

Thrombingenerierung bei Patienten mit Lungenkarzinom

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von: Philipp Sinn

geb. am 03.11.1985 in Kaltenkirchen

angefertigt in der

Abteilung Pneumologie; Department für Innere Medizin, Neurologie und Dermatologie am

Universitätsklinikum Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. Hans-Jürgen Seyfarth

Ko-Betreuer: Prof. Dr. Sirak Petros

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 17.09.2019

Bibliographische Beschreibung

Sinn, Philipp

Thrombingerierung bei Patienten mit Lungenkarzinom

Universität Leipzig, Dissertation

86 S., 49 Lit., 24 Abb., 23 Tab.

Referat:

Thrombembolische Komplikationen sind bei onkologischen Patienten allgemein und bei Patienten mit Lungenkarzinom im Besonderen eine häufige Komplikation. Das Phänomen einer tumorassoziierten Thrombose ist in der Medizin schon lange als Trousseau-Syndrom bekannt. Die Interaktion zwischen Tumorerkrankung und Hämostase ist Gegenstand intensiver medizinischer Forschung. Die Expression von *tissue factor* und die Freisetzung von prokoagulatorischen Mikropartikeln durch den Tumor scheinen hier von herausragender Bedeutung zu sein. *Tissue factor* ist im zellbasierten Gerinnungsmodell der Ausgangspunkt der Koagulation und die Generierung von Thrombin ihr geschwindigkeitsbestimmender Schritt.

Die Analyse der Thrombingerierung im Plasma ist daher ein vielversprechender Ansatz, um mehr über die funktionellen Veränderungen des hämostaseologischen Gleichgewichts bei Tumorkranken zu erfahren.

In einer prospektiven Studie wurden Plasmaproben von 100 Patienten mit neu diagnostiziertem Lungenkarzinom akquiriert und ein Thrombingerierungsassay durchgeführt. Es erfolgte ein Vergleich mit den Werten gesunder Probanden. Dieser zeigte, dass die Thrombingerierung bei Patienten mit Lungenkarzinom hauptsächlich schneller abläuft als bei Gesunden.

Darüber hinaus wurde eine Verlaufsbeobachtung über 12 Monate durchgeführt. Eine Assoziation zwischen den Parametern der Thrombingerierungskurve und dem Auftreten thrombembolischer Komplikationen im Krankheitsverlauf wurde mittels ROC-Analyse geprüft, ohne dass diese nachgewiesen werden konnte.

Detailliertes Wissen über das Wechselspiel von Tumorerkrankung und Hämostase ist notwendig, um in Zukunft jene Patienten mit hohem thrombembolischem Risiko früher identifizieren zu können und gegebenenfalls sogar einen weiteren Ansatzpunkt zu haben, für die Eindämmung der Tumorerkrankung.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Einleitung | 5 |
| 1.1 | Hyperkoagulabilität bei Tumorerkrankungen | 5 |
| 1.1.1 | Pathophysiologie der Hämostase..... | 7 |
| 1.1.2 | Thrombozytenadhäsion- und aggregation..... | 7 |
| 1.1.3 | Klassische Gerinnungskaskade und Zellbasiertes Gerinnungsmodell | 8 |
| | A) Initiation..... | 11 |
| | B) Amplifikation..... | 12 |
| | C) Propagation..... | 12 |
| 1.1.4 | Klassische Globalparameter zur Erfassung des Gerinnungsstatus | 13 |
| 1.1.5 | Neuere Globaltests..... | 14 |
| | 1.1.5.1 Thromboelastometrie | 14 |
| | 1.1.5.2 Clot waveform analysis (CWA)..... | 14 |
| | 1.1.5.3 Thrombingenerierungsassays | 15 |
| 1.2 | Lungenkarzinom | 17 |
| 1.2.1 | Epidemiologie und Risikofaktoren des Lungenkarzinoms | 17 |
| 1.2.2 | Diagnostik..... | 19 |
| 1.2.3 | Histomorphologie und molekulare Diagnostik des Lungenkarzinoms | 20 |
| 1.2.4 | TNM-Klassifikation des Lungenkarzinoms und Prognose | 21 |
| 1.2.5 | Zytostatische und chirurgische Therapie des Lungenkarzinoms | 25 |
| 2 | Ziele und Fragestellung der Studie | 27 |
| 3 | Erhebung der Daten..... | 29 |
| 3.1 | Patientenkollektiv..... | 29 |
| 3.2 | Vergleichskollektiv..... | 29 |
| 4 | Methode und Materialien..... | 29 |
| 4.1 | Thrombingenerierungsassay | 29 |

| | | |
|---------|--|----|
| 4.1.1 | Präanalytik..... | 30 |
| 4.1.2 | Testprinzip und Materialien | 30 |
| 4.1.3 | Durchführung | 32 |
| 4.2 | Zweck der PRP/PPP-Ratio | 33 |
| 4.3 | Statistik | 34 |
| 5 | Ergebnisse | 35 |
| 5.1 | Beschreibung der Studiengruppen | 35 |
| 5.2 | Karzinomgruppe vs. Kontrollgruppe..... | 35 |
| 5.2.1 | PRP und PPP | 35 |
| 5.2.1.1 | Plättchenreiches Plasma mit Reagenz C high (PRP mit RCH) | 41 |
| 5.2.1.2 | Plättchenreiches Plasma mit Reagenz C low (PRP mit RCL) | 42 |
| 5.2.1.3 | Plättchenarmes Plasma mit Reagenz C high (PPP mit RCH) | 43 |
| 5.2.1.4 | Plättchenarmes Plasma mit Reagenz C low (PPP mit RCL) | 44 |
| 5.2.2 | PRP/ PPP | 45 |
| 5.3 | Subgruppenanalyse | 46 |
| 5.3.1 | M-Status: M0 vs. M1 | 46 |
| 5.3.2 | T-Status: T1/2 vs T3/4 | 47 |
| 5.3.3 | SCLC vs. NSCLC..... | 49 |
| 5.3.4 | ROC-Analyse: Assoziation zwischen Thrombingenerierung und Embolien | 51 |
| 6 | Diskussion | 54 |
| 6.1 | Diskussion der Methode..... | 54 |
| 6.1.1 | Studiendesign und statistische Auswertung | 54 |
| 6.1.2 | Thrombingenerierungsassay | 55 |
| 6.2 | Diskussion der Ergebnisse | 56 |
| 6.2.1 | Karzinomgruppe vs. Kontrollgruppe | 56 |
| 6.2.2 | PRP/PPP-Ratio | 59 |

| | | |
|-------|--|----|
| 6.2.3 | M-Status und T-Status..... | 62 |
| 6.2.4 | SCLC vs. NSCLC..... | 63 |
| 6.2.5 | Thrombingenerierung als Biomarker für emboliegefährdete Patienten..... | 65 |
| 6.3 | Schlussbetrachtung und Ausblick..... | 66 |
| 7 | Zusammenfassung..... | 70 |
| 8 | Erklärung über die eigenständige Abfassung..... | 73 |
| 9 | Curriculum vitae..... | 74 |
| 10 | Danksagung..... | 75 |
| 11 | Literaturverzeichnis..... | 76 |
| 12 | Tabellen- und Abbildungsverzeichnis..... | 81 |
| 13 | Abkürzungsverzeichnis..... | 82 |

1 Einleitung

1.1 Hyperkoagulabilität bei Tumorerkrankungen

„Diejenigen, welche meine Klinik regelmäßig besuchen, haben das häufige Vorkommen jener ganz besonderen und ziemlich wichtigen Affektion bemerkt, welche man die Phlegmasia alba dolens nennt. Sie erinnern sich wohl, dass wir diese weiße ödematöse und schmerzhaftige Geschwulst [...] [bei] tief gelegenen Krebsleiden beobachtet haben.“

Dies ist der erste wissenschaftliche Bericht über thrombembolische Komplikationen bei einer malignen Grunderkrankung. Verfasst hat ihn der französische Internist Armand Trousseau 1865. Er verweist auch auf Virchow, welcher eine Lungenembolie als Folge einer peripheren Thrombose beschrieben hat. Er schreibt außerdem:

„Schon seit langer Zeit war mir die Häufigkeit eines solchen schmerzhaften Ödems an der oberen oder untere Extremität bei Krebskranken aufgefallen, und zwar war es hier ganz gleichgültig, wo der Krebs seinen Sitz hatte [...]“ (Trousseau A 1868)

Diesen grundsätzlichen Zusammenhang erkannt zu haben, ist Trousseau sicherlich nicht hoch genug anzurechnen. So wird heute in der Medizin auch noch vom Trousseau-Syndrom gesprochen, wenn eine tumorassoziierte Thrombose gemeint ist. Hinsichtlich der Frage „wo der Krebs seinen Sitz hat“, wird heutzutage allerdings schärfer differenziert. Es werden patienten-, therapie- und tumorbezogene Risikofaktoren unterschieden.

Tabelle 1 Risikofaktoren (RF) für tumorassoziierte Thrombembolien (Ikushima et al. 2016)

| Patientenbezogene RF | Therapiebezogene RF | Tumorbezogene RF |
|---|--|---|
| Höheres Lebensalter | Chemotherapie | Art und Lokalisation |
| Längere Immobilität | Beeinflussung des Hormonhaushalts (z. B. beim Estrogenrezeptor-pos. Mammakarzinom) | Stadium |
| Positive Anamnese | Wachstumsfaktoren | Kompression oder direkte Invasion größerer Gefäße |
| Erhöhte Leukozyten- oder Thrombozytenzahl | Angiogenesehemmer | Muzine von Adenokarzinomen |
| Akute Infektion | Operation | Expression von <i>tissue factor</i> |
| Komorbidität (z. B. Vorhofflimmern oder Adipositas) | Zentraler Venenkatheter | |

Auch im Verständnis der Pathophysiologie tumorassoziiierter Thrombosen hat die Wissenschaft einige Fortschritte gemacht: Tumorzellen können über verschiedene Mechanismen die Gerinnung aktivieren, zum Beispiel durch die Expression von *tissue factor* oder *cancer procoagulant*, aber auch durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. *Cancer procoagulant*, ein Protein, das auch von Lungenkarzinomzellen exprimiert wird (Rucińska et al. 1997), fördert direkt die Konversion von Faktor X zu Faktor Xa, und *tissue factor* (TF) ist im zellbasierten Gerinnungsmodell der Ausgangspunkt der Koagulation (siehe 1.1.3). Außerdem können Sialinsäurereste in Muzinen von Adenokarzinomen Faktor X nichtenzymatisch aktivieren. Muzine interagieren auch mit den Adhäsionsmolekülen L- und P-Selektin, was die Entstehung von Thromben ebenfalls begünstigt. (Ikushima et al. 2016; Falanga et al. 2015)

Thrombembolische Ereignisse sind, hinter einem Progress der Tumorerkrankung, die häufigste Todesursache bei onkologischen Patienten. Ikushima et al. (2016) berichten, dass bei Patienten mit tumorassoziiierter Thrombembolie am häufigsten ein Lungentumor zu Grunde liegt, gefolgt von Pankreas- und Kolonkarzinom. Tabelle 2 bietet eine Übersicht über die Angaben der Inzidenz thrombembolischer Komplikationen bei Patienten mit Lungenkarzinom in jüngeren klinischen Studien.

Tabelle 2 Klinische Studien und ihre Angaben zur Inzidenz von Thrombembolien bei Patienten mit Lungenkarzinom

| Autor | n Patienten mit Lungenkarzinom | Inzidenz von Thrombembolien |
|----------------------|--------------------------------|---|
| Connolly et al. 2012 | 6732 | 13,9% VTE in Lungenkrebskohorte, 1,4 % in Kontrollkohorte |
| Crolow et al. 2013 | 1940 | 9,8% Thrombembolien, davon 78 % venös |
| Zhang et al. 2014 | 673 | 13,2% VTE, davon 6,2% TVT, 4,9% LAE und 2,1% beides |
| Kadlec et al. 2014 | 950 | 8,3% VTE bei Männern und 11,7% bei Frauen |

1.1.1 Pathophysiologie der Hämostase

1.1.2 Thrombozytenadhäsion- und aggregation

Die thrombozytäre Hämostase umfasst eine Vasokonstriktion sowie die Thrombozytenadhäsion, -aggregation und Sekretion prokoagulatorischer Substanzen durch die Thrombozyten. Liegt eine Gefäßläsion vor, im Sinne einer Diskontinuität des Gefäßendothels, verursacht die proximale Vasokonstriktion eine Verlangsamung des Blutstroms. Dies erleichtert die Interaktion der Thrombozyten mit den subendothelialen Matrixproteinen wie Kollagen und von Wilbrand-Faktor (vWF). Die in der Thrombozytenmembran verankerten Glykoproteine Ib und IV binden an subendotheliales Kollagen und vWF. Dieser initiale Kontakt wird gefestigt durch die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors (Integrin $\alpha_{IIb} \beta_3$) und Kollagenrezeptors (Integrin $\alpha_2 \beta_2$). Die folgende Degranulation der Thrombozyten führt zur Bindung weiterer Plättchen an die bereits adhärenen Thrombozyten über Fibrinogenbrücken zwischen den membrangebundenen Glykoproteinen IIb/IIIa. Inhalt der Granula sind makromolekulare Substanzen, wie Wachstumsfaktoren und Adhäsionsproteine, sowie mikromolekulare Substanzen, wie Adenosindiphosphat (ADP), Thromboxan A₂ und Serotonin, welche eine autokrine Verstärkung der Thrombozytenaktivierung bewirken (Langer und Gawaz 2010). Diese beinhaltet eine Konformationsänderung des Fibrinogenrezeptors, dessen Affinität zu Fibrin infolgedessen gesteigert wird. Die Verlagerung negativ geladener Phospholipide an die Außenseite der Thrombozytenmembran bildet die Grundlage für den späteren *thrombin burst*, da sich so kalziumabhängige Gerinnungsfaktoren anlagern können.

1.1.3 Klassische Gerinnungskaskade und Zellbasiertes Gerinnungsmodell

Die klassische Blutgerinnungskaskade (siehe Abbildung 1) postuliert, dass extrinsischer und intrinsischer Pfad der Gerinnung als quasi unabhängige, klar voneinander abgrenzbare Enzymkaskaden arbeiten und die Interaktion zwischen Gerinnungsfaktoren und Zelloberflächen eine untergeordnete Rolle spielt. Während dieses Modell hilfreich war, um zu verstehen, wie die Blutgerinnung als plasmatischer Prozess *in vitro* abläuft, zeigte weitere Forschung, dass physiologische Prozesse damit unzureichend erklärt sind. So verursacht beispielsweise ein Mangel von Komponenten der intrinsischen Gerinnung, wie Faktor XII, Prekallikrein (PK), oder *high molecular weight kininogen* (HMWK), zwar eine deutliche Verlängerung der aPTT. Dies korreliert aber nicht mit einem erhöhten Blutungsrisiko, weder im Mausmodell noch beim Menschen. Andersherum zeigen Patienten mit Hämophilie ein hohes Blutungsrisiko, obwohl sie eine intakte extrinsische Gerinnung aufweisen. Auch ein Mangel des Faktors VII kann mit kritischen Blutungsereignissen assoziiert sein, trotz intaktem intrinsischem System. Die klinische Manifestation von Blutungen beim Vorliegen von Defekten entweder im intrinsischen oder im extrinsischen System spricht also gegen die Annahme, dass beide Enzymkaskaden als unabhängige Aktivatoren von Faktor X wirken (Smith 2009). Zumal bereits die 1965 beschriebene Josso-Schleife die Trennung zwischen extrinsischer und intrinsischer Gerinnung relativiert, da gezeigt werden konnte, dass *tissue factor* (TF) und Faktor VII nicht nur Faktor X, sondern auch Faktor IX aktivieren, sowie dass Thrombin nicht nur Fibrinogen, sondern auch Faktor VIII aktiviert. Faktor VIII und Faktor IX bilden den Tenase-Komplex, der ebenfalls Faktor X aktiviert. Es handelt sich hierbei also um eine sich selbst verstärkende Schleife, welche mit der Einteilung in extrinsische und intrinsische Gerinnung nicht korrekt erfasst wird. (Josso und Prou-Wartelle 1965)

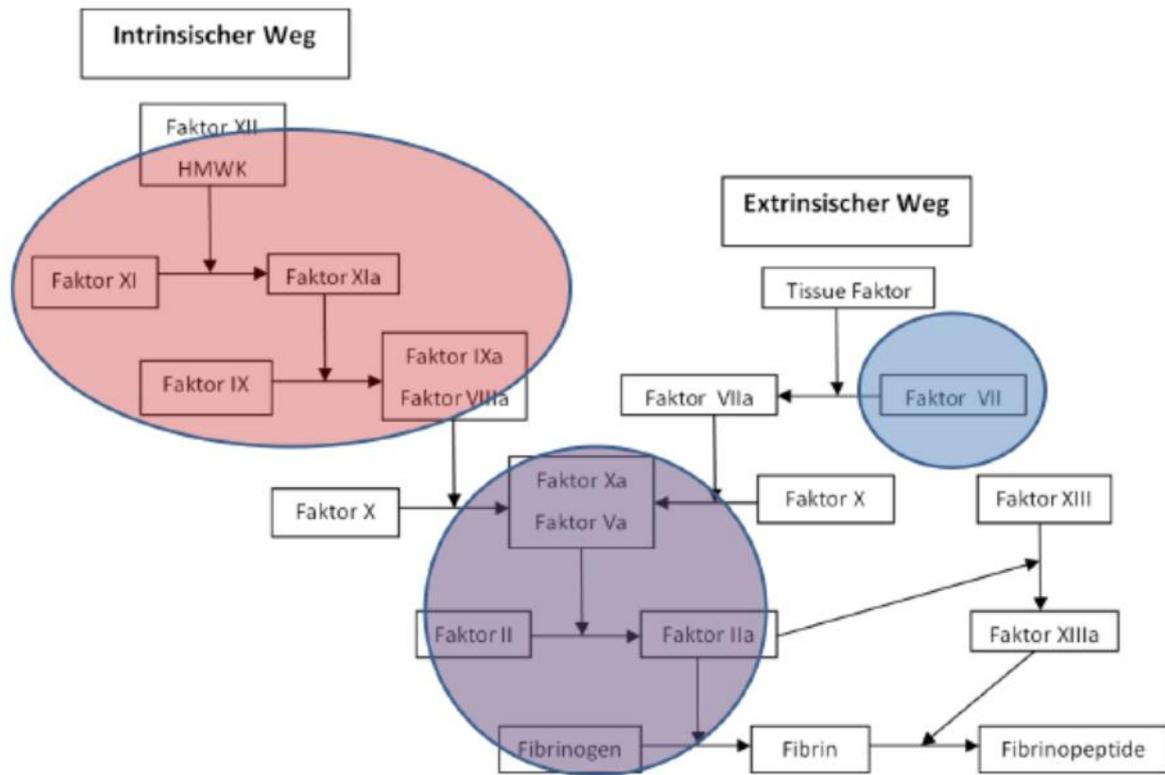


Abbildung 1 Klassische Gerinnungskaskade: durch aPTT erfasste Faktoren (rosa hinterlegt), durch PT erfasste Faktoren (blau hinterlegt) und gemeinsam erfasste Faktoren (violett) (Schneider 2016)

Das zellbasierte Gerinnungsmodell wird angesehen als ein Resultat der Arbeit von Maureen Hoffman, Douglas Monroe und Harold Roberts (Roberts et al. 2006). Die Formation des Koagulationskomplex spielt sich demnach an einer prokoagulatorischen Membran in Anwesenheit von Kalzium ab und wird in drei Phasen unterteilt: Initiation, Amplifikation und Propagation. (McMichael 2012)

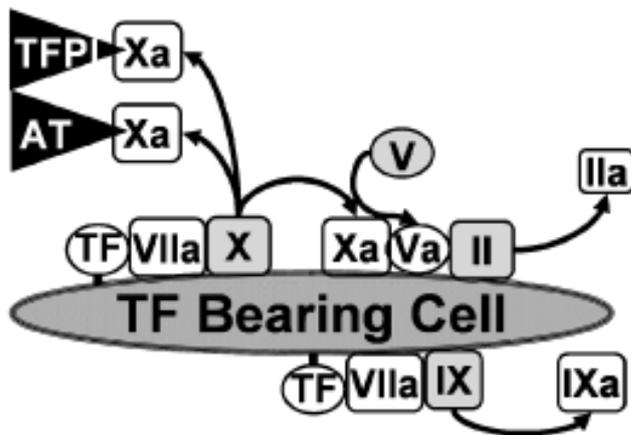
Tabelle 3 Phasen des Zellbasierten Gerinnungsmodells

| Phase des Koagulationsprozesses | Beteiligte Zellen | Mediatoren und Resultat |
|---------------------------------|--|---|
| Initiation | TF-tragende Zellen | Generierung einer geringen Menge FIXa, FXa und Thrombin durch den TF-FVIIa-Komplex |
| Amplifikation | Thrombozyten | Aktivierung der Thrombozyten und des GP IIb/IIIa-Rezeptors; Spaltung des vWF-FVIII-Komplexes und Aktivierung von FV, FVIII, FXI auf der Thrombozytenmembran |
| Propagation | aktivierte Thrombozyten und Endothelzellen | Generierung von FXa durch den tenase (FIXa-FVIIIa)-Komplex, sowie Prothrombinase (FXa-FVa)-Komplex auf aktivierten Thrombozyten; dadurch massive Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin; Thrombozytenaggregation durch Fibrin über GP IIb/IIIa-Rezeptor |

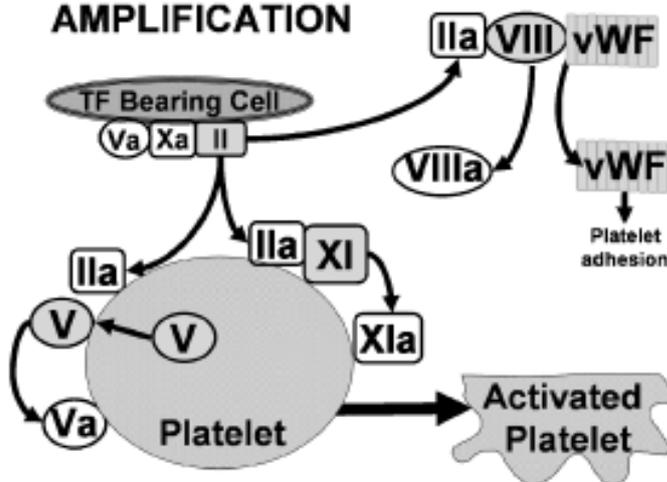
A) *Initiation*

Ausgangspunkt der Initiation sind TF-tragende Zellen. TF findet sich in subendothelialen Fibroblasten, die durch einen Gewebsdefekt in Kontakt mit dem Blutstrom geraten, aber auch an zirkulierenden Mikropartikeln, die als Membranvesikel von Thrombozyten oder Monozyten abgegeben werden oder an glatten Muskelzellen und Keratinozyten - also an Zellen, die normalerweise nicht in Kontakt mit dem Blutstrom geraten (McMichael 2012). Endothelzellen exprimieren TF nur unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α . Es ist bekannt, dass auch Tumorzellen prokoagulatorische Proteine, wie TF, TNF- α und VEGF exprimieren (Falanga et al. 2015). Faktor VIIa zirkuliert in geringen Mengen im Blutstrom. Bei Kontakt mit TF aktiviert der TF-FVIIa-Komplex Faktor IX und Faktor X. FXa bildet mit FVa in Gegenwart von Kalzium und Phospholipiden den Prothrombinase-Komplex auf TF-exprimierenden Zellen. Dieser aktiviert Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (Faktor IIa). Allerdings bleibt dieser Prozess vorerst auf die TF-exprimierende Zelle beschränkt, da FXa im Plasma schnell durch *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) und Antithrombin (AT) inaktiviert wird. So erfolgt eine Generierung geringer Mengen Thrombin, die in gesunden Individuen kontinuierlich und getrennt

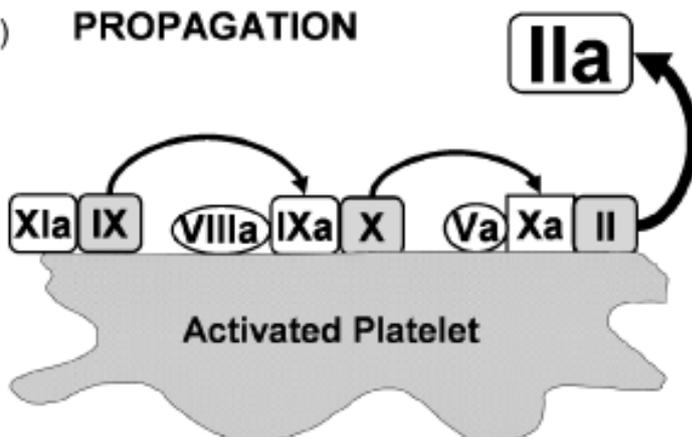
(a) **INITIATION**



(b) **AMPLIFICATION**



(c) **PROPAGATION**



malerweise nicht in Kontakt mit dem Blutstrom geraten (McMichael 2012). Endothelzellen exprimieren TF nur unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α . Es ist bekannt, dass auch Tumorzellen prokoagulatorische Proteine, wie TF, TNF- α und VEGF exprimieren (Falanga et al. 2015). Faktor VIIa zirkuliert in geringen Mengen im Blutstrom. Bei Kontakt mit TF aktiviert der TF-FVIIa-Komplex Faktor IX und Faktor X. FXa bildet mit FVa in Gegenwart von Kalzium und Phospholipiden den Prothrombinase-Komplex auf TF-exprimierenden Zellen. Dieser aktiviert Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (Faktor IIa). Allerdings bleibt dieser Prozess vorerst auf die TF-exprimierende Zelle beschränkt, da FXa im Plasma schnell durch *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) und Antithrombin (AT) inaktiviert wird. So erfolgt eine Generierung geringer Mengen Thrombin, die in gesunden Individuen kontinuierlich und getrennt

Abbildung 2 Das zellbasierte Gerinnungsmodell (Smith 2009)

von den folgenden Phasen des Koagulationsprozesses abläuft. Faktor VII hat eine Art Wächterfunktion inne, in dem Sinn, dass er im Blut zirkuliert und im Falle von Endothelschäden bzw. Kontakt zu *tissue factor* die Initiation einleitet. Deren Resultat ist die Aktivierung einer gewissen Menge Faktor Xa auf der Zelloberfläche. Die Inhibierung des freien Faktors Xa durch TFPI und AT bewirkt, dass die Gerinnelbildung nicht über die geschädigte Stelle hinaus vorkommt. (McMichael 2012)

B) Amplifikation

Die während der Initiation gebildete geringe Menge Thrombin kann vielfältige Effekte an den Schauplätzen der Hämostase haben. Diese prothrombotische Anlaufphase endet mit der Aktivierung von Thrombozyten, also der Präsentation von Phospholipiden an deren Membranaußenseite, der Bildung einer prokoagulatorischen Membran und der Exozytose von Mikropartikeln. Thrombin aktiviert die Faktoren V und X. Außerdem löst es den FVIII von vWF und aktiviert dann auch FVIII. Thrombozyten, die in dieser Phase an den Ort der Schädigung rekrutiert werden, steuern die prokoagulatorische Phospholipidmembran für die Versammlung der für die Propagation notwendigen Faktoren bei (McMichael 2012).

C) Propagation

Faktor IXa und Faktor VIIIa bilden den Tenase-Komplex (von engl. ten = 10) und aktivieren Faktor X. Der Tenase-Komplex ist in der Aktivierung von Faktor X circa 50 Mal effektiver als der TF-FVIIa-Komplex, sodass der Großteil des physiologisch gebildeten Faktors X durch ihn gebildet wird. Faktor Xa initiiert die Bildung des Prothrombinasekomplex, bestehend aus den Faktoren Xa und Va. Was nun folgt, wird *thrombin burst* genannt: die explosive Bildung von Thrombin und infolge dessen die Bildung eines Fibringerinnsels. Thrombin aktiviert außerdem Faktor XIII zu Faktor XIIIa, welcher für die Quervernetzung des Fibrins und somit für die Stabilisierung des Gerinnsels verantwortlich zeichnet.

Diese Modell erklärt nun auch die eingangs erwähnten Blutungskomplikation bei bestimmten hereditären Koagulopathien: In Abwesenheit von FVIII, wie bei Hämophilie A, oder FIX, also Hämophilie B, läuft eine normale Initiation ab, da in dieser der TF-FVIIa-Komplex die bestimmende Komponente ist. Die Bildung einer ausreichenden Menge Tenase-Komplex ist

allerdings nicht möglich, da keine ausreichende Menge Faktor VIIIa oder Faktor IXa vorhanden ist.

1.1.4 Klassische Globalparameter zur Erfassung des Gerinnungsstatus

In der klinischen Routine wird sich zur Erfassung des Gerinnungsstatus in aller Regel auf die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), die Prothrombinzeit (PT) beziehungsweise den Quick-Wert und die Thrombozytenzahl beschränkt. Bei aPTT und PT handelt es sich um plasmatische Globaltests. Der Quick-Wert und die INR (international normalized ratio) sind alternative Darstellungsmethoden der PT: der gemessene Wert wird ins Verhältnis zur Messung in einer Normalplasmaprobe gesetzt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen. Etabliert sind diese Parameter hauptsächlich zur Überwachung einer Therapie mit Vitamin-K-Antagonisten. Um die Messung durchzuführen, ist die Gewinnung von Citrat-Blut erforderlich. Citrat bindet das naturgemäß in der Probe vorhandene Kalzium und verhindert so die Gerinnung der Probe in der Monovette. Im Labor wird die Probe zentrifugiert und die Messung erfolgt im überstehenden Plasma. Zur Bestimmung der PT/ INR wird der Plasmaprobe nun Kalzium und TF zugegeben und die Zeit bis zur Bildung von Fibrinfäden gemessen. Die PT/ INR beinhaltet die Aktivität des Faktor VII der extrinsischen Gerinnung und der gemeinsamen Endstrecke des Kaskadenmodells bestehend aus den Faktoren X, V, II und Fibrinogen. Für die Messung der aPTT wird die ebenfalls zentrifugierte Plasmaprobe mit Phospholipiden und Kalzium versetzt und die Zeit bis zur Gerinnung bestimmt. Da diese Messung ohne TF auskommt, gibt die aPTT die Aktivität der intrinsischen Gerinnung, also der Faktoren XII, XI, IX, VIII sowie der gemeinsamen Endstrecke wieder.

APTT und PT bieten wertvolle Informationen zur Überwachung einer antikoagulativen Therapie und werden auch zur Diagnose von Blutungsdiathesen wie Hämophilie A und B verwendet. Allerdings endet die Aussagekraft dieser klassischen Tests in der Regel mit dem Beginn des sogenannten *thrombin burst* (Lance 2015). Weitere Forschung zeigte, dass diese Tests den in vivo Status nur unzureichend wiedergeben. Burns et al. (1993) untersuchten, um wieviel Prozent die Aktivität eines einzelnen Faktors in einer Plasmaprobe reduziert sein muss, damit eine Verlängerung der PT bzw. aPTT messbar ist. Dabei zeigte sich, dass Plasmaproben mit einer reduzierten Aktivität von zwei Faktoren auf 75 % eine verlängerte PT und aPTT aufweisen, während dies wenn nur ein Faktor auf 50 % reduziert ist, nicht der Fall ist. Das ist deswegen

von Interesse, weil die meisten erworbenen Koagulopathien durch eine kombinierte Faktordefizienz charakterisiert sind und sich so möglicherweise die schlechte Korrelation zwischen einem pathologischen Ergebnis in einem dieser Tests und klinischen Blutungsereignissen erklärt. Darüber hinaus erfassen diese klassischen Globalparameter weder Wechselspiel zwischen Plättchen und Endothel, noch ist mit ihrer Hilfe eine Aussage über die Qualität des Gerinnsels möglich.

1.1.5 Neuere Globaltests

1.1.5.1 *Thromboelastometrie*

Neuere Verfahren sind beispielsweise die beiden auf dem Markt befindlichen automatisierten thromboelastischen Tests ROTEM (Rotationsthromboelastometrie) und TEG® (Thromboelastograph). Sie basieren auf dem bereits 1948 von Hartert entwickelten ersten thromboelastischen Test. Das Prinzip besteht darin, in einer Küvette mit der zu untersuchenden Blutprobe einen Stempel oszillieren zu lassen oder andersherum um einen unbeweglichen Stempel die Küvette zu bewegen. In beiden Fällen hemmt das sich bildende Gerinnsel die Bewegung, woraus Rückschlüsse auf die Gerinnselfestigkeit gezogen werden. Die Aufzeichnung der Bewegung des Stempels über die Zeit ist die Thromboelastometriekurve, mit deren Hilfe die Zeit bis zum Einsetzen des Gerinnungsprozesses sowie die Zeit bis zum Erreichen eines stabilen Gerinnsels bestimmt werden können.

Thromboelastometrie erlaubt, im Gegensatz zu klassischen Parametern wie PT und aPTT, also auch eine Aussage über die Qualität des Gerinnsels beziehungsweise über das Vorliegen einer hyperfibrinolytischen Situation. Die Methoden werden vor allem in der Kardiochirurgie, Polytraumachirurgie und Leberchirurgie angewandt, obwohl es bisher keine großen prospektiven randomisierten Studien gibt. Nachteile der Thromboelastometrie sind, dass die Aktivität des von Willebrand Faktors sowie des Faktors XIII, welcher für die Quervernetzung des Fibrins verantwortlich ist, nicht erfasst wird. Auch die Effekte einer antikoagulatorischen Pharmakotherapie und milde Thrombozytenfunktionsstörungen können nicht erfasst werden. Schlussendlich ist die Standardisierung des Assay zurzeit noch nicht abgeschlossen (Prüller F 2015; Lance 2015).

1.1.5.2 *Clot waveform analysis (CWA)*

Das Prinzip der CWA basiert auf der klassischen aPTT, allerdings in Kombination mit einer photooptischen Messung. So kann die Änderung der Absorption in Beziehung gebracht werden

zur Fibrinkonzentration. Die Kurve, aufgetragen über die Zeit, entspricht der Fibrinbildung, die erste Ableitung der Thrombinaktivität, die zweite der Prothrombinaseaktivität und die dritte der Tenaseaktivität. Auch diese Methode bedarf noch weiterer Standardisierung, hat sich aber als sehr nützlich erwiesen in der Diagnostik der disseminierten intravasalen Gerinnung, welche durch die CWA in bis zu 19% der Fälle früher entdeckt werden konnte als durch konventionelle Methoden (Levi M et al. 2009). Außerdem zeigt neuere Forschung, dass dieser Test bei Hämophiliepatienten als einfache Überwachungsmethode hilfreich sein kann (Siegemund et al. 2014). Es gibt Grund zur Annahme, dass die CWA ein nützliches Mittel ist zur Einschätzung des Schweregrades und der Prognose einer Sepsis. Die CWA zeigte sich in einschlägigen Studien in dieser Frage den klassischen Entzündungsparametern überlegen (Chopin et al. 2006). Allerdings liegt in der Anwendung der CWA in der Klinik noch wenig Erfahrung vor, sodass dieses Verfahren noch keine breite Verwendung findet.

1.1.5.3 Thrombingenerierungsassays

Eine der ersten Arbeiten über Techniken zur Messung der Thrombingenerierung wurde 1953 von MacFarlane und Biggs publiziert. Die Methode war allerdings recht umständlich und – für heutige Maßstäbe – ungenau, da aus der gewonnenen Probe kontinuierlich Teilproben entnommen und in eine Fibrinogenlösung gegeben werden mussten, in welcher dann die Messung erfolgte. Bei diesem Verfahren wurde also noch Fibrinogen als Substrat des Thrombins

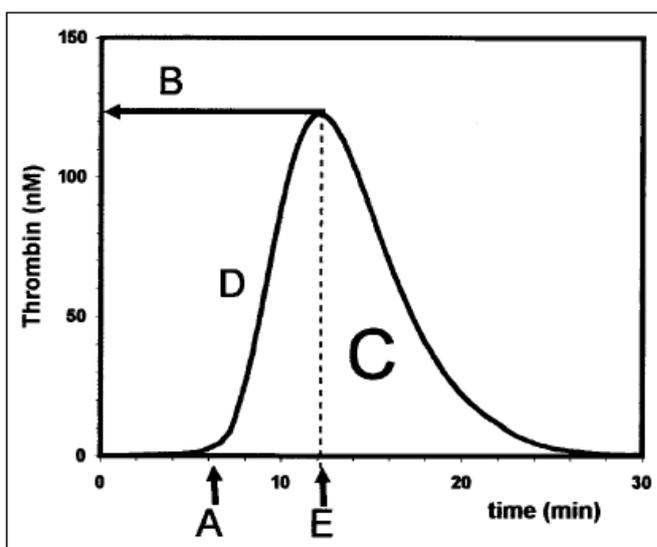


Abbildung 3 Parameter des Thrombogramms: A) lag time (min), B) peak thrombin (nM), C) Endogenes Thrombinpotential (Fläche unter der Kurve), E) time to peak (min), D) maximale Steigung der Kurve i.e. Reaktionsbeschleunigung (Hemker et al. 2006)

eingesetzt, während in späteren Weiterentwicklungen artifizielle Substrate Anwendung finden. (Macfarlane und Biggs 1953)

Hemker et. al. verwendeten später ein chromogenes Substrat, welches es möglich machte, die Thrombingenerierung photometrisch auszuwerten. Allerdings wurde das Substrat schnell verbraucht, sodass seine Umsetzung nicht die gesamte Thrombingenerierung widerspiegelte und auch mit den physiologischen

Feedbackmechanismen der Thrombinbildung interferierte. Eine weitere Limitation war, dass der Test aufgrund der photometrischen Signalerfassung nur in defibriniertem Plasma durchgeführt werden konnte. Dieselbe Arbeitsgruppe entwickelte deswegen ein fluorogenes Substrat (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Ein kontinuierlicher, softwaregestützter Vergleich des Fluoreszenzsignals mit einer Probe bekannter Thrombinaktivität erlaubt es, die Thrombinaktivität in der zu untersuchenden Plasmaprobe als eine Kurve über der Zeit aufzutragen. Dieses Verfahren stellt heutzutage den Stand der Technik dar (Lance 2015). Es gibt aktuell zwei kommerziell erhältliche fluorometrische Thrombingenerierungsassays: *calibrated automated thrombin generation assay* (CAT) (Thrombinoscope B.V., Maastricht, Niederlande) und *Technothrombin TGA[®] assay* (Technoclone, Wien, Österreich).

Die Parameter der so abgeleiteten Thrombingenerierungskurve sind in Abbildung 3 dargestellt. Als *lag time* wird die Zeit bis zum Emporschnellen der Kurve – genauer: bis Erreichen von 1/6 der maximalen Thrombinkonzentration, dem sogenannten *thrombin burst*, bezeichnet. *Peak thrombin* stellt die maximale Thrombinkonzentration dar, *time to peak* die Zeit bis zum Erreichen derselben. Die Fläche unter der Kurve (= *area under the curve, AUC*) entspricht dem Endogenen Thrombinpotential (ETP) und die größte Steigung der Kurve ist der sogenannte *velocity index*, also die maximale Beschleunigung der Thrombinbildung. Die Thrombingenerierung kann prinzipiell im plättchenarmen (PPP) oder plättchenreichen Plasma (PRP) untersucht werden. Um die Gerinnung in Gang zu setzen, wird mittels eines Triggers, in aller Regel *tissue factor*, eine Gefäßläsion imitiert. Im plättchenarmen Plasma verstärken Phospholipide den Effekt von *tissue factor*. Im plättchenreichen Plasma steuern Thrombozyten zusätzliche prokoagulatorische Membranen bei (Lance 2015). Je nach Fragestellung werden der Probe verschiedene Quantitäten *tissue factor* zugesetzt. Mit einem Thrombingenerierungsassay können nicht nur Hämophiliepatienten von gesunden unterschieden werden, sondern es können auch Hämophiliepatienten mit besonders hohem Blutungsrisiko identifiziert werden. TF-Konzentrationen zwischen 2 und 5 pM sind erforderlich um zwischen Hämophiliepatienten und Gesunden zu unterscheiden, weil dann die Thrombingenerierung von der Aktivität der Faktoren VIII und IX abhängt. Es konnte auch gezeigt werden, dass eine Thrombingenerierung unter 20 % der Norm bei diesen Patienten mit einer erhöhten klinischen Blutungstendenz einher geht und dass eine Substitution von beispielsweise Faktor VIII bei Hämophilie A die Thrombingenerierung wieder steigen lässt (Hemker et al. 2006). Bei niedrigeren TF-Konzentrationen wird die Faktor XI-Konzentration entscheidend (Keularts et al. 2001). Der Vorteil des

Thrombingenerierungsassays liegt also darin, dass hier nicht die Aktivität oder Konzentration einzelner Faktoren bestimmt werden, sondern das Gerinnungspotential eines Individuums. Es gibt Grund zur Annahme, dass die Thrombingenerierung geeignet ist, sowohl Situationen erhöhter Blutungsgefahr zu detektieren als auch erhöhter Thrombogenität. Petros et al. (2012) zeigten beispielsweise einen Zusammenhang zwischen den Werten für *lag time* und *time to peak* im plättchenarmen Plasma und der Entwicklung einer disseminierten intravasalen Gerinnung bei Patienten mit schwerer Sepsis.

Die Thrombingenerierungskurve, erstellt mittels eines fluorogenen Substrats, lässt also Rückschlüsse auf die hämostatische Gesamtkapazität eines Individuums zu und scheint ein vielversprechendes Forschungsinstrument zu sein, dessen breitere Anwendung in der Klinik wünschenswert wäre, wenn gleich hier zu noch eine weitere Standardisierung des Verfahrens notwendig ist.

1.2 Lungenkarzinom

1.2.1 Epidemiologie und Risikofaktoren des Lungenkarzinoms

Auf Grund der demografischen Alterung der Bevölkerung in Deutschland hat sich seit Ende der 1970 Jahre die Zahl der Neuerkrankungen an Krebs allgemein fast verdoppelt. So wird auch beim Lungenkarzinom ein Anstieg der Neuerkrankungsrate bis 2020 prognostiziert. Im Jahre 2013 lag die Anzahl der Neuerkrankungen an Lungenkrebs (ICD-10-Codes C33 und C34) laut dem Zentrum für Krebsregisterdaten am Statistischen Bundesamt für Frauen bei 18.810 und für Männer bei 34.690 (Robert Koch-Institut (RKI) 2016). Lungenkrebs ist damit bei beiden Geschlechtern, hinter Darmkrebs auf Platz zwei, die dritt häufigste Krebsart. Bei Männern ist Prostatakrebs und bei Frauen Brustkrebs am häufigsten (laut Deutsche Krebsgesellschaft). Weitere epidemiologische Kennziffern des Lungenkarzinoms hinsichtlich Neuerkrankungen und Sterbefällen in der Bundesrepublik Deutschland sowie ausgewählte Daten aus der EU sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 zusammengestellt. Als rohe Rate und altersstandardisierte Rate wird hier die Anzahl an Neuerkrankungen bzw. Sterbefällen pro 100.000 Einwohner angegeben.

Tabelle 4 Neuerkrankungen an Lungenkrebs in Deutschland 2013, zum Vergleich ausgewählte Kennzahlen aus der EU (Robert Koch-Institut (RKI) 2016)

| Neuerkrankungen | Frauen | Männer |
|-----------------------------------|---------|---------|
| Absolute Zahl | 18.810 | 34.690 |
| Mittleres Erkrankungsalter | 68,3 | 69,3 |
| Rohe Rate | 45,7 | 87,7 |
| Altersstandardisierte Rate | 28,6 | 58,6 |
| Aktueller Trend | + 3,1 % | - 1,2 % |
| Altersstandardisierte Rate (EU) | 26,1 | 66,3 |
| Prognose für 2020 (absolute Zahl) | 23.7000 | 36.2000 |

Tabelle 5 Sterbefälle an Lungenkrebs in Deutschland 2013, zum Vergleich ausgewählte Kennzahlen aus der EU (Robert Koch-Institut (RKI) 2016)

| Sterbefälle | Frauen | Männer |
|---------------------------------|---------|---------|
| Absolute Zahl | 15.140 | 29.708 |
| Mittleres Sterbealter | 70,06 | 71,0 |
| Rohe Rate | 36,8 | 75,3 |
| Altersstandardisierte Rate | 21,7 | 48,8 |
| Aktueller Trend | + 2,7 % | - 1,5 % |
| Altersstandardisierte Rate (EU) | 20,4 | 55,3 |
| Aktueller Trend (EU) | + 2,3 % | - 1,6 % |

Die altersstandardisierte Rate hinsichtlich Neuerkrankungen beziehungsweise Sterbefällen wird hierbei angegeben, um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen Gesellschaften verschiedener Altersstruktur zu erzielen, weil auch beim Lungenkrebs die Erkrankungswahrscheinlichkeit mit höherem Alter steigt. Dies wird erreicht indem die Häufigkeiten aller 5-Jahres-Altersgruppen auf eine fiktive Bevölkerung mit konstanter Altersstruktur hochgerechnet werden. So kann mit Hilfe der altersstandardisierten Rate ermittelt werden, dass Deutschland im

Verhältnis zu den anderen EU-Staaten sowohl bei den Neuerkrankungen als auch bei der Sterberate im Mittelfeld liegt. Dies gilt für die Gesamtbevölkerung ohne Differenzierung zwischen Männern und Frauen. Allerdings verzeichnet Deutschland, wie die meisten industrialisierten Ländern, einen gegenläufigen Trend hinsichtlich der Erkrankungs- und Sterberate bei Männern und Frauen. Bei Männern waren beide Kennzahlen zuletzt rückläufig während sie bei Frauen ansteigen. Dies korreliert mit dem geschlechtsspezifischen Rauchverhalten bis circa zur Jahrtausendwende (Robert Koch-Institut (RKI) 2016). Das Inhalationsrauchen ist überhaupt der stärkste Risikofaktor für die Entwicklung eines Lungenkarzinoms. Bis zu 90 % der Lungenkarzinome sind auf das Rauchen zurück zu führen. Weitere mögliche Ursachen sind Radon- oder Uranbelastung der Umwelt sowie eine Bestrahlung des Thorax in der Krankengeschichte beispielsweise auf Grund eines Mammakarzinoms oder Hodgkin-Lymphoms. Auch Passivrauchen erhöht das Risiko um bis zu 25%, wobei hier vor allem eine langjährige und früh in der Kindheit beginnende Exposition relevant ist. In solchen Fällen kann das Risiko um das bis zu 2,5 fache erhöht sein (Hien 2012). Unter bestimmten Voraussetzungen kann das Bronchialkarzinom als Berufskrankheit anerkannt werden, zum Beispiel wenn eine Exposition gegenüber Asbest, Buchen- oder Eichenholzstäuben als ursächlich gilt. Ein weiterer Risikofaktor ist die Luftverschmutzung in Großstädten, unter anderem durch Dieselabgase. Besorgniserregend ist, dass in jüngerer Zeit bei beiden Geschlechtern der Anteil an Adenokarzinomen unter den Lungentumoren zunimmt. Da das Adenokarzinom am wenigsten mit dem Rauchen assoziiert ist (Scagliotti et al. 2009), könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass andere Risikofaktoren, möglicherweise Umweltbedingungen, an Bedeutung gewinnen.

1.2.2 Diagnostik

Da das Lungenkarzinom im Frühstadium keine typischen Symptome verursacht, wird es häufig spät diagnostiziert. B-Symptomatik (Nachtschweiß, Gewichtsverlust, Fieber) sowie Husten, Thoraxschmerzen und Dyspnoe sind unspezifische Symptome. Als Spätsymptom treten häufig Hämoptysen auf. Paraneoplastische Syndrome können vor allem beim kleinzelligen Lungenkarzinom auftreten. Hier wären das Cushing-Syndrom beim Vorliegen eines kleinzelligen-neuroendokrinen Tumors und das Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion zu nennen. Ein seltenes neuropathisches, paraneoplastisches Phänomen ist das Lambert-Eaton-Syndrom. Es ist gekennzeichnet durch ein myasthenieähnliches Krankheitsbild mit einer Schwäche der

proximalen Extremitätenmuskulatur. Im Labor lassen sich Antikörper gegen spannungsgesteuerte Kalziumkanäle nachweisen. Auch eine Thromboseneigung bei gleichzeitig vorliegender Thrombozytopenie weckt den Verdacht auf ein Bronchialkarzinom. Ein neu aufgetretenes Asthma oder eine kürzlich entwickelte Bronchitis, rezidivierende Pneumonien, insbesondere in Kombination mit einer positiven Raucheranamnese bei Patienten über 40 Jahren sollten immer an ein Bronchialkarzinom denken lassen.

In solchen Fällen muss zügig weitere Diagnostik eingeleitet werden. Hierzu zählt als Lokalisationsdiagnostik eine Bildgebung in Form von Thoraxröntgen oder CT-Thorax. Im Thoraxröntgen ist jedoch jeder Runderherd bis zum Beweis des Gegenteils als karzinomverdächtig einzustufen und auch im CT sind viele Differenzialdiagnosen zu bedenken, sodass zur Diagnosesicherung allein die Gewinnung einer histologischen oder zytologischen Probe geeignet ist. Dies geschieht bevorzugt bronchoskopisch. Auch kann eine endosonografisch gesteuerte Feinnadelbiopsie durchgeführt werden. Ist der Befund auf diese Weise nicht zu erreichen, wird häufig eine CT-gesteuerte transthorakale Punktion, eine videoassistierte Thorakoskopie oder eine Mediastinoskopie durchgeführt. Zur Basisdiagnostik gehören außerdem Oberbauchsonografie und Skelettszintigrafie. Bei Verdacht auf zerebrale Metastasen ist eine CT- oder MRT-Untersuchung des Gehirns durchzuführen. Labormedizinisch lassen sich gegebenenfalls im Serum Tumormarker nachweisen, welche allerdings keine Diagnostika sondern Verlaufsparameter darstellen. Zu erwähnen sind hier die neuronenspezifische Enolase (NSE) beim kleinzelligen Karzinom, das carcinoembryonale Antigen (CEA) beim Adenokarzinom und das Zytokeratinfragment 21-1 (CYFRA 21-1) beim Plattenepithelkarzinom.

1.2.3 Histomorphologie und molekulare Diagnostik des Lungenkarzinoms

Die histologische Einteilung des Lungenkarzinoms erfolgt nach der WHO-Klassifikation. Prinzipiell werden nichtkleinzellige (*non-small cell lung cancer* = NSCLC) von kleinzelligen Karzinomen (*small cell lung cancer* = SCLC) unterschieden. Bei den nichtkleinzelligen wiederum sind die drei Haupttypen Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom und großzelliges Karzinom relevant. Das Adenokarzinom ist durch Schleimproduktion und drüsiges Wachstum gekennzeichnet. Das bronchioloalveoläre Karzinom stellt eine Variante des Adenokarzinoms dar, mit tapetenförmiger, einschichtiger Auskleidung der Bronchoalveolarepten. Das Plattenepithelkarzinom zeichnet sich histomorphologisch durch Verhornung oder die Ausbildung von

Interzellulärbrücken aus. Das großzellige Karzinom stellt aufgrund seiner schlechten Differenzierung eine Ausschlussdiagnose dar. Das kleinzellige Karzinom ist eine andere Variante eines schlecht differenzierten Lungenkarzinoms. Die Tumorzellen dürfen hierbei definitionsgemäß nicht größer als drei Lymphozyten sein. Es weist eine kurze Tumorverdopplungszeit von 10 bis 50 Tagen und die schlechteste Prognose auf (Herold 2017). Deswegen muss es auch anders therapiert werden als die nichtkleinzelligen Karzinome. Neben der klassischen Histologie hat zudem die Immunhistochemie in der Differenzialdiagnostik des Lungenkarzinoms ihren festen Platz. Mit ihrer Hilfe kann nicht nur zwischen lungeneigenem Tumor und Metastase anderen Ursprungs unterschieden werden, sondern sie erlaubt auch den Nachweis spezifischer neuroendokriner Antigene auf der Tumorzelloberfläche. Ein weiteres vielversprechendes Forschungsgebiet sind Onkogene, da sie der Angriffspunkt für sogenannte *targeted therapies* sind. Von besonderer Bedeutung ist hier beispielsweise der Nachweis einer aktivierenden Punktmutation im EGFR-Gen (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor), da dies die Voraussetzung ist für eine Therapie mit einem EGFR-Inhibitor. Weitere Onkogene, deren Aberration mittlerweile therapeutische Konsequenzen hat, sind K-RAS und EML4-ALK. (Petersen 2011)

1.2.4 TNM-Klassifikation des Lungenkarzinoms und Prognose

Die Prognose des Lungenkarzinoms ist stark abhängig vom initialen Stadium der Erkrankung und von der Histologie. So liegt bei NSCLC das 5-Jahresüberleben bei 11 bis 15 %, während bei SCLC lediglich 5-Jahresüberlebensraten (5-JÜR) von weniger als 10 % im Stadium Limited Disease und 1 % im Stadium Extensiv Disease erreicht werden (Hien 2012). Die TNM-Klassifikation (siehe Tabelle 6) und das daraus abgeleitete UICC-Stadium (siehe Tabelle 7) müssen erhoben werden, um eine stadiengerechte Therapie durchzuführen. Bei SCLC ist außerdem die in Tabelle 8 dargestellte Einteilung in *very limited*, *limited* und *extensiv disease* üblich, da nur im Stadium *very limited disease* eine operative Therapie durchgeführt werden kann. (Hien 2012)

Tabelle 6 TNM-Klassifikation (UICC 2017) des Lungenkarzinoms

| Kategorie | Stadium | Kurzbeschreibung |
|-----------|---|---|
| T (Tumor) | Tis | <ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma in situ |
| | T1 | <ul style="list-style-type: none"> • größter Durchmesser < 3cm, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, Hauptbronchus nicht beteiligt |
| | T1a(mi) | <ul style="list-style-type: none"> • Minimal invasives Adenokarzinom |
| | T1a | <ul style="list-style-type: none"> • größter Durchmesser < oder = 1cm |
| | T1b | <ul style="list-style-type: none"> • größter Durchmesser > 1 oder < oder = 2 cm |
| | T1c | <ul style="list-style-type: none"> • größter Durchmesser > 2 oder < oder = 3 cm |
| | T2 | <ul style="list-style-type: none"> • größter Durchmesser > 3 aber < oder = 5 cm oder • Infiltration des Hauptbronchus unabhängig vom Abstand von der Carina aber ohne direkte Invasion der Carina • Infiltration der viszeralen Pleura oder • tumorbedingte partielle Atelektase oder obstruktive Pneumonie die bis in den Hilus reichen, Teile der Lunge oder die gesamte Lunge umfassen |
| | T2a | <ul style="list-style-type: none"> • größter Durchmesser > 3 < oder = 4 cm |
| | T2b | <ul style="list-style-type: none"> • größter Durchmesser > 4 < oder = 5 cm |
| | T3 | <ul style="list-style-type: none"> • größter Durchmesser > 5 aber < oder = 7 cm • Infiltration von Thoraxwand (inklusive parietale Pleura und Superior Sulcus), N. phrenicus, oder parietales Perikard • zusätzlicher Tumorknoten im selben Lungenlappen wie der Primärtumor |
| T4 | <ul style="list-style-type: none"> • größter Durchmesser > 7cm oder mit direkter Infiltration von Diaphragma, Mediastinum, Herz, großen Gefäßen, Trachea, N. laryngeus recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper oder Karina • zusätzlicher Tumorknoten in einem anderen ipsilateralen Lungenlappen | |

| | | |
|-----------------|-----|--|
| N (Lymphknoten) | N0 | <ul style="list-style-type: none"> keine Lymphknotenmetastasen |
| | N1 | <ul style="list-style-type: none"> Metastase in ipsilateralen, peribronchialen und / oder ipsilateralen hilären Lymphknoten und / oder intrapulmonalen Lymphknoten oder direkte Invasion dieser Lymphknoten |
| | N2 | <ul style="list-style-type: none"> Metastase in ipsilateralen mediastinalen und / oder subkari-nalen Lymphknoten |
| | N3 | <ul style="list-style-type: none"> Metastase in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen hilären, ipsi- oder kontralateral tief zervikalen, supraklavikulären Lymphknoten |
| M (Meta-stase) | M0 | <ul style="list-style-type: none"> keine Fernmetastasen |
| | M1 | <ul style="list-style-type: none"> Fernmetastasen |
| | M1a | <ul style="list-style-type: none"> separater Tumorknoten in einem kontralateralen Lungenlap-pen Pleura mit knotigem Befall maligner Pleuraerguss maligner Perikarderguss |
| | M1b | <ul style="list-style-type: none"> isolierte Fernmetastase in einem extrathorakalen Organ |
| | M1c | <ul style="list-style-type: none"> mehrere Fernmetastasen (>1) in einem oder mehreren Orga-nen |

Tabelle 7 UICC-Stadien des Lungenkarzinoms

| Stadium | Primärtumor | Lymphknoten | Fernmetastasen |
|---------|-------------|-------------|----------------|
| 0 | Tis | N0 | M0 |
| IA1 | T1a(mi) | N0 | M0 |
| | T1a | N0 | M0 |
| IA2 | T1b | N0 | M0 |
| IA3 | T1c | N0 | M0 |
| IB | T2a | N0 | M0 |
| IIA | T2b | N0 | M0 |
| IIB | T1a-c | N1 | M0 |
| | T2a | N1 | M0 |
| | T2b | N1 | M0 |
| | T3 | N0 | M0 |
| IIIA | T1a-c | N2 | M0 |
| | T2a-b | N2 | M0 |
| | T3 | N1 | M0 |
| | T4 | N0 | M0 |
| | T4 | N1 | M0 |
| IIIB | T1a-b | N3 | M0 |
| | T2 a-b | N3 | M0 |
| | T3 | N2 | M0 |
| | T4 | N2 | M0 |
| IIIC | T3 | N3 | M0 |
| | T4 | N3 | M0 |
| IVA | jedes T | jedes N | M1a |
| | jedes T | jedes N | M1b |
| IVB | jedes T | jedes N | M1c |

Tabelle 8 Stadieneinteilung des SCLC

| | |
|----------------------|--|
| very limited disease | T1 oder T2, N0 |
| limited disease | Befall eines Hemithorax mit oder ohne: <ul style="list-style-type: none"> - ipsilaterale hiläre Lymphknotenmetastasen - ipsi- oder kontralaterale mediastinale Lymphknotenmetastasen - Skalenus- oder supraklavikuläre Lymphknotenmetastasen - malignem Pleuraerguss |
| extensive disease | Bei Vorliegen von Fernmetastasen |

1.2.5 Zytostatische und chirurgische Therapie des Lungenkarzinoms

Die Therapie des Lungenkarzinoms orientiert sich an der TNM-Klassifikation und ist sehr komplex, weswegen hier nur ein Überblick gegeben werden kann. Nach den S3-Leitlinien (2018) wird das kleinzellige Lungenkarzinom primär einer Radio-/ Chemotherapie zugeführt. Dies erscheint geboten, da die Erkrankung zum Diagnosezeitpunkt in aller Regel bereits disseminiert ist. Die chirurgische Therapie spielt beim SCLC eine untergeordnete Rolle und kann nur im Stadium *very limited disease* erwogen werden. Eine neoadjuvante Radio-/ Chemotherapie kann dann präoperativ eingesetzt werden, um den Tumor zu verkleinern. Außerdem sollte eine adjuvante Chemotherapie in Betracht gezogen werden.

Im Stadium *limited disease* wird eine Chemotherapie in Kombination mit einer Bestrahlung des Mediastinums, sowie einer prophylaktischen Schädelbestrahlung angewandt. Im Stadium *extensive disease* ist der Therapieansatz palliativ und unimodal, das heißt eine Bestrahlung kommt nur noch bei nachgewiesenen Hirn- oder Skelettmetastasen oder oberer Einflusstauung in Betracht. Nach der aktuellen S3-Leitlinie wird eine platinbasierte Chemotherapie empfohlen, das heißt Carboplatin oder Cisplatin in Kombination mit Etoposid. Vor allem bei der Anwendung von Cisplatin ist das emetogene Potential der Chemotherapie nicht zu unterschätzen, weswegen eine begleitende antiemetische Therapie beispielsweise mit Dexamethason oder auch Aprepitant durchgeführt werden muss (Hien 2012; Goeckenjan et al. 2010).

Beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom wird primär eine chirurgische Therapie angestrebt. Bedauerlicherweise kommen hierfür aber nur noch circa 1/3 der Patienten bei Aufnahme in die Klinik in Frage. Nichts desto trotz kann bis zum Stadium T3 ohne kontralateralen Lymphknotenbefall (UICC IIIA) eine Operation durchgeführt werden, gegeben Falls mit neo- oder adjuvanter Chemotherapie und Radiatio. Allerdings tritt das Kriterium der funktionellen Operabilität einschränkend hinzu, i.e. ob der Patient über genügend respiratorische Reserven verfügt, um einen Verlust von Lungenparenchym zu kompensieren. So darf eine Pneumektomie nur durchgeführt werden, wenn die $FEV_1 > 2,0$ l (80 % Soll) und die Diffusionskapazität (DLCO) > 60 % des Solls beträgt. Für die Lobektomie liegen die Grenzwerte bei $FEV_1 > 1,5$ l und DLCO > 60 % des Solls. Der Erfolg der Operation wird in den R-Stadien ausgedrückt. Angestrebt wird immer R0, das heißt die Absetzungsrän­der sind tumorfrei.

Ab dem Stadium IIIB kommt nur noch eine Radiochemotherapie in Betracht. Komorbiditäten und Allgemeinzustand des Patienten müssen bei der Indikationsstellung unbedingt beachtet werden. Wenn der Allgemeinzustand des Patienten es erlaubt, wird eine simultane Radiochemotherapie durchgeführt. Die Bestrahlung wird durchgeführt mit einer Gesamtdosis von 60 bis 66 Gy fraktioniert über 4 bis 6 Wochen. Chemotherapeutisch werden 4 bis 6 Zyklen einer platinbasierten Kombination verabreicht (Goekenjan et al. 2010). Geprüfte Kombinationspartner sind Etoposid oder Vincaalkaloid. Eine Therapie mit Tyrosinkinasehemmern, wie Erlotinib oder Gefitinib ist angezeigt, wenn eine Mutation des EGFR-Gens nachgewiesen werden kann. Dies gelingt wenn dann in aller Regel bei Adenokarzinomen. Crizotinib ist ein jüngerer Tyrosinkinasehemmer welcher bei EML4-ALK-Translokation wirksam ist (Petersen 2011). Von zunehmender Bedeutung ist außerdem mittlerweile die PD-L1-Expression des Tumorgewebes, welche den Einsatz sogenannter Checkpoint-Inhibitoren wie beispielsweise Pembrolizumab erlaubt. Bei therapie­naiven Patienten im Stadium IV ohne Nachweis von Treibermutationen und einer PD-L1-Expression von ≥ 50 % sollte Pembrolizumab als Erstlinientherapie angeboten werden. (S3-Leitlinie 2018)

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl in der chirurgischen als auch in der zytostatischen Therapie des Lungenkarzinoms beachtliche Fortschritte erzielt wurden. Vor allem die Entwicklung der *targeted therapy* lässt erahnen, dass Tumoren in Zukunft vielleicht weniger anhand ihres histologischen Ursprungs eingeteilt und therapiert werden, als vielmehr auf Grund der Expression molekularer Antigene. Lungenkrebs bleibt aber leider nach wie vor

die häufigste Krebstodesursache bei Männern und die zweithäufigste bei Frauen (Quelle: Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg).

2 Ziele und Fragestellung der Studie

Thrombembolien bei Patienten mit Lungenkarzinom stellen keine zufällige Komplikation dar, sondern eine Hauptursache für Morbidität und Mortalität in diesem Patientenkollektiv. Zweck der Studie ist es deswegen, zu prüfen, ob die Thrombingenerierung, gemessen mittels Technothrombin® TGA, geeignet ist, die Hyperkoagulabilität bei Patienten mit Lungenkarzinom abzubilden. Es gibt Grund zur Annahme, dass dies der Fall ist, denn jüngere Forschung konnte zeigen, dass Tumoren das hämostaseologische Gleichgewicht im Organismus in Richtung Koagulation verschieben, indem sie *tissue factor* exprimieren und prokoagulatorische Phospholipide sezernieren (Falanga et al. 2015). Folgende Fragen wurden daraus abgeleitet:

- Zeigt die Thrombingenerierung im Patientenblut einen signifikanten Unterschied verglichen mit derjenigen von gesunden Probanden?
- Zeigt die Thrombingenerierung, dass Tumorpatienten außer den Thrombozyten eine zusätzliche Phospholipidquelle haben, nämlich den Tumor?
- Unterscheidet sich die Thrombingenerierung innerhalb des Patientenkollektivs signifikant zwischen jenen, welche an einem lokal fortgeschrittenen Lungenkarzinom erkrankt sind im Vergleich zu jenen, bei welchen ein frühes Stadium der Erkrankung vorliegt?
- Unterscheidet sich die Thrombingenerierung innerhalb des Patientenkollektivs signifikant zwischen jenen, die an einem metastasierten Tumor erkrankt sind und jenen, bei denen ein lokal begrenztes Stadium vorliegt?
- Unterscheidet sich die Thrombingenerierung innerhalb des Patientenkollektivs signifikant zwischen jenen, die an einem kleinzelligen Lungenkarzinom erkrankt sind und jenen, die an einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom erkrankt sind?

- Unterscheidet sich die Thrombingerierung innerhalb des Patientenkollektivs signifikant zwischen jenen, die im Verlauf eine thrombembolische Komplikation erleiden und jenen, bei denen dies nicht der Fall ist?

Dabei sollten folgende Arbeitshypothesen geprüft werden:

1. Patienten mit Lungenkarzinom zeigen eine signifikant stärkere Thrombingerierung als gesunde Probanden.
2. Der Quotient PRP/PPP ist in der Tumorgruppe signifikant höher hinsichtlich der Parameter *peak thrombin* und *velocity index* und signifikant niedriger hinsichtlich der Parameter *lag time* und *time to peak*.
3. Patienten, bei welchen ein M1-Stadium vorliegt, zeigen eine signifikant höhere Thrombingerierung als solche, bei denen ein M0-Stadium vorliegt.
4. Patienten, welche an einem T3 oder T4-Tumor erkrankt sind zeigen eine signifikant höhere Thrombingerierung als Patienten mit einem T1 oder T2-Tumor.
5. Patienten, welche an einem SCLC erkrankt sind, weisen eine signifikant höhere Thrombingerierung auf, als solche, welche an einem NSCLC erkrankt sind.
6. Die Messung der Thrombingerierung eignet sich, um zwischen jene Patienten mit besonders hohem thrombembolischen Risiko und jenen mit geringerem Risiko zu unterscheiden.

3 Erhebung der Daten

3.1 Patientenkollektiv

In der Abteilung für Pneumologie am Universitätsklinikum Leipzig wurden von September 2014 bis Juni 2016 100 Patienten mit der Erstdiagnose Lungenkarzinom in die Studie eingeschlossen. Die Blutentnahme erfolgte vor Beginn der Chemotherapie, beziehungsweise vor der Operation. Es wurden folgende Ein- und Ausschlusskriterien definiert:

Einschlusskriterien:

- Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung
- erstdiagnostiziertes Lungenkarzinom.

Ausschlusskriterien:

- Ablehnung der Teilnahme an der Studie
- behandeltes Zweitkarzinom zum Entnahmezeitpunkt
- therapeutische Antikoagulation
- zytostatische Therapie im Entnahmezeitraum
- Schwangerschaft
- Alter < 18 Jahren

3.2 Vergleichskollektiv

Das Vergleichskollektiv wurde aus gesunden Blutspendern am Universitätsklinikum Leipzig rekrutiert. Für die vorliegende Arbeit wurde, was das Vergleichskollektiv betrifft, ein bereits existierender Datensatz verwendet.

4 Methode und Materialien

4.1 Thrombingenerierungsassay

Zur Bestimmung der Thrombingenerierung im Zeitablauf im plättchenarmen (PPP) und plättchenreichen Plasma (PRP) wurde der kommerziell erhältliche Reagenziensatz TECHNOTHROMBIN® TGA verwendet. Um die Reaktion zu starten, wird die Gerinnung durch Phospholipidmicellen, die *tissue factor* und CaCl_2 enthalten, aktiviert. Der Test wird zur

Bestimmung von Gerinnungsstörungen, wie Blutungsneigungen und Thrombophilien verwendet. Es wird der gesamte Zeitablauf der Thrombingenerierung während Initiation, Amplifikation und Inhibierung der Thrombinbildung verfolgt.

4.1.1 Präanalytik

Von jedem Patienten wurden nach erfolgter Aufklärung und Einwilligung durch Punktion einer peripheren Vene zwei Monovetten Citrat-Blut gewonnen (Firma Sarstedt, 1,8 ml mit 3,2% Citrat (1:10)). Aufgrund der Notwendigkeit, plättchenreiches Plasma (PRP) sofort zu verarbeiten, wurden die Proben innerhalb einer Stunde ins Labor gebracht und aufgearbeitet.

4.1.2 Testprinzip und Materialien

Die Spaltung eines fluorogenen Substrats durch Thrombin und infolgedessen eine Änderung der Fluoreszenz bilden die Grundlage des Thrombingenerierungsassay. Durch die Zugabe von negativ geladenen Phospholipiden und *tissue factor* wird die Gerinnung aktiviert. Mittels der entsprechenden Thrombinkalibrationskurve kann durch die Detektion der Änderung der Fluoreszenz über der Zeit die Thrombinkonzentration (nM) der Probe berechnet werden. Die Änderung der Thrombinkonzentration im Zeitablauf entspricht der Thrombingenerierung.

Folgende Reagenzien wurden für den TECHNOTHROMBIN® TGA Kit verwendet:

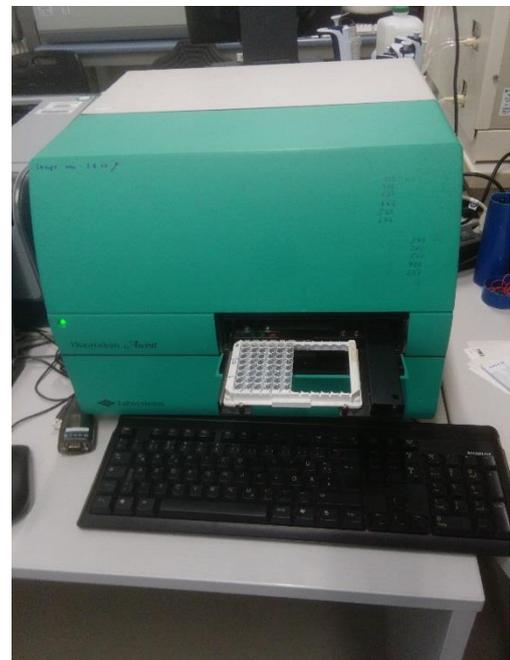


Abbildung 4 Fluoroskan Ascent Fluorometer (Thermolab Systems, Helsinki, Finland)

Tabelle 9 Zusammensetzung des TECHNOTHROMBIN® TGA Kit

| mL | Reagenz | Beschreibung |
|-----------|-------------------------|---|
| 3 x 1,5 | TGA Substrat | fluorogenes Substrat 1 mM Z-G-G-R-AMC, 15 mM CaCl ₂ |
| 1 x 3 | TGA Puffer | Hepes-NaCl-Puffer mit 1 % BSA |
| 1 x 0,5 | TGA Thrombinkalibrator | 1000 nM Thrombin in Puffer in BSA |
| 1 x 0,5 | TGA Reagenz C (RC) low | niedrig konzentrierte Phospholipidmicellen mit 50 pM TF in Tris-Hepes-NaCl Puffer |
| 1 x 0,5 | TGA Reagenz C (RC) high | hoch konzentrierte Phospholipidmicellen mit 50 pM TF in Tris-Hepes-NaCl Puffer |
| 1 x 1 | TGA Kontrolle 1 | humanes Normalplasma, lyophilisiert |
| 1 x 1 | TGA Kontrolle 2 | humanes Plasma mit erhöhter Thrombingenerierung, lyophilisiert |
| 1 x 1 | TGA Kontrolle 3 | humanes Plasma mit verminderter Thrombingenerierung, lyophilisiert |

Benötigte Materialien:

- Pipetten
- destilliertes Wasser
- NUNC Mikrotiterplatte Maxisorb REF 475515 für die Fluoreszenzmessung
- Fluorometer (Fluorskan Ascent, Thermolab Systems, Helsinki, Finland), Fluoreszenzreader (96-Näpfe), 360 nm/ 460 nm Extinktion/ Emission mit geeigneter Software zur Berechnung der Fluoreszenzänderung

4.1.3 Durchführung

Für den TECHNOTHROMBIN® TGA Test wurde plättchenreiches und plättchenarmes Plasma verwendet, jeweils mit RC high (RCH) und RC low (RCL).

Plasmapräparation:

- Für plättchenreiches Plasma (PRP) wurde 10 min lang bei 170 x g zentrifugiert und das so gewonnene PRP vorsichtig abpipettiert.
- Für plättchenarmes Plasma (PPP) wurde das PRP für weitere 20 min bei 1800 x g zentrifugiert und das so gewonnene PPP vorsichtig abpipettiert.

Die lyophilisierten Reagenzien wurden in destiliiertem Wasser gelöst und sorgfältig gemischt (Vortex, REAX 2000, Heidolph, Schwabach). Nach 20 min Rekonstitutionszeit wurden sie bei Raumtemperatur weiterverarbeitet.

Die Proben wurden über 120 min mit 1 min Messintervallen im Fluorometer gemessen. Die Thrombinkalibrationskurve wurde separat von der Probenmessung erstellt. Tabelle 10 zeigt die Verdünnungsreihe aus Thrombinkalibrator und Puffer, welche nach dem in Tabelle 11 dargestellten Schema mit TGA-Substrat in die Mikrotiterplatte gegeben und im Fluorometer gemessen wurde. Tabelle 12 zeigt das Pipettierschema zur Bestimmung der Probe.

Tabelle 10 Verdünnungsreihe des Thrombinkalibrators

| | |
|-----------------------|---|
| 1. Verdünnung (1:2) | 200 µL Thrombinkalibrator + 200 µL TGA-Puffer |
| 2. Verdünnung (1:4) | 100 µL 1. Verdünnung + 100 µL TGA-Puffer |
| 3. Verdünnung (1:20) | 20 µL Thrombinkalibrator + 380 µL TGA-Puffer |
| 4. Verdünnung (1:200) | 20 µL 3. Verdünnung + 180 µL TGA-Puffer |

Tabelle 11 Pipettierschema für die Thrombinkalibrationskurve

| | |
|--|------------------------------|
| 40 µL | Kalibratorverdünnung (1.-4.) |
| 50 µL | TGA Substrat |
| Messung über 10 min bei 37°C in 30 s Messintervallen | |

Tabelle 12 Pipettierschema für die Probenmessung

| | Messung mit: | |
|--|--------------|-------------|
| Reagenz | TGA RC low | TGA RC high |
| Probe | 40 µL | 40 µL |
| TGA RC low | 10 µL | - |
| TGA RC high | - | 10 µL |
| TGA Substrat | 50 µL | 50 µL |
| Messung über 120 min bei 37°C in 1 min Messintervallen | | |

Aus dem in Tabelle 12 dargestellten Pipettierschema ergibt sich, dass die Endkonzentration von *tissue factor* in der Küvette 5 pM beträgt. Die Auswertung der Messung erfolgte mittels der vom Hersteller zur Verfügung gestellten Software. Diese ermittelt für verschiedene Thrombinkonzentrationen sogenannte RFU (*relative fluorescent units*). Durch den Abgleich der Fluoreszenz in der Probe mit der so erstellten Thrombinkalibrationskurve wird die Thrombinkonzentration (nM) zum gegebenen Zeitpunkt berechnet. Die so erfassten Parameter des Thrombogramms – *lag time*, *time to peak*, *velocity index*, *peak thrombin* und *AUC* - sind in Abbildung 3 dargestellt.

4.2 Zweck der PRP/PPP-Ratio

Der Quotient PRP/PPP wurde für jeden Parameter der Thrombingenerierungskurve berechnet. Das bedeutet am Beispiel *lag time*:

$$\text{lag time Quotient} = \text{PRP high lag time} / \text{PPP high lag time}$$

Zweck dieser Operation ist es, den Beitrag der Thrombozyten am Koagulationsprozess zu nivellieren, um den Beitrag der Tumorzellen zu demaskieren. Unter der Annahme, dass das Lungenkarzinom das hämostaseologische Gleichgewicht in Richtung Koagulation verschiebt, wird

eine erhöhte PRP/PPP-Ratio in der Tumorgruppe als der Beitrag des Tumorleidens zum Koagulationsprozess betrachtet.

4.3 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics 25. Zur Prüfung auf Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk-Test angewandt. Da keine Normalverteilung vorlag, wurde eine logarithmische Transformation auf Basis des dekadischen Logarithmus durchgeführt. Mittelwertgleichheit wurde mit dem T-Test für ungepaarte Stichproben mit vorherigem Levene-Test geprüft. Das Signifikanzniveau α wurde auf 0,05 festgelegt. Beim Vergleich der beiden Studiengruppen wurden p-Werte unadjustiert und adjustiert für Alter und Geschlecht berechnet. Um zu prüfen, ob eine Mittelwertdifferenz zwischen den Studiengruppen auf das Vorliegen oder Nichtvorliegen eines Tumors zurückzuführen ist, wurde eine multivariate Regressionsanalyse mit Berücksichtigung der Variablen Alter [A], Geschlecht [S] und (Studien-)Gruppe [G] durchgeführt. Allerdings ist zu beachten, dass die Ergebnisse der multivariaten Regressionsanalyse nicht gewertet werden, wenn der ANOVA-Signifikanztest nicht signifikant ist. Das standardisierte Beta beschreibt den Einfluss einer erklärenden Variablen (hier: Alter, Geschlecht, Gruppe) auf die abhängige Variable (hier beispielsweise *PRP high lag time*). Durch die Standardisierung werden Unterschiede in der Metrik nivelliert, sodass man Variablen unterschiedlicher Skalierung (Alter in Jahren) und unterschiedlicher Messniveaus (Alter = metrisch; Geschlecht = binär) miteinander ins Verhältnis setzen kann - je größer das standardisierte Beta, desto größer die Assoziation.

Um zu testen, ob die Thrombingenerierung geeignet ist, Patienten mit hohem thromboembolischen Risiko zu identifizieren wurde eine Verlaufsbeobachtung durchgeführt. Patienten, welche innerhalb eines Jahres nach Diagnosestellung eine Thrombembolie entwickelten, wurden jenen ohne Thrombembolie gegenübergestellt. Die diskriminative Fähigkeit der Thrombingenerierung wurde mittels ROC-Kurve analysiert. Es wurde die Fläche unter der ROC-Kurve (= AUC, „area under the curve“) und ihr 95% Konfidenzintervall berechnet. Die AUC der ROC-Kurve kann Werte zwischen 0,5 und 1 annehmen. Je mehr sich die AUC 1 annähert, desto besser eignet sich der untersuchte Parameter – im vorliegenden Fall die Thrombingenerierung – um zwischen krank und gesund zu unterscheiden. Die ROC-AUC gibt also die Wahrscheinlichkeit an, mit welcher bei einem zufällig ausgewählten Wertepaar (krank/ gesund i.e.

Embolie/ keine Embolie) dieser Zustand anhand des gewählten Parameters (beispielsweise PRP high peak thrombin) korrekt vorhergesagt wird.

5 Ergebnisse

5.1 Beschreibung der Studiengruppen

Die Patientengruppe besteht aus 100 Patienten, davon sind 72 männlichen (72 %) und 28 weiblichen Geschlechts. Weitere statistische Kennzahlen hinsichtlich der Alters- und Geschlechtszusammensetzung sind in Tabelle 13 aufgeführt und den Werten der Kontrollgruppe gegenübergestellt.

Tabelle 13 Statistische Kennzahlen der Tumor- und der Kontrollgruppe; Alter in Jahren

| | Tumor (n = 100) | Kontrolle (n = 68) |
|---------------------|------------------------|---------------------------|
| Alter: | | |
| Median | 66,6 | 44,0 |
| Interquartilbereich | 15,9 | 14,0 |
| Geschlecht: | | |
| Männlich | 72 | 31 (45,59 %) |
| Weiblich | 28 | 37 (54,42 %) |

5.2 Karzinomgruppe vs. Kontrollgruppe

5.2.1 PRP und PPP

Im Folgenden sind vier Tabellen dargestellt. Sie zeigen den Median (mit Interquartilbereich) sowie die Resultate für den Mittelwertvergleich mittels T-Test für ungepaarte Stichproben. Eine Tabelle fasst jeweils eine Messreihe zusammen.

Es zeigt sich, dass sich die Thrombingenerierung zwischen den Studiengruppen vor allem hinsichtlich der Geschwindigkeit der Thrombinbildung unterscheidet. Dieser Unterschied bleibt auch nach Adjustierung für Alter und Geschlecht weitestgehend bestehen. In der multivariaten Regressionsanalyse zeigt sich in den Messreihen PRP high und PPP high ebenfalls eine signifikante Assoziation der Parameter lag time und time to peak mit der Gruppenzugehörigkeit

(Tumor vs. Kontrolle). Die Merkmale Alter und Geschlecht haben keine signifikante Assoziation mit den untersuchten Parametern.

Anschließend sind die mit SPSS erstellten Boxplots für alle 4 Messreihen jeweils vergleichend für beide Studiengruppen dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 14 Plättchenreiches Plasma mit Reagenz C high: T-Test und multivariate Regression (A = Alter, S = Geschlecht, G = Studiengruppe)

| | T-TEST AUF MITTELWERTGLEICHHEIT | | | | MULTIVARIATE REGRESSIONSANALYSE | | | | | | |
|---|---------------------------------|------------------|-----------------------|--|---------------------------------|-------|-------|--------|-------|---------|--|
| | Tumor | Kontrolle | p-Wert (unadjustiert) | p-Wert (adjustiert für Alter und Geschlecht) | Standardisiertes Beta | | | p-Wert | | | |
| | | | | | A | S | G | A | S | G | |
| N | 100 | 68 | | | | | | | | | |
| PRP high | | | | | | | | | | | |
| lag time (min) ANOVA < 0,001 | 12,0 (5,3) | 15,0 (3,0) | < 0,001 | 0,001 | 0,026 | 0,123 | 0,516 | 0,791 | 0,077 | < 0,001 | |
| peak thrombin (nM) ANOVA 0,309878 | 459,6 (292,1) | 416,0 (128,0) | 0,05 | 0,58 | 0,07 | 0,009 | 0,089 | 0,544 | 0,911 | 0,447 | |
| time to peak (min) ANOVA < 0,001 | 14,3 (4,3) | 18,0 (4,0) | < 0,001 | 0,003 | 0,037 | 0,105 | 0,47 | 0,716 | 0,139 | < 0,001 | |
| velocity index (nM/min) ANOVA 0,977712 | 202,5 (181,2) | 147,0 (103,0) | 0,744 | 0,94 | 0,006 | 0,026 | 0,013 | 0,961 | 0,744 | 0,916 | |

Tabelle 15 Plättchenreiches Plasma mit Reagenz C low: T-Test und multivariate Regression (A = Alter, S = Geschlecht, G = Studiengruppe)

| | T-TEST AUF MITTELWERTGLEICHHEIT | | | | MULTIVARIATE REGRESSIONSANALYSE | | | | | | |
|---|---------------------------------|------------------|-----------------------|--|---------------------------------|-------|-------|--------|-------|-------|--|
| | Tumor | Kontrolle | p-Wert (unadjustiert) | p-Wert (adjustiert für Alter und Geschlecht) | Standardisiertes Beta | | | p-Wert | | | |
| | | | | | A | S | G | A | S | G | |
| N | 100 | 68 | | | | | | | | | |
| PRP low | | | | | | | | | | | |
| lag time (min) ANOVA 0,050341 | 13,3 (3,7) | 13,0 (2,0) | 0,089 | 0,933 | 0,12 | 0,17 | 0,014 | 0,29 | 0,032 | 0,907 | |
| peak thrombin (nM) ANOVA 0,491730 | 370,8 (203,7) | 317,0 (103,0) | 0,128 | 0,776 | 0,082 | 0,005 | 0,046 | 0,479 | 0,955 | 0,698 | |
| time to peak (min) ANOVA 0,208765 | 17,7 (4,3) | 17,0 (3,0) | 0,166 | < 0,001 | 0,08 | 0,129 | 0,006 | 0,484 | 0,108 | 0,962 | |
| velocity index (nM/min) ANOVA 0,750939 | 92,7 (72,4) | 71,0 (40,0) | 0,275 | 0,012 | 0,038 | 0,013 | 0,056 | 0,744 | 0,871 | 0,644 | |

Ergebnisse

Tabelle 16 Plättchenarmes Plasma mit Reagenz C high: T-Test und multivariate Regression (A = Alter, S = Geschlecht, G = Studiengruppe)

| | T-TEST AUF MITTELWERTGLEICHHEIT | | | | MULTIVARIATE REGRESSIONSANALYSE | | | | | | |
|---|---------------------------------|------------------|------------------------|--|---------------------------------|-------|-------|--------|-------|---------|--|
| | Tumor | Kontrolle | p-Wert (un-adjustiert) | p-Wert (adjustiert für Alter und Geschlecht) | Standardisiertes Beta | | | p-Wert | | | |
| | | | | | A | S | G | A | S | G | |
| N | 100 | 68 | | | | | | | | | |
| PPP high | | | | | | | | | | | |
| lag time (min) ANOVA < 0,001 | 14,0 (7,3) | 15,0 (4,0) | < 0,001 | 0,01 | 0,063 | 0,116 | 0,389 | 0,547 | 0,117 | < 0,001 | |
| peak thrombin (nM) ANOVA 0,384169 | 389,5 (203,7) | 357,0 (142,0) | 0,206 | 0,936 | 0,123 | 0,054 | 0,013 | 0,284 | 0,499 | 0,912 | |
| time to peak (min) ANOVA 0,000003 | 16,3 (5,3) | 19,0 (5,0) | < 0,001 | 0,032 | 0,06 | 0,125 | 0,365 | 0,576 | 0,094 | 0,001 | |
| velocity index (nM/min) ANOVA 0,889752 | 127,0 (133,8) | 111,0 (86,0) | 0,735 | 0,969 | 0,058 | 0,039 | 0,007 | 0,617 | 0,628 | 0,954 | |

Tabelle 17 Plättchenarmes Plasma mit Reagenz C low: T-Test und multivariate Regression (A = Alter, S = Geschlecht, G = Studiengruppe)

| | T-TEST AUF MITTELWERTGLEICHHEIT | | | | MULTIVARIATE REGRESSIONSANALYSE | | | | | | |
|---|---------------------------------|------------------|------------------------|--|---------------------------------|-------|-------|--------|--------------|--------------|--|
| | Tumor | Kontrolle | p-Wert (un-adjustiert) | p-Wert (adjustiert für Alter und Geschlecht) | Standardisiertes Beta | | | p-Wert | | | |
| | | | | | A | S | G | A | S | G | |
| N | 100 | 68 | | | | | | | | | |
| PPP low | | | | | | | | | | | |
| lag time (min) ANOVA 0,000003 | 16,3 (6,0) | 14,0 (4,0) | < 0,001 | 0,04 | 0,068 | 0,199 | 0,349 | 0,525 | 0,008 | 0,002 | |
| peak thrombin (nM) ANOVA 0,428963 | 247,7 (168,1) | 226,0 (128,0) | 0,831 | 0,595 | 0,163 | 0,063 | 0,088 | 0,161 | 0,432 | 0,458 | |
| time to peak (min) ANOVA 0,000720 | 21,3 (7,3) | 19,0 (5,0) | < 0,001 | 0,198 | 0,026 | 0,151 | 0,221 | 0,817 | 0,051 | 0,052 | |
| velocity index (nM/min) ANOVA 0,911828 | 62,4 (47,2) | 56,0 (37,0) | 0,652 | 0,969 | 0,062 | 0,015 | 0,007 | 0,596 | 0,850 | 0,954 | |

5.2.1.1 Plättchenreiches Plasma mit Reagenz C high (PRP mit RCH)

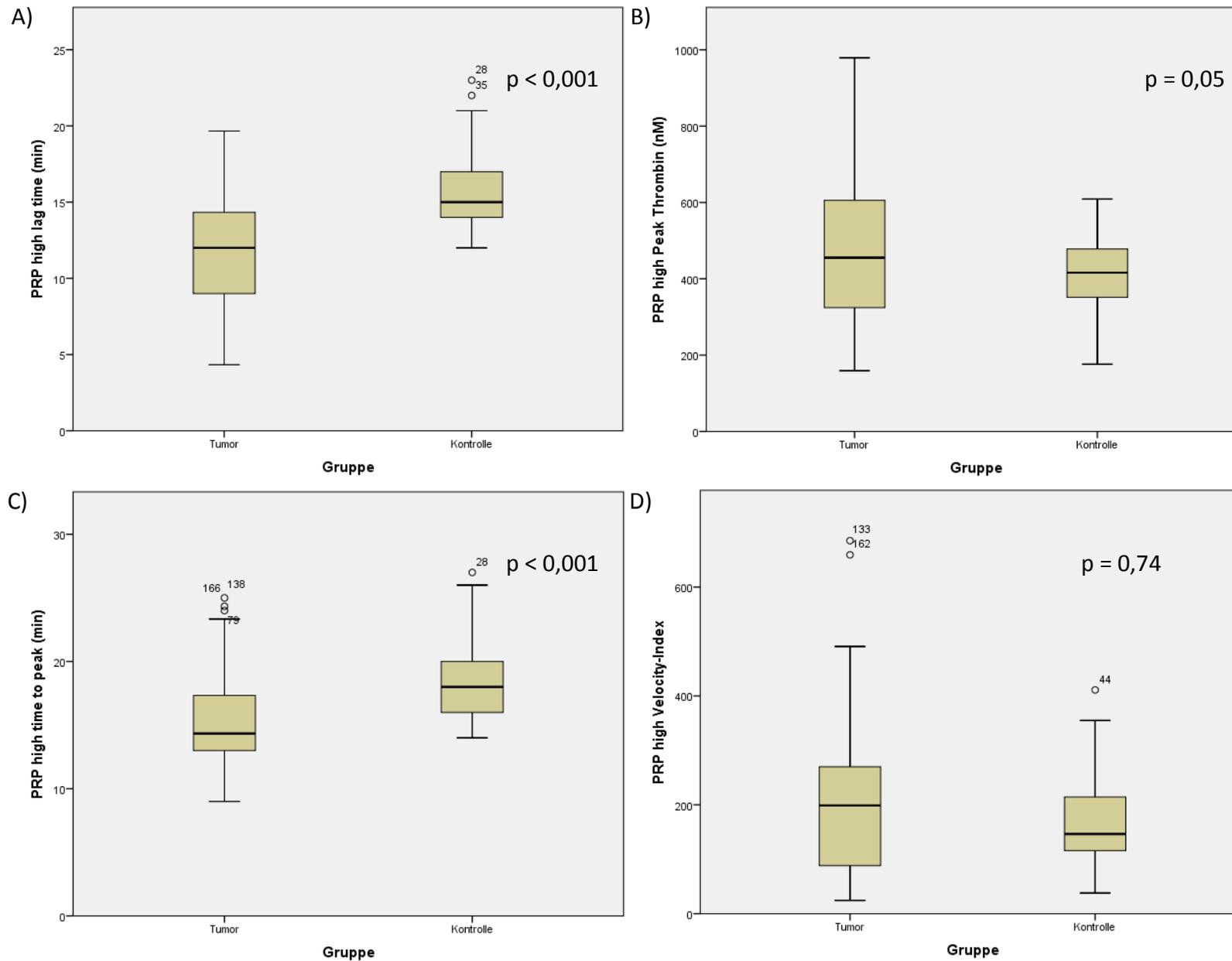


Abbildung 5 PRP RCH Tumor- vs. Kontrollgruppe; A) lag time B) peak thrombin C) time to peak D) velocity index

5.2.1.2 Plättchenreiches Plasma mit Reagenz C low (PRP mit RCL)

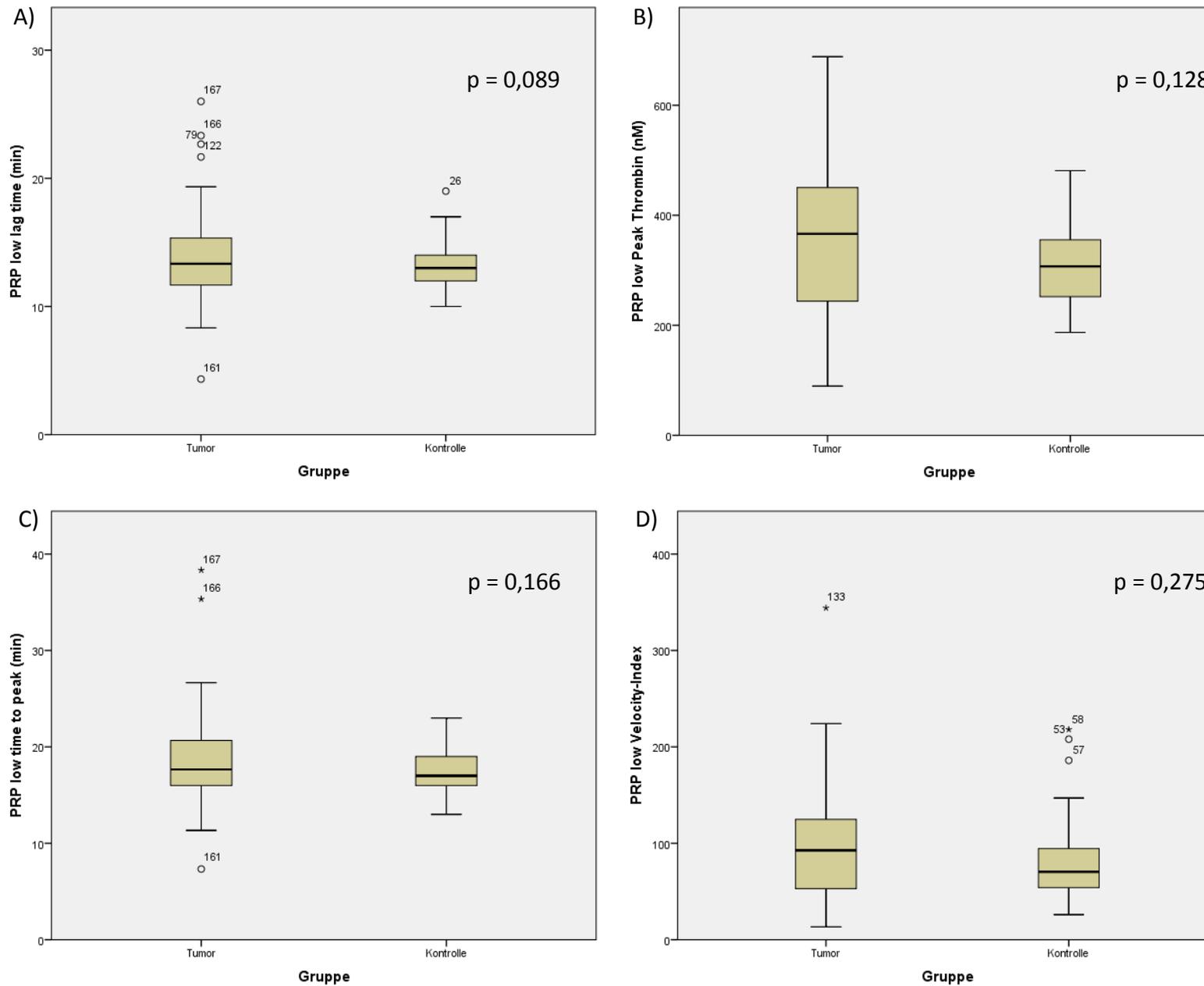


Abbildung 6 PRP RCL Tumor- vs. Kontrollgruppe; A) lag time B) peak thrombin C) time to peak D) velocity index

5.2.1.3 Plättchenarmes Plasma mit Reagenz C high (PPP mit RCH)

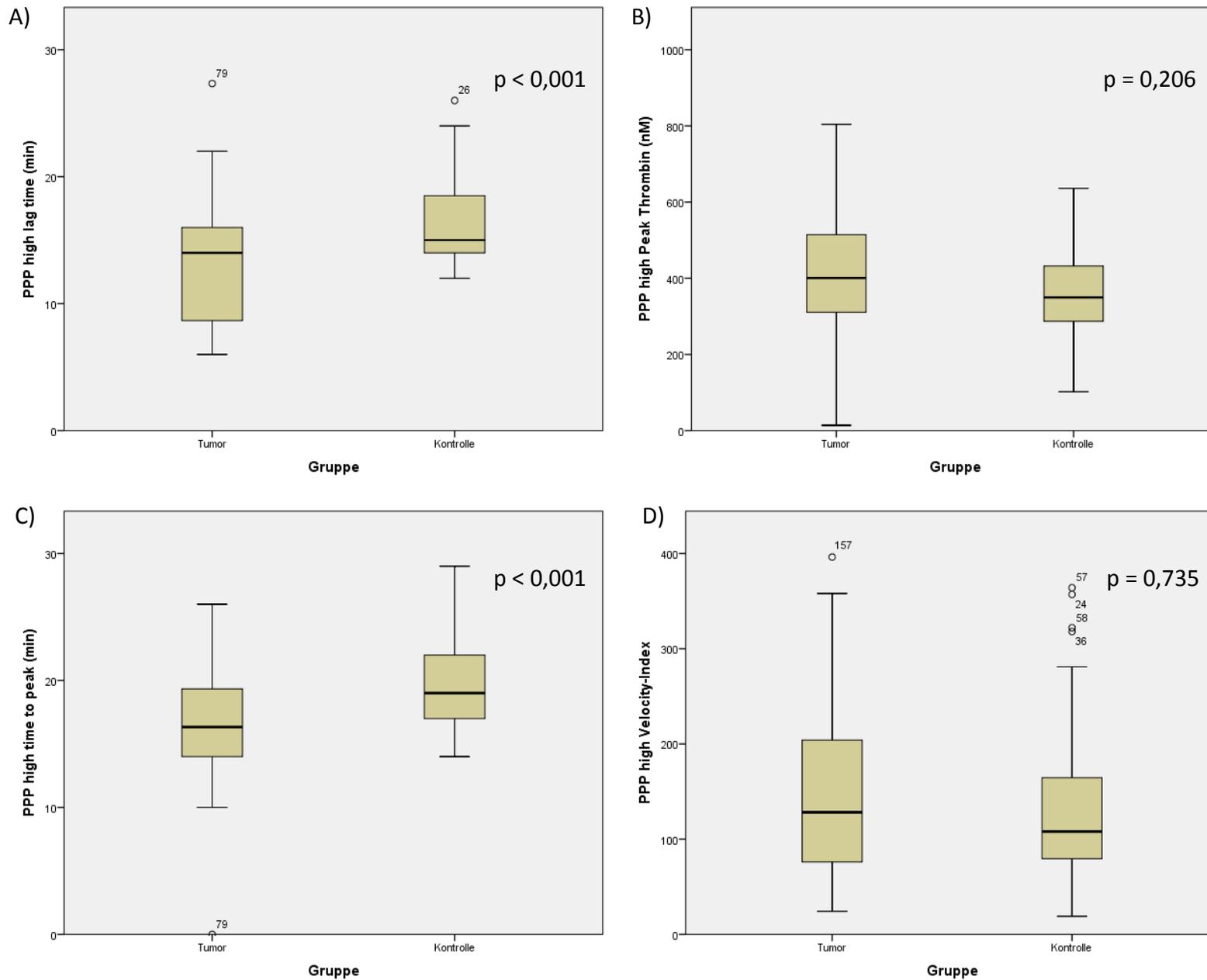
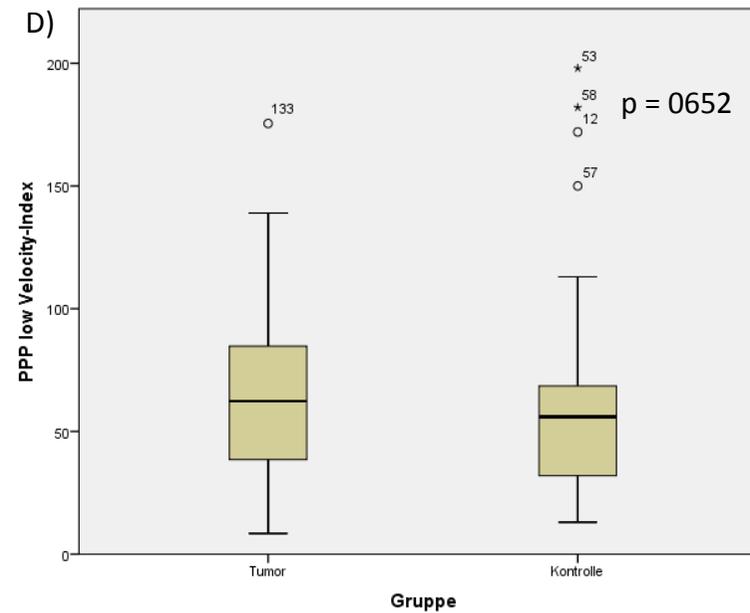
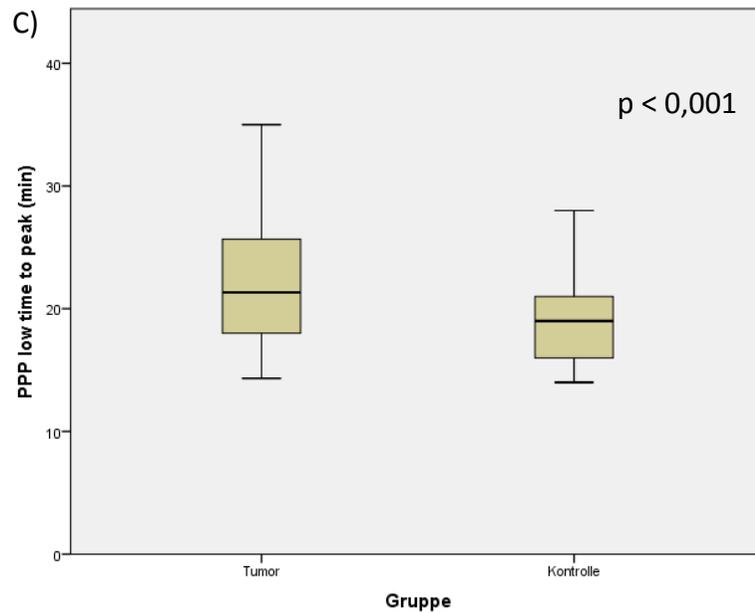
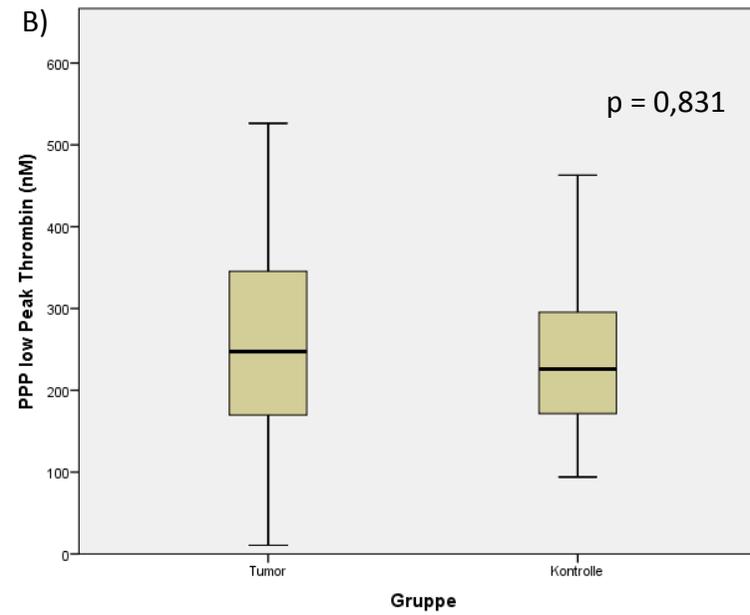
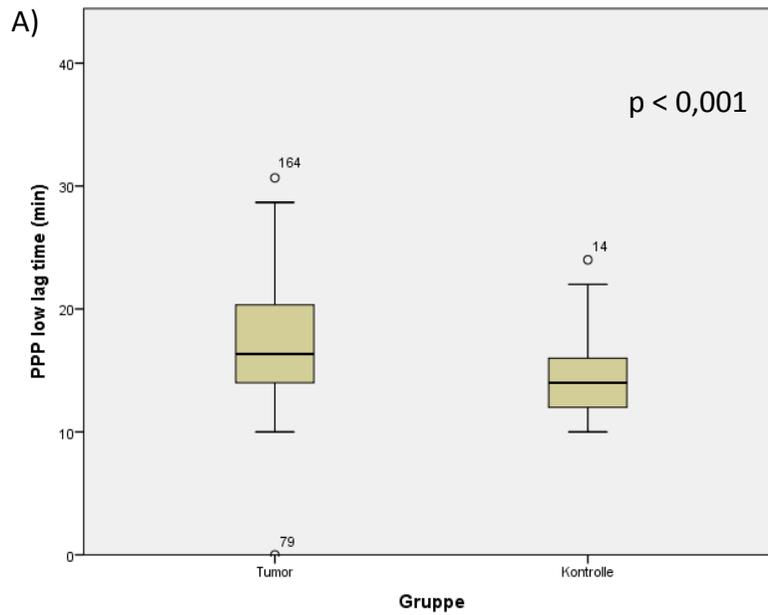


Abbildung 7 PPP RCH Tumor- vs. Kontrollgruppe; A) lag time B) peak thrombin C) time to peak D) velocity index

5.2.1.4 Plättchenarmes Plasma mit Reagenz C low (PPP mit RCL)



5.2.2 PRP/ PPP

Tabelle 18 zeigt den Vergleich Tumor- vs. Kontrollgruppe hinsichtlich der PRP/PPP-Ratio. Für die Parameter *peak thrombin* und *velocity index* zeigen sich in allen Messreihen jeweils höhere Werte in der Tumorgruppe als in der Kontrollgruppe. Diese Differenz ist allerdings nicht signifikant. Was die Reaktionszeiten *lag time* und *time to peak* anbelangt, zeigt sich ein signifikant kleinerer Quotient in der Tumorgruppe und zwar ebenfalls sowohl bei Messung mit hoher als auch geringer Konzentration von Phospholipiden im Testkit (Reagenz C *high* oder *low*)

Tabelle 18 PRP/ PPP-Ratio: Da es sich um einen virtuellen Parameter handelt, wurde keine Logarithmierung durchgeführt; Median (Interquartilbereich)

| | T-TEST AUF MITTELWERTGLEICHHEIT | | |
|---------------------------|---------------------------------|-----------|-------------------|
| | Tumor | Kontrolle | p-Wert |
| N | 100 | 68 | |
| PRP high/ PPP high | | | |
| lag time | 0,9 (0,2) | 1,0 (0,1) | 0,039 |
| peak thrombin | 1,1 (0,2) | 1,1 (0,3) | 0,487 |
| time to peak | 0,9 (0,2) | 1,0 (0,2) | 0,036 |
| velocity index | 1,4 (0,7) | 1,2 (0,7) | 0,703 |
| PRP low/ PPP low | | | |
| lag time | 0,8 (0,2) | 0,9 (0,2) | < 0,001 |
| peak thrombin | 1,4 (0,5) | 1,3 (0,4) | 0,279 |
| time to peak | 0,8 (0,2) | 0,9 (0,2) | 0,001 |
| velocity index | 1,5 (0,9) | 1,3 (0,7) | 0,476 |

5.3 Subgruppenanalyse

5.3.1 M-Status: M0 vs. M1

Tabelle 19 fasst die Ergebnisse der Subgruppenanalyse von Patienten mit und ohne metastasiertem Tumorleiden zusammen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Subgruppen mit und ohne Metastase.

Tabelle 19 Subgruppenanalyse: M0 versus M1, Median (Interquartilbereich)

| | T-TEST AUF MITTELWERTGLEICHHEIT (log) | | |
|----------------------------|---------------------------------------|-----------------|--------|
| | keine Metastase | Metastase | p-Wert |
| N | 34 | 61 | |
| PRP high | | | |
| lag time (min) | 11,3 (5,5) | 12,7 (5,8) | 0,059 |
| peak thrombin (nM) | 443,1 (242,6) | 469,2 (342,9) | 0,254 |
| time to peak (min) | 13,8 (3,2) | 14,3 (4,7) | 0,178 |
| velocity index (nM/min) | 178,4 (184,5) | 212,5 (184,0) | 0,263 |
| AUC | 5670,4 (2789,4) | 5732,6 (3689,7) | 0,956 |
| PRP low | | | |
| lag time (min) | 12,8 (3,8) | 13,3 (3,8) | 0,273 |
| peak thrombin (nM) | 337,1 (182,7) | 377,6 (220,9) | 0,268 |
| time to peak (min) | 17,7 (3,6) | 17,7 (4,5) | 0,367 |
| velocity index (nM/min) | 86,6 (54,9) | 98,0 (78,2) | 0,671 |
| AUC | 5689,3 (2582,2) | 5731,6 (3831,2) | 0,789 |

| | T-TEST AUF MITTELWERTGLEICHHEIT (log) | | |
|-------------------------|---------------------------------------|-----------------|--------|
| | keine Metastase | Metastase | p-Wert |
| PPP high | | | |
| lag time (min) | 13,7 (6,8) | 14,0 (6,0) | 0,155 |
| peak thrombin (nM) | 381,4 (186,6) | 418,0 (238,1) | 0,251 |
| time to peak (min) | 16,0 (3,9) | 16,7 (5,5) | 0,130 |
| velocity index (nM/min) | 126,1 (125,9) | 128,3 (129,4) | 0,370 |
| AUC | 5579,3 (2317,2) | 5207,2 (3155,7) | 0,811 |
| PPP low | | | |
| lag time (min) | 15,8 (6,9) | 16,3 (5,8) | 0,764 |
| peak thrombin (nM) | 246,6 (187,6) | 260,9 (170,6) | 0,487 |
| time to peak (min) | 21,2 (8,1) | 21,3 (6,8) | 0,290 |
| velocity index (nM/min) | 54,3 (46,4) | 62,7 (48,9) | 0,454 |
| AUC | 5689,3 (2582,2) | 5731,6 (3831,2) | 0,802 |

5.3.2 T-Status: T1/2 vs T3/4

Signifikante Unterschiede zeigen sich bei *PPP high peak thrombin* und *velocity index* sowie *PPP low peak thrombin*. Alle drei Parameter sind in der T3/4-Gruppe jeweils signifikant höher als in der T2/3-Gruppe (siehe Tabelle 20). Die übrigen Parameter zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Subgruppen.

Tabelle 20 Subgruppenanalyse: T1/2 versus T3/4, Median (Interquartilbereich)

| | T-TEST AUF MITTELWERTGLEICHHEIT (log) | | |
|----------------------------|---------------------------------------|---------------------|--------------|
| | T1 oder T2(Median) | T3 oder T4 (Median) | p-Wert |
| N | 36 | 63 | |
| PRP high | | | |
| lag time (min) | 12,0 (6,3) | 12,0 (5,2) | 0,851 |
| peak thrombin (nM) | 408,3 (295,3) | 501,5 (310,9) | 0,058 |
| time to peak (min) | 14,3 (5,1) | 14,2 (3,9) | 0,618 |
| velocity index (nM/min) | 160,6 (143,1) | 218,3 (189,5) | 0,119 |
| AUC | 5645,3 (3165,2) | 5695,1 (3169,4) | 0,596 |
| PRP low | | | |
| lag time (min) | 13,2 (3,8) | 13,3 (4,4) | 0,731 |
| peak thrombin (nM) | 301,0 (221,9) | 372,5 (170,9) | 0,215 |
| time to peak (min) | 17,5 (4,2) | 17,7 (4,6) | 0,639 |
| velocity index (nM/min) | 68,6 (62,2) | 103,5 (64,6) | 0,145 |
| AUC | 5677,6 (3292,7) | 5634,4 (3224,8) | 0,805 |
| PPP high | | | |
| lag time (min) | 13,2 (8,4) | 14,0 (7,1) | 0,978 |
| peak thrombin (nM) | 356,9 (194,0) | 439,9 (231,7) | 0,01 |
| time to peak (min) | 16,0 (5,3) | 16,7 (5,3) | 0,648 |
| velocity index (nM/min) | 101,1 (99,6) | 142,2 (153,4) | 0,021 |
| AUC | 5447,2 (2935,4) | 5440,1 (2444,6) | 0,230 |

| | T-TEST AUF MITTELWERTGLEICHHEIT (log) | | |
|----------------------------|---------------------------------------|---------------------|-------------|
| | T1 oder T2(Median) | T3 oder T4 (Median) | p-Wert |
| PPP low | | | |
| lag time (min) | 16,5 (5,6) | 16,3 (6,3) | 0,811 |
| peak thrombin (nM) | 209,5 (138,6) | 264,2 (170,6) | 0,02 |
| time to peak (min) | 21,3 (7,7) | 21,2 (7,3) | 0,164 |
| velocity index (nM/min) | 49,5 (49,0) | 66,8 (49,8) | 0,119 |
| AUC | 5677,6 (3292,7) | 5634,4 (3224,8) | 0,805 |

5.3.3 SCLC vs. NSCLC

Tabelle 21 zeigt Median, Interquartilbereich und p-Wert der Subgruppenanalysen SCLC vs. NSCLC. Signifikante Unterschiede zwischen SCLC und NSCLC sehen wir bei *PPP low peak thrombin* ($p < 0,04$) und *velocity index* ($p < 0,05$).

Tabelle 21 Subgruppenanalyse: SCLC vs. NSCLC; Median (Interquartilbereich)

| | T-TEST AUF MITTELWERTGLEICHHEIT (log) | | |
|----------------------------|---------------------------------------|-----------------|--------|
| | SCLC | NSCLC | p-Wert |
| N | 14 | 86 | |
| PRP high | | | |
| lag time (min) | 12,0 (6,2) | 11,8 (4,3) | 0,557 |
| peak thrombin (nM) | 446,7 (285,4) | 564,2 (320,2) | 0,078 |
| time to peak (min) | 14,3 (4,5) | 13,8 (2,3) | 0,1 |
| velocity index (nM/min) | 193,6 (179,2) | 246,2 (213,7) | 0,1 |
| AUC | 5491,5 (3184,1) | 7222,7 (3042,1) | 0,333 |
| PRP low | | | |
| lag time (min) | 13,0 (4,5) | 13,7 (1,8) | 0,516 |
| peak thrombin (nM) | 341,7 (205,8) | 384,5 (185,9) | 0,137 |
| time to peak (min) | 17,7 (5,2) | 17,5 (2,4) | 0,219 |
| velocity index (nM/min) | 74,8 (74,2) | 104,8 (48,1) | 0,066 |
| AUC | 5513,6 (3375,6) | 7297,3 (2958,8) | 0,349 |
| PPP high | | | |
| lag time (min) | 14,0 (7,2) | 14,3 (8,6) | 0,992 |
| peak thrombin (nM) | 373,3 (214,2) | 447,1 (185,0) | 0,169 |
| time to peak (min) | 16,3 (5,2) | 16,7 (6,3) | 0,702 |
| velocity index (nM/min) | 123,5 (137,8) | 142,2 (102,2) | 0,134 |
| AUC | 5363,6 (2672,7) | 6487,9 (2397,3) | 0,315 |

| | T-TEST AUF MITTELWERTGLEICHHEIT (log) | | |
|----------------------------|---------------------------------------|-----------------|--------------|
| | SCLC (Median) | NSCLC (Median) | p-Wert |
| PPP low | | | |
| lag time (min) | 16,3 (6,7) | 16,0 (3,0) | 0,203 |
| peak thrombin (nM) | 247,7 (188,8) | 247,7 (113,2) | 0,039 |
| time to peak (min) | 21,7 (8,2) | 20,0 (3,3) | 0,262 |
| velocity index (nM/min) | 57,9 (50,5) | 68,7 (29,9) | 0,047 |
| AUC | 5513,6 (3375,6) | 7297,3 (2958,8) | 0,349 |

5.3.4 ROC-Analyse: Assoziation zwischen Thrombingenerierung und Embolien

Die Fähigkeit einer jeden Variable, zwischen Karzinompatienten mit embolischer Komplikation und solchen ohne embolischer Komplikation zu unterscheiden, wurde mittels ROC-Analyse untersucht. In die Untersuchung eingeschlossen wurden 100 Karzinompatienten, von denen 19 eine Thrombembolie innerhalb des Beobachtungszeitraums von einem Jahr erlitten. 64 Patienten erlitten keine Thrombembolie innerhalb des Beobachtungszeitraum. Bei 17 Patienten blieb der Emboliestatus ungeklärt. Eine ROC-AUC für *PRP high peak thrombin* von 0,67 bedeutet, dass man den Emboliepatienten in 67 % der Fälle korrekt anhand dieses Parameters identifizieren kann. Tabelle 23 bietet eine Übersicht. Abbildung 8 zeigt exemplarisch vier ROC-Kurven für *PRP high AUC*, *PRP low AUC*, *PPP high AUC* und *PPP low AUC*. Zusammenfassend ist hier festzuhalten, dass die ROC-AUC-Werte nur gering von 0,5 abweichen. Die höchste ROC-AUC zeigt *PPP high peak thrombin* mit 0,67. Anhand der vorliegenden Daten lässt sich also kein Parameter identifizieren, mit dessen Hilfe Patienten mit hohem Embolierisiko mit ausreichender Sicherheit identifiziert werden können.

Tabelle 22 Follow-up der Karzinompatienten

| Thrombembolie | n |
|----------------------|----------|
| positiv | 19 |
| negativ | 64 |
| fehlend | 17 |
| Gesamt | 100 |

Tabelle 23 ROC-Analyse

| | ROC-AUC | 95 % Konfidenzintervall |
|-----------------|----------------|--------------------------------|
| PRP high | | |
| Lag time | 0,43 | 0,29 - 0,58 |
| Peak thrombin | 0,65 | 0,50 - 0,79 |
| Time to peak | 0,46 | 0,31 - 0,61 |
| Velocity index | 0,6 | 0,47 - 0,73 |
| AUC | 0,6 | 0,45 - 0,75 |
| PRP low | | |
| Lag time | 0,55 | 0,39 - 0,70 |
| Peak thrombin | 0,58 | 0,43 - 0,73 |
| Time to peak | 0,52 | 0,37 - 0,67 |
| Velocity index | 0,51 | 0,38 - 0,65 |
| AUC | 0,59 | 0,44 - 0,74 |
| PPP high | | |
| Lag time | 0,46 | 0,32 - 0,61 |
| Peak thrombin | 0,67 | 0,53 - 0,80 |
| Time to peak | 0,48 | 0,33 - 0,63 |
| Velocity index | 0,65 | 0,52 - 0,77 |
| AUC | 0,62 | 0,48 - 0,77 |

| | ROC-AUC | 95 % Konfidenzintervall |
|----------------|---------|-------------------------|
| PPP low | | |
| Lag time | 0,57 | 0,41 - 0,72 |
| Peak thrombin | 0,60 | 0,46 - 0,75 |
| Time to peak | 0,59 | 0,45 - 0,73 |
| Velocity index | 0,55 | 0,41 - 0,68 |
| AUC | 0,59 | 0,44 - 0,74 |

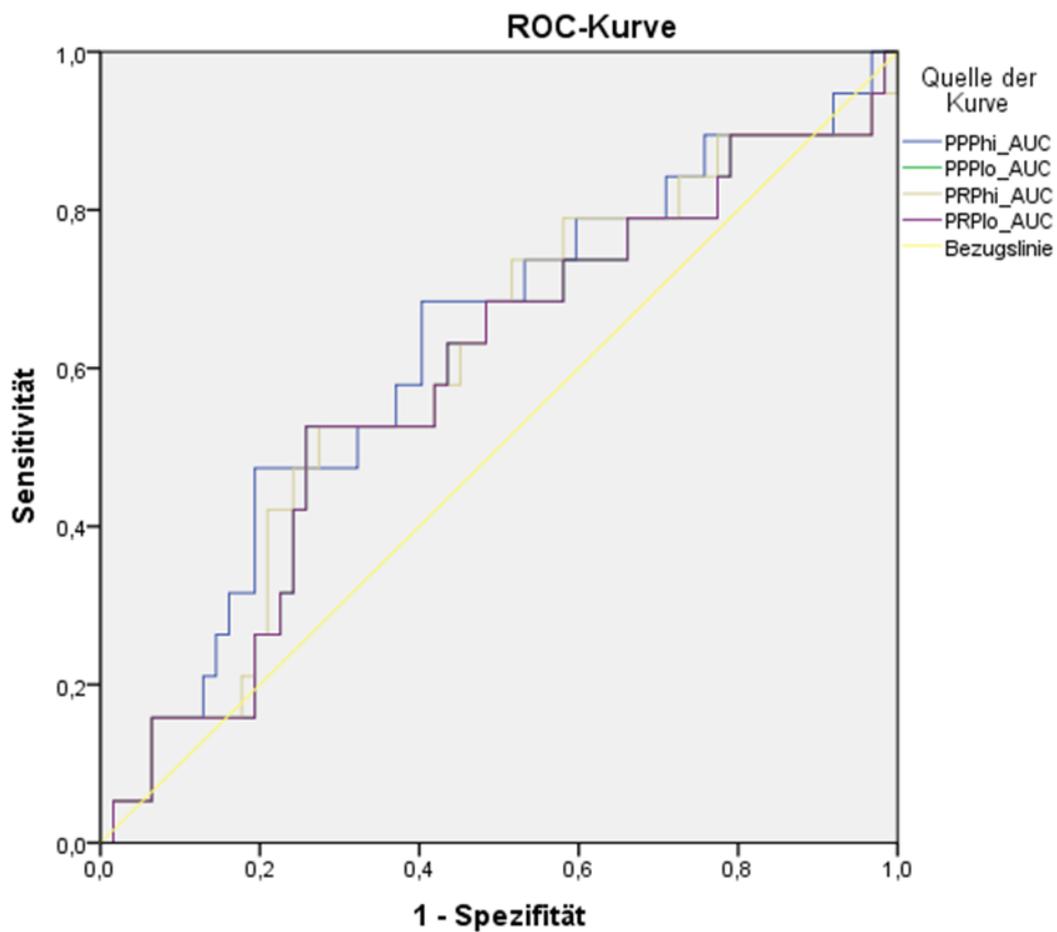


Abbildung 8 ROC-Kurve für PRP high AUC, PRP low AUC, PPP high AUC und PPP low AUC

6 Diskussion

6.1 Diskussion der Methode

6.1.1 Studiendesign und statistische Auswertung

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine prospektive Studie, die sich in zwei Teilstudien unterteilen lässt: Zum einen der Vergleich Tumorgruppe vs. Kontrollgruppe, zum anderen die Nachverfolgung der Tumorpatienten. Die Thrombingerierung wurde in vier unterschiedlichen Testansätzen bestimmt. Es wurden 100 Patienten mit Lungenkarzinom in die Studie eingeschlossen und über 12 Monate nachbeobachtet. Als Endpunkt definiert wurden Tod oder Thrombembolie. In 17 Fällen ließ sich dies nicht abschließend klären, da der Patient oder der Hausarzt nicht mehr erreichbar waren.

In Anbetracht des explorativen Charakters der vorliegenden Studie, erscheint es notwendig darauf hinzuweisen, dass hier Korrelationen aufgezeigt werden können, um Hypothesen zu generieren, die dann Auftakt zu weiterer Forschung sein müssen. Kausalzusammenhänge können mittels eines schlichten Vergleichs zwischen Studien- und Kontrollgruppe nicht aufgedeckt werden. Zumal darauf hinzuweisen ist, dass im vorliegenden Fall die Studiengruppe sich nicht nur im Merkmal „krank“ oder „gesund“, bzw. Tumor oder kein Tumor, unterscheiden, sondern das naturgemäß ein signifikanter Altersunterschied vorliegt. Das mittlere Erkrankungsalter für Lungenkrebs in Deutschland liegt für Frauen bei 68,3 und für Männer bei 69,3 Jahren (Robert Koch-Institut (RKI) 2016). Im vorliegenden Patientenkollektiv liegt das mittlere Erkrankungsalter mit 67,27 Jahre im zu erwartenden Bereich. Da es praktisch sehr schwierig ist, aus dieser Altersgruppe ein gesundes Vergleichskollektiv zu rekrutieren, wurde auf gesunde Blutspender zurückgegriffen, die erwartungsgemäß eine jüngere Population darstellen. Um einen Vergleich dennoch zu ermöglichen und von möglichen Störfaktoren wie Alters- und Geschlechtsunterschieden zu bereinigen, wurden altersadjustierte p-Werte berechnet und eine multivariate Regressionsanalyse durchgeführt. Es lässt sich so zwar nicht ausschließen, dass Alters- und Geschlechtsunterschiede das Testergebnis beeinflussen, aber die Wahrscheinlichkeit, dass aufgrund von Alters- und Geschlechtsunterschieden falsche Schlüsse

gezogen werden, lässt sich minimieren. Unter den gegebenen Bedingungen erscheint dies das bestmögliche Verfahren.

6.1.2 Thrombingenerierungsassay

Im Unterschied zu traditionellen Globalparametern der Gerinnung wie Prothrombinzeit (PT) oder Thromboplastinzeit (aPTT), fängt die Thrombingenerierung das Resultat der Interaktion zwischen Thrombin, seinen *Enhancern* und Inhibitoren ein und scheint deswegen eher geeignet einen Status erhöhter Thrombogenität (hohe Thrombingenerierung) oder erhöhter Blutungsgefahr (niedrige Thrombingenerierung) widerzuspiegeln.

Ein Nachteil von Thrombingenerierungsassays ist ihre unvollständige Standardisierung. Es gibt mehrere kommerziell erhältlich Thrombingenerierungsassays. Es soll hier auf zwei näher eingegangen werden: Eine Studie des britischen *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC, Potters Bar, Großbritannien) konnte zeigen, dass Variationen in den Parametern der Thrombingenerierungskurve von bis zu 30-50% bestehen, und zwar zwischen jenen Laboratorien, die den gleichen Assay benutzt haben, nämlich *calibrated automated thrombography CAT* oder Technothrombin® TGA. Dies lag hauptsächlich darin begründet, dass unterschiedliche Konzentrationen von *tissue factor* verwendet wurden (van Veen et al. 2008).

Ein weiteres unbeherrschtes Problem bei der Messung der Thrombingenerierungskurve mittels eines fluorogenen Substrats, wie *calibrated automated thrombography CAT* und Technothrombin® TGA es verwenden, ist der innere Filtereffekt: Die Beziehung zwischen Fluoreszenzsignal und Thrombingenerierung ist nicht linear aufgrund des Substratverbrauchs während der Reaktion und der nicht-Linearität der fluorogenen Aktivität mit steigender Konzentration fluoreszierender Moleküle. Demzufolge erfordert jedes Fluoreszenzlevel einen eigenen Kalibrationsfaktor, um die Thrombingenerierung zu berechnen. Ein Nachteil von Technothrombin® TGA besteht darin, dass hierzu, separat von der zu messenden Plasmaprobe, eine Verdünnungsreihe eines Thrombinkalibrators mit einer Pufferlösung erstellt wird. Mittels dieser Technik kann keine Korrektur des inneren Filtereffekts oder der durch Substratkonsumption verursachten Aberrationen erreicht werden. Außerdem können Ungenauigkeiten durch verschiedene Färbung des Plasmas entstehen (van Veen et al. 2008).

Auch die Präanalytik zur Durchführung eines Thrombingenerierungsassay ist nicht unkompliziert. So müssen beispielsweise Messungen in plättchenreichem Plasma (PRP) an frischem Plasma durchgeführt werden, was längere Transportstrecken erschwert und eine multizentrische Studie nahezu unmöglich macht.

Überhaupt ist es ein besonderes Merkmal dieser Arbeit, dass erstmals verschiedene Testansätze in einer Studie verwendet wurden. Der Unterschied zwischen einer Messung in PPP oder PRP besteht darin, dass bei PPP im Wesentlichen nur die plasmatische Gerinnung gemessen wird, während bei PRP der Beitrag der Thrombozyten enthalten ist. Der Hersteller des verwendeten Testkits empfiehlt RC low zur Messung einer Thromboseneigung, bevorzugt in Kombination mit PPP, und RC high zum Monitoring einer Antikoagulantientherapie. Da es für diese Empfehlung aber letzten Endes keine nachvollziehbare Rationale gibt und auch untersucht werden sollte, mittels welchen Testkits die funktionellen Konsequenzen des zellulären *cross talk* der Tumorzellen auf das hämostaseologische Gleichgewicht am besten dargestellt werden können, wurden alle vier Testansätze verwendet. Wie in den folgenden Kapiteln 6.2.1 und 6.2.2 noch thematisiert werden wird, erlauben es die Resultate dieser Arbeit, eine zukünftige Studie zur Thrombingenerierung bei Lungenkarzinom gegebenenfalls lediglich in plättchenarmem Plasma (PPP) durchzuführen, denn die in nahezu allen Testkits verkürzte *lag time* und *time to peak* in der Tumorgruppe, zeigt sich sowohl bei Messung in PPP als auch in PRP.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Karzinomgruppe vs. Kontrollgruppe

Thrombin ist das zentrale Enzym der Hämostase, seine Aktivierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Bildung eines Fibringerinnsels. In der Klinik sind thrombembolische Ereignisse eine häufige Komplikation bei Patienten mit Lungenkarzinom. Die Inzidenz von Thrombembolien liegt in dieser Patientengruppe bei bis zu 20 %. Die Verknüpfung dieser beiden Momente führt zur ersten Hypothese dieser Arbeit:

„Patienten mit Lungenkarzinom zeigen eine signifikant stärkere Thrombingenerierung als gesunde Probanden.“

Diese Hypothese kann weder vollumfänglich verworfen, noch bestätigt werden. Bei genauer Betrachtung der Ergebnisse zeigt sich, dass die beiden Gruppen „Tumor“ und „Kontrolle“ sich vor allem hinsichtlich der Reaktionszeiten signifikant unterscheiden: *lag time* ist in den Messreihen *PRP high*, und *PPP high* in der Tumorgruppe signifikant kürzer als in der Kontrollgruppe. In der Messreihe *PRP low* sehen wir hinsichtlich *lag time* keinen signifikanten Unterschied und in *PPP low* sehen wir eine in der Tumorgruppe signifikant längere *lag time* als in der Kontrollgruppe. Geht man davon aus, dass je kürzer *lag time* umso stärker die Thrombingenerierung, i.e. das prokoagulatorische Potential, so steht vor allem das letzte Resultat im Widerspruch zu unserer Hypothese.

Was *time to peak* anbelangt, sind die Ergebnisse ähnlich konträr: In *PRP high* und *PPP high* sehen wir eine signifikant kürzere *time to peak* in der Tumorgruppe. Dieser signifikante Unterschied hat auch nach Adjustierung für Alter und Geschlecht Bestand. In *PPP low* sehen wir eine signifikant längere *time to peak* in der Tumorgruppe. Diese Signifikanz hat allerdings nach Adjustierung für Alter und Geschlecht keinen Bestand. Andersherum in *PRP low*: Die längere *time to peak* der Tumorgruppe ist erst nach Adjustierung für Alter und Geschlecht signifikant.

PRP high zeigt einen signifikant höheren *peak thrombin* in der Tumorgruppe. Zwar ließe sich dies als stärkere Thrombingenerierung in der Tumorgruppe interpretieren, nach Adjustierung für Alter und Geschlecht ist der Unterschied aber nicht mehr signifikant.

Unterm Strich bleiben zwei Messreihen, welche mit unserer Hypothese in Einklang zu bringen sind: *PPP high* und *PRP high* zeigen eine signifikant kürzere *lag time* und *time to peak* in der Tumorgruppe. Diese Differenz bleibt auch nach Adjustierung für Alter und Geschlecht signifikant. Gestützt hierauf lässt sich schlussfolgern, dass die Thrombingenerierung bei Patienten mit Lungenkarzinom schneller abläuft, im Sinne einer stärkeren Thrombingenerierung und eines höheren prokoagulatorischen Potentials. Die anderen Messreihen erlauben diesen Schluss allerdings nicht. Dieser Unterschied ist also nur darstellbar in jenen Messreihen, welche mit einer hohen Konzentration von Phospholipidmicellen durchgeführt werden, gleichgültig ob im plättchenreichen oder plättchenarmen Plasma gemessen wird. Petros et al. (2012) untersuchten die Thrombingenerierung bei Patienten mit Sepsis und verglichen diese mit derjenigen von gesunden Probanden. Sie führten dabei die Messung im plättchenarmen Plasma mit 4 μMol Phospholipid durch. Es stellte sich heraus, dass die Patienten mit Sepsis sich hinsichtlich *peak thrombin*, *time to peak* und *lag time* signifikant von den gesunden Probanden

unterschieden. Allerdings wiesen die Sepsispatienten in dieser Studie eine längere *lag time* und *time to peak* auf als die Vergleichsgruppe. Unter der Annahme, dass es sich bei einer Tumorerkrankung ebenfalls um eine systemische Inflammation handelt, stehen diese Ergebnisse im Widerspruch zu den Resultaten der vorliegenden Arbeit. Allerdings muss beim Vergleich dieser Studienergebnisse bedacht werden, dass die Methoden der Messung der Thrombingenerierung sich unterscheiden. Für die vorliegende Arbeit wurde Technothrombin® TGA verwendet. Dieses Produkt enthält Reagenz C *Low* und *High*. Die Messung wird mit 5 pM *tissue factor* und Phospholipidmicellen in niedriger beziehungsweise hoher Konzentration durchgeführt. Wieviel Phospholipid die Testansätze enthalten, wird durch den Vertreiber nicht bekannt gegeben. Das ist bedauerlich, denn in der vorliegenden Arbeit sehen wir unterschiedliche Ergebnisse je nachdem ob RC *low* oder RC *high* verwendet wird. Debaugnies et al. (2010) konnten zeigen, dass die Resultate der Messung der Thrombingenerierung bei Tumorpatienten von der Zugabe von *tissue factor* und Phospholipiden als *Trigger* im Testkit abhängig sind. Sie verwendeten Konzentrationen von 1 pM *tissue factor* und 4 pM Phospholipiden. Sie bestimmten die Thrombingenerierung im Blut von 31 neu diagnostizierten Tumorpatienten mit verschiedenen Malignomen und verglichen diese mit derjenigen eines gesunden Vergleichskollektivs. Es zeigte sich, dass die Tumorpatienten sich je nachdem ob weder *tissue factor* noch Phospholipide, nur *tissue factor* oder nur Phospholipide als *Trigger* hinzugegeben wurden in teilweise unterschiedlichen Parametern der Thrombingenerierungskurve von den gesunden Probanden unterschieden (siehe 6.2.2).

Eine weitere Schwachstelle der vorliegenden Studie ist die Altersabhängigkeit der Thrombingenerierung. Haidl et al. (2006) konnten nachweisen, dass zwischen Lebensalter und *lag time*, sowie Lebensalter und *time to peak* eine negative Korrelation besteht, das heißt je älter ein Proband umso kürzer *lag time* beziehungsweise *time to peak*. Allerdings verwendeten sie für ihre Untersuchung zum einen ein anderes Verfahren, nämlich *Calibrated Automated Thrombography* (CAT); zum anderen teilten sie die 86 erwachsenen Individuen, welche an der Studie teilnahmen in zwei Altersgruppen: 18 bis 35 Jahre alt und älter als 35 Jahre. Sie führten dann eine lineare Regression durch und kamen zu oben genanntem Resultat. Dieses ist allerdings deswegen nicht uneingeschränkt auf die vorliegenden Daten übertragbar, weil die Probanden hier fast ausschließlich in die Altersgruppe „älter als 35“ fallen. Ob auch in dieser Altersgruppe eine signifikante Altersabhängigkeit der Thrombingenerierung besteht, ist letzten Endes nicht bekannt.

Schlussendlich sollten die Resultate dieser Studie mit Vorsicht interpretiert werden, denn es ist nicht erforscht, welcher Testkit – *PPP low*, *PPP high*, *PRP low* oder *PRP high* – eigentlich mehr der in vivo Situation entspricht. Außerdem sind Vergleiche mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen durch mangelnde Standardisierung und Unkenntnis über den genauen Anteil an Phospholipiden bei Technothrombin® TGA erschwert. Allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Unterschiede zwischen Tumorpatienten und Gesunden am besten bei Messungen mit hoher Konzentration von Phospholipiden sichtbar werden. Hier kann dann auch plättchenarmes Plasma verwendet werden, was aufgrund seiner Haltbarkeit besser handhabbar ist als plättchenreiches Plasma. Dies sollte bei der Konzipierung zukünftiger Studien bedacht werden. Insbesondere bei der Suche nach einem Biomarker für das thrombembolische Risiko von Tumorpatienten ist dies relevant.

6.2.2 PRP/PPP-Ratio

Tumorzellen exprimieren prokoagulatorische Proteine wie *tissue factor* und *cancer procoagulant*, sezernieren phospholipidhaltige Mikrovesikel und können Endothelzellen und Thrombozyten auch direkt aktivieren (Falanga et al. 2015). Vor diesem Hintergrund entstand der Wunsch, dass es möglich sei, den Beitrag der Tumorzellen zur Koagulation zu zeigen und zu quantifizieren. Dies führte zur zweiten Hypothese dieser Arbeit:

„Der Quotient PRP/PPP ist in der Tumorgruppe signifikant höher hinsichtlich der Parameter *peak thrombin* und *velocity index* und signifikant niedriger hinsichtlich der Parameter *lag time* und *time to peak*.“

Die Quotienten für *lag time* und *time to peak* sind sämtlich in der Tumorgruppe signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe. Dieses Resultat erlaubt einen Schluss auf die Ursache der in 5.2 dargestellten Unterschieden zwischen den beiden Hauptgruppen der Studie. Wir sahen dort, dass die Reaktionszeiten *lag time* und *time to peak* in den Messreihen *PRP high* und *PPP high* in der Tumorgruppe signifikant kürzer sind. Die Ursache für diese beschleunigte Thrombingenerierung in der Tumorgruppe liegt offenbar nicht in der Thrombozytenfunktion, denn diese wurde mittels des Quotienten $\frac{PRP}{PPP}$ nivelliert. Vielmehr legt dieses Resultat den Schluss nahe, dass die Ursache der beschleunigten Thrombingenerierung in der Patientengruppe darin besteht, dass im Patientenblut nicht nur die Thrombozyten als Quelle von Phospholipiden und anderen prokoagulatorischen Substanzen agieren, sondern dass es hier eine weitere Phospholipidquelle gibt und als diese kommt schlussendlich nur der Tumor in Betracht.

Interessanterweise kommen Debaugnies et al. (2010) mit einer anderen Methode zu einem ganz ähnlichen Resultat. Sie bestimmten die Thrombingenerierung bei Tumorpatienten (siehe 6.2.1), verglichen diese mit derjenigen von gesunden Probanden und fanden folgendes heraus:

Bestimmten sie die Thrombingenerierung ohne Zugabe von *tissue factor* oder Phospholipiden, so zeigten die Tumorpatienten einen signifikant höheren Wert für ETP (entspricht der AUC der Thrombingenerierungskurve), *peak thrombin* und *velocity index*. Die gleichen Parameter waren signifikant höher nach Zugabe von *tissue factor*. Zusätzlich war *time to peak* dann signifikant kürzer in der Tumorgruppe. Die Autoren schlussfolgern, dass eine höhere Konzentration von zirkulierenden Phospholipiden bei Tumorpatienten für diese Differenz verantwortlich ist. Führten sie die Messung nach Zugabe von 4 pM Phospholipid durch, so verschwanden diese Unterschiede und es zeigte sich stattdessen eine signifikant kürzere lag time in der Tumorgruppe. Dies erklären die Autoren mit einer höheren Konzentration von endogenem *tissue factor* bei Tumorpatienten, wie in einschlägigen Publikationen berichtet wird (Prandoni et al. 2005). Ein Nachteil des für die vorliegende Studie verwendeten Technothrombin® TGA besteht darin, dass die Konzentration von *tissue factor* im Testkit zum einen immer 5 pM beträgt und dass zum anderen die genaue Konzentration von Phospholipiden in RC *high* und RC *low* nicht bekannt gegeben wird. Daher lässt sich anhand der vorliegenden Daten kein direkter Ursache-Wirkungs-Zusammenhang herstellen, wenn es darum geht, ob für die beobachteten Unterschiede zwischen Tumor- und Kontrollgruppe eher eine höhere Konzentration von *tissue factor* oder von Phospholipiden im Patientenblut verantwortlich ist, oder ob beides gleichermaßen seinen Beitrag leistet. Es lässt sich allenfalls unter Vorbehalt postulieren, dass endogener *tissue factor* maßgeblich ist, für die Unterschiede, die sich zeigen. Denn wenn im Testkit die Konzentration von *tissue factor* immer gleich ist, ist sie im Patientenblut und im Blutspenderblut offenbar nicht gleich, sonst gäbe es ja keine Unterschiede im Resultat. Dies würde auch erklären, warum sich bei Messung mit RC *high* stärkere Unterschiede zeigen, als bei Messung mit RC *low*: Möglicherweise kann sich in einem Reagenz mit hoher Konzentration von Phospholipiden ein endogen erhöhter *tissue factor* stärker entfalten. Duchemin et al. (2008) berichten ebenfalls, dass steigende Konzentrationen von *tissue factor* im Plasma mit einer sinkenden lag time bei der Messung der Thrombingenerierung einher gehen. *Tissue factor* ist ja auch bekanntermaßen verantwortlich für die Phase der Initiation im Zellbasierten Gerinnungsmodell (siehe 1.1.3). In der vorliegenden Arbeit sind die Unterschiede zwischen Tumor- und

Kontrollgruppe maßgeblich durch eine verkürzte *lag time* in der Tumorgruppe gekennzeichnet. Dies lässt vermuten, dass eine erhöhte Konzentration von zirkulierendem *tissue factor* bei Patienten mit Lungenkrebs für diesen Unterschied ursächlich ist.

Es stellt sich natürlich die Frage, welche klinische Konsequenz sich aus diesem Ergebnis ableiten lässt. Es gibt einige Studien, die die prophylaktische oder supraprophylaktische Antikoagulation bei Tumorpatienten und ihren Effekt auf Überleben und progressionsfreies Überleben untersuchen. Die Resultate sind hier aber widersprüchlich. Der RASTEN *trial* (Ek et al. 2018) zeigte keinen Vorteil einer supraprophylaktischen Antikoagulation bei Patienten mit SCLC hinsichtlich Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben. Allerdings traten in der Kontrollgruppe, welche nur Chemotherapie erhielt, signifikant häufiger venöse Thrombembolien und Lungenembolien auf. Auf der anderen Seite erlitten 27 von 186 Patienten in der Antikoagulationsgruppe Blutungskomplikationen. Angesichts dieser Problemlage entstand der Wunsch, einen Biomarker zur Hand zu haben, mit dessen Hilfe besonders gefährdete Patienten erkannt werden können. Diese Fragestellung ist ebenfalls Thema in Kapitel 5.3.4 der vorliegenden Arbeit. Wie noch detaillierter erläutert werden wird, konnte dieses Ziel zwar anhand der vorliegenden Daten nicht erreicht werden. Mittels der ROC-Analyse fand sich keine nennenswerte Assoziation zwischen einem der im Labor erhobenen Parameter der Thrombingenerierungskurve und dem klinischen Auftreten thrombembolischer Komplikationen. Allerdings liefert diese Arbeit einen Beitrag auf dem Weg dorthin: Es ist uns gelungen in einer Blutprobe die Beschleunigung des Koagulationsprozesses durch den Tumor sichtbar zu machen. Die Tumorpatienten unterscheiden sich hauptsächlich durch kürzere Reaktionszeiten *lag time* und *time to peak* von den gesunden Probanden. Diese Erkenntnis sollte bei weiteren Überlegungen, welcher Parameter der Thrombingenerierungskurve eigentlich potenziell als klinisches Diagnostikum in Betracht kommt, berücksichtigt werden. Die beschriebenen Unterschiede sind auch bei Messung in plättchenarmem Plasma darstellbar. Das ist deswegen von Vorteil, weil plättchenarmes Plasma länger gelagert werden kann als plättchenreiches Plasma. Dies kann die Präanalytik zukünftiger Studien entscheidend vereinfachen. Diese Studie liefert zudem Hinweise darauf, das RC high besser geeignet ist als RC low um Hyperkoagulabilität bei Tumorerkrankungen darzustellen.

6.2.3 M-Status und T-Status

Der Zusammenhang von thrombotischem und malignem Potential von Tumorerkrankung ist Gegenstand aktueller Forschung. In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass das aktive Onkogen EGFRiv in Prostatakarzinomzellen zu einer verstärkten Sezernierung von Mikrovesikeln durch den Tumor führt. Diese Mikrovesikel können durch die Aktivierung von Thrombin mittels *tissue factor* die Mikroumgebung des Tumors thrombogen beeinflussen. Außerdem kann durch die Aktivierung von Thrombin PAR-1 aktiviert werden (Al Saleh et al. 2018).

PAR-1 wird bei NSCLC hauptsächlich im Stroma des Tumors exprimiert und ist u.a. dazu in der Lage den NF-κB-Signalweg zu aktivieren. Dies führt wiederum zu gesteigerter Invasivität und Migrationsfähigkeit der Tumorzellen (Akca et al. 2011). Eine interessante Arbeit zu diesem Thema ist auch die von Sawada et al. (1999), welche mittels immunhistochemischer Färbung an OP-Resektaten von NSCLC zeigen konnten, dass *tissue factor* besonders häufig und besonders stark von solchen Tumoren exprimiert wurde, welche bereits metastasiert hatten.

Angesichts dieser Erkenntnisse über die molekulare Interaktion zwischen Malignität und Thrombogenität entstand die Frage, ob sich dieses thrombogene Potential von Tumoren im Vergleich zweier Patientengruppen mit verschieden fortgeschrittenem Tumorleiden unterscheidet. Denn immerhin ist es naheliegend, dass der Tumor seine thrombogene Wirkung umso stärker entfaltet, je größer er ist oder je stärker entdifferenziert er ist. Fortgeschritten bedeutet hier einerseits lokal – im T-Stadium – andererseits im M-Stadium. Dies führte zu den beiden folgenden Hypothesen dieser Arbeit:

„Patienten, bei welchen ein M1-Stadium vorliegt, zeigen eine signifikant höhere Thrombingerierung als solche, bei denen ein M0-Stadium vorliegt.“

„Patienten, welche an einem T3 oder T4-Tumor erkrankt sind zeigen eine signifikant höhere Thrombingerierung als Patienten mit einem T1 oder T2-Tumor.“

Ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Fernmetastase und der Thrombingerierung im Patientenblut konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Vermutungen darüber anzustellen, warum dem so ist, wo doch in Zellkultur bereits Pathomechanismen und Interaktionen zwischen Tumor und Hämostase beschrieben sind, fällt schwer. Bisher sind schlichtweg keine Studien mit einer ähnlichen Herangehensweise an diese Fragestellung publiziert. Die zitierten Studien, welche sich mit der molekularen Interaktion zwischen Tumor

und Hämostase beschäftigen, beschränken sich auf die Mikroumgebung des Tumors. Im Unterschied dazu wurde in der vorliegenden Arbeit eine systemische Blutprobe untersucht. Wie und ob die beschriebenen Interaktionsmechanismen systemisch Wirkung entfalten, sodass sie zur Metastasierung beitragen, kann anhand der vorliegenden Daten nicht geklärt werden. Zudem gibt es große epidemiologische Studien, welche das Vorliegen eines metastasierten oder lokal fortgeschrittenen Lungenkrebs als Risikofaktor für das Auftreten von venösen Thrombembolien identifizieren konnten (Chew et al. 2008). Dies spiegelt sich aber offenbar nicht in einer prinzipiell gesteigerten Thrombingenerierung bei metastasiertem Krebsleiden wieder. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass beim Vergleich von metastasiertem und nicht metastasiertem Lungenkarzinom in der vorliegenden Studie nicht zwischen den verschiedenen histologischen Typen unterschieden wurde. Chew et al. (2008) konnten nämlich ebenfalls zeigen, dass bei Vorliegen eines Adenokarzinoms, die Inzidenz von Thrombembolien besonders hoch ist (siehe 6.2.4).

Etwas mehr Stoff bietet die Subgruppenanalyse der T-Stadien. Wie in Kapitel 5.3.2 erläutert, sehen wir hier in zwei von vier Messreihen signifikante Unterschiede: Im plättchenarmen Plasma PPP *high* zeigt sich *peak thrombin* in der T3/4-Gruppe signifikant höher als in der T1/2-Gruppe. In der gleichen Messreihe ist auch für *velocity index* ein signifikant höherer Wert in der T3/T4-Gruppe zu verzeichnen. Mit wenig Phospholipiden im plättchenarmen Plasma gemessen (PPP *low*), zeigt sich ebenfalls ein signifikant höherer *peak thrombin* in der T3/T4-Gruppe. Wir sehen also bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Lungenkrebs eine verstärkte Thrombingenerierung v. a. im Sinne eines erhöhten Scheitelpunkts der Thrombingenerierungskurve, dem sogenannten *peak thrombin*. Diese Resultate passen also durchaus zur eingangs formulierten These: Je größer der Tumor desto stärker die Thrombingenerierung.

6.2.4 SCLC vs. NSCLC

Das kleinzellige Lungenkarzinom ist seinem histologischen Ursprung und seinem klinischen Verlauf nach eine andere Tumorentität als die als nicht-kleinzellige Karzinome zusammengefassten Lungentumoren. Das kleinzellige Lungenkarzinom ist gekennzeichnet durch seinen Ursprung von neuroendokrinen Vorläuferzellen und eine besonders kurze Tumorverdopplungszeit. Paraneoplastische Syndrome finden sich vor allem beim kleinzelligen Lungenkarzinom.

Das kleinzellige Lungenkarzinom macht circa 15 % aller Lungenkarzinome aus. Die Häufigkeit des kleinzelligen Lungenkarzinoms liegt mit $n = 14$ in der vorliegenden Studie im Erwartungsbereich. Die genannten Charakteristika und die bekannte Rasanz des Krankheitsverlaufs waren Grundlage für die folgende Hypothese dieser Arbeit:

„Patienten, welche an einem SCLC erkrankt sind, weisen eine signifikant höhere Thrombingenerierung auf, als solche, welche an einem NSCLC erkrankt sind.“

Wie Tabelle 20 zu entnehmen ist, bestätigt sich diese These lediglich hinsichtlich der Messung PPP low mit den Parametern *peak thrombin* und *velocity index*. In der SCLC-Gruppe sehen wir hier signifikant höhere Werte. Interessant ist, dass sich dieser Unterschied zwischen den histologischen Typen bei der Messung mit PPP low zeigt, während wir beim Vergleich Tumor- vs. Kontrollgruppe einen signifikanten Unterschied im Sinne einer kürzeren *lag time* und einer kürzeren *time to peak* mit PPP high und PRP high gesehen haben. Je nach Fragestellung sind also möglicherweise unterschiedliche Parameter der Thrombingenerierungskurve und unterschiedliche Testansätze, das heißt plättchenreiches oder plättchenarmes Plasma, zu empfehlen. Interpretieren wir die gezeigten Unterschiede zwischen der SCLC- und der NSCLC-Gruppe als Zeichen der Hyperkoagulabilität der an einem SCLC erkrankten Patienten, so stehen diese Ergebnisse im Widerspruch zu den Resultaten von Chew et al. (2008). Diese analysierten in einer retrospektiven Studie die Inzidenz von venösen Thrombembolien bei 91.933 Patienten mit Lungenkarzinom. Hierbei zeigte sich, dass vor allem jene Patienten ein hohes thrombembolisches Risiko hatten, welche in jüngerem Alter erkrankt waren, an mehreren Komorbiditäten litten, ein metastatisch oder lokal fortgeschrittenes Tumorleiden hatten und bei welchen histologisch ein Adenokarzinom vorlag. Die kumulative 2-Jahres-Inzidenz für eine venöse Thrombose lag hier für Patienten mit NSCLC bei 3,6 % und für Patienten mit SCLC bei 2,5 %. Am höchsten war sie bei Patienten mit Adenokarzinom mit 5,0 %.

Eine eindeutig gesteigerte Thrombingenerierung bei SCLC im Vergleich zu NSCLC konnte in der vorliegenden Studie also nicht nachgewiesen werden. Es scheint aber relevant zu sein, welcher Testansatz für welche Fragestellung verwendet wird, denn die Unterschiede die es gibt zwischen SCLC und NSCL zeigen sich im plättchenarmen Plasma mit wenig Phospholipiden

(PPP *low*), während sich im Hauptgruppenvergleich zwischen der Kontrollgruppe und der Tumorgruppe die signifikanten Unterschiede hauptsächlich bei Messung mit viel Phospholipiden demaskieren, wobei es keine Rolle spielte, ob plättchenreiches oder plättchenarmes Plasma verwendet wurde.

6.2.5 Thrombingenerierung als Biomarker für emboliegefährdete Patienten

Klinische Studien wie der RASTEN trial (Ek et al. 2018) untersuchen den Effekt von niedermolekularem Heparin (LMWH) in Kombination mit Chemotherapie auf das Gesamtüberleben, das progressionsfreie Überleben und auf die Inzidenz von venösen Thrombembolien bei Patient mit SCLC. Hinsichtlich Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben zeigte sich hier bei 390 randomisierten Patienten kein Vorteil durch die Gabe von LMWH. Die Inzidenz von VTE war signifikant reduziert im LMWH-Arm. Zu einem ähnlichen Resultat gelangen Macbeth et al. (2016): In einer multizentrischen Studie wurden über 2000 Patienten mit Lungenkarzinom in jedem Stadium und jeder Histologie randomisiert und auf zwei Studienarme verteilt: nur Chemotherapie vs. Chemotherapie plus LMWH in prophylaktischer Dosierung. Auch hier zeigte sich kein Hinweis auf einen Unterschied im Gesamt- oder progressionsfreien Überleben. Allerdings fand sich im LMWH-Arm eine signifikant reduziert Inzidenz von VTE bei gleichzeitig gehäuften Blutungskomplikationen. Vor diesem Hintergrund ist es wichtig, jene Patienten mit hohem thrombembolischen Risiko zu identifizieren und die anderen nicht unnötig der Gefahr einer Blutungskomplikation auszusetzen. Dies führte zur sechsten Hypothese dieser Arbeit:

„Die Messung der Thrombingenerierung eignet sich, um zwischen jene Patienten mit besonders hohem thrombembolischen Risiko und jenen mit geringerem Risiko zu unterscheiden.“

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde eine ROC-Analyse durchgeführt mit dem Zweck eine Assoziation zwischen einem der Parameter der Thrombingenerierungskurve und dem klinischen Auftreten von Thrombembolien zu prüfen. Eine solche Assoziation lässt sich anhand der vorliegenden Daten allerdings nicht bestätigen. Einen ähnlichen Ansatz verfolgten Eichinger et al. (2008) welche die Vorhersage einer Rezidivthrombose mittels endogenem Thrombinpotential (ETP) und D-Dimer untersuchten. Hier zeigte sich, dass ein erhöhtes ETP das Risiko für eine Rezidivthrombose bei Patienten mit stattgehabter Venenthrombose um das 1,6-fache

erhöht. Es ist allerdings darauf hinzuweisen, dass Eichinger et al. (2008) ein anderes Studiendesign zu Grunde legten: Die Plasmaproben zur Bestimmung des D-Dimer und des ETP wurden nach Absetzen der Antikoagulation bei stattgehabter Venenthrombose aquiriert und die Patienten dann regelmäßig hinsichtlich einer Rezidivthrombose nachuntersucht. Für die vorliegende Arbeit wurde Patienten mit der Erstdiagnose eines Lungenkarzinoms vor Beginn der Therapie eine Plasmaprobe entnommen und die Thrombingenerierung bestimmt. Im Nachbeobachtungszeitraum erhielten die Patienten dann eine Chemotherapie, Radiochemotherapie oder eine chirurgische Therapie. Adjuvante und neoadjuvante Chemotherapien wurden ebenfalls verabreicht. Bei aller Homogenität des Patientenkollektivs sind die Verläufe also recht heterogen. Es ist zu bedenken, dass viele Begleitumstände, welche für das individuelle thrombembolische Risiko eines Patienten relevant sind, wie Immobilität, BMI, Raucherstatus, Begleiterkrankungen und ECOG Performance Status (Kuderer et al. 2017) bei dieser Studie außer Acht gelassen wurden. Insbesondere die Verabreichung von Chemotherapie kann durch direkten Endothelschaden, aber auch durch Suppression endogener Antikoagulantien thrombogen wirken (Vitale et al. 2015). Möglicherweise wird auch durch diesen Effekt die Aussagekraft der vorliegenden, prätherapeutisch erhobenen Daten geschwächt.

Um das endogene Thrombinpotential dennoch für die Risikostratifizierung onkologischer Patienten nutzbar zu machen, wäre es ratsam zunächst in einer weiteren Studie Verlaufskontrollen der Thrombingenerierung unter Chemotherapie oder nach onkologischer Operation durchzuführen, mit dem Zweck den Verlauf der Thrombingenerierung mit dem Verlauf der Tumorerkrankung zu korrelieren. Dies wäre auch ein Beitrag zu der Frage, wann im Krankheitsverlauf die Messung der Thrombingenerierung eigentlich aussagekräftig ist.

6.3 Schlussbetrachtung und Ausblick

Trotz beachtlicher Fortschritte in Diagnostik und Therapie ist Lungenkrebs bei Männern aktuell die häufigste und bei Frauen die zweithäufigste Krebstodesursache. Und das Robert-Koch-Institut rechnet unter anderem wegen der Alterung der Gesellschaft mit einem Anstieg der Erkrankungsfälle (S3 Leitlinie Lungenkarzinom 2018).

Thrombembolische Komplikationen sind bei onkologischen Patienten im Allgemeinen und bei Patienten mit Lungenkarzinom im Besonderen ein bedeutender Faktor hinsichtlich Morbidität und Mortalität. Connolly et al. (2012) geben die 1-Jahres-Inzidenz von Thrombembolien bei Patienten mit Lungenkarzinom mit 13,9 % an im Vergleich zu 1,5 % in einer Kontrollkohorte.

Die Mechanismen, welche zu einer erhöhten Inzidenz von Thrombembolien bei Lungenkrebspatienten führen, sind nicht vollständig verstanden, geschweige denn dass sich ein einzelner Pathomechanismus hätte identifizieren lassen. Große Aufmerksamkeit hat die Wissenschaftsgemeinde in der jüngeren Vergangenheit der Rolle von *tissue factor* in der Genese tumorassoziiertes Thrombosen geschenkt. Eine erhöhte Konzentration von *tissue factor* in der systemischen Zirkulation und die Expression von *tissue factor* auf Tumorzellen können hier als wegweisende Erkenntnisse genannt werden (Sousou und Khorana 2009).

Was die klinische Forschung anbelangt, so wurde in mehreren großen Studien geprüft, ob Patienten mit Lungenkarzinom von einer prophylaktischen Antikoagulation profitieren, ohne dass dies bestätigt werden konnte (Ek et al. 2018; Macbeth et al. 2016).

Für die vorliegende Arbeit wurde daher ein funktioneller Ansatz gewählt, um die Hyperkoagulabilität bei Patienten mit Lungenkarzinom darzustellen. Hierzu wurde ein Thrombingenerierungsassay durchgeführt und die Thrombingenerierung von Patienten mit Lungenkarzinom mit derjenigen von gesunden Probanden verglichen. Hierbei sind zwei Aspekte nicht aus den Augen zu verlieren:

Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Thrombingenerierung in der Patientengruppe vor allem schneller abläuft. Weil *tissue factor* maßgeblich ist für die Phase der Initiation im zellbasierten Gerinnungsmodell ist diese Differenz möglicherweise eine Konsequenz von erhöhten *tissue factor*-Konzentrationen in der systemischen Zirkulation von Patienten mit Lungenkrebs. Diese Schlussfolgerung steht im Einklang mit den Ergebnissen von Duchemin et al. (2008): steigende Konzentrationen von *tissue factor* gehen mit einer kürzeren lag time einher. Sie lässt sich auch gut mit den beobachteten Unterschieden zwischen den Messungen mit viel oder wenig Phospholipid vereinbaren: Da die Konzentration von *tissue factor* im Testkit immer gleich war, kann sich ein endogen erhöhter *tissue factor* möglicherweise in Anwesenheit von viel Phospholipid stärker entfalten als bei Messung mit wenig Phospholipid.

Zum anderen sollten aus der vorliegenden Arbeit Konsequenzen gezogen werden für die Konzipierung zukünftiger Studien mit Thrombingenerierungsassays wie Technothrombin® TGA. Die verkürzten Reaktionszeiten in der Tumorgruppe waren nämlich sowohl bei Messung im plättchenreichen, als auch im plättchenarmen Plasma jeweils mit hoher Konzentration von Phospholipiden zu sehen. Das bedeutet, dass für zukünftige, größere, gegebenenfalls multizentrische Studien zu dieser Fragestellung plättchenarmes Plasma verwendet werden kann. Dies erleichtert aufgrund seiner längeren Haltbarkeit die Präanalytik und ermöglicht es, die Proben über weitere Strecken zu transportieren. Allerdings bietet die Methode noch immer viele Schwachstellen wie unterschiedliche Konzentrationen von *tissue factor* und Phospholipiden, unterschiedliche Kalibrierungstechniken und die empfindliche Präanalytik.

Was die Frage nach der Nutzbarmachung der Thrombingenerierung als Biomarker für embolie- oder thrombosegefährdete Patienten anbelangt, konnte diese Arbeit keine relevante Assoziation eines Parameters der Thrombingenerierungskurve mit dem Auftreten von Thrombembolien aufzeigen. Um auf diesem Weg weiter voran zu kommen, könnte es hilfreich sein, in einer zukünftigen Studie die Thrombingenerierung auch im Verlauf der Erkrankung, i.e. unter Chemotherapie, zu bestimmen. Es wäre nämlich interessant zu prüfen, ob die beschriebenen Synergien zwischen Tumor und Hämostase (Ikushima et al. 2016; Falanga et al. 2015; Al Saleh et al. 2018; Akca et al. 2011) sich auch funktionell dahingehend auswirken, dass ein Progress der Tumorerkrankung mit einem Anstieg der Thrombingenerierung und ein Regress mit ihrem Rückgang einher geht. Denn möglicherweise hat die Thrombingenerierung auch das Potential als Indikator für ein Ansprechen der Tumorerkrankung verwendet zu werden.

In der in dieser Studie durchgeführten Subgruppenanalyse zwischen Tumoren in lokal begrenztem und lokal fortgeschrittenem Stadium (T1/2 vs. T3/4; siehe 5.3.2) zeigte sich ein signifikant stärkerer *peak thrombin* in PPP *high* und PPP *low* in der Tumorgruppe, sodass vorsichtig geschlussfolgert werden kann, dass eine größere Tumormasse auch zu einer stärkeren Thrombingenerierung führt. In einer zukünftigen Studie könnte diese These an den einzelnen Histologien des Lungenkarzinoms geprüft werden, denn es ist bekannt, dass diese sich in ihrem biologischen Verhalten unterscheiden.

Aber auch der Vergleich zwischen Tumoren im metastasierten und Tumoren im lokalen Stadium sollte weiterverfolgt werden, denn es gibt Hinweise darauf, dass die Expression von *tissue factor* bei NSCLC im metastasierten Stadium besonders stark ist (Sawada et al. 1999),

sodass sich die Frage stellt, inwiefern dieser Sachverhalt systemisch Einfluss auf die Hämostase hat.

Schlussendlich muss auch bedacht werden, dass die Chemotherapie selbst thrombogen wirken kann. Der Pathomechanismus hierbei ist ebenfalls nicht vollständig verstanden, allerdings ist bekannt, dass ein direkter Endothelschaden durch die Chemotherapie und eine Herabregulierung endogener Antikoagulanzen hierbei eine Rolle spielen (Vitale et al. 2015). Möglicherweise beeinträchtigt dieser Sachverhalt auch die Aussagekraft der in dieser Studie durchgeführten Bestimmung der Thrombingenerierung vor Beginn jeder Therapie.

7 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Thrombingerierung bei Patienten mit Lungenkarzinom

eingereicht von

Philipp Sinn

angefertigt an der

Medizinischen Klinik 1, Abteilung für Pneumologie

Direktor: Prof. Dr. med. Hubert Wirtz

Betreuer: Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Seyfarth

Ko-Betreuer: Prof. Dr. med. Sirak Petros

Dezember 2018

Es ist bekannt, dass thrombembolische Ereignisse, hinter einem Progress der Tumorerkrankung, die häufigste Todesursache bei onkologischen Patienten sind. Bei jenen Patienten, welche eine Thrombembolie erleiden, liegt am häufigsten ein Lungentumor vor, gefolgt von Pankreas- und Kolonkarzinom.

Die Interaktion zwischen Tumor und Hämostase ist vielfach Gegenstand medizinischer Forschung. Hierbei spielt die Expression von *tissue factor* und *cancer procoagulant*, sowie die Sezernierung phospholipidhaltiger Mikropartikel durch Tumorzellen eine bedeutende Rolle.

Das Zellbasierte Gerinnungsmodell teilt die Koagulation in drei Phasen ein: Initiation, Amplifikation, und Propagation. Es beschreibt die *tissue factor*-tragende Zelle als Ausgangspunkt und die Generierung von Thrombin als den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Formierung eines Fibringerinnsels.

Für die vorliegende Arbeit wurde daher ein Thrombingenerierungsassay im plättchenreichen (PRP) und im plättchenarmen Plasma (PPP) durchgeführt. Es wurden Plasmaproben von 100 Patienten mit Lungenkarzinom vor Beginn der Therapie gesammelt und die Thrombingenerierung in diesen Proben den Werten von gesunden Probanden gegenübergestellt. Hierbei zeigte sich, dass die Thrombingenerierung in der Patientengruppe vor allem schneller abläuft. Dieses Resultat wird untermauert durch das Ergebnis einer berechneten *PRP/PPP-Ratio*: Mittels dieses virtuellen Parameters wird der Beitrag der Thrombozyten zum Koagulationsprozess nivelliert. Auch hier waren die Quotienten für *lag time* und *time to peak* in der Tumorgruppe signifikant kleiner. Dies erlaubt den Schluss, dass dem so ist, weil der Tumor als eine zusätzliche Quelle von Phospholipiden und prokoagulatorischen Faktoren wirkt. Bemerkenswert an diesen Ergebnissen ist ebenfalls, dass sich die verkürzte *lag time* und *time to peak* in der Tumorgruppe sowohl bei Messung im plättchenreichen als auch im plättchenarmen Plasma zeigte. Für zukünftige, gegebenenfalls multizentrische Studien kann daher empfohlen werden, nur plättchenarmes Plasma zu verwenden. Dieses ist länger haltbar und es können so etwaige Fehler in der Präanalytik vermieden werden.

Es wurde zudem eine Nachbeobachtung über ein Jahr durchgeführt hinsichtlich des Auftretens einer Thrombose oder Lungenembolie in der Karzinomgruppe. Mittels einer ROC-Analyse wurde geprüft, ob irgendein Parameter der Thrombingenerierungskurve eine signifikante Assoziation mit dem Auftreten thrombembolischer Komplikationen im Krankheitsverlauf hat. Diese Vermutung hat sich allerdings nicht bestätigt. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass einige Einflussfaktoren auf die Hämostase außer Acht gelassen wurden. So erhielten die meisten Patienten während des Beobachtungszeitraums Chemotherapie. Es ist anzunehmen, dass diese das thrombogene Risiko beeinflusst (Vitale et al. 2015).

In drei Subgruppenanalysen wurden Patienten mit metastasiertem oder nicht metastasiertem Lungenkarzinom, mit lokal begrenztem oder lokal fortgeschrittenem Lungenkarzinom, sowie mit NSCLC oder SCLC verglichen. Es ergaben sich Hinweise darauf, dass das Ausmaß der Thrombingerierung möglicherweise mit der Tumormasse, also dem T-Stadium, in Zusammenhang steht.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass thrombembolische Komplikationen bei Tumorpatienten, auch im Kontext einer über die Jahre verbesserten Diagnostik und Therapie von Tumorerkrankungen an Bedeutung gewinnen. Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag dazu, die funktionellen Zusammenhänge zwischen Tumor und Hämostase aufzuklären. Diese Aufklärung ist Bedingung dafür, in Zukunft emboliegefährdete Patienten besser erkennen zu können und vielleicht liefert sie sogar irgendwann einen weiteren Angriffspunkt für die Eindämmung der Tumorerkrankung.

8 Erklärung über die eigenständige Abfassung

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

.....

Datum

.....

Unterschrift

9 Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Philipp Sinn
geb. am 03.11.1985
in Kaltenkirchen

Ärztliche Berufstätigkeit:

seit
06/2017 Arzt in Weiterbildung am Universitätsklinikum Leipzig, Abteilung für Pneumologie

Hochschulstudium:

10/2010 – 12/2016 Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig
08/2012 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2015 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
12/2016 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Promotion:

seit 09/2014 – Prospektive Studie:
 „Thrombingerierung bei Patienten mit Lungenkarzinom“
 Betreuer: Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Seyfarth; Abteilung für
 Pneumologie, Medizinische Klinik 1, Universitätsklinikum
 Leipzig

Abitur:

04/2010 „Abiturprüfung für Nichtschüler“ am Abendgymnasium Marburg

Nicht akademische Berufstätigkeit:

10/2004 – 06/2007 Ausbildung als Tischler in der Möbelwerkstatt Friebe in Kelkheim im Taunus
09/2007 – 03/2008 Anstellung als Tischler in der Schreinerei Ardüser in Davos, Schweiz
09/2008 – 04/2009 Anstellung als Tischler bei The Wood Connection in Windhoek, Namibia

10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Hans-Jürgen Seyfarth bedanken für die Überlassung des Promotionsthemas, welches spannende Einblick in die Interaktion zweier medizinischer Fachbereiche bietet: Onkologie und Hämostaseologie. Desweiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Sirak Petros und Herrn Prof. Hubert Wirtz für wertvolle Denkanstöße.

Mein Dank gilt Familie Siegemund und besonders Herrn Dr. Roland Siegemund für die exzellente Zusammenarbeit mit dem Labor. Ich wünsche Ihnen allen noch lange gute Gesundheit.

Darüber hinaus danke ich den Ärzten der Abteilung für Pneumologie auf den Stationen G021 und G02-2 am Universtätsklinikum Leipzig für die gute Zusammenarbeit bei der Rekrutierung des Patientenkollektivs.

Des Weiteren danke ich allen Patienten, die sich für diese Studie zur Verfügung gestellt haben, obwohl sie wahrlich andere Sorgen gehabt hätten.

Das Studium, diese wissenschaftliche Arbeit und die Ergreifung des Arztberufs überhaupt wäre schlussendlich nicht möglich gewesen, ohne die finanzielle und moralische Unterstützung durch meine Eltern, welche mich in meinem späten Entschluss für diesen Beruf stets bestärkt haben.

11 Literaturverzeichnis

Akca, Hakan; Demiray, Aydin; Tokgun, Onur; Yokota, Jun (2011): Invasiveness and anchorage independent growth ability augmented by PTEN inactivation through the PI3K/AKT/NFkB pathway in lung cancer cells. In: *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 73 (3), S. 302–309. DOI: 10.1016/j.lungcan.2011.01.012.

Al Saleh, Hassan A.; Haas-Neill, Sandor; Al-Hashimi, Ali; Kapoor, Anil; Shayegan, Bobby; Austin, Richard C.; Al-Nedawi, Khalid (2018): Thrombotic characteristics of extracellular vesicles derived from prostate cancer cells. In: *The Prostate*. DOI: 10.1002/pros.23653.

Burns, E. R.; Goldberg, S. N.; Wenz, B. (1993): Paradoxical effect of multiple mild coagulation factor deficiencies on the prothrombin time and activated partial thromboplastin time. In: *American journal of clinical pathology* 100 (2), S. 94–98.

Chew, H. K.; Davies, A. M.; Wun, T.; Harvey, D.; Zhou, H.; White, R. H. (2008): The incidence of venous thromboembolism among patients with primary lung cancer. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 6 (4), S. 601–608. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2008.02908.x.

Chopin, Nicolas; Floccard, Bernard; Sobas, Frederic; Illinger, Julien; Boselli, Emmanuel; Benatir, Farida et al. (2006): Activated partial thromboplastin time waveform analysis: a new tool to detect infection? In: *Critical care medicine* 34 (6), S. 1654–1660. DOI: 10.1097/01.CCM.0000217471.12799.1C.

Connolly, G. C.; Dalal, M.; Lin, J.; Khorana, A. A. (2012): Incidence and predictors of venous thromboembolism (VTE) among ambulatory patients with lung cancer. In: *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 78 (3), S. 253–258. DOI: 10.1016/j.lungcan.2012.09.007.

Crolow, C.; Samulowski, M.; Blum, T.; Kollmeier, J.; Schönfeld, N.; Bittner, R. C. et al. (2013): Häufigkeit thromboembolischer Komplikationen bei Patienten mit Lungenkarzinom. In: *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 67 (8), S. 442–447. DOI: 10.1055/s-0033-1344341.

Debaugnies, France; Azerad, Marie-Agnes; Noubouossie, Denis; Rozen, Laurence; Hemker, H. Coenraad; Corazza, F. et al. (2010): Evaluation of the procoagulant activity in the plasma of cancer patients using a thrombin generation assay. In: *Thrombosis research* 126 (6), S. 531–535. DOI: 10.1016/j.thromres.2010.09.002.

Duchemin, Jérôme; Pan-Petes, Brigitte; Arnaud, Bertrand; Blouch, Marie-Thérèse; Abgrall, Jean-François (2008): Influence of coagulation factors and tissue factor concentration on the thrombin generation test in plasma. In: *Thrombosis and Haemostasis* 99 (4), S. 767–773. DOI: 10.1160/TH07-09-0581.

Eichinger, Sabine; Hron, Gregor; Kollars, Marietta; Kyrle, Paul A. (2008): Prediction of recurrent venous thromboembolism by endogenous thrombin potential and D-dimer. In: *Clinical chemistry* 54 (12), S. 2042–2048. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112243.

Ek, L.; Gezelius, E.; Bergman, B.; Bendahl, P. O.; Anderson, H.; Sundberg, J. et al. (2018): Randomized phase III trial of low-molecular-weight heparin enoxaparin in addition to standard treatment in small-cell lung cancer: the RASTEN trial. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 29 (2), S. 398–404. DOI: 10.1093/annonc/mdx716.

Falanga, Anna; Marchetti, Marina; Russo, Laura (2015): The mechanisms of cancer-associated thrombosis. In: *Thrombosis research* 135, S8-S11. DOI: 10.1016/S0049-3848(15)50432-5.

Goeckenjan, G.; Sitter, H.; Thomas, M.; Branscheid, D.; Flentje, M.; Griesinger, F. et al. (2010): Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. In: *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 64 Suppl 2, e1-164. DOI: 10.1055/s-0029-1243837.

Haidl, Harald; Cimenti, Christina; Leschnik, Bettina; Zach, Doris; Muntean, Wolfgang (2006): Age-dependency of thrombin generation measured by means of calibrated automated thrombography (CAT). In: *Thrombosis and Haemostasis* 2006: 95/5 (May), S. 772–775.

Hemker, H. Coenraad; Dieri, Raed Al; Smedt, Erik de; Béguin, Suzette (2006): Thrombin generation, a function test of the haemostatic thrombotic system. In: *Thromb Haemost.* DOI: 10.1160/TH06-07-0408.

Herold (2017): Innere Medizin.

Hien, Peter (2012): Praktische Pneumologie. 2. Aufl. Dordrecht: Springer.

Ikushima, Soichiro; Ono, Ryu; Fukuda, Kensuke; Sakayori, Masashi; Awano, Nobuyasu; Kondo, Keisuke (2016): Trousseau's syndrome: cancer-associated thrombosis. In: *Japanese journal of clinical oncology* 46 (3), S. 204–208. DOI: 10.1093/jjco/hyv165.

Josso, F.; Prou-Wartelle, O. (1965): Interaction of tissue factor and factor VII at the earliest phase of coagulation. In: *Thrombosis et diathesis haemorrhagica. Supplementum* 17, S. 35–44.

Kadlec, Bohdan; Skrickova, Jana; Merta, Zdenek; Dusek, Ladislav; Jarkovsky, Jiri (2014): The incidence and predictors of thromboembolic events in patients with lung cancer. In: *TheScientificWorldJournal* 2014, S. 125706. DOI: 10.1155/2014/125706.

Keularts, I. M.; Zivelin, A.; Seligsohn, U.; Hemker, H. C.; Beguin, S. (2001): The role of factor XI in thrombin generation induced by low concentrations of tissue factor. In: *Thrombosis and Haemostasis* 85 (6), S. 1060–1065.

Kuderer, Nicole M.; Poniewierski, Marek S.; Culakova, Eva; Lyman, Gary H.; Khorana, Alok A.; Pabinger, Ingrid et al. (2017): Predictors of Venous Thromboembolism and Early Mortality in Lung Cancer: Results from a Global Prospective Study (CANTARISK). In: *The oncologist*. DOI: 10.1634/theoncologist.2017-0205.

Lance, Marcus D. (2015): A general review of major global coagulation assays: thrombelastography, thrombin generation test and clot waveform analysis. In: *Thrombosis journal* 13, S. 1. DOI: 10.1186/1477-9560-13-1.

Langer, H. F.; Gawaz, M.: Thrombozytenadhäsion- und aggregation. In: B. Pötzsch und K. Madlener (Hg.): *Hämostaseologie. Grundlagen, Diagnostik, Therapie*, S. 82–83.

Levi M; Toh CH; Thachil J; Watson HG (2009): Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation: British Committee for Standards in Haematology. In: *Br J Haematol* 145, S. 24–33.

Macbeth, Fergus; Noble, Simon; Evans, Jessica; Ahmed, Sheikh; Cohen, David; Hood, Kerensa et al. (2016): Randomized Phase III Trial of Standard Therapy Plus Low Molecular Weight Heparin in Patients With Lung Cancer: FRAGMENT Trial. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 34 (5), S. 488–494. DOI: 10.1200/JCO.2015.64.0268.

Macfarlane, R. G.; Biggs, R. (1953): A Thrombin Generation Test. The Application in Haemophilia and Thrombocytopenia. In: *Journal of Clinical Pathology* 6 (1), S. 3–8. DOI: 10.1136/jcp.6.1.3.

McMichael, Maureen (2012): New models of hemostasis. In: *Topics in companion animal medicine* 27 (2), S. 40–45. DOI: 10.1053/j.tcam.2012.07.005.

Onkologie, Leitlinienprogramm (2018): S3-Leitlinie Lungenkarzinom.

- Petersen, Iver (2011): The morphological and molecular diagnosis of lung cancer. In: *Deutsches Arzteblatt international* 108 (31-32), S. 525–531. DOI: 10.3238/arztebl.2011.0525.
- Petros, S.; Kliem, P.; Siegemund, T.; Siegemund, R. (2012): Thrombin generation in severe sepsis. In: *Thrombosis research* 129 (6), S. 797–800. DOI: 10.1016/j.thromres.2011.08.004.
- Prandoni, Paolo; Falanga, Anna; Piccioli, Andrea (2005): Cancer and venous thromboembolism. In: *The Lancet. Oncology* 6 (6), S. 401–410. DOI: 10.1016/S1470-2045(05)70207-2.
- Prüller F (2015): 1.4 Thrombelastometrie/graphie (TEM/TEG). In: Interdisziplinäre Gerinnungsgruppe Steiermark (Hg.): *Gerinnung im klinischen Alltag*. 6. Aufl.
- Robert Koch-Institut (RKI) (2016): Kapitel 2: Epidemiologie von Krebserkrankungen – Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016.
- Roberts, Harold R.; Hoffman, Maureane; Monroe, Dougald M. (2006): A cell-based model of thrombin generation. In: *Seminars in thrombosis and hemostasis* 32 Suppl 1, S. 32–38. DOI: 10.1055/s-2006-939552.
- Rucińska, M.; Skrzydlewski, Z.; Zaremba, E.; Furman, M.; Kasacka, I. (1997): Cancer procoagulant (CP) in lung cancer. In: *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku (1995)* 42 Suppl 1, S. 251–253.
- Sawada, M.; Miyake, S.; Ohdama, S.; Matsubara, O.; Masuda, S.; Yakumaru, K.; Yoshizawa, Y. (1999): Expression of tissue factor in non-small-cell lung cancers and its relationship to metastasis. In: *British journal of cancer* 79 (3-4), S. 472–477. DOI: 10.1038/sj.bjc.6690073.
- Scagliotti, Giorgio V.; Longo, Marina; Novello, Silvia (2009): Nonsmall cell lung cancer in never smokers. In: *Current opinion in oncology* 21 (2), S. 99–104. DOI: 10.1097/CCO.0b013e328321049e.
- Schneider, Tobias (2016): Thrombingenerierung und Rotationsthromboelastometrie bei gesunden Erwachsenen mit Datum-signed.
- Siegemund, T.; Scholz, U.; Schobess, R.; Siegemund, A. (2014): Clot waveform analysis in patients with haemophilia A. In: *Hamostaseologie* 34 Suppl 1, S48-52. DOI: 10.5482/HAMO-14-02-0016.

Smith, Stephanie A. (2009): The cell-based model of coagulation. In: *Journal of veterinary emergency and critical care (San Antonio, Tex. : 2001)* 19 (1), S. 3–10. DOI: 10.1111/j.1476-4431.2009.00389.x.

Sousou, Tarek; Khorana, Alok A. (2009): New insights into cancer-associated thrombosis. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29 (3), S. 316–320. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.182196.

Trousseau A (1868): Medizinische Klinik des Hôtel Dieu in Paris. Deutsch bearbeitet v. Dr. L. Culmann. 2. Aufl. (2).

van Veen, J. J.; Gatt, A.; Makris, M. (2008): Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? In: *British journal of haematology* 142 (6), S. 889–903. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07267.x.

Vitale, Carolina; D'Amato, Maria; Calabrò, Paolo; Stanziola, Anna Agnese; Mormile, Mauro; Molino, Antonio (2015): Venous thromboembolism and lung cancer: a review. In: *Multidisciplinary respiratory medicine* 10 (1), S. 28. DOI: 10.1186/s40248-015-0021-4.

Zhang, Yuhui; Yang, Yuanhua; Chen, Wenhui; Guo, Lijuan; Liang, Lirong; Zhai, Zhenguo; Wang, Chen (2014): Prevalence and associations of VTE in patients with newly diagnosed lung cancer. In: *Chest* 146 (3), S. 650–658. DOI: 10.1378/chest.13-2379.

12 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1 Risikofaktoren (RF) für tumorassoziierte Thrombembolien (Ikushima et al. 2016).... | 6 |
| Tabelle 2 Klinische Studien und ihre Angaben zur Inzidenz von Thrombembolien bei Patienten mit Lungenkarzinom..... | 7 |
| Abbildung 1 Klassische Gerinnungskaskade: durch aPTT erfasste Faktoren (rosa hinterlegt), durch PT erfasste Faktoren (blau hinterlegt) und gemeinsam erfasste Faktoren (violett) (Schneider 2016) | 9 |
| Tabelle 3 Phasen des Zellbasierten Gerinnungsmodells..... | 10 |
| Abbildung 2 Das zellbasierte Gerinnungsmodell (Smith 2009)..... | 11 |
| Abbildung 3 Parameter des Thrombogramms: A) lag time (min), B) peak thrombin (nM), C) Endogenes Thrombinpotential (Fläche unter der Kurve), E) time to peak (min), D) maximale Steigung der Kurve i.e. Reaktionsbeschleunigung (Hemker et al. 2006) | 15 |
| Tabelle 4 Neuerkrankungen an Lungenkrebs in Deutschland 2013, zum Vergleich ausgewählte Kennzahlen aus der EU (Robert Koch-Institut (RKI) 2016)..... | 18 |
| Tabelle 5 Sterbefälle an Lungenkrebs in Deutschland 2013, zum Vergleich ausgewählte Kennzahlen aus der EU (Robert Koch-Institut (RKI) 2016)..... | 18 |
| Tabelle 6 TNM-Klassifikation (UICC 2017) des Lungenkarzinoms..... | 22 |
| Tabelle 7 UICC-Stadien des Lungenkarzinoms | 24 |
| Tabelle 8 Stadieneinteilung des SCLC..... | 25 |
| Abbildung 4 Fluoroskan Ascent Fluorometer (Thermolab Systems, Helsinki, Finland)..... | 30 |
| Tabelle 9 Zusammensetzung des TECHNOTHROMBIN® TGA Kit | 31 |
| Tabelle 10 Verdünnungsreihe des Thrombinkalibrators | 32 |
| Tabelle 11 Pipettierschema für die Thrombinkalibrationskurve | 33 |
| Tabelle 12 Pipettierschema für die Probenmessung | 33 |
| Tabelle 13 Statistische Kennzahlen der Tumor- und der Kontrollgruppe; Alter in Jahren | 35 |
| Tabelle 14 Plättchenreiches Plasma mit Reagenz C high: T-Test und multivariate Regression (A = Alter, S = Geschlecht, G = Studiengruppe) | 37 |
| Tabelle 15 Plättchenreiches Plasma mit Reagenz C low: T-Test und multivariate Regression (A = Alter, S = Geschlecht, G = Studiengruppe) | 38 |
| Tabelle 16 Plättchenarmes Plasma mit Reagenz C high: T-Test und multivariate Regression (A = Alter, S = Geschlecht, G = Studiengruppe) | 39 |

Tabelle 17 Plättchenarmes Plasma mit Reagenz C low: T-Test und multivariate Regression (A = Alter, S = Geschlecht, G = Studiengruppe) 40

Abbildung 5 PRP RCH Tumor- vs. Kontrollgruppe; A) lag time B) peak thrombin C) time to peak D) velocity index 41

Abbildung 18 PRP RCL Tumor- vs. Kontrollgruppe; A) lag time B) peak thrombin C) time to peak D) velocity index 42

Abbildung 19 PPP RCH Tumor- vs. Kontrollgruppe; A) lag time B) peak thrombin C) time to peak D) velocity index 43

Tabelle 18 PRP/ PPP-Ratio: Da es sich um einen virtuellen Parameter handelt, wurde keine Logarithmierung durchgeführt; Median (Interquartilbereich) 45

Tabelle 19 Subgruppenanalyse: M0 versus M1, Median (Interquartilbereich) 46

Tabelle 20 Subgruppenanalyse: T1/2 versus T3/4, Median (Interquartilbereich) 48

Tabelle 21 Subgruppenanalyse: SCLC vs. NSCLC; Median (Interquartilbereich) 50

Tabelle 22 Follow-up der Karzinompatienten 52

Tabelle 23 ROC-Analyse 52

Abbildung 8 ROC-Kurve für PRP high AUC, PRP low AUC, PPP high AUC und PPP low AUC ... 53

13 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| α 2M | Alpha 2 Makroglobulin |
| aPTT | aktivierte partielle Thromboplastinzeit |
| AT | Antithrombin |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CaCl ₂ | Calciumchlorid |
| CEA | carcinoembryonale Antigen |
| CTI | Corn trypsin inhibitor |
| DLCO | Diffusionskapazität der Lunge für Kohlenmonoxid |
| ETP | endogenes Thrombinpotential |
| FII | Faktor II (Prothrombin) |

| | |
|------------------|---|
| FIIa | Faktor IIa (Thrombin) |
| FVII | Faktor VII |
| FVIII | Faktor VIII |
| FIX | Faktor IX |
| FX | Faktor X |
| FXI | Faktor XI |
| FXII | Faktor XII |
| FXIII | Faktor XIII |
| FEV ₁ | forcierte Einsekundenkapazität |
| LAE | Lungenarterienembolie |
| LMWH | <i>low molecular weight heparin</i> (niedermolekulares Heparin) |
| Min | Minute |
| μL | Mikroliter |
| NF-κB | nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells |
| nM | nanomolar |
| nm | Nanometer |
| NSE | neuronenspezifische Enolase |
| NSCLC | Non Small Cell Lung Cancer (nicht kleinzelliges Lungenkarzinom) |
| PAI | Plasminogen activator inhibitor |
| PAR-1 | Protease aktivierender Rezeptor 1 |
| PDGF | Platelet derived growth factor |
| pM | picomolar |
| RFU | <i>relative fluorescent units</i> (relative Fluoreszenzeinheiten) |
| PPP | plättchenarmes Plasma |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|---|
| PRP | plättchenreiches Plasma |
| PT | Prothrombinzeit |
| RCH | Reagenz C high |
| RCL | Reagenz C low |
| RF | Risikofaktor |
| s | Sekunde |
| SCLC | Small Cell Lung Cancer (kleinzelliges Lungenkarzinom) |
| TF | Tissue Factor |
| TVT | tiefe Venenthrombose |
| TFPI | Tissue Factor Pathway Inhibitor |
| t-PA | Gewebsplasminogen Aktivator |
| TXA2 | Thromboxan A2 |
| vWF | von Willebrand Faktor |
| VTE | venöse Thrombembolie |
| CYFRA 21-1 | Zytokeratinfragment 21-1 |