ( $p=0,015$  am ersten postoperativen Tag,  $p=0,004$  am vierten postoperativen Tag) (**Abb. 25**). Während die Konzentration an Fibrinogen präoperativ bei Meningeom- und Kontrollpatienten ähnlich hoch ist, ergibt sich am ersten postoperativen Tag eine signifikant niedrigere mittlere Fibrinogen-Konzentration bei den Tumorpatienten.

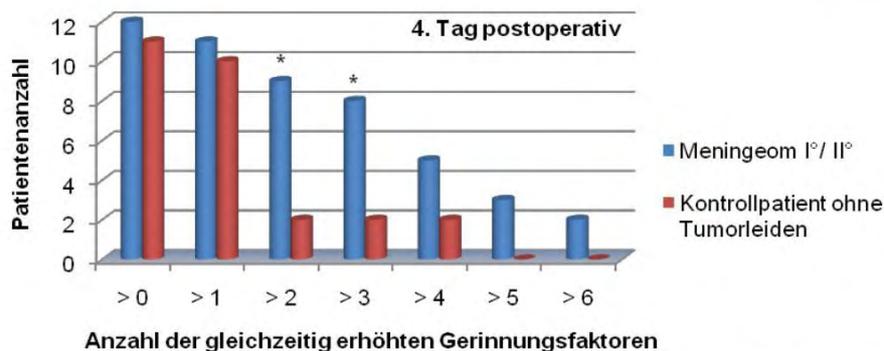
Multiple Erhöhungen der Gerinnungsfaktoren in beiden Patientengruppen



Anzahl pathologisch erhöhter GF	>0	>1	>2	>3	>4	>5	>6
p	0,565	1,000	0,423	0,611	0,491	1,000	1,000



Anzahl pathologisch erhöhter GF	>0	>1	>2	>3	>4	>5	>6
p	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-	-



Anzahl pathologisch erhöhter GF	>0	>1	>2	>3	>4	>5	>6
p	1,000	1,000	0,012	0,036	0,371	0,217	0,478

**Abb. 23** Vergleich der Patientenanzahlen, welche mehrere Gerinnungsfaktoren gleichzeitig in pathologisch erhöhter Aktivität aufweisen (oben: präoperativ, n=29; Mitte: erster postoperativer Tag, n=12; unten: vierter postoperativer Tag, n=12). n=Patientenanzahl je Gruppe. Signifikante Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet.

Mit einem Mittelwert von 2,87 g/l weisen die Meningeompatienten signifikant geringere Konzentrationen an Fibrinogen auf als die Kontrollpatienten ( $p=0,037$ ) (**Abb. 24**). Bis zum vierten postoperativen Tag steigen die mittleren Konzentrationen von Fibrinogen beider Patientengruppen über die obere Grenze des Normbereiches an. Dabei ist wiederum ein signifikanter Anstieg der mittleren Konzentration für Fibrinogen innerhalb der Tumorgruppe zu beobachten ( $p<0,001$ ). Während die Konzentrationen der D-Dimere der Meningeompatienten im zeitlichen Verlauf zunehmen und am vierten postoperativen Tag einen pathologisch erhöhten mittleren Wert von 202,92 mg/l annehmen, so liegen die Mittelwerte der D-Dimere in der Kontrollgruppe stets im Normbereich. Auch hier ergeben sich aber keine signifikanten Unterschiede (**Abb. 24**).

### **5.5. Vergleich der systemischen Gerinnungsparameter von Patienten mit einem Meningeom WHO I° und Kontrollpatienten**

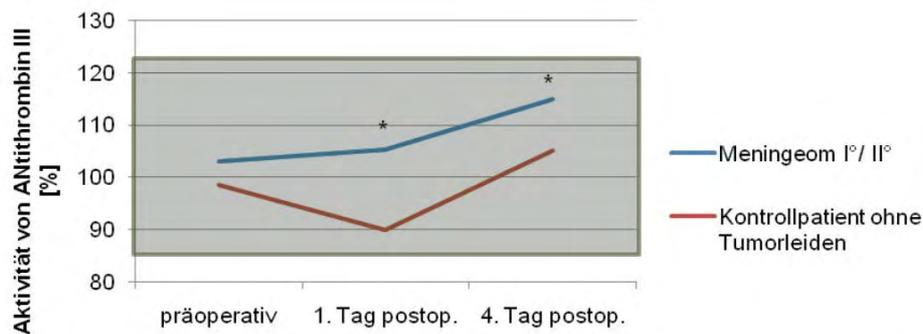
#### Vergleich der absoluten Aktivitätswerte der Gerinnungsfaktoren

Patienten mit einem Meningeom WHO I° weisen sowohl präoperativ als auch am ersten postoperativen Tag keine signifikant erhöhten Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren gegenüber der Kontrollgruppe auf. Im Gegensatz liegt der Faktor XIII bei den Meningeompatienten am ersten postoperativen Tag mit 75,24 % in signifikant niedrigerer Aktivität vor als in der Kontrollgruppe ( $p=0,019$ ). Dieses Phänomen ist auch am vierten postoperativen Tag nachweisbar ( $p=0,024$ ). Allerdings lässt sich dann auch für den Faktor VIII mit 167,11 % eine signifikant erhöhte mittlere Aktivität bei den Meningeompatienten gegenüber den Kontrollpatienten feststellen (**Abb. 26**). Insgesamt zeigen Patienten mit einem Meningeom WHO I° weniger hohe Aktivitäten von Gerinnungsfaktoren als Patienten mit einem Meningeom WHO II°.

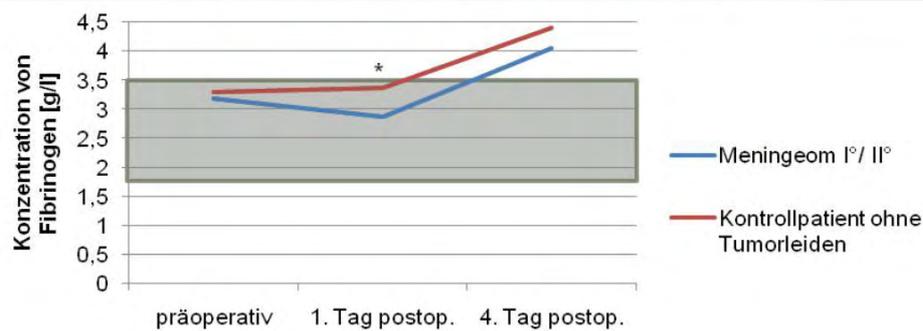
#### Über die obere Normgrenze hinaus pathologische erhöhte Aktivitätswerte einzelner Gerinnungsfaktoren

Insbesondere am vierten postoperativen Tag lassen sich bei den Patienten mit einem Meningeom WHO I° tendenziell mehr Gerinnungsfaktoren mit pathologisch erhöhter Aktivität messen als in der Kontrollgruppe. Präoperativ sowie ein Tag nach der Operation ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

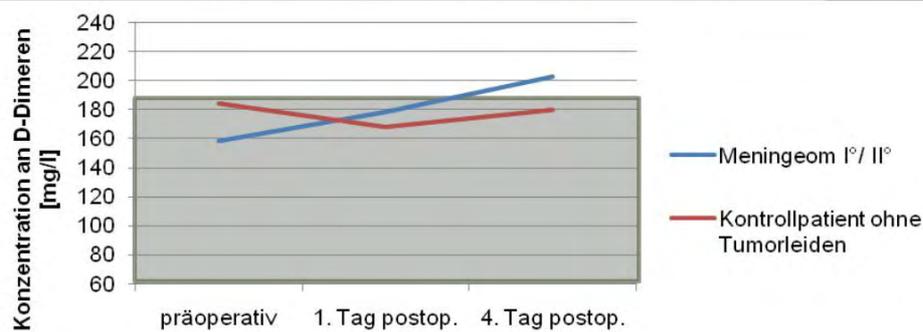
AT III, Fibrinogen sowie D-Dimere bei Patienten mit einem Meningeom I°/II° und Kontrollpatienten



Antithrombin III	präoperativ (n=16)		1. Tag postoperativ (n=16)		4. Tag postoperativ (n=16)	
mittlere Aktivität [%]	102,94	98,56	105,38	89,94	114,94	105,06
s	12,82	11,13	12,58	13,47	10,15	12,25
p	0,395		0,003		0,010	



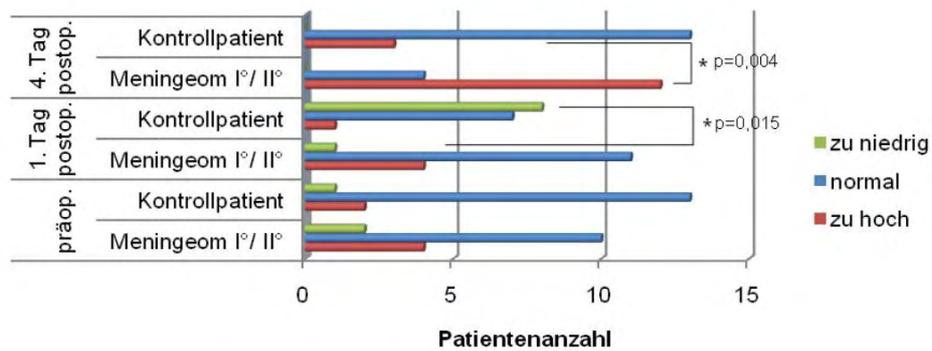
Fibrinogen	präoperativ (n=16)		1. Tag postoperativ (n=16)		4. Tag postoperativ (n=16)	
mittlere Konzentration [g/l]	3,19	3,30	2,87	3,37	4,06	4,41
s	1,26	0,80	1,58	0,82	1,91	2,24
p	0,496		0,037		0,963	



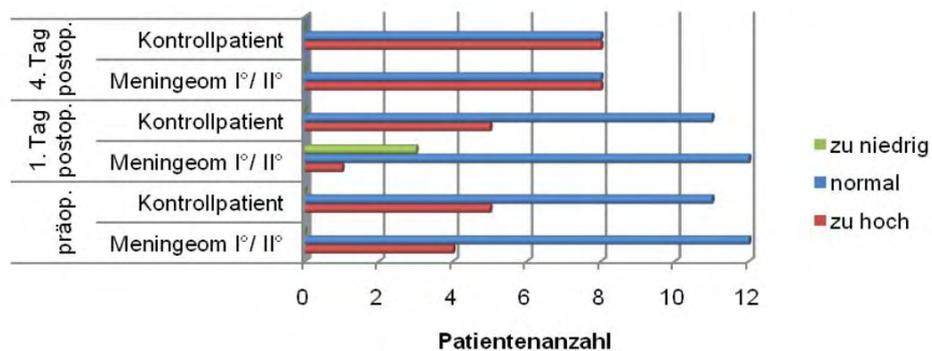
D-Dimere	präoperativ (n=12)		1. Tag postoperativ (n=12)		4. Tag postoperativ (n=12)	
mittlere Konzentration [mg/l]	158,00	183,92	178,50	188,17	202,92	180,08
s	69,95	93,45	75,04	77,30	115,58	87,03
p	0,630		0,932		0,854	

**Abb. 24** Auswertung der anderen das Gerinnungssystem beeinflussenden Werte bei Patienten mit einem Meningeom WHO I° oder II° sowie Kontrollpatienten (oben: Aktivität von Antithrombin III, Mitte: Konzentration an Fibrinogen, unten: Konzentration an D-Dimeren). n=Patientenanzahl je Gruppe, s=Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet. Die hellblau unterlegten Diagrammfelder markieren die jeweiligen Normbereiche.

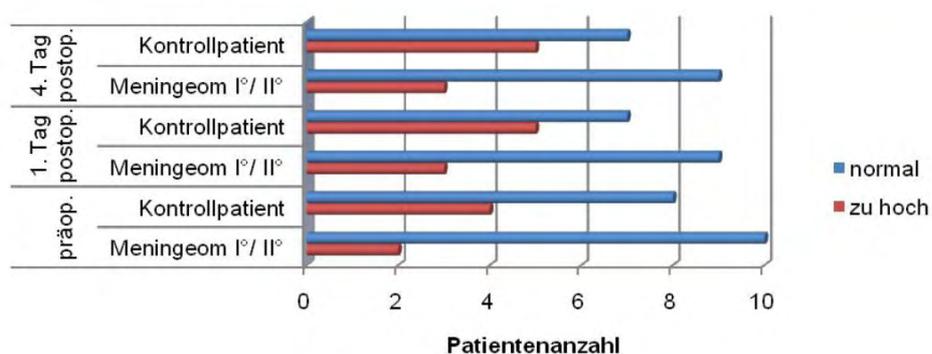
AT III, Fibrinogen sowie D-Dimere bei Patienten mit einem Meningeom I°/II° und Kontrollpatienten



Antithrombin III	präoperativ (n=16)			1. Tag postoperativ (n=16)			4. Tag postoperativ (n=16)		
Patientenanzahl - Meningeom I°/II°	4	10	2	4	11	1	12	4	0
Patientenanzahl - Kontrollpatient	2	13	1	1	7	8	3	13	0



Fibrinogen	präoperativ (n=16)			1. Tag postoperativ (n=16)			4. Tag postoperativ (n=16)		
Patientenanzahl - Meningeom I°/II°	4	12	0	1	12	3	8	8	0
Patientenanzahl - Kontrollpatient	5	11	0	5	11	0	8	8	0

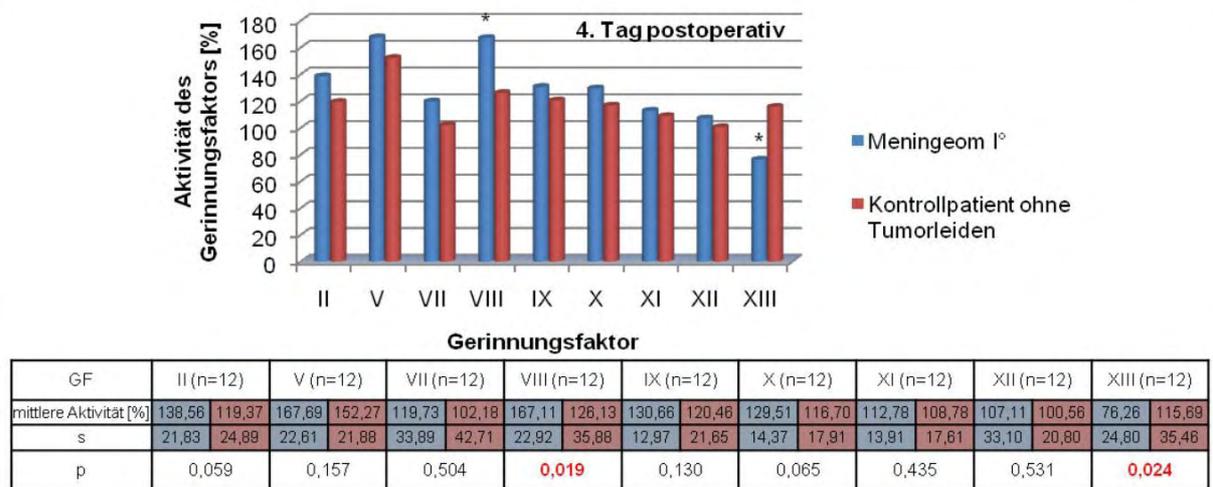
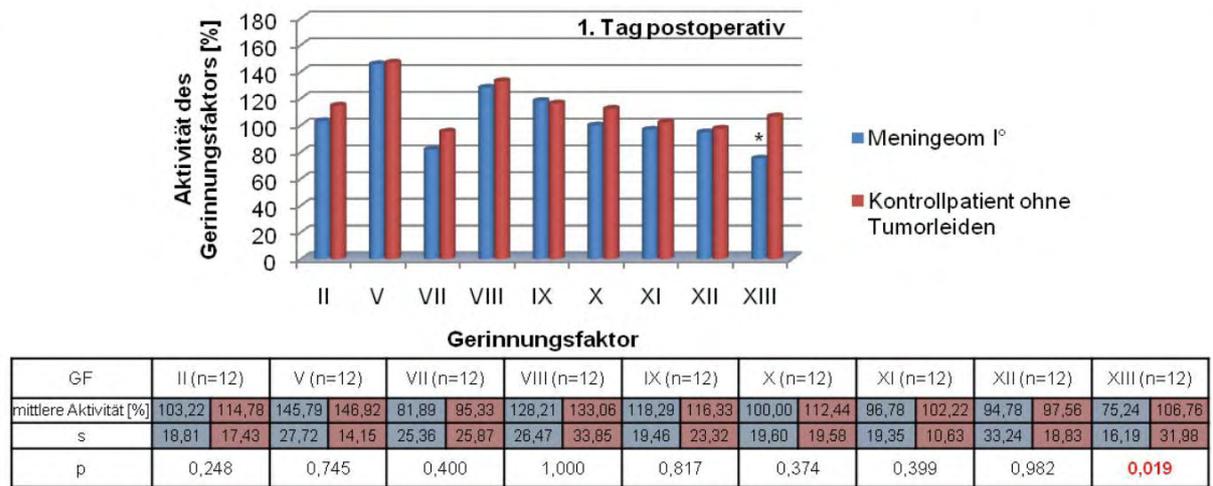
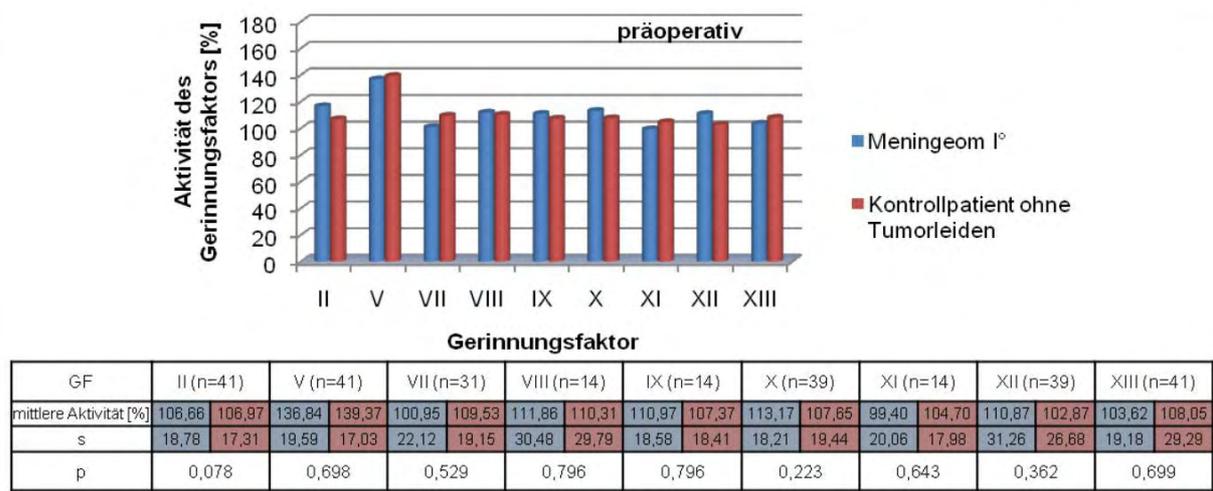


D-Dimere	präoperativ (n=12)		1. Tag postoperativ (n=12)		4. Tag postoperativ (n=12)	
Patientenanzahl - Meningeom I°/II°	2	10	3	9	3	9
Patientenanzahl - Kontrollpatient	4	8	5	7	5	7

**Abb. 25** Auswertung der anderen das Gerinnungssystem beeinflussenden Werte bei Patienten mit einem Meningeom WHO I° oder II° sowie Kontrollpatienten in Bezug auf die entsprechenden Referenzbereiche (oben: Aktivität von Antithrombin III, Mitte: Konzentration an Fibrinogen, unten: Konzentration an D-Dimeren). n=Patientenanzahl je Gruppe.

**Beachte:** Signifikant häufiger (\*) pathologisch erhöhte mittlere Aktivitätswerte am vierten postoperativen Tag bei den Patienten mit einem Meningeom WHO I° oder II°.

Vergleich der Gerinnungsfaktoren bei Patienten mit einem Meningeom I° und Kontrollpatienten



**Abb. 26** Darstellung der mittleren Aktivitäten der gemessenen Gerinnungsfaktoren bei Patienten mit einem Meningeom WHO I° und Kontrollpatienten (oben: präoperativ, Mitte: erster postoperativer Tag, unten: vierter postoperativer Tag). n=Patientenanzahl je Gruppe, s=Standardabweichung. Die signifikanten Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet.

Am vierten postoperativen Tag liegt der Gerinnungsfaktor IX bei sieben Patienten mit einem Meningeom WHO I° und damit signifikant häufiger in pathologisch erhöhter Aktivität als in der Kontrollgruppe vor ( $p=0,002$ ) (**Abb. 27**).

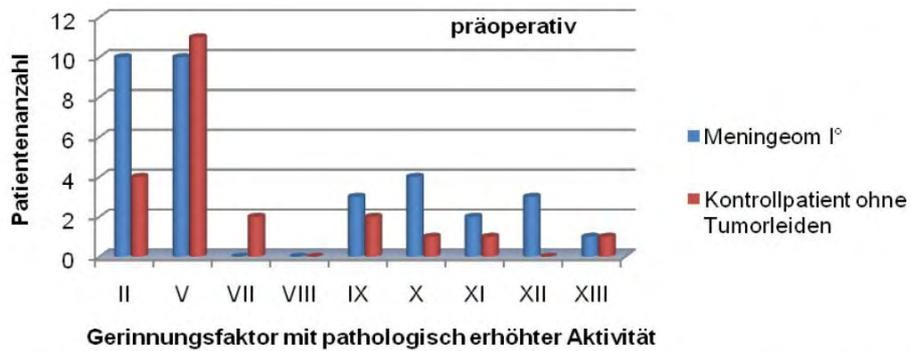
Über die obere Normgrenze hinaus pathologische Erhöhungen der Aktivitätswerte von multiplen Gerinnungsfaktoren

Während die Mehrfacherhöhungen zum präoperativen Messpunkt nur knapp häufiger bei den Meningeompatienten und am ersten postoperativen Tag sogar eher in der Gruppe der Kontrollpatienten beobachtet werden, weisen die Tumorpatienten am vierten postoperativen Tag deutlich häufiger multiple Erhöhungen von Gerinnungsfaktor-Aktivitäten im pathologischen Wertebereich auf. So finden sich vier Tage nach der Operation signifikant mehr Meningeompatienten, bei denen verglichen mit der Kontrollgruppe mehr als zwei Gerinnungsfaktoren gleichzeitig in pathologisch erhöhter Aktivität vorliegen ( $p=0,050$ ) (**Abb. 28**).

Antithrombin III, Fibrinogen und D-Dimere

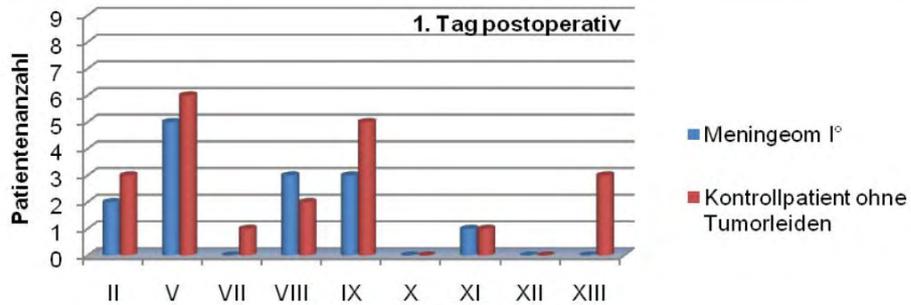
Patienten mit einem Meningeom WHO I° zeigen deutlich höhere Aktivitäten von Antithrombin III im Vergleich zur Kontrollgruppe. Am ersten postoperativen Tag ist dieser Unterschied mit einem Mittelwert von 104,50 % bei den Tumorpatienten und 91,57 % bei den Kontrollpatienten signifikant ( $p=0,021$ ) (**Abb. 29**). Zudem zeigen die Patienten mit einem Meningeom WHO I° am vierten postoperativen Tag in Bezug auf den Referenzbereich signifikant häufiger pathologisch erhöhte Werte als die Kontrollpatienten (**Abb. 30**). Die Patienten mit einem Meningeom WHO I° weisen perioperativ weniger hohe Konzentrationen an Fibrinogen im peripheren Blut auf als die Kontrollpatienten. Am ersten postoperativen Tag ist eine signifikant niedrigere mittlere Konzentration an Fibrinogen bei den Meningeompatienten zu beobachten ( $p=0,045$ ). Im weiteren Verlauf steigen die Werte beider über die obere Grenze des Normbereiches an. Dabei sind sie innerhalb der Tumorgruppe am vierten postoperativen Tag signifikant höher als am ersten postoperativen Tag ( $p<0,001$ ). Auch die Konzentrationen der D-Dimere liegen bei den Patienten mit einem Meningeom WHO I° im Mittel niedriger als in der Gruppe der Patienten mit einem Meningeom WHO I° oder II°. Dennoch ist auch bei den Patienten mit einem Meningeom WHO I° eine Steigerung der mittleren Konzentrationen bis über den Normbereich am vierten postoperativen Tag zu beobachten (**Abb. 29**).

Häufigkeiten pathologisch erhöhter Einzelfaktoren in beiden Patientengruppen



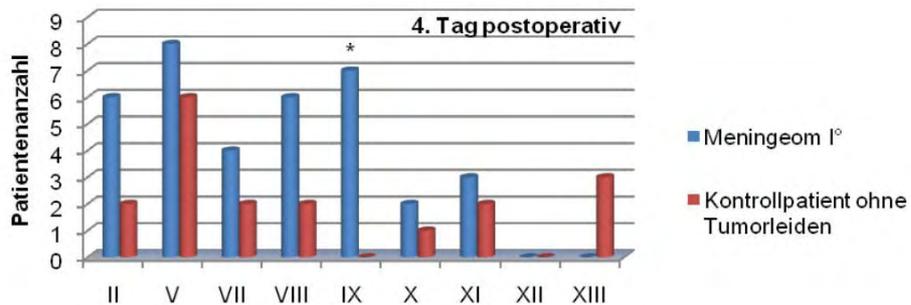
Gerinnungsfaktor mit pathologisch erhöhter Aktivität

GF	II (n=23)	V (n=23)	VII (n=19)	VIII (n=10)	IX (n=10)	X (n=23)	XI (n=10)	XII (n=23)	XIII↑ (n=23)	XIII↓ (n=23)
p	0,108	1,000	0,486	-	1,000	0,346	1,000	0,233	0,346	1,000



Gerinnungsfaktor mit pathologisch erhöhter Aktivität

GF	II (n=9)	V (n=9)	VII (n=9)	VIII (n=9)	IX (n=9)	X (n=9)	XI (n=9)	XII (n=9)	XIII↑ (n=9)	XIII↓ (n=9)
p	1,000	1,000	1,000	1,000	0,637	-	1,000	-	0,206	0,082

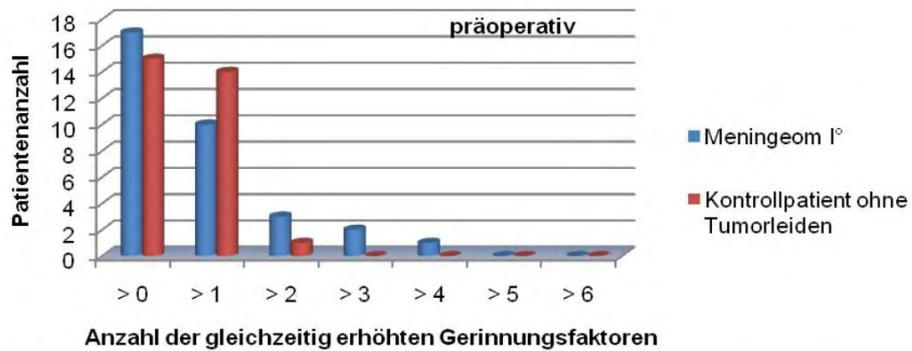


Gerinnungsfaktor mit pathologisch erhöhter Aktivität

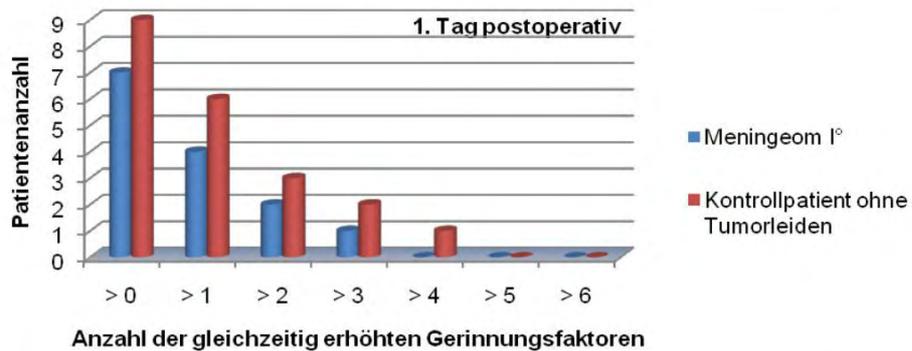
GF	II (n=9)	V (n=9)	VII (n=9)	VIII (n=9)	IX (n=9)	X (n=9)	XI (n=9)	XII (n=9)	XIII↑ (n=9)	XIII↓ (n=9)
p	0,153	0,576	0,620	0,153	<b>0,002</b>	1,000	1,000	-	0,206	0,082

**Abb. 27** Darstellung der Patientenzahlen, die im venösen Blut einen Gerinnungsfaktor mit pathologisch erhöhter Aktivität aufweisen (oben: präoperativ, Mitte: erster postoperativer Tag, unten: vierter postoperativer Tag). n=Patientenzahl je Gruppe. Die signifikanten Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet.

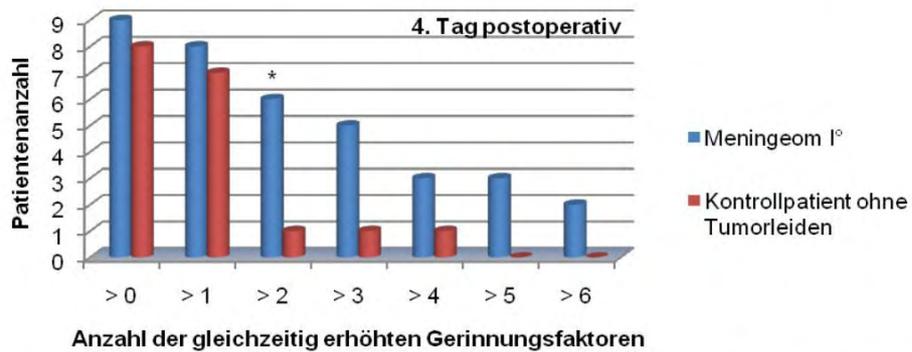
Multiple Erhöhungen der Gerinnungsfaktoren in beiden Patientengruppen



Anzahl pathologisch erhöhter GF	>0	>1	>2	>3	>4	>5	>6
p	0,749	0,376	0,608	0,489	1,000	-	-



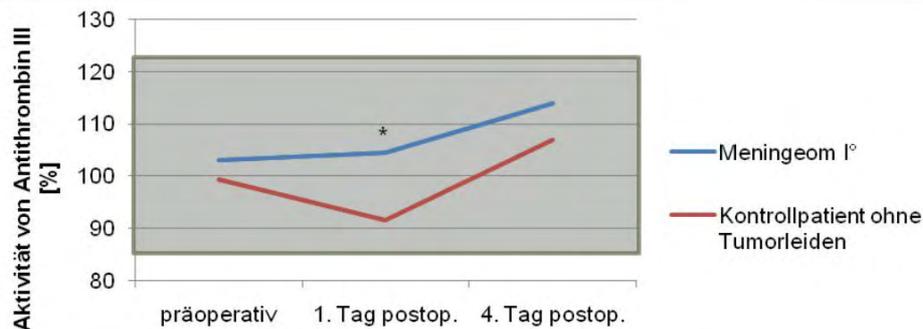
Anzahl pathologisch erhöhter GF	>0	>1	>2	>3	>4	>5	>6
p	0,471	0,637	1,000	1,000	1,000	-	-



Anzahl pathologisch erhöhter GF	>0	>1	>2	>3	>4	>5	>6
p	1,000	1,000	0,050	0,131	0,576	0,206	0,471

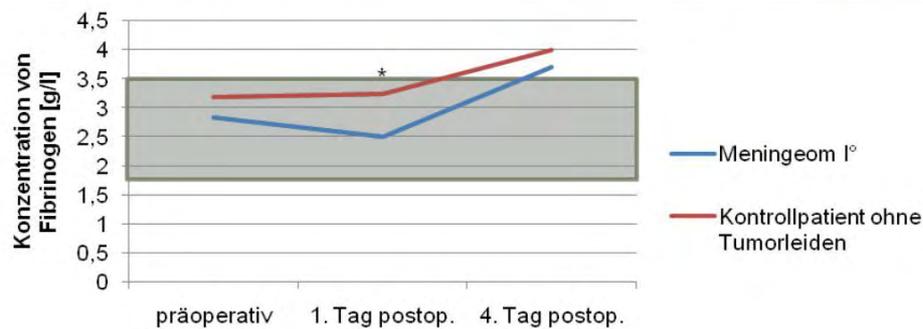
**Abb. 28** Vergleich der Patientenanzahlen, welche mehrere Gerinnungsfaktoren gleichzeitig in pathologisch erhöhter Aktivität aufweisen (oben: präoperativ, n=23; Mitte: erster postoperativer Tag, n=9; unten: vierter postoperativer Tag, n=9). n=Patientenanzahl je Gruppe. Signifikante Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet.

AT III, Fibrinogen sowie D-Dimere bei Patienten mit einem Meningeom I° und Kontrollpatienten



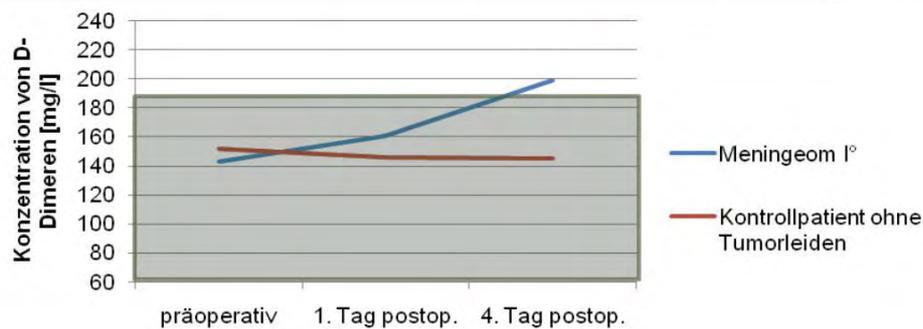
zeitlicher Verlauf

Antithrombin III	präoperativ (n=14)		1. Tag postoperativ (n=14)		4. Tag postoperativ (n=14)	
mittlere Aktivität [%]	103,00	99,29	104,50	91,57	113,93	106,93
s	11,70	11,68	12,94	13,53	10,58	11,86
p	0,474		<b>0,021</b>		0,059	



zeitlicher Verlauf

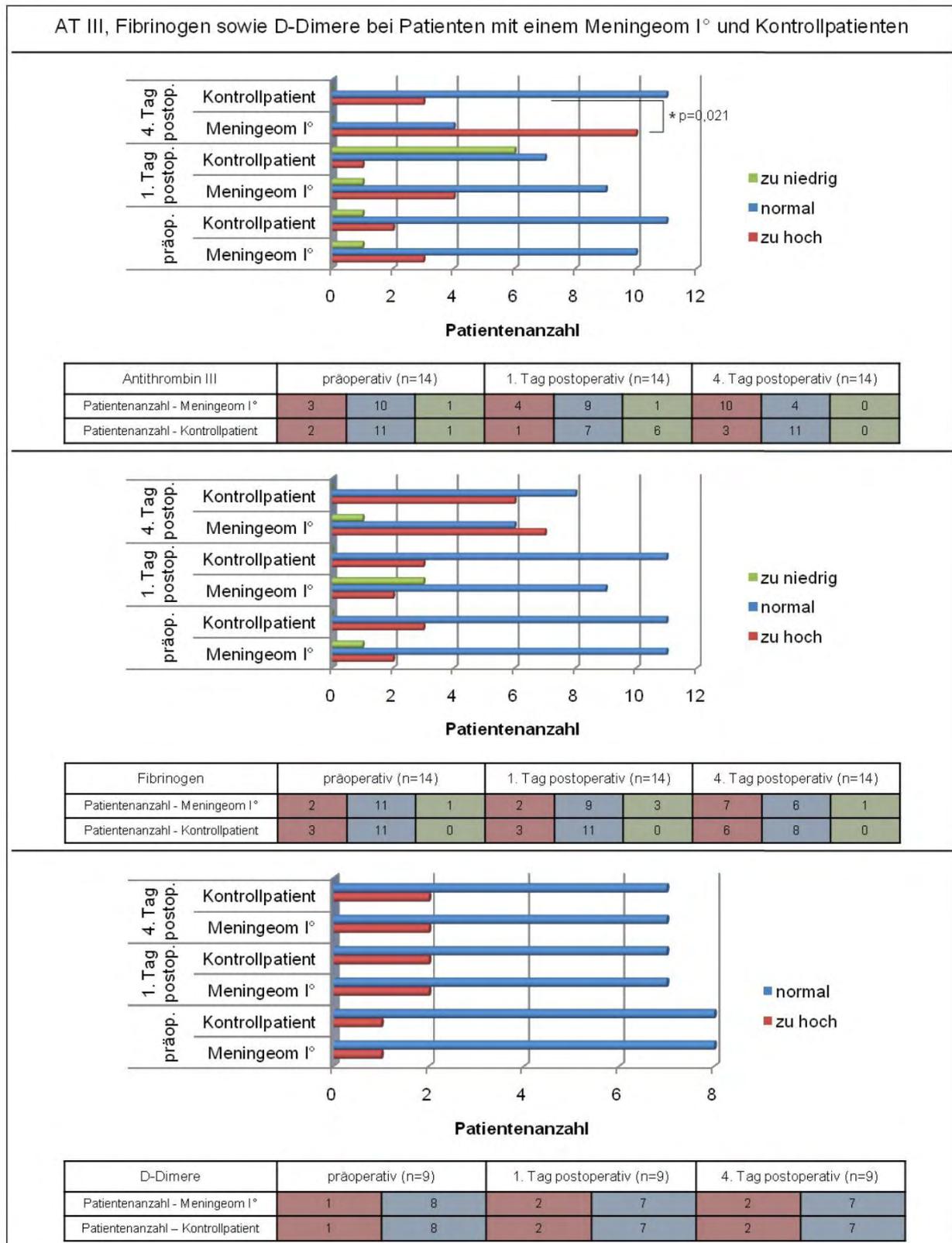
Fibrinogen	präoperativ (n=14)		1. Tag postoperativ (n=14)		4. Tag postoperativ (n=14)	
mittlere Konzentration [g/l]	2,85	3,19	2,51	3,24	3,71	4,01
s	0,72	0,79	0,79	0,77	1,14	1,88
p	0,381		<b>0,045</b>		0,883	



zeitlicher Verlauf

D-Dimere	präoperativ (n=9)		1. Tag postoperativ (n=9)		4. Tag postoperativ (n=9)	
mittlere Konzentration [mg/l]	143,11	151,56	160,89	145,67	198,89	145,11
s	49,28	73,67	46,83	74,27	125,17	88,57
p	0,730		0,546		0,399	

**Abb. 29** Auswertung der anderen das Gerinnungssystem beeinflussenden Werte bei Patienten mit einem Meningeom WHO I° sowie Kontrollpatienten (oben: Aktivität von Antithrombin III, Mitte: Konzentration an Fibrinogen, unten: Konzentration an D-Dimeren). n=Patientenanzahl je Gruppe, s=Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet. Die hellblau unterlegten Diagrammfelder markieren die jeweiligen Normbereiche.



**Abb. 30** Auswertung der anderen das Gerinnungssystem beeinflussenden Werte bei Patienten mit einem Meningeom WHO I° sowie Kontrollpatienten in Bezug auf die entsprechenden Referenzbereiche (oben: Aktivität von Antithrombin III, Mitte: Konzentration an Fibrinogen, unten: Konzentration an D-Dimeren). n=Patientenanzahl je Gruppe.  
Beachte: Signifikant häufiger (\*) pathologisch erhöhte mittlere Aktivitätswerte bei den Patienten mit einem Meningeom WHO I° am vierten postoperativen Tag im Vergleich zu den Kontrollpatienten.

## 5.6. Vergleich der systemischen Gerinnungsparameter von Patienten mit einer intrazerebralen Karzinometastase und Kontrollpatienten

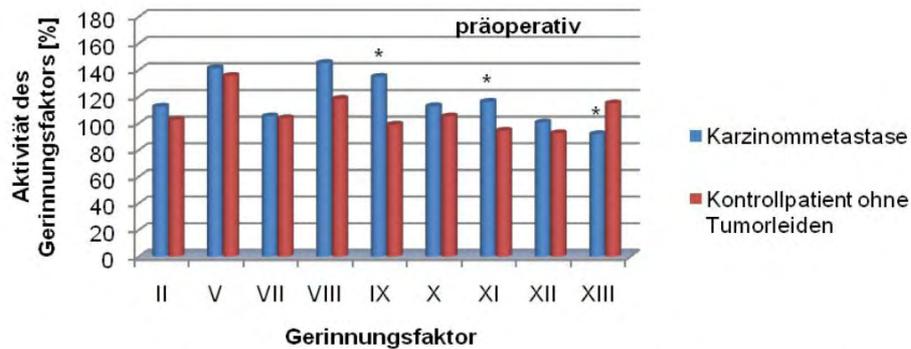
### Vergleich der absoluten Aktivitätswerte der Gerinnungsfaktoren ohne Bewertung der Normgrenzen

Patienten mit einer intrazerebralen Karzinometastase weisen verglichen mit den Kontrollpatienten präoperativ höhere mittlere Aktivitäten aller Gerinnungsfaktoren auf – den Faktor XIII ausgenommen. Dabei liegt die mittlere Aktivität des Faktors IX mit 134,97 % signifikant über der mit 99,11 % bei den Kontrollpatienten ( $p=0,011$ ). Der Faktor XI besitzt bei den Karzinompatienten eine mittlere Aktivität von 116,29 % und liegt damit ebenfalls in signifikant erhöhter mittlerer Aktivität gegenüber der des Faktors XI der Kontrollpatienten von 94,57 % vor ( $p=0,034$ ). Die Aktivität des Faktors XIII hingegen beträgt bei den Tumorpatienten im Mittel nur 92,01 %, bei den Kontrollpatienten dagegen 115,07 %, so dass sich ein signifikanter Unterschied von  $p=0,011$  ergibt. Am ersten postoperativen Tag kommt es zur Annäherung der Aktivitätswerte beider Patientengruppen. Tendenziell weisen die Karzinompatienten höhere Aktivitäten der Faktoren II und VIII bis XII auf. Wiederum liegt der Faktor XIII mit 59,20 % bei den Tumorpatienten in signifikant niedriger mittlerer Aktivität gegenüber der von 106,88 % bei den Kontrollpatienten vor ( $p=0,032$ ). Auch am vierten postoperativen Tag finden sich signifikante Unterschiede in der mittleren Aktivität des Faktors XIII. Diese beträgt bei den Patienten mit einer Karzinometastase 58,38 % und ist somit signifikant niedriger als die mittlere Aktivität von 104,59 % der Kontrollpatienten ( $p=0,008$ ). Ferner sind es erneut die Tumorpatienten, die verglichen mit der Kontrollgruppe tendenziell höhere Aktivitäten der Faktoren II sowie VIII bis XI aufweisen (**Abb. 31**).

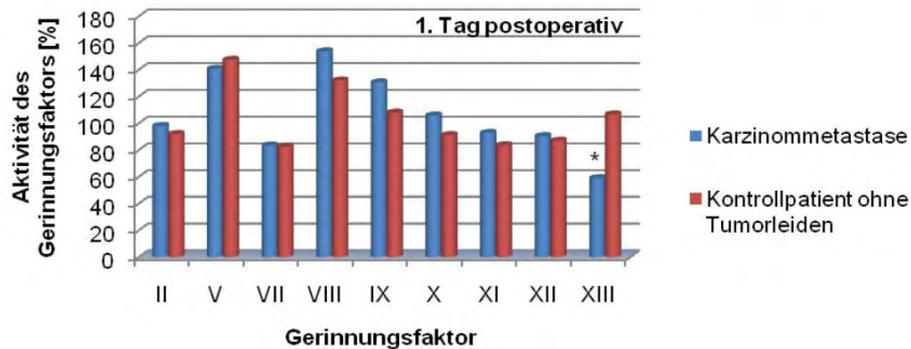
### Über die obere Normgrenze hinaus pathologisch erhöhte Aktivitätswerte einzelner Gerinnungsfaktoren

Gerinnungsfaktoren mit pathologisch erhöhter Aktivität sind tendenziell öfter bei Patienten mit einer intrazerebralen Karzinometastase nachweisbar als bei Kontrollpatienten. Es fällt jedoch auch auf, dass sich besonders postoperativ bei der Mehrheit der Karzinompatienten eine pathologisch erniedrigte Aktivität des Gerinnungsfaktors XIII zeigt.

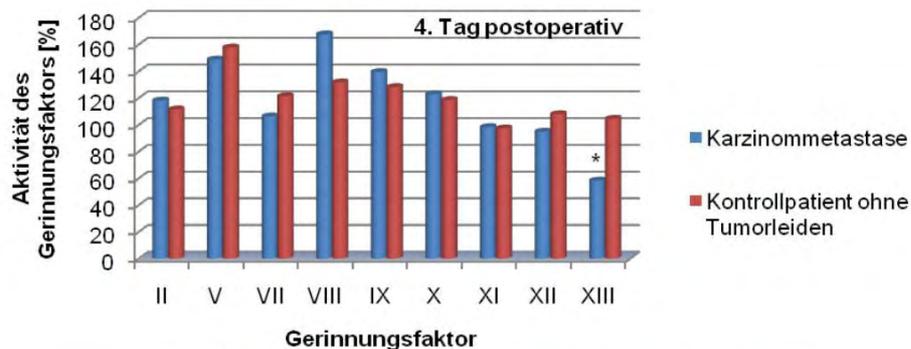
Aktivität der Gerinnungsfaktoren bei Patienten mit einer Karzinommetastase und Kontrollpatienten



GF	II (n=26)		V (n=26)		VII (n=21)		VIII (n=7)		IX (n=7)		X (n=26)		XI (n=7)		XII (n=26)		XIII (n=26)	
mittlere Aktivität [%]	112,81	102,85	141,53	135,89	105,33	103,90	145,43	118,53	134,97	99,11	112,88	105,35	116,29	94,57	100,69	92,69	92,01	115,07
s	18,54	12,91	15,36	15,04	19,14	17,62	39,90	41,49	26,56	9,05	17,15	17,32	18,55	17,35	25,46	24,65	18,10	32,13
p	0,067		0,321		0,837		0,259		<b>0,011</b>		0,207		<b>0,034</b>		0,481		<b>0,011</b>	



GF	II (n=5)		V (n=5)		VII (n=5)		VIII (n=5)		IX (n=5)		X (n=5)		XI (n=5)		XII (n=5)		XIII (n=5)	
mittlere Aktivität [%]	98,20	92,20	140,89	147,61	83,60	82,60	154,00	132,16	130,78	108,16	106,00	91,40	93,00	83,80	90,60	87,20	59,20	106,88
s	17,43	16,54	26,69	14,10	16,71	24,91	30,04	29,61	2,15	19,86	17,16	11,89	9,77	18,75	20,27	11,86	21,30	33,41
p	0,730		0,690		1,000		0,310		0,151		0,151		0,643		0,405		<b>0,032</b>	



GF	II (n=5)		V (n=5)		VII (n=5)		VIII (n=5)		IX (n=5)		X (n=5)		XI (n=5)		XII (n=5)		XIII (n=5)	
mittlere Aktivität [%]	118,20	111,60	148,86	157,86	106,40	121,46	167,69	131,80	139,54	128,28	123,00	118,66	98,40	97,40	95,00	108,00	58,38	104,59
s	18,99	17,44	26,84	21,30	7,23	51,72	47,41	21,47	10,36	9,00	17,15	15,56	14,05	23,61	13,04	19,42	10,71	36,16
p	0,690		0,524		0,683		0,167		0,143		0,841		1,000		0,500		<b>0,008</b>	

**Abb. 31** Darstellung der mittleren Aktivitäten der gemessenen Gerinnungsfaktoren bei Patienten mit einer intrazerebralen Karzinommetastase und Kontrollpatienten (oben: präoperativ, Mitte: erster postoperativer Tag, unten: vierter postoperativer Tag). n=Patientenanzahl je Gruppe, s=Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet.

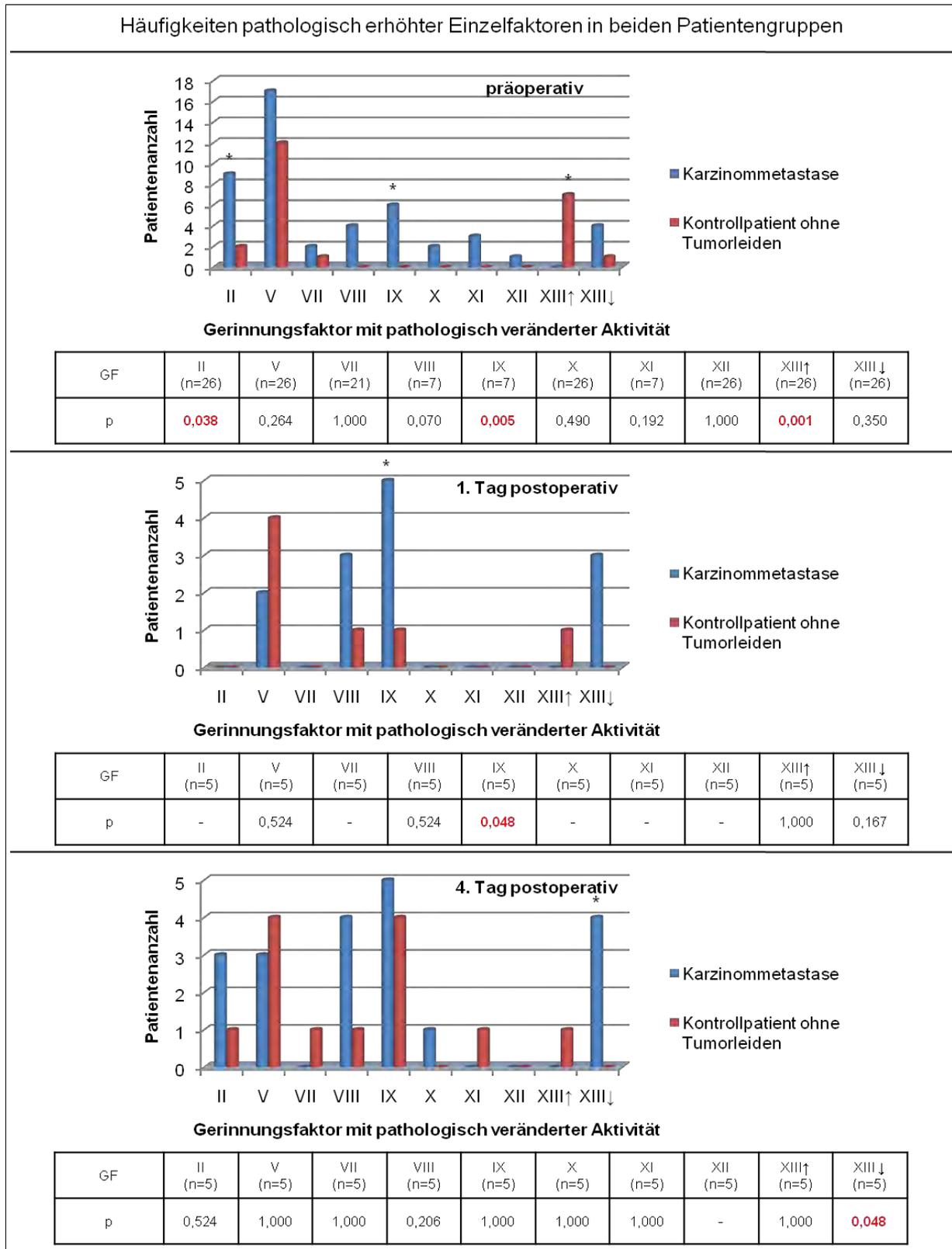
Präoperativ sind bei den Patienten mit einer Karzinometastase signifikant häufiger pathologisch erhöhte Aktivitätswerte für die Faktoren II und IX zu beobachten ( $p=0,038$  für den Faktor II beziehungsweise  $p=0,005$  für den Faktor IX). Der Faktor XIII liegt bei den Tumorpatienten dagegen signifikant häufiger in pathologisch erniedrigter Aktivität vor ( $p=0,001$ ). Am ersten postoperativen Tag findet sich bei signifikant mehr Karzinompatienten eine pathologisch erhöhte Aktivität des Faktors IX ( $p=0,048$ ). Weitere drei Tage später zeigen beide Patientengruppen insgesamt mehr Gerinnungsfaktoren mit gesteigerter Aktivität als am ersten postoperativen Tag. Dessen ungeachtet lässt sich für vier von fünf Karzinompatienten eine pathologisch erniedrigte Aktivität für den Faktor XIII nachweisen, so dass sich im Vergleich mit den Kontrollpatienten ein signifikanter Unterschied von  $p=0,048$  ergibt (**Abb. 32**).

#### Über die obere Normgrenze hinaus pathologische Erhöhungen der Aktivitätswerte von multiplen Gerinnungsfaktoren

Bei der Auswertung multipel pathologisch erhöhter Gerinnungsfaktor-Aktivitäten lassen sich besonders präoperativ Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen beobachten. So weisen die Patienten mit einer intrazerebralen Karzinometastase vor dem operativen Eingriff stets häufiger gleichzeitig multiple Faktoren auf, die in pathologisch erhöhter Aktivität vorliegen. Mehr als zwei pathologisch hoch aktivierte Faktoren sind präoperativ signifikant häufiger bei den Tumorpatienten als in der Kontrollgruppe messbar ( $p=0,010$ ). Am ersten und vierten postoperativen Tag nähern sich die Werte beider Gruppen aneinander an, so dass keine signifikante Aussage hinsichtlich der multipel pathologisch erhöhten Gerinnungsfaktor-Aktivitäten getroffen werden kann (**Abb. 33**).

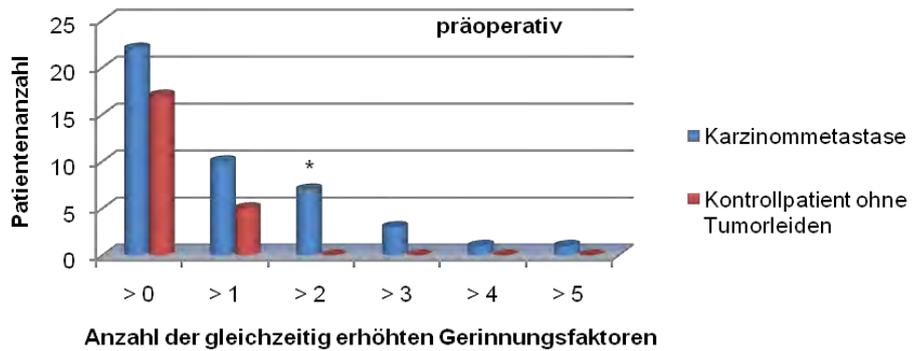
#### Antithrombin III, Fibrinogen und D-Dimere

Ähnlich der Patienten mit primären Hirntumoren zeigen auch die Patienten mit einer intrazerebralen Karzinometastase deutlich höhere Aktivitäten von Antithrombin III im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die gemessenen mittleren Aktivitäten betragen präoperativ 111,78 %, am ersten postoperativen Tag 110,78 % und am vierten postoperativen Tag 116,00 %. Damit liegen sie zu den letzten beiden Messzeiten signifikant über denen der Kontrollpatienten ( $p=0,013$  am ersten postoperativen Tag und  $p=0,028$  am vierten postoperativen Tag).

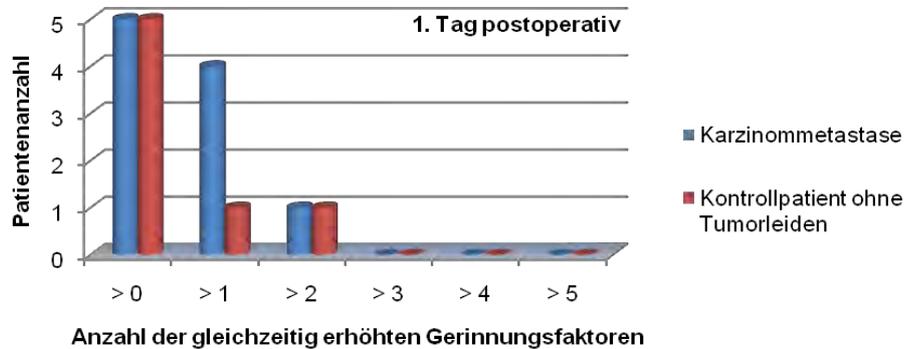


**Abb. 32** Darstellung der Patientenzahlen, die im venösen Blut einen Gerinnungsfaktor mit pathologisch erhöhter Aktivität aufweisen (oben: präoperativ, Mitte: erster postoperativer Tag, unten: vierter postoperativer Tag). n=Patientenzahl je Gruppe. Die signifikanten Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet.

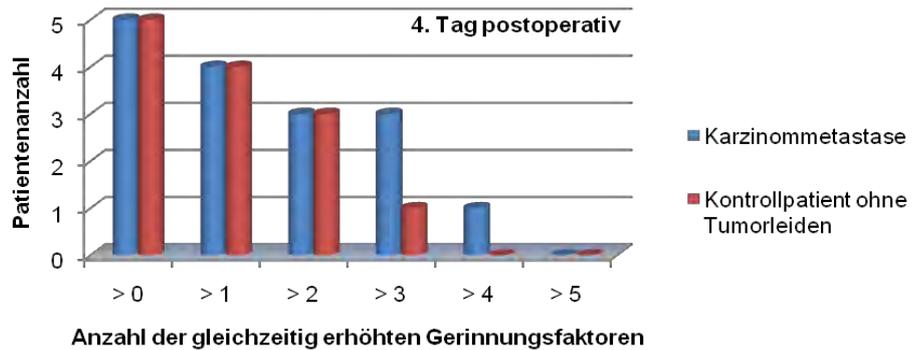
Multiple Erhöhungen der Gerinnungsfaktoren in beiden Patientengruppen



Anzahl pathologisch erhöhter GF	> 0	> 1	> 2	> 3	> 4	> 5
p	0,199	0,220	0,010	0,235	1,000	1,000



Anzahl pathologisch erhöhter GF	> 0	> 1	> 2	> 3	> 4	> 5
p	-	0,206	1,000	-	-	-

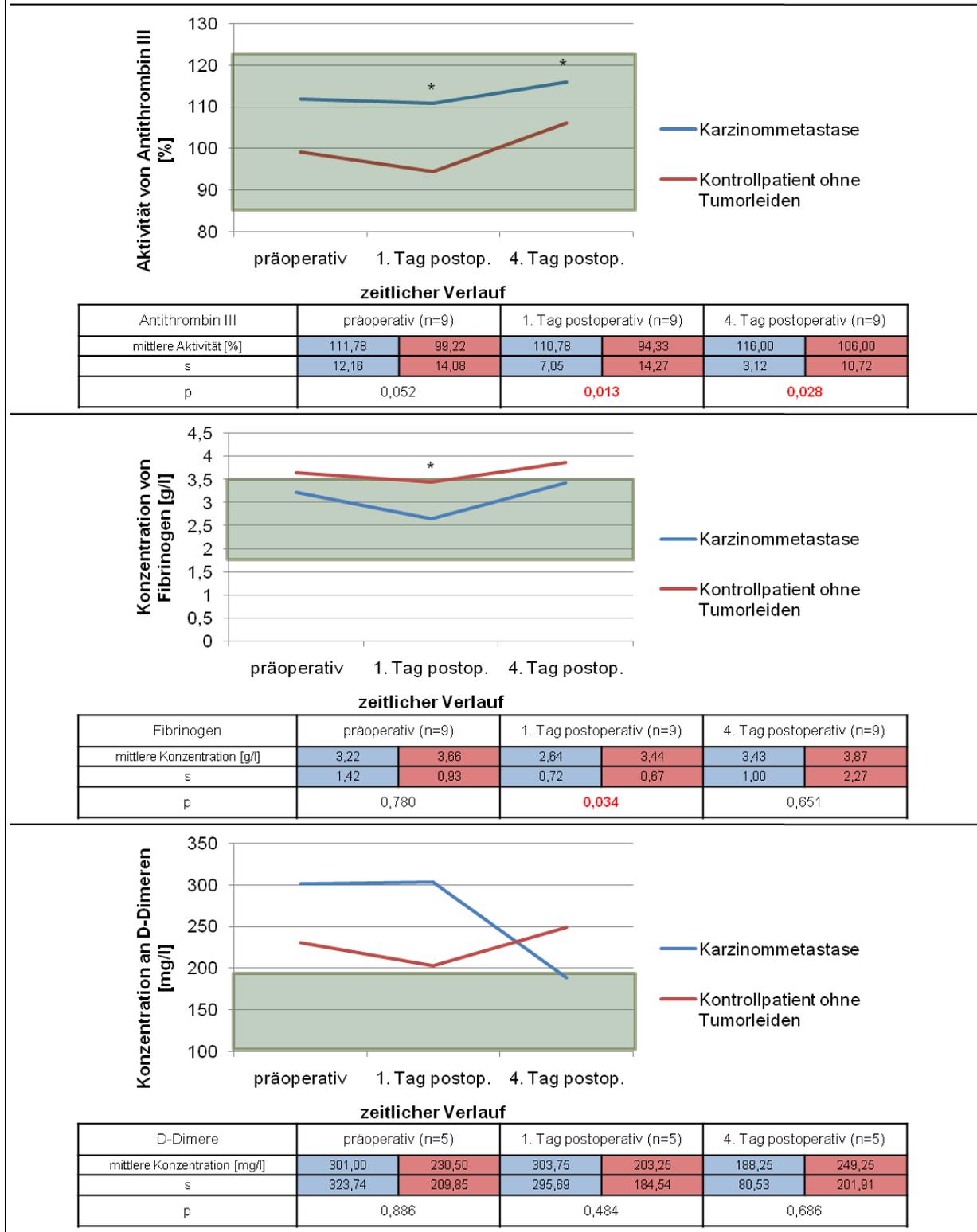


Anzahl pathologisch erhöhter GF	> 0	> 1	> 2	> 3	> 4	> 5
p	-	1,000	1,000	0,524	1,000	-

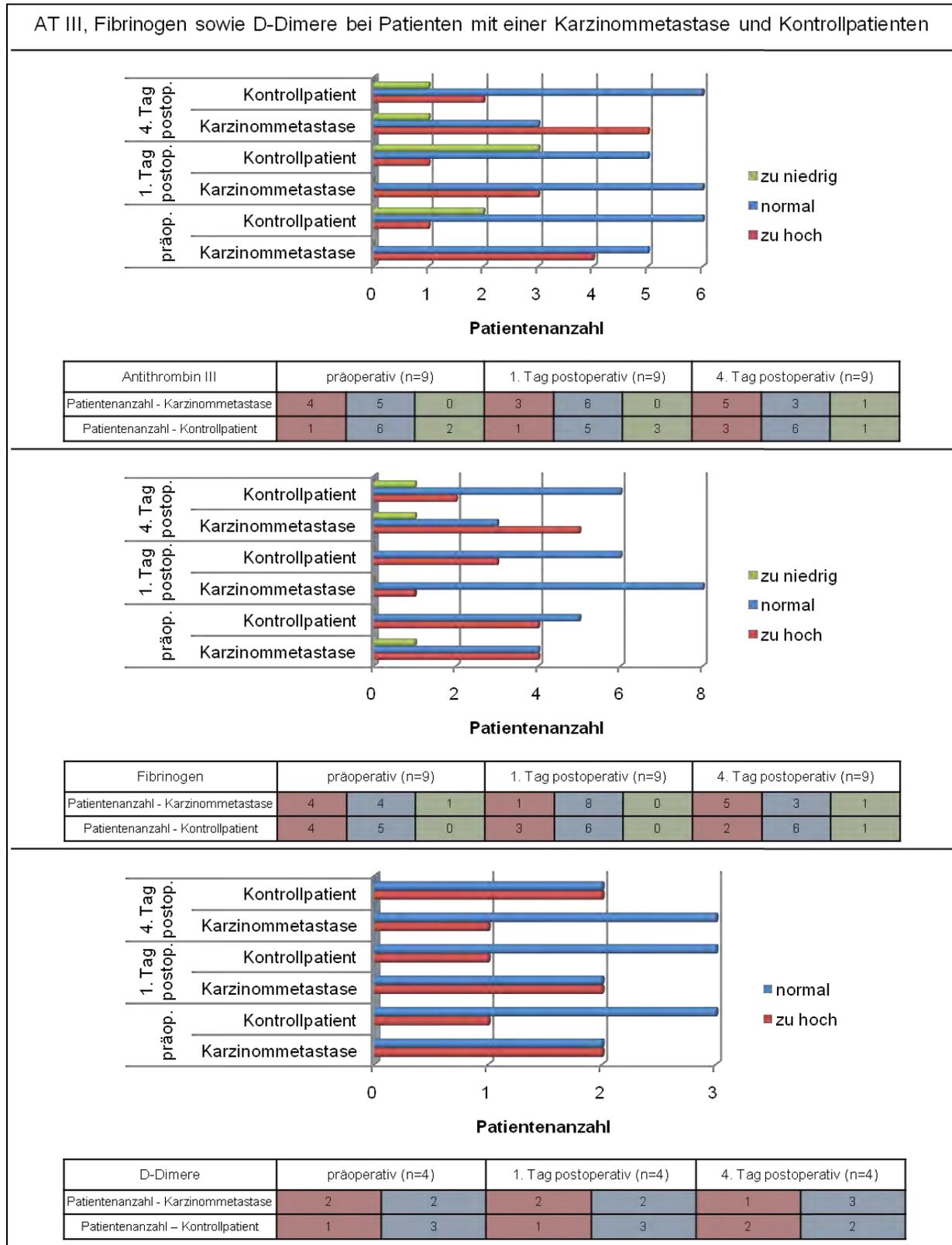
**Abb. 33** Vergleich der Patientenanzahlen, welche mehrere Gerinnungsfaktoren gleichzeitig in pathologisch erhöhter Aktivität aufweisen (oben: präoperativ, n=26; Mitte: erster postoperative Tag, n=5; unten: vierter postoperative Tag, n=5). n=Patientenanzahl je Gruppe. Die signifikanten Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet.

Außerdem sind bei den Tumorpatienten zu allen drei Messzeiten häufiger über die obere Normgrenze hinaus erhöhte Aktivitätswerte für Antithrombin III nachweisbar als bei den Kontrollpatienten (**Abb. 35**). Die mittleren Konzentrationen von Fibrinogen sind bei den Patienten mit einer Karzinometastase im Vergleich zu den Kontrollpatienten niedriger. So findet sich am ersten postoperativen Tag mit 2,64 g/l ein signifikant niedriger Mittelwert für die Konzentration von Fibrinogen bei den Karzinompatienten als in der Gruppe der Kontrollpatienten, die einen Mittelwert von 3,44 g/l aufweist ( $p=0,034$ ). Allerdings steigt die mittlere Konzentration für Fibrinogen innerhalb der Gruppe der Karzinompatienten vom ersten bis zum vierten postoperativen Tag signifikant an ( $p=0,043$ ). Hervorstechend in dieser Auswertung sind die bei den Karzinompatienten gemessenen, gegenüber dem Referenzbereich über das anderthalbfach erhöhten mittleren Konzentrationen der D-Dimere am präoperativen und ersten postoperativen Messzeitpunkt. Die Mittelwerte von 301,00 mg/l präoperativ sowie 303,75 mg/l am ersten postoperativen Tag liegen deutlich über dem Normbereich. Der mittlere Wert von 188,25 mg/l des vierten postoperativen Tages liegt gering unter der oberen Grenze des Referenzbereiches. Allerdings sind die Werte nicht signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe (**Abb. 34**).

AT III, Fibrinogen sowie D-Dimere bei Patienten mit einer Karzinometastase und Kontrollpatienten



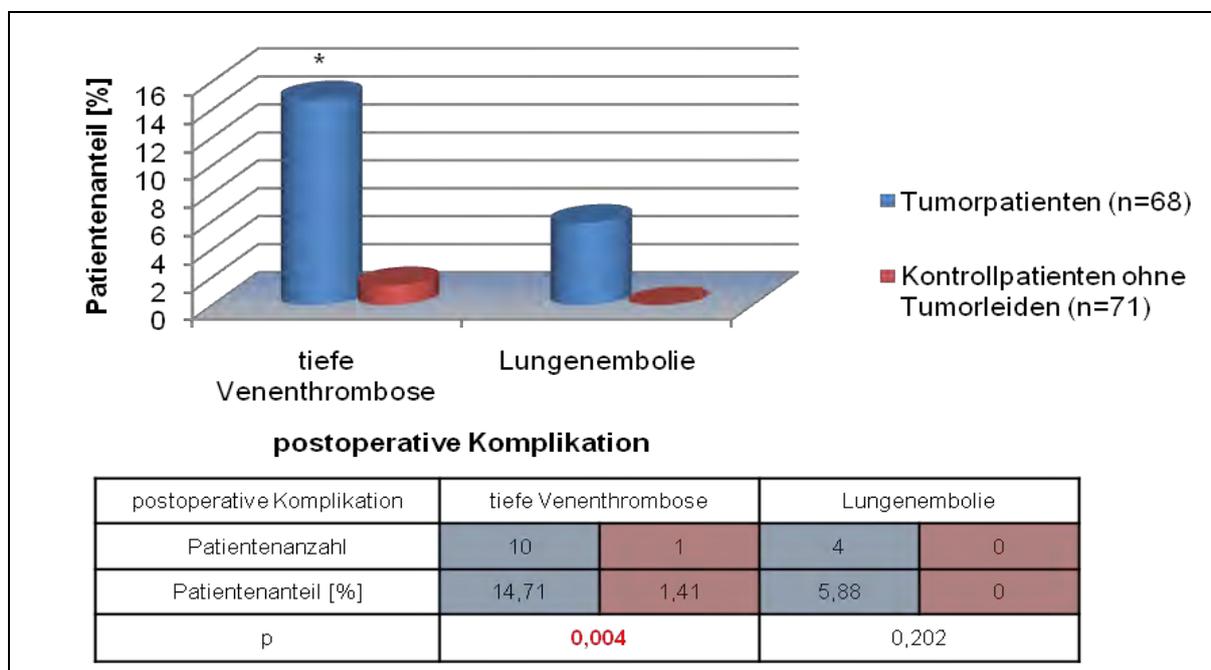
**Abb. 34** Auswertung der anderen das Gerinnungssystem beeinflussenden Werte bei Patienten mit einer intrazerebralen Karzinometastase sowie Kontrollpatienten (oben: Aktivität von Antithrombin III, Mitte: Konzentration an Fibrinogen, unten: Konzentration an D-Dimeren). n=Patientenanzahl je Gruppe, s=Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet. Die hellblau unterlegten Diagrammfelder markieren die jeweiligen Normbereiche.



**Abb. 35** Auswertung der anderen das Gerinnungssystem beeinflussenden Werte bei Patienten mit einer intrazerebralen Karzinommetastase sowie Kontrollpatienten in Bezug auf die entsprechenden Referenzbereiche (oben: Aktivität von Antithrombin III, Mitte: Konzentration an Fibrinogen, unten: Konzentration an D-Dimeren). n=Patientenanzahl je Gruppe.

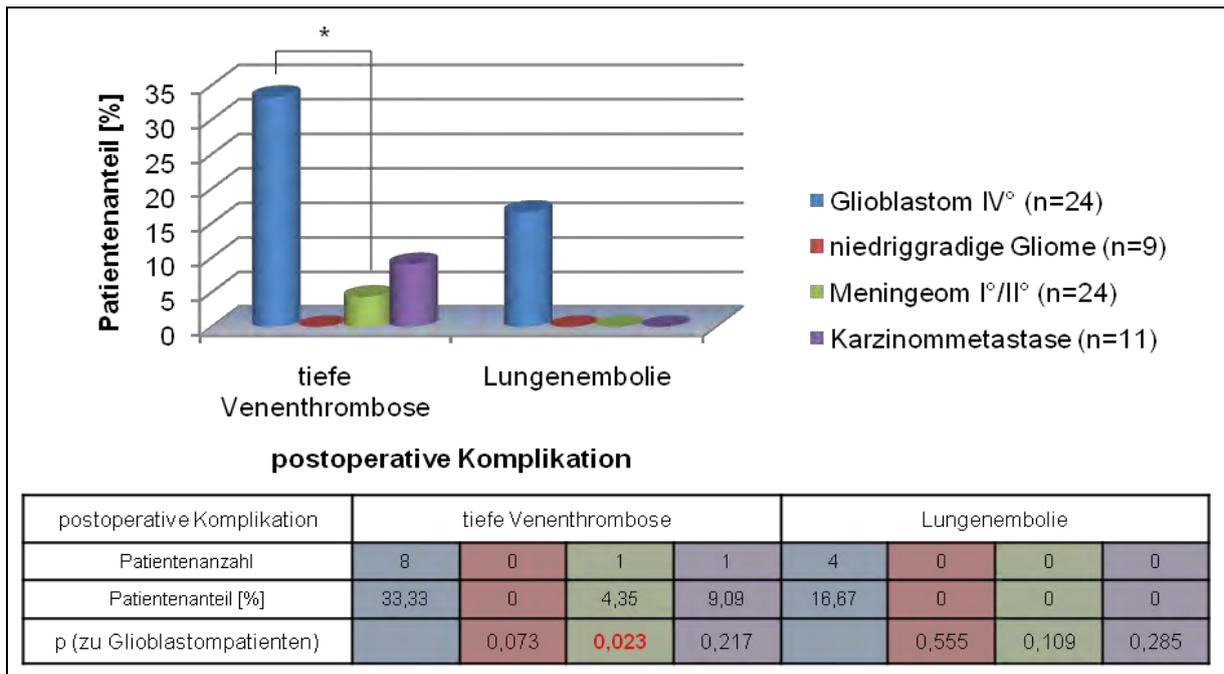
### 5.7. Thrombembolische Komplikationen im postoperativen Zeitraum

Die Patienten, die wegen eines intrakraniellen Tumors operiert wurden, erlitten häufiger thrombembolische Komplikationen als die neurochirurgischen Kontrollpatienten, die sich ebenfalls einer Operation unterzogen hatten. So wurde im postoperativen Zeitraum bei 14,71 % aller Tumorpatienten und damit signifikant häufiger als bei den Kontrollpatienten eine tiefe Beinvenenthrombose diagnostiziert ( $p=0,004$ ). 5,88 % der Tumorpatienten und keiner der Kontrollpatienten entwickelten daraufhin eine klinisch manifeste Lungenembolie (**Abb. 36**).



**Abb. 36** Vergleich der Patientenanteile, bei denen im postoperativen Zeitraum eine tiefe Venenthrombose beziehungsweise infolgedessen eine Lungenembolie diagnostiziert wurde.  $n$ =Patientenanzahl je Gruppe. Signifikante Unterschiede sind durch rot markierte  $p$ -Werte gekennzeichnet.

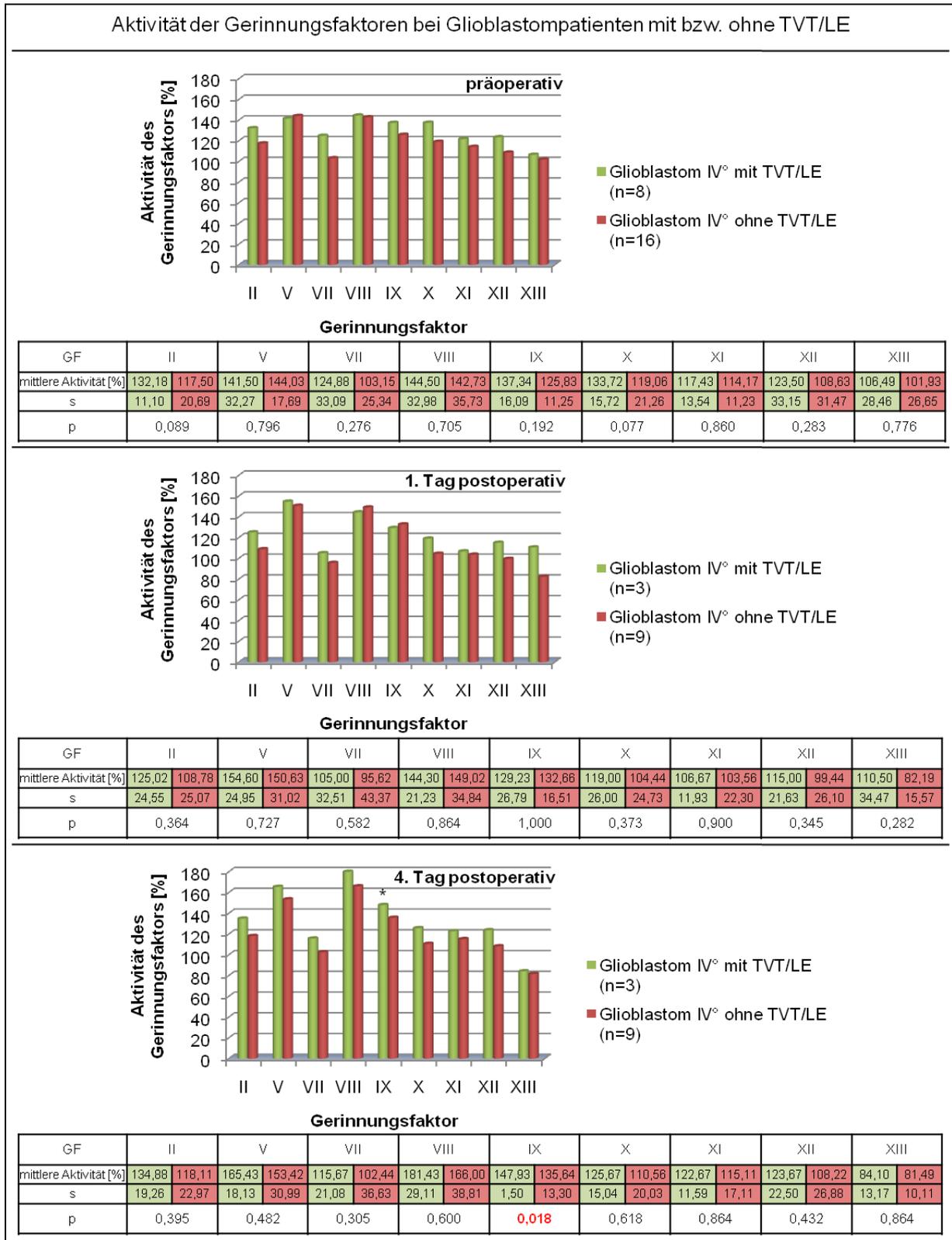
Die meisten thrombembolischen Komplikationen traten bei Patienten mit einem Glioblastom WHO IV° auf. Während bei 33,33 % der Glioblastompatienten eine klinisch manifeste tiefe Beinvenenthrombose und bei 16,67 % eine Lungenembolie diagnostiziert wurde, zeigten sich bei 4,35 % der Patienten mit einem Meningeom WHO I°/II° und bei 9,09 % der Patienten mit einer Karzinommetastase eine Thrombose, jedoch keine Lungenembolie. Damit weisen Glioblastompatienten postoperativ signifikant häufiger relevante thrombembolische Komplikationen auf im Vergleich zu Patienten mit einem Meningeom WHO I° und II° ( $p=0,023$ ) (**Abb. 37**).



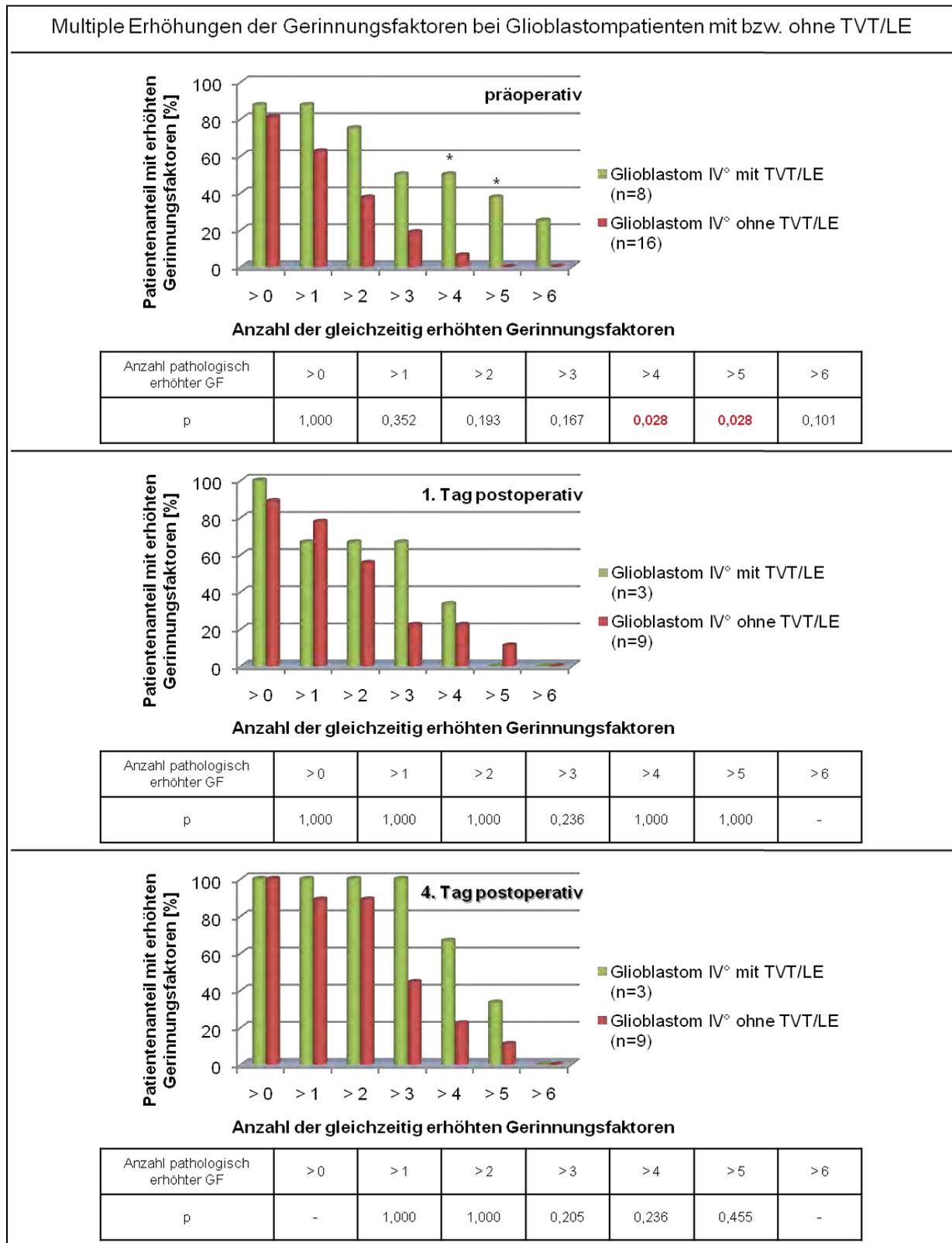
**Abb. 37** Darstellung der Patientenanteile der untersuchten Tumorentitäten, bei denen postoperativ eine thrombembolische Komplikation auftrat. n=Patientenanzahl je Gruppe. Die signifikanten Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet.

Bei den Glioblastompatienten, bei denen im postoperativen Verlauf ein thrombembolisches Geschehen auftrat, wurden perioperativ meist höhere Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren gemessen als bei denjenigen ohne thrombembolische Komplikation. Bereits präoperativ zeigen die Glioblastompatienten mit postoperativen Thrombosen tendenziell höhere Aktivitäten der Faktoren II sowie VII - XIII. Auch am ersten postoperativen Tag sind höhere Aktivitäten der Faktoren II, V, VII sowie X - XIII nachweisbar. Am vierten postoperativen Tag zeigen sich bei den Glioblastompatienten mit postoperativer tiefer Venenthrombose schließlich eine signifikant höhere Aktivität des Faktors IX ( $p=0,018$ ) sowie tendenziell höhere Werte für alle übrigen gemessenen Gerinnungsfaktor-Aktivitäten (**Abb. 38**).

Neben höheren Gerinnungsfaktor-Aktivitäten weisen die Glioblastompatienten mit thrombembolischen Komplikationen zudem häufiger pathologisch erhöhte Aktivitäten multipler Gerinnungsfaktoren auf. Schon vor dem operativen Eingriff liegen bei signifikant mehr Patienten mit einer thrombembolischen Komplikation mehr als vier sowie mehr als fünf pathologisch erhöhte Aktivitätswerte von Gerinnungsfaktoren gleichzeitig vor ( $p=$  jeweils 0,028). Auch postoperativ zeigen sich bei den Tumorpatienten, die im weiteren Verlauf eine Thrombose entwickelten, deutlich mehr Gerinnungsfaktoren gleichzeitig in pathologisch erhöhter Aktivität als bei denjenigen Patienten ohne diese Komplikation (**Abb. 39**).



**Abb. 38** Darstellung der mittleren Aktivitäten der gemessenen Gerinnungsfaktoren bei Glioblastompatienten mit beziehungsweise ohne thrombembolische Komplikation im postoperativen Zeitraum (oben: Gerinnungsfaktoren präoperativ, Mitte: erster postoperativer Tag, unten: vierter postoperativer Tag). n=Patientenanzahl je Gruppe, s=Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet.



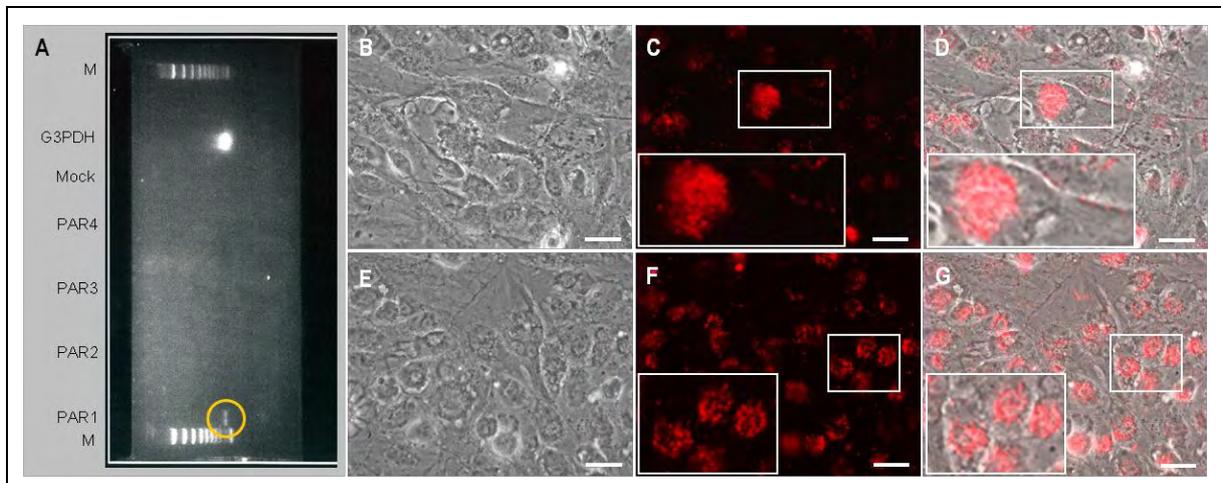
**Abb. 39** Vergleich der Patientenzahlen, welche mehrere Gerinnungsfaktoren gleichzeitig in pathologisch erhöhter Aktivität aufweisen (oben: präoperativ, Mitte: erster postoperativer Tag, unten: vierter postoperativer Tag). n=Patientenzahl je Gruppe. Signifikante Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet.

## 5.8. Gesamtüberleben der Hirntumorpatienten

Eine Korrelation der ermittelten Gerinnungswerte mit dem Gesamtüberleben der Hirntumorpatienten konnte in dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Aufgrund der verschiedenen therapeutischen Strategien (Stereotaxie/offene Probenentnahme/subtotale Exstirpation/makroskopisch totale Exstirpation) sowie einer individuell durchgeführten adjuvanten Chemotherapie entstehen zu kleine Patientengruppen für eine hinreichende statistische Auswertung.

## 5.9. Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion

Humane Glioblastomzellen exprimieren mRNA für den Protease-aktivierten Rezeptor Typ 1. Messenger RNA für die Typen 2 - 4 wird nicht exprimiert. Das PCR-Produkt zeigt sich in Bezug auf den daneben aufgetragenen Marker mit einer Länge von 592 bp an (**Abb. 40 A**).



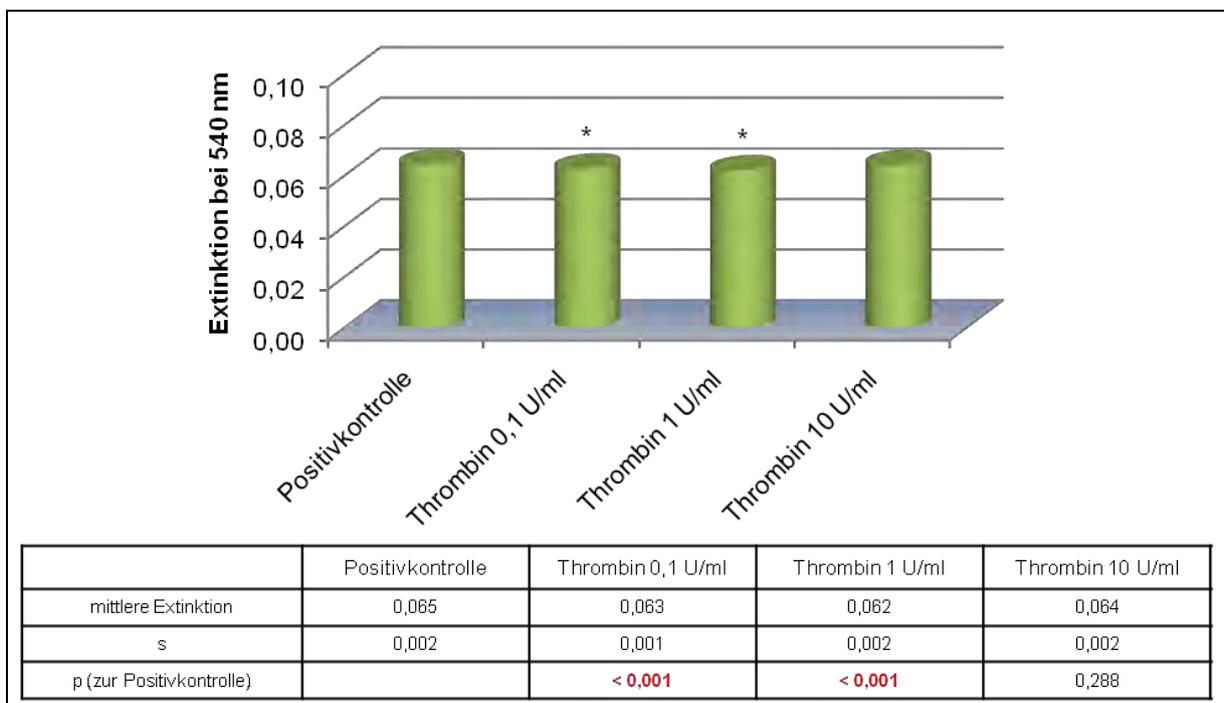
**Abb. 40** (A) zeigt die RT-PCR mit der entsprechenden Bande des PAR1-Rezeptors, die mit einem gelben Kreis umrahmt ist. (B-D) zeigen eine PAR1-Färbung der U373MG-Glioblastomzellen im lebenden Zustand. (B) stellt die Durchlichtmikroskopie dar. (C) zeigt die Fluoreszenz-gestützte Darstellung der PAR1-Antikörper-Bindung unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 594 nm und (D) veranschaulicht das Fusionsbild beider Aufnahmen. (E-F) zeigt eine zweite Zellkultur, in der ebenfalls U373MG-Glioblastomzellen in lebendem Zustand mit einem PAR1-Antikörper und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper markiert werden. Der Balken entspricht jeweils 20  $\mu\text{m}$ . Die Ausschnittsvergrößerungen sollen die clusterartige Verdichtung der Rezeptorproteine darstellen.

### 5.10. Immunozytochemische Analyse der PAR-Expression in vitro auf lebenden humanen Glioblastomzellen

Fluoreszenzmikroskopisch kann die Expression des Thrombinrezeptors PAR-1 auf der Oberfläche von lebenden humanen Glioblastomzellen der Linie U373MG nachgewiesen werden. Dabei stellt sich der Rezeptor auf den Zellen in typischer Weise in clusterartiger Anordnung dar. Die Protease-aktivierten Rezeptoren Typ 2 - 4 werden durch die Färbung nicht nachgewiesen (**Abb. 40 B-G**).

### 5.11. Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO)

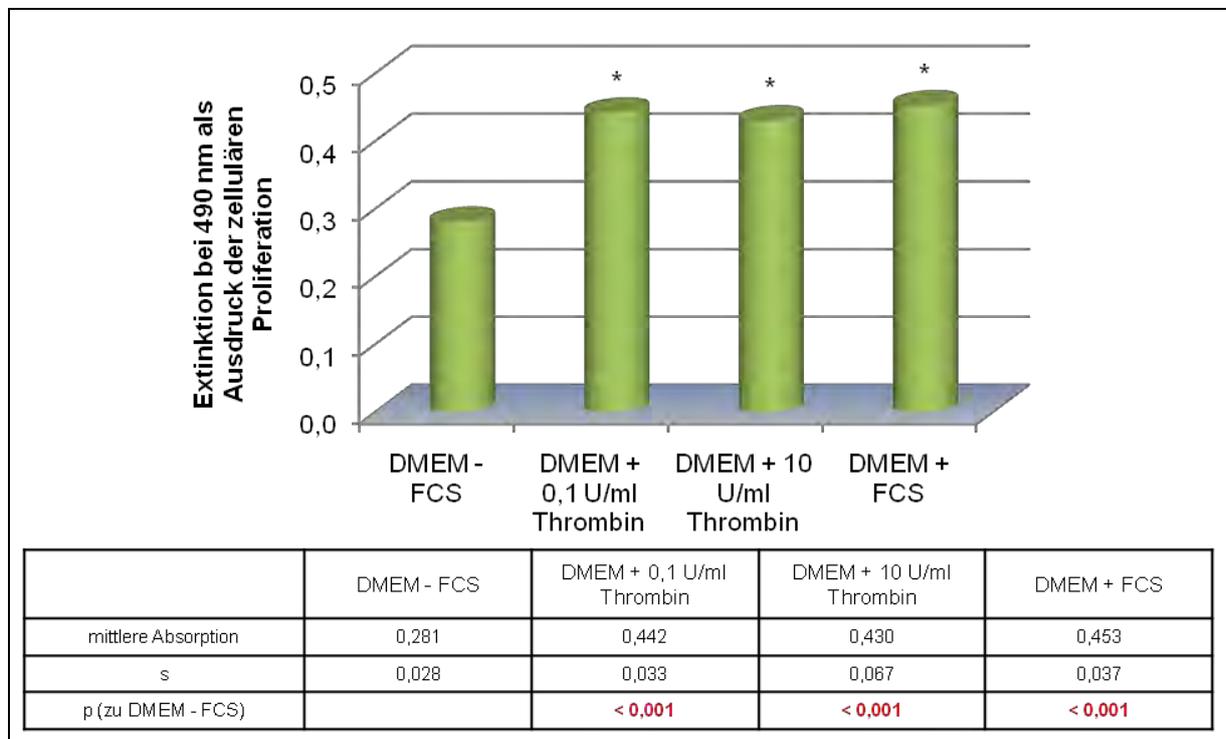
Es findet keine durch Thrombin stimulierte Synthese von Stickstoffmonoxid in humanen Glioblastomzellen der Linie U373MG statt. Die gemessenen Extinktionen der Glioblastomzellen nach Inkubation mit Thrombin in Konzentrationen von 0,1 und 1,0 U/ml ergibt einen signifikanten Abfall der mittleren Extinktion im Vergleich zur Positivkontrolle ( $p$  jeweils  $<0,001$ ), der für eine signifikant geringere NO-Synthese spricht. Auch die Stimulation mit 10 U/ml Thrombin führt zu einem deutlichen aber nicht signifikanten Abfall der mittleren Extinktion und damit der NO-Synthese in den humanen Glioblastomzellen verglichen mit der Positivkontrolle (**Abb. 41**).



**Abb. 41** Extinktionsmessung von humanen Glioblastomzellen der Linie U373MG nach Inkubation dieser mit Thrombin in steigenden Konzentrationen von 0,1; 1,0 und 10,0 U/ml. s=Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet.

### 5.12. Zellproliferationsassay mittels Inkorporation und Detektion von 5'-Bromodeoxyuridin (BrdU)

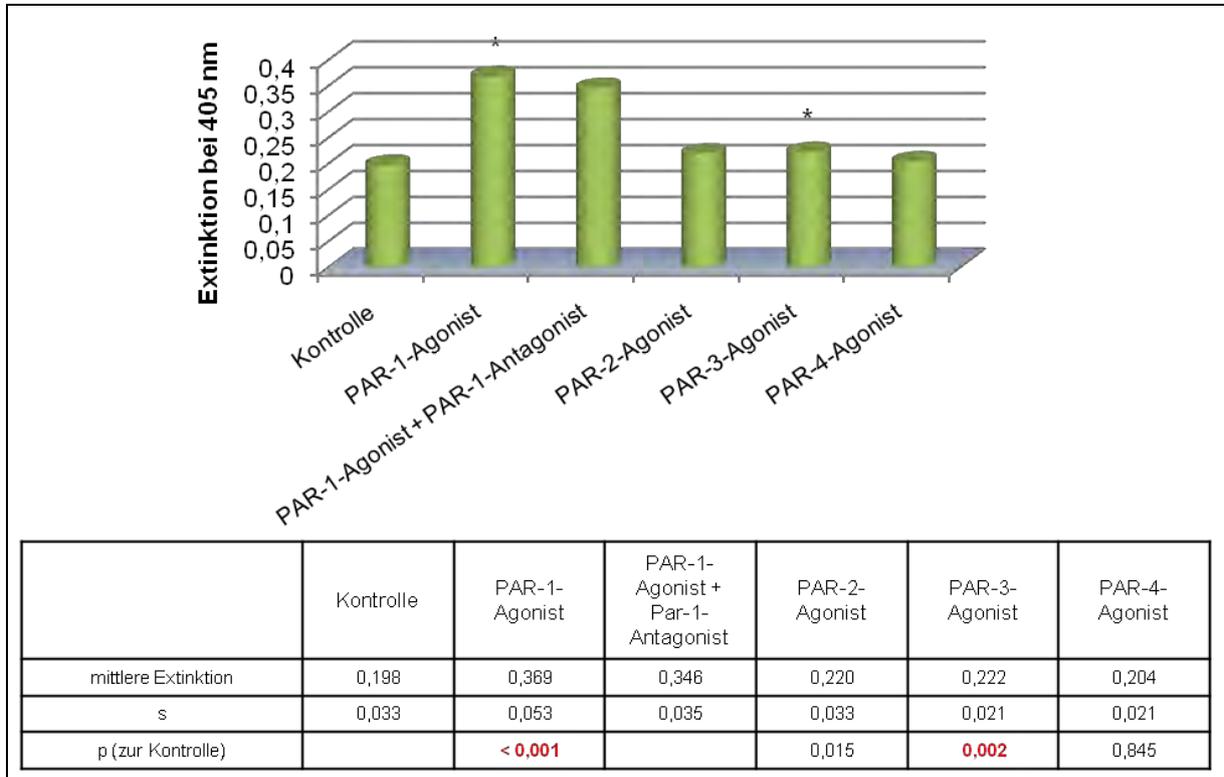
Thrombin verursacht einen signifikanten Anstieg der DNS-Synthese in humanen U373MG Glioblastomzellen. So zeigt sich nach Inkubation der Glioblastomzellen mit 0,1 U/ml Thrombin eine im Vergleich zur Kontrolle (DMEM - FCS) um 57 % höhere Extinktion und damit signifikant gesteigerte DNS-Synthese ( $p < 0,001$ ). Eine gegenüber der Kontrolle um 53 % höhere Extinktion nach Stimulation der Zellen mit 10 U/ml Thrombin weist ebenfalls auf eine signifikant gesteigerte DNS-Synthese in den untersuchten Glioblastomzellen hin ( $p < 0,001$ ) (**Abb. 42**).



**Abb. 42** Extinktionsmessung von humanen Glioblastomzellen der Linie U373MG nach Inkubation dieser ohne FCS (Negativkontrolle), mit Thrombin in Konzentrationen von 0,1 U/ml und 10 U/ml sowie mit FCS (Positivkontrolle). s=Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet.

Im BrdU-Inkorporations- und Detektionsassay kann für den PAR-1-Agonisten (500  $\mu\text{M}$ ) eine hochsignifikant höhere Extinktionsrate und damit DNS-Syntheserate gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden ( $p < 0,001$ ). Der dem PAR-1-Agonisten (500  $\mu\text{M}$ ) zugegebene PAR-1-Antagonist (500  $\mu\text{M}$ ) kann die Extinktion zwar deutlich, jedoch nicht signifikant im Vergleich zur Probe ohne Antagonist hemmen ( $p = 0,089$ ). Eine gegenüber der Kontrolle gering erhöhte mittlere Extinktion

nach Inkubation der humanen Glioblastomzellen mit dem PAR-3-Agonisten ist ebenfalls signifikant im Vergleich zur Kontrolle ( $p=0,002$ ). Dagegen können in dieser Zelllinie keine signifikanten Steigerungen der DNS-Syntheserate durch den PAR-2- oder den PAR-4-Agonisten nachgewiesen werden (**Abb. 43**).



**Abb. 43** Extinktionsmessung von humanen Glioblastomzellen der Linie U373MG nach Inkubation dieser mit jeweils einem Agonisten der Protease-aktivierten Rezeptoren Typ 1 - 4 beziehungsweise einem zusätzlich zum PAR-1-Agonisten applizierten PAR-1-Antagonisten. s=Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind durch rot markierte p-Werte gekennzeichnet.

## 6. Diskussion

### 6.1. Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren

Patienten mit hochgradigen Gliomen, die eine Thrombose oder Embolie erleiden, überleben signifikant kürzer als Patienten ohne Thrombose, selbst wenn diese Patienten die Komplikation initial überlebten (Kuhn *et al.* 2009). Bei 85 % der Glioblastompatienten mit thrombembolischer Komplikation geschehen die Thromboembolien in den ersten drei postoperativen Monaten (Kuhn *et al.* 2009). Damit gehören Patienten mit hochgradigen Gliomen zu den Tumorpatienten mit den höchsten Raten für venöse Thromboembolien (Gerber *et al.* 2006). Ein derart hohes Risiko ist lediglich noch für Patienten mit einem Ovarialkarzinom oder einem Lymphom (Deitcher 2003) beziehungsweise mit einem Ovarial- oder Pankreaskarzinom (Lee und Levine 2003) beschrieben. Thrombembolische Komplikationen gelten als zweithäufigste Todesursache unter hospitalisierten Tumorpatienten (Pruemer 2005, Mousa 2006). Sie werden durch Veränderungen der Hämostase – einschließlich Hyperkoagulabilität, akuter oder chronischer disseminierter intravaskulärer Gerinnung und Fibrinolyse verursacht (Sawaya und Ligon 1994, Pruemer 2005).

Wie in **Abbildung 8** zu sehen weisen Patienten mit einem Glioblastom schon präoperativ multipel und signifikant erhöhte Gerinnungsfaktor-Aktivitäten im intrinsischen System sowie in der Endstrecke der Gerinnungskaskade (Faktoren II, VIII, IX, X und XI) auf. Tendenziell ist auch eine Erhöhung des Faktors XII erkennbar. Im postoperativen Verlauf lassen sich die erhöhten Aktivitäten nicht so eindrucksvoll darstellen, da sie durch den Effekt der Operation verschleiert werden. Die Operation stellt ein Trauma dar und beeinflusst somit das Gerinnungssystem in allen seinen Komponenten. Signifikante Erhöhungen der Gerinnungsfaktor-Aktivitäten liegen bei den Patienten mit einem Glioblastom am ersten postoperativen Tag für den Faktor IX vor sowie am vierten postoperativen Tag für die Faktoren VIII und IX. Trotzdem bleiben tendenzielle Erhöhungen für die Faktoren II, X, XI und XII erkennbar. Der Grund für die nicht darstellbaren signifikanten Unterschiede sind am ehesten die im Vergleich zur präoperativen Erhebung geringeren Patientenzahlen und die Wirkung der Operation.

Ähnliche Ergebnisse finden sich bei Patienten mit einer intrazerebralen Karzinommetastase. Die präoperativ signifikant erhöhten Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren IX und XI sind als solche früh postoperativ nicht nachweisbar (**Abb. 31**). Jedoch finden sich auch hier tendenzielle Aktivitätserhöhungen der Faktoren II, VIII und X. Insgesamt müssten sich mit einem größeren postoperativen Patientenkollektiv auch signifikante postoperative Erhöhungen der Aktivitäten von Gerinnungsfaktoren nachweisen lassen. Darüber hinaus wurde an den Tagen eins und vier die frühe postoperative Phase erfasst. Drei Monate nach der Operation lassen sich hier sicher ebenfalls andere Werte erheben.

Hirntumore mit niedrigerem WHO-Grad, wie die hier untersuchten niedriggradigen Gliome und Meningeome WHO I° und II°, zeigen nicht so deutliche aber trotzdem signifikante Erhöhungen einzelner Gerinnungsfaktoren. Bei Patienten mit einem niedriggradigen Gliom sind die Gerinnungsfaktoren II (präoperativ) und VII (am ersten postoperativen Tag) signifikant erhöht, wohingegen Patienten mit einem Meningeom in diesem Zeitverlauf keine signifikanten Unterschiede in den Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren gegenüber der Kontrollgruppe zeigen (**Abb. 14; 21; 26**). Patienten beider Tumorentitäten weisen allerdings am vierten postoperativen Tag deutlich signifikante Aktivitätserhöhungen der plasmatischen Gerinnungsfaktoren auf (niedriggradige Gliome für den Faktor XII, Meningeome WHO I°/II° für die Faktoren II und VIII, Meningeome WHO I° für den Faktor VIII). Im direkten Vergleich zwischen den Patienten mit einem niedriggradigen Gliom und den Patienten mit einem Glioblastom ließen sich präoperativ signifikant höhere Aktivitätswerte bei den Glioblastompatienten nachweisen (**Abb. 19**). Allerdings ist die Aussagekraft dieses Vergleiches eingeschränkt, da die beiden Patientengruppen aufgrund ihrer unterschiedlichen tumorspezifischen Altersverteilungen nicht hinreichend gematcht werden konnten.

Da den Faktor V betreffend sowohl bei Tumor- als auch Kontrollpatienten stets sehr hohe Aktivitäten gemessen wurden und die Mittelwerte am vierten postoperativen Tag in allen Patientengruppen oberhalb des Referenzbereiches lagen, muss die Methodik zur Bestimmung dieses Gerinnungsfaktors kritisch betrachtet werden. Eventuell sind zu niedrige obere Normgrenzen als Ursache zu diskutieren.

Die aufgezeigten Unterschiede im plasmatischen Gerinnungsstatus zwischen hoch- und niedriggradigen Hirntumoren implizieren, dass niedriggradige Gliome mit einem niedrigeren Risiko für Thrombosen und deren Komplikationen einher gehen (Kuhn et

al. 2009). Diese Aussage würde ebenfalls mit Rong *et al.* (2005) korrelieren, die desweiteren zeigten, dass die Konzentration des tissue factors mit dem Tumorgrad korreliert und in Glioblastomen am höchsten ist. Die Arbeitsgruppe beobachtete außerdem bei fast allen Glioblastomen intravaskuläre Mikrothromben, welche zum Gefäßverschluß führten. Als ein Grund für diese Effekte führten sie in ihrer Publikation die erhöhte Induktion des tissue factors an (Rong *et al.* 2005). Kuhn *et al.* (2009) konnten inzwischen auch die Expression des Thrombinrezeptors PAR-1 durch Gliomgewebe nachweisen. Dabei korrelierte die Dichte der Thrombinrezeptoren im untersuchten Gewebe ebenfalls mit dem Tumorgrad. Zudem gelang in der nun vorliegenden Arbeit der Nachweis von PAR-1-mRNA in humanen Glioblastomzellen der Linie U373MG. Darüber hinaus konnte die Färbung von lebenden U373MG Glioblastomzellen für PAR-1 die Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche nachweisen. Van Meir und Brat (2004) wiesen zusätzlich ein erniedrigtes Level des Plasminogenaktivators (tPA) nach. Dadurch werden die prokoagulatorischen Eigenschaften unterstützt. Experimentelle Daten ließen Korte (2000) vermuten, dass die Gerinnung sowohl in der Tumorentwicklung, der Tumorprogression als auch in der Metastasierung eine Rolle spielt. Er ging davon aus, dass der tissue factor/Faktor VII-Weg den stärksten prokoagulatorischen Stimulus bei malignen Tumorerkrankungen über eine Steigerung der Thrombinproduktion darstellt. In den oben aufgeführten Ergebnissen liegt der Faktor VII zwar präoperativ tendenziell und bei Patienten mit einem niedriggradigen Gliom in signifikant höherer Aktivität vor als bei den Kontrollpatienten, allerdings finden sich signifikante Erhöhungen der Aktivitäten von Gerinnungsfaktoren viel häufiger im intrinsischen Signalweg der Gerinnungskaskade.

Nicht nur anhand der absoluten Gerinnungsfaktor-Aktivitäten sondern auch unter dem Aspekt pathologischer Einzelerhöhungen weisen Patienten mit Hirntumoren deutlich mehr Potenzial für Thrombosebildung als Kontrollpatienten auf. Dabei ist erneut ein deutlicher Zusammenhang zwischen Tumorgrad und Ausprägung der Erhöhungen der Einzelfaktoren erkennbar. So weisen Glioblastompatienten präoperativ signifikant öfter pathologisch erhöhte Faktoren II, IX und X sowie tendenziell häufiger pathologisch erhöhte Faktoren XI und XII gegenüber der Kontrollgruppe auf (**Abb. 9**). Nach der Operation lassen sich diese Erhöhungen nicht so eindrucksvoll darstellen, da sie wiederum vom Effekt der Operation verschleiert werden. Signifikant pathologisch erhöhte Aktivitäten finden sich für den

Gerinnungsfaktor IX am ersten postoperativen Tag sowie für den Faktor VIII am vierten postoperativen Tag. Desweiteren wurden bei tendenziell mehr Glioblastompatienten pathologisch erhöhte Aktivitäten der Faktoren II (am ersten und vierten postoperativen Tag) und XI (am vierten postoperativen Tag) beobachtet. Mit einem größeren Patientenkollektiv ließen sich auch hier sicherlich mehr signifikante Unterschiede erheben. Desweiteren spielt sicher der Abnahmezeitpunkt eine Rolle. Mehrere Monate nach der Operation verschwinden die OP-bedingten Effekte und die erkrankungseigenen Charakteristika brechen wieder durch.

Patienten mit einer intrazerebralen Karzinommetastase zeigen – wenngleich seltener als Glioblastompatienten doch häufiger als die Kontrollpatienten – pathologisch erhöhte Aktivitäten einzelner Gerinnungsfaktoren im systemischen Blut. Während signifikante Ergebnisse vor allem präoperativ für die Faktoren II und IX sowie Tendenzen bei den Faktoren VIII, X und XIII beobachtet werden konnten, so ließ sich im postoperativen Verlauf nur für den pathologisch vermehrt aktivierten Faktor IX am ersten postoperativen Tag eine signifikant höhere Zahl an betroffenen Karzinompatienten feststellen (**Abb. 32**).

Am ehesten infolge des niedrigeren WHO-Grads und der anderen Histologie zeigen Patienten mit einem niedriggradigen Gliom beziehungsweise einem Meningeom präoperativ und am ersten postoperativen Tag nur tendenziell öfter einzelne Gerinnungsfaktoren, die sich in pathologisch erhöhter Aktivität nachweisen lassen. Am vierten postoperativen Tag weisen jedoch wieder signifikant mehr Patienten mit einem Meningeom WHO I° oder II° einen pathologisch vermehrt aktivierten Faktor IX im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (**Abb. 22**). Ein weiterer Grund für fehlende signifikante Unterschiede besonders im postoperativen Verlauf können die kleinen Patientengruppen sein. Auch ein weiterer späterer Messpunkt, zum Beispiel nach drei Monaten, würde hier zu anderen Ergebnissen führen. Insgesamt betrachtet scheinen die Gerinnungsfaktoren II und IX bei Hirntumorpatienten am häufigsten in pathologisch erhöhter Aktivität vorzuliegen.

Bisher durchgeführte Studien konnten signifikante Erhöhungen einer Zysteinprotease mit dem Namen cancer procoagulant (CP) sowie des tissue factors im Hirntumorgewebe aufzeigen (Ogiichi *et al.* 2000, Giagounidis *et al.* 2001). Der auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimierte TF kann über einen Komplex mit dem Gerinnungsfaktor VII/VIIa zur Aktivierung der Faktoren IX und X führen. Unabhängig von der Gerinnungskaskade führt der „cancer procoagulant“, der in gesundem,

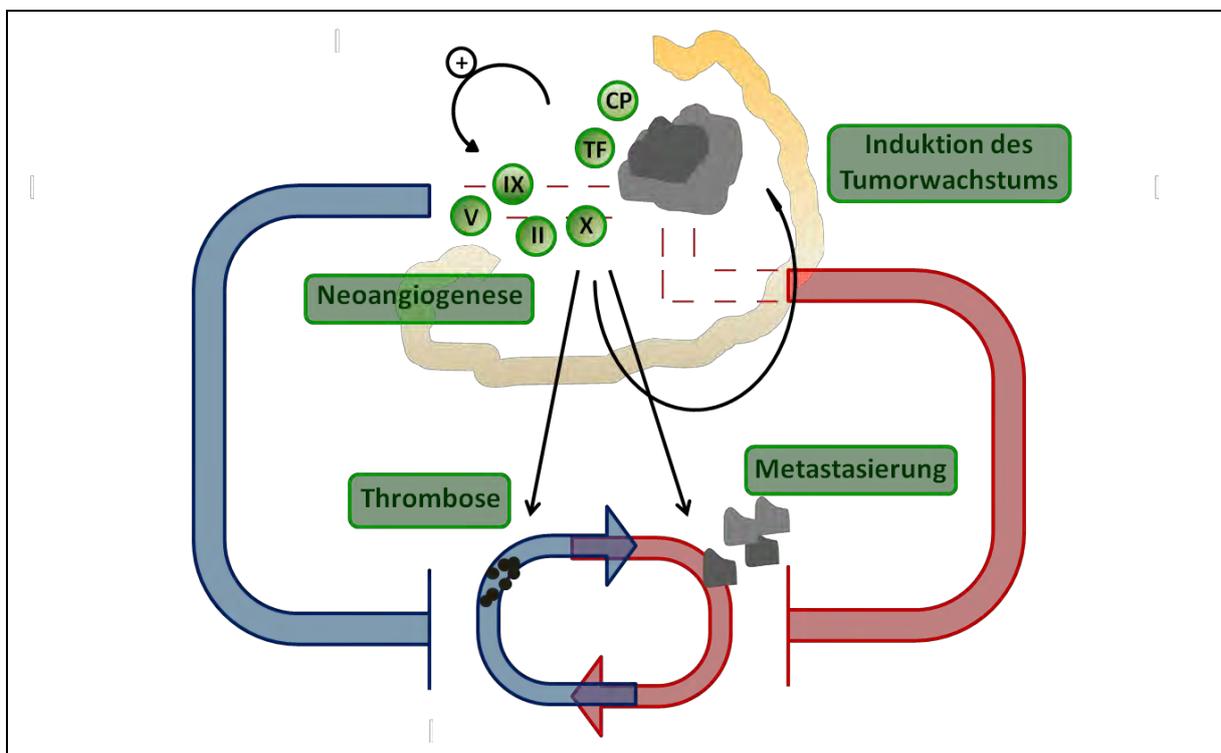
tumorfremem Gewebe nicht nachweisbar war (Ogiichi *et al.* 2000), zusätzlich zur Aktivierung des Faktors X (Giagounidis *et al.* 2001). Folglich kann man nicht nur den intrinsischen Weg für eine Hyperkoagulabilität bei Hirntumorpatienten verantwortlich machen. Es ist die enge Verflechtung multipler Gerinnungsfaktoren und anderer prokoagulatorischer Substanzen (wie zum Beispiel CP), welche letztendlich zur vermehrten Thrombin- und auch Fibrinbildung im Tumorgewebe selbst sowie im systemischen Blut führt.

## **6.2. Multipel erhöhte Gerinnungsfaktor-Aktivitäten und Mehrfacherhöhungen der Aktivität von Gerinnungsfaktoren**

Interessanterweise sind bei der Auswertung der Kombinationen von über die obere Normgrenze hinaus pathologisch aktivierten Gerinnungsfaktoren eben jene der Faktoren II & IX, II & V, II & X (präoperativ) sowie II & IX (am vierten postoperativen Tag) signifikant häufiger bei Glioblastompatienten nachweisbar als in der Kontrollgruppe (**Abb. 11**). Hierfür kann der Grund in der von Ogiichi *et al.* (2000) und Giagounidis *et al.* (2001) beschriebenen vermehrten Expression von tissue factor und cancer procoagulant liegen. Diese führt wie bereits erwähnt zu einer verstärkten Aktivierung der Faktoren IX und X und in der Folge dann auch des Faktors II, so dass die oben genannten Kombinationen entstehen. Auch durch die operativ bedingte Läsion und die Eröffnung von Blutgefäßen könnte hier ein Einstrom in die systemische Zirkulation denkbar sein. Der als Prothrombinase wirkende Komplex aus den Faktoren V und X kann in gesteigerter Aktivität vermehrt Prothrombin proteolytisch spalten und damit wiederum Thrombin bilden. Ornstein *et al.* (2002) konnten aus ihren Experimenten schließen, dass der tissue factor durch einen autokrinen Wachstumsschub mithilfe der Gerinnungsfaktoren in der Lage ist ebenfalls Thrombin zu produzieren. Sciacca *et al.* (2004) begaben sich in der Diskussion auf die genetische Ebene und machten bereits genetische Polymorphismen, die in den codierenden Genen für Prothrombin und den Faktor V liegen, für eine Prädisposition für tiefe Venenthrombosen bei Patienten mit hochgradigen Gliomen verantwortlich. Zu diesen Ergebnissen passen auch jene von Ornstein *et al.* (2002). Die Arbeitsgruppe fand heraus, dass die TF-mRNA 500 x stärker in Astrozytomen als in tumorfremem Hirnparenchym vorliegt und dass die

Expression mit dem WHO-Grad des Tumors korreliert. Letzteres kann ein weiterer Grund dafür sein, weshalb vor allem die in dieser Arbeit untersuchten Glioblastompatienten signifikant häufiger als Kontrollpatienten pathologisch vermehrt aktivierte Gerinnungsfaktoren zeigen, während die Ergebnisse aus den Vergleichen mit niedriggradigen Gliomen weniger markant ausfallen. Die Ergebnisse von Rong *et al.* (2005) könnten die beschriebenen Tendenzen untermauern. In ihren Untersuchungen wiesen sie in über 90 % der malignen Astrozytome, jedoch in nur 10% der niedriggradigen Gliome (WHO-Grad I und II) eine TF-Expression neoplastischer Zellen nach. Einige Arbeitsgruppen kamen sogar (in vivo oder in vitro) zu dem Schluss, dass schließlich höhergradige Gliome selbst die Faktoren II, III, VIII, IX und X sowie den PAR-1-Rezeptor produzieren (Shikamoto und Morita 1999, Marras *et al.* 2000, Deitcher 2003, Fernandes *et al.* 2006, Kuhn *et al.* 2009).

Es spricht also vieles dafür, dass die pathologisch erhöhten Aktivitätswerte besonders der Gerinnungsfaktoren II, V, IX und X beziehungsweise deren Kombinationen bei Patienten mit einem Glioblastom entweder direkt durch die Tumorzellen selbst und/oder indirekt über eine erhöhte Expression von TF oder CP bedingt sind (**Abb. 44**). Derart markante Ergebnisse finden sich jedoch nur bei Glioblastompatienten.



**Abb. 44** Effekte der zum Teil selbst getriggerten Gerinnungsaktivierung auf das Gehirntumorgewebe und mögliche systemische Auswirkungen.

Neben den Kombinationen ließen sich zudem auch öfter Mehrfacherhöhungen bei Patienten mit einem Glioblastom feststellen. So weisen einerseits präoperativ signifikant mehr Glioblastompatienten mehr als einen und mehr als zwei Gerinnungsfaktoren gleichzeitig in pathologisch erhöhter Aktivität auf. Ähnlich zu diesen Ergebnissen sind bei ihnen auch am vierten postoperativen Tag signifikant häufiger mehr als drei gleichzeitig in erhöhter Aktivität vorliegende Gerinnungsfaktoren nachzuweisen (**Abb. 10**).

Patienten mit einer intrazerebralen Karzinometastase, die sonst fast ebenso ausgeprägt pathologische Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren zeigen wie Glioblastompatienten, weisen zwar präoperativ signifikant mehr als zwei gleichzeitig erhöhte Gerinnungsfaktoren auf aber sie zeigen am vierten postoperativen Tag keine signifikanten Mehrfacherhöhungen, was eventuell auch auf die postoperativ geringe Fallzahl (n=5) zurückzuführen ist (**Abb. 33**). Ähnliches war in dieser Studiengruppe auch schon bei den absoluten Gerinnungsfaktor-Aktivitäten sowie den pathologisch erhöhten Aktivitäten einzelner Faktoren zu beobachten.

Erstaunlicherweise sind bei den Meningeompatienten am vierten postoperativen Tag signifikante Mehrfacherhöhungen von mehr als zwei und mehr als drei Gerinnungsfaktoren nachweisbar (**Abb. 23**). Damit stellen sie zu diesem Zeitpunkt zusammen mit den Glioblastompatienten die aus dieser Sicht gefährdetsten Patienten für relevante thrombembolische Komplikationen dar. Die genauen Ursachen für diese Engleisung der Gerinnungsfaktoren bei Meningeompatienten im postoperativen Stadium sind aber noch unbekannt. Freigesetzte Substanzen, die aus dem Tumor an die Zirkulation abgegeben werden, könnten eine Rolle spielen.

Während Patienten mit einem niedriggradigen Gliom präoperativ und am ersten postoperativen Tag keine Auffälligkeiten im Vergleich der pathologischen Erhöhungen von multiplen Gerinnungsfaktor-Aktivitäten zeigen, so finden sich am vierten postoperativen Tag signifikant häufiger mehr als zwei Gerinnungsfaktoren mit pathologisch erhöhter Aktivität (**Abb. 16**).

Durch perioperative Effekte verlieren sich die oben aufgezeigten signifikanten Unterschiede am ersten postoperativen Tag bei allen untersuchten Patientenkollektiven. Hier scheint der Risikofaktor „Operation“ eine wesentlich größere Rolle im Hinblick auf Thromboseentstehung und nachfolgenden Komplikationen einzunehmen als die Malignom-assoziierten Effekte. Am vierten postoperativen Tag kann bereits eine erneute Ausbildung sowohl signifikanter

Erhöhungen der absoluten Gerinnungsfaktor-Aktivitäten als auch von signifikant häufiger auftretenden multiplen Aktivitätserhöhungen der Faktoren beobachtet werden, die sich im weiteren postoperativen Verlauf noch verdeutlichen könnte.

### 6.3. Auswirkungen der erhöhten Gerinnungsfaktor-Aktivitäten

Letztendlich mündet die Aktivierung von Gerinnungsfaktoren immer in einer vermehrten Thrombinexpression. Thrombin seinerseits besitzt wie in **Abbildung 45** dargestellt ein sehr großes Wirkungsspektrum. Es hat neben der prokoagulatorischen Wirkung noch mehrere andere Funktionen, die über G-Proteingekoppelte Rezeptoren aus der PAR-Familie mit dem Prototyp PAR-1 vermittelt werden (Zieger *et al.* 2001, Fan *et al.* 2005).

Fan *et al.* (2005) konnten mittels der real time PCR in C6-Gliomzellen eine signifikant erhöhte mRNA-Expression des IL-6, IL-1-beta und TNF-alpha unter Thrombinzugabe nachweisen. Auch die Ergebnisse von Fadul und Zacharski (2005) sprechen für eine proinflammatorische Wirkung des Thrombins. Mit ihren Experimenten konnten sie zeigen, dass der aktivierte Faktor II nicht nur Ödeme im Gehirn induziert, sondern auch eine Leukozyteninfiltration sowie die Aktivierung der Mikroglia auslöst. Damit wird eine fokale Entzündung erzeugt. Das Auftreten von Entzündungszellen innerhalb von Gliomen korreliert wiederum mit der Prognose. Meli *et al.* (2001) wiesen schließlich eine durch Thrombin verstärkte iNOS-Expression nach. Damit wird von den Gliazellen Stickstoffmonoxid freigesetzt, welches wichtig für eine entzündliche Antwort im ZNS ist. In dieser Studie konnte keine Freisetzung von Stickstoffmonoxid nach Stimulation humaner Glioblastomzellen der Linie U373MG mit Thrombin beobachtet werden (**Abb. 41**). Neben der proinflammatorischen Funktion stimuliert Thrombin desweiteren das Tumorwachstum. Ogiichi *et al.* (2000) konnten mithilfe einer Kombination aus den Gerinnungsfaktoren II, V und X mit oder ohne den Faktor VII eine Proliferation in drei verschiedenen Zelllinien (Gliomzelllinie T98G, TM-1 sowie die normale humane astrocyte cell strain NHA) induzieren. Dabei war der maximal Mitose-stimulierende Effekt in den Gliomzelllinien höher als in der NHA-Zelllinie, die als Kontrolle diente. Die Gerinnungsfaktoren einzeln oder in anderen Kombinationen eingesetzt, hatten keinen Effekt auf die Zellproliferation. Daraus folgerten sie, dass der pro-proliferative Effekt durch die Produktion von

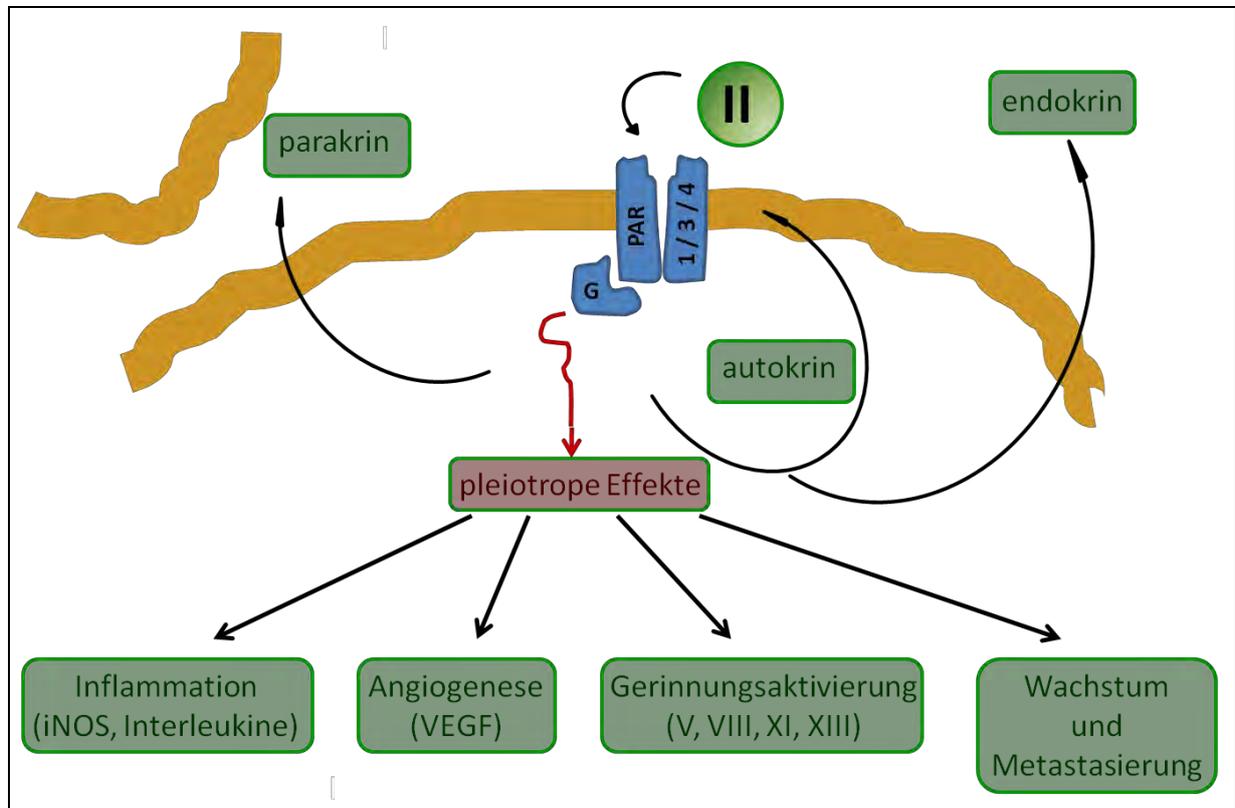
Thrombin angenommen werden kann. Auch in dieser Studie konnte ein signifikanter Anstieg der DNS-Synthese in humanen Glioblastomzellen der Linie U373MG nach Inkubation dieser mit Thrombin in verschiedenen Konzentrationen nachgewiesen werden (**Abb. 42**). Ein ebenfalls signifikanter Anstieg der DNS-Synthese humaner Glioblastomzellen der Linie U373MG ließ sich auch nach Inkubation mit einem PAR-1-Agonisten darstellen (**Abb. 43**). Die geringe, jedoch signifikante Steigerung der Proliferation durch den PAR-3-Agonisten könnte auf Kreuzreaktionen mit dem PAR-1-Rezeptor zurückgeführt werden, da auch schon in einer vorherigen Arbeit der Verdacht auf einen mutierten und damit nicht vollständig hemmbaren PAR-1-Rezeptor geäußert wurde (Kuhn *et al.* 2009). Interessanterweise stellte sich in der Arbeitsgruppe um Fan *et al.* (2005) heraus, dass Thrombin in niedrigen Konzentrationen zwar die Zellproliferation in C6-Gliomzellen hemmt, in höheren Konzentrationen diese allerdings erhöht. Damit könnte ein weiterer Grund für die signifikanten Aktivitätserhöhungen des Faktors II im Gliomgewebe und systemischen Blut im Sinne eines selbsterhaltenden und wachstumsfördernden Mechanismus beobachtet worden sein. Thrombin spielt nach Hua *et al.* (2005) zudem eine große Rolle in der Produktion sowie Sekretion des „Nerve Growth Factors“ in Gliomzellen. Auch damit wird die Astrozyten- und Tumorzellproliferation stimuliert (Zieger *et al.* 2001, Ornstein *et al.* 2002, Kuhn *et al.* 2009). Hiller (2003) beschreibt Thrombin als Wachstumsfaktor, der DNS-Synthese und Mitose auslöst.

Wie jedes andere proliferierende Gewebe bedarf natürlich auch der Hirntumor einer vermehrten Durchblutung, um sich mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Da Thrombin *in vitro* die VEGF-Produktion stimulieren kann, scheint es somit eine wichtige Rolle in der Angiogenese zu spielen (Guan *et al.* 2002, Yamahata *et al.* 2002, Rickles *et al.* 2003, Hiller 2003, Hua *et al.* 2005). In Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit muss die Gefäßbildung mehr oder weniger schnell erfolgen, für die ein entsprechend großer Bedarf an Thrombin und somit auch ein Grund für die verschiedenen signifikant erhöhten Gerinnungsfaktor-Aktivitäten für die Thrombinaktivierung bei den Tumorentitäten angenommen werden kann.

Auch in der Metastasierung wird dem Faktor II eine wichtige Rolle zugeschrieben. Van Meir und Brat (2004) fanden, dass der in Astrozyten durch Thrombin aktivierte PAR-1 invasive und metastatische Eigenschaften von malignen Zellen stimuliert (Korte 2000). PAR-1 wird jedoch auch durch Hirntumorzellen exprimiert, wie Untersuchungen von humanen Glioblastom-Zellreihen und Kurzzeitkulturen zeigen

(Junge *et al.* 2004). Das konnte in dieser Studie an humanen Glioblastomzellen ebenso bestätigt werden.

Schließlich ist noch die bekannteste Funktion des Faktors II zu erwähnen – die Fibrinbildung. Möglicherweise stellt die Interaktion zwischen Tumorwachstum und Koagulation eine Art Überlebensstrategie des Tumors dar. Zum Beispiel dient die Bildung einer Fibrinhülle der immunologischen Maskierung eines Tumors (Nawroth 2006). Demnach sind auch Adhäsion und Metastasierung immer an die Bildung einer Fibrinmatrix gebunden. Thrombin ist jedoch nicht nur für die Fibrinbildung verantwortlich. Es verstärkt durch eine positive Rückkopplung schließlich auch seine eigene Aktivität, indem es die Faktoren V, VIII, XI und XIII aktiviert (Taketomi *et al.* 2008). Auf diese Weise entsteht ein prokoagulatorischer Kreislauf (für die Patienten ein *circulus vitiosus*), der die Balance im Hirntumorgewebe mit sehr vielseitigen Konsequenzen hin zu einer Hyperkoagulabilität des Blutes verschiebt. Die Faktoren II, VIII, IX und X, die auch in der vorliegenden Untersuchung in signifikant erhöht aktivierter Form vorliegen, werden dabei durch vermehrte Expression des tissue factors, cancer procoagulants sowie des Thrombins besonders häufig induziert.



**Abb. 45:** Wirkungsspektrum des Gerinnungsfaktors II.

Allerdings würde auch der Hirntumor nicht von einer ausschließlich prothrombotischen Lage profitieren. Sciacca *et al.* (2004) zeigten, dass die Thrombin-induzierte Vermehrung von VEGF wiederum den tissue plasminogen activator (tPA) induziert und somit die Spaltung von Plasminogen in Plasmin. Parallel dazu erfolgt jedoch auch die Expression des Inhibitors von tPA (PAI-1), welche zu einem prothrombotischen Status führt, indem die Plasminogenaktivierung inhibiert und somit fibrinolytische Aktivität reduziert wird (Zieger *et al.* 2001, Fan *et al.* 2005). Sciacca *et al.* (2004) wiesen desweiteren die Hochregulierung von dem Lipoprotein(a) nach, welches die Sekretion von tPA reduziert sowie die PAI-1-Produktion anregt. Hirntumorzellen sind folglich in der Lage, neben den oben genannten, zahlreichen prothrombotischen auch antithrombotische Substanzen zu exprimieren, um optimale Bedingungen für ihre teilweise rasante Proliferation zu erhalten.

#### **6.4. Von der lokalen zur systemischen Thrombose**

Auch die in dieser Studie untersuchten Hirntumorpatienten erlitten im postoperativen Zeitraum signifikant häufiger klinisch manifeste tiefe Venenthrombosen als die Kontrollpatienten und infolge dessen deutlich aber nicht signifikant häufiger eine Lungenembolie (**Abb. 36**). Mit einem größeren Patientenkollektiv würde sich sicherlich auch im Vergleich der postoperativen Lungenembolien ein signifikanter Unterschied ergeben. Unter den Hirntumorpatienten waren am häufigsten bei den Patienten mit einem Glioblastom WHO IV° tiefe Venenthrombosen sowie eine Lungenembolie zu diagnostizieren (**Abb. 37**). Im Vergleich zu der ebenfalls großen Gruppe der Meningeompatienten ist dieser Unterschied auch signifikant; wiederum würden bei der Untersuchung einer größeren Patientenzahl wahrscheinlich häufiger signifikante Unterschiede entstehen. Ein Grund für die im Vergleich zu den Kontrollpatienten bedeutsam häufiger auftretenden thrombembolischen Ereignisse könnten die in dieser Arbeit untersuchten Gerinnungsfaktoren sein, welche im peripheren Blut von Patienten mit einem Hirntumor in erhöhter Aktivität vorliegen. Doch wie erklärt sich eine derart ausgeprägte Hyperkoagulabilität im systemischen Blut – fernab gelegen vom eigentlichen Tumorgewebe im ZNS?

Normale Blutgefäße des ZNS weisen dank der Blut-Hirn-Schranke eine nur sehr geringe Proteindiffusion durch ihre Wände auf. Allerdings kann die Blut-Hirn-Schranke zum Beispiel durch VEGF durchlässig werden (Van Meir und Brat 2004), für das eine erhöhte Expression in neoplastischen Zellen nachgewiesen wurde (Hiller 2003, Hua *et al.* 2005). Zudem kann durch Zytokinproduktion (zum Beispiel Interleukine, TNF- $\alpha$ ) der Tumorzellen die normale antikoagulatorische Eigenschaft des Gefäßendothels gestört werden. Durch diese Mechanismen weisen etwa die Hälfte aller Patienten mit malignen Erkrankungen und über 90 % der Patienten mit metastasierten malignen Erkrankungen abnorme Gerinnungsparameter auf (Giagounidis *et al.* 2001). Schließlich könnte es durch die gestörte Blut-Hirn-Schranke auch zur Einschwemmung unbekannter Stoffe ins systemische Blut kommen, die eine vermehrte Gerinnungsfaktor-Produktion in der Leber oder eine erhöhte Aktivierung vorhandener Faktoren im Blut auslösen. Eine außerdem nachgewiesene Hyperimmunoglobulinämie sowie Thrombozytose können eine erhöhte Plasmasviskosität bedingen und das Thromboembolierisiko ebenfalls steigern (Giagounidis *et al.* 2001, Walsh und Kakkar 2001).

Neben den prothrombotischen Substanzen ist der Hirntumor selbst ein traumatisierender Prozess, der gesunde zentralnervöse Strukturen sowie dortige Blutgefäße schädigt. Valdes-Camin *et al.* (1994) beobachteten, dass bereits normales Hirngewebe reich an tissue factor ist. Nicht überraschend erscheint nach Ornstein *et al.* (2002) also eine venöse Thromboembolie nach Hirntraumen, infolgedessen TF vermehrt ins systemische Gefäßsystem gelangt. Folglich müsste auch ein Hirntumor dem tissue factor den Übertritt in die systemische Zirkulation mit nachfolgenden Koagulationsreaktionen durch die gestörte Blut-Hirn-Schranke ermöglichen. Selbiges könnte für die untersuchten Gerinnungsfaktoren zutreffen. Zusätzlich schädigt die Therapie der Tumore Hirngewebe sowie Endothelzellen und fördert damit die Produktion und Freisetzung von TF. In mehreren Arbeitsgruppen konnte eine erhöhte Sekretion von TF in endothelialen Zellen nachgewiesen werden (Albrecht *et al.* 1992, Maialo *et al.* 2002).

### 6.5. Antithrombin III, Fibrinogen und D-Dimere

Patienten mit einem Hirntumor weisen verglichen mit den Kontrollgruppen im systemischen Blut signifikant höhere Aktivitäten an Antithrombin III auf. Für die Glioblastom- und Meningeompatienten sowie für die mit einer intrazerebralen Karzinometastase lassen sich diese zu beiden postoperativen Messzeitpunkten nachweisen (**Abb. 12; 24; 29; 34**). Zudem konnte bei den Patienten mit einem Glioblastom sowie bei den Patienten mit einem Meningeom I° oder II° zu beiden postoperativen Messzeitpunkten und bei den Patienten mit einem Meningeom I° am ersten postoperativen Tag häufiger pathologische, das heißt gegenüber dem Normbereich erhöhte Aktivitätswerte von AT III gegenüber den Kontrollgruppen nachgewiesen werden (**Abb. 13; 25; 30**). Mit einem größeren Patientenkollektiv wären eventuell auch bereits präoperativ signifikante Unterschiede nachweisbar. Bei den Patienten mit einem niedriggradigen Gliom lassen sich dagegen keine signifikanten Unterschiede feststellen. Allerdings zeigen sie sowohl prä- als auch an den postoperativen Tagen die höchsten absoluten Werte von Antithrombin III, welche im direkten Vergleich mit den Glioblastompatienten präoperativ signifikant höher liegen. Das Ausbleiben an signifikanten Unterschieden in dieser Tumorentität kann somit am ehesten anhand der geringen Fallzahl unter den Patienten mit einem niedriggradigen Gliom erklärt werden. Ornstein *et al.* (2002), die in einer ähnlichen Untersuchung die Aktivität des Thrombin-Antithrombin-Komplexes im systemischen Blut vor, 60 und 180 Minuten nach neurochirurgischen Operationen maligner intrakranieller Neoplasien maßen, stellten ebenfalls signifikante Erhöhungen fest. Das Maximum des Thrombin-Antithrombin-Komplexes war in ihren Experimenten 11fach gegenüber dem normalen Wert erhöht, während selbst bei zerebralen Aneurysmen eine Erhöhung lediglich um das 4,5fache gemessen wurde. Die Arbeitsgruppe kam zu dem Schluss, dass ein maligner Hirntumor die Patienten in einem größeren Ausmaß für systemische Gerinnungsaktivierung prädisponieren könnte als benigne intrakranielle Prozesse. Diese Ergebnisse im systemischen Blut passen zu den lokal beobachteten Fakten von Isaka *et al.* (1994). Das von jener Arbeitsgruppe immunhistochemisch untersuchte Endothel der Mikrogefäße aus Hirntumoren enthielt mäßig viel AT III in allen Geweben. Lediglich in den Kapillaren der Glioblastome fand eine nur schwache Reaktion statt. Aus ihren Experimenten schlossen sie, dass die erhöhte Expression von antithrombotischen Antigenen neben

der Hyperkoagulabilität zumindest teilweise auch intratumorale Blutungen erklären könnte (Isaka *et al.* 1994). Weitere Funktionen des verstärkt exprimierten Antithrombins III könnten sein, eine komplette Thrombosierung der den Tumor versorgenden Gefäße zu verhindern und die inflammatorische Reaktion zu regulieren. Die Ergebnisse implizieren, dass das Antithrombin III einen Schutzmechanismus des Körpers darstellen könnte, der bei Patienten mit niedriggradigen Gliomen und einer besseren Prognose stärker ausgeprägt ist als bei Patienten mit höhergradigen Hirntumoren und einer schlechteren Prognose. Dieses bestätigen auch die Experimente von Kuhn *et al.* (2009), in denen AT III die Proliferation von Glioblastomzellen senken konnte. Glioblastome können folglich nur bestrebt sein, das Antithrombin III wenigstens in ihrem Gewebe zu blockieren, was die ebenfalls beobachtete verminderte Expression im Endothel erklären würde (Kuhn *et al.* 2009). Auch die in dieser Arbeit gemessenen präoperativ signifikant und postoperativ deutlich erhöhten Aktivitäten von AT III bei Patienten mit einem niedriggradigen Gliom im Vergleich zu Patienten mit einem Glioblastom können diese Hypothese untermauern.

Bei der Auswertung der Fibrinogen-Konzentrationen fallen die am ersten postoperativen Tag stets signifikant höheren Werte bei den Kontroll- verglichen mit den Hirntumorpatienten auf. Alle übrigen Vergleiche ergeben keine signifikanten Unterschiede. Während präoperativ in allen Patientengruppen sehr ähnliche Mittelwerte innerhalb des oberen Referenzbereiches gemessen wurden, zeigten die Kontrollpatienten am ersten postoperativen Tag tendenziell höhere Konzentrationen an Fibrinogen. Die insgesamt niedrigeren Konzentrationen am ersten postoperativen Tag könnten zum Beispiel durch die operationsbedingte Hämodilution oder den Verbrauch bedingt sein. Am vierten postoperativen Tag sind es dagegen die Hirntumorpatienten, die nicht nur die höchsten sondern auch stets über dem Referenzbereich liegende mittlere Fibrinogen-Konzentrationen aufweisen (**Abb. 12; 17; 24; 29**). Innerhalb aller Tumorgruppen lässt sich zudem ein signifikanter Anstieg der mittleren Konzentrationen von Fibrinogen vom ersten zum vierten postoperativen Tag nachweisen. Damit könnte ein weiterer Grund für das postoperativ erhöhte Thromboserisiko bei Hirntumorpatienten beobachtet worden sein. Da die Konzentration von dem akute-Phase-Protein Fibrinogen neben der Gerinnungssituation jedoch auch durch inflammatorische Prozesse reguliert wird, ist noch nicht geklärt, ob die besonders postoperativ hohen Fibrinogen-Konzentrationen

der Tumorpatienten durch die Neoplasie oder eine postoperative systemische inflammatorische Reaktion bedingt sind. Dagegen korrelierte bei Sawaya und Glas-Greenwalt (1992) das Auftreten einer Thrombose bei Patienten mit Hirntumoren unter anderem signifikant mit einem erniedrigten Fibrinogenspiegel. In der vorliegenden Arbeit war das aufgrund der geringen Patientenzahl nicht der Fall. Die in den Untersuchungen beobachtete hämostatische Unordnung assoziierte die Arbeitsgruppe am ehesten mit einer subklinischen Form des disseminierten intravaskulären Koagulationssyndroms (DIC). Allerdings müssten nach dieser Theorie außerdem die Gerinnungsfaktoren aufgrund des Verbrauchs in erniedrigter Aktivität vorliegen, was in dieser Arbeit ebenso nicht beobachtet wurde. Da im Vorfeld einer DIC jedoch immer eine Aktivierung der Gerinnung und damit auch der Gerinnungsfaktoren stattfinden muss, könnte ein Grund für diese Differenzen in den unterschiedlichen Zeitpunkten der Messungen liegen.

Auch in der Auswertung der Konzentrationen von D-Dimeren bei Hirntumor- und Kontrollpatienten ergaben sich weniger markante Ergebnisse als bei der Beurteilung der Gerinnungsfaktoren. Die präoperative Konzentration an D-Dimeren ist bei den Patienten mit einem niedriggradigen Gliom deutlich erhöht gegenüber jener der Kontrollpatienten (**Abb. 17**). Das könnte ein Hinweis für einen perioperativen permanenten Fibrinabbau bei den Patienten mit einem niedriggradigen Gliom sein. Auffallend ist desweiteren ein sich stets indirekt proportional verhaltender Verlauf der mittleren Konzentration an D-Dimeren bei den Hirntumorpatienten zu dem der Kontrollpatienten. Während Glioblastom- und Meningeompatienten während der drei Messpunkte ansteigende Konzentrationen aufweisen, fallen diese in den entsprechenden Kontrollgruppen ab. Die Patienten mit einem niedriggradigen Gliom beziehungsweise einer intrazerebralen Karzinometastase weisen im Verlauf abfallende Werte der D-Dimere auf.

Allerdings bewirken neben thrombotischem Geschehen und Tumoren auch ein chirurgischer Eingriff, Wundheilung, disseminierte intravasale Gerinnung und Entzündung/Sepsis erhöhte D-Dimere, so dass die Ursache für obige Differenzen wahrscheinlich in den eben genannten Störfaktoren liegt. Aus diesem Grund scheint die Messung der Konzentrationen an D-Dimeren in Bezug auf das Thromboserisiko von Hirntumorpatienten wenig aussagekräftig. Sciacca *et al.* (2004) lieferten eindeutigere Ergebnisse. In ihrer Fall-Kontroll-Studie beobachteten sie unter anderem signifikant höhere Plasmaspiegel der D-Dimere bei Patienten mit

hochgradigen Gliomen vom WHO-Grad III und IV als bei Gesunden oder Patienten mit Multipler Sklerose. Auch sie assoziierten das bei Hirntumorpatienten erhöhte Risiko für eine Thrombose/Lungenembolie mit dem Tumor selbst.

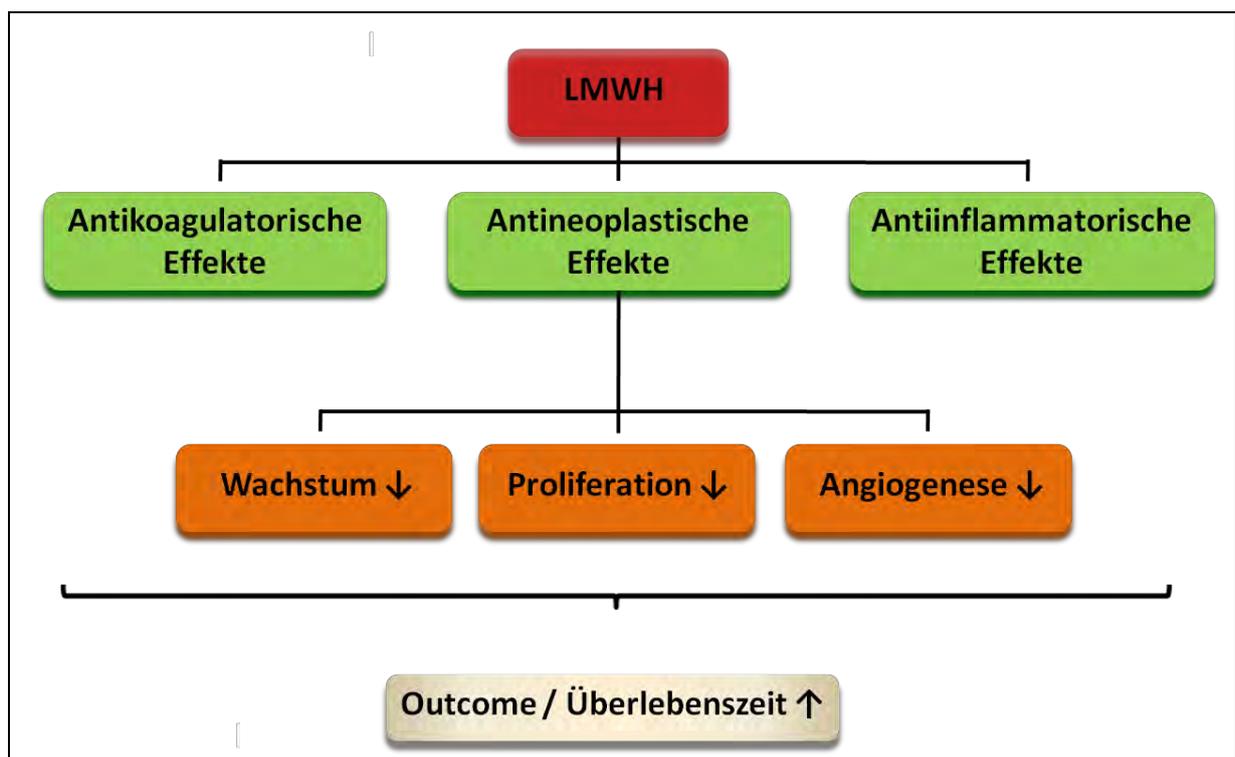
### **6.6. Thromboseprophylaxe bei Patienten mit einem Hirntumor**

Das postoperative Risiko für thrombembolische Komplikationen ist bei Gliomen höher einzuschätzen als das bei anderen Erkrankungen. Als Grund kann eine Veränderung der beschriebenen Gerinnungsfaktoren im Sinne eines paraneoplastischen Syndroms angenommen werden (Weller 2004). Ist die Diagnose einer tiefer Beinvenenthrombose bei Patienten mit einem primären Hirntumor gestellt, erfolgt die Therapie prinzipiell gleich der Behandlung anderer Patienten. Dabei erweist sich die Therapie mit niedermolekularem fraktioniertem Heparin (LMWH) als besser steuerbar als jene Maßnahmen mit Vitamin K-Antagonisten (Weller 2004). Das gilt jedoch nicht für Tumoren, die bereits zu einer intrakraniellen Blutung geführt haben. In diesen Fällen muss sich auf die Hochlagerung der betroffenen Extremität bei Low-Dose-Heparinisierung und gegebenenfalls einer Implantation eines Vena-cava-Schirms beschränkt werden (Schlegel *et al.* 2003). Auch im Hinblick auf die Sekundärprävention bei Patienten mit einer intrazerebralen Metastase herrschen unterschiedliche Meinungen. Monreal *et al.* (2004) halten eine Thromboseprophylaxe bei Patienten mit einem metastasierten Tumor für oft problematisch, da ihrer Ansicht nach aufgrund der Leber- oder Hirnmetastasen ein hohes Risiko für Blutungen und Thrombozytopenie besteht. Vorteile bei der Therapie und Prävention mit LMWH sind die längere Halbwertszeit gegenüber unfraktioniertem Heparin, die bessere Bioverfügbarkeit, die geringere Proteinbindungsfähigkeit sowie dass für die Therapieüberwachung weniger Labortests (Prothrombinzeit, partielle Thromboplastinzeit) erforderlich sind (Schmidt *et al.* 2002, Balzarotti *et al.* 2006, Mousa 2006). Desweiteren kann das Risiko einer intrazerebralen Blutung, einer heparininduzierten Thrombozytopenie und Osteoporose mit LMWH im Vergleich zu einer Therapie mit unfraktioniertem Heparin gesenkt werden (Schmidt *et al.* 2002). Auch für eine perioperative Antikoagulation zur Thromboseprophylaxe von Patienten mit einem primären Hirntumor spricht derzeit viel. Die Inzidenz venöser Thromboemboliebildung bei Patienten, die operiert werden, ist nach Otten *et al.*

(2000) hoch genug, um eine Prophylaxe mit Antikoagulantien zu rechtfertigen. So erhalten operativ behandelte Patienten zusätzlich zu Antithrombosestrümpfen, einer krankengymnastische Übungstherapie sowie einer frühzeitige Mobilisierung standardmäßig auch LMWH (Schlegel *et al.* 2003). Wie mehrere andere Arbeitsgruppen auch kamen Schmidt *et al.* (2002) zu dem Schluss, dass das Risiko ernster Nebenwirkungen durch eine antikoagulatorische Therapie bei Patienten mit malignen Gliomen überschätzt worden ist (Walsh und Kakkar 2001). In ihrer Studie mit 915 Patienten mit malignen Gliomen entwickelten 4 % eine tiefe Beinvenenthrombose oder eine Lungenembolie während der sechsten bis 246. postoperativen Woche. Von den 22 Patienten, die mit antikoagulatorischen Medikamenten behandelt wurden, entwickelte keiner eine intrazerebrale Blutung. Auguste *et al.* (2004) stellten ergänzend fest, dass eine mechanische Thromboseprophylaxe bei Patienten mit einem Hirntumor mittels externer pneumatischer Kompression und/oder elastischen Kompressionsstrümpfen effektiv erfolgen kann. Neben den antikoagulatorischen Effekten scheint niedermolekulares Heparin jedoch noch weitere Wirkungen zu haben (**Abb. 46**). Experimentelle Daten ließen Korte (2000) vermuten, dass Antikoagulanzen, vor allen LMWH, antineoplastische Effekte besitzen und dadurch das Outcome verbessern können. Das konnten auch Kuhn *et al.* (2009) zeigen. In ihren in-vitro Experimenten wiesen sie nach, dass niedermolekulare Heparine wie Nadroparin, Enoxaparin oder auch HMWH die Proliferation von Glioblastomzellen auf ein Drittel im Vergleich zu den Kontrollzellen herunter regulieren können. Derselbe Effekt entstand durch auf die Glioblastomzellen appliziertes Hirudin, welches ein natürlicher Gerinnungshemmer aus dem Blutegel ist. Ähnliche Ergebnisse fanden Balzarotti *et al.* (2006), indem sie mittels Enoxaparin das Wachstum von höhergradigen Gliomzellen signifikant senken, die Tumorzellmigration jedoch nicht signifikant beeinflussen konnten. Mousa (2006) stellten fest, dass Fondaparinux nicht nur fest und schnell an AT III binden und dadurch den Faktor Xa inhibieren kann. Die Inhibition des aktivierten Faktors X und des tissue factors verminderte in ihren Experimenten außerdem die TF/Faktor VII-Aktivierung, was wiederum die Herunterregulation des prokoagulatorischen Status, der Angiogenese und der Entzündung bewirkte. Argatroban als spezifischer Thrombininhibitor kann nach Hua *et al.* (2005) im C6-Gliommodell bei Ratten sowohl Hirnödeme, die Tumormasse als auch neurologische Defizite reduzieren. Es verlängerte außerdem die Überlebenszeit der untersuchten Ratten. Schließlich

konnten Fan *et al.* (2005) die Inhibition der Expression von IL-6 mRNA durch Hirudin nachweisen.

Es wurde einerseits folglich von mehreren Arbeitsgruppen neben den antithrombotischen auch antiproliferative, antiinflammatorische und letztendlich das Outcome verbessernde Effekte der Antikoagulanzen beschrieben. Da für Patienten mit einem Gehirntumor andererseits nicht nur post-, sondern auch präoperativ erhöht aktivierte Gerinnungsfaktoren nachgewiesen werden konnten (**Abb. 8; 14; 31**), welche auf eine mögliche präoperative Hyperkoagulabilität hinweisen, scheint eine Diskussion über den bereits präoperativen Einsatz von Antikoagulanzen bei Patienten mit einem Hirntumor sinnvoll (Goh *et al.* 1997, Ogiichi *et al.* 2000, Nawroth 2006). Das gilt vor allen für Patienten, die zwar nicht operiert, jedoch aufgrund ihrer Hirntumorerkrankung vorübergehend oder dauerhaft immobilisiert sind beziehungsweise bei denen eine Chemotherapie durchgeführt wird (Schlegel *et al.* 2003).



**Abb. 46** Mögliche Effekte der niedermolekularen Heparine.

Ornstein *et al.* (2002) kamen zu dem Schluss, dass in Bezug auf das über mehrere Monate andauernde erhöhte Risiko einer venösen Thromboembolie die längerfristige Prophylaxe mit LMWH für Hochrisiko-Patienten erwogen werden sollte. In dem

„Khorana risk score“ zur Risikoklassifizierung von Tumorpatienten hinsichtlich symptomatischer Thrombosen teilten Khorana *et al.* (2008) Patienten mit einem Hirntumor aufgrund ihrer Tumorlokalisation in die Hochrisikogruppe ein, da sie besonders stark mit symptomatischen Thrombosen assoziiert waren. Im Gegensatz zur low-risk und intermediate-risk Gruppe profitiert die Hochrisikogruppe nach den Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe nach einer prophylaktischen Antikoagulation, da sie in der Studie ein fast 7 % hohes Risiko während der ersten 73 Tage aufwies.

Weil eine effektive Prophylaxe jedoch tägliches Heparin subkutan bedeuten kann, erscheint nach Sciacca *et al.* (2004) die Identifikation von für Thrombosen gefährdeten Patienten sinnvoll für eine individuelle präventive Behandlung. Ornstein *et al.* (2002) diskutierten neben der Antikoagulation mit LMWH und Thrombininhibitoren auch teilweise oral verabreichbare Medikamente in der Antitumortherapie. In ihren Labormodellen zeigten zum Beispiel rekombinant hergestellte TF-pathway Inhibitoren (rTFPI), Vitamin E, Cyclosporin A, ja sogar Statine antithrombotische Aktivität und konnten das Tumorstadium hemmen. Die Arbeitsgruppe vermutete einen weniger zytotoxischen als vielmehr zytostatischen Wirkmechanismus der Antikoagulantien. Demnach liegt es nahe, dass diese Medikamente ihre größte Wirkung durch eine kontinuierliche Verabreichung entfalten als bei nur intermittierender Gabe und eventuell am effektivsten in Kombination mit einer zytotoxischen Therapie wirken.

## 7. Schlussfolgerungen

Die vorliegende Studie ist als Teil einer größeren Forschungsarbeit zu verstehen, die sich mit den Wechselwirkungen zwischen Hirntumoren und Gerinnung beziehungsweise thrombembolischen Ereignissen beschäftigt. Während andere Studien die lokalen Geschehnisse im Tumorgewebe selbst untersuchen, beschäftigt sich diese Arbeit mit den systemisch vorliegenden Veränderungen der Gerinnungsfaktor-Aktivitäten sowie anderer Gerinnungswerte bei Hirntumorpatienten. Die Ergebnisse werden ergänzt durch einige Expressionsstudien sowie in vitro-Experimente.

Für fast alle Patienten mit einem Hirntumor lassen sich Aktivitäten der getesteten Gerinnungsfaktoren von über 100 % der Norm nachweisen. Dabei liegen besonders die Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren II, VIII, IX, X und XI bei den Tumorpatienten verglichen mit der Kontrollgruppe in höherer Aktivität, die Gerinnungsfaktoren II sowie IX am häufigsten in signifikant höherer Aktivität vor. Höhere Aktivitäten von Gerinnungsfaktoren gegenüber der Kontrollgruppe beziehungsweise pathologisch erhöhte Aktivitäten finden sich vor allen bei Patienten mit einem Glioblastom WHO IV°. Patienten mit einem niedriggradigen Hirntumor oder einer intrazerebralen Karzinommetastase weisen weniger markante Veränderungen auf.

Patienten mit einem Hirntumor zeigen öfter mehrere, gleichzeitig in pathologisch erhöhter Aktivität vorliegende Gerinnungsfaktoren als Patienten ohne Tumorleiden. Zudem liegen bei Patienten mit einem Glioblastom WHO IV° signifikant öfter die Faktoren II & V, II & IX sowie II & X gleichzeitig in pathologisch erhöhter Aktivität vor. Diese multiplen Aktivitätserhöhungen münden letztendlich in einer gesteigerten Thrombinbildung.

Weiterhin lassen sich bei Hirntumorpatienten stets eindeutig höhere Aktivitäten von Antithrombin III im Vergleich zu Kontrollgruppe messen. Die Werte der Patienten mit einem niedriggradigen Gliom liegen dabei höher als jene der Glioblastompatienten. Bei den Hirntumorpatienten findet vom ersten zum vierten postoperativen Tag zudem ein signifikanter Anstieg der mittleren Konzentrationen von Fibrinogen statt

Die gemessenen Gerinnungsparameter korrelieren mit dem Auftreten thrombembolischer Komplikationen im postoperativen Zeitraum. So treten bei

Patienten mit einem Hirntumor signifikant häufiger postoperativ klinisch manifeste tiefe Venenthrombosen auf als bei den Kontrollpatienten. Unter den Hirntumorpatienten zeigen am häufigsten die Patienten mit einem Glioblastom WHO IV° tiefe Venenthrombosen im postoperativen Zeitraum beziehungsweise infolge dessen eine Lungenembolie. Die Glioblastompatienten mit einer postoperativen thrombembolischen Komplikation weisen verglichen mit den Glioblastompatienten ohne postoperative thrombembolische Komplikation sowohl höhere Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren als auch häufiger mehrere gleichzeitig in pathologischer Aktivität vorliegende Gerinnungsfaktoren im systemischen Blut auf.

Humane Glioblastomzellen exprimieren messenger RNA für den Protease-aktivierten Rezeptor Typ 1. Das Protein des PAR-1 ist auf der Zelloberfläche lokalisiert und in Clustern angeordnet. Durch Thrombin oder seine Agonisten findet eine reduzierte Synthese von Stickstoffmonoxid in humanen U373MG Glioblastomzellen statt. Thrombin und PAR-Agonisten verursachen einen signifikanten Anstieg der DNS-Synthese in humanen U373MG Glioblastomzellen und damit eine deutliche Zunahme der Proliferation.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen einen Zusammenhang zwischen der thrombembolischen Komplikation selbst, der systemischen Gerinnungsaktivität und einer erhöhten Tumoraggressivität vermuten. Eine prophylaktische Antikoagulation, besonders für Patienten mit einem Glioblastom WHO IV°, ist daher zu diskutieren.

## 8. Literatur- und Quellenverzeichnis

**Aggarwal** BB, Mehta K. 1996. Determination and regulation of nitric oxide production from macrophages by lipopolysaccharides, cytokines, and retinoids. *Methods Enzymol.*, 269:166-171.

**Albrecht** S, Luther T, Grossmann H, Flössel C, Kotsch M, Müller M. 1992. An ELISA for tissue factor using monoclonal antibodies. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 3(3):263-270.

**Arora** P, Ricks TK, Trejo J. 2007. Protease-activated receptor signalling, endocytic sorting and dysregulation in cancer. *Journal of Cell Science*, 120: 921-928.

**Auguste** KI, Quinones-Hinojosa A, Berger MS. 2004. Efficacy of mechanical prophylaxis for venous thromboembolism in patients with brain tumors. *Neurosurg Focus*, 17(4):E3.

**Bae** JS, Rezaie AR. 2008. Protease activated receptor 1 (PAR-1) activation by thrombin is protective in human pulmonary artery endothelial cells if endothelial protein C receptor is occupied by its natural ligand. *Thromb Haemost.*, 100(1):101-109.

**Balzarotti** M, Fontana F, Marras C, Boiardi A, Croci D, Ciusani D, Salmaggi A. 2006. In vitro study of low molecular weight heparin effect on cell growth and cell invasion in primary cell cultures of high-grade gliomas. *Oncology Research*, 16(5):245-250.

**Barthels** M, von Depka M. 2003. *Das Gerinnungskompodium*. Erste Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

**Boire** A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A. 2005. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell*, 120:303-313.

**Coughlin SR.** 2005. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J. Thromb. Haemost.*, 3:1800-1814.

**Dade Behring.** 1999. Berichrom<sup>®</sup> F II, V, VII, X. Reagenzien zur photometrischen Bestimmung von Faktor XIII. Produktinformation.

**Dade Behring.** 1999. Berichrom<sup>®</sup> F VIII, IX, XI, XII. Reagenzien zur photometrischen Bestimmung von Faktor XIII. Produktinformation.

**Dade Behring.** 1999. Berichrom<sup>®</sup> F XIII. Reagenzien zur photometrischen Bestimmung von Faktor XIII. Produktinformation.

**Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Lehy T, Laburthe M.** 2003. Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induce cell proliferation and motility in human colon cancer cells. *Am. J. Pathol.*, 162:1503-1513.

**Deitcher S.** 2003. Cancer-related deep venous thrombosis: Clinical Importance, Treatment Challenges and Management Strategies. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis*, 29(3):247-258.

**Even-Ram S, Uziely B, Cohen P, Grisaru-Granovsky S, Maoz M, Ginzburg Y, Reich R, Vlodaysky I, Bar-Shavit R.** 1998. Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat. Med.*, 4:909-914.

**Fadul CE, Zacharski LR.** 2005. Coagulation biology in glioma pathogenesis: a missing link? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3:1915-1916.

**Fan Y, Zhang W, Mulholland M.** 2005. Thrombin and PAR-1-AP increase proinflammatory cytokine expression in C6 Cells. *Journal of Surgical Research*, 129:196-201.

**Fernandes RS, Kirszberg C, Rumganek VM, Monteiro RQ.** 2006. On the molecular mechanisms for the highly procoagulant pattern of C6 glioma cells. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(10):1546-1552.

**Fidler IJ**, Schackert G, Zhang RD, Radinsky R, Fujimaki T. 1999. The biology of melanoma brain metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 18(3):387-400.

**Forsyth PA**, Posner JB. 1993. Headaches in patients with brain tumors: a study of 111 patients. *Neurology*, 43(9):1678-1683.

**Gasparetto EL**, Leite Cda C, Lucato LT, Barros CV, Marie SK, Santana P, Aguiar PH, Rosemberg S. 2007. Intracranial meningiomas: magnetic resonance imaging findings in 78 cases. *Arq Neuropsiquiatr.*, 65(3A):610-614.

**Gerber DE**, Grossman SA, Streiff MB. 2006. Management of Venous Thromboembolism in Patients with Primary and Metastatic Brain Tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 24:1310-1318.

**Giagounidis A**, Germing U, Haas R. 2001. Zytostatische Therapie: Einflüsse auf das Hämostasesystem. *Hämostaseologie*, 21:1-4.

**Goh KY**, Tsoi WC, Feng CS, Nickham N, Poon WS. 1997. Haemostatic changes during surgery for primary brain tumors. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 63(3):334-338.

**Guan M**, Jin J, Su B, Liu W, Lu Y. 2002. Tissue factor expression and angiogenesis in human glioma. *Clin Biochem.*, 35(4):321-325.

**Hach-Wunderle V**, Hach W. 1999. Das Trousseau-Syndrom. *Gefässchirurgie*, 4:50-54.

**Hettiarachchi R**, Lok J, Prins M, Büller H, Prandoni P. 1998. Undiagnosed malignancy in patients with deep vein thrombosis: incidence, risk indicators, and diagnosis. *Cancer*, 83(1):180-185.

**Hiller E**. 2003. Gerinnungsprobleme in der Hämatologie und Onkologie. *Der Onkologe*, 9:77-87.

**Hua Y**, Tang LL, Fewel ME, Keep RF, Schallert T, Muraszko KM, Hoff JT, Xi GH. 2005. Systemic use of argatroban reduces tumor mass, attenuates neurological deficits and prolongs survival time in rat glioma models. *Acta Neurochir*, 95:403-406.

**Hua Y**, Tang LL, Keep RF, Schallert T, Fewel ME, Muraszko KM, Hoff JT, Xi GH. 2005. The role of thrombin in gliomas. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3:1917-1923.

**Isaka T**, Yoshimine T, Maruno M, Kuroda R, Ishii H, Hayakawa T. 1994. Altered expression of antithrombotic molecules in human glioma vessels. *Acta Neuropathol.*, 87(1):81-85.

**Junge C**, Lee C, Hubbard K, Zhang Z, Olson J, Hepler J, Brat D, Traynelis S. 2004. Protease-activated receptor-1 in human brain: localization and functional expression in astrocytes. *Exp Neurol.*, 188(1):94-103.

**Kaufmann R**, Patt S, Schafberg H, Kalff R, Neupert G, Nowak G. 1998. Functional thrombin receptor PAR1 in primary cultures of human glioblastoma cells. *Neuroreport*, 9(4):709-712.

**Keil E**, Fiedler H. 2000. *Klinische Chemie systematisch*. Bremen: UNI-MED Verlag AG, 141-159.

**Khorana A**, Liebman H, White R, Wun T, Lyman G. 2008. The Risk of Venous Thromboembolism in Patients with Cancer. *Blood*, 111 (10):4833-4907.

**Korte W**. 2000. Changes of coagulation and fibrinolysis system in malignancy: their possible impact on future diagnostic and therapeutic procedures. *Clin Chem Lab Med.*, 38(8):679-692.

**Kuhn SA**, Regenbrecht C, Brodhun, Kosmehl H, Handel L, Frank S, Bjerkvig R, Liebmann L, Deufel T, Lehrach H, Hanisch UK, Kalff R. 2009. Thrombotic complications are an external monitor for a highly aggressive glioblastoma disease. In Vorbereitung (Originalarbeit).

**Legler** JM, Ries L, Smith MA, Warren JL, Heineman EF, Kaplan R, Linet M. 1999. Brain and Other Central Nervous System Cancers: Recent Trends in Incidence and Mortality. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(16):1382-1390.

**Lee** AY, Levine MN. 2003. Venous thromboembolism and cancer: risks and outcomes. *Circulation*, 107:17-21.

**Löffler** G. 2000. *Basiswissen Biochemie*. Vierte Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.

**Maiolo** A, Tua A, Grignani G. 2002. Hemostasis and cancer: tumor cells induce the expression of tissue factor-like procoagulant activity on endothelial cells. *Haematologica*, 87(6):624-628.

**Marras** LC, Geerts WH, Perry JR. 2000. The risk of venous thromboembolism is increased throughout the course of malignant glioma: an evidence-based review. *Cancer*, 89(3):640-646.

**Meli** R, Raso GM, Cicala C, Eposito E, Fiorino F, Cirino G. 2001. Thrombin and PAR-1 activating peptide increase iNOS expression in cytokine-stimulated C6 glioma cells. *Journal of Neurochemistry*, 79:556-563.

**Miike** S, McWilliam AS, Kita H. 2001. Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. *J Immunol*, 167(11):6615-6622.

**Monreal** M, Zacharski L, Jiménez JA, Roncales J, Vilaseca B. 2004. Fixed-dose low-molecular weight heparin for secondary prevention of venous thromboembolism in patients with disseminated cancer: a prospective cohort study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2:1311-1315.

**Mousa** SA. 2006. Role of current and emerging antithrombotics in thrombosis and cancer. *Drugs Today*, 42(5):331-350.

**Nathanson M**, Savitsky JP. 1952. Platelet Adhesive Index Studies in Multiple Sclerosis and Other Neurologic Disorders. Bull N Y Acad Med, 28(7): 462–468.

**Nawroth PP**. 2006. Malignancy and thrombosis [Plenarsitzung]. In: 50. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose und Hämostasieforschung. Basel.

**Ogiichi T**, Hirashima Y, Nakamura S, Endo S, Krimoto M, Takaku A. 2000. Tissue factor and cancer procoagulant expressed by glioma cells participate in their thrombin-mediated proliferation. Journal of Neuro-Oncology, 46:1-9.

**Okamoto T**, Nishibori M, Sawada K, Iwagaki H, Nakaya N, Jikuhara A, Tanaka N, Saeki K. 2001. The effects of stimulating protease-activated receptor-1 and -2 in A172 human glioblastoma. J Neural Transm, 108(2):125-140.

**Ornstein DL**, Meehan KR, Zacharski LR. 2002. The Coagulation System as a Target for the Treatment of Human Gliomas. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 28(1):19-27.

**Otten H**, Prins M, Smorenburg S, Hutten B. 2000. Risk Assessment and Prophylaxis of Venous Thromboembolism in Non-Surgical Patients: Cancer as a Risk Factor. Haemostasis, 30(2):72-76.

**Perry A**, Scheithauer BW, Stafford SL, Lohse CM, Wollan PC. 1999. "Malignancy" in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications. Cancer, 85(9):2046-2056.

**Preston-Martin S**. Epidemiology of primary CNS neoplasms. 1996. Neurol. Clin., 14:273-290.

**Pruemer J**. 2005. Prevalence, causes and impact of cancer-associated thrombosis. American Journal of Health-System Pharmacy, 62(22):4-6.

**Quevedo J**, Buckner J, Schmidt J, Dinapoli R, O'Fallon J. 1994. Thromboembolism in patients with high-grade glioma. Mayo Clinic Proceedings, 69(4):329-332.

**Rickles** FR, Patierno S, Fernandez PM. 2003. Tissue Factor, Thrombin and Cancer. Chest, 124:58-68.

**Rong** Y, Post DE, Pieper RO, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. 2005. PTEN and Hypoxia regulate Tissue Factor Expression and Plasma Coagulation by Glioblastoma. Cancer Research, 65(4):1406-1413.

**Rosenblum** M, Levy R, Bredesen D, So Y, Wara W, Ziegler JL. 1988. Primary central nervous system lymphomas in patients with AIDS. Ann Neurol, 23:13-16.

**Salminen** E, Pukkala E, Teppo L. 1999. Second cancers in patients with brain tumors – impact of treatment. Eur J Cancer, 35:102-105.

**Sawaya** R, Glas-Greenwalt P. 1992. Postoperative venous thromboembolism and brain tumors: Part II. Haemostatic profile. Journal of Neurooncology, 14(2):127-134.

**Sawaya** R, Ligon BL. 1994. Thromboembolic complications associated with brain tumors. Journal of Neurooncology, 22:173-181.

**Schackert** G. 2002. Leitlinienpapier zur Diagnostik und Therapie zerebraler Metastasen. Neuro-Onkologische Arbeitsgemeinschaft in der Deutschen Krebsgesellschaft.

**Schlegel** U, Weller M, Westphal M. 2003. Neuroonkologie. Zweite Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

**Schmidt** F, Faul C, Dichgans J, Weller M. 2002. Low molecular weight heparin for deep vein thrombosis in glioma patients. Journal Neurology, 249:1409-1412.

**Sciacca** FL, Ciusani E, Silvani A, Corsini E, Frigerio S, Pogliani S, Parati E, Croci D, Boiardi A, Salmaggi A. 2004. Genetic and Plasma Markers of Venous Thromboembolism in Patients with High Grade Gliomas. Clinical Cancer Research, 10:1312-1317.

**Shikamoto** Y, Morita T. 1999. Expression of factor X in both the rat brain and cells of the central nervous system. *FEBS Letters*, 463:387-389.

**Simanek** R, Vormittag R, Hassler M, Roessler M, Schwarz S, Zielinski C, Pabinger I, Marosi C. 2007. Venous thromboembolism and survival in patients with high-grade glioma. *Neuro-Oncol.*, 9(2):89-95.

**Sørensen** HA, Melemkjoer L, Olsen JH, Baron JA. 2000. Prognosis of Cancers Associated with Venous Thromboembolism. *The New England Journal of Medicine*, 343:1846-1850.

**Stupp** R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO. 2009. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* [submitted]

**Taketomi** T, Szlam F, Bader S, Sheppard C, Levy J, Tanaka K. 2008. Effects of recombinant activated factor VII on thrombin-mediated feedback activation of coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 19(2):135-41.

**Thomas** L. 2005. *Labor und Diagnose*. Sechste Aufl. Frankfurt am Main: TH-Books.

**Van Meir** EG, Brat DJ. 2004. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Laboratory investigation*, 84:397-405.

**Valdes-Camin** R, Callahan JB, Ebert RF. 1994. A high-sensitivity thromboplastin reagent prepared from cultured human cells. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 5(4):617-624.

**Walsh** DC, Kakkar AK. 2001. Thromboembolism in brain tumors. *Curr Opin Pulm Med*, 7(5):326-331.

**Weller M.** 2004. Interdisziplinäre S 2 - Leitlinie für die Diagnostik und Therapie der Gliome des Erwachsenenalters. München, Bern, Wien, New York: W. Zuckschwerdt Verlag.

**www.cebtrus.org** (Central Brain Tumor Registry of the United States)

**Yamahata H,** Takeshima H, Kuratsu J, Sarker K, Tanioka K, Wakimaru N, Nakata M, Kitajima I, Maruyama I. 2002. The role of thrombin in the neo-vascularization of malignant gliomas: an intrinsic modulator for the up-regulation of vascular endothelial growth factor. *Int J Oncol*, 20(5):921-928.

**Zieger M,** Tausch S, Heuklein P, Nowak G, Kaufmann R. 2001. A novel PAR-1-Type Thrombin receptor signaling pathway: Cyclic AMP-independent activation of PKA in SNB-19 Glioblastoma cells. *Biochemical and Biophysical Research communications*, 282:952-957.

## **9. Anhang**

### **9.1. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. R. Kalff, dem Direktor der Klinik für Neurochirurgie, danke ich für seine Unterstützung, Hilfe und die Möglichkeit, in seinem Team mitzuwirken.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Susanne Kuhn für die Möglichkeit, diese Thematik zu bearbeiten sowie für stets sehr interessante Anregungen, die halfen mein wissenschaftliches Denken zu fordern und zu fördern.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Uwe Hanisch danke ich für die Ermittlung der experimentellen Rohdaten für die Expressionsanalysen des PAR-1 in humanen Gliomzellen und für die funktionellen Tests.

Bei Prof. Dr. med. Deufel möchte ich mich für die hilfreiche Beantwortung von Fragen zur methodischen Durchführung und die Möglichkeit zur Nutzung des Labors der Klinischen Chemie bedanken.

Den Medizinisch-Technischen Assistentinnen vom „Gerinnungs-Arbeitsplatz“, besonders Frau Oder und Frau Zwirnmann, danke ich für ihre große Geduld und ebenso große fachliche Kompetenz bei der Laborarbeit.

Frau Cornelia Heyer möchte ich für die gute Koordination und stets freundliche Unterstützung danken.

Meinen Eltern Ines und Thomas Handel, meinem Bruder Till sowie meinen Großeltern Rosemarie und Dr. med. Jürgen Handel danke ich für die erholsamen Stunden zu Hause und stets ermunternde Worte, wenn Bedarf bestand.

Besonders möchte ich mich auch bei Christian für seine Geduld, nervenaufreibende Korrekturen und hilfreiche Anregungen bedanken.

## 9.2. Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name, Vorname: Handel, Linn  
Geburtsdatum: 28.06.1984  
Geburtsort: Dresden  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

09/1989 Einschulung  
1990 – 1994 Grundschule Niederlößnitz, Radebeul  
1994 – 2002 Gymnasium Luisenstift, Radebeul  
06/2002 Abitur  
2002 – 2003 Europäischer Freiwilligendienst in Palencia,  
Spanien

### Berufsausbildung

seit 2003 Studium der Humanmedizin an der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena  
09/2005 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2005 – 2006 Tutorin für den Mikroskopischen Kurs am  
Institut für Anatomie/Anatomie II  
seit 06/2006 Promotion in der Klinik für Neurochirurgie  
des Universitätsklinikums Jena

Jena, den 22.06.2009

Unterschrift

### 9.3. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

1. Frau Dr. med. Susanne Antje Kuhn bei der Konzeption der Arbeit, sowie durch Unterstützung in klinischen Fragen
2. Herr Prof. Dr. rer. nat. Uwe Hanisch durch Ermittlung der experimentellen Rohdaten für die Expressionsanalysen des PAR-1 in humanen Gliomzellen und durch die funktionellen Tests
3. die Medizinisch-Technischen Assistentinnen des Instituts für Klinische Chemie, insbesondere Frau Oder und Frau Zwirnermann, in der Durchführung der Bestimmung der Gerinnungsfaktoren, D-Dimere, Antithrombin III sowie des Fibrinogens
4. Frau Dr. Ing. M. Sc. Hoyer in statistischen Fragen,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 22.06.2009

Unterschrift