

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie
(Direktor: Professor Dr. med. Henry W. S. Schroeder)
der Universitätsmedizin Greifswald

**Ex vivo Untersuchungen zur primären Hämostase und der Interaktion zwischen
Thrombozyten und Leukozyten bei Patienten mit *Glioblastoma multiforme***

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2021

vorgelegt von:
Maximilian Splittstöhser
geb. am: 18.08.1993
in: Berlin-Mitte

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich
1. Gutachter: Prof. Dr. med. Henry W. S. Schroeder
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Synowitz

Ort, Raum: Zoom Videokonferenz, Meeting-ID: 667 4920 2874
Tag der Disputation: 05.04.2022

Für Spencer

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Hämostase im Kontext maligner Erkrankungen.....	1
1.2 Glioblastoma multiforme.....	2
1.2.1 Das GBM hat ein lokal und systemisch wirkendes prokoagulatorisches Potential	4
1.2.2 Sphingosin-1-Phosphat und das Tumormikromilieu im GBM.....	5
1.3 Der Thrombozyt.....	7
1.3.1 Funktion wichtiger thrombozytärer Oberflächenrezeptoren	8
1.3.3 Heterotype Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten.....	11
1.4 Rolle der Thrombozyten in der Pathophysiologie des GBM	12
2 Zielstellung und Hypothesen	14
3 Materialien	15
4 Methoden	19
4.1 Patientenrekrutierung und Präanalytik	19
4.2 Bestimmung der Thrombozytenaktivität und der Bildung heterotyper Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate.....	20
4.2.1 Durchflusszytometrie als Methode.....	20
4.2.2 Probenprozessierung zur Messung der Thrombozytenaktivität.....	21
4.2.3 Probenprozessierung zur Messung der Bildung von heterotyphen Konjugaten.....	23
4.2.4 Analyse durchflusszytometrischer Experimente	23
4.3 Bestimmung des gesamten zirkulierenden P-Selektins.....	26
4.3.1 ELISA als Methode	26
4.3.2 Versuchsdurchführung und Probenprozessierung	26
4.3.3 Auswertungsstrategie	27

4.4 Bestimmung von zirkulierendem Sphingosin-1-Phosphat	28
4.4.1 Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie als Methode	28
4.4.2 Versuchsdurchführung und Probenprozessierung	28
4.4.3 Auswertungsstrategie	29
4.5 <i>Thrombin Generation Assay</i> und Thrombinbestimmung	29
4.5.1 <i>Thrombin Generation Assay</i> als Methode.....	29
4.5.2 Probenprozessierung und Versuchsdurchführung	29
4.5.3 Auswertungsstrategie	30
4.6 Statistische Auswertung	30
5 Ergebnisse	31
5.1 Charakterisierung der Patientenkohorte	31
5.2 Bestimmung der Aktivität zirkulierender Thrombozyten sowie deren <i>ex-vivo</i>-Reaktivität auf die Agonisten ADP und TRAP	32
5.2.1 Funktionsnachweis der <i>ex-vivo</i> -Thrombozytenstimulation.....	32
5.2.2 P-Selektin-Expression auf Thrombozyten	33
5.2.3 CD63-Expression auf Thrombozyten	34
5.2.4 Spezifische Fibrinogenanbindung an den aktivierten thrombozytären GPIIb/IIIa	35
5.2.5 CD40L-Expression auf Thrombozyten.....	36
5.3 Bildung von heterotypen Thrombozyten-Leukozyten-Konjugaten	38
5.3.1 Thrombozyten-Monozyten-Konjugate	38
5.3.2 Thrombozyten-Granulozyten-Konjugate	39
5.3.3 Thrombozyten-Lymphozyten-Konjugate	40
5.4 Expression von CD11b auf Leukozytenpopulationen	41
5.4.1 Expression von CD11b auf Monozyten	41
5.4.2 Expression von CD11b auf Granulozyten.....	42
5.4.3 Expression von CD11b auf Lymphozyten.....	43
5.5 Bestimmung des gesamten thrombozytären P-Selektins im Blutplasma	44
5.6 Bestimmung von zirkulierendem Sphingosin-1-Phosphat	45

5.7 Bestimmung der Gesamt-Thrombin-Bildungskapazität	46
5.8 Übersicht der Ergebnisse	48
6 Diskussion	49
6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	49
6.2 Limitationen der Dissertation	49
6.3 Aktivitätsstatus zirkulierender Thrombozyten im GBM	51
6.4 <i>Ex-vivo</i> -Reaktivität der Thrombozyten von GBM-Patienten auf spezifische Agonisten	54
6.5 Heterotype Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten bei GBM-Patienten	56
6.6 CD11b und Aktivierung der Leukozyten	58
6.7 Sphingosin-1-Phosphat als pleiotropes Molekül im GBM	59
6.8 Sekundäre Hämostase bei GBM-Patienten.....	60
6.9 Translationale Relevanz der Dissertation	61
7 Zusammenfassung.....	64
8 Summary.....	65
9 Literaturverzeichnis.....	66
10 Anhang.....	79
10.1 Pufferherstellung.....	79
10.1.1 Tyrode-Puffer.....	79
10.1.2 PBS.....	79
11 Eidesstattliche Erklärung	81
12 Danksagung.....	82

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	-	Abbildung
AcN	-	Acetonitril
ADP	-	Adenosindiphosphat
APC	-	Allophycocyanin (Fluorochrom)
ATP	-	Adenosintriphosphat
BSA	-	Bovines Serumalbumin
CML	-	chronisch-myeloische Leukämie
ELISA	-	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ET	-	essenzielle Thrombozythämie
FCS	-	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	-	Fluorescein (Fluorochrom)
FSC	-	<i>Forward Scatter</i> (Vorwärtststreulicht)
GBM	-	<i>Glioblastoma multiforme</i>
GP...	-	Glykoprotein... (GPIIb/IIIa, GPIb-IX-V, GPIb α , GPIIb α , GPIX, GPV)
HEPES	-	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGG	-	<i>High-Grade Glioma</i> (Astrozytome Grad III & IV)
HRP	-	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IDH	-	Isocitrat-Dehydrogenase
MFI	-	Mediane Fluoreszenzintensität
MGMT	-	<i>O</i> ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
PAR	-	Protease-aktivierter Rezeptor
pAVK	-	peripher arterielle Verschlusskrankheit
PBS	-	<i>Phosphat buffered saline</i>
PDGFR	-	<i>Platelet derived growth factor receptor</i>
PE	-	Phycoerythrin (Fluorochrom)
PMF	-	primäre Myelofibrose
PPP	-	plättchenarmes Plasma (<i>platelet poor plasma</i>)
PRP	-	plättchenreiches Plasma (<i>platelet rich plasma</i>)
PSGL-1	-	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
PV	-	Polycythaemia vera

Abkürzungsverzeichnis

S1P	- Sphingosin-1-Phosphat
S1P-R	- Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor
SSC	- <i>Sideward Scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
TAM	- tumorassoziierte Makrophagen
TCIPA	- <i>Tumor cell-induced platelet aggregation</i>
TF	- <i>Tissue factor</i>
TGK	- Thrombozyten-Granulozyten-Konjugate
TLK	- Thrombozyten-Lymphozyten-Konjugate
TMB	- Tetramethyl-Benzidin
TMK	- Thrombozyten-Monozyten-Konjugate
TNF α	- Tumornekrosefaktor α
TRAP	- Thrombin-Rezeptor-Aktivator-Peptid
TVT	- tiefe Beinvenenthrombose
VEGF	- <i>Vascular endothelial growth factor</i>
VTE	- venös thrombembolisches Ereignis
vWF	- von-Willebrand-Faktor

1 Einleitung

1.1 Hämostase im Kontext maligner Erkrankungen

Unter dem *Trousseau Syndrom* versteht man ein paraneoplastisches Syndrom, das das Auftreten thrombotischer Ereignisse im Rahmen von malignen Erkrankungen beschreibt. Dieses Syndrom geht auf den französischen Arzt und Wissenschaftler Armand Trousseau zurück, der als einer der ersten den Zusammenhang zwischen einer erhöhten Blutgerinnung und malignen Erkrankungen herstellte. Im Jahr 1865 veröffentlichte er sein Werk „*Clinique Medicale de l'Hotel-Dieu de Paris*“. Unter anderem prägte er hierin den Begriff „*Phlegmatia Alba Dolens*“ – ursprünglich das Auftreten einer progredienten Thrombophlebitis bei Patienten mit malignen Tumorerkrankungen – ein häufig initiales Symptom von Tumorerkrankungen. Trousseau bemerkte bereits zu seiner Zeit, dass jene Patienten, die unter ihrer malignen Erkrankung eine Thrombophlebitis entwickelten, mit einer schlechteren Prognose assoziiert waren [1-4].

Die Assoziation von venös thrombembolischen Ereignissen (VTE) mit reduziertem Gesamtüberleben konnte in jüngeren Studien bestätigt werden. Patienten mit malignen Erkrankungen und der zusätzlichen Entwicklung einer tiefen Beinvenenthrombose (TVT) oder Lungenarterienembolie haben ein doppelt so hohes Risiko, innerhalb eines Jahres zu versterben, als jene Patienten ohne Entwicklung eines VTE [5].

Auch heute noch zeigt sich eine deutlich höhere Inzidenz von VTE mit 500/100.000 Fällen pro Jahr bei Patienten mit Malignomen, verglichen mit 70 - 113/100.000 Fällen pro Jahr bei der Allgemeinbevölkerung [6]. Das Risiko ein VTE zu entwickeln, ist damit bei Patienten mit malignen Erkrankungen verglichen mit Patienten ohne maligne Erkrankungen um das 5- bis 7-fache erhöht [6-8]. Dieses Risiko erhöht sich zudem in Abhängigkeit von der malignen Tumorentität. Bei Patienten mit Ovarial-, Pankreas- oder Gehirntumoren ist das Risiko ein VTE zu entwickeln, gegenüber Tumoren des Hals-Kopf-Bereichs, der Blase oder Brust um das 5-fache erhöht [9].

Maligne Gliome, darunter vor allem das *Glioblastoma multiforme* (GBM), haben ein hohes koagulatorisches Potential [10, 11]. Die genauen Pathomechanismen, die zu

dem erhöhten Koagulationspotential bei Tumorpatienten führen, wurden bislang vorwiegend in Hinblick auf die plasmatische Gerinnung untersucht [12, 13]. Die Wechselwirkung zwischen der primären Hämostase und den malignen Gliomen ist bislang unzureichend untersucht, weshalb dies ein Hauptziel der vorliegenden Dissertation darstellt [6].

1.2 Glioblastoma multiforme

Das GBM ist der häufigste maligne Tumor des zentralen Nervensystems bei Erwachsenen. Seine Inzidenz beträgt 3-5/100.000 pro Jahr wobei die Prognose als infaust gilt [14, 15]. Unter der aktuellen Standardtherapie konnte die Überlebenszeit auf im Median 14,6 Monate verlängert werden [16]. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt derzeit bei 5,5%. Allgemein erkranken Männer um den Faktor 1,58 etwas häufiger als Frauen, das mediane Erkrankungsalter liegt dabei bei 64 Jahren [15]. Die Diagnose des GBM wird klassischerweise durch den histopathologischen Nachweis gesichert, welcher nach der neuesten WHO-Klassifikation durch molekularbiologische Untersuchungen flankiert wird [11, 17].

Der Begriff des GBM ist auf die beiden Neurochirurgen Percival Bailey und Harvey Cushing zurückzuführen, welche Anfang des 20. Jahrhunderts im *John Hopkins Hospital* in Baltimore, Maryland, praktizierten [18]. Schon 1864 prägte Rudolf Virchow den Begriff der „Gliome“. Einen weiteren Beitrag lieferte 1940 der deutsche Neuropathologe Hans Joachim Scherer, welcher das GBM in 2 Subtypen, das primäre und sekundäre GBM unterteilte [19].

Das GBM ist eine Entartung der Astrozyten, den glialen Stützzellen des Gehirns. Auf Grund seiner aggressiven Natur wird es von der WHO dem höchsten Grad zugeordnet. Es befindet sich mit den histologischen Subtypen des Gliosarkoms, Riesenzellglioblastoms und epitheloiden Glioblastoms in der Gruppe der Grad IV-Astrozytome [11, 20].

Das histopathologische Bild ist vielgestaltig und sehr heterogen. Als typisch zeigt sich eine zentrale nekrotische Region, welche von vitalem Tumorgewebe mit mikrovaskulären Aussprossungen und proliferativen Arealen umgeben ist. Der

Tumor setzt sich aus sowohl neoplastischem Gewebe als auch Stromagewebe zusammen [14].

Das GBM wird entsprechend seiner molekulargenetischen Eigenschaften und seines Entstehungsmechanismus in das primäre und das sekundäre GBM unterteilt.

Das primäre GBM entsteht *de novo*, vorwiegend in Patienten jenseits des 50. Lebensjahres und zeichnet sich vor allem durch *epidermal-growth-factor*-Amplifikationen und -Mutationen, *Loss of Heterozygosity* des Chromosoms 10q, Deletion des PTEN-Gens und p16 Deletion aus. Das sekundäre GBM kommt überwiegend bei Patienten unter 50 Jahren vor und entwickelt sich aus niedriggradigen Astrozytomen vorwiegend durch Transformation über einen längeren Zeitraum bis hin zu Jahren. Diese Form ist wesentlich seltener, zeichnet sich jedoch durch Mutationen im p53-Tumor-Suppressor-Gen, Überexpression von *Platelet derived growth factor receptor* (PDGFR), Veränderungen im p16- und Retinoblastomsignalweg sowie ebenfalls *Loss of Heterozygosity* des Chromosoms 10q aus. Eine klinische oder morphologische Unterscheidung ist hinsichtlich der beiden Subtypen nicht möglich. Ebenso wenig unterscheidet sich deren Standardtherapie. Lediglich hinsichtlich neuer, moderner Therapiemöglichkeiten könnten diese genetischen Unterschiede eine Rolle hin zu zielgerichteten Therapieansätzen spielen [14].

In der aktuellen WHO-Klassifikation der Tumore des ZNS von 2016 spielen erstmals auch molekulargenetische Marker in der Subklassifizierung maligner Gliome eine Rolle [11, 17, 21]. Einen wichtigen Beitrag zur Subklassifizierung des GBM spielt dabei der Mutationsstatus der Isocitrat Dehydrogenase (IDH) 1 und 2. Eine mutierte IDH 1/2 ist vorwiegend bei sekundären GBM zu finden, wohingegen der Wildtyp in primären *de novo* GBM vorliegt [11, 21]. Prognostisch ist die Mutation der IDH 1 oder 2, verglichen zum Wildtyp, mit einem längeren Überleben der Patienten assoziiert [22, 23].

Ohne Einfluss auf die Subklassifizierung aber eine trotzdem wichtige Analyse in der Routinediagnostik des GBM ist die Bestimmung des Methylierungsstatus des Promotors der *O*⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT). Ein methylierter MGMT-Promoter zeigt ein besseres Ansprechen auf die Therapie mit Temozolomid und ist mit einem verlängerten Gesamtüberleben der Patienten verbunden [24].

Die eingangs erwähnte Standardtherapie des GBM besteht seit 2005 und umfasst derzeit drei Behandlungsoptionen: die operative Resektion aller kontrastmittelaufnehmenden Tumoranteile im MRT gefolgt von einer Radiochemotherapie mit Temozolomid. An erster Stelle steht die operative Resektion des Tumors, mit dem Ziel, die Tumormasse größtmöglich zu entfernen, ohne dabei neurologische Defizite zu generieren. Die alleinige Operation verbessert die Prognose der Patienten und reduziert verdrängungsbedingte Symptome [25-28]. Anschließend erfolgt eine Radiotherapie nach standardisiertem Protokoll mit 2 Gy pro Tag über 30 Tage und einer kumulativen Gesamtdosis von 60 Gy. Ergänzend dazu erfolgt eine chemotherapeutische Unterstützung mit Temozolomid [16]. Nach dem letztlich enttäuschenden Ergebnis der anti-angiogenetischen Therapieansätze beim GBM, sind im Jahr 2019 vor allem die Therapie mit Wechselstromfeldern und experimentelle immuntherapeutische Ansätze für den Patienten die am vielversprechendsten innovativen Therapieformen [11, 29-32].

Obwohl die Bluthirnschranke durch das GBM geschädigt ist, stellt die Umgehung der restlich intakten Bluthirnschranke einen nicht unwichtigen Anteil an der Entwicklung weiterer effektiver Therapieansätze dar. Derzeit sind direkte invasive Verfahren, wie die Implantation eines Katheters bei der *convection enhanced delivery*, aber auch indirekte, nicht-invasive Verfahren wie die Ultraschall gestützte Unterbrechung der Bluthirnschranke, die *peptide carrier mediated delivery*, die Nanomedizin und die Verwendung von Hydrogelen im Fokus aktiver Forschung, um die Therapie des GBM zu optimieren [19].

1.2.1 Das GBM hat ein lokal und systemisch wirkendes prokoagulatorisches Potential

Patienten mit *High-Grade Glioma* (HGG) (Astrozytom Grad III oder IV) gehören zu einer Hochrisikogruppe in Bezug auf die Entwicklung thrombembolischer Ereignisse [10, 11]. Bei einer Untersuchung von über 9000 Patienten mit HGG konnten *Semrad et al.* aufzeigen, dass diese Patienten nach 2 Jahren eine 30 % höhere Mortalität aufwiesen als jene, die keine TVT entwickelten [33]. *Smith et al.* bestätigten mit ihrer retrospektiven Untersuchung die hohe Rate an TVT unter HGG-Patienten, konnten aber keinen direkten Zusammenhang mit einer erhöhten

Mortalität nachweisen. Jedoch verbrachten HGG-Patienten mit TVT wesentlich mehr Zeit auf einer Intensivstation als jene, die keine TVT entwickelten [34].

Das prokoagulatorische Potential im GBM spiegelt sich systemisch und vor allem lokal im Tumor selbst wider. Ein intraoperatives und histopathologisches Kennzeichen des GBM sind zahlreiche thrombosierte Gefäße [10, 35].

Systemisch entlädt sich dieses Potential in einer erhöhten Inzidenz von vaskulären thrombembolischen Ereignissen. GBM-Patienten zeigen von allen malignen Erkrankungen die höchste Inzidenz für die Entwicklung von systemischen VTE wie TVT und Lungenarterienembolien auf [10, 35]. Die Inzidenz ein systemisches VTE zu erleiden liegt bei GBM-Patienten zwischen 10 % bis über 30 % [11, 33, 36-38]. Eine Feststellung der genauen Todesursache bei GBM-Patienten stellt auf Grund der multifaktoriellen Bedingungen und relativ geringen Obduktionsraten eine Herausforderung dar. *Brockmann et al.* fanden jedoch bei 3 von 8 obduzierten GBM-Patienten einen Anhalt für thrombembolisch bedingte Todeseintritte [39]. Darüber hinaus wurde in der Studie von *Fisher et al.* auch ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen wie Herzinsuffizienz, Herzinfarkt und Koronarer Herzkrankheit bei GBM-Patienten festgestellt [36].

Die genauen Ursachen, die zu diesem prokoagulatorischen Potential des GBM beitragen, sind unzureichend geklärt. Bis dato ermittelte Risikofaktoren stellen Beinpareesen, reduzierte Mobilität, die Therapie mit Kortikosteroiden sowie osmotisch aktive Infusionen zur Senkung des Hirndrucks, Chemotherapie und plasmatische Veränderungen dar [37, 38]. Bezüglich des plasmatischen Einflusses wurden bis jetzt erhöhte Spiegel von *Tissue factor* (TF) und *Plasminogen activator inhibitor*, sowie reduzierte Spiegel von *Tissue plasminogen activator* bei GBM-Patienten identifiziert [10]. Der Einfluss der primären Hämostase auf das prokoagulatorische Potential von GBM-Patienten ist bislang unzureichend charakterisiert.

1.2.2 Sphingosin-1-Phosphat und das Tumormikromilieu im GBM

Das Tumormikromilieu des GBM enthält viele verschiedene Zellarten, ist sehr heterogen aufgebaut und wesentlich für die Pathologie des Tumors. Es finden sich dort in enger Beziehung Tumorzellen (Tumorstammzellen und nicht-

Tumorstammzellen) und nichttumoröse Zellen des umgebenden Stromagewebes (Mikroglia, Astrozyten, Fibroblasten, Endothelzellen). Die Bedeutung dieses Mikromilieus liegt in der besonderen Interaktion zwischen Tumorzellen und nicht-Tumorzellen, welche insgesamt der Förderung der Tumorentwicklung und dessen Progression dienen [40]. Besonders hervorzuheben ist hierbei die Interaktion zwischen Tumorzellen und den Tumor-assoziierten-Makrophagen (TAM), den residenten Mikrogliazellen im Tumorgewebe und den aus der Peripherie rekrutierten Makrophagen [40, 41]. TAM existieren in 2 Phänotypen, dem M1- und M2-Phänotyp. Während der M1-Phänotyp mit entzündlichem Geschehen, Immunabwehr sowie der Tumorkontrolle assoziiert ist, stellt der M2-Phänotyp einen eher konträren, antiinflammatorischen, homöostaseerhaltenden und tumorsupportiven Phänotyp dar [40, 41]. Das GBM sorgt aktiv durch Chemokin-Sekretion für die Ansiedlung und Umwandlung der TAM hin zu einem M2-Phänotyp. Es zeigt sich eine positive Korrelation zwischen dem Grad der histologischen Malignität von Gliomen mit der Menge an dort vorherrschenden M2-TAM im Tumorgewebe [40-42].

Das ubiquitär vorkommende Signalmolekül Sphingosin-1-Phosphat (S1P) hat eine wichtige Bedeutung im Tumormikromilieu des GBM. Im GBM selbst ist es an diversen Signalwegen wie der Tumorproliferation beteiligt [43]. S1P ist jedoch in vielen weiteren Geweben und mannigfaltigen Prozessen wie der Zellmotilität, der Zellproliferation, dem Zellüberleben und an Entzündungsgeschehen beteiligt [44, 45]. Der vielfältige Einfluss dieses Moleküls ergibt sich unter anderem durch die 5 unterschiedlichen S1P-Rezeptoren (S1P-R₁₋₅), welche nicht nur je nach Gewebe unterschiedlich verteilt vorkommen, sondern auch alle unterschiedliche Effekte hervorrufen [45]. Im GBM werden 4 der 5 S1P-R (S1P-R₁₋₃ und S1P-R₅) exprimiert [43].

S1P wird durch die Phosphorylierung von Sphingosin durch Sphingosinkinasen (SPK) generiert und kann durch S1P-Phosphatasen dephosphoryliert bzw. durch die S1P-Lyase terminal eliminiert werden [41, 43, 45]. Die S1P-Konzentrationen zwischen den Geweben und dem Blut sind in engen Grenzen kontrolliert und werden als Schlüsselfaktor der Signalwirkung von S1P vermutet [45, 46]. In humanem Plasma liegen die S1P-Konzentrationen für gewöhnlich im unteren mikromolar Bereich, in den Geweben sogar erheblich darunter [45]. Erhöhte S1P-Konzentrationen sind in

GBM-Gewebe nachgewiesen worden [47]. Ein Migrationsbestreben hin zu hohen S1P-Konzentrationen konnte im Mausmodell für M1-polarisierte Makrophagen nachgewiesen werden [48].

S1P spielt auch eine maßgebende Rolle hinsichtlich der TAM-Polarisierung. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass S1P die Umwandlung vom M1-Phänotyp zum M2-Phänotyp begünstigt [41, 49, 50].

1.3 Der Thrombozyt

Der italienische Professor Giulio Bizzozero war 1881/82 der erste, der Thrombozyten wissenschaftlich beschrieb und international publizierte [51].

Die Thrombozyten sind mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 2 - 5 μm neben Erythrozyten und Leukozyten die kleinsten Zellen des Blutes. Sie entwickeln sich aus Megakaryozyten im Knochenmark neben den anderen Zellen der Hämatopoese. Ihre Lebenszeit in der Blutzirkulation beträgt 7 - 10 Tage. Zusammen mit Erythrozyten sind sie die einzigen Zellen, die keinen Zellkern mehr besitzen. Deshalb können sie sich nicht durch Proteinsynthese an neue Situationen anpassen. Sie sind jedoch mit einer Vielzahl von präsynthetisierten Proteinen ausgestattet und kompensieren diesen Nachteil durch ihre Morphologie sowie die Fähigkeit, über diverse Rezeptorsysteme mit anderen Zellen in Interaktion zu treten [52, 53].

Ruhende Thrombozyten sind diskoid geformt und bestehen aus einer nicht dehnbaren aber eingefalteten doppelten Phospholipidmembran. Sie besitzen ein spezielles Kanalsystem, diverse Oberflächenrezeptoren, besondere intrazelluläre Granula sowie ein spezialisiertes Zytoskelett, welches maßgebend für ihre Zellfunktionalität ist [53].

Aktivierte Thrombozyten erfahren eine Konformationsänderung hin zu einer eher amöboid wirkenden Gestalt mit Ausbildung zahlreicher Filopodien [53].

Die Granula des Thrombozyten lassen sich im elektronenmikroskopischen Bild in α - und dichte Granula unterscheiden. Diese Granula werden bei der Thrombozytenaktivierung mit der Zellmembran fusioniert und die enthaltenen Substanzen werden in die Zellmembran integriert oder in den Extrazellulärraum exozytiert [53, 54]. Die α -Granula enthalten vorwiegend in der Vesikelmembran

integrierte Zelloberflächenproteine, wie zum Beispiel P-Selektin und GPIIb/IIIa, aber auch viele lösliche Bestandteile wie Fibrinogen, *von-Willebrand-Faktor* (vWF) und lösliches P-Selektin [53].

In den dichten Granula sind vor allem hämostatisch aktive Moleküle wie Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), Serotonin oder Calcium aber auch CD63 zu finden [53].

Thrombozyten sind vor allem für ihre Funktion als Hauptprotagonisten in der primären Hämostase bekannt, doch haben sie weitaus mehr Funktionen. So spielen sie in zahlreichen anderen Prozessen wie bei Entzündungen (Atherosklerose, Sepsis, Arthritis), Immunprozessen und der Angiogenese eine Rolle [55]. Darüber hinaus können Thrombozyten mit im Blut zirkulierenden Tumorzellen im Rahmen der *Tumor cell-induced platelet aggregation* (TCIPA) interagieren [56, 57]. Auf verschiedenen Wegen verhindern sie dabei die NK-Zell vermittelte Zellyse und begünstigen Metastasierung [58, 59].

1.3.1 Funktion wichtiger thrombozytärer Oberflächenrezeptoren

Die spezielle Charakteristik und die speziellen Eigenschaften der Thrombozyten werden maßgeblich durch ihre Oberflächenrezeptoren und Granula bestimmt. Werden Thrombozyten aktiviert, kommt es nicht nur zu einer morphologischen Veränderung, sondern auch zu einer Veränderung der Rezeptorexpression auf der Oberfläche von Thrombozyten. Allein die Aktivierung von Thrombozyten beruht auf Rezeptorinteraktionen mit entsprechenden Liganden. Die wichtigsten physiologischen Thrombozytenaktivatoren sind Thrombin, Thrombin-Rezeptor-Aktivat-Peptid (TRAP), ADP und Thromboxan A₂. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie und entsprechenden Antikörpern können diese Veränderungen erfasst und die Aktivierung bzw. Aktivierbarkeit von Thrombozyten gemessen werden [60, 61].

Im Folgenden werden die für die vorliegende Dissertation wichtigsten Oberflächenrezeptoren genauer beschrieben (s. Abb. 1).

GPIb-IX-V ist ein omnivalent auf Thrombozyten exprimierter Rezeptorkomplex, der der Familie der *Leucin-Rich-Repeat*-Rezeptoren angehört. Er besteht aus 4 Untereinheiten: GPIb α (CD42b), GPIb β (CD42c), GPIX (CD42a) und GPV (CD42d).

Seine Funktionen liegen in der Initiation der Adhäsion von Thrombozyten an die subendotheliale Matrix, das Endothel oder auch an Leukozyten, wobei GPIb α (CD42b) die Hauptligandenbindungsstelle ist. Hierüber bindet er unter anderem an vWF. Außerdem ist der GPIb-IX-V an koagulatorischen Prozessen beteiligt, indem er α -Thrombin, FXI, FXII, FVa oder Kininogen bindet und deren Interaktion fördert. Er spielt weiterhin eine Rolle in der Zellkommunikation. GPIb-IX-V ist ein klassischer Thrombozytenmarker. Störungen dieses Rezeptorkomplexes führen zum Bernard-Soulier-Syndrom [61-63].

CD63 ist ein Tetraspanin. Es ist in dichten Granula gespeichert und gelangt via Granulafusion an die Oberfläche von aktivierten Thrombozyten. CD63 ist ein spezifischer Marker für aktivierte Thrombozyten [54, 62].

P-Selektin (CD62p) ist ein Adhäsionsmolekül aus der Familie der C-Typ-Selektine. Es wird nicht nur in den α -Granula von Thrombozyten gespeichert, sondern kommt auch auf Endothelzellen vor. Besonders nach Thrombozytenaktivierung wird es durch α -Granula-Fusion auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert und in die Zirkulation exozytiert. P-Selektin ist daher ebenfalls ein Marker der Thrombozytenaktivierung. Seine Bedeutung erlangt es durch seinen Gegenspieler, den P-Selektin Glykoprotein Liganden-1 (PSGL-1). Dieser findet sich auf neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und dendritischen Zellen. P-Selektin- und PSGL-1-Interaktionen sind essenziell für die Bindung von Leukozyten an Thrombozyten, um heterotype Konjugate zu bilden oder Leukozyten an verletzten Gefäßen im Rahmen der Thrombogenese zu rekrutieren. Darüber hinaus löst diese Interaktion die Fibrinbildung und das Thrombuswachstum aus [58].

GPIIb/IIIa (α IIb β 3) ist ein Integrin und fungiert als Adhäsionsrezeptor. Es gibt 2 Affinitätstatus von GPIIb/IIIa, einen niedrig-affinen und einen hoch-affinen. Der niedrig-affine GPIIb/IIIa-Rezeptor ist nicht in der Lage Liganden zu binden. Erst nach Thrombozytenaktivierung erfolgt ein Wechsel in den hoch-affinen Status durch intrazelluläre Signalkaskaden, die als *inside-out-signaling* zusammengefasst werden. In seinem hoch-affinen Zustand kann der GPIIb/IIIa-Rezeptor Liganden binden, bevorzugt Fibrinogen und vWF, womit er maßgebend zur Thrombozytenaggregation und Thrombusbildung beiträgt. Des Weiteren kann er Vitronectin, Fibronectin und Thrombospondin binden, die an der Thrombozytenadhäsion mitwirken und

letztendlich auch der Thrombozytenaggregation zuspitzen. Er stellt ebenfalls einen zuverlässigen Marker für die Thrombozytenaktivierung dar [64].

CD40L (CD154) ist ein Transmembranprotein, welches als Ligand von CD40 fungiert und strukturell mit dem Tumornekrosefaktor α (TNF α) verwandt ist. Die ursprüngliche Bedeutung wurde an aktivierten T-Zellen entdeckt, welche über die CD40L/CD40-Interaktion den Kontakt zu B-Zellen herstellen und damit eine zentrale Rolle in der humoralen Immunabwehr spielen. CD40L spielt aber auch bei Thrombozyten eine Rolle. Diese exprimieren eine basale Rate von CD40L und speichern weiteres CD40L in Granulamembranen. Dieses wird bei Thrombozytenaktivierung in die Zellmembran integriert und sogar eine lösliche Variante von CD40L exozytiert. B-Lymphozyten, Monozyten, Endothelzellen aber auch Thrombozyten selbst können CD40L via CD40 binden, was zum Entzündungsgeschehen beiträgt, Immunreaktionen initiiert oder auch hämostatische Folgen hervorrufen kann [65, 66].

Weitere wichtige Rezeptoren stellen die Thrombin-bindenden Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) und ADP-Rezeptoren dar.

Thrombin ist der potenteste Thrombozytenaktivator über die Bindung an PAR. Es gibt 4 Subtypen, PAR₁₋₄, jedoch werden nur PAR₁ und PAR₄ auf menschlichen Thrombozyten exprimiert. PAR₁ stellt den Hauptbindungspartner für Thrombin dar. Neben Thrombin können auch thrombinähnliche Moleküle wie TRAP Thrombozyten über PAR_{1/4} aktivieren [62, 67].

ADP stellt ein weiteres wichtiges Thrombozytenaktivierungsmolekül dar, vor allem weil es in den dichten Granula von Thrombozyten gespeichert und während der Aktivierung exozytiert wird. ADP bindet an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren P2Y₁ oder P2Y₁₂. Im Vergleich zu Thrombin ist ADP ein schwächerer Thrombozytenaktivator, der die morphologische Veränderung des Thrombozyten und die reversible Aggregation initiiert [62, 68].

Werden Thrombozyten aktiviert, kommt es unter anderem zu einer massiven Freisetzung von S1P. Thrombozyten speichern sehr viel S1P, da ihnen die S1P-Lyase zum Abbau von S1P fehlt und es somit zur Akkumulation kommt [44, 45]. Ca. 40 % des in PRP gemessenen S1P ist auf thrombozytäre Freisetzung zurückzuführen [45].

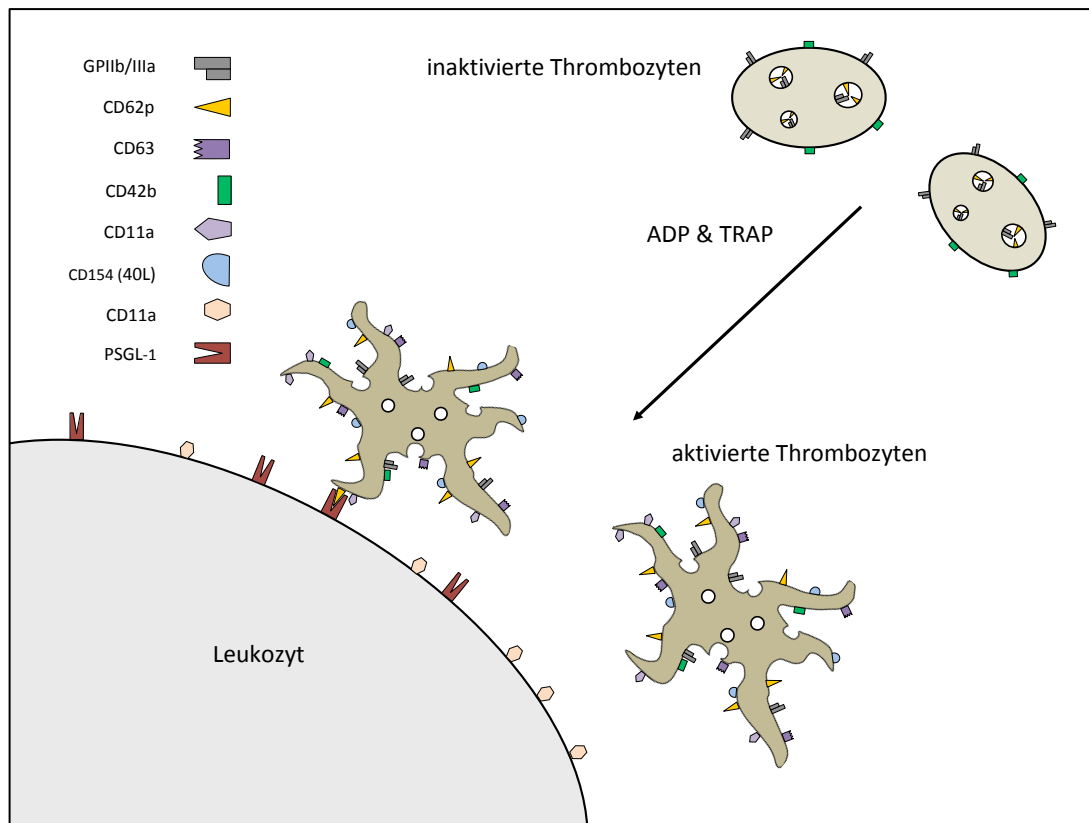


Abbildung 1: inaktivierte und aktivierte Thrombozyten mit Leukozyteninteraktion

1.3.3 Heterotype Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten

Durch heterotype Interaktionen mit immunkompetenten Zellen wird den Thrombozyten eine immunmodulatorische Funktion zu Teil.

Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate gelten als Surrogat proinflammatorischer Prozesse und sind in pathophysiologischen Prozessen wie Atherosklerose und Sepsis beschrieben [65, 69, 70]. Diese Konjugatbildung wird initial durch die bereits erwähnte P-Selektin/PSGL-1-Rezeptorinteraktion vermittelt und bildet sich zwischen Monozyten (TMK), Granulozyten (TGK) und Lymphozyten (TLK) aus, wobei die quantitativ stärkste Bindung mit den Monozyten stattfindet (s. Abb. 1) [69]. Die Konjugatbildung zwischen Thrombozyten und Leukozyten nimmt typischerweise zu, wenn Thrombozyten stark aktiviert sind [71, 72].

Die Monozyten werden durch diese Konjugatbildung aktiviert. Dadurch exprimieren diese mehr TF und proinflammatorische Mediatoren durch rezeptorvermittelte Verstärkung proinflammatorischer Genexpression. TMK dienen somit als Ausgangspunkt für das Zusammenspiel von intravaskulärer Entzündung und Hämostase. Sie stellen ein Surrogatparameter für Entzündungsgeschehen dar und sind ein sensibler Marker für aktivierte Thrombozyten [69, 71, 72].

TGK bilden sich vorwiegend zwischen aktivierten Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten aus, jedoch in geringerem Ausmaß verglichen mit TMK. Die Thrombozyten aktivieren die Granulozyten und fördern deren Adhäsions- und Phagozytosefähigkeit. Als heterotypes Konjugat können sie weitere neutrophile Granulozyten in entzündetem Gewebe rekrutieren. Sie spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Immunabwehr und Hämostase [65, 69, 70].

TLK haben die geringste Bildungsrate. In der Interaktion mit Lymphozyten unterstützen die aktivierten Thrombozyten vor allem T-Helferzellen, natürliche Killerzellen sowie B-Lymphozyten in deren Fähigkeit zur Adhäsion, Aktivierung und Migration in Lymphknoten sowie deren *Homing* via P-Selektin/PSGL-1-Bindung. Über CD40L/CD40-Interaktion können TLK weitere Lymphozyten rekrutieren [69].

1.4 Rolle der Thrombozyten in der Pathophysiologie des GBM

Schon 1872 beschrieb Leopold Riess eine „massive Erhöhung der Thrombozyten“ in Patienten mit Karzinomen und stellte damit den Zusammenhang zwischen Thrombozyten und malignen Erkrankungen her [56]. Eine Thrombozytose stellt in vielen Tumorleiden einen ungünstigen Prognosefaktor hinsichtlich einer kürzeren Überlebenszeit dar [56].

Obwohl das Potential von Thrombozyten in der Pathogenese von Tumoren seit längerem bekannt ist, gibt es doch relativ wenige Arbeiten, die den Zusammenhang von Thrombozyten und dem GBM untersucht haben. Ein Vorreiter ist das Forschungsteam um Prof. Marc A. Brockmann. In einer Arbeit von 2007 entdeckten sie erstmalig, dass die Thrombozytose ebenfalls einen negativen Prognosefaktor für GBM-Patienten darstellt [39]. Sie untersuchten den Zusammenhang zwischen Tumor und Thrombozytose und kamen in darauffolgenden Experimenten zu den

Ergebnissen, die die Thrombozytose am ehesten als Folge des GBM-Leidens erklären würden [73, 74]. Sie publizierten 2011 eine Studie, in der sie die Interaktion zwischen Thrombozyten und GBM-Zellen *in vivo* und *ex vivo* untersuchten. In den *ex vivo* Experimenten stellte sich heraus, dass in GBM-Zellkulturen, die mit den Exozytoseprodukten aktivierter Thrombozyten inkubiert wurden, die Proliferation und Migration der GBM-Zellen anstieg. Ebenfalls ließ sich im gleichen Versuchsaufbau ein positiver Einfluss dieser exozytierten Zytokine auf Endothelzellen nachweisen. Durch diese Ergebnisse angeregt, untersuchten sie diesen positiven Effekt von Thrombozyten auf das GBM-Wachstum und die Angiogenese in Mausmodellen. Hier konnten sie jedoch keinen solchen Effekt nachweisen. Zudem verglichen sie humanes GBM-Gewebe hinsichtlich der Tumorproliferation und der Gefäßdichte im Tumor in Abhängigkeit von der präoperativen Thrombozytenzahl. Hier konnten sie keine signifikante Korrelation nachweisen. Sie schlossen daraus, dass die Thrombozytose lediglich ein paraneoplastisches Phänomen des GBM sei und obwohl die *ex-vivo*-Ergebnisse einen tumorsupportiven Einfluss auf das GBM zeigten, schienen sie letztendlich *in vivo* keine Rolle zu spielen [74].

Dass die wahre Bedeutung von Thrombozyten in der Pathogenese des GBM damit nicht abschließend geklärt ist, zeigt eine Studie von 2017. *Di Vito et al.* kamen zu dem Ergebnis, dass der von Thrombozyten exozytierte *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) wesentlich an der Neovaskularisierung des GBM beteiligt ist und darüber hinaus in Thrombozyten von GBM-Patienten – verglichen zu gesunden Kontrollprobanden – in deutlich höheren Konzentrationen vorliegt [75].

2 Zielstellung und Hypothesen

Aus dem wissenschaftlichen Kontext wurden zu Beginn der Arbeit folgende Hypothesen aufgestellt:

1. Die Thrombozytenaktivität, gemessen an der Oberflächenexpression aktivitätsspezifischer Antigene (CD63, P-Selektin, CD40L, Charakterisierung des GPIIb/ IIIa) und der Sekretion von P-Selektin in das Blutplasma, ist bei Patienten mit GBM im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden gesteigert.
2. Im Rahmen der gesteigerten thrombozytären Aktivierung kommt es bei Patienten mit GBM zu einer vermehrten Bildung heterotyper Konjugate aus Thrombozyten und Leukozyten.
3. Die Gesamt-Thrombinbildungskapazität, als Marker für die globale Hämostase, ist bei Patienten mit GBM im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden gesteigert.
4. Die Plasmakonzentration von Sphingosin-1-Phosphat, ist bei Patienten mit GBM im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden verringert und kann somit als Marker einer systemischen Antiinflammation dienen.

3 Materialien

Geräte

Gerät	Firma
Durchflusszytometer	EMD Millipore Corporation
Zentrifuge	Thermo Scientific
Kühlschrank # 1 (4°C)	Viessmann
Kühlschrank # 2 (4°C)	Liebherr
Gefrierschrank (-20°C)	Viessmann
Gefrierschrank (-80°C)	Hans-S. Schröder GmbH
Pipette (0,5 - 10 µl)	Eppendorf
Pipette (10 - 100 µl)	Eppendorf
Pipette (100 - 1000 µl)	Eppendorf
Vortexer	VWR International
LC-MS/MS (1200L Triple Quadrupole MS)	Varian, Darmstadt
Prostar Autosampler	Varian, Darmstadt
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Vortex Reax Control	Heidolph Instruments, Schwabach
Fluoroskan Acent	Thermo Fisher
Zorbax SB-8C-Säule	Agilent Technologies
Wasserbad Büchi 461	Büchi
Infinite M200	Tecan Trading AG

Fluoreszenzmarkierte Antikörper

Antikörper	Firma
FITC Mouse IgG1 k Isotope Control	BD Pharmingen
FITC Mouse Anti-Human CD62P	BD Pharmingen
FITC Mouse Anti-Human CD63	BD Pharmingen
FITC Mouse Anti-Human CD154 (CD40L)	BD Pharmingen

3 Materialien

PE Mouse IgG1, k Isotope Ctrl (FC)	BioLegend
PE anti-human CD45	BioLegend
APC Mouse IgG1, k Isotope Ctrl (FC)	BioLegend
APC anti-human CD42b	BioLegend
APC anti-human CD11b	BioLegend
Fibrinogen Oregon Green 488 conjugate (from human plasma)	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)

Sonstige Reagenzien

Reagenz	Firma
TRAP	Biosyntan
ADP (Adenosine 5'-diphosphate sodium salt)	SIGMA
Tirofiban, Hydrochloride Hydrate	SIGMA
BD FACS(TM) Lysing Solution	BD Pharmingen
Guava ICF(R) Instrument Cleaning Fluid	EMD Millipore Corporation
Tyrodepuffer	laborinterne Herstellung (s. Anhang)
PBS	laborinterne Herstellung (s. Anhang)
Acetonitril (AcN)	Merck KGaA, Darmstadt
Ameisensäure	Fluka Chemie, Steinheim
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
S1P	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama
S1P- <i>d7</i>	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama
Sigmacote [®]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Wasser für HPLC	Merck KgaA, Darmstadt

3 Materialien

Thrombin Calibrator	Thrombinoscope BV
PPP-Reagent	Thrombinoscope BV
PRP-Reagent	Thrombinoscope BV
Fluo-Buffer	Thrombinoscope BV
FluCa-Kit	Thrombinoscope BV
Platinum ELISA Kit	Affymetrix eBioscience

Puffer und Lösungen

LC/MS-MS	Zusammensetzung
AcN 80 %	80% (v/v) AcN in Wasser für HPLC
Fließmittel A	0,1% (v/v) Ameisensäure in Wasser für HPLC
Fließmittel B	0,1% (v/v) Ameisensäure in AcN/Methanol (50/50, v/v)

Laborbedarf

Utensil	Firma
Butterfly (Safety-Lok™ Blood Collection Set) 21 G	Becton, Dickinson and Company
Monovetten Hirudin (2,7 ml)	Sarstedt
Vacutainer Citrat (2,7 ml)	Becton, Dickinson and Company
Probenröhrchen 1,5 ml farblos, mit Längsstegen	Biozym
Schraubverschlüsse, farblich gemischt	Biozym
Pipettenspitzen (100 - 1000 µl)	Ratiolab
Pipettenspitzen (50 - 1000 µl)	Eppendorf
Pipettenspitzen (10 - 100 µl)	Sarstedt
Pipettenspitzen (0,5 - 10 µl)	VWR International
Safe-Lock Tubes (2 ml)	Eppendorf
Safe-Lock Tubes (1,5 ml)	Eppendorf

3 Materialien

Safe-Lock Tubes (0,5 ml)	Eppendorf
Pipetboy Acu	Integra
Serological Pipette (5 ml)	Sarstedt
Serological Pipette (25 ml)	Sarstedt
Falcon-Tube 50 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
96-well-Polypropylenplatte (F-Boden)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zorbax SB-8C-Säule	Agilent Technologies

Software

Software	Hersteller	Version
guavaSoft (TM) software	EMD Millipore Corporation	2.6
GraphPad PRISM	GraphPad Software, Inc.	6.0 c
Varian MS Workstation, Version 6.9	Agilent Technologies	6.9
Thrombinoscope, Version 5.0	Thrombinoscope BV	5.0
Tecan i-control	Tecan Trading AG	3.8.2.0

4 Methoden

4.1 Patientenrekrutierung und Präanalytik

Die Ethikkommission der Universitätsmedizin Greifswald erteilte ein positives Votum zu der vorliegenden Studie. Vor Blutentnahme wurden die Patienten bzw. Kontrollprobanden ausführlich über den Zweck und Nutzen, sowie die verbundenen Risiken der Studie aufgeklärt. Die Einwilligung erfolgte freiwillig durch schriftliches Einverständnis.

Da die vorliegende Studie auf Blutanalysen von GBM-Patienten vor jeder Art von Therapie abzielte, wurden im Studienzeitraum alle konsekutiven Patienten (n = 27) nach bildgebender Diagnostik mit Verdacht auf ein GBM eingeschlossen. Die histopathologische Aufarbeitung des Gewebes ergab bei n = 6 Patienten eine andere Diagnose sodass final n = 21 erstdiagnostizierte GBM-Patienten eingeschlossen werden konnten.

Eine geeignete Kontrollprobandengruppe wurde durch alters- und geschlechtsübereinstimmende Profilerhebung generiert und unter den elektiv aufgenommenen Patienten der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie Greifswald ausgesucht. Grundvoraussetzung für die Aufnahme in die Kontrollprobandengruppe war das Nichtvorhandensein von malignen, systemischen oder intrakraniellen Erkrankungen und / oder einer akuten Schmerzsymptomatik (vgl. Abb. 2).

Die Blutentnahme erfolgte aus einer superfiziellen Kubitalvene. Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde sich an ein etabliertes Blutentnahmeprotokoll zum Umgang mit Thrombozyten von der *European Working Group on Clinical Cell Analysis* gehalten [76]. Um die für Thrombozytenaktivierungsmessungen wichtige Kalziumhomöostase unbeeinträchtigt zu lassen, wurde mit Hirudin als Antikoagulanz gearbeitet. Die Blutstauung für die entsprechende Venenpunktion wurde auf ein Minimum reduziert. Nach der Venenpunktion wurden die ersten 5 ml des gewonnenen Blutes verworfen. Die protokollarische Aufarbeitung des Blutes im Rahmen der Thrombozytenaktivierungsmessungen begann binnen 10 min nach Blutentnahme [76].

Zusätzlich wurde aus Zitrat-antikoaguliertem-Blut Plättchenreiches-Plasma (PRP) und Plättchenarmes-Plasma (PPP) hergestellt und bei -80°C tiefgefroren, um dieses für die konsekutiven Analysen zur Bestimmung von löslichem P-Selektin, Sphingosin-1-Phosphat und der Gesamt-Thrombinbildungskapazität zu verwenden.

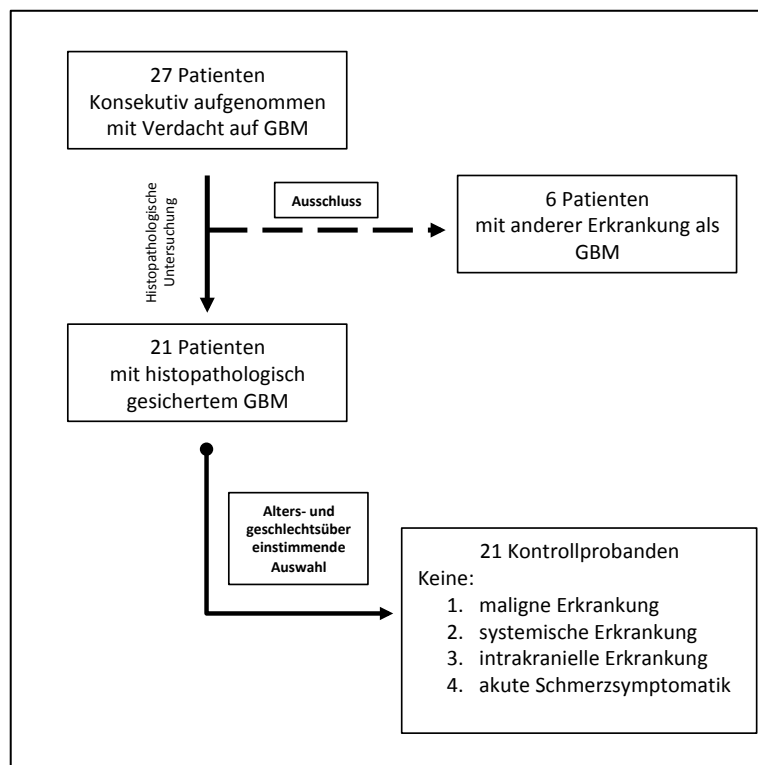


Abbildung 2: Fließschema der Patienten- und Probandenauswahl

4.2 Bestimmung der Thrombozytenaktivität und der Bildung heterotyper Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate

Die Bestimmung der Thrombozytenaktivität und die Bildung von heterotypen Thrombozyten-Leukozyten-Konjugaten fand mit der Durchflusszytometrie statt. Die Etablierung des Studienprotokolls erfolgte stufenweise und parallel zu den konsekutiven Patientenvermessungen. Unterschiedliche n-Zahlen in Bezug auf einzelne Studienparameter sind dadurch bedingt.

4.2.1 Durchflusszytometrie als Methode

Die Durchflusszytometrie ist ein laserbasiertes Analyseverfahren, bei dem Zellsuspensionen vermessen werden können. Dabei wird eine Probe mit konstanter Durchflussgeschwindigkeit durch eine Kapillare transportiert, wodurch sich hierin

enthaltene Zellen hintereinander aufreihen. Dies ermöglicht die Einzelvermessung der Zellen durch mindestens einen Laser. Das lineare Laserlicht wird zellcharakteristisch abgelenkt und durch Detektoren aufgefangen. Durch das abgelenkte Vorwärtstreulicht (FSC) und Seitwärtstreulicht (SSC) können Zellen ihrer Größe bzw. Granularität nach identifiziert werden.

Zusätzlich können, durch fluoreszenzmarkierte Antikörper, neben der morphologischen Charakterisierung weitere Fragen beantwortet werden. Diese können durch Laser angeregt und somit zum fluoreszieren gebracht werden. Die durch die Fluoreszenzmoleküle spezifisch emittierten Lichtwellen werden mit weiteren Detektoren registriert. Über das Fluoreszenzverhalten der einzelnen Zellen können Rückschlüsse über die Antikörperbindung getroffen werden [77-79].

Für die vorliegende Studie wurde ein Durchflusszytometer der Firma EMD Millipore Corporation verwendet und mit Hilfe der Software *Guava soft™* ausgewertet.

4.2.2 Probenprozessierung zur Messung der Thrombozytenaktivität

Zur Quantifizierung der Thrombozytenaktivität wurde zunächst PRP hergestellt. Hiernach wurde die Expression folgender Marker durchflusszytometrisch bestimmt:

- CD42b
- CD62p (P-Selektin)
- CD63 (Platelet-Activation-Antigen)
- CD154 (CD40L)
- Fibrinogenanbindung (indirekte Quantifizierung der aktivierten GPIIb/IIIa-Expression)

Es wurde sowohl die basale Thrombozytenaktivität als auch die *ex-vivo*-Thrombozytenreaktivität auf die thrombozytären Agonisten ADP oder TRAP gemessen.

Aus mit Hirudin antikoagulierte Vollblut wurde durch Zentrifugation PRP hergestellt. Das PRP wurde anschließend 1:3 mit Tyrodepuffer verdünnt, um eine Kontaktaktivierung der Thrombozyten zu vermindern [78]. Es folgte die Thrombozytenstimulation mit ADP (50µM) oder TRAP (25µM) in je 200 µl verdünntem PRP für 10 min, um ein hohes prokoagulatorisches und Thrombozytenaktivierendes-Potential zu imitieren [80]. Hiernach wurden monoklonale Antikörper

oder Isotypkontrollen zugegeben und für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Messung der Fibrinogenanbindung an aktivierten GPIIb/IIIa wurde abweichend vorgegangen. Hierzu wurde das verdünnte PRP zunächst aufgeteilt. In den ersten Anteil wurde der GPIIb/IIIa-Antagonist Tirofiban als Negativkontrolle zugegeben und für 15 min inkubiert. Der zweite Anteil verblieb unbehandelt. Nach der Inkubationszeit wurde in den ersten und den zweiten Anteil Fibrinogen hinzugegeben und für weitere 5 min inkubiert. Daraufhin erfolgte die Thrombozytenstimulation mit ADP (50 μ M) bzw. TRAP (25 μ M) für 10 min.

Neben den Stimulationsansätzen mit ADP und TRAP wurde jeweils eine Kontrolle ohne Stimulation mitgeführt. Nach Abwarten der Inkubationszeit wurden alle Reaktionen in den Ansätzen mit 0,4 ml *Phosphat buffered saline* (PBS) gestoppt und unverzüglich durchflusszytometrisch vermessen (vgl. Abb. 3).

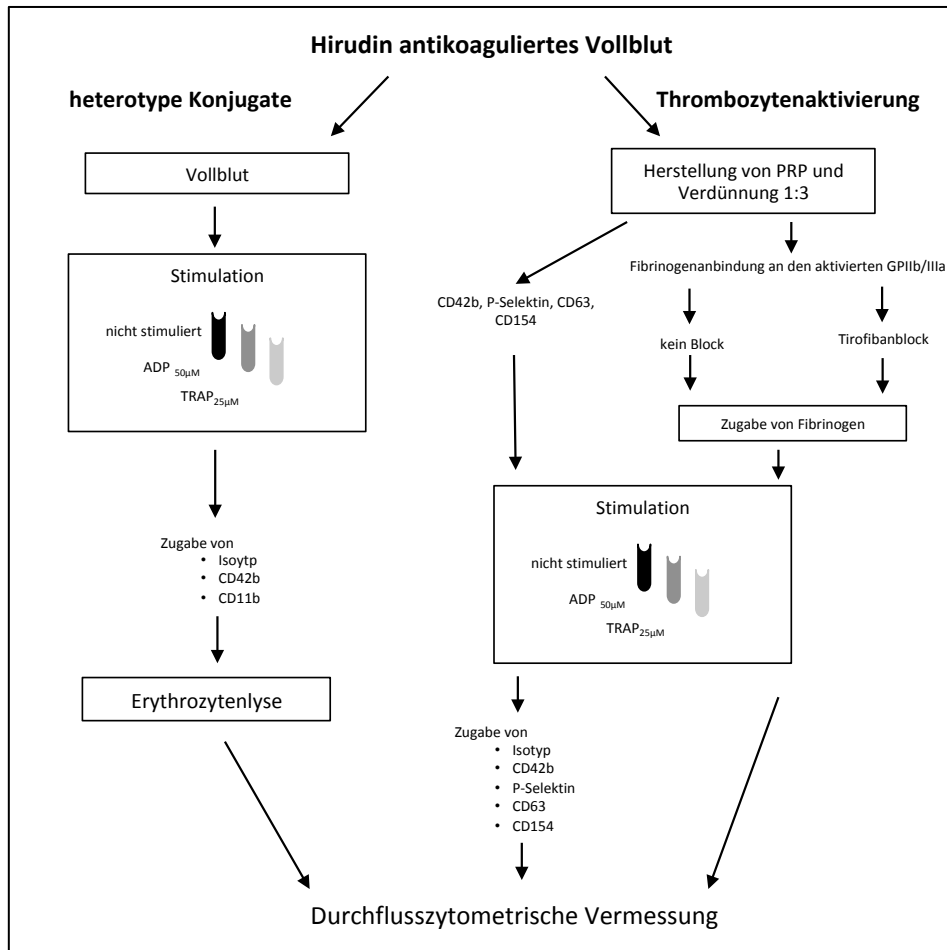


Abbildung 3: Fließschema der Probenaufbereitung zur Messung der Thrombozytenaktivität sowie Thrombozyten-Konjugat-Bildung

4.2.3 Probenprozessierung zur Messung der Bildung von heterotypen Konjugaten

Für die Vermessung heterotyper Konjugate wurden Thrombozyten in Hirudin antikoagulierte Vollblut in je 800 µl mit ADP oder TRAP für 10 min stimuliert. Eine Probe ohne Stimulation diente zur Kontrolle. Hiernach erfolgte die Färbung mit monoklonalen Antikörpern oder Isotypkontrollen für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur. Es folgte eine Erythrozytenlyse mit zwei Waschschrritten. Nach dem Waschprozess erfolgte unverzüglich die durchflusszytometrische Vermessung (vgl. Abb. 3).

4.2.4 Analyse durchflusszytometrischer Experimente

Die Thrombozyten wurden anhand ihrer Streulichteigenschaften im FSC-SSC-plot sowie der thrombozytenspezifischen Anbindung von CD42b charakterisiert (Abb. 4 A und B). In der damit definierten Thrombozytenpopulation wurden die Signale für

CD63, P-Selektin, CD40L und Fibrinogen gemessen. Als Negativkontrolle in den Messungen zu CD63, P-Selektin und CD40L dienten die jeweiligen Isotypen (Abb. 4 C).

Für die spezifische Fibrinogenanbindung an GPIIb/IIIa wurde die Differenz aus dem medianen Fluoreszenzsignal der absoluten Fibrinogenanbindung mit dem medianen Fluoreszenzsignal der Fibrinogenanbindung nach GPIIb/IIIa-Blockade mit Tirofiban gebildet (Abb. 4 D).

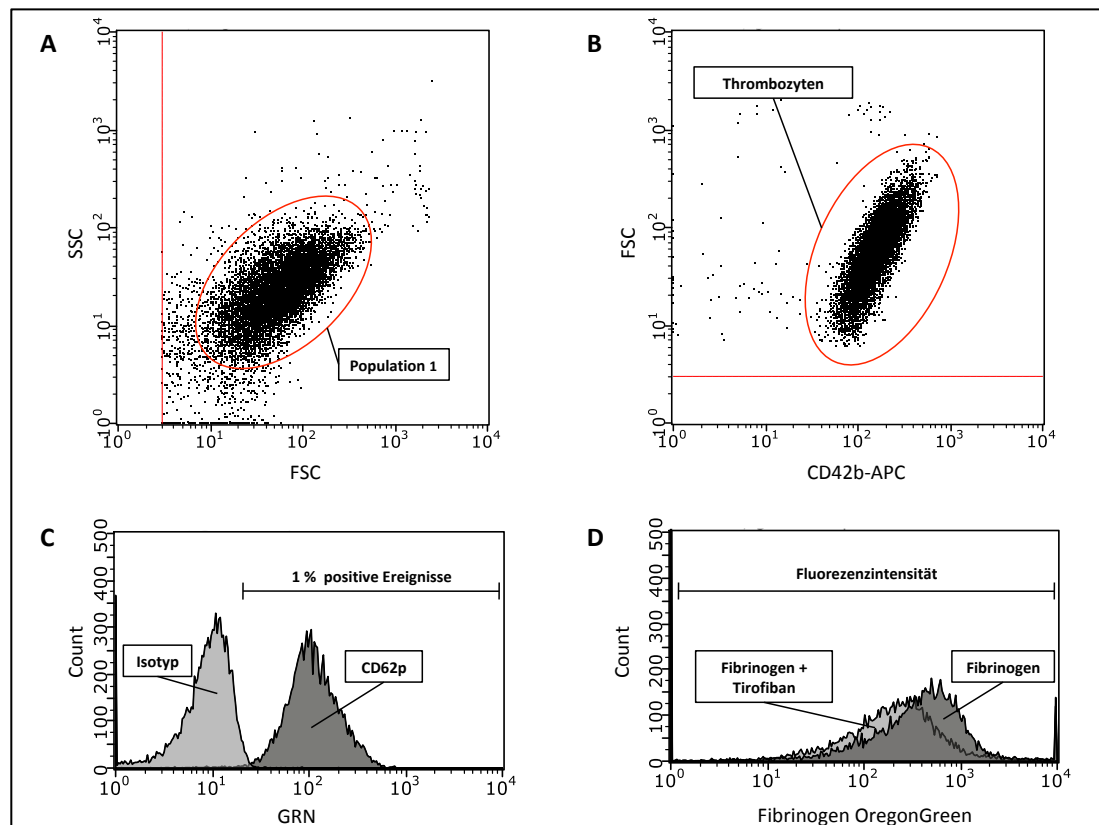


Abbildung 4: Gating und Auswertstrategie für die Thrombozytenaktivierung

Anhand der thrombozytenspezifischen Streulichteigenschaften im FSC-SSC-plot wurde die Thrombozytenpopulation definiert (Population 1 in A) und durch die Anbindung von CD42b-APC als solche identifiziert (B). In der Thrombozytenpopulation wurde die Anbindung der Isotypen gemessen und die Grenze für die positiven Ereignisse bestimmt. Die Messung der mAK-Signale erfolgte in Prozent der positiven Ereignisse über die Isotypengrenze hinaus (C). Für die Bestimmung der Fibrinogenanbindung wurde die Differenz aus der medianen Fluoreszenzintensität der Fibrinogenanbindung mit der Fibrinogenanbindung nach vorheriger Tirofibanblockade gebildet (D).

Die Leukozytenpopulation wurde durch ihre spezifischen Streulichteigenschaften im FSC-SSC-plot eingegrenzt (Abb. 5 A). Einzelne Subpopulationen (Monozyten, Granulozyten, Lymphozyten) wurden durch die Anbindung von CD45 und der Charakteristischen Abbildung im SSC definiert (Abb. 5 B). Die Messung der Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate erfolgte durch die CD42b-Anbindung in der jeweiligen Subpopulation. Analog wurde die CD11b-Anbindung erfasst. Es wurde die mediane Fluoreszenzintensität der jeweiligen Antikörper bestimmt. Die unspezifische Antikörperanbindung wurde durch Differenzbildung der medianen Fluoreszenzintensität der Antikörper mit der medianen Fluoreszenzintensität des Isotyps errechnet (Abb. 5 C und D).

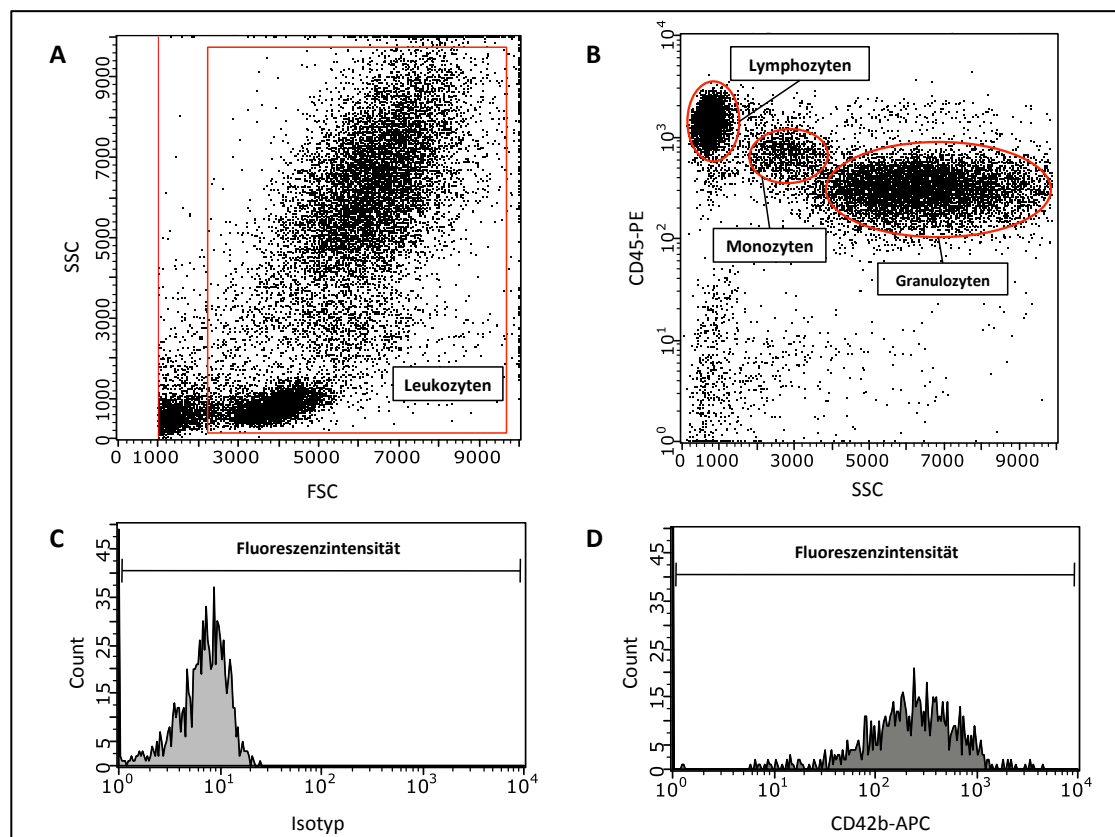


Abbildung 5: Gating und Auswertstrategie für die Bildung heterotyper Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate

Anhand der Streulichteigenschaften im FSC-SSC-plot wurde die Leukozytenpopulation bestimmt (A). Mit CD45-PE und dem SSC erfolgte die Unterscheidung zwischen Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten (B). Für die mAK-Messungen und Isotypkontrollen wurde die mediane Fluoreszenzintensität bestimmt (Isotyp (C) und CD42b-mAK (D)).

4.3 Bestimmung des gesamten zirkulierenden P-Selektins

Die Bestimmung des gesamten thrombozytären P-Selektins im Plasma erfolgte in PRP mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

4.3.1 ELISA als Methode

Die ELISA basiert auf dem Prinzip der Antikörper-Antigenbindung. Die für diese Arbeit verwendete Methode entspricht der Sandwich-ELISA und wurde mit Hilfe eines fertigen *Human P-selectin Platinum* ELISA-Kits (eBioscience) für den Nachweis von humanem P-Selektin durchgeführt [81, 82].

4.3.2 Versuchsdurchführung und Probenprozessierung

Für den Serumnachweis von P-Selektin wurde aufgetautes PRP verwendet. Das verwendete ELISA-Kit wurde nach der entsprechenden Verwendungsempfehlung vorbereitet und durchgeführt.

Auf einer Mikrotiterplatte wurden die entsprechenden Ansätze für die Proben, *blanks* und Kontrollen definiert. Jeder Ansatz wurde dabei doppelt angelegt. Jedes *well* wurde 2 Mal mit jeweils 400 µl Waschpuffer für mindestens 10 s gewaschen. Anschließend wurden Proben, Kontrollen und *blanks* nach dem Studienprotokoll 1:10 verdünnt hinzugefügt. Es wurde *Horseradish Peroxidase* (HRP) hinzugegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem *Microplate Shaker* inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die *wells* 3 Mal nach oben erwähntem Schema gewaschen. Es wurde anschließend Tetramethyl-Benzidin (TMB) zu allen Ansätzen hinzugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation im Dunkeln wurde die Enzymreaktion mit *Stop Solution* gestoppt. Die Enzymreaktion wurde unmittelbar in einem Spectro-Photometer bei 450 nm als primäre Wellenlänge und 620 nm als Referenzwellenlänge analysiert (vgl. Abb. 6).

4 Methoden

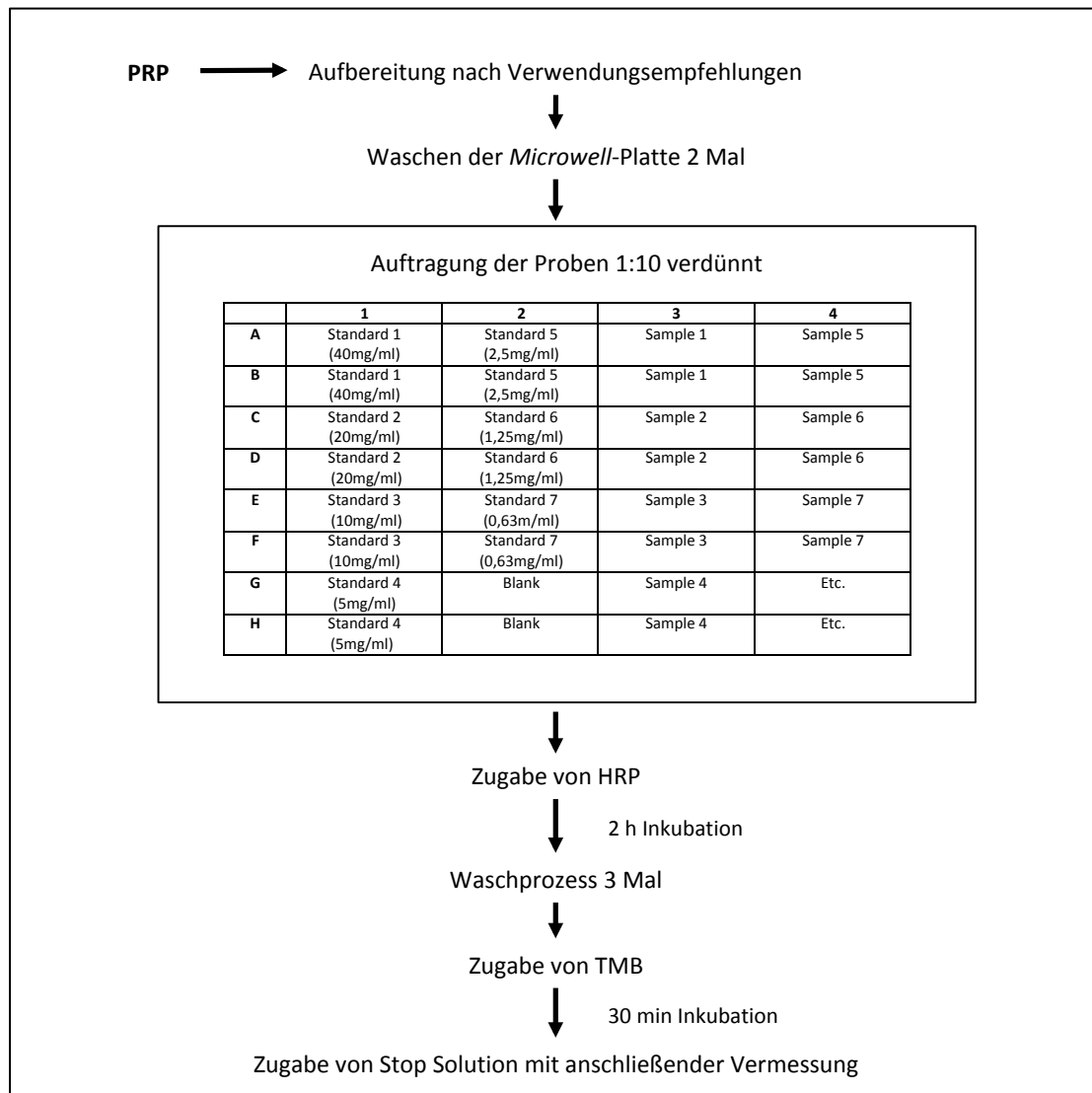


Abbildung 6: Fließschema der Probenaufbereitung zur Messung von P-Selektin in PRP mittels ELISA

4.3.3 Auswertungsstrategie

Aus den entsprechend doppelt angelegten Proben wurde der jeweilige Mittelwert der Messungen gebildet. Anschließend erfolgte die Erstellung einer Kalibrierungsgeraden mit Hilfe der Kontrollproben. Die sich daraus ergebende lineare Gleichung wurde genutzt, um alle ermittelten Mittelwerte entsprechend der Kalibrierung anzupassen. Der Verdünnungsfaktor wurde ebenfalls berücksichtigt und miteingerechnet. Anschließend wurde aus den *High-Control*-Werten der jeweiligen Vermessungstage ein Faktor gebildet, mit dem alle Messwerte multipliziert wurden. Es erfolgte die statistische Auswertung der angepassten Daten.

4.4 Bestimmung von zirkulierendem Sphingosin-1-Phosphat

Der Plasmaspiegel von S1P wurde mittels Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie in PRP und PPP bestimmt.

4.4.1 Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie als Methode

Die Quantifizierung der S1P-Konzentration erfolgte mittels LC-MS/MS in PRP bzw. PPP von GBM-Patienten bzw. Kontrollprobanden. Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren, welches auf dem Prinzip basiert, gasförmige Ionen anhand ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses aufzutrennen und zu detektieren. Die aufgearbeiteten Proben wurden vor der Messung mittels Flüssigkeitschromatographie fraktioniert, d.h. die enthaltenen Moleküle wurden anhand ihrer unpolareität/lipophilie aufgetrennt.

Die Messungen wurde dankenswerterweise durch eine befreundete Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Edzard Schwedhelm und Dr. Eileen Moritz am Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt und nach einem etablierten Protokoll auf Grundlage einer von *Reidy, Daum, Kalhorn et al.* entwickelten Methode durchgeführt [83, 84].

4.4.2 Versuchsdurchführung und Probenprozessierung

Alle Eppendorf-*Tubes* und Mikrotiterplatten wurden vor ihrer Verwendung silikonisiert. Zur Deproteinisierung des PRPs bzw. PPPs wurden 350 µl AcN (80% AcN in H₂O) in einem 1,5 ml-Eppendorf-*Tube* vorgelegt. Anschließend wurden 20 µl des internen Standards (1 µmol/l [16,17,18-²H₇-S1P] (S1P-d₇)) und 20 µl des PRP bzw. PPP hinzu pipettiert. Die befüllten Eppendorf-*Tubes* wurden dann für 1 min gründlich gevortext und 15 min bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert. Jeweils 100 µl des Überstandes wurden in ein *well* einer 96-*well*-Mikrotiterplatte transferiert.

Für die Kalibrierung wurden Kalibratoren mit 0 µM, 0,1 µM, 0,3 µM, 1 µM und 3 µM durch entsprechende Verdünnung der S1P-Stammlösung (10 µM S1P-Standardsubstanz) mit FCS hergestellt. Diese Kalibratoren wurden analog zur vorher beschriebenen Probenaufarbeitung mit AcN deproteinisiert und auf jeder Mikrotiterplatte in aufsteigender Konzentration aufgetragen.

Um die Vergleichbarkeit der Mikrotiterplatten zu überprüfen, wurden pro Mikrotiterplatte jeweils eine sog. *quality control low* mit 0,3 µM S1P und eine sog.

quality control high mit 1 µM S1P als Duplikat aufgetragen. Die Aufarbeitung dieser Qualitätskontrollen wurde analog zu den Proben und Kalibratoren durchgeführt (s.o.).

Pro Probe wurden jeweils 12 µl in das verwendete HPLC-Gerät injiziert. Die Analyten wurden anschließend mit einem binären Gradienten (AcN/Methanol, Ameisensäure) von der Zorbax SB-C8-Säule eluiert.

Die nachfolgende Detektion der Analyten S1P (380 > 264) und S1P_{d7} (387 > 271) erfolgte mittels gekoppeltem Tandem-Massenspektrometer.

4.4.3 Auswertungsstrategie

Die Peakflächen (*Area under the curve*) der Analyten wurden mit der Software MS Data Review[®] berechnet. Mit Hilfe der Peakflächenverhältnisse von S1P und dem internen Standard der Kalibratoren wurde pro Mikrotiterplatte eine Kalibriergerade erstellt. Deren Steigung diente der rechnerischen Ermittlung der S1P-Konzentration der untersuchten Proben.

4.5 Thrombin Generation Assay und Thrombinbestimmung

4.5.1 Thrombin Generation Assay als Methode

Die Bestimmung des Gesamt-Thrombins erfolgt mit dem sog. *Thrombin Generation Assay*. Diese Methode beruht auf der Spaltung eines Fluoreszenz-gekoppelten Substrates der Serinprotease Thrombin. Der *Thrombin Generation Assay* ist neben den Testverfahren der Thromboplastinzeit und der partiellen Thromboplastinzeit etabliert und deckt einen weiteren Teil der Gerinnungsdiagnostik ab [85].

4.5.2 Probenprozessierung und Versuchsdurchführung

Das Gesamt-Thrombin wurde in PRP sowie PPP von Probanden und GBM-Patienten bestimmt. Der Versuch wurde nach dem empfohlenen und etablierten Protokoll der Herstellerfirma Thrombinoscope BV durchgeführt.

Hierbei wurden auf einer 96-well-Mikrotiterplatte in doppelter Ausführung jeweils eine Probe und ein passender Kalibrator angelegt. Da jedes Plasma unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften hat, muss jede Probe mit einem eigenen Kalibrator

verglichen werden. Mit Hilfe der Vermessungssoftware wurden die korrespondierenden Probenpaare mit ihren Kalibratorpaaren bestimmt.

Das PRP bzw. PPP wurde 1:4 verdünnt. Jeweils 80 µl des verdünnten PRP bzw. PPP wurden pro *well* vorgelegt. Den Kalibratoren wurde 20 µl *Thrombin Calibrator* hinzugefügt. Zu den Proben wurde entsprechend des Grundmediums entweder 20 µl *PRP-Reagent* oder 20 µl *PPP-Reagent* hinzugegeben.

Anschließend wurde die beladene 96-*well*-Mikrotiterplatte dem Fluorometer zugeführt und für mindestens 5 min auf 37°C erwärmt. Die Vermessung wurde mit der automatischen Zugabe von 20 µl *Flu-Ca-Kit* zu den jeweiligen Ansätzen durch das Versuchsgerät gestartet.

4.5.3 Auswertungsstrategie

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software *Throbinoscope*. Es wurden die *lag-time*, Gesamtthrombinbildung sowie die Spitzenthrombinbildung betrachtet.

4.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von *GraphPad Prism 6.0*. Die Daten wurden mit Hilfe des *Shapiro-Wilk-Tests* auf Normalverteilung getestet. Der Vergleich der GBM-Gruppe mit der Gruppe der Kontrollprobanden erfolgte mit dem *Mann-Whitney-U-Test*. Als statistisches Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ angenommen. Für Nominalverteilte Daten wurde der *exakte Test nach Fisher* verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der Patientenkohorte

Entsprechend des Profils der 21 untersuchten GBM-Patienten (8 weiblich, 13 männlich, Durchschnittsalter 71 Jahre, Spannweite 55 - 86 Jahre) wurden alters- und geschlechtsübereinstimmend 21 Kontrollprobanden (8 weiblich, 13 männlich, Durchschnittsalter 65 Jahre, Spannweite 47 - 83 Jahre) rekrutiert. Die beiden Untersuchungsgruppen wurden hinsichtlich ihrer Laborparameter und Medikation verglichen. Die wichtigsten Parameter / Medikamente sind in Tabelle 1 und 2 zusammengefasst. Im Labor zeigten die GBM-Patienten signifikant erhöhte Leukozytenzahlen. Eine Thrombozytose lag in keiner der beiden Gruppen vor.

GBM-Patienten unterschieden sich weiterhin in der Einnahme / Verabreichung von Dexamethason, welches regelmäßig zur anti-ödematösen Therapie und Hirndrucksenkung verabreicht wird, Levetiracetam zur Kontrolle symptomatischer Epilepsien, Protonenpumpeninhibitoren zur Prophylaxe gastraler Ulcera und Heparin zur Thromboseprophylaxe, welche bei den GBM-Patienten entsprechend der erkrankungsspezifischen Komplikationen häufiger angeordnet wurden [14].

Tabelle 1

Vergleich ausgewählter Laborparameter zwischen GBM-Patienten und Kontrollprobanden zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert mit den dazugehörigen Minimal- und Maximalwerten in Klammern. Die statistische Analyse erfolgte mit dem *Mann-Whitney-U Test*. Als signifikanter Unterschied wurde $p < 0,05$ definiert.

Laborparameter	GBM-Patienten	Kontrollprobanden	p-Wert
Thrombozyten [Gpt/l]	257 (135 - 383)	240 (169 - 365)	0,50
Thrombozytenvolumen [fl]	11 (9,5 - 12,3)	10,5 (9,6 - 12,9)	0,10
Leukozyten [Gpt/l]	12,7 (5,4 - 21,8)	8,2 (4,5 - 19,2)	0,02
Hämoglobin [mmol/l]	8,4 (7,1 - 9,4)	8,8 (7,6 - 10,3)	0,20
Quick [%]	94 (21 - 125)	101 (74 - 130)	0,26

Tabelle 2

Vergleich der Medikamenteneinnahme von GBM-Patienten und Kontrollprobanden zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Die statistische Analyse erfolgte mit dem *exakten Test nach Fisher*. Als signifikanter Unterschied wurde $p < 0,05$ definiert.

Medikamente	GBM-Patienten (n = 21)	Kontrollprobanden (n = 21)	p-Wert
Thrombozytenaggregationshemmer	0	0	1,00
Falithrom	0	0	1,00
NMH	10	2	0,01
Dexamethason	13	0	< 0,01
Paracetamol/Novamin	6	5	1,00
Opioide	3	2	1,00
Antikonvulsiva (Levetiracetam)	8	1	< 0,01
PPI	18	6	< 0,01
Anti-Hypertensiva	15	10	0,21
Antidiabetika	3	0	0,23
Antibiotika	0	0	1,00
Benzodiazepine	3	0	0,23
Statine	7	3	0,28

5.2 Bestimmung der Aktivität zirkulierender Thrombozyten sowie deren *ex-vivo*-Reaktivität auf die Agonisten ADP und TRAP

5.2.1 Funktionsnachweis der *ex-vivo*-Thrombozytenstimulation

Die *ex-vivo*-Stimulierbarkeit von Thrombozyten durch die Agonisten ADP_{50 μM} und TRAP_{25 μM} wurde in vorgeschalteten Experimenten mit PRP von gesunden Probanden nachgewiesen (Abb. 7). In den unstimulierten Ansätzen exprimierten 4,17 % der Thrombozyten P-Selektin. Nach Stimulation mit ADP waren es 29 % und nach Stimulation mit TRAP 49,1 % ($p < 0,0001$ in allen Vergleichen), was einem zu erwartenden Anstieg der P-Selektin-Expression nach thrombozytärer Stimulation entspricht.

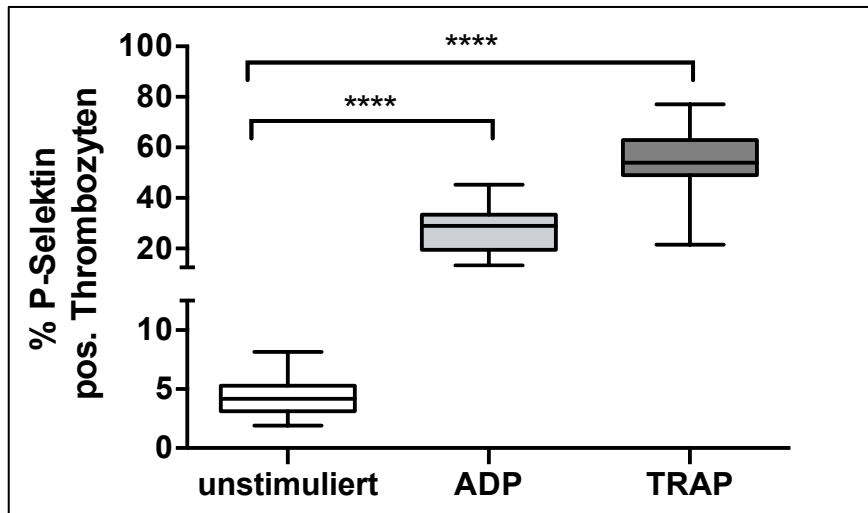


Abbildung 7: Funktionsnachweis der *ex-vivo*-Thrombozytenstimulation.

Zunahme der positiven Thrombozyten nach *ex-vivo*-Stimulation mit ADP (50 μ M) und TRAP (25 μ M) in PRP, im Vergleich zu den basal P-Selektin exprimierenden Thrombozyten im unstimulierten Ansatz. Dargestellt ist jeweils der Median der % P-Selektin-positiven Thrombozyten. Die Whisker zeigen Minimum und Maximum an. n = 21; **** p < 0,0001.

5.2.2 P-Selektin-Expression auf Thrombozyten

In den Messungen zur P-Selektin-Expression auf Thrombozyten zeigte sich in den nicht stimulierten Ansätzen kein Unterschied zwischen den GBM-Patienten und den Kontrollprobanden (CON: Median 4,2 %, Spannweite von 1,9 % bis 8,2 %; GBM: Median 5,1 %, Spannweite von 2,2 % bis 8,4 %; p = 0,14). Ebenfalls zeigte sich kein Unterschied nach *ex-vivo*-Stimulation mit ADP (CON: Median 29 %, Spannweite von 13,3 % bis 45,3 %; GBM: Median 28 %, Spannweite von 12 % bis 60 %; p = 1). Nach *ex-vivo*-Aktivierung mit TRAP zeigte sich eine Tendenz der erhöhten P-Selektin-Expression auf Thrombozyten der GBM-Patienten (CON: Median 54 %, Spannweite von 21,5 % bis 77,1 %; GBM: Median 63,5 % Spannweite von 28 % bis 79,4 %; p = 0,07), wenngleich eine statistische Signifikanz nicht erreicht werden konnte (Abb. 8).

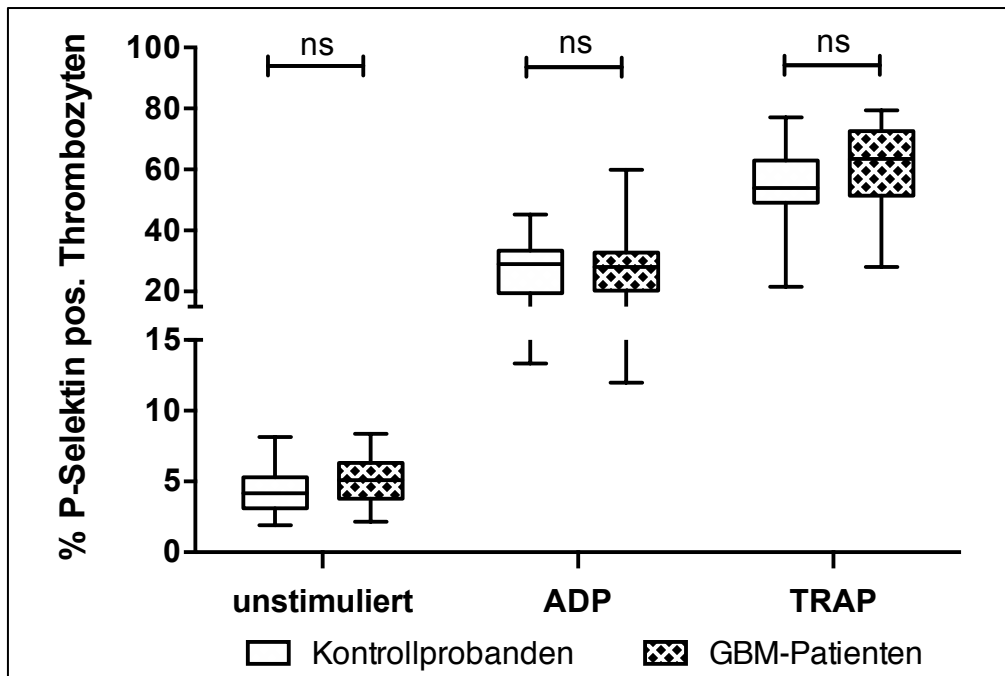


Abbildung 8: P-Selektin auf Thrombozyten bei GBM-Patienten und Kontrollprobanden.

Nach Blutentnahme wurde die basale P-Selektin-Expression (unstimuliert) sowie die P-Selektin Expression nach *ex-vivo*-Thrombozytenstimulation mit ADP (50 μ M) bzw. TRAP (25 μ M) bei GBM-Patienten und Kontrollprobanden vermessen. Dargestellt ist der Median der % P-Selektin-positiven Thrombozyten. Die Whisker zeigen Minimum und Maximum an. n = 21 pro Gruppe; ns = $p \geq 0,05$

5.2.3 CD63-Expression auf Thrombozyten

In den Messungen zur CD63-Expression auf Thrombozyten zeigte sich in den nicht stimulierten Ansätzen eine signifikant höhere CD63-Expression auf den Thrombozyten von GBM-Patienten (CON: Median 1,8 %, Spannweite von 0,3 % bis 3,7 %; GBM: Median 2,7 %, Spannweite von 0,6 % bis 4,4 %; $p = 0,01$). Nach *ex-vivo*-Stimulation mit ADP konnte kein Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen festgestellt werden (CON: Median 7,7 %, Spannweite von 3,5 % bis 17,8 %; GBM: Median 7,4 %, Spannweite von 2,4 % bis 34,5 %; $p = 0,75$). Durch *ex-vivo*-Stimulation mit TRAP konnte eine signifikant höhere CD63-Expression auf Thrombozyten der GBM-Patienten beobachtet werden (CON: Median 33,3 %, Spannweite von 15,5 % bis 64,4 %; GBM: Median 38,4 %, Spannweite von 11 % bis 62,5 %; $p = 0,04$) (Abb. 9).

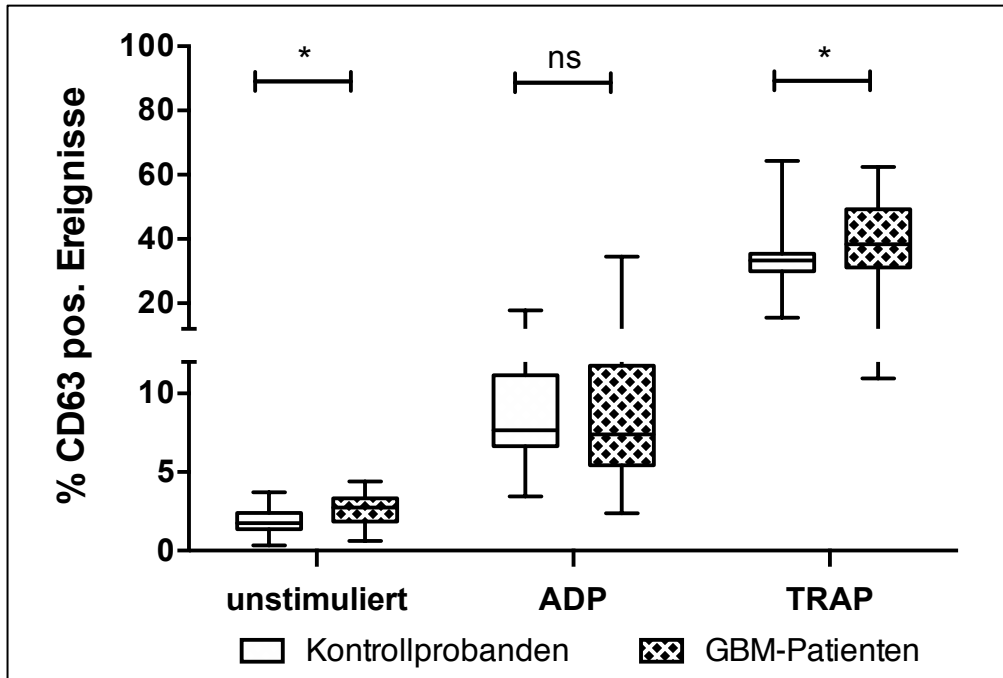


Abbildung 9: CD63 auf Thrombozyten bei GBM-Patienten und Kontrollprobanden.

Nach Blutentnahme wurde die basale CD63-Expression (unstimuliert) sowie die CD63-Expression nach *ex-vivo*-Thrombozytenstimulation mit ADP (50 μ M) bzw. TRAP (25 μ M) bei GBM-Patienten und Kontrollprobanden vermessen. Dargestellt ist der Median der % CD63-positiven Thrombozyten. Die Whisker zeigen Minimum und Maximum an. n = 19 pro Gruppe; * p < 0,05; ns p \geq 0,05

5.2.4 Spezifische Fibrinogenanbindung an den aktivierten thrombozytären GPIIb/IIIa

In den Messungen zur spezifischen Anbindung von Fibrinogen an den aktivierten thrombozytären GPIIb/IIIa zeigte sich in den nicht stimulierten Ansätzen eine Tendenz zur erhöhten Fibrinogenanbindung in der Gruppe der GBM-Patienten (CON: Median - 8,6 Mediane Fluoreszenzintensität (MFI), Spannweite von - 64,8 MFI bis 13,9 MFI; GBM: Median 8,7 MFI, Spannweite von - 50,1 MFI bis 56,5 MFI; p = 0,1). Die negativen Werte hierbei sind möglich, da eine Differenz der MFI (mit Tirofiban und ohne) abgebildet und im unstimulierten Ansatz eine geringe Aktivierung des GPIIb/IIIa zu erwarten ist. Die aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptoren auf Thrombozyten der GBM-Patienten zeigten nach *ex-vivo*-Stimulation mit ADP eine signifikant höhere Fibrinogenanbindung (CON: Median 36 MFI, Spannweite von - 2,58 MFI bis 253 MFI; GBM: Median 128 MFI, Spannweite von 67 MFI bis 270 MFI; p = 0,03). Nach *ex-vivo*-Stimulation mit TRAP egalisierte sich dieser

Unterschied (CON: Median 57,1 MFI, Spannweite von 10,3 MFI bis 156,1 MFI; GBM: Median 50,4 MFI, Spannweite von - 2,1 MFI bis 259,6 MFI; $p = 1$) (Abb. 10).

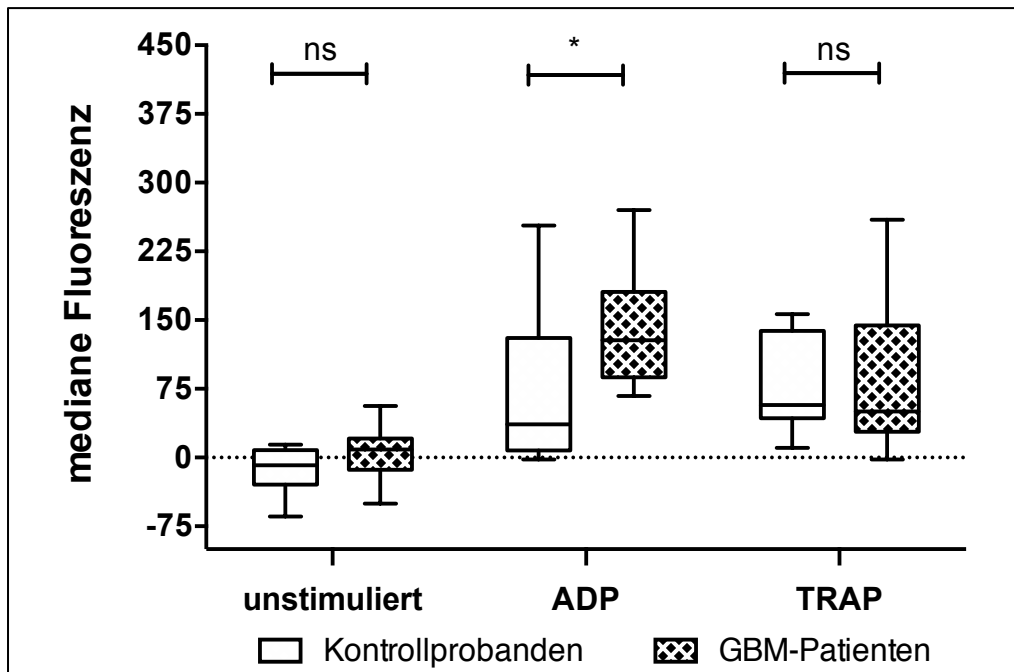


Abbildung 10: spezifische Fibrinogenanbindung an den GPIIb/IIIa-Rezeptor von Thrombozyten bei GBM-Patienten und Kontrollprobanden.

Nach Blutentnahme wurde die basale Fibrinogenanbindung (unstimuliert) sowie die Fibrinogenanbindung nach *ex-vivo*-Thrombozytenstimulation mit ADP (50 μ M) bzw. TRAP (25 μ M) bei GBM-Patienten und Kontrollprobanden vermessen. Dargestellt ist die Differenz des Medians der Fluoreszenzintensität (MFI) der Fibrinogenanbindung minus des Medians der Fluoreszenzintensität (MFI) der Fibrinogenanbindung nach Tirofibanblockade über Thrombozyten. Die Whisker zeigen Minimum und Maximum an. $n = 11$ pro Gruppe; * $p < 0,05$; ns $p \geq 0,05$

5.2.5 CD40L-Expression auf Thrombozyten

In den Messungen zur CD40L-Expression auf Thrombozyten zeigte sich in der Gruppe der GBM-Patienten eine in der Tendenz erhöhte Expression gegenüber der Kontrollprobanden im nicht stimulierten Ansatz (CON: Median 1,2 %, Spannweite von 0,4 % bis 1,6 %; GBM: Median 1,4 %, Spannweite von 0,9 % bis 3,1 %; $p = 0,11$). Nach der *ex-vivo*-Stimulation mit ADP (CON: Median 0,9 %, Spannweite von 0,04 % bis 1,7 %; GBM: Median 1 %, Spannweite von 0,5 % bis 2,4 %; $p = 0,3$) und TRAP (CON: Median 1,1 %, Spannweite von 0,5 % bis 1,5 %; GBM: Median 1,6 %,

Spannweite von 0,6 % bis 1,3 %; $p = 0,39$) ließen sich hingegen keine Unterschiede feststellen. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 dargestellt.

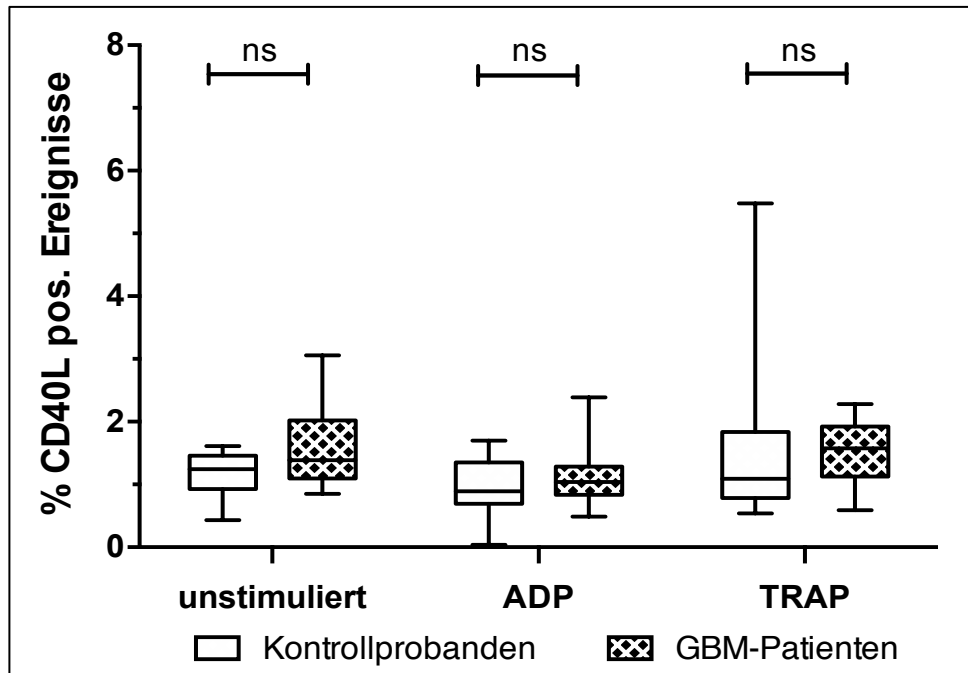


Abbildung 11: CD40L auf Thrombozyten bei GBM-Patienten und Kontrollprobanden.

Nach Blutentnahme wurde die basale CD40L-Expression (unstimuliert) sowie die CD40L-Expression nach *ex-vivo*-Thrombozytenstimulation mit ADP (50 μ M) bzw. TRAP (25 μ M) bei GBM-Patienten und Kontrollprobanden vermessen. Dargestellt ist der Median der % CD40L-positiven Thrombozyten. Die Whisker zeigen Minimum und Maximum an. $n = 12$ pro Gruppe; ns $p \geq 0,05$

5.3 Bildung von heterotypen Thrombozyten-Leukozyten-Konjugaten

5.3.1 Thrombozyten-Monozyten-Konjugate

In den Messungen zur Bildung heterotyper Thrombozyten-Monozyten-Konjugate (TMK) zeigte sich in den nicht stimulierten Ansätzen kein Unterschied in der TMK-Bildung zwischen GBM-Patienten und Kontrollprobanden (CON: Median 102,1 MFI, Spannweite von 24 MFI bis 271 MFI; GBM: Median 84,1 MFI, Spannweite von 21,7 MFI bis 185 MFI; $p = 0,39$). Nach *ex-vivo*-Stimulation mit ADP deutete sich eine geringere TMK-Bildung bei den GBM-Patienten gegenüber den Kontrollprobanden an, die jedoch keine statistische Signifikanz aufwies (CON: Median 117,3 MFI, Spannweite von 44 MFI bis 294 MFI; GBM: Median 82,3 MFI, Spannweite von 32,6 MFI bis 271 MFI; $p = 0,28$). Nach der *ex-vivo*-Stimulation mit TRAP zeigte sich eine tendenziell geringere Bildung von TMK bei den GBM-Patienten, wobei eine statistische Signifikanz nur knapp verfehlt wurde (CON: Median 182,3 MFI, Spannweite von 50 MFI bis 935 MFI; GBM: Median 128,5 MFI, Spannweite von 59 MFI bis 378 MFI; $p = 0,07$).

Interessanterweise zeigte sich der zu erwartende Anstieg der TMK-Bildung nach *ex-vivo*-Stimulation mit TRAP im Vergleich zu den basalen Messungen nur in der Gruppe der Kontrollprobanden, nicht jedoch bei den GBM-Patienten statistisch signifikant verändert (CON: TRAP $p = 0,02$; GBM: TRAP $p = 0,09$) (Abb. 12).

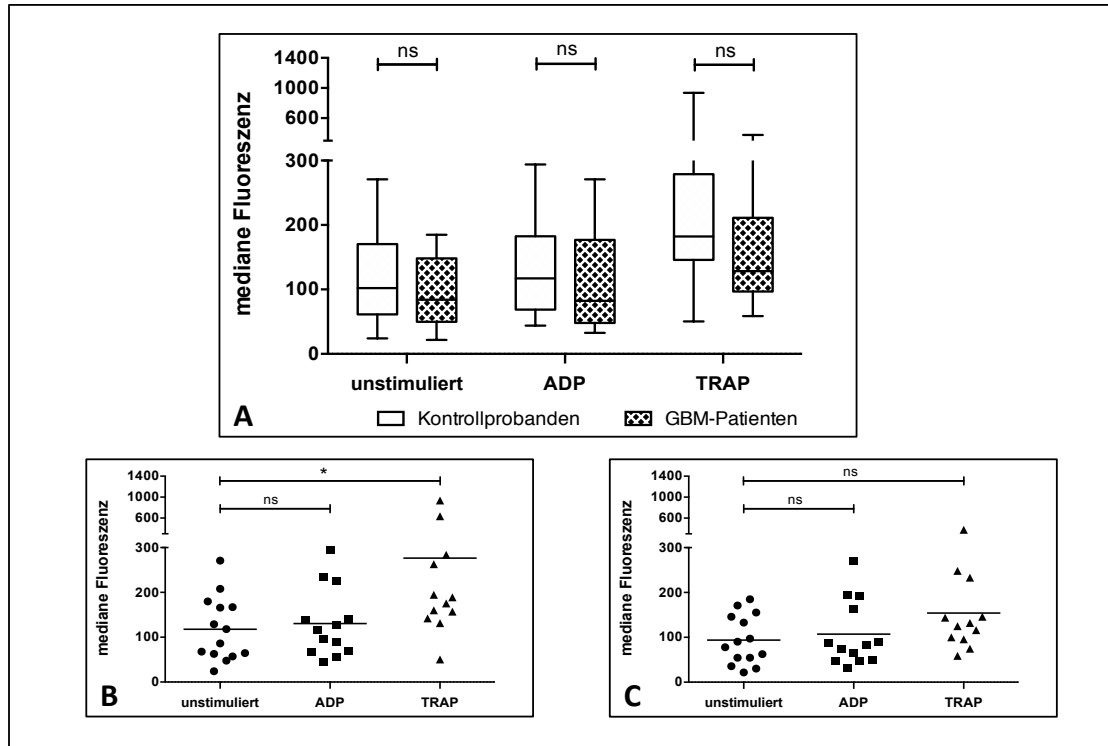


Abbildung 12: Heterotype Konjugatbildung aus Thrombozyten und Monozyten bei GBM-Patienten und Kontrollprobanden.

Gemessen wurde die basale CD42b-Anbindung (unstimuliert) sowie die CD42b-Anbindung an Monozyten nach *ex-vivo*-Thrombozytenstimulation mit ADP (50 μ M) bzw. TRAP (25 μ M) bei GBM-Patienten und Kontrollprobanden (A). Dargestellt ist der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) des CD42b-Signals über den Monozyten. Die Whisker zeigen Minimum und Maximum an. Des Weiteren ist die Entwicklung der CD42b-Anbindung in der Monozytenpopulation vor und nach Stimulation mit TRAP jeweils für die Gruppe der Kontrollprobanden (B) sowie die GBM-Patienten-Gruppe (C) separat als Median der MFI dargestellt. n = 14 (unstimuliert); n = 13 (ADP); n = 12 (TRAP); * p < 0,05; ns p \geq 0,05

5.3.2 Thrombozyten-Granulozyten-Konjugate

Bei der Bildung von Thrombozyten-Granulozyten-Konjugaten (TGK) konnten im nicht stimulierten Ansatz keine Unterschiede zwischen GBM-Patienten und Kontrollprobanden festgestellt werden (CON: Median 64,3 MFI, Spannweite von 14,2 MFI bis 127 MFI; GBM: Median 54,7 MFI, Spannweite von 13,3 MFI bis 105 MFI; p = 0,37). Nach *ex-vivo*-Stimulation mit ADP (CON: Median 61,1 MFI, Spannweite von 18,4 MFI bis 134,7 MFI; GBM: Median 47,3 MFI, Spannweite von 21,9 MFI bis 105,7 MFI; p = 0,72) und TRAP (CON: Median 49,4 MFI, Spannweite von 18,3 MFI bis 193 MFI; GBM: Median 65,3 MFI, Spannweite von 26,7 MFI bis 111 MFI; p = 0,38)

konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der TKG-Bildung zwischen den GBM-Patienten und Kontrollprobanden ermittelt werden (Abb. 13).

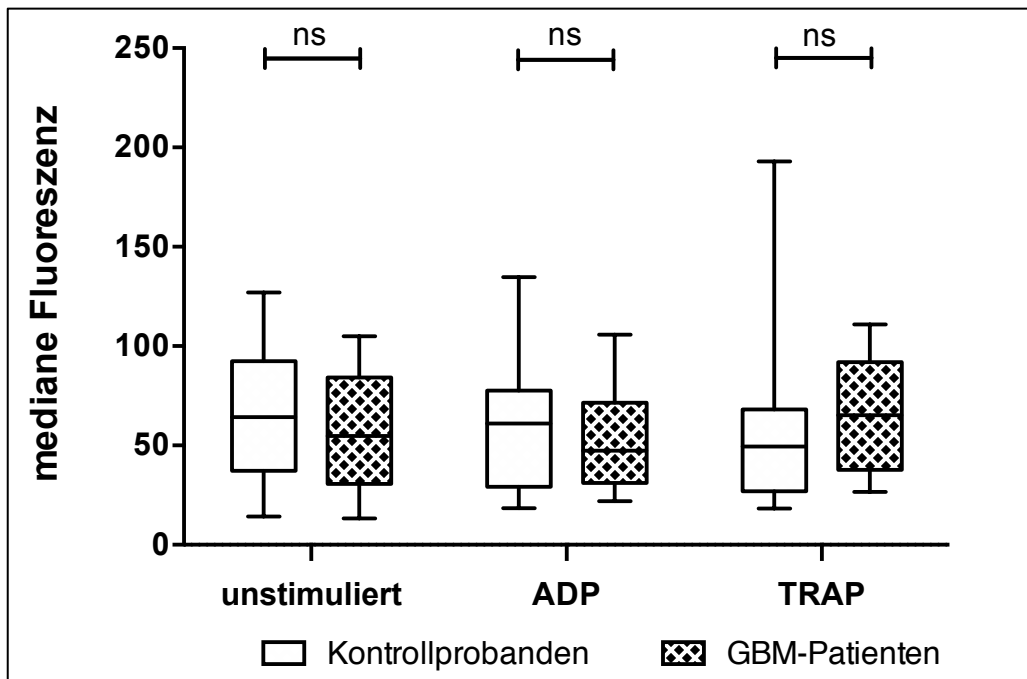


Abbildung 13: Heterotype Konjugatbildung aus Thrombozyten und Granulozyten bei GBM-Patienten und Kontrollprobanden.

Gemessen wurde die basale CD42b-Anbindung (unstimuliert) sowie die CD42b-Anbindung an Granulozyten nach *ex-vivo*-Thrombozytenstimulation mit ADP (50 μ M) bzw. TRAP (25 μ M) bei GBM-Patienten und Kontrollprobanden. Dargestellt ist der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) des CD42b-Signals über den Granulozyten. Die Whisker zeigen Minimum und Maximum an. n = 14 (unstimuliert); n = 13 (ADP); n = 13 (TRAP); ns $p \geq 0,05$

5.3.3 Thrombozyten-Lymphozyten-Konjugate

Die Bildung von Thrombozyten-Lymphozyten-Konjugaten (TLK) erfolgte in beiden Vergleichsgruppen weniger stark ausgeprägt als in den zuvor betrachteten Monozyten- bzw. Granulozytenpopulationen. Bei den Ansätzen mit nicht stimulierten Thrombozyten (CON: Median 38,8 MFI, Spannweite von 10,4 MFI bis 95,8 MFI; GBM: Median 38 MFI, Spannweite von 9,7 MFI bis 84,4 MFI; $p = 0,5$) sowie nach *ex-vivo*-Stimulation mit ADP (CON: Median 33,9 MFI, Spannweite von 10,1 MFI bis 120,2 MFI; GBM: Median 22,7 MFI, Spannweite von 13,6 MFI bis 39,7 MFI; $p = 0,24$) und TRAP (CON: Median 17,4 MFI, Spannweite von 9,6 MFI bis 35 MFI; GBM: Median 16,3 MFI, Spannweite von 8,5 MFI bis 29,3 MFI; $p = 0,5$) konnten keine

signifikanten Unterschiede zwischen den GBM-Patienten und Kontrollprobanden festgestellt werden (Abb. 14).

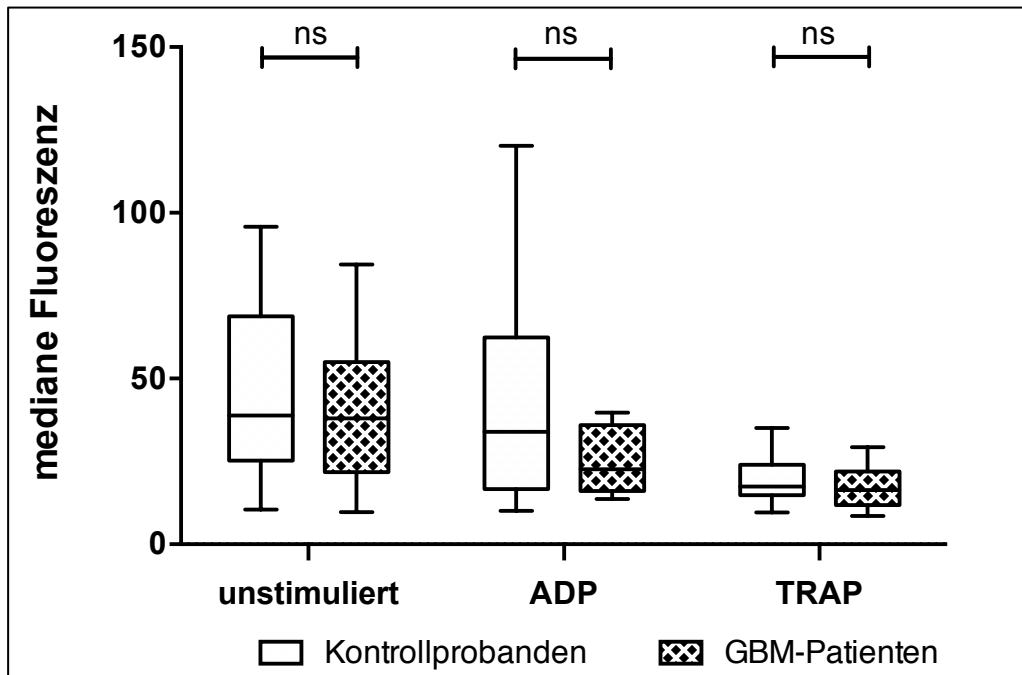


Abbildung 14: Heterotype Konjugatbildung aus Thrombozyten und Lymphozyten bei GBM-Patienten und Kontrollprobanden.

Gemessen wurde die basale CD42b-Anbindung (unstimuliert) sowie die CD42b-Anbindung an Lymphozyten nach *ex-vivo*-Thrombozytenstimulation mit ADP (50 μ M) bzw. TRAP (25 μ M) bei GBM-Patienten und Kontrollprobanden. Dargestellt ist der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) des CD42b-Signals über den Lymphozyten. Die Whisker zeigen Minimum und Maximum an. n = 14 pro Gruppe; ns $p \geq 0,05$

5.4 Expression von CD11b auf Leukozytenpopulationen

5.4.1 Expression von CD11b auf Monozyten

In den Messungen zur CD11b-Expression auf Monozyten konnte im nicht stimulierten Ansatz kein signifikanter Unterschied zwischen den GBM-Patienten und Kontrollprobanden festgestellt werden (CON: Median 241,4 MFI, Spannweite von 123,7 MFI bis 413,5 MFI; GBM: Median 176,8 MFI, Spannweite von 83 MFI bis 431,3 MFI; $p = 0,64$). Nach *ex-vivo*-Stimulation mit ADP (CON: Median 345,1 MFI, Spannweite von 290,6 MFI bis 590 MFI; GBM: Median 304,3 MFI, Spannweite von 135 MFI bis 654,8 MFI; $p = 0,39$) aber auch nach der *ex-vivo*-Stimulation durch TRAP (CON: Median 395,5 MFI, Spannweite von 250,2 MFI bis 550 MFI; GBM: Median

446,5 MFI, Spannweite von 249 MFI bis 729,3 MFI; $p = 0,39$) konnten keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt werden (Abb. 15).

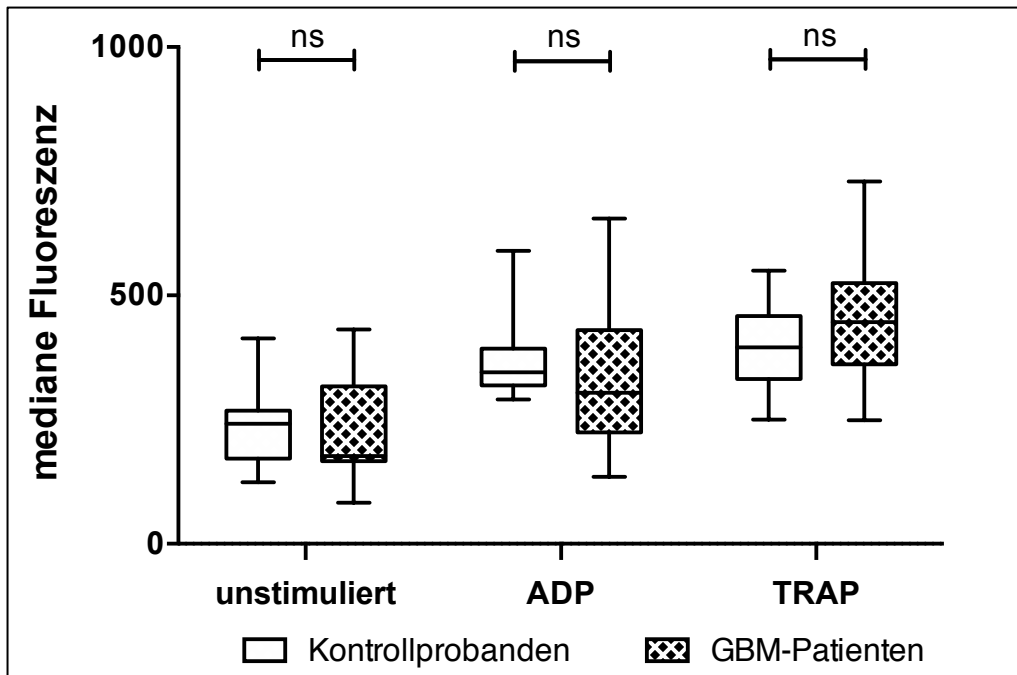


Abbildung 15: CD11b in der Monozytenpopulation bei GBM-Patienten und Kontrollprobanden.

Gemessen wurde die basale CD11b-Anbindung (unstimuliert) sowie die CD11b-Anbindung an Monozyten nach *ex-vivo*-Thrombozytenstimulation mit ADP (50 μ M) bzw. TRAP (25 μ M) bei GBM-Patienten und Kontrollprobanden. Dargestellt ist der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) des CD11b-Signals über den Monozyten. Die Whisker zeigen Minimum und Maximum an. $n = 11$ (unstimuliert); $n = 10$ (ADP); $n = 10$ (TRAP); ns $p \geq 0,05$

5.4.2 Expression von CD11b auf Granulozyten

In den Messungen zur CD11b-Expression auf Granulozyten zeigte sich eine tendenziell erniedrigte Expression in der Gruppe der GBM-Patienten, sowohl bei der Messung des nicht stimulierten Versuchsansatzes (CON: Median 235,1 MFI, Spannweite von 121,9 MFI bis 477 MFI; GBM: Median 138 MFI, Spannweite von 77,7 MFI bis 372 MFI; $p = 0,065$) als auch nach *ex-vivo*-Stimulation mit ADP (CON: Median 283 MFI, Spannweite von 222,9 MFI bis 604,2 MFI; GBM: Median 188 MFI, Spannweite von 97,2 MFI bis 584,5 MFI; $p = 0,075$) und TRAP (CON: Median 469,3 MFI, Spannweite von 310,5 MFI bis 751 MFI; GBM: Median 357,3 MFI, Spannweite von 274,2 MFI bis 669,5 MFI; $p = 0,1$). Diese Unterschiede waren jedoch in keinem Fall signifikant. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 dargestellt.

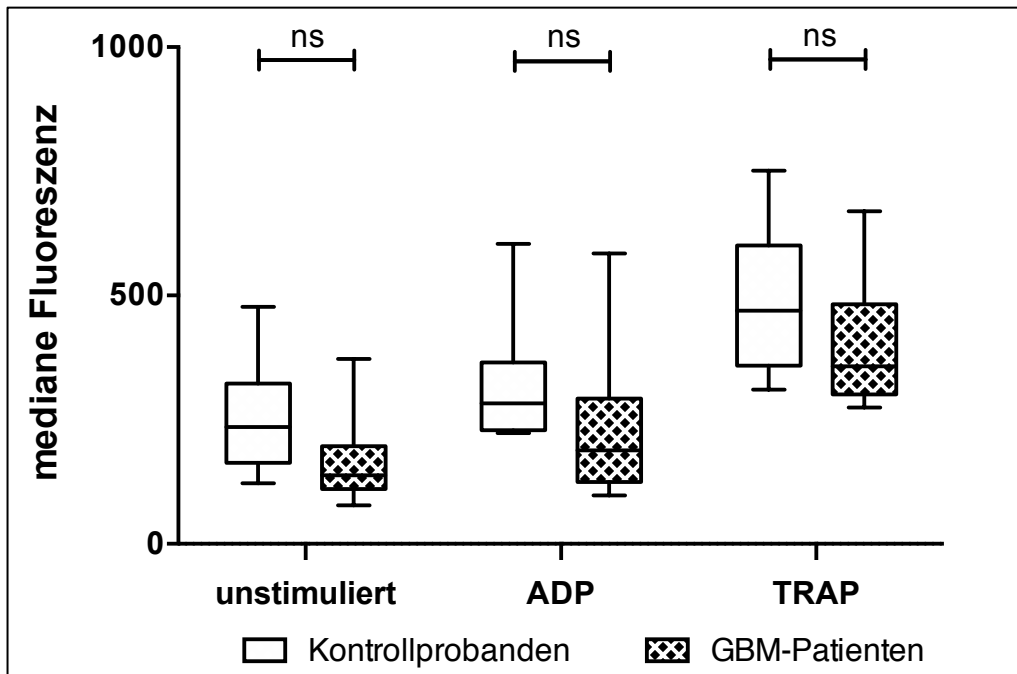


Abbildung 16: CD11b in der Granulozytenpopulation bei GBM-Patienten und Kontrollprobanden.

Gemessen wurde die basale CD11b-Anbindung (unstimuliert) sowie die CD11b-Anbindung an Granulozyten nach *ex-vivo*-Thrombozytenstimulation mit ADP (50 μ M) bzw. TRAP (25 μ M) bei GBM-Patienten und Kontrollprobanden. Dargestellt ist der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) des CD11b-Signals über den Granulozyten. Die Whisker zeigen Minimum und Maximum an. n = 11 (unstimuliert); n = 10 (ADP); n = 11 (TRAP); ns p \geq 0,05

5.4.3 Expression von CD11b auf Lymphozyten

In den Messungen zur CD11b-Expression auf Lymphozyten zeigten sich keine Unterschiede zwischen den GBM-Patienten und Kontrollprobanden. Weder in den nicht stimulierten Versuchsansätzen (CON: Median 8,5 MFI, Spannweite von 7,1 MFI bis 44,2 MFI; GBM: Median 9 MFI, Spannweite von 1 MFI bis 16,8 MFI; p = 0,83), noch nach *ex-vivo*-Stimulation durch ADP (CON: Median 8,6 MFI, Spannweite von 7,6 MFI bis 45,4 MFI; GBM: Median 9,1 MFI, Spannweite von 5,1 MFI bis 14,3 MFI; p = 0,64) oder TRAP (CON: Median 8,9 MFI, Spannweite von 8,2 MFI bis 49,5 MFI; GBM: Median 9,2 MFI, Spannweite von 2,6 MFI bis 17 MFI; p = 0,73) konnten signifikante Unterschiede bezüglich der CD11b-Expression festgestellt werden. Abb. 17 zeigt die Ergebnisse der CD11b-Expression auf Lymphozyten.

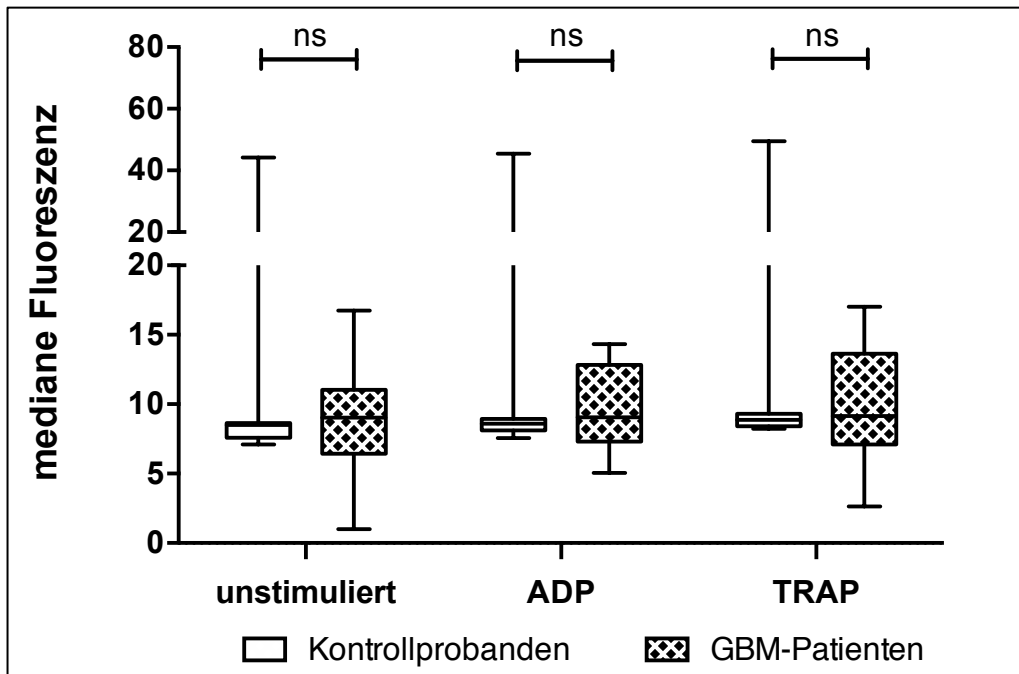


Abbildung 17: CD11b in der Lymphozytenpopulation bei GBM-Patienten und Kontrollprobanden.

Gemessen wurde die basale CD11b-Anbindung (unstimuliert) sowie die CD11b-Anbindung an Lymphozyten nach *ex-vivo*-Thrombozytenstimulation mit ADP (50 μ M) bzw. TRAP (25 μ M) bei GBM-Patienten und Kontrollprobanden. Dargestellt ist der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) des CD11b-Signals über den Lymphozyten. Die Whisker zeigen Minimum und Maximum an. n = 11 pro Gruppe; ns p \geq 0,05

5.5 Bestimmung des gesamten thrombozytären P-Selektins im Blutplasma

Die Bestimmung des gesamten thrombozytären P-Selektins (Expression und Sekretion) erfolgte in PRP. Das Blutplasma der GBM-Patienten enthielt signifikant mehr thrombozytäres P-Selektin als das Blutplasma der Kontrollprobanden (CON: Median 58,6 ng/ml, Spannweite von 31,2 ng/ml bis 96,6 ng/ml; GBM: Median 75,9 ng/ml, Spannweite von 30,6 ng/ml MFI bis 135,6 ng/ml; p = 0,01). Die Ergebnisse sind in Abb. 18 dargestellt.

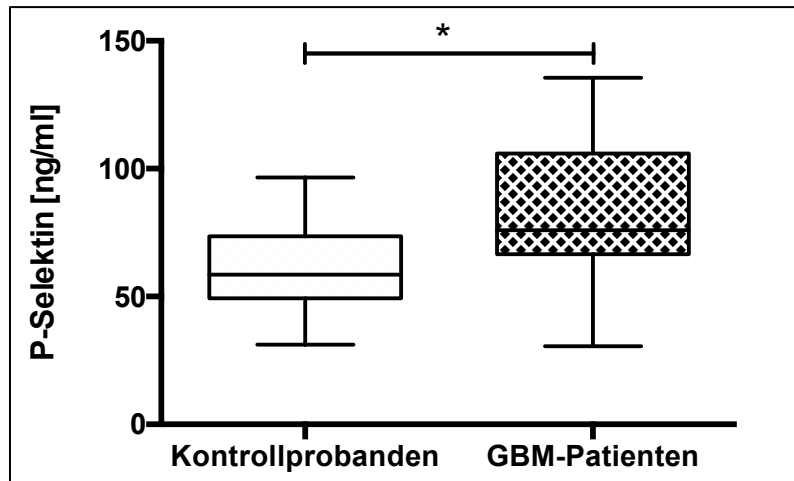


Abbildung 18: P-Selektin-Konzentration gemessen in PRP von GBM-Patienten und Kontrollprobanden.

Vermessen wurde wiederaufgetautes PRP durch ELISA. Dargestellt ist der Median der P-Selektin-Konzentration in ng/ml. Die Whisker zeigen Minimum und Maximum. n = 19 pro Gruppe; * p < 0,05

5.6 Bestimmung von zirkulierendem Sphingosin-1-Phosphat

Die Bestimmung des zirkulierenden S1P wurde in PRP und PPP durchgeführt und ist in Abb. 19 abgebildet. Im PRP zeigten sich signifikant verringerte S1P-Spiegel bei den GBM-Patienten verglichen mit den Kontrollprobanden (CON: Median 0,56 μ M, Spannweite von 0,41 μ M bis 0,81 μ M; GBM: Median 0,49 μ M, Spannweite von 0,36 μ M bis 0,69 μ M; p = 0,04). Bei der Untersuchung des PPP ergaben sich keine Unterschiede zwischen den GBM-Patienten und Kontrollprobanden (CON: Median 0,43 μ M, Spannweite von 0,28 μ M bis 0,65 μ M; GBM: Median 0,39 μ M, Spannweite von 0,28 μ M bis 0,72 μ M; p = 0,24). Bei der Bildung der Differenz aus PRP und PPP zeigte sich eine Tendenz zu reduzierter S1P-Konzentration in der Gruppe der GBM-Patienten (CON: Median 0,12 μ M, Spannweite von 0,01 μ M bis 0,29 μ M; GBM: Median 0,09 μ M, Spannweite von -0,11 μ M bis 0,22 μ M; p = 0,06).

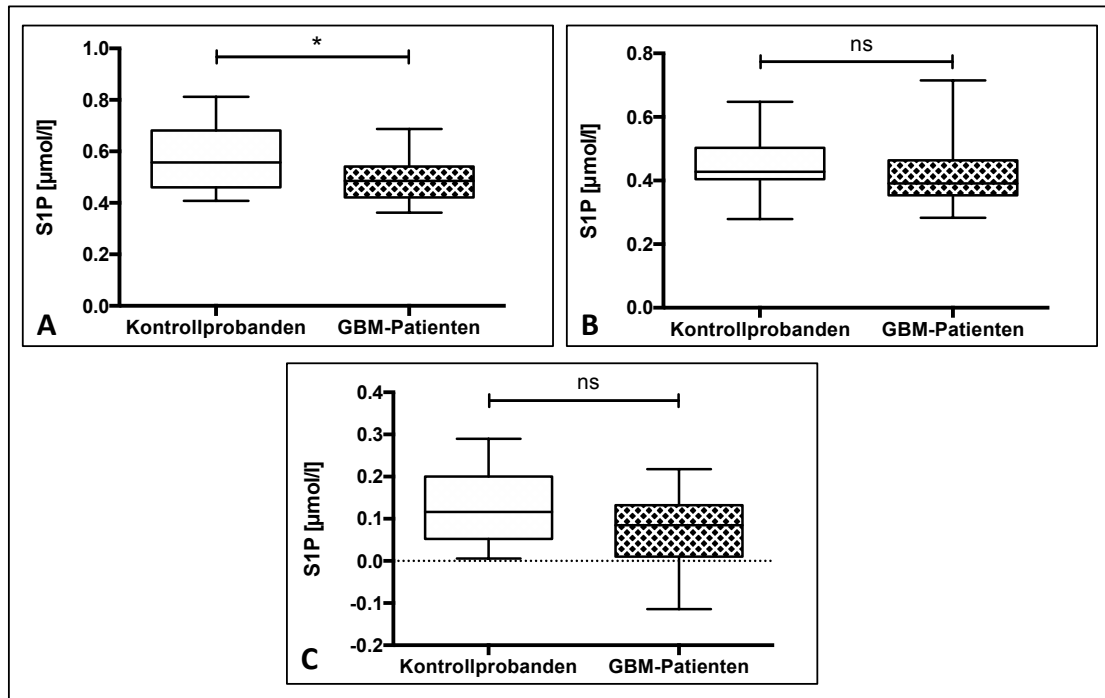


Abbildung 19: Sphingosin-1-Phosphat-Konzentration gemessen in PRP und PPP von GBM-Patienten und Kontrollprobanden sowie die Differenz von PRP - PPP

Vermessen wurde wiederaufgetautes PRP (A) und PPP (B) durch LC-MS/MS. Zudem wurden die PPP-Werte von den PRP-Werten subtrahiert (C). Dargestellt ist jeweils der Median der Sphingosin-1-Phosphat-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$. Die Whisker zeigen Minimum und Maximum an. $n = 17$ pro Gruppe; * $p < 0,05$; ns $p \geq 0,05$

5.7 Bestimmung der Gesamt-Thrombin-Bildungskapazität

Die Gesamt-Thrombinbestimmung wurde in aufgetautem PRP durchgeführt. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Gesamt-Thrombins (CON: Median 1392 nM, Spannweite von 876 nM bis 1978 nM; GBM: Median 1417 nM, Spannweite von 636 nM bis 2475 nM; $p = 0,7$), des Spitzenthrombins (CON: Median 102 nM, Spannweite von 59,7 nM bis 146 nM; GBM: Median 108 nM, Spannweite von 41 nM bis 187 nM; $p = 0,77$) und der lag time (CON: Median 3,4 min, Spannweite von 2,4 min bis 6,4 min; GBM: Median 3,4 min, Spannweite von 2,2 min bis 5,6 min; $p = 0,88$) zwischen den GBM-Patienten und den Kontrollprobanden festgestellt werden. Alle Ergebnisse sind in Abb. 20 zusammengefasst.

5 Ergebnisse

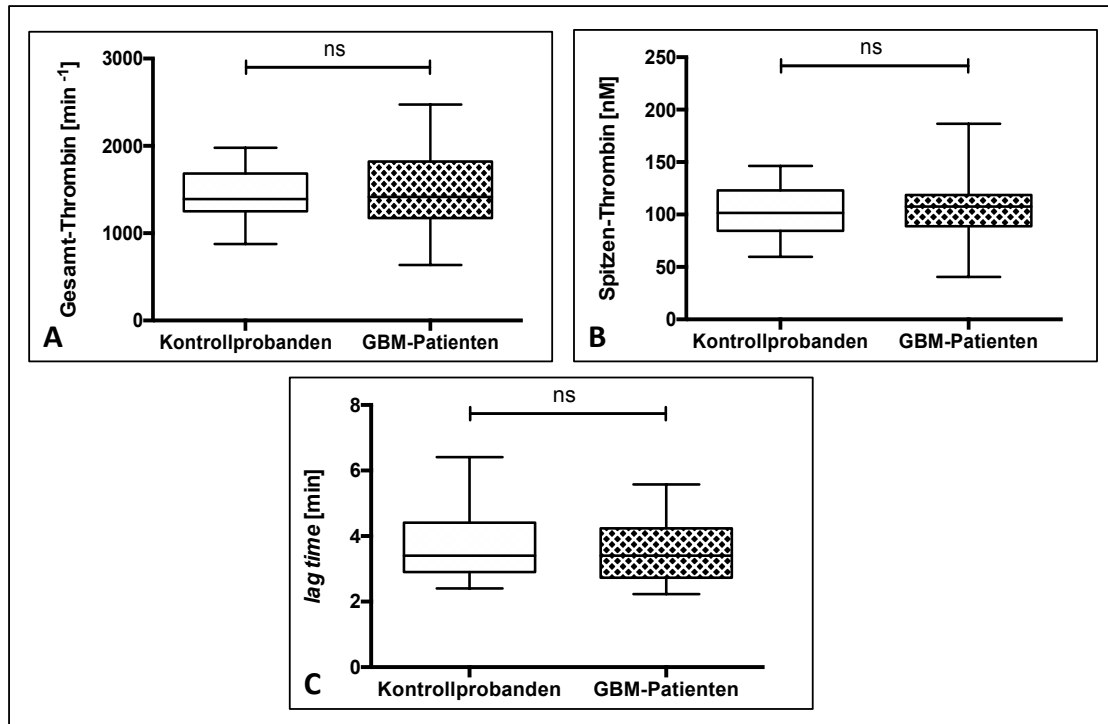


Abbildung 20: Gesamt-Thrombin (A), Spitzen-Thrombin (B) und Thrombin lag-time (C) in PRP von GBM-Patienten und Kontrollprobanden.

Vermessen wurde wiederaufgetautes PRP durch ein *Thrombin Generation Assay*. Dargestellt ist der Median der Gesamt-Thrombinbildung über die Zeit (min) (A), der Median der Spitzenthrombinbildung in nmol/l (B) sowie der Median der lag-time in Minuten (C). Die Whisker zeigen Minimum und Maximum an. n = 19 pro Gruppe; ns p ≥ 0,05

5.8 Übersicht der Ergebnisse

Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der generierten Ergebnisse.

Tabelle 3

- ↑ signifikant erhöht in der Gruppe der GBM-Patienten verglichen zu der Kontrollgruppe ($p < 0,05$)
- ↓ signifikant reduziert in der Gruppe der GBM-Patienten verglichen zu der Kontrollgruppe ($p < 0,05$)
- (↑) tendenziell erhöht in der Gruppe der GBM-Patienten verglichen zu der Kontrollgruppe ($p < 0,1$)
- (↓) tendenziell reduziert in der Gruppe der GBM-Patienten verglichen zu der Kontrollgruppe ($p < 0,1$)
- kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der GBM-Patienten und der Kontrollgruppe ($p > 0,05$)

Experiment		nativ	ADP	TRAP
Thrombozytenaktivierung	P-Selektin	-	-	(↑)
	CD63	↑	-	↑
	CD40L	(↑)	-	-
	Fibrinogen	(↑)	↑	-
Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate	Monozyten	-	-	(↓)
	Granulozyten	-	-	-
	Lymphozyten	-	-	-
CD11b Expression	Monozyten	-	-	-
	Granulozyten	(↓)	(↓)	(↓)
	Lymphozyten	-	-	-
Plasma P-Selektin	PRP	↑		
S1P-Konzentration	PRP	↓		
	PPP	-		
	PRP-PPP	(↓)		
Thrombinbildung	gesamt	-		
	Peaklevel	-		
	lag time	-		

6 Diskussion

6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Dissertationsarbeit konnte eine gesteigerte Aktivierung zirkulierender Thrombozyten bei GBM-Patienten gezeigt werden. Diese zeigte sich am prägnantesten in der Oberflächenexpression von CD63 und der Oberflächenexpression und Sekretion von P-Selektin. Auch die Oberflächenexpression des GPIIb/IIIa und von CD40L zeigte sich, wenn auch nicht statistisch signifikant, auf Thrombozyten von GBM-Patienten erhöht. Neben der basalen Aktivität zeigte sich auch die *ex-vivo*-Stimulierbarkeit der Thrombozyten mit ADP oder TRAP in GBM Patienten gesteigert, wobei eine höhere Ergebnisheterogenität vorliegt. Auf eine erhöhte Thrombozytenaktivität deutete auch die größere S1P-Ausschüttung aus Thrombozyten bei GBM-Patienten hin. Die Gesamtkonzentration von S1P im Plasma der GBM-Patienten war signifikant verringert.

Obwohl die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten bei einer gesteigerten Thrombozytenaktivierung normalerweise sehr sensitiv ansteigt, wurde in den vorliegenden Ergebnissen eine vor allem in der Population der Monozyten verminderte Interaktion nachgewiesen, was ein sehr interessantes Ergebnis darstellt und in unserer Arbeitsgruppe weiterführend untersucht wird.

Zudem zeigte sich die Oberflächenexpression von CD11b auf Granulozyten der GBM-Patienten verringert. Zur Charakterisierung der globalen Hämostase wurde die Thrombinbildung untersucht. Hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den GBM-Patienten und Kontrollen.

Teilergebnisse dieser Dissertation wurden in dem *peer-review journal* „*Oncotarget*“ am 25. Mai 2018 veröffentlicht [86].

6.2 Limitationen der Dissertation

Bezüglich der *ex-vivo*-Analyse der Thrombozytenaktivierung wurde mit größter Sorgfalt darauf geachtet, dass die artifizielle Aktivierung der Thrombozyten so gering wie möglich ausfällt. Vergleicht man die Daten der Kontrollprobanden der

vorliegenden Studie, so lässt sich feststellen, dass die Thrombozytengrundaktivierung dem gleichen Umfang ähnlich durchgeführter Experimente entspricht und somit die prä-analytische Thrombozytenaktivierung keinen erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse hat [87-90].

Die Ergebnisse dieser Studie basieren auf *ex vivo* durchgeführten Experimenten, was einer *in vivo* Situation nicht vollkommen entsprechen kann. Durch die *ex vivo* Stimulationen mit ADP bzw. TRAP wurden jedoch Thrombozytenaktivatoren verwandt, die die *in vivo* Stimulation, wie u.a. durch Tumoren geschehend, imitieren und auch in zahlreichen anderen Studien zum Einsatz kommen [87, 90-98].

Weitere Störfaktoren wurden weitestgehend minimiert. Das Blut der Patienten wurde vor Beginn der operativen Therapie abgenommen, da in mehreren Studien gezeigt werden konnte, dass bereits die Art und der Umfang der operativen Therapie einen Einfluss auf die Entwicklung eines VTE bei Patienten mit HGG haben kann [38, 99]. Durch entsprechende alters- und geschlechtsspezifische Zuordnungen zueinander wurden weitere Störgrößen zwischen den GBM-Patienten- und Kontrollprobanden reduziert. Die GBM-Patienten unterschieden sich lediglich in der Einnahme von Dexamethason, Levetiracetam, Protonenpumpeninhibitoren und Heparin zu den Kontrollen. Dies war zu erwarten, da GBM-Patienten entsprechend ihrer erkrankungsspezifischen Komplikationen diese Medikamente bereits vor OP erhalten [14]. Keiner der GBM-Patienten oder Probanden nahm ASS oder andere nicht-steroidale antiinflammatorische Medikamente mit Auswirkung auf die Thrombozytenfunktion ein. Die Vorerkrankungen, Hausmedikation und Blutwerte unterschieden sich, bis auf die erhöhten Leukozytenwerte bei den GBM-Patienten, in beiden Gruppen nicht. Die erhöhten Leukozytenwerte sind dabei gut in Einklang mit der Dexamethasontherapie bei den GBM-Patienten zu bringen, da Dexamethason zur Erhöhung der Leukozytenzahl bei GBM-Patienten führen kann [100]. Insbesondere waren die Thrombozytenzahlen in beiden Gruppen vergleichbar. Eine Thrombozytose lag in keiner Gruppe vor.

Um möglichst belastbare Ergebnisse zu generieren, sind gerade bei Experimenten mit humanem Primärgewebe große Fallzahlen unablässig. Der Probenumfang $n = 21$ dieser Studie mag daher klein erscheinen, doch entspricht dies durchaus einem

repräsentativem Probenumfang vergleicht man andere Studien, die die Thrombozytenaktivierung thematisieren [80, 88, 89, 93, 98, 101].

6.3 Aktivitätsstatus zirkulierender Thrombozyten im GBM

P-Selektin ist ein gut untersuchter Aktivierungsmarker für Thrombozyten, der in unterschiedlichen Erkrankungen mit thrombembolischem oder inflammatorischem Hintergrund untersucht wurde. So zeigten 2005 *Chirinos et al.* bei 25 untersuchten Patienten in einer Studie zu venösen Thrombembolien eine 7-fach höhere P-Selektinexpression, verglichen mit den 25 Kontrollprobanden [101]. *Cha et al.* untersuchten die P-Selektinexpression auf Thrombozyten von Patienten mit atherosklerotisch bedingten Schlaganfällen, nicht nur innerhalb von 24 h nach stattgehabter Ischämie, sondern auch im Verlauf von 90 Tagen. In der gesamten Zeit zeigte sich die P-Selektinexpression auf den Thrombozyten der 29 untersuchten Patienten im Mittel 0,4-fach gegenüber den 52 Kontrollprobanden erhöht [102]. Bei 23 Patienten mit peripher arterieller Verschlusskrankheit (pAVK), konnten *Tan et al.*, um das 0,7-fache erhöht, mehr P-Selektin positive Thrombozyten detektieren als bei den 30 untersuchten gesunden Kontrollprobanden [103]. Eine um das doppelte erhöhte P-Selektinexpression konnten *Tschöpe et al.* bei 30 Patienten mit Diabetes mellitus gegenüber der Kontrollgruppe (n = 27) nachweisen [104].

In der vorliegenden Studie zeigt sich eine 0,2-fach erhöhte Expression von thrombozytär gebundenem P-Selektin bei GBM-Patienten gegenüber Kontrollprobanden. Die Plasmaspiegel des sekretierten P-Selektins sind bei GBM-Patienten 0,3-fach und statistisch signifikant erhöht. *Campanella et al.* bestätigen 2020 mit ihren Untersuchungen zur Thrombozytenaktivierung bei GBM-Patienten die Ergebnisse dieser Dissertation. Die P-Selektinexpression auf Thrombozyten von GBM-Patienten zeigte sich bei ihnen deutlich und signifikant um das 1,24-fache gegenüber den Kontrollen erhöht. Eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse kann auf Grund methodischer Unterschiede nicht vorgenommen werden. Neben Natriumcitrat als Antikoagulanzen, wurde das PRP von *Campanella et al.* nach einem anderen Protokoll aufbereitet sowie ein deutlich kleineres Patientenkollektiv (n = 6) untersucht. Lösliches P-Selektin wurde nicht gemessen [80].

Signifikant erhöhte P-Selektinspiegel im Plasma von Patienten mit Vorhofflimmern wurden in Untersuchung von *Alberti et al.* beschrieben. Jedoch zeigte sich die P-Selektin-Expression auf den Thrombozyten der Patienten deutlich gegenüber denen der Kontrollprobanden reduziert. Die hohen Spiegel an plasmatischem P-Selektin und verringerter P-Selektinexpression auf Thrombozyten wurden hier als Ausdruck völliger thrombozytärer Erschöpfung interpretiert. Die Thrombozyten schienen maximal aktiviert und den Großteil ihres gesamten P-Selektins in das Plasma abgegeben zu haben. Insbesondere weil nach adäquater Thrombozytenstimulation mit ADP die P-Selektin-Zunahme auf den Thrombozyten der Patienten mit Vorhofflimmern deutlich geringer ausfiel als bei den Kontrollen [98].

Die Thrombozyten der GBM-Patienten dieser Dissertationsarbeit weisen über die erhöhten plasmatischen P-Selektinspiegel hinaus, eine erhöhte P-Selektin-Expression auf ihrer Oberfläche auf. Sie erreichen nicht diesen Status der völligen Erschöpfung, wie von *Alberti et al.* beobachtet.

Die erhöhte Thrombozytenaktivierung wird weiterhin durch die deutlich erhöhte CD63-Expression auf Thrombozyten der GBM-Patienten untermauert. GBM-Patienten zeigten in dieser Studie eine 0,5-fach höhere Expression gegenüber den Kontrollprobanden.

CD63 ist ebenfalls ein gut etablierter Thrombozytenaktivierungsmarker und in systemisch inflammatorischen Erkrankungen erhöht beschrieben worden. In der bereits erwähnten Studie zu Patienten mit pAVK zeigten *Tan et al.* eine 0,85-fach erhöhte CD63-Expressionen auf Thrombozyten bei pAVK Patienten, verglichen mit den Kontrollprobanden [103]. Auch *Tschöpe et al.* untersuchten CD63 in der Studie zu Patienten mit Diabetes mellitus und fanden eine 2,3-fach höhere Expressionen von CD63 bei Patienten [104]. In der Studie zur CD63-Expression auf Thrombozyten bei Patienten mit atherosklerotisch bedingten Schlaganfällen, wiesen *Cha et al.* mit im Mittel 0,3-fach höheren CD63-Expressionen über die gesamte Zeit von 90 Tagen eine signifikante Mehrexpression gegenüber den Kontrollprobanden nach [102].

Weiterhin spricht die um das doppelte erhöhte Fibrinogenanbindung an den aktivierten GPIIb/IIIa für eine stärkere Thrombozytenaktivierung bei GBM-Patienten. Dieser Unterschied wies keine statistische Signifikanz auf, was eventuell auf eine interindividuell hohe Streuung dieser Messwerte zurückzuführen sein könnte. In der

Studie zur Thrombozytenaktivierung bei Patienten mit aspirinexazerbiertem Asthma bronchiale, untersuchten *Mitsui et al.* – neben der P-Selektin- und CD63-Expression – die Expression von GPIIb/IIIa an 30 Patienten und 14 gesunden Kontrollen. Statistisch signifikant zeigten sich P-Selektin um das 2,6-fache und CD63 um das 2-fache bei den Asthmapatienten gegenüber den Kontrollprobanden erhöht. GPIIb/IIIa, der durch die Anbindung von PAC-1 charakterisiert wurde, zeigte sich ebenfalls bei den Patienten um das 0,72-fache, jedoch nicht statistisch signifikant erhöht. Insbesondere unter den gesunden Kontrollen fällt auf, dass eine deutlich größere Streuung der Messwerte von GPIIb/IIIa gegenüber den Messwerten von P-Selektin und CD63 vorliegt [89]. Dieser Sachverhalt wurde von den Autoren nicht explizit diskutiert, könnte aber, wie in der hier vorliegenden Studie, für eine fehlende statistische Signifikanz verantwortlich sein.

CD40L zeigt sich im unstimulierten Ansatz auf der Thrombozytenoberfläche von GBM-Patienten erhöht, verglichen mit den Kontrollprobanden. *Henn et al.* konnten in ihren ersten Untersuchungen zeigen, dass aktivierte Thrombozyten mehr CD40L auf ihrer Oberfläche exprimierten und damit entzündliche Reaktionen am Endothel begünstigten. Dass der in der vorliegenden Studie gezeigte Unterschied zwischen GBM-Patienten und Kontrollprobanden nicht signifikant ist, könnte eventuell in der relativen Instabilität dieses Parameters begründet sein. *Henn et al.* zeigten in ihren Untersuchungen, dass die Expression von CD40L auf aktivierten Thrombozyten bereits eine Minute nach Aktivierung abnimmt [105]. Trotz zügiger Probenaufbereitung dauerte es ca. eine Stunde bis die Proben dieser Dissertationsarbeit vermessungsbereit waren.

Gut in den Kontext der thrombozytären Mehraktivierung lässt sich weiterhin die S1P-Konzentrationsdifferenz von PRP und PPP setzen. Hier zeigen GBM-Patienten eine reduzierte Differenz. Die Thrombozyten der GBM-Patienten müssen somit im Rahmen ihrer Mehraktivierung bereits große Mengen ihres intrazellulären S1P ausgeschüttet haben, da S1P auch von aktivierten Thrombozyten freigesetzt wird [45, 80].

6.4 *Ex-vivo*-Reaktivität der Thrombozyten von GBM-Patienten auf spezifische Agonisten

Hohe Konzentrationen von thrombozytären Agonisten sind in vielen malignen Tumorentitäten wie dem Ovarial-, Mamma- und Colonkarzinom beschrieben [80, 106-110]. Um ein solch Thrombozyten-stimulierendes-Milieu im GBM zu imitieren, schlossen sich *ex-vivo-Stimulationsversuche* an. Hierbei wurden mit 50 μ M ADP und 25 μ M TRAP bewusst hohe Konzentrationen gewählt, um ein hohes prokoagulatorisches und Thrombozyten-aktivierendes-Potential, wie im GBM vermutet, zu imitieren [10, 80].

Nach *ex-vivo-Stimulation* mit ADP zeigte sich eine signifikant höhere Fibrinogenanbindung an den GPIIb/IIIa auf den Thrombozyten der GBM-Patienten. Nach *ex-vivo-Stimulation* mit TRAP zeigten die Thrombozyten der GBM-Patienten signifikant höhere CD63-Expressionen auf ihrer Oberfläche, P-Selektin war in der Tendenz erhöht. Auch *Riedl et al.* fanden in einer prospektiven Studie mit einer gemischten Population von 62 Tumorpatienten eine erhöhte Reaktivität der Thrombozyten auf die Thrombozytenstimulation mit TRAP gegenüber der Probandenpopulation (n = 30), was sich in der Mehrexpression von P-Selektin widerspiegelte. GBM-Patienten wurden in dieser Studie jedoch nicht separat analysiert. Jedoch zeigte sich bei der differenzierten Betrachtung der Patienten, dass diejenigen mit schlechter Prognose (früheres Versterben, Entwicklung einer Thrombose) eine geringere Expression des aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptors sowie P-Selektin-Expression auf den Thrombozyten aufwiesen [94]. Eventuell befanden sich die Thrombozyten hier, wie bei *Alberti et al.*, auch in einem Stadium völliger thrombozytärer Erschöpfung [98]. Plasmatische P-Selektinspiegel die diese Theorie stützen würden, wurden von *Riedl et al.* nicht untersucht. Jedoch sind erschöpfte Thrombozyten im Rahmen des stark prothrombotischen Milieus von Malignomen in einer gemischten Gruppe von Tumorpatienten bereits seit längerem bekannt [111]. *Cooke et al.* fanden eine erhöhte Reaktivität von Thrombozyten bei Patienten mit metastasierten Tumoren unterschiedlicher Herkunft. Gemessen wurde die P-Selektin-Expression auf den Thrombozyten der Tumorpatienten sowie die Thrombozytenaggregometrie jeweils mit und ohne Thrombozytenstimulation [90].

Die Thrombozytenstimulation erfolgte hier unter anderem mit ADP bzw. TRAP. Die P-Selektin-Expression zeigte im unstimulierten Ansatz keine deutlichen Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollprobanden. Nach Stimulation mit TRAP bzw. ADP hingegen exprimierten die Thrombozyten der Patienten signifikant mehr P-Selektin als die Kontrollprobanden. In der Thrombozytenaggregometrie zeigten die Thrombozyten der Patienten mit und ohne Stimulation signifikant höhere Aggregatbildungen als die Kontrollprobanden. Wiederum fand keine differenzierte Betrachtung von GBM-Patienten auf Grund zu geringer Patientenzahlen statt.

Auch *Campanella et al.* untersuchten die Reaktivität der Thrombozyten von GBM-Patienten hinsichtlich ihrer P-Selektinexpression nach ADP- bzw. TRAP-Stimulation. Nach Stimulation mit ADP fanden sie eine 1,3-fach höhere, nach Stimulation mit TRAP eine 0,24-fach höhere P-Selektinexpression auf Thrombozyten der GBM-Patienten gegenüber den Kontrollprobanden.

Interessanterweise verwendeten *Riedl et al.*, *Cooke et al.* sowie *Campanella et al.* deutlich geringere Stimulationsmengen, als sie in den Untersuchungen zu dieser Dissertation verwendet wurden.

Während *Cooke et al.* Thrombozyten mit ADP in den Konzentrationen von 1 und 5 μM , sowie TRAP mit Konzentrationen von 1, 2 und 20 μM stimulierten, verwandten *Campanella et al.* 10 μM ADP und 5 μM TRAP [80, 90]. *Riedl et al.* führten die *ex vivo* Thrombozytenaktivierung ausschließlich mit 14,25 μM TRAP durch [94]. Zum Vergleich, die in der vorliegenden Studie verwendeten Konzentrationen der Thrombozytenstimulanzien liegen bei 50 μM für ADP bzw. 25 μM für TRAP. Insbesondere bei TRAP-Stimulation mit 20 μM fanden *Cooke et al.* keine Unterschiede zwischen der Thrombozytenaktivität von Probanden und Patienten. Nach *ex-vivo-Stimulation* mit 1 und 2 μM TRAP zeigte sich hingegen die Thrombozytenaktivität der Patienten signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht [90]. Dies deutet darauf hin, dass die Unterschiede nicht bei einer maximal abgesättigten TRAP-Konzentration zu sehen sind, wohl aber bei einer submaximalen Stimulation. Gleiches könnte für die ADP-Stimulation zutreffen. *Cooke et al.* wählten für die ADP-Stimulation max. 5 μM und lagen damit bei einem Zehntel, *Campanella et al.* verwendeten mit 10 μM ADP ein Fünftel der hier verwendeten Stimulationsdosis. Hiermit wäre zu erklären, warum mit den in der vorliegenden

Dissertation gewählten hohen Stimulationskonzentration an ADP und TRAP die Unterschiede zwischen Thrombozyten der GBM-Patienten und Probanden nicht so deutlich ausfielen. Allerdings wurden die hohen Konzentrationen an ADP und TRAP in dieser Dissertation bewusst gewählt, um das hohe prokoagulatorische Tumormilieu des GBM *ex vivo* zu imitieren.

Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen Kontrollprobanden und GBM-Patienten bezüglich der CD40L-Expression auf Thrombozyten, weder nach ADP- noch nach TRAP-Stimulation. Dies ist gut in Einklang mit den Ergebnissen von *Henn et al.* zu bringen. Diese stellten fest, dass nach adäquater Thrombozytenstimulation mit Thrombin deutlich mehr CD40L von Thrombozyten gesunder Probanden produziert, jedoch als lösliches Produkt von der Zelloberfläche in den Extrazellularraum abgegeben wurde. Mit Zunahme des löslichen CD40L, nahm die Nachweisbarkeit des zellulär gebundene CD40L innerhalb einer Stunde nach Aktivierung ab [66].

6.5 Heterotype Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten bei GBM-Patienten

Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate – als Surrogatparameter für inflammatorische Prozesse – bilden sich vorwiegend unter Thrombozyten und Monozyten und am wenigsten unter Thrombozyten und Lymphozyten aus, was auch in den hier vorliegenden Ergebnissen nachweisbar ist [69-71, 88]. Die Interaktion wird initial und am wichtigsten über P-Selektin-Expression mit dem Bindungspartner PSGL-1 auf Leukozyten vermittelt [69]. Darüber hinaus trägt der GPIIb/IIIa-Rezeptor zu dieser Konjugatbildung bei [112]. Typischerweise nimmt die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Konjugaten nach Aktivierung von Thrombozyten zu [71, 72, 112]. Dies zeigt sich deutlich bei der TMK-Bildung der Kontrollprobanden, welche sich nach TRAP-Stimulation signifikant gegenüber der nicht stimulierten TMK-Bildung erhöht. Nach *ex-vivo-Stimulation* mit ADP und TRAP kann bei deutlich stärkerer P-Selektin-Expression und Fibrinogenanbindung an GPIIb/IIIa auf Thrombozyten der GBM-Patienten eine paradoxerweise geringere TMK-Bildung bei GBM-Patienten gegenüber der Kontrollprobandengruppe festgestellt werden.

Erhöhte Thrombozyten-Monozyten-Konjugate konnten in mehreren Erkrankungen beobachtet werden und gingen dabei mit einer erhöhten P-Selektin-Expression auf

Thrombozyten einher. *Villmow et al.* untersuchten 2003 47 Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen, 10 davon mit chronisch-myeloischer Leukämie (CML), 11 mit Polycythaemia vera (PV), und jeweils 12 mit primärer Myelofibrose (PMF) bzw. essenzieller Thrombozythämie (ET). In allen 4 Gruppen ließen sich erhöhte P-Selektin-Expressionen auf Thrombozyten verglichen mit den 16 Kontrollprobanden nachweisen. Signifikant erhöhte TMK-Bildungen zeigten sich aber nur bei Patienten mit PV und ET, hier jeweils um das 0,9-fache verglichen mit den Kontrollprobanden erhöht. Interessanterweise wiesen hier diese beiden Gruppen unter allen 4 myeloproliferativen Erkrankungen das höchste Risiko für die Entwicklung thrombembolischer Komplikationen auf [88].

Auch *Riedl et al.* fanden in ihren Untersuchungen zu 62 heterogenen Tumorpatienten eine erhöhte P-Selektin-Expression auf Thrombozyten verglichen mit den 30 vermessenen Kontrollprobanden. Die erhöhte Thrombozytenaktivität bei den Tumorpatienten ging mit einer signifikant um das 0,8-fach gesteigerten Konjugatbildung von TMKs einher. Nicht nur im nativen Ansatz, auch nach Thrombozytenstimulation mit TRAP zeigten sich die Thrombozyten der Patienten – durch weitere Mehrexpression von P-Selektin – reaktiver gegenüber den Thrombozyten der Kontrollprobanden. Im Vergleich zum unstimulierten Ansatz nahm die TMK-Bildung bei den Patienten um das 2,5-fache zu und unterschied sich signifikant um das 0,5-fache zu den Kontrollprobanden [94]. Eine differenzierte Betrachtung von GBM-Patienten wurde dabei wiederum nicht durchgeführt.

Chirinos et al. fanden, in der bereits angeführten Studie zu 25 Patienten mit VTE, eine um 0,64-fach erhöhte Thrombozyten-Leukozyten-Konjugatbildung bei den Patienten verglichen mit den Kontrollprobanden (n = 25) bei entsprechend erhöhter P-Selektin-Expression der Thrombozyten. Leider wurden in dieser Studie die Leukozytenpopulationen zusammengefasst und nicht differenziert betrachtet [101].

Bei der bereits erwähnten Untersuchung von *Alberti et al.* zu Patienten mit Vorhofflimmern wurden signifikant geringere Bildungen von TMK gefunden [98]. Berücksichtigt man, dass ebenfalls signifikant geringere P-Selektin-Expressionen auf den Thrombozyten dieser Patienten detektiert wurden, so ist diese reduzierte Konjugatbildung am ehesten als Folge eines P-Selektin-Mangels auf Thrombozyten zu betrachten. Da in der vorliegenden Dissertation eine hochnormale P-Selektin-

Expression auf Thrombozyten der GBM-Patienten nachgewiesen werden konnte, ist ein thrombozytäres Defizit für die geringe Konjugatbildung weniger anzunehmen. Daher lässt sich vermuten, dass ein für die TMK-Bildung wichtiger leukozytärer Rezeptor, wie beispielsweise PSGL-1, eine Rolle in dem Prozess spielen kann.

6.6 CD11b und Aktivierung der Leukozyten

CD11b bildet zusammen mit CD18 den Rezeptorkomplex Mac-1, welcher multiple Funktionen auf Leukozyten übernimmt. So dient er als Ligandenrezeptor für bspw. Fibrinogen und Komplementfaktoren und erfüllt als Adhäsionsmolekül wichtige Funktionen in der leukozytären Endotheladhäsion sowie Phagozytose [113, 114]. Besonders aktivierte Granulozyten und Monozyten exprimieren dieses Molekül, weshalb CD11b oft als Aktivierungsmarker für Leukozyten verwandt wird [101, 114]. Erhöhte CD11b-Expressionen auf Leukozyten wurden vor allem in inflammatorischen Geschehen wie Sepsis, Verbrennungen, Diabetes Mellitus und hämodialysierten Patienten aber auch in prothrombotischen Erkrankungen wie denen des myeloproliferativen Formenkreises und Patienten mit VTE beobachtet [101, 113, 115]. Reduzierte Expressionen fanden sich bei der chronischen myeloischen Leukämie, dem myelodysplastischen Syndrom sowie Neonaten [113].

Der Fokus der vorliegenden Dissertation lag nicht auf der Charakterisierung des Funktionsstatus zirkulierender Leukozyten, welche sehr viel detaillierter erfasst werden kann als durch die alleinige Messung der CD11b-Expression [116, 117]. In diesem einschränkenden Kontext sind die CD11b-Ergebnisse auch zu interpretieren. In der Monozytenpopulation zeigten sich keine Unterschiede in der CD11b-Expression zwischen GBM-Patienten und Kontrollprobanden. Diese Ergebnisse decken sich mit der Studie von *Alberti et al.*, die ebenfalls keine Unterschiede zwischen Patienten mit Vorhofflimmern und Kontrollprobanden hinsichtlich der CD11b-Expression auf Monozyten feststellen konnten und dies als unbeeinträchtigte Leukozytenfunktion interpretierten [98].

In der Granulozytenpopulation zeigte sich die CD11b-Expression bei GBM-Patienten tendenziell jedoch nicht statistisch signifikant gegenüber den Kontrollprobanden reduziert. Die Aktivierbarkeit der Granulozyten zeigte sich bei den GBM-Patienten

vor allem nach Stimulation mit TRAP nicht eingeschränkt. Ob dies als ein Ausdruck eingeschränkter Granulozytenfunktion, wie es bei Patienten mit myeloischen Erkrankungen oder Neugeborenen beobachtet wurde, gewertet werden kann, bleibt fragwürdig [113].

Die Lymphozytenpopulationen zeigten keine Unterschiede in der CD11b-Expression zwischen beiden Gruppen. Auch in der Studie von *Li et al.* zur Expression von CD11b auf Leukozyten wurden bei diesen im Vergleich zu Monozyten und Granulozyten bei gesunden Probanden keine besonderen Auffälligkeiten festgestellt. Außerdem war keine Mehrexpression von CD11b bei den Lymphozyten nach Leukozytenstimulation nachweisbar [114].

6.7 Sphingosin-1-Phosphat als pleiotropes Molekül im GBM

S1P ist ein wichtiges Mediatormolekül und trägt zur Entwicklung des immunsuppressiven, antiinflammatorischen und tumorsupportiven Mikromilieus im GBM bei [41]. Die Blut- und Gewebespiegel von S1P sind streng kontrolliert und liegen im unteren Mikromolarbereich, was sich in den Ergebnissen dieser Dissertation widerspiegelt [45]. Unterschiede in der S1P-Konzentration zwischen Blut und Geweben sorgen für die Einwanderung von Immunzellen, Migration von Stammzellen aber auch die Migration und Proliferation von malignen Zellen [43, 45, 46]. Der Einfluss von S1P auf die Lymphozytenmigration wurde erstmalig von *Schwab et al.* beschrieben. Sie konnten zeigen, dass hohe Konzentrationen von S1P in Lymphgeweben die Lymphozyten daran hinderten, aus diesen Geweben zu migrieren [118]. *Müller et al.* wiesen im Mausmodell nach, dass Makrophagen ein ähnliches Bestreben zu hohen S1P-Konzentrationen aufweisen. Insbesondere M1-Makrophagen zeigten ein hohes Migrationsbestreben zu hohen S1P-Konzentrationen [48]. Erhöhte Konzentrationen von S1P konnten von *Abuhusain et al.* in GBM-Geweben nachgewiesen werden [47]. Darüber hinaus konnte im GBM gezeigt werden, dass S1P via S1P-Rezeptoren die TAM Rekrutierung steuert und somit zu einer Anreicherung an TAM führt [41]. Im Tumormikromilieu zeigten *Weigert et al.* dass S1P an der antiinflammatorischen Phänotypenumstellung von M1- zu M2-Phänotypen beteiligt ist [49].

Im PRP der GBM-Patienten dieser Dissertation zeigte sich signifikant weniger S1P als im PRP der Kontrollprobanden. Diese peripher reduzierten S1P-Spiegel könnten einen noch größeren Konzentrationsunterschied von S1P zwischen dem Blut und dem GBM-Gewebe begünstigen. Dies wiederum könne die Monozytenmigration und konsekutive TAM-Bildung im GBM fördern. Vor dem Hintergrund, dass S1P wiederum die Polarisierung hin zu antiinflammatorischen M2-TAM im GBM unterstützt, kann der reduzierte S1P-Spiegel im GBM-Patientenplasma als ein systemischer Ausdruck der GBM vermittelten Antiinflammation gesehen werden [49].

6.8 Sekundäre Hämostase bei GBM-Patienten

Die Messung der *ex vivo* Gesamt-Thrombin-Bildungskapazität im Rahmen eines *Thrombin Generation Assays* ist eine etablierte Methode, um global die Funktionsfähigkeit des hämostatischen Systems beurteilen zu können und birgt großes Potential eine erhöhte Blutungs- oder Thromboseneigung zu ermitteln [119]. *Ay et al.* zeigten als erste, dass in einer heterogenen Gruppe von Tumorpatienten, bei diesen die eine VTE entwickelten, signifikant höhere spitzen Thrombinwerte sowie eine verkürzte *lag time* auftraten als bei jenen, die keine VTE entwickelten. Unterschiede in der Gesamt-Thrombin-Bildungskapazität zeigten sich keine [120]. Relativ war die Entwicklung von VTE in der Gruppe der Hirntumorpatienten am höchsten, jedoch wurde die Thrombinbildung für diese Gruppe weder spezifisch analysiert, noch wurde die genaue Hirntumorentität angegeben.

Interessanterweise fanden *Streiff et al.* bei einer Analyse von HGG-Patienten keine Unterschiede in der Thrombinbildungsfähigkeit zwischen den Patienten die VTE entwickelten und diesen, die keine entwickelten. Weitere koagulative Parameter wie das D-Dimer waren zwischen beiden Gruppen ebenfalls nicht unterschiedlich [38]. *Thaler et al.* untersuchten unter anderem die Spitzenthrombinbildung in einer Gruppe von HGG-Patienten mit und ohne Entwicklung von VTE und konnten ebenfalls keine Unterschiede feststellen [121].

Nie wurde in diesen Studien ein Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden durchgeführt, wie es in dieser Studie der Fall ist. Da in den beiden letztzitierten Studien jedoch keine Unterschiede in der Thrombinbildung zwischen HGG-Patienten

mit und ohne VTE gefunden wurden, erscheinen die hier fehlenden Unterschiede in der Thrombinbildung zwischen GBM-Patienten und Kontrollprobanden durchaus plausibel.

Die erhöhten Thrombinwerte in der Studie von *Ay et al.* in einer gemischten Population von Tumorpatienten sind am ehesten nicht auf die Thrombinwerte von GBM-Patienten zurückzuführen.

Thaler et al. fanden als unabhängige Prädiktoren für die Entwicklung einer VTE bei HGG-Patienten erhöhtes lösliches P-Selektin sowie reduzierte Thrombozytenzahlen [121]. Auch wenn die reduzierten Thrombozytenzahlen nicht bei den GBM-Patienten dieser Studie nachzuweisen waren, so ließ sich erhöhtes lösliches P-Selektin durchaus nachweisen.

6.9 Translationale Relevanz der Dissertation

Die Ergebnisse dieser Dissertation tragen zu einem weiteren Verständnis des äußerst komplexen prokoagulativen Potentials von GBM-Patienten bei. Diese Studie zeigt zum ersten Mal eine erhöhte Thrombozytenaktivierung durch erhöhte Expression von CD63 und P-Selektin sowie eine erhöhte Sekretion von P-Selektin im Patientenplasma in einer homogenen Gruppe von GBM-Patienten. Darüber hinaus konnte für diese Patientengruppe eine erhöhte Thrombozytenreaktivität auf Thrombozytenagonisten nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bieten einen weiteren Erklärungsansatz für das in der Gruppe der GBM-Patienten deutlich erhöhte prokoagulatorische Potential, welches in diversen Studien beobachtet wurde [10, 33-38]. Hierbei wurden vorwiegend Veränderungen der plasmatischen Gerinnung gefunden und als ursächlich beschrieben [10, 37, 38]. Dabei ist unabhängig vom GBM bekannt, dass eine erhöhte Thrombozytenaktivierung und Reaktivität auf Thrombozytenstimulanzen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von arteriellen und venös thrombembolischen Ereignissen einhergeht [72, 122]. Ob vor diesem Hintergrund die Beeinflussung der erhöhten Thrombozytenaktivität mittels gängiger Thrombozytenaggregationshemmer, wie Aspirin, Clopidogrel und weiteren, einen therapeutischen Nutzen für GBM-Patienten entstehen lassen könne, bleibt offen. Derzeit gibt es keine Studien, die den Einsatz

von Thrombozytenaggregationshemmern zur Verhinderung von thrombembolischen Ereignissen bei GBM-Patienten unterstützen [123]. In einer retrospektiven Studie von *Seliger et al.* fand sich kein Vorteil für die Einnahme von Aspirin bezogen auf das Langzeitüberleben von WHO Grad-IV-Gliom-Patienten, wobei sekundär auftretende Komplikationen wie thrombembolische Ereignisse nicht analysiert wurden. Gleichwohl diskutieren die Autoren einen möglichen Nutzen von Aspirin zur Verhinderung ischämischer Schlaganfälle [124].

Interaktionen zwischen Thrombozyten und soliden Tumoren zeigen sich in einer vermehrten Thrombozytenaggregation im Rahmen der TCIPA. Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgt dabei unter anderem durch das Zusammenspiel der Tumorzellen via P-Selektin oder GPIIb/IIIa [56, 57]. Diese beiden Rezeptoren zeigen sich auch in dieser Studie auf den Thrombozyten der GBM-Patienten erhöht. Zahlreiche thrombosierte Gefäße sind ein histopathologisches Kennzeichen des GBM, an deren Entstehung Thrombozyten maßgeblich beteiligt sind [10, 35]. Eine direkte Interaktion des GBM mit den Thrombozyten könnte für die Ergebnisse dieser Dissertation plausibel sein und würde eine mögliche Erklärung für die Untersuchungsergebnisse von *Nilsson et al.* liefern, welche EGFRvIII-RNA in zirkulierenden Thrombozyten von Gliom-Patienten nachweisen konnten [125].

Obwohl in dieser Studie stärker aktivierte Thrombozyten bei GBM-Patienten nachgewiesen wurden, konnte ein korrespondierender Anstieg der Thrombozyten-Leukozyten-Konjugatbildung – wie in der Literatur beschrieben – nicht beobachtet werden [71, 88, 94, 101, 112]. Es zeigte sich hingegen eine niedrigere TMK-Bildung bei GBM-Patienten. Diese Konstellation wurde bereits von *Alberti et al.* bei Patienten mit Vorhofflimmern beobachtet. Hier zeigte sich jedoch ein P-Selektin-Mangel auf Seiten der Thrombozyten für die reduzierte Konjugatbildung ursächlich [98]. Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen eine intakte bzw. eine deutliche Mehraktivierung der Thrombozyten von GBM-Patienten auf. Dieses „Versagen“ der Konjugat-Bildung könne somit im Rahmen eines leukozytären Defizits vermutet werden. Eine bereits dieser Dissertationsarbeit angeschlossene Studie unserer Arbeitsgruppe zeigt interessanterweise eine Reduktion der Expression von PSGL-1 auf zirkulierenden Monozyten in GBM Patienten [86]. Die reduzierte Konjugatbildung könnte ein weiterer Ausdruck systemischer Antiinflammation sein,

welche durch das GBM und sein assoziiertes Mikromilieu initiiert wird. Reduzierte S1P-Konzentrationen im PRP der GBM-Patienten könnten die Monozytenmigration und TAM-Bildung begünstigen. Das GBM interagiert mit den Zellen seines Mikromilieus und sorgt vor allem mit der Generierung von M2-TAM für einen antiinflammatorischen und tumorsupportiven Phänotyp [41]. Fingolimod, ein Medikament, das in diesen Stoffwechselweg eingreift und die SPK hemmt, konnte in mehreren Zellkultur- und Tiermodellbasierten Studien eine Wachstumshemmung bis zum Zelluntergang von GBM-Gewebe bewirken [126]. Ein mitunter vielversprechender Therapieansatz für das GBM, der weiterer Forschung bedarf, da derzeit ausschließlich eine Zulassung des Medikaments zur Behandlung der Multiplen Sklerose vorliegt [127, 128].

7 Zusammenfassung

Malignomkrankungen gehen mit einer erhöhten Inzidenz thrombembolischer Ereignisse einher, wobei GBM-Patienten am meisten gefährdet sind. Die genauen Ursachen des hohen prokoagulativen Potentials von GBM-Patienten sind wenig untersucht. Diese Dissertationsarbeit beschreibt zum ersten Mal die primäre Hämostase in einer homogenen Gruppe von GBM Patienten. Gemessen wurde die Thrombozytenaktivierung und -reaktivität von jeweils 21 GBM-Patienten und gesunden Kontrollprobanden. Dabei zeigten die Thrombozyten der GBM-Patienten eine stärkere Aktivierung, weil in den Messungen die Oberflächenexpression von CD63, sowie die Sekretion von P-Selektin ins Plasma erhöht waren. Durch eine gesteigerte Fibrinogenanbindung an den aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptor bzw. erhöhte Oberflächenexpression von CD63, zeigten die Thrombozyten der GBM-Patienten nach *ex vivo* Stimulation mit ADP und TRAP eine erhöhte Reaktivität.

Eine erhöhte Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Konjugaten konnte trotz gesteigerter Thrombozytenaktivität in der GBM-Patienten-Gruppe nicht beobachtet werden. Tendenziell war die Konjugatbildung in der Monozytenpopulation sogar vermindert. Dieser Zusammenhang lässt sich nicht in den Kontext der gängigen Literatur bringen, insbesondere da sich die Funktion der Leukozyten gleichwertig als unbeeinträchtigt zwischen GBM-Patienten und Kontrollprobanden zeigte. Um diesen Sachverhalt zu erklären, müssen weitere Untersuchungen, wie die Studie zur Untersuchung des PSGL-1 auf Leukozyten, durchgeführt werden. Darüber hinaus ist unklar, wie es zu den hier beschriebenen Veränderungen kommt. Interaktionen zwischen dem GBM und seinem Tumormikromilieu (TAM) wurden bereits untersucht, aber eine aktive Beeinflussung von Zellen außerhalb seines Mikromilieus ist für das GBM noch nicht beschrieben worden, jedoch wäre es ein denkbarer Erklärungsansatz. Die S1P-Spiegel im PRP von GBM-Patienten zeigten sich signifikant reduziert gegenüber denen der Kontrollprobanden, was einen systemischen Ausdruck des antiinflammatorischen Status des GBM darstellen könnte. Die globale Hämostase zeigte sich bei GBM-Patienten und Kontrollprobanden in der vorliegenden Dissertation uneingeschränkt, wobei dies nicht der zentrale Gegenstand der Arbeit war.

8 Summary

Patients suffering from malignancies have a high incidence of thrombembolic events, especially GBM patients. Still, the exact reasons causing this high procoagulative potential have not been investigated enough. This MD thesis describes for the first time the primary haemostasis in a homogenous group of GBM patients. The platelet activation and platelet reactivity of 21 GBM patients and 21 healthy patients as a control group have been measured. It was shown that the platelets of GBM patients had a higher state of activation because of the expression of surface receptor marker CD63 and P-selectin secretion in the patients' plasma. They also showed a greater reactivity to platelet agonist stimulation with ADP and TRAP where a higher fibrinogen binding to the activated GPIIb/IIIa and expression of CD63 was determined.

Regarding the platelet-leukocyte-conjugate formation, there was no greater formation observed in the group of GBM patients, even though platelet activation was increased. However, within the population of monocytes, the conjugate formation was in fact decreased by tendency. This coherence is not in line with common literature, especially because the leukocyte function was unaffected between the GBM patients and the control group. To clarify this circumstance, further investigations must be made, like studies investigating the PSGL-1 on leukocytes. Moreover, it is not clear why these changes occur. Interactions between the GBM and its tumour environment (TAM) are well known. However, an active manipulation of cells outside the microenvironment has not been described for GBM, but it might be a possible explanation. The S1P-levels in the PRP of GBM patients were significantly reduced in comparison to the controls, which might be a systemic expression of the antiinflammatory status of GBM.

The global haemostasis showed no impairment between GBM-patients and controls, whereby this has not been the main focus of this study.

9 Literaturverzeichnis

- [1] A.A. Khorana, Malignancy, thrombosis and Trousseau: the case for an eponym, *J Thromb Haemost*, 1 (2003) 2463-2465.
- [2] F.R. Rickles, R.L. Edwards, Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau's syndrome revisited, *Blood*, 62 (1983) 14-31.
- [3] A. Varki, Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms, *Blood*, 110 (2007) 1723-1729.
- [4] P. Metharom, M. Falasca, M.C. Berndt, The History of Armand Trousseau and Cancer-Associated Thrombosis, *Cancers*, 11 (2019).
- [5] H.T. Sørensen , L. Mellekjær , J.H. Olsen , J.A. Baron Prognosis of Cancers Associated with Venous Thromboembolism, *New England Journal of Medicine*, 343 (2000) 1846-1850.
- [6] H.A. Goubran, T. Burnouf, M. Radosevic, M. El-Ekiaby, The platelet-cancer loop, *Eur J Intern Med*, 24 (2013) 393-400.
- [7] J.A. Heit, M.D. Silverstein, D.N. Mohr, T.M. Petterson, W.M. O'Fallon, L.J. Melton, 3rd, Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study, *Archives of internal medicine*, 160 (2000) 809-815.
- [8] H.R. Buller, F.F. van Doormaal, G.L. van Sluis, P.W. Kamphuisen, Cancer and thrombosis: from molecular mechanisms to clinical presentations, *J Thromb Haemost*, 5 Suppl 1 (2007) 246-254.
- [9] N. Levitan, A. Dowlati, S.C. Remick, H.I. Tahsildar, L.D. Sivinski, R. Beyth, A.A. Rimm, Rates of initial and recurrent thromboembolic disease among patients with malignancy versus those without malignancy. Risk analysis using Medicare claims data, *Medicine*, 78 (1999) 285-291.
- [10] D.J. Brat, E.G. Van Meir, Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma, *Lab Invest*, 84 (2004) 397-405.
- [11] A.C. Tan, D.M. Ashley, G.Y. López, M. Malinzak, H.S. Friedman, M. Khasraw, Management of glioblastoma: State of the art and future directions, *CA: a cancer journal for clinicians*, 70 (2020) 299-312.

- [12] J.I. Zwicker, B.C. Furie, B. Furie, Cancer-associated thrombosis, *Crit Rev Oncol Hematol*, 62 (2007) 126-136.
- [13] C.E. Fadul, L.R. Zacharski, Coagulation biology in glioma pathogenesis: a missing link?, *J Thromb Haemost*, 3 (2005) 1915-1916.
- [14] P.Y. Wen, S. Kesari, Malignant gliomas in adults, *The New England journal of medicine*, 359 (2008) 492-507.
- [15] Q.T. Ostrom, H. Gittleman, P. Liao, T. Vecchione-Koval, Y. Wolinsky, C. Kruchko, J.S. Barnholtz-Sloan, CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014, *Neuro-Oncology*, 19 (2017) v1-v88.
- [16] R. Stupp , W.P. Mason , M.J. van den Bent , M. Weller , B. Fisher , M.J.B. Taphoorn , K. Belanger , A.A. Brandes , C. Marosi , U. Bogdahn , J. Curschmann , R.C. Janzer , S.K. Ludwin , T. Gorlia , A. Allgeier , D. Lacombe , J.G. Cairncross , E. Eisenhauer , R.O. Mirimanoff Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma, *New England Journal of Medicine*, 352 (2005) 987-996.
- [17] D.N. Louis, A. Perry, G. Reifenberger, A. von Deimling, D. Figarella-Branger, W.K. Cavenee, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, P. Kleihues, D.W. Ellison, The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary, *Acta neuropathologica*, 131 (2016) 803-820.
- [18] P. Bailey, H. Cushing, A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis : with a correlated study of prognosis, Lippincott, Philadelphia, PA, 1926.
- [19] J. Bianco, C. Bastiancich, A. Jankovski, A. des Rieux, V. Preat, F. Danhier, On glioblastoma and the search for a cure: where do we stand?, *Cell Mol Life Sci*, 74 (2017) 2451-2466.
- [20] S. Feiden, W. Feiden, [WHO classification of tumours of the CNS: revised edition of 2007 with critical comments on the typing und grading of common-type diffuse gliomas], *Der Pathologe*, 29 (2008) 411-421.
- [21] T. Komori, The 2016 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: The Major Points of Revision, *Neurologia medico-chirurgica*, 57 (2017) 301-311.

- [22] H. Yan, D.W. Parsons, G. Jin, R. McLendon, B.A. Rasheed, W. Yuan, I. Kos, I. Batinic-Haberle, S. Jones, G.J. Riggins, H. Friedman, A. Friedman, D. Reardon, J. Herndon, K.W. Kinzler, V.E. Velculescu, B. Vogelstein, D.D. Bigner, IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas, *The New England journal of medicine*, 360 (2009) 765-773.
- [23] F.E. Bleeker, N.A. Atai, S. Lamba, A. Jonker, D. Rijkeboer, K.S. Bosch, W. Tigchelaar, D. Troost, W.P. Vandertop, A. Bardelli, C.J. Van Noorden, The prognostic IDH1(R132) mutation is associated with reduced NADP+-dependent IDH activity in glioblastoma, *Acta neuropathologica*, 119 (2010) 487-494.
- [24] M.E. Hegi, A.C. Diserens, T. Gorlia, M.F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J.M. Kros, J.A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J.E. Bromberg, P. Hau, R.O. Mirimanoff, J.G. Cairncross, R.C. Janzer, R. Stupp, MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma, *The New England journal of medicine*, 352 (2005) 997-1003.
- [25] M. Lacroix, D. Abi-Said, D.R. Fournay, Z.L. Gokaslan, W. Shi, F. DeMonte, F.F. Lang, I.E. McCutcheon, S.J. Hassenbusch, E. Holland, K. Hess, C. Michael, D. Miller, R. Sawaya, A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival, *Journal of neurosurgery*, 95 (2001) 190-198.
- [26] T.J. Brown, M.C. Brennan, M. Li, E.W. Church, N.J. Brandmeir, K.L. Rakszawski, A.S. Patel, E.B. Rizk, D. Suki, R. Sawaya, M. Glantz, Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis, *JAMA Oncology*, 2 (2016) 1460-1469.
- [27] N. Ahmadloo, A.-A. Kani, M. Mohammadianpanah, H. Nasrolahi, S. Omidvari, A. Mosalaei, M. Ansari, Treatment outcome and prognostic factors of adult glioblastoma multiforme, *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 25 (2013) 21-30.
- [28] E.R. Laws, I.F. Parney, W. Huang, F. Anderson, A.M. Morris, A. Asher, K.O. Lillehei, M. Bernstein, H. Brem, A. Sloan, M.S. Berger, S. Chang, Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project, *Journal of neurosurgery*, 99 (2003) 467-473.
- [29] E. Domingo-Musibay, E. Galanis, What next for newly diagnosed glioblastoma?, *Future Oncology*, 11 (2015) 3273-3283.

- [30] A.A. Rehman, K.B. Elmore, T.A. Mattei, The effects of alternating electric fields in glioblastoma: current evidence on therapeutic mechanisms and clinical outcomes, *Neurosurg Focus*, 38 (2015) E14.
- [31] R. Stupp, S. Taillibert, A. Kanner, W. Read, D. Steinberg, B. Lhermitte, S. Toms, A. Idbaih, M.S. Ahluwalia, K. Fink, F. Di Meo, F. Lieberman, J.J. Zhu, G. Stragliotto, D. Tran, S. Brem, A. Hottinger, E.D. Kirson, G. Lavy-Shahaf, U. Weinberg, C.Y. Kim, S.H. Paek, G. Nicholas, J. Bruna, H. Hirte, M. Weller, Y. Palti, M.E. Hegi, Z. Ram, Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial, *Jama*, 318 (2017) 2306-2316.
- [32] Q. Institute for, C. Efficiency in Health, Institute for Quality and Efficiency in Health Care: Extracts, Tumour-treating fields in addition to current standard therapy for glioblastoma as first-line treatment IQWiG Reports - Commission No. N18-02, Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG)
(c) IQWiG (Institute for Quality and Efficiency in Health Care). Cologne (Germany), 2019.
- [33] T.J. Semrad, R. O'Donnell, T. Wun, H. Chew, D. Harvey, H. Zhou, R.H. White, Epidemiology of venous thromboembolism in 9489 patients with malignant glioma, *Journal of neurosurgery*, 106 (2007) 601-608.
- [34] T.R. Smith, R.R. Lall, R.B. Graham, J. McClendon, Jr., R.R. Lall, A.D. Nanney, J.G. Adel, A. Zakarija, J.P. Chandler, Venous thromboembolism in high grade glioma among surgical patients: results from a single center over a 10 year period, *J Neurooncol*, 120 (2014) 347-352.
- [35] M. Tehrani, T.M. Friedman, J.J. Olson, D.J. Brat, Intravascular Thrombosis in Central Nervous System Malignancies: A Potential Role in Astrocytoma Progression to Glioblastoma, *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 18 (2008) 164-171.
- [36] J.L. Fisher, S. Palmisano, J.A. Schwartzbaum, T. Svensson, S. Lonn, Comorbid conditions associated with glioblastoma, *J Neurooncol*, 116 (2014) 585-591.
- [37] N.C. Edwin, M.N. Khoury, D. Sohal, K.R. McCrae, M.S. Ahluwalia, A.A. Khorana, Recurrent venous thromboembolism in glioblastoma, *Thromb Res*, 137 (2016) 184-188.

- [38] M.B. Streiff, X. Ye, T.S. Kickler, S. Desideri, J. Jani, J. Fisher, S.A. Grossman, A prospective multicenter study of venous thromboembolism in patients with newly-diagnosed high-grade glioma: hazard rate and risk factors, *Journal of Neuro-Oncology*, 124 (2015) 299-305.
- [39] M.A. Brockmann, A. Giese, K. Mueller, F.J. Kaba, F. Lohr, C. Weiss, S. Gottschalk, I. Nolte, J. Leppert, J. Tuettenberg, C. Groden, Preoperative thrombocytosis predicts poor survival in patients with glioblastoma, *Neuro Oncol*, 9 (2007) 335-342.
- [40] N.A. Charles, E.C. Holland, R. Gilbertson, R. Glass, H. Kettenmann, The brain tumor microenvironment, *Glia*, 59 (2011) 1169-1180.
- [41] L. Riboni, L. Abdel Hadi, S.E. Navone, L. Guarnaccia, R. Campanella, G. Marfia, Sphingosine-1-Phosphate in the Tumor Microenvironment: A Signaling Hub Regulating Cancer Hallmarks, *Cells*, 9 (2020).
- [42] M.D. Sørensen, R.H. Dahlrot, H.B. Boldt, S. Hansen, B.W. Kristensen, Tumour-associated microglia/macrophages predict poor prognosis in high-grade gliomas and correlate with an aggressive tumour subtype, *Neuropathology and applied neurobiology*, 44 (2018) 185-206.
- [43] S. Bien-Moller, S. Lange, T. Holm, A. Bohm, H. Paland, J. Kupper, S. Herzog, K. Weitmann, C. Havemann, S. Vogelgesang, S. Marx, W. Hoffmann, H.W. Schroeder, B.H. Rauch, Expression of S1P metabolizing enzymes and receptors correlate with survival time and regulate cell migration in glioblastoma multiforme, *Oncotarget*, 7 (2016) 13031-13046.
- [44] T. Ulrych, A. Bohm, A. Polzin, G. Daum, R.M. Nusing, G. Geisslinger, T. Hohlfeld, K. Schror, B.H. Rauch, Release of sphingosine-1-phosphate from human platelets is dependent on thromboxane formation, *J Thromb Haemost*, 9 (2011) 790-798.
- [45] B.H. Rauch, Sphingosine 1-Phosphate as a Link between Blood Coagulation and Inflammation, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 34 (2014) 185-196.
- [46] A. Olivera, M.L. Allende, R.L. Proia, Shaping the landscape: metabolic regulation of S1P gradients, *Biochim Biophys Acta*, 1831 (2013) 193-202.
- [47] H.J. Abuhusain, A. Matin, Q. Qiao, H. Shen, N. Kain, B.W. Day, B.W. Stringer, B. Daniels, M.A. Laaksonen, C. Teo, K.L. McDonald, A.S. Don, A metabolic shift favoring sphingosine 1-phosphate at the expense of ceramide controls glioblastoma angiogenesis, *J Biol Chem*, 288 (2013) 37355-37364.

- [48] J. Müller, W. von Bernstorff, C.D. Heidecke, T. Schulze, Differential S1P Receptor Profiles on M1- and M2-Polarized Macrophages Affect Macrophage Cytokine Production and Migration, *BioMed Research International*, 2017 (2017) 7584621.
- [49] A. Weigert, N. Tzieply, A. von Knethen, A.M. Johann, H. Schmidt, G. Geisslinger, B. Brune, Tumor cell apoptosis polarizes macrophages role of sphingosine-1-phosphate, *Molecular biology of the cell*, 18 (2007) 3810-3819.
- [50] J.E. Hughes, S. Srinivasan, K.R. Lynch, R.L. Proia, P. Ferdek, C.C. Hedrick, Sphingosine-1-phosphate induces an antiinflammatory phenotype in macrophages, *Circ Res*, 102 (2008) 950-958.
- [51] D. Ribatti, E. Crivellato, Giulio Bizzozero and the discovery of platelets, *Leuk Res*, 2007, pp. 1339-1341.
- [52] K. Ghoshal, M. Bhattacharyya, Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis, *ScientificWorldJournal*, 2014 (2014) 781857.
- [53] J.G. White, Chapter 7 - Platelet Structure A2 - Michelson, Alan D, *Platelets (Third Edition)*, Academic Press2013, pp. 117-144.
- [54] R. Flaumenhaft, Chapter 18 - Platelet Secretion A2 - Michelson, Alan D, *Platelets (Third Edition)*, Academic Press2013, pp. 343-366.
- [55] H.M. Nording, P. Seizer, H.F. Langer, Platelets in inflammation and atherogenesis, *Front Immunol*, 6 (2015) 98.
- [56] D. Buergy, F. Wenz, C. Groden, M.A. Brockmann, Tumor-platelet interaction in solid tumors, *Int J Cancer*, 130 (2012) 2747-2760.
- [57] L. Erpenbeck, M.P. Schon, Deadly allies: the fatal interplay between platelets and metastasizing cancer cells, *Blood*, 115 (2010) 3427-3436.
- [58] V. Evangelista, S.S. Smyth, Chapter 16 - Interactions Between Platelets, Leukocytes and the Endothelium A2 - Michelson, Alan D, *Platelets (Third Edition)*, Academic Press2013, pp. 295-312.
- [59] B. Nieswandt, M. Hafner, B. Echtenacher, D.N. Mannel, Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets, *Cancer Res*, 59 (1999) 1295-1300.
- [60] Z.M. Ruggeri, S.P. Jackson, Chapter 20 - Platelet Thrombus Formation in Flowing Blood A2 - Michelson, Alan D, *Platelets (Third Edition)*, Academic Press2013, pp. 399-423.

- [61] M.A. Berny-Lang, A.L. Frelinger III, M.R. Barnard, A.D. Michelson, Chapter 29 - Flow Cytometry, Platelets (Third Edition), Academic Press 2013, pp. 581-602.
- [62] K.J. Clemetson, J.M. Clemetson, Chapter 9 - Platelet Receptors A2 - Michelson, Alan D, Platelets (Third Edition), Academic Press 2013, pp. 169-194.
- [63] R.K. Andrews, M.C. Berndt, Chapter 10 - The GPIIb-IIIa Complex A2 - Michelson, Alan D, Platelets (Third Edition), Academic Press 2013, pp. 195-213.
- [64] K. Bledzka, M.M. Pesho, Y.-Q. Ma, E.F. Plow, Chapter 12 - Integrin α IIb β 3 A2 - Michelson, Alan D, Platelets (Third Edition), Academic Press 2013, pp. 233-248.
- [65] A. Vieira de Abreu, M.T. Rondina, A.S. Weyrich, G.A. Zimmerman, Chapter 36 - Inflammation A2 - Michelson, Alan D, Platelets (Third Edition), Academic Press 2013, pp. 733-766.
- [66] V. Henn, S. Steinbach, K. Büchner, P. Presek, R.A. Kroczyk, The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40, *Blood*, 98 (2001) 1047-1054.
- [67] P. Zhang, L. Covic, A. Kuliopulos, Chapter 13 - Protease-Activated Receptors A2 - Michelson, Alan D, Platelets (Third Edition), Academic Press 2013, pp. 249-259.
- [68] M. Cattaneo, Chapter 14 - The Platelet P2 Receptors A2 - Michelson, Alan D, Platelets (Third Edition), Academic Press 2013, pp. 261-281.
- [69] A. Vieira-de-Abreu, R.A. Campbell, A.S. Weyrich, G.A. Zimmerman, Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum, *Seminars in Immunopathology*, 34 (2012) 5-30.
- [70] A. Zarbock, R.K. Polanowska-Grabowska, K. Ley, Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation, *Blood Rev*, 21 (2007) 99-111.
- [71] J.M. van Gils, J.J. Zwaginga, P.L. Hordijk, Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases, *J Leukoc Biol*, 85 (2009) 195-204.
- [72] W. Lösche, S. Heptinstall, Value of Platelet Activation Markers as Prothrombotic Risk Indicators, *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 34 (2007) 34-42.
- [73] I. Nolte, H. Przibylla, T. Bostel, C. Groden, M.A. Brockmann, Tumor-platelet interactions: glioblastoma growth is accompanied by increasing platelet counts, *Clinical neurology and neurosurgery*, 110 (2008) 339-342.

- [74] M.A. Brockmann, B. Bender, E. Plaxina, I. Nolte, R. Erber, K. Lamszus, C. Groden, L. Schilling, Differential effects of tumor-platelet interaction in vitro and in vivo in glioblastoma, *J Neurooncol*, 105 (2011) 45-56.
- [75] C. Di Vito, S.E. Navone, G. Marfia, L. Abdel Hadi, M.E. Mancuso, A. Pecci, F.M. Crisa, V. Berno, P. Rampini, R. Campanella, L. Riboni, Platelets from glioblastoma patients promote angiogenesis of tumor endothelial cells and exhibit increased VEGF content and release, *Platelets*, 28 (2017) 585-594.
- [76] G. Schmitz, G. Rothe, A. Ruf, S. Barlage, D. Tschöpe, K.J. Clemetson, A.H. Goodall, A.D. Michelson, A.T. Nurden, T.V. Shankey, European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function, *Thromb Haemost*, 79 (1998) 885-896.
- [77] M. Brown, C. Wittwer, *Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology*, *Clinical Chemistry*, 46 (2000) 1221-1229.
- [78] A.D. Michelson, Flow cytometry: a clinical test of platelet function, *Blood*, 87 (1996) 4925-4936.
- [79] P.K. Chattopadhyay, M. Roederer, Cytometry: today's technology and tomorrow's horizons, *Methods (San Diego, Calif.)*, 57 (2012) 251-258.
- [80] R. Campanella, L. Guarnaccia, C. Cordiglieri, E. Trombetta, M. Caroli, G. Carrabba, N. La Verde, P. Rampini, C. Gaudino, A. Costa, S. Luzzi, G. Mantovani, M. Locatelli, L. Riboni, S.E. Navone, G. Marfia, Tumor-Educated Platelets and Angiogenesis in Glioblastoma: Another Brick in the Wall for Novel Prognostic and Targetable Biomarkers, *Changing the Vision from a Localized Tumor to a Systemic Pathology*, *Cells*, 9 (2020).
- [81] R.M. Lequin, Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Clin Chem*, 51 (2005) 2415-2418.
- [82] B.K. Van Weemen, A.H. Schuurs, Immunoassay using antigen-enzyme conjugates, *FEBS letters*, 15 (1971) 232-236.
- [83] T. Shimizu, T. Nakazawa, A. Cho, F. Dastvan, D. Shilling, G. Daum, M.A. Reidy, Sphingosine 1-phosphate receptor 2 negatively regulates neointimal formation in mouse arteries, *Circ Res*, 101 (2007) 995-1000.
- [84] E. Moritz, D. Wegner, S. Gross, M. Bahls, M. Dorr, S.B. Felix, T. Ittermann, S. Oswald, M. Nauck, N. Friedrich, R.H. Boger, G. Daum, E. Schwedhelm, B.H. Rauch,

Reference intervals for serum sphingosine-1-phosphate in the population-based Study of Health in Pomerania, *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 468 (2017) 25-31.

[85] A. Tripodi, Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory, *Clin Chem*, 62 (2016) 699-707.

[86] S. Marx, M. Splittstohser, F. Kinnen, E. Moritz, C. Joseph, S. Paul, H. Paland, C. Seifert, M. Marx, A. Bohm, E. Schwedhelm, K. Holzer, S. Singer, C.A. Ritter, S. Bien-Moller, H.W.S. Schroeder, B.H. Rauch, Platelet activation parameters and platelet-leucocyte-conjugate formation in glioblastoma multiforme patients, *Oncotarget*, 9 (2018) 25860-25876.

[87] S. Panzer, L. Hocker, D. Koren, Agonists-induced platelet activation varies considerably in healthy male individuals: studies by flow cytometry, *Annals of hematology*, 85 (2006) 121-125.

[88] T. Villmow, B. Kemkes-Matthes, A.C. Matzdorff, Markers of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in patients with myeloproliferative syndromes, *Thrombosis research*, 108 (2002) 139-145.

[89] C. Mitsui, K. Kajiwara, H. Hayashi, J. Ito, H. Mita, E. Ono, N. Higashi, Y. Fukutomi, K. Sekiya, T. Tsuburai, K. Akiyama, K. Yamamoto, M. Taniguchi, Platelet activation markers overexpressed specifically in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 137 (2016) 400-411.

[90] N.M. Cooke, K. Egan, S. McFadden, L. Grogan, O.S. Breathnach, J. O'Leary, B.T. Hennessy, D. Kenny, Increased platelet reactivity in patients with late-stage metastatic cancer, *Cancer Med*, 2 (2013) 564-570.

[91] L. Plantureux, D. Mège, L. Crescence, F. Dignat-George, C. Dubois, L. Panicot-Dubois, Impacts of Cancer on Platelet Production, Activation and Education and Mechanisms of Cancer-Associated Thrombosis, *Cancers*, 10 (2018).

[92] R. Paniccia, R. Priora, A.A. Liotta, R. Abbate, Platelet function tests: a comparative review, *Vascular health and risk management*, 11 (2015) 133-148.

[93] M. Sossdorf, S. Marx, B. Schaarschmidt, G.P. Otto, R.A. Claus, K. Reinhart, C.S. Hartog, W. Losche, HES 130/0.4 impairs haemostasis and stimulates pro-inflammatory blood platelet function, *Crit Care*, 13 (2009) R208.

- [94] J. Riedl, A. Kaider, C. Marosi, G.W. Prager, B. Eichelberger, A. Assinger, I. Pabinger, S. Panzer, C. Ay, Decreased platelet reactivity in patients with cancer is associated with high risk of venous thromboembolism and poor prognosis, *Thrombosis and haemostasis*, 117 (2017) 90-98.
- [95] P.M. van der Zee, E. Biro, Y. Ko, R.J. de Winter, C.E. Hack, A. Sturk, R. Nieuwland, P-selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction, *Clin Chem*, 52 (2006) 657-664.
- [96] M. Grunewald, A. Siegemund, A. Grunewald, A. Konegen, M. Kokschi, M. Griesshammer, Absence of compensatory platelet activation in patients with severe haemophilia, but evidence for a platelet collagen-activation defect, *Platelets*, 13 (2002) 451-458.
- [97] P.J. Vinholt, H. Frederiksen, A.M. Hvas, U. Sprogøe, C. Nielsen, Measurement of platelet aggregation, independently of patient platelet count: a flow-cytometric approach, *J Thromb Haemost*, 15 (2017) 1191-1202.
- [98] S. Alberti, G. Angeloni, C. Tamburrelli, A. Pampuch, B. Izzi, L. Messano, Q. Parisi, M. Santamaria, M.B. Donati, G. de Gaetano, C. Cerletti, Platelet-leukocyte mixed conjugates in patients with atrial fibrillation, *Platelets*, 20 (2009) 235-241.
- [99] R. Simanek, R. Vormittag, M. Hassler, K. Roessler, M. Schwarz, C. Zielinski, I. Pabinger, C. Marosi, Venous thromboembolism and survival in patients with high-grade glioma, *Neuro Oncol*, 9 (2007) 89-95.
- [100] D. Dubinski, S.Y. Won, F. Gessler, J. Quick-Weller, B. Behmanesh, S. Bernatz, M.T. Forster, K. Franz, K.H. Plate, V. Seifert, P.N. Harter, C. Senft, Dexamethasone-induced leukocytosis is associated with poor survival in newly diagnosed glioblastoma, *J Neurooncol*, 137 (2018) 503-510.
- [101] J.A. Chirinos, G.A. Heresi, H. Velasquez, W. Jy, J.J. Jimenez, E. Ahn, L.L. Horstman, A.O. Soriano, J.P. Zambrano, Y.S. Ahn, Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism, *J Am Coll Cardiol*, 45 (2005) 1467-1471.
- [102] J.-K. Cha, W.-S. Jo, H.C. Shin, H.-R. Bae, J.-M. Ho, J.W. Kim, Increased platelet CD63 and P-selectin expression persist in atherosclerotic ischemic stroke, *Platelets*, 15 (2004) 3-7.

- [103] K.T. Tan, M.H. Tayebjee, C. Lynd, A.D. Blann, G.Y. Lip, Platelet microparticles and soluble P selectin in peripheral artery disease: relationship to extent of disease and platelet activation markers, *Annals of medicine*, 37 (2005) 61-66.
- [104] D. Tschoepe, P. Roesen, J. Esser, B. Schwippert, H.K. Nieuwenhuis, B. Kehrel, F.A. Gries, Large platelets circulate in an activated state in diabetes mellitus, *Semin Thromb Hemost*, 17 (1991) 433-438.
- [105] V. Henn, J.R. Slupsky, M. Grafe, I. Anagnostopoulos, R. Forster, G. Muller-Berghaus, R.A. Kroczeck, CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells, *Nature*, 391 (1998) 591-594.
- [106] M. Haemmerle, J. Bottsford-Miller, S. Pradeep, M.L. Taylor, H.J. Choi, J.M. Hansen, H.J. Dalton, R.L. Stone, M.S. Cho, A.M. Nick, A.S. Nagaraja, T. Gutschner, K.M. Gharpure, L.S. Mangala, R. Rupaimoole, H.D. Han, B. Zand, G.N. Armaiz-Pena, S.Y. Wu, C.V. Pecot, A.R. Burns, G. Lopez-Berestein, V. Afshar-Kharghan, A.K. Sood, FAK regulates platelet extravasation and tumor growth after antiangiogenic therapy withdrawal, *J Clin Invest*, 126 (2016) 1885-1896.
- [107] G. Grignani, L. Pacchiarini, M.M. Ricetti, P. Dionigi, V. Jemos, M. Zucchella, P. Fratino, Mechanisms of platelet activation by cultured human cancer cells and cells freshly isolated from tumor tissues, *Invasion & metastasis*, 9 (1989) 298-309.
- [108] O. Elaskalani, M.C. Berndt, M. Falasca, P. Metharom, Targeting Platelets for the Treatment of Cancer, *Cancers*, 9 (2017).
- [109] J. Riedl, M. Preusser, P.M. Nazari, F. Posch, S. Panzer, C. Marosi, P. Birner, J. Thaler, C. Brostjan, D. Lötsch, W. Berger, J.A. Hainfellner, I. Pabinger, C. Ay, Podoplanin expression in primary brain tumors induces platelet aggregation and increases risk of venous thromboembolism, *Blood*, 129 (2017) 1831-1839.
- [110] M. Zarà, I. Canobbio, C. Visconte, J. Canino, M. Torti, G.F. Guidetti, Molecular mechanisms of platelet activation and aggregation induced by breast cancer cells, *Cellular signalling*, 48 (2018) 45-53.
- [111] B. Boneu, R. Bugat, A. Boneu, N. Eche, P. Sie, P.F. Combes, Exhausted platelets in patients with malignant solid tumors without evidence of active consumption coagulopathy, *Eur J Cancer Clin Oncol*, 20 (1984) 899-903.

- [112] H.M. Sanderson, S.C. Fox, R.A. Robbins, W. Losche, P. Spangenberg, S. Heptinstall, Role of GPIIb-IIIa in platelet-monocyte and platelet-neutrophil conjugate formation in whole blood, *Platelets*, 9 (1998) 245-250.
- [113] A. Mazzone, G. Ricevuti, Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance, *Haematologica*, 80 (1995) 161-175.
- [114] N. Li, G. Hallden, P. Hjerdahl, A whole-blood flow cytometric assay for leukocyte CD11b expression using fluorescence signal triggering, *Eur J Haematol*, 65 (2000) 57-65.
- [115] A. Alvarez-Larran, E. Arellano-Rodrigo, J.C. Reverter, A. Domingo, N. Villamor, D. Colomer, F. Cervantes, Increased platelet, leukocyte, and coagulation activation in primary myelofibrosis, *Annals of hematology*, 87 (2008) 269-276.
- [116] A.J. van Oostrom, J.P. van Wijk, T.P. Sijmonsma, T.J. Rabelink, M. Castro Cabezas, Increased expression of activation markers on monocytes and neutrophils in type 2 diabetes, *The Netherlands journal of medicine*, 62 (2004) 320-325.
- [117] A.J. van Oostrom, T.J. Rabelink, C. Verseyden, T.P. Sijmonsma, H.W. Plokker, P.P. De Jaegere, M.C. Cabezas, Activation of leukocytes by postprandial lipemia in healthy volunteers, *Atherosclerosis*, 177 (2004) 175-182.
- [118] S.R. Schwab, J.P. Pereira, M. Matloubian, Y. Xu, Y. Huang, J.G. Cyster, Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients, *Science*, 309 (2005) 1735-1739.
- [119] R.C.F. Duarte, C.N. Ferreira, D.R.A. Rios, H.J.D. Reis, M.D.G. Carvalho, Thrombin generation assays for global evaluation of the hemostatic system: perspectives and limitations, *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 39 (2017) 259-265.
- [120] C. Ay, D. Dunkler, R. Simanek, J. Thaler, S. Koder, C. Marosi, C. Zielinski, I. Pabinger, Prediction of venous thromboembolism in patients with cancer by measuring thrombin generation: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study, *J Clin Oncol*, 29 (2011) 2099-2103.
- [121] J. Thaler, C. Ay, A. Kaider, E.-M. Reitter, J. Haselböck, C. Mannhalter, C. Zielinski, C. Marosi, I. Pabinger, Biomarkers predictive of venous thromboembolism in patients with newly diagnosed high-grade gliomas, *Neuro-Oncology*, 16 (2014) 1645-1651.

- [122] S.S. Kabbani, M.W. Watkins, T. Ashikaga, E.F. Terrien, P.A. Holoch, B.E. Sobel, D.J. Schneider, Platelet reactivity characterized prospectively: a determinant of outcome 90 days after percutaneous coronary intervention, *Circulation*, 104 (2001) 181-186.
- [123] S. Taillibert, L. Taillandier, E. Le Rhun, Venous thrombosis in patients with high-grade glioma, *Current opinion in oncology*, 27 (2015) 516-521.
- [124] C. Seliger, J. Schaertl, M. Gerken, C. Lubber, M. Proescholdt, M.J. Riemenschneider, M.F. Leitzmann, P. Hau, M. Klinkhammer-Schalke, Use of statins or NSAIDs and survival of patients with high-grade glioma, *PloS one*, 13 (2018) e0207858-e0207858.
- [125] R.J. Nilsson, L. Balaj, E. Hulleman, S. van Rijn, D.M. Pegtel, M. Walraven, A. Widmark, W.R. Gerritsen, H.M. Verheul, W.P. Vandertop, D.P. Noske, J. Skog, T. Wurdinger, Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers, *Blood*, 118 (2011) 3680-3683.
- [126] L.A. SORDILLO, P.P. SORDILLO, L. HELSON, Sphingosine Kinase Inhibitors as Maintenance Therapy of Glioblastoma After Ceramide-Induced Response, *Anticancer Research*, 36 (2016) 2085-2095.
- [127] V. Brinkmann, A. Billich, T. Baumruker, P. Heining, R. Schmouder, G. Francis, S. Aradhya, P. Burtin, Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis, *Nature reviews. Drug discovery*, 9 (2010) 883-897.
- [128] S. Faissner, R. Gold, Oral Therapies for Multiple Sclerosis, *Cold Spring Harb Perspect Med*, 9 (2019) a032011.

10 Anhang

10.1 Pufferherstellung

10.1.1 Tyrode-Puffer

Für die Herstellung eines Liters Tyrode Puffer wurden folgende Substanzen verwendet:

- NaCl (134 mM) (7,83 g)
- NaHCO₃ (12 mM) (1,01 g)
- KCL (2,9 mM) (0,22 g)
- NaH₂PO₄ (0,36 mM) (0,05 g)
- MgCl₂ (1 mM) (0,10 g)
- HEPES (5 mM) (1,19 g)
- Glucose (5 mM) (0,90 g)
- BSA (1 mg/ml) (1,00 g)
- Aqua dest. (1,00 l)
- KOH
- HCl

Alle Substanzen bis auf KOH und HCL wurden unter einer Feinwaage abgewogen und anschließend in 1 L Aqua dest. unter stetigem rühren aufgelöst. Anschließend wurde mit KOH bzw. HCl der Puffer auf den pH von 7,4 vorsichtig titriert.

10.1.2 PBS

Für die Herstellung von einem Liter 10-fach konzentriertem PBS wurden folgende Substanzen verwendet:

- NaCl (80 g)
- KCL (2 g)
- NaH₂PO₄ (11,35 g)
- KH₂PO₄ (2,4 g)
- Aqua dest. (1 l)
- KOH

- HCl

Alle Substanzen bis auf KOH und HCL wurden unter einer Feinwaage abgewogen und anschließend in 1 L Aqua dest. unter stetigem rühren aufgelöst. Anschließend wurde mit KOH bzw. HCl der Puffer auf den pH von 7,4 vorsichtig titriert.

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

12 Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mir beim Entstehen dieser Arbeit geholfen und somit maßgeblich zum Erfolg beigetragen haben.

Allen voran möchte ich PD Dr. med. habil. Sascha Marx für die gesamte Betreuung und produktive Zusammenarbeit danken. Ohne dich wäre diese Arbeit gar nicht erst zu Stande gekommen. Deine fortwährende motivierende und disziplinierende Art waren der Schlüssel zum Erfolg! Vielen Dank!

Weiterhin danke ich meinem Doktorvater Prof. H. W. S. Schroeder für die Unterstützung, insbesondere der Ermöglichung meine Ergebnisse in wissenschaftlichen Vorträgen zu präsentieren.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. B. H. Rauch für die kritische Interpretation meiner Daten mit fortwährender Inspiration, weitere Zusammenhänge zu ergründen.

Prof. E. Schwedhelm und seinem Team danke ich für die freundliche Zusammenarbeit bei der Analyse meiner Proben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Labor-Team in Greifswald bedanken. Vielen Dank Sarah Polster, Caro Seifert, Dr. Andreas Böhm, Dr. Heiko Paland, Dr. Paul Hagen, Frederik Kinnen, Dr. Sandra Bien-Möller, Dr. Christy Joseph, Dr. Susanne Brück und Dr. Eileen Moritz! Ihr alle habt mir geholfen, bei Fragen und Problemen stets voranzukommen und ohne euer Zutun wäre diese Arbeit nie so gelungen, wie sie es jetzt ist.

Ich danke ganz besonders meiner Familie, vor allem meinen Eltern Grit und Jens, die mich zu jeder Zeit unterstützt und mir somit den Kopf für die Forschungsarbeit freigeräumt haben. Meinen Trainingsfreunden Jürgen, Stefan und meiner lieben Oma Käthe gilt ein besonderer Dank für euren ganz persönlichen Beitrag zu dieser Arbeit. Des Weiteren danke ich allen bis jetzt nicht aufgezählten Freunden und meinen Mitbewohnern, die mir allzeit unterstützend zur Seite standen und mich bis hierhin begleitet haben.

Abschließend gilt mein Dank ganz besonders meiner Freundin Gesine, die tapfer meine Verzweiflungsanfälle, Arbeitsehrgeiz und meine Frustration abgefangen hat und mir zu jeder Zeit eine große Stütze war.