

**Untersuchung des Einflusses  
gerinnungsaktiver Präparate  
auf die Proliferation humaner Gliome**

Dissertation

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

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

von Iris Gischel

geboren am 31. August 1984 in Schmalkalden

### **Gutachter**

- 1. Prof. Dr. R. Kalff, Jena**
- 2. Prof. Dr. A. Hochhaus, Jena**
- 3. Prof. Dr. R. Firsching, Magdeburg**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 22. November 2011**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>3</b>
2.1 Zellulärer Aufbau des Gehirns .....	3
2.1.1 Gliazellen .....	3
2.1.2 Astrozyten .....	3
2.1.3 Oligodendrozyten .....	3
2.1.4 Mikrogliazellen .....	3
2.1.5 Ependymzellen .....	3
2.2 Einteilung und Klassifikation der Hirntumore .....	3
2.3 Glioblastoma multiforme .....	5
2.3.1 Klinische Aspekte des Glioblastoms .....	5
2.3.2 Genetische Aspekte des Glioblastoms .....	6
2.4 Das Gerinnungssystem .....	7
2.4.1 Das thrombozytäre System.....	8
2.4.2 Das plasmatische System .....	8
2.5 Pathologische Gerinnung in Gliomen .....	11
2.6 Funktionen und Struktur von Thrombin.....	12
2.7 Die gerinnungsaktiven Präparate .....	13
2.7.1 Faktor X.....	13
2.7.2 Tissucol® .....	13
2.7.3 TachoSil® .....	14
2.7.4 FloSeal®.....	14
2.7.5 TRAP-6 (Thrombin-Rezeptor aktivierendes Peptid).....	15
2.7.6 Heparin und Antithrombin III .....	15
2.7.7 Niedermolekulare Heparine .....	16
2.7.8 PPACK (H-D-Phe-Pro-Arg-Chloromethylketon) .....	16
2.7.9 Hirudin .....	17
2.7.10 Albumin.....	18
2.8 Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) .....	19
<b>3 Zielstellungen der Arbeit.....</b>	<b>21</b>
<b>4 Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
4.1 Materialien und Geräte .....	22

4.1.1	Zellkulturlinien.....	22
4.1.2	Gerinnungsaktivatoren .....	22
4.1.3	Gerinnungsinhibitoren.....	22
4.1.4	Sonstige Substanzen.....	23
4.1.5	Dosis der verwendeten Substanzen .....	23
4.1.6	Verwendete Chemikalien .....	23
4.1.7	Verwendete Geräte .....	24
4.2	Methoden.....	24
4.3	Statistische Auswertung .....	27
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>28</b>
5.1	Applikation der Gerinnungsaktivatoren .....	28
5.1.1	Faktor X.....	28
5.1.2	Thrombinkomponente aus Tissucol® .....	28
5.1.3	TachoSil® .....	29
5.1.4	FloSeal®.....	30
5.1.5	TRAP-6 .....	30
5.2	Applikation der Gerinnungshemmer .....	31
5.2.1	Antithrombin III .....	31
5.2.2	Heparin.....	31
5.2.3	Heparin und Antithrombin III .....	32
5.2.4	Hirudin .....	32
5.2.5	Enoxaparin .....	33
5.2.6	Nadroparin.....	34
5.2.7	PPACK (H-D-Phe-Pro-Arg-Chloromethylketon) .....	34
5.2.8	Kleberkomponente des Tissucol® .....	35
5.3	Applikation anderer Substanzen.....	35
5.3.1	Albumin.....	35
5.4	Kombinationen der Substanzen.....	36
5.4.1	Kombinierte Gabe von Albumin und Enoxaparin.....	36
5.4.2	Kombinierte Gabe von Albumin und Nadroparin.....	37
5.4.3	Kombinierte Gabe von Albumin und Heparin .....	38
5.4.4	Kombinierte Gabe von Albumin und Hirudin.....	39
5.4.5	Kombinierte Gabe von Albumin und PPACK .....	39
5.4.6	Kombinierte Gabe von Antithrombin III und Albumin .....	40
5.4.7	Kombinierte Gabe von Antithrombin III und TachoSil® .....	41
5.4.8	Kombinierte Gabe von Antithrombin III und Thrombin aus FloSeal® .....	42
5.4.9	Kombinierte Gabe von Antithrombin III und Thrombin aus Tissucol® .....	42

5.4.10	Kombinierte Gabe von Antithrombin III + Heparin und Albumin .....	43
5.4.11	Kombinierte Gabe von Antithrombin III + Heparin und TachoSil® .....	44
5.4.12	Kombinierte Gabe von Antithrombin III + Heparin und Thrombin aus FloSeal® .....	45
5.4.13	Kombinierte Gabe von Antithrombin III + Heparin und Thrombin aus Tissucol® .....	45
5.4.14	Kombinierte Gabe von Faktor X und Antithrombin III .....	46
5.4.15	Kombinierte Gabe von Faktor X und Antithrombin III + Heparin .....	47
5.4.16	Kombinierte Gabe von Faktor X und Enoxaparin.....	48
5.4.17	Kombinierte Gabe von Faktor X und Nadroparin.....	48
5.4.18	Kombinierte Gabe von Faktor X und Heparin .....	49
5.4.19	Kombinierte Gabe von Faktor X und Hirudin.....	50
5.4.20	Kombinierte Gabe der Kleberkomponente aus Tissucol® und Albumin.....	50
5.4.21	Kombinierte Gabe der Kleberkomponente aus Tissucol® und TachoSil® .....	51
5.4.22	Kombinierte Gabe der Kleberkomponente aus Tissucol® und Floseal® .....	52
5.4.23	Kombinierte Gabe der Kleberkomponente aus Tissucol® und Thrombin-Tissucol® .....	53
5.4.24	Kombinierte Gabe von TachoSil® und Enoxaparin.....	53
5.4.25	Kombinierte Gabe von TachoSil® und Nadroparin.....	54
5.4.26	Kombinierte Gabe von TachoSil® und Heparin .....	55
5.4.27	Kombinierte Gabe von TachoSil® und Hirudin .....	56
5.4.28	Kombinierte Gabe von TachoSil® und PPACK .....	56
5.4.29	Kombinierte Gabe von Thrombin aus FloSeal® und Enoxaparin .....	57
5.4.30	Kombinierte Gabe von Thrombin aus FloSeal® und Nadroparin.....	58
5.4.31	Kombinierte Gabe von Thrombin aus FloSeal® und Heparin .....	59
5.4.32	Kombinierte Gabe von Thrombin aus FloSeal® und Hirudin .....	59
5.4.33	Kombinierte Gabe von Thrombin aus FloSeal® und PPACK.....	60
5.4.34	Kombinierte Gabe von Thrombin aus Tissucol® und Enoxaparin .....	61
5.4.35	Kombinierte Gabe von Thrombin aus Tissucol® und Nadroparin .....	61
5.4.36	Kombinierte Gabe von Thrombin aus Tissucol® und Heparin.....	62
5.4.37	Kombinierte Gabe von Thrombin aus Tissucol® und Hirudin .....	63
5.4.38	Kombinierte Gabe von Thrombin aus Tissucol® und PPACK.....	63
5.4.39	Kombinierte Gabe von TRAP-6 und PPACK.....	64
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>65</b>
6.1	Einführung.....	65
6.2	Diskussion der verwendeten Methoden .....	67
6.3	Diskussion der Rolle des Fetalen Kälberserums .....	67
6.4	Diskussion der Ergebnisse nach Applikation der Gerinnungsaktivatoren .....	69
6.5	Diskussion der Ergebnisse nach Applikation der Gerinnungsinhibitoren .....	71

6.6	Diskussion der Ergebnisse der kombinierten Gabe der gerinnungsaktiven Substanzen.....	73
6.6.1	Kombinationen mit Faktor Xa.....	73
6.6.2	Kombinationen mit der Kleberkomponente aus Tissucol® .....	74
6.6.3	Kombinationen mit TachoSil® .....	75
6.6.4	Kombinationen mit FloSeal® .....	76
6.6.5	Kombinationen mit der Thrombinkomponente des Tissucol® .....	76
6.6.6	Kombinationen mit Antithrombin III .....	77
6.6.7	Kombinationen von Antithrombin III + Heparin .....	77
6.6.8	Kombination von TRAP-6 und PPACK .....	78
6.6.9	Kombinationen mit Albumin .....	79
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>92</b>

## Abkürzungsverzeichnis

+	-	und
®	-	amtlich registrierte Marke
%	-	Prozent
°C	-	Grad Celsius
Abb.	-	Abbildung
ABE 1	-	Anion Binding Exosite 1
ABE 2	-	Anion Binding Exosite 2
ADP	-	Adenosindiphosphat
5-ALA	-	5-Aminolävulinsäure
Ala	-	Alanin
Arg	-	Arginin
Asn	-	Asparagin
AT III	-	Antithrombin III
ATCC	-	American Type Culture Collection
BCNU	-	Carmustin
bzw.	-	beziehungsweise
ca.	-	circa
Ca	-	Calcium
cm	-	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	-	Quadratcentimeter
cMRT	-	craniale Magnetresonanztomographie
CO <sup>2</sup>	-	Kohlendioxid
Da	-	Dalton
d.F.	-	der Fälle
DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	-	Epidermal Growth Factor Receptor
EORTC	-	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
Faktor Va	-	aktivierter Gerinnungsfaktor V
Faktor VIIa	-	aktivierter Gerinnungsfaktor VII
Faktor IXa	-	aktivierter Gerinnungsfaktor IX
Faktor Xa	-	aktivierter Gerinnungsfaktor X
Faktor XIa	-	aktivierter Gerinnungsfaktor XI

Faktor XIIa	-	aktivierter Gerinnungsfaktor XII
FCS (FBS)	-	Fetal Calf Serum (Fetal Bovine Serum)
g	-	Gramm
Gly	-	Glycin
Gy	-	Gray (Maßeinheit der Energiedosis)
h	-	Stunde
H <sup>2</sup> O	-	Wasser
HIF	-	Hypoxie induzierter Faktor
His	-	Histidin
HMWK	-	High Molecular Weight Kininogen
HSA	-	Humanes Serumalbumin
I.E.	-	Internationale Einheiten
IL-6	-	Interleukin 6
IL-8	-	Interleukin 8
Ile	-	Isoleucin
kDa	-	Kilodalton
KIE	-	Kallidinogenase-Inaktivator-Einheiten
Leu	-	Leucin
LMWH	-	Low Molecular Weight Heparin
LOH	-	Loss of Heterozygosity
Mab 31-2	-	monoklonaler Antikörper
MDM2	-	Tumorsuppressorgen
mg	-	Milligramm
µg	-	Mikrogramm
min	-	Minuten
ml	-	Milliliter
µmol	-	Mikromol
NGF	-	Nerve Growth Factor
NMH	-	niedermolekulares Heparin
nMol	-	Nanomol
O <sup>2</sup>	-	Sauerstoff
PAR	-	Protease Aktivierter Rezeptor
PCR	-	Polymerasekettenreaktion
PDGFR	-	Platelet Derived Growth Factor Receptor



PF 3	-	Plättchenfaktor 3
Phe	-	Phenylalanin
PPACK	-	Phenylalanin-L-Prolyl-L-Arginin-Chloromethylketon
Pro	-	Prolyl
PTEN	-	Phosphatase and Tensin homolog
RB	-	Retinoblastoma-Gen
rpm	-	Rotation per minutes
Ser	-	Serin
SFLLRN	-	Einbuchstabencode für Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn
TF	-	Tissue Factor
Thr	-	Threonin
TNM	-	Tumor Nodes (=Lymphknoten) Metastasen
TRAP-6	-	Thrombin-Rezeptor-aktivierendes Peptid 6
TVT	-	tiefe Beinvenenthrombose
U	-	Units
Val	-	Valin
VEGF	-	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	-	von-Willebrand-Faktor
WHO	-	World Health Organization
z.B.	-	zum Beispiel
ZNS	-	Zentrales Nervensystem

## **1 Zusammenfassung**

Gliome stellen die häufigsten primären Hirntumore dar. Das Glioblastoma multiforme ist als WHO-Grad-IV-Tumor durch einen besonders hohen Grad an Malignität gekennzeichnet. Die bisherige Therapie bestehend aus operativer Exstirpation, Radiatio und Chemotherapie kann nicht zu einer dauerhaften Heilung führen. Die Einführung des Chemotherapeutikums Temozolomid kann jedoch die mediane Überlebenszeit von 12,1 Monate auf 14,6 Monate erhöhen und die 2-Jahres-Überlebensrate von 10% auf 26% anheben (Stupp et al. 2005). Inzwischen überblickt man die 5-Jahres-Überlebensrate, die sich unter der oben genannten Therapie auf 9,8% erhöht hat, verglichen mit der 5-Jahres-Überlebensrate von 1,9% bei einer alleinigen Radiotherapie.

Bereits Trousseau beschrieb 1865 eine veränderte Blutzusammensetzung bei Tumorpatienten, die zu einem gehäuften Auftreten von Thrombosen führt. Auch Ornstein konnte 2002 bestätigen, dass Patienten mit malignen Gliomen vermehrt zu tiefen Beinvenenthrombosen und Lungenembolien neigen (Ornstein, D. L. et al. 2002). Die Inzidenz der TVT variiert sehr stark. Bis zu 60% der Patienten, die an einem Hirntumor operiert werden, können innerhalb der ersten sechs postoperativen Wochen eine TVT entwickeln (Sawaya R. et al. 1992). Doch nicht nur die systemische Blutgerinnung ist bei Glioblastompatienten pathologisch sondern auch im Tumor selbst kann eine Hochregulation des Gerinnungssystems nachgewiesen werden (Rodas 1998), was für die Versorgung und damit das Wachstum des Tumors essenziell ist. Thrombin spielt als Schlüsselenzym der Gerinnungskaskade hierbei eine zentrale Rolle. Kaufmann hatte 1998 nachgewiesen, dass Gliomzellen den Thrombinrezeptor PAR 1 exprimieren, über den Thrombin seine proliferative Wirkung entfalten kann. Hua bestätigte dann mit seinen Studien den wachstumsfördernden Effekt von Thrombin auf Gliomzellen (Hua et al. 2005, 2008; Arbit 2006). Neben Thrombin spielen auch andere von Glioblastomzellen exprimierte Gerinnungsfaktoren wie Faktor X eine wichtige Rolle in Bezug auf das Wachstum der Tumorzellen. Shikamoto bestätigte 1999 die Expression von Faktor X durch Glioblastomzellen (Shikamoto 1999). Dieser kann über die Aktivierung des PAR 2 auf der Oberfläche der Tumorzellen zu einer gesteigerten Proliferation der Zellen führen (Coelho 2003).

Ziele der vorliegenden Arbeit sind es nun zu zeigen, dass medizinisch genutzte thrombinhaltige Präparate wie FloSeal®, TachoSil®, Tissucol®, aber auch der Gerinnungsfaktor X und Albumin sowie das den Thrombinrezeptor aktivierende synthetische Peptid TRAP-6 einen wachstumsfördernden Effekt auf humane Glioblastomzellen haben und dass im Gegensatz dazu gerinnungshemmende Substanzen wie Heparin, Antithrombin III,

Enoxaparin, Nadroparin, Hirudin und PPACK zu einer Proliferationshemmung der Tumorzellen führen können. Weiterhin soll die Auswirkung einer kombinierten Gabe eines Gerinnungsaktivators und –inhibitors auf das Wachstum der Glioblastomzellen untersucht werden. Grundlage für die Versuchsreihen sind die beiden humanen Glioblastomzelllinien U87MG und U373MG. Nach Applikation der zu untersuchenden Substanz erfolgt eine Auszählung der Zellen unter dem Lichtmikroskop mithilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die Zugabe der thrombinhaltigen Substanzen FloSeal®, TachoSil® und Tissucol® zu den Glioblastomzellen führte in allen Versuchsreihen bei beiden Zelllinien zu einer hoch signifikanten Steigerung der Proliferation der Zellen. Auch TRAP-6 und der Gerinnungsfaktor X konnten wie vermutet das Wachstum der Zellen erhöhen. Selbst Albumin als Substanz, die keinen Einfluss auf das Gerinnungssystem hat, führte zu einer Zunahme der Proliferation. Im Gegensatz dazu bewirkte die Applikation der Gerinnungsinhibitoren Heparin, Hirudin, Enoxaparin, Nadroparin, AT III und PPACK in allen Versuchsreihen eine hoch signifikante Reduktion des Wachstums der Glioblastomzellen. Besonders interessant sind die Ergebnisse der kombinierten Gabe eines Aktivators und eines Hemmstoffes der Gerinnung auf die Glioblastomzellen. Der proliferationsfördernde Effekt der thrombinhaltigen Substanzen FloSeal®, TachoSil® und Tissucol® konnte durch zusätzliche Applikation eines Gerinnungshemmers aufgehoben werden. Für die Verwendung dieser Stoffe im Klinikalltag ist dieses Resultat von großer Bedeutung, denn eine zusätzliche Behandlung des Patienten mit einem Antikoagulant könnte dadurch einen positiven Effekt auf das Überleben des Patienten ausüben. In weiteren Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass auch eine Antagonisierung der proliferativen Wirkung von Faktor X durch den Zusatz eines Gerinnungshemmers möglich ist. Wie bereits erwähnt wird der Faktor X durch die Glioblastomzellen selbst exprimiert und bewirkt über PAR 2 eine Neoangiogenese im Tumor. Eine Therapie des Patienten mit einem der untersuchten Gerinnungshemmstoffe kann dazu führen, dass dieser Mechanismus blockiert wird, was zu einer Reduktion des Tumorwachstums führen kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen neue Therapieoptionen für das Glioblastom auf, wobei sie die Resultate von Versuchen in vitro sind und durch klinische Studien überprüft werden müssen.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Zellulärer Aufbau des Gehirns**

#### **2.1.1 Gliazellen**

Gliazellen umgeben als Hüll- und Stützgewebe die Neuronen des ZNS. Man unterscheidet vier Zelltypen: die Astrozyten, die Oligodendrozyten, die Ependymzellen und die Mikroglia (Trepel 2008).

#### **2.1.2 Astrozyten**

Astrozyten sind sternförmige Zellen, die an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind und damit den Übertritt mancher im Blut gelöster Stoffe in das Hirngewebe verhindern. Darüber hinaus besitzen sie eine Stützfunktion und können durch ihre Fähigkeit zur Proliferation an der Ausbildung der sogenannten Glianarben an der Stelle zugrunde gegangenen Hirngewebes beitragen. Weiterhin kontrollieren sie das Elektrolytgleichgewicht im Gehirn und stehen im Stoffaustausch mit den Neuronen (Trepel 2008).

#### **2.1.3 Oligodendrozyten**

Oligodendrozyten bilden mit ihren Fortsätzen die Markscheiden um die Axone und verbessern so die Erregungsleitung (Trepel 2008).

#### **2.1.4 Mikrogliazellen**

Die kleinen Mikrogliazellen werden auch als Hortega-Zellen bezeichnet. Sie besitzen Makrophagen-Funktion und spielen somit eine zentrale Rolle bei immunologischen Prozessen des Gehirns (Trepel 2008).

#### **2.1.5 Ependymzellen**

Ependymzellen kleiden die inneren Liquorräume des Gehirns, die Ventrikel, aus und sind an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Trepel 2008).

### **2.2 Einteilung und Klassifikation der Hirntumore**

Aufgrund der besonderen Lage und Eigenschaften der Hirntumore erscheint die für sonstige Tumorerkrankungen übliche Einteilung nach der TNM-Klassifikation wenig sinnvoll. Unabhängig von der Größe des Primärtumors können bei Hirntumoren auch kleinere Prozesse infolge einer Hirndrucksteigerung zu einer lebensbedrohlichen Komplikation für den Patienten führen. Daher entschied die WHO bereits 1979 eine Gradierung nach histologischen

Gesichtspunkten vorzunehmen, die zuletzt 2007 in einer überarbeiteten Fassung von Luis et al. erneut veröffentlicht wurde (Tabelle 1).

Grad 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- geringe Zelldichte</li> <li>- keine Kernunregelmäßigkeit</li> <li>- keine Mitosen</li> <li>- keine Nekrosen</li> </ul>
Grad 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- mäßige Zelldichte</li> <li>- geringe Kernunregelmäßigkeit</li> <li>- einige typische Mitosen</li> <li>- keine Nekrosen</li> </ul>
Grad 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- erhebliche Zelldichte</li> <li>- Kernpolymorphien</li> <li>- zahlreiche Mitosen</li> <li>- manchmal Nekrosen</li> </ul>
Grad 4	<ul style="list-style-type: none"> <li>- hohe Zelldichte</li> <li>- starke Zell- und Kernpolymorphien</li> <li>- zahlreiche atypische Mitosen</li> <li>- ausgedehnte Nekrosen</li> </ul>

**Tabelle 1: Grading der Hirntumore (modifiziert nach Louis et al. 2007)**

Gliome gehören zu den Hirntumoren neuroepithelialen Ursprungs. Zu ihnen zählen weiter Astrozytome, Oligodendrogliome, ependymale Tumore sowie Mischgliome. Gliome stellen die häufigsten primären hirneigenen Tumore dar. Weiterhin unterscheidet man die sekundären, außerhalb des ZNS entstandenen Hirntumore, die zum Beispiel durch Metastasierung in den Schädel gelangt sind. So unterteilt die WHO in der Klassifikation aus dem Jahr 2007 die Hirntumore in Abhängigkeit des Ursprungs ihrer Zelltypen (Tabelle 2).

<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <u>Tumoren des neuroepithelialen Gewebes</u> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.1. Astrozytäre Tumoren           <ol style="list-style-type: none"> <li>1.1.1. pilozytisches Astrozytom</li> <li>1.1.2. diffuses Astrozytom</li> <li>1.1.3. anaplastisches Astrozytom</li> <li>1.1.4. Glioblastom</li> </ol> </li> <li>1.2. Oligodendrogliale Tumoren           <ol style="list-style-type: none"> <li>1.2.1. Oligodendrogliom</li> <li>1.2.2. anaplastisches Oligodendrogliom</li> </ol> </li> <li>1.3. Oligoastrozytische Tumoren           <ol style="list-style-type: none"> <li>1.3.1. Oligoastrozytom</li> <li>1.3.2. anaplastisches Oligoastrozytom</li> </ol> </li> <li>1.4. Ependymale Tumoren           <ol style="list-style-type: none"> <li>1.4.1. Subependymom</li> <li>1.4.2. myxopapilläres Ependymom</li> <li>1.4.3. Ependymom</li> <li>1.4.4. anaplastisches Ependymom</li> </ol> </li> <li>1.5. Plexus-choroideus-Tumoren           <ol style="list-style-type: none"> <li>1.5.1. Plexuspapillom</li> <li>1.5.2. Plexuskarzinom</li> </ol> </li> <li>1.6. Andere neuroepitheliale Tumore           <ol style="list-style-type: none"> <li>1.6.1. Astroblastom</li> <li>1.6.2. Angiozentrisches Gliom</li> </ol> </li> <li>1.7. Neuronale und gemischt neuronal-gliale Tumoren           <ol style="list-style-type: none"> <li>1.7.1. Gangliozytom</li> <li>1.7.2. Gangliogliom</li> </ol> </li> <li>1.8. Tumoren des Pinealisparenchyms           <ol style="list-style-type: none"> <li>1.8.1. Pineozytom</li> <li>1.8.2. Pineoblastom</li> </ol> </li> <li>1.9. Embryonale Tumoren           <ol style="list-style-type: none"> <li>1.9.1. Primitive Neuroektodermale Tumoren (PNET)</li> </ol> </li> </ol> </li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>2. <u>Tumoren der peripheren Nerven</u> <ol style="list-style-type: none"> <li>2.1. Schwannom</li> <li>2.2. Neurofibrom</li> <li>2.3. Perineurinom</li> </ol> </li> <li>3. <u>Tumoren der Meningen</u> <ol style="list-style-type: none"> <li>3.1. Tumoren der meningoethelialen Zellen           <ol style="list-style-type: none"> <li>3.1.1. Meningeom</li> </ol> </li> <li>3.2. Mesenchymale Tumoren           <ol style="list-style-type: none"> <li>3.2.1. Lipom</li> <li>3.2.2. Angiolipom</li> <li>3.2.3. Liposarkom</li> <li>3.2.4. Leiomyom/ -sarkom</li> <li>3.2.5. Rhabdomyom/ -sarkom</li> </ol> </li> <li>3.3. Primär melanozytäre Läsionen           <ol style="list-style-type: none"> <li>3.3.1. Malignes Melanom</li> </ol> </li> <li>3.4. Andere Neubildungen der Meningen           <ol style="list-style-type: none"> <li>3.4.1. Hämangioblastom</li> </ol> </li> </ol> </li> <li>4. <u>Lymphome und hämatopoetische Neubildungen</u> <ol style="list-style-type: none"> <li>4.1. Malignes Lymphom</li> <li>4.2. Plasmozytom</li> </ol> </li> <li>5. <u>Keimzelltumoren</u> <ol style="list-style-type: none"> <li>5.1. Germinom</li> <li>5.2. Chorionkarzinom</li> <li>5.3. Teratom</li> <li>5.4. gemischte Keimzelltumoren</li> </ol> </li> <li>6. <u>Tumoren der Sellaregion</u> <ol style="list-style-type: none"> <li>6.1. Kraniopharyngeom</li> <li>6.2. Hypophysenadenom</li> </ol> </li> <li>7. <u>Metastasen</u></li> <li>8. <u>Tumorähnliche Läsionen</u></li> </ol>
---	--

Tabelle 2: WHO-Klassifikation der Hirntumore (modifiziert nach Louis et al. 2007)

## 2.3 Glioblastoma multiforme

### 2.3.1 Klinische Aspekte des Glioblastoms

Der häufigste maligne astrozytäre Tumor ist das Glioblastoma multiforme, der WHO-Grad IV-Tumor. Er zeichnet sich histologisch insbesondere durch eine hohe Anzahl an Kernatypien, hohe Mitoseraten, Gefäßproliferationen und Nekrosen aus. Die Inzidenz beträgt etwa 6/100000/Jahr. Er tritt vor allem bei Männern zwischen dem 45.- 70. Lebensjahr auf. Das Verhältnis Männer zu Frauen beträgt 1,5:1 (Ohgaki et Kleihues 2005). Glioblastome sind meist in den Großhirnhemisphären lokalisiert, infiltrieren aber oft die Basalganglien und

neigen dazu, sich in die kontralaterale Hemisphäre auszubreiten. Aufgrund dieser Eigenschaft wird das Glioblastom auch als Schmetterlingsgliom bezeichnet. Typischerweise zeichnen sich Glioblastome durch eine kurze, ca. drei Monate dauernde klinische Symptomatik aus. Die Patienten werden durch Persönlichkeitsveränderungen, unspezifische neurologische Symptome und zunehmenden Hirndruck auffällig. In der Bildgebung mittels cMRT ist ein unregelmäßig konfigurierter Tumor mit einer Kontrastmittel-anreichernden peripheren Ringzone als Ausdruck einer Störung der Blut-Hirn-Schranke zu sehen. Im Zentrum des Tumors befindet sich eine hypointense Zone als Zeichen der ausgeprägten Tumornekrose. Um die zentrale Nekrose herum findet man eine radiäre Ansammlung von Tumorzellen, die als Pseudopalisaden bezeichnet werden (Brat et al. 2004). Um den Tumor bildet sich oft ein ausgeprägtes perifokales Ödem.

Die Standardtherapie des Glioblastoms ist die komplette operative Exstirpation des Tumors mit anschließender Radiatio mit 54 bis 60 Gy Gesamthöchstdosis (Laperriere 2002), kombiniert mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid. Die Radikalität der Operation stellt hierbei einen wichtigen prognostischen Faktor für die Patienten dar (Hess 1999). Die fluoreszenzgestützte Operation maligner Gliome verbessert die Rate kompletter Resektionen und erhöht die Rate der Progressionsfreiheit nach 6 Monaten (Stummer et al. 2006). Wie in der EORTC-Studie gezeigt, verlängert Temozolomid die mediane Überlebenszeit von 12,1 Monate auf 14,6 Monate und erhöht die 2-Jahres-Überlebensrate von 10% auf 26% (Stupp et al. 2005, Dresemann 2010). Inzwischen überblickt man die 5-Jahres-Überlebensrate, die sich unter der oben genannten Therapie auf 9,8% erhöht hat, verglichen mit der 5-Jahres-Überlebensrate von 1,9% bei einer alleinigen Radiotherapie (Stupp et al. 2009).

Es ist bekannt, dass bei Patienten mit Glioblastomen postoperativ eine erhöhte Thrombemboliegefahr besteht (Brandes et al. 1997; Ornstein et al. 2002). Deshalb ist die Prophylaxe tiefer Beinvenenthrombosen mittels niedermolekularen Heparinen durchzuführen (Marras 2000; Auguste et al. 2003, 2004; Otten 2000). Trotz neuer Therapieansätze ist der progrediente Verlauf der Erkrankung bisher nicht dauerhaft aufzuhalten.

### **2.3.2 Genetische Aspekte des Glioblastoms**

Genetische Veränderungen werden für viele gliale Tumore beschrieben (Shapiro 2001). Die Entstehung der Glioblastome erfolgt entweder primär, in 80% der Fälle, oder sekundär aus niedriggradigen oder anaplastischen Astrozytomen. Diese zwei Entstehungsformen unterscheiden sich insbesondere durch molekulargenetische Faktoren (Kleihues et Cavenee, 1997; Kleihues et Ohgaki, 1999). Das p53-Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Zelle

bei besonderem Stress in der G1-Phase des Zellzyklus ruhen lassen oder ihre Apoptose induzieren kann. Besonders bei sekundären Glioblastomen ist dieses Gen mutiert (Abb. 1).

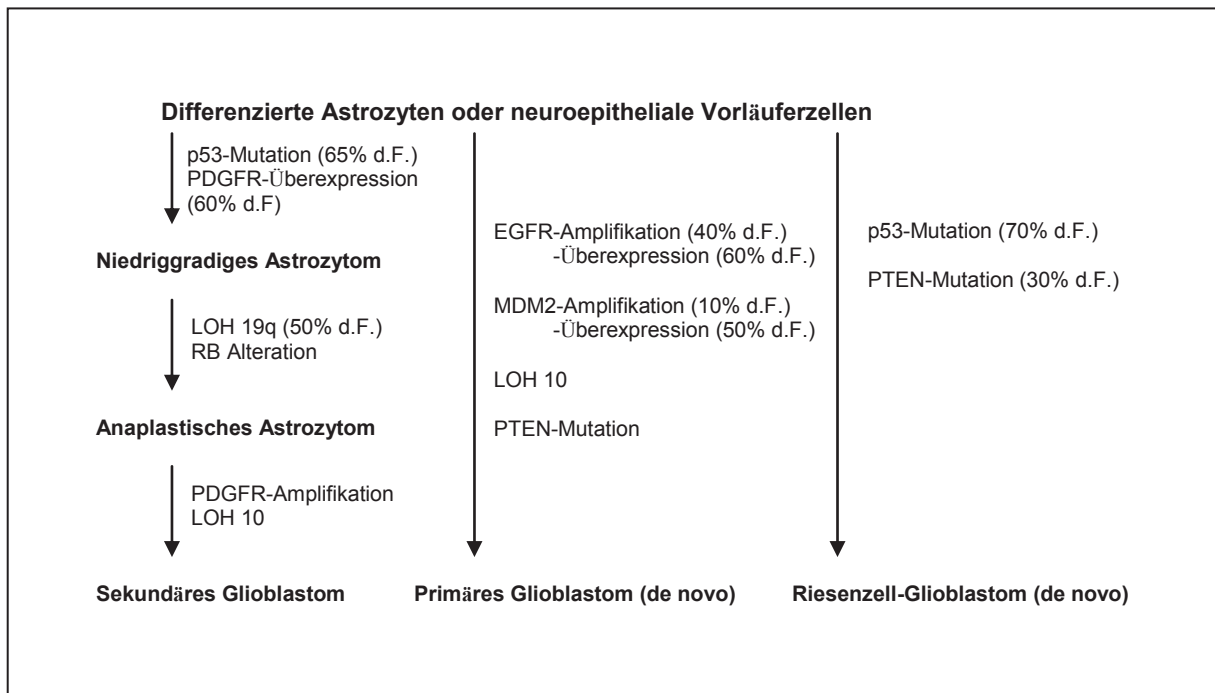


Abb. 1: Genetische Progressionswege zum Glioblastom (modifiziert nach Kleihues et Ohgaki 1999)

In etwa 65% der sekundär entstandenen Glioblastome ist ein mutiertes p53-Protein zu finden. Folglich teilen sich die Tumorzellen unkontrolliert. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist die EGFR-Amplifikation bzw. -Überexpression, vor allem beim de-novo-Glioblastom. In etwa 60% der primär entstandenen Glioblastome findet man eine EGFR-Amplifikation. Der EGFR ist ein Transmembranrezeptor mit Tyrosinkinase-Aktivität, der das Zellwachstum stimuliert und die Apoptose verhindert. Außerdem treten primäre Glioblastome meist bei älteren Patienten auf. Sie zeigen unter anderem auch PTEN-Mutationen, MDM2-Amplifikation sowie einen Verlust des Chromosoms 10. Sekundäre Glioblastome hingegen entwickeln sich meist bei jüngeren Patienten und weisen eine PDGFR-Überexpression auf.

## 2.4 Das Gerinnungssystem

Mit Hilfe der Hämostase schützt sich der menschliche Körper bei Gewebeverletzungen gegen den Blutverlust. Das Zusammenspiel verschiedener Komponenten bewirkt die Gerinnung des Blutes. So sind vaskuläre, zelluläre und plasmatische Prozesse an der Koagulation beteiligt. Hierbei wird eine primäre Hämostase, die die vaskulären und zellulären Vorgänge betrifft, von einer sekundären, der plasmatischen Blutstillung unterschieden. Im Anschluss daran



bewirkt die Fibrinolyse als Antikoagulation eine Auflösung des gebildeten Gerinnsels. Bei Gesunden stehen diese beiden Vorgänge im Gleichgewicht. Kommt es jedoch beispielsweise durch maligne Prozesse zu Fehlregulationen, können daraus entweder eine Blutungsneigung oder eine Hyperkoagulabilität des Blutes und somit eine Thromboseneigung resultieren (Francis et al. 1998).

#### **2.4.1 Das thrombozytäre System**

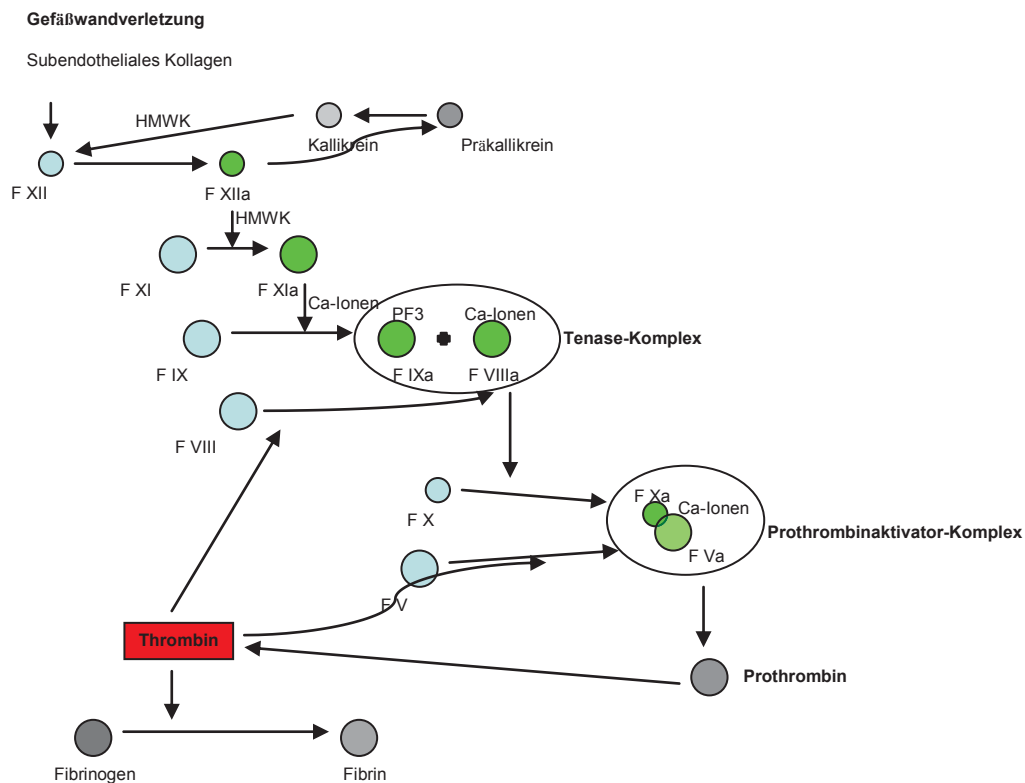
Bei einer Verletzung der Gefäßwand kommt es zu einer Adhäsion von Thrombozyten an subendotheliales Kollagen. Dieser Vorgang wird durch den von-Willebrand-Faktor (vWF) vermittelt. Er bindet an die freiliegenden Kollagenfasern unter dem verletzten Endothel und über die Oberflächenproteine Ib/IX und IIb/IIIa an die Thrombozyten, was die Anheftung des entstehenden Thrombus an das Endothel zur Folge hat. Währenddessen werden die Thrombozyten aktiviert, die daraufhin weiteren vWF und andere Mediatoren, wie z.B. ADP und Serotonin freisetzen, was zu einer erneuten Aggregation von Thrombozyten an die bereits an der Gefäßwand adhärenen Thrombozyten führt. Darüber hinaus werden aus der Thrombozytenmembran Phospholipide wie beispielsweise PF 3 freigesetzt, an deren Oberfläche Thrombin gebildet wird. Innerhalb weniger Minuten wird somit der primäre Gefäßverschluss erreicht. Der Thrombus im engeren Sinne ist ein Gebilde aus Thrombozytenaggregaten, Fibrin, Leukozyten und Erythrozyten und entsteht sekundär durch die Prozesse des plasmatischen Gerinnungssystems.

#### **2.4.2 Das plasmatische System**

Man unterteilt die Prozesse der plasmatischen Gerinnung in einen intrinsischen und extrinsischen Weg. Das Schlüsselenzym beider Gerinnungskaskaden ist Thrombin (Dahlback 2000).

Der intrinsische Weg wird bei einer Gefäßwandverletzung aktiviert. Hierbei werden negativ geladene, subendotheliale Strukturen wie z.B. Kollagen freigelegt. Dadurch werden innerhalb von Minuten die Faktoren XII und XI zu XIIa und XIa aktiviert. Dieser Vorgang wird als Kontaktaktivierung bezeichnet. Faktor XIIa aktiviert darüber hinaus Präkallikrein zu Kallikrein. Dieses aktiviert als Kofaktor zusammen mit dem high molecular weight kininogen HMWK in einer Verstärkerschleife erneut Faktor XII zu XIIa, was als Kallikrein-Loop bezeichnet wird. Faktor XIIa aktiviert den Faktor XI zu XIa, der dann mit Hilfe von Kalziumionen den Faktor IX zu IXa aktiviert. Mit dem Kofaktor VIIIa aktiviert Faktor IXa den Faktor X zu Xa. Bei dieser Reaktion bilden Faktor VIIIa, Kalziumionen und der

Plättchenfaktor 3 den Tenase-Komplex, der als Katalysator eine Beschleunigung der Reaktion um das 200.000fache bewirkt. Nun beginnt mit der Bildung des Prothrombinaktivator-Komplexes bestehend aus Faktor Xa, Kofaktor Va, Kalziumionen und Phospholipiden die gemeinsame Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen Systems. Dabei wird durch Faktor Xa Prothrombin in Thrombin hydrolytisch gespalten, welches dann wiederum die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin bewirkt (Abb. 2).



**Abb. 2: Intrinsisches Gerinnungssystem**

Bei den Prozessen des extrinsischen Systems werden keine aktivierenden Oberflächen benötigt. Hier kommt es bereits innerhalb von Sekunden nach der Verletzung der Gefäßwand zu einer Freisetzung von Gewebefaktor (TF). Dieser bildet zusammen mit Phospholipiden das Gewebsthromboplastin, welches als Kofaktor für den aktivierten Faktor VII dient. Er katalysiert die Umwandlung von Faktor X in Xa und somit die Aktivierung der gemeinsamen Endstrecke. Es müssen bereits geringe Mengen an Faktor VII vorliegen, um das System in Gang zu setzen. Wird dann aber einmal Faktor Xa gebildet, kann dieser zusammen mit Gewebsthromboplastin den Faktor VII zu VIIa aktivieren und somit die Reaktion verstärken (Abb. 3).

Aktivierung innerhalb von Sekunden

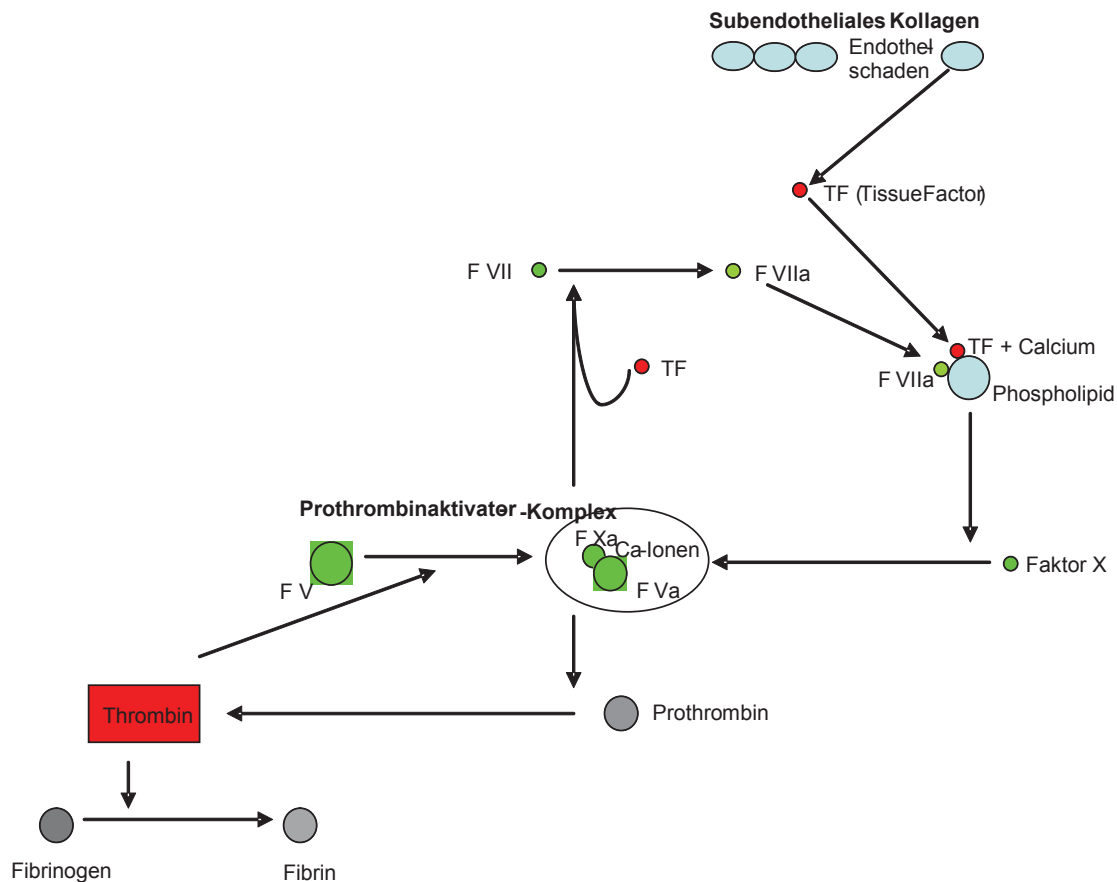


Abb. 3: Extrinsisches Gerinnungssystem

Aus heutiger Sicht ist jedoch die Unterscheidung zwischen intrinsischem und extrinsischem System überholt (Skript zur Vorlesung Transfusionsmedizin/Hämostaseologie Universität Erlangen). Da eine exakte Trennung von plasmatischer und zellulärer Gerinnung nicht immer möglich ist, spricht man heute von einem „Zell-basierten Modell der Gerinnung“, bei dem der Ablauf der Hämostase in drei Phasen gegliedert wird. In der Initiation, der ersten Phase, kommt es zur Schlüsselreaktion, dem Kontakt von TF-tragenden Zellen, also den Fibroblasten mit Blutplasma. Daraufhin wird der Faktor VII nach der Bindung an den TF aktiviert. Das führt zu einer Aktivierung der Faktoren X, IX und V auf der Zelloberfläche. So kann über die Prothrombinase weiterhin Thrombin entstehen. Anschließend folgt die Amplifikation als zweite Phase. Hier kommt es durch das Thrombin zu einer Verstärkung der Adhäsion und Thrombozytenaktivierung. Auf der Oberfläche der Thrombozyten werden die Faktoren V, VIII und XI aktiviert. Nun schließt sich die Propagation als dritte Phase an. Es kommt zu einem „Thrombinburst“ als Folge von vermehrter Tenase- und Prothrombinasebildung.

## 2.5 Pathologische Gerinnung in Gliomen

Bereits 1865 beschrieb der französische Internist Armand T. Trousseau das Phänomen der „Phlegmasia alba dolens“ als eine mögliche Manifestationsform gastrointestinaler Tumore. Er erkannte Veränderungen der Blutzusammensetzung, die insbesondere bei Tumorleiden zu Thrombosen führten. Auch Francis bestätigte 1998 ein erhöhtes Auftreten thromboembolischer Ereignisse bei Tumorpatienten als Ausdruck einer gestörten Gerinnung (Francis et al. 1998). Inzwischen wurde auch durch klinische Studien bestätigt, dass Patienten mit malignen Gliomen vermehrt zu tiefen Beinvenenthrombosen und Lungenembolien neigen (Ornstein et al. 2002; Lee 2003). Die Inzidenz der TVT variiert sehr stark, bis zu 60% der Patienten, die an einem Hirntumor operiert werden, können innerhalb der ersten sechs postoperativen Wochen eine TVT entwickeln (Sawaya R. et al. 1992; Vukovich 1997). Durchschnittlich betrifft es ca. 20-30% der Patienten mit einem malignen Gliom (Jenkins et al. 2010).

Es gibt zwei molekulare Erscheinungen in malignen Gliomen, die zu einer pathologischen Gerinnung führen. Eine VEGF-Überexpression (Sciacca 2004) und ein PTEN-Verlust (Rong 2005). Dies führt zu einer Überexpression von TF und damit einer gesteigerten Angiogenese (Takano 2000). Hamada bestätigte 1996 die Expression von TF durch Gliomzellen und beschrieb die Zunahme der TF-Konzentration mit steigender Malignität des Tumors. Das heißt, dass die höchste TF-Konzentration beim Glioblastom zu finden ist (Hamada et al. 1996). Dies bewirkt über eine vermehrte Bildung von Thrombin aus Prothrombin die beschriebene Hyperkoagulabilität (Tehrani et al. 2008).

Um die bei Glioblastomen typische Tumornekrosezone herum findet man sogenannte „Pseudopalisaden-Zellen“, die proangiogenetische Faktoren sezernieren und damit die TF-Expression beeinflussen (Jenkins et al. 2010). An der Ausbildung dieser Pseudopalisaden ist die aktive Migration der Gliomzellen in das umliegende Gewebe zu erkennen (Rong et al. 2006). Innerhalb der Tumornekrosezone wird durch die dort vorliegende lokale Hypoxie der hypoxieinduzierbare Faktor (HIF) produziert, der wiederum zur Bildung von proangiogenetischem VEGF führt (Brat et al. 2004). Auch die Überexpression des EGFR in dieser Region bewirkt eine erhöhte TF-Expression (Rong et al. 2009). Dadurch kommt es zu einer vermehrten Bildung von Thrombin innerhalb des Tumors (Yamahata et al. 2002). Es entsteht aus Prothrombin, das aufgrund der erhöhten Gefäßpermeabilität vermehrt in den Tumor gelangt (Hua et al. 2005). Neben Prothrombin exprimieren Tumorzellen auch andere Gerinnungsfaktoren wie z.B. Faktor VII, Faktor IX und Faktor X (Nowak 2007). Darüber hinaus gibt es in Karzinomzellen das so genannte Cancer Procoagulant, eine

Zysteinendopeptidase, die direkt den Faktor X aktiviert. Dieser weist eine andere räumliche Struktur auf als der Faktor Xa im Prothrombinasekomplex des normalen Gerinnungssystems und bewirkt über Prothrombin die Bildung von Thrombin (Nowak 2007).

## 2.6 Funktionen und Struktur von Thrombin

Thrombin ist eine Serinprotease und das Schlüsselenzym der Blutgerinnung. Es spaltet Fibrinogen zu Fibrin, was den finalen Vorgang bei der Koagulation darstellt und zur Bildung des Gerinnsels führt (Löffler 2003). Weiterhin hat Thrombin vielfältige zellbiologische Funktionen, die für das Wachstum von Tumorzellen essenziell sind. Über Bindung an seinen Rezeptor, den PAR, übt es einen proliferativen Effekt auf glatte Gefäßmuskelzellen aus (Stouffer 1998). Es erhöht darüber hinaus die Bildung und Sekretion von NGF (Neveu 1993) und VEGF (Xu et al. 2009, Tsopanoglou 1999). Dadurch kommt es zur Neoangiogenese, was eine wichtige Voraussetzung für das Tumorstadium ist. Außerdem verursacht es durch seine mitogene Aktivität die Produktion extrazellulärer Matrix und kann so die Tumormasse erhöhen (Hua et al. 2005). Weiterhin ist es an der Ausbildung des für Glioblastome typischen Hirnödems beteiligt (Lee 1996).

Thrombin besteht aus zwei Proteinketten, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die A-Kette enthält 36 Aminosäuren, die B-Kette enthält 259 Aminosäuren. Es verfügt über bestimmte Oberflächenstrukturen, die für die Bindung der Substrate oder Inhibitoren wichtig sind (Abb. 4), die Anionbindungsregionen 1 und 2 (ABE 1, 2). Fibrinogen und Hirudin binden an die ABE 1, Heparin bindet an die ABE 2 (Pötzsch 2010).

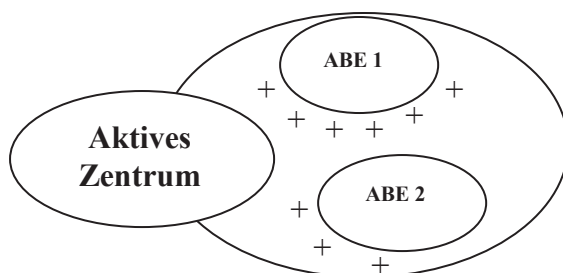


Abb. 4: Darstellung des aktiven Zentrums und der Substratbindungsregionen des Thrombin (modifiziert nach Pötzsch 2010)

## 2.7 Die gerinnungsaktiven Präparate

### 2.7.1 Faktor X

Der Gerinnungsfaktor X wird auch als Thrombokinasen oder Stuart-Power-Faktor bezeichnet. Er ist eine Serinprotease mit einem molekularen Gewicht von 59 kDa (Löffler 2003) und wird Vitamin K-abhängig in der Leber synthetisiert. Er gehört zu den  $\alpha$ -Globulinen und besteht aus einer schweren und einer leichten Kette, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die Aktivierung erfolgt durch die extrinsische oder intrinsische Tenase durch Abspaltung eines 52-Aminosäuren-Abspaltungspeptids von der schweren Kette. Der aktivierte Faktor Xa führt zur Aktivierung des Prothrombins in Thrombin (Pötzsch 2010). Außerdem wirkt der Faktor X über den von Glioblastomzellen exprimierten Rezeptor PAR 2 und bewirkt so eine Proliferationssteigerung der Tumorzellen (Coelho 2003)

### 2.7.2 Tissucol®

Tissucol® ist ein biologischer Zweikomponentenkleber bestehend aus einer Fertigspritze mit Kleberproteinlösung und einer Spritze mit Thrombinlösung (Fachinformation Baxter) (Tabelle 3).

Kleberproteinlösung	Humanplasmaproteinfraktion:	160-240 mg
	Fibrinogen:	140-220 mg
	Blutgerinnungsfaktor XIII:	20-100 I.E.
	Plasmafibronectin:	4-18 mg
	Aprotinin (bovin):	6000 KIE
Thrombinlösung	Thrombin (human):	1000 I.E.
	Kalziumchlorid x 2H <sub>2</sub> O:	11,76 mg

Tabelle 3: Zusammensetzung Tissucol®

Tissucol® findet im klinischen Alltag Anwendung bei der Gewebeklebung zur Versorgung chirurgischer Nähte oder bei der Abdichtung von Membrandefekten. Darüber hinaus wird dieser Fibrinkleber zur intraoperativen Blutstillung bei diffusen Blutungen, wie sie bei der Exstirpation eines Glioblastoms auftreten können eingesetzt. Das in der Thrombinlösung enthaltene Thrombin bewirkt die Umwandlung des in der Kleberproteinlösung enthaltenen Fibrinogen zu Fibrin und eine Aktivierung des Faktor XIII. Dieser bildet kovalente Bindungen zwischen den Fibrinmonomeren und verwandelt so das zunächst harnstofflösliche Fibrin mit Hilfe der Kalziumionen in polymeres, harnstoffunlösliches Fibrin. Dies ist Voraussetzung für den Wundverschluss. Ein weiterer Bestandteil der Kleberproteinlösung ist Aprotinin, ein aus 58 Aminosäuren bestehender Serinprotease-Inhibitor. Die höchste Affinität hat Aprotinin zu den Serinproteasen Trypsin und Plasmin aber auch zu Thrombin (Day et al.

2006). Daraus resultiert eine Hemmung der Fibrinolyse (Aktories 2009) und in geringerem Ausmaß eine Hemmung der Koagulation. Aprotinin wurde im klinischen Alltag zur Reduktion des Blutverlustes bei Bypassoperationen eingesetzt, was vor allem auf die Plasminhemmung zurückzuführen ist (Day et al. 2006). Weiterhin ist bekannt, dass Aprotinin anti-inflammatorisch wirkt. Day et al. zeigten 2006, dass eine Aktivierung von Endothelzellen durch Thrombin mithilfe von Aprotinin über Antagonisierung des Thrombinrezeptors PAR-1 in vitro gehemmt werden kann.

### 2.7.3 TachoSil®

TachoSil® ist ein Schwamm, der mit Fibrinogen und Thrombin beschichtet ist (Fachinformation NYCOMED) (Abb. 5).



Abb. 5: TachoSil®

Er enthält pro cm<sup>2</sup> 5,5mg Fibrinogen vom Menschen und 2 I.E. Thrombin vom Menschen. Sie sind als trockene Beschichtung auf der Oberfläche des Kollagenschwammes aufgetragen. Bei Kontakt mit Flüssigkeiten lösen sich die Komponenten aus der Beschichtung und bewirken dadurch eine lokale Hämostase. So kommt es zum Wundverschluss. Weitere Bestandteile des Schwammes sind laut Herstellerangaben Kollagen, Albumin, Ribovlavin, Natriumchlorid, Natriumcitrat und L-Argininhydrochlorid in unbekannter Dosierung.

### 2.7.4 FloSeal®

FloSeal® besteht aus einer bovinen Gelatine-Matrix und einer humanen Thrombin-Komponente (Tabelle 4) (Abb. 6). Vor dem Gebrauch muss das Thrombin der Gelatine-Matrix zugesetzt werden (Fachinformation Baxter).

Gelatine-Matrix	Thrombin-Komponente
Gelatine-Matrix: 5ml	Humanes Thrombin: 2500 I.E. Kalziumchlorid-Lösung: 200µmol

Tabelle 4: Zusammensetzung FloSeal®

FloSeal® wird intraoperativ zur Blutstillung eingesetzt. Man appliziert es auf das blutende Gewebe. Innerhalb von 2min kommt es zur Ausbildung eines Fibringerinnsels, das den Gewebedefekt verschließt.



Abb. 6: FloSeal®

### 2.7.5 TRAP-6 (Thrombin-Rezeptor aktivierendes Peptid)

TRAP-6 gehört zu den Thrombin-Rezeptor aktivierenden Peptiden. Es hat die Aminosäurestruktur SFLLRN (Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn). Analysen haben gezeigt, dass ein Minimum von fünf Aminosäuren zur Aktivierung des Thrombinrezeptors notwendig ist (Scarborough et al. 1992). So kann sich das synthetisch hergestellte Peptid an die Aminosäuren 42-44 des Thrombinrezeptors anlagern, diesen damit aktivieren und so die Funktionen von Thrombin imitieren (Johnson 1998). Besonders die für das Tumorwachstum essentielle Neoangiogenese wird durch die Wirkung von TRAP gesteigert (Maragoudakis 2002).

### 2.7.6 Heparin und Antithrombin III

Heparin ist ein Polysaccharid, das therapeutisch zur Hemmung der Blutgerinnung eingesetzt wird. Es wird von Mastzellen im perikapillären Gewebe, in Lungen oder Leber gebildet. Ab einer Kettenlänge von fünf Monosacchariden wirkt Heparin gerinnungshemmend. Heparine mit einer Kettenlänge von 5-17 werden als niedermolekulare Heparine, mit einer Kettenlänge ab 18 als unfraktionierte Heparine bezeichnet. Heparin ist ein indirekter Thrombininhibitor, das heißt es entfaltet seine Wirkung über einen Kofaktor, das Antithrombin III. Antithrombin III ist ein physiologischer Inhibitor der Blutgerinnung und wird in der Leber gebildet. Es ist ein Serpin und gehört zu den Serin-Protease-Inhibitoren. AT III ist ein Glykoprotein bestehend aus 433 Aminosäuren (Olson 1994). Es hemmt die aktivierten Faktoren XIIa, XIa, IXa und mit hoher Affinität die Faktoren Xa und Thrombin durch Bildung eines stabilen Enzym-Inhibitor-Komplexes (Löffler 2003, Lüllmann 2006). Für die Ausbildung dieses Komplexes ist eine Interaktion zwischen ATIII und dem Gerinnungsfaktor an der Proteinase-



bindenden Domäne Voraussetzung. Sie befindet sich an der reaktiven Stelle des ATIII, der Peptidbrücke zwischen Aminosäure 393 (Arginin) und 394 (Serin) (Witt 2002) (Abb. 7).

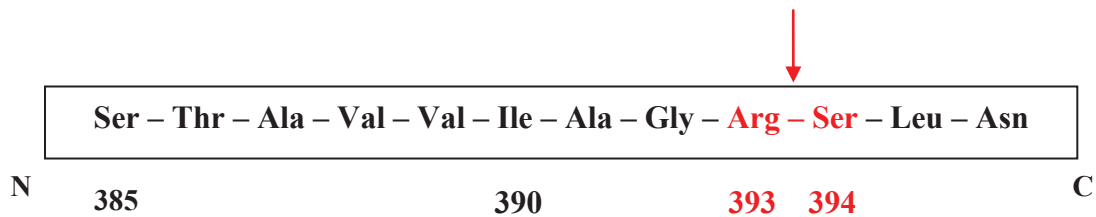


Abb. 7: Aminosäurestruktur von ATIII ab AS 385 mit reaktiver Stelle (393-394) (modifiziert nach Bock 1982)

Neben dieser Domäne gibt es eine heparinbindende Domäne nahe dem N-Terminus, an der Heparin an ATIII binden kann. Dadurch wird eine Konformationsänderung des ATIII bewirkt, wodurch die Inhibierung der Proteasen etwa um den Faktor 1000 beschleunigt wird.

### 2.7.7 Niedermolekulare Heparine

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung der Applikation der niedermolekularen Heparine Enoxaparin als Wirkstoff von Clexane® und Nadroparin als wirksame Substanz von Fraxiparin® auf Glioblastomzellen untersucht. LMWH bestehen aus 5-17 Monosacchariden. Im Gegensatz zu den unfraktionierten Heparinen verfügen sie über eine längere Halbwertszeit, höhere Bioverfügbarkeit und werden weniger an Plasmaproteine gebunden. Klinische Studien haben belegt, dass niedermolekulare Heparine das Zellwachstum, die Zellinvasion und die Angiogenese hemmen können (Balzarotti 2006). Balzarotti bestätigte 2006 den antineoplastischen Effekt von Enoxaparin auf Gliomzellen in vitro. Im Klinikalltag werden niedermolekulare Heparine zur Primärprophylaxe tiefer Venenthrombosen peri- und postoperativ und zur Therapie tiefer Venenthrombosen eingesetzt (Fachinformation Fraxiparin 2002). Nadroparin hat ein Molekulargewicht von 4500 Da und wird durch Depolymerisation aus Heparin hergestellt. Es hemmt insbesondere Faktor Xa und in geringem Ausmaß auch Thrombin. Die Applikation erfolgt subkutan, wobei die maximale Aktivität nach drei Stunden erreicht wird. Enoxaparin hat auch ein Molekulargewicht von 4500 Da und unterscheidet sich von Heparin durch seine höhere Affinität zu Faktor Xa und Thrombin (Fachinformation Clexane 2002).

### 2.7.8 PPACK (H-D-Phe-Pro-Arg-Chloromethylketon)

PPACK ist ein Active-Site-Inhibitor des Thrombin, das heißt es hemmt dessen aktives Zentrum im Bereich der Aminosäure His 57 (Steinmetzer 2004). Es gehört zur ersten

Generation von Active-Site-Inhibitoren und ist als Alternative zum Heparin entwickelt worden (Lyon 1995), weil man erkannt hatte, dass Tripeptide mit der Sequenz Phe-Pro-Arg das aktive Zentrum von Thrombin irreversibel blockieren können. So geht die Proteaseaktivität von Thrombin verloren. PPACK wird als monofunktionaler direkter Thrombininhibitor bezeichnet (Pöttsch 2010) (Abb. 8).

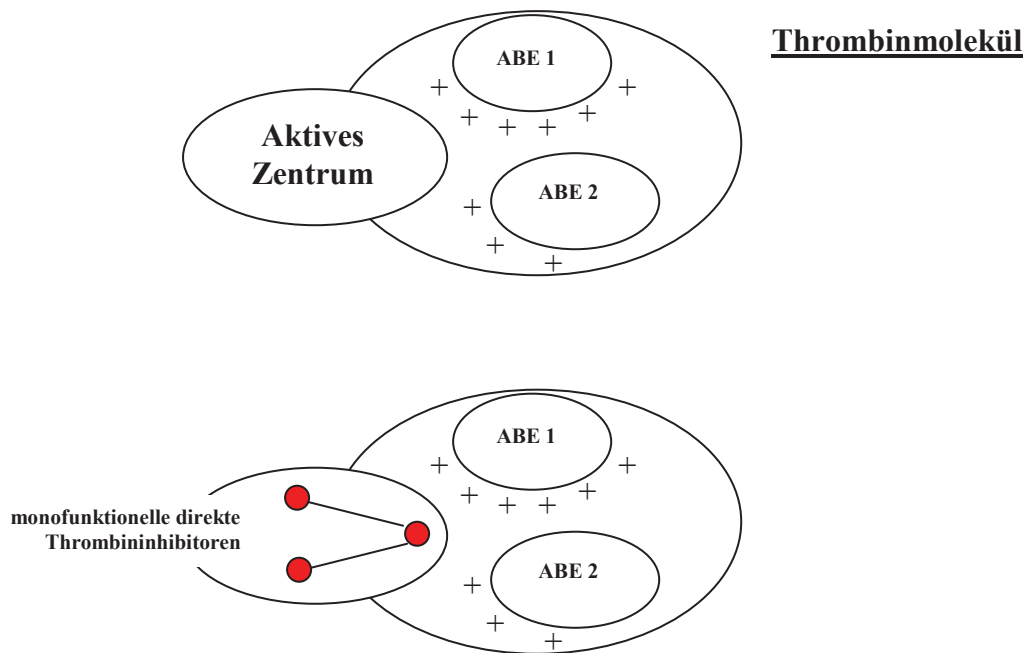


Abb. 8: Schematische Darstellung der Wirkung monofunktionaler direkter Thrombininhibitoren wie PPACK auf Thrombin durch Ausfüllen des aktiven Zentrums (modifiziert nach Pöttsch 2010)

### 2.7.9 Hirudin

Hirudin ist ein Polypeptid aus dem medizinischen Blutegel *Hirudo medicinalis*. Es besteht aus 65 Aminosäuren (Dodt 1985) (Abb. 9). Hirudin ist die bisher stärkste bekannte natürliche Substanz, die selektiv äquimolare Mengen an Thrombin inhibiert (Braun 1990). Anders als bei Heparin ist hierfür kein Kofaktor wie AT III nötig. Die Bindung von Hirudin an Thrombin verläuft in einer biphasischen Reaktion (Abb. 10). Deshalb wird Hirudin auch als bifunktionaler direkter Thrombininhibitor bezeichnet. Die initiale Interaktion beinhaltet die Bindung der C-terminalen Domäne des Hirudin an die „anion binding exosite 1“ des Thrombin. Dies bewirkt eine Konformationsänderung, die die Bindung der N-terminalen Domäne des Hirudin an das aktive Zentrum des Thrombin ermöglicht. So entsteht ein sehr stabiler Enzym-Inhibitor-Komplex (Pöttsch 2010).

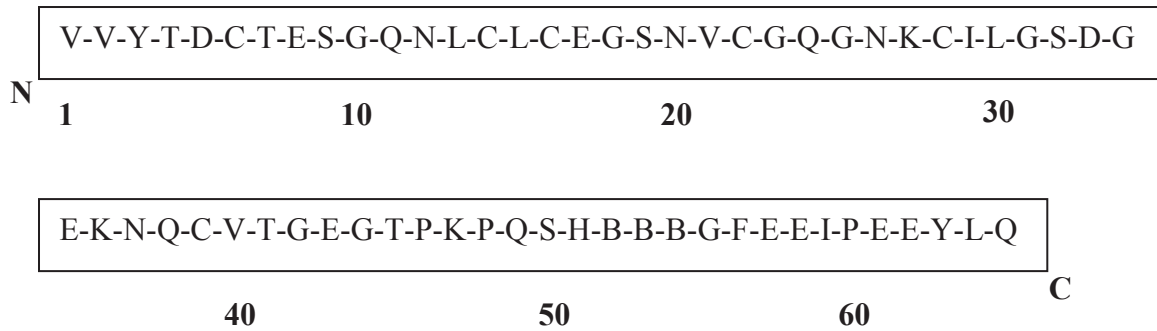


Abb. 9: Primärstruktur von Hirudin (modifiziert nach Chang 1983, Markwardt 1994)

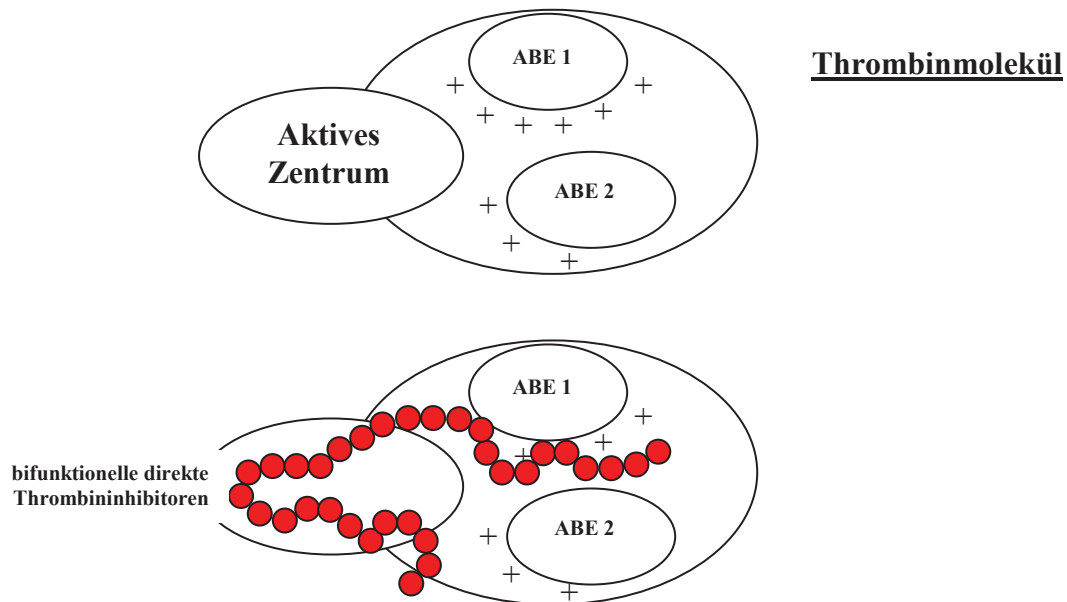


Abb. 10: Schematische Darstellung der Wirkung bifunktionaler direkter Thrombininhibitoren wie Hirudin auf Thrombin über ABE 1 (anion binding exosite 1) und die Umgebung des aktiven Zentrums (modifiziert nach Pöttsch 2010)

### 2.7.10 Albumin

Albumin ist ein Plasmaprotein, das in der Leber gebildet wird. Es dient vor allem der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes (Löffler 2003). Albumin ist ein Transportprotein bestehend aus einer Einzelkette aus 585 Aminosäuren, die als  $\alpha$ -Helix angeordnet sind. Es gibt drei homologe Domänen, die spezielle strukturelle und funktionelle Eigenschaften besitzen, die HSA-Domänen I-III. An diese Domänen binden bestimmte Liganden, wie z.B. Medikamente. In Abhängigkeit vom vorliegenden pH-Wert kann Albumin seine Struktur verändern, wodurch auch die Bindungseigenschaften modifiziert werden (Anraku 2001).

## 2.8 Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR)

Auf der Oberfläche von humanen Hirntumorzellen wurden besondere Rezeptoren, die PARs (Protease-aktivierte Rezeptoren) nachgewiesen (Kaufmann et al. 1998, Okamoto et al. 2001). PAR sind Protease-aktivierte, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Ihre Aktivierung beruht auf der Wirkung von Serinproteasen, insbesondere Thrombin (Abb. 11).

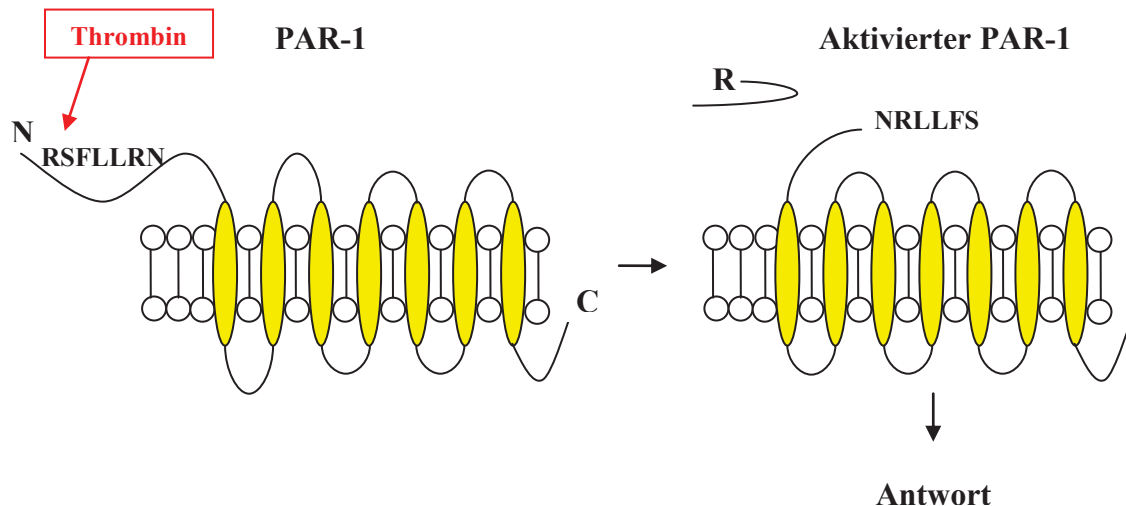


Abb. 11: Aktivierung des PAR-1 (modifiziert nach Coughlin 2003)

Durch Proteolyse wird die N-terminale extrazelluläre Region entfernt, wodurch ein neuer Ligand entsteht, der mit dem Rezeptor interagiert und so Signale vermittelt (Borensztajn et al. 2008). Man unterscheidet vier Isoformen: PAR-1, PAR-2, PAR-3 und PAR-4. Sie werden von verschiedenen Gewebetypen exprimiert (Coughlin 2000), unter anderem PAR-1 und -2 von Glioblastomzellen (Kaufmann et al. 1998). Eine Überexpression von PAR-1 findet man auch bei zahlreichen anderen Tumoren wie beispielsweise beim Mammakarzinom (Even-Ram et al. 1998), Prostatakarzinom (Yuan et al. 2004), malignen Melanom (Tellez et al. 2003), Endometrium-, Ovarial- (Granovsky-Grisaru et al. 2006) und Pankreaskarzinom (Rudroff et al. 2002). PAR-1, -3 und -4 werden von Thrombin aktiviert. Über die PARs kommt es so zur Thrombozytenaktivierung und damit zu einer erhöhten Koagulabilität (Coughlin 2003). PAR-2 wird nicht durch Thrombin sondern durch Gerinnungsfaktoren wie z.B. Faktor Xa und Faktor VIIa, TF sowie Trypsin aktiviert (Coughlin 2003). Insbesondere die Aktivierung über TF führt zu einer gesteigerten Proliferation, Migration und Invasion von Gliomzellen (Gessler et al. 2010). Eine Überexpression von PAR-2 findet man unter anderem beim Gallenblasenkarzinom (Shibata 2004) und auch beim Prostatakarzinom (Black 2007). Für das

Tumorzellwachstum sind PARs von großer Bedeutung. Karzinomzellen befinden sich meist in einer proteasereichen Umgebung. Über eine Aktivierung der PARs kann durch Endothelzellproliferation die Neoangiogenese und damit das Tumorwachstum gesteigert werden (Coelho 2003). Eine Blockierung des PAR-1 mit einem Antagonisten führt wiederum zu einer Reduktion des Tumorwachstums (Boire 2005) und der Angiogenese (Zania et al. 2006). Gessler bestätigte 2010, dass eine Hemmung des PAR-2 in humanen Gliomzelllinien zu einer verminderten Zellmigration und –invasion führen kann (Gessler et. al. 2010).

### **3 Zielstellungen der Arbeit**

Glioblastompatienten neigen durch eine Hochregulation des Gerinnungssystems vermehrt zu tiefen Venenthrombosen. Nicht nur die systemische Blutgerinnung ist bei diesen Patienten pathologisch, auch innerhalb des Tumors kommt es zur Bildung von Mikrothromben. Als wichtigstes Schlüsselenzym hierfür ist Thrombin anzusehen. Seine vielfältigen Auswirkungen auf Tumorzellen sind bereits durch zahlreiche Studien bestätigt. Besonders hervorzuheben ist hierbei die Rolle der PAR, die von den Glioblastomzellen exprimiert werden. So kann Thrombin einerseits die Gerinnungskaskade aktivieren, was zur Ausbildung der Thromben führt. Andererseits bewirkt es über die genannten PAR eine vermehrte Sekretion von VEGF, wodurch es zur Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen kommt (Stouffer 1998), was die Neoangiogenese steigert. Durch seine mitogene Aktivität aktiviert es die Produktion extrazellulärer Matrix und erhöht so die Tumormasse (Hua 2005). Glioblastomzellen exprimieren darüber hinaus Gerinnungsfaktoren wie zum Beispiel Faktor X, der über PAR-2 ebenfalls die Proliferation der Tumorzellen fördert. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass Antagonisten von Thrombin oder Faktor X zu einer Hemmung des Wachstums von Glioblastomzellen führen können.

Ziele der vorliegenden Dissertation sind es zu zeigen, dass thrombinhaltige Substanzen, die im Klinikalltag verwendet werden wie TachoSil®, FloSeal® und Tissucol® eine proliferative Wirkung auf Glioblastomzellen haben, was unter Umständen zu einem schlechteren Outcome für die Patienten führen könnte.

Darüber hinaus soll untersucht werden, ob antithrombotisch wirkende Substanzen wie Heparin, Antithrombin III, Hirudin, Enoxaparin oder Nadroparin im Gegensatz dazu einen wachstumshemmenden Effekt haben. Die zusätzliche Therapie der Patienten mit diesen Substanzen könnte dann zu einer besseren Langzeitprognose führen.

Da der intraoperative Einsatz der thrombinhaltigen Stoffe jedoch meist nicht vermieden werden kann, soll in weiteren Versuchsreihen die kombinierte Gabe eines Aktivators mit einem Inhibitor der Blutgerinnung untersucht werden. Hier ist von Bedeutung, ob der proliferationsfördernde Effekt durch eine antagonistisch wirkende Substanz aufgehoben werden kann.

Für die Versuchsreihen werden die Glioblastomzellen der Linien U373MG und U87MG verwendet. Um eine Aussage über den Einsatz der genannten Substanzen in vivo treffen zu können bedarf es daher weiterführender Untersuchungen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialien und Geräte

#### 4.1.1 Zellkulturlinien

Für die Versuchsreihen wurden zwei humane Glioblastomzellreihen verwendet. Es handelt sich um Zellen der Linien U87MG und U373MG, die über ATCC (American Type Culture Collection) bezogen wurden (Tabelle 5).

Zelllinie	ATCC Number
U87MG	HTB-14™
U373MG	HTB-17™

Tabelle 5: Verwendete Zellkulturlinien

#### 4.1.2 Gerinnungsaktivatoren

Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die in den Experimenten verwendeten Gerinnungsaktivatoren.

Substanz	Lot Number	Firma
Thrombin aus FloSeal® Haemostatic Matrix	070511A	Baxter Healthcare Corp., USA
TachoSil®	10383069	NYCOMED Austria GmbH, Österreich
Tissucol Duo S 2ml Immuno®	VND1G102	Baxter Deutschland GmbH, Deutschland
Factor X Activated (Xa) from Bovine Plasma®	F9302-50UG	Sigma Aldrich, Inc, USA
TRAP-6 (2-6) trifluoroacetate salt®	2000026	Bachem AG, Schweiz

Tabelle 6: Verwendete Gerinnungsaktivatoren

#### 4.1.3 Gerinnungsinhibitoren

Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die verwendeten Gerinnungsinhibitoren.

Substanz	Lot Number	Firma
Hirudin, BKHV, Rceombinant, Hansenula polymorpha®	B47438	Calbiochem, Deutschland
Fraxiparin multi®		Glaxo Wellcome Production, Frankreich
Clexane multidosse 100mg/ml®		Aventis Pharma S.A., Spanien
Tissucol Duo S 2ml Immuno® (Kleberproteinlösung)	VND1G102	Baxter Deutschland GmbH, Deutschland
Heparin sodium salt, from bovine intestinal mucosa®	H0777-50KU	Sigma Aldrich, Inc, USA
PPACK (H-D-Phe-Pro-Arg-Chloromethylketon), Dihydrochloride®, 5mg	B57252	Calbiochem, Deutschland
Antithrombin III	A2221-125UG	Sigma Aldrich, Inc., USA

Tabelle 7: Verwendete Gerinnungsinhibitoren

#### 4.1.4 Sonstige Substanzen

Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die untersuchten Substanzen, die keinen direkten Einfluss auf die Blutgerinnung haben.

Substanz	Lot Number	Firma
Human- Albumin Kabi 20%®	54744636A	OCTAPHARMA GmbH, Deutschland

Tabelle 8: Sonstige Substanzen

#### 4.1.5 Dosis der verwendeten Substanzen

Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die Dosierung der verwendeten Substanzen.

<u>Gerinnungsaktivatoren</u>		<u>Gerinnungshemmer</u>		<u>Sonstige Substanzen</u>	
FloSeal®	10 U/ml	Hirudin	20 U/ml	Human-Albumin	0,1 g/ml
TachoSil®	2 U/cm <sup>2</sup>	Heparin	20 U/ml		
Tissucol®-	10 U/ml	Fraxiparin®	950 U/ml		
Thrombin		Clexane®	1000 U/ml		
Faktor Xa	10 U/ml	PPACK	5 nMol		
TRAP-6	0,005 g/ml	Antithrombin III	10 U/ml		
		Tissucol®-Kleber	100 U/ml		

Tabelle 9: Dosis der verwendeten Substanzen

#### 4.1.6 Verwendete Chemikalien

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die zusätzlich notwendigen Chemikalien.

Substanz	Lot Number	Firma
Hank's Salt Solution® 500ml, tested for endotoxin	L2015	Biochrom AG, Deutschland
DMEM® 500ml	F0455	Biochrom AG, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin® 100ml; 10000U/10000µg/ml	0849G	Biochrom AG, Deutschland
FBS, fetal bovine serum® 500ml	S0115	Biochrom AG, Deutschland
Trypsin/EDTA Solution® 100ml	L2153	Biochrom AG, Deutschland

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien



#### 4.1.7 Verwendete Geräte

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die verwendeten Geräte.

Gerät	Firma
Inkubator HERAcell	Kendro Laboratory Products, Deutschland
Sterilbank HERAsafe	Kendro Laboratory Products, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25; CE 660720	Carl Zeiss, Deutschland
Messpipetten aus Glas	Hartenstein, Deutschland
Zellkulturflaschen Cellstar®	Greiner Bio-one, Deutschland
Zentrifuge	Carl Zeiss, Deutschland
Pipettierhilfe	Hartenstein, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Hartenstein, Deutschland
Multiwellplatte, 24-Well-Platten	Greiner Bio-one, Deutschland

Tabelle 11: Verwendete Geräte

#### 4.2 Methoden

Für die Versuche wurden die zwei humanen Gliomzelllinien U87MG und U373MG verwendet. Während des Versuchsablaufes wurden sie bei 37°C, 95% O<sup>2</sup>- Gehalt und 5% CO<sup>2</sup>- Gehalt in einem Zellkulturmedium inkubiert, welches vor Beginn der Versuchsreihen aus 500ml DMEM, 50ml FCS, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin hergestellt wurde. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen zunächst gezüchtet, bis sie konfluent waren. Dafür wurde alle zwei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt, bei dem das verbrauchte Medium abpipettiert wurde und 5 ml neues Medium dazugegeben wurde. Bei Konfluenz wurden dann die Passagen durchgeführt. Dazu wurde das Medium entfernt und pro Zellkulturflasche 2ml Trypsin/EDTA hinzugegeben. Nach 2min im Inkubator wurden die Zellen durch Abklopfen vom Boden gelöst. Der Verdauungsprozess wurde durch Zugabe von 5ml Medium gestoppt. Die nun entstandene Zellsuspension wurde für 10min bei 800rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden mithilfe der Neubauer-Zählkammer die Zellen ausgezählt, da für die Versuche 24-Well-Platten verwendet werden sollten, wobei sich in jedem Well 100 Zellen als Referenzwert befinden sollten (Abb. 12).

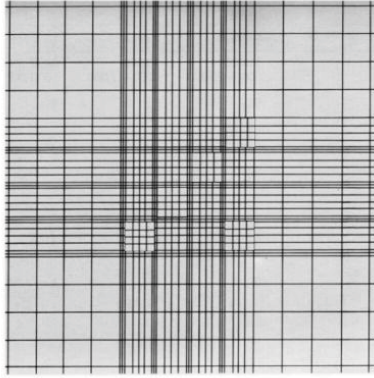


Abb. 12: Neubauer-Zählkammer (modifiziert nach Lindl 2002)

Die Zählkammer besteht aus 9 gleich großen Quadraten. 4 davon sind in 16 kleinere Quadrate unterteilt. Diese wurden dann folgendermaßen ausgezählt (Abb. 13).

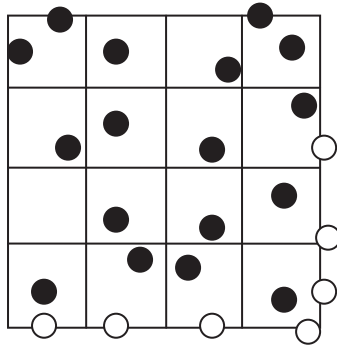


Abb. 13: Zählweise der Zählkammer (modifiziert nach Lindl 2002)

Nur die hier schwarz markierten Zellen wurden gezählt. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass Zellen, die auf einer Linie liegen nicht zweimal gezählt werden. Dies wird dadurch vermieden, dass nur Zellen, die oben und links vom Betrachter auf den Linien liegen, mitgezählt wurden. Anschließend wurde der Mittelwert gebildet und mit  $10^4$  multipliziert um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten.

Jeweils 1ml der Zellsuspension wurde in jedes Well der 24-Well-Platte gefüllt und die Platte anschließend für 24h inkubiert. Die Versuche wurden mit jeder Zelllinie dreimal wiederholt. Es ergab sich folgender Versuchsaufbau (Abb. 14).

+ FCS	+ FCS	+ FCS	+ FCS	+ FCS	+ FCS
- FCS	- FCS	- FCS	- FCS	- FCS	- FCS
Substanz + FCS	Substanz + FCS	Substanz + FCS	Substanz + FCS	Substanz + FCS	Substanz + FCS
Substanz	Substanz	Substanz	Substanz	Substanz	Substanz

**Abb. 14: Versuchsaufbau der Experimente**

Die 24-Well-Platten bestehen aus 4 Reihen mit je 6 Wells. Die erste Reihe stellte die Positivkontrolle mit FCS, dem Fetalen Kälberserum dar, die zweite Reihe die Negativkontrolle ohne FCS und die 3. und 4. Reihe waren die eigentlichen Versuchsreihen. Jede Substanz wurde zunächst allein getestet.

Für die Verwendung des TachoSil® musste zunächst das Thrombin herausgelöst werden. Dazu wurde aus dem Schwamm 1cm<sup>2</sup> ausgeschnitten und für 30min in 50ml DMEM eingelegt.

In weiteren Experimenten wurde anschließend untersucht, wie sich eine Kombination der Substanzen auf die Proliferation der Zellen auswirkt. Hierbei ergab sich folgender Versuchsaufbau (Abb. 15).

<b>+ FCS</b>	<b>+ FCS</b>	<b>+ FCS</b>	<b>+ FCS</b>	<b>+ FCS</b>	<b>+ FCS</b>
<b>- FCS</b>	<b>- FCS</b>	<b>- FCS</b>	<b>- FCS</b>	<b>- FCS</b>	<b>- FCS</b>
Substanz A + B + FCS	Substanz A + B + FCS	Substanz A + B + FCS	Substanz A + B + FCS	Substanz A + B + FCS	Substanz A + B + FCS
Substanz A + FCS	Substanz A + FCS	Substanz A + FCS	Substanz A + FCS	Substanz A + FCS	Substanz A + FCS

Substanz A + Substanz B	Substanz A + Substanz B	Substanz A + Substanz B	Substanz A + Substanz B	Substanz A + Substanz B	Substanz A + Substanz B
Substanz B	Substanz B	Substanz B	Substanz B	Substanz B	Substanz B

Abb. 15: Versuchsaufbau der Experimente bei kombinierter Gabe der Substanzen

Anschließend wurden die Platten für 24h inkubiert und am nächsten Tag nach Beendigung des Experimentes unter dem Mikroskop ausgezählt.

### 4.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem SPSS-Programm Version 15.0 für Windows. Es handelt sich bei den Versuchsreihen um unabhängige, metrische Grundgesamtheiten A, B mit  $n > 8$  Werten, weshalb der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test als statistisches Testverfahren geeignet ist. Er dient zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen. Man hat zwei Stichproben; Stichprobe A mit  $n_1$  Werten und Stichprobe B mit  $n_2$  Werten. Man vergleicht jeden Wert der Stichprobe A mit jedem Wert der Stichprobe B, das heißt es gibt  $n_1 * n_2$  Vergleiche. Die Nullhypothese  $H(0)$  besagt, dass es keinen Unterschied zwischen den Verteilungen gibt, d. h.  $A = B$ . Ein Ergebnis mit einem Signifikanzniveau  $p < 0,05$  wurde als signifikant, ein  $p < 0,001$  als hoch signifikant interpretiert. Die einfache Standardabweichung wurde berechnet und als Boxplot in die Abbildungen übernommen.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Applikation der Gerinnungsaktivatoren

#### 5.1.1 Faktor X

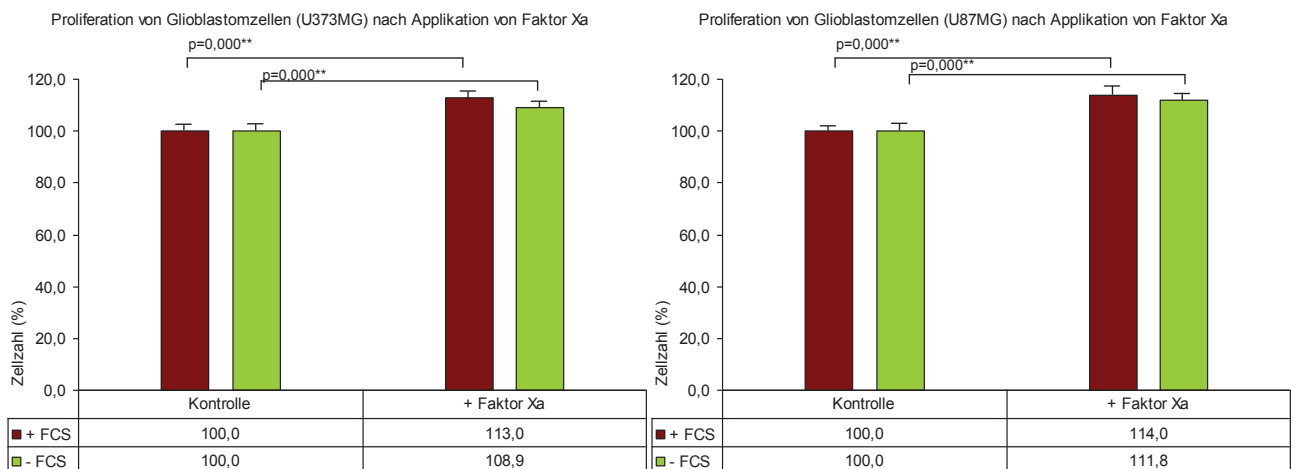


Abb. 16: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Faktor X

Die Applikation des aktivierten Faktor X (Xa) zu den Glioblastomzelllinien führt jeweils zu einem hoch signifikanten Anstieg der Proliferation (Abb. 4). Unter Zugabe von FCS ist dieser Effekt deutlicher sichtbar, da es bei U373MG zu einem Anstieg auf 113% im Vergleich zur Positivkontrolle kommt. Bei den Zellen der Linie U87MG kommt es zu einem Wachstumsanstieg auf 114%. Ohne FCS steigt das Wachstum der Zellen, verglichen mit der Negativkontrolle, weniger deutlich, auf 108,9% bei U373MG und auf 111,8% bei U87MG (Abb. 16).

#### 5.1.2 Thrombinkomponente aus Tissucol®

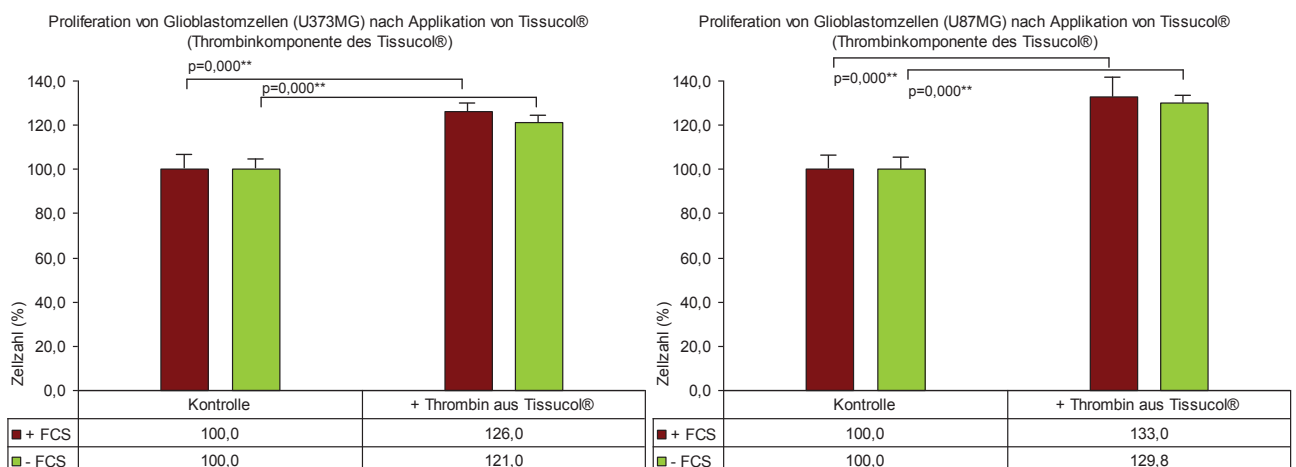


Abb. 17: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation der Thrombinkomponente aus Tissucol®

Die Applikation der Thrombinkomponente führt bei beiden Glioblastomzelllinien zu einer hoch signifikanten Zunahme des Wachstums der Zellen ( $p=0,000$ ). Die Zugabe von FCS fördert das Wachstum zusätzlich, so dass bei der U373MG-Linie die Proliferation auf 126,0%, verglichen mit der Positivkontrolle ansteigt; bei U87MG auf 133,0%. Ohne FCS ist der Effekt des Thrombins geringer ausgeprägt. Bei den U373MG-Zellen steigt das Wachstum auf 121,0%, bei den U87MG-Zellen auf 129,8%, verglichen mit der jeweiligen Negativkontrolle (Abb. 17).

### 5.1.3 TachoSil®

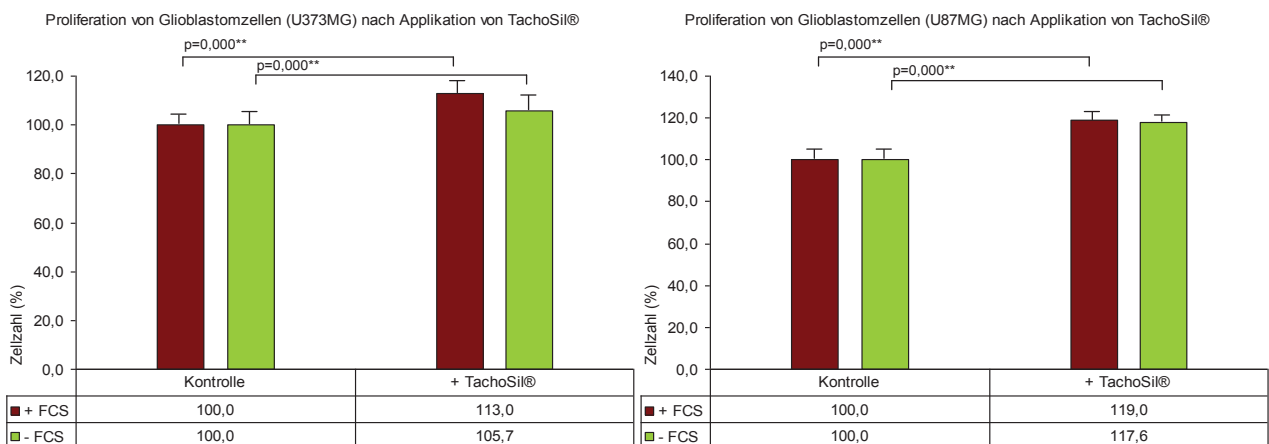


Abb. 18: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von TachoSil®

Appliziert man das im TachoSil®-Schwamm enthaltene Fibrinogen und Thrombin auf Glioblastomzellen der Linien U373MG und U87MG, führt dies zu einem hoch signifikanten Proliferationsanstieg ( $p=0,000$ ). Die Zugabe von FCS bewirkt eine weitere Steigerung des Wachstums; bei U373MG auf 113,0%, bei U87MG auf 119,0%, verglichen mit der Positivkontrolle. Bei der Durchführung des Versuches ohne FCS steigt das Wachstum etwas weniger stark an, bei U373MG auf 105,7%, bei U87MG auf 117,6%, verglichen mit der Negativkontrolle (Abb. 18).

## 5.1.4 FloSeal®

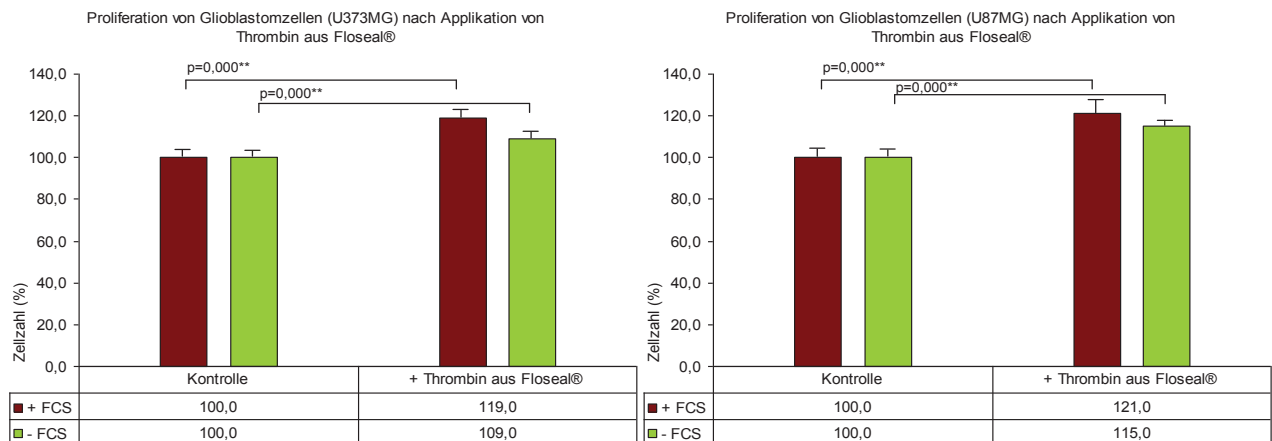


Abb. 19: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von FloSeal®

Bei beiden Glioblastomzelllinien führt die Applikation von FloSeal® und FCS zu einer hoch signifikanten Steigerung der Proliferation auf 119,0% bei U373MG und auf 121,0% bei den Zellen der Linie U87MG, verglichen mit der Positivkontrollreihe. Ohne FCS wachsen die Zellen weniger stark, aber trotzdem noch hoch signifikant: 109,0% bei den U373MG und 115,0% bei U87MG (Abb. 19).

## 5.1.5 TRAP-6

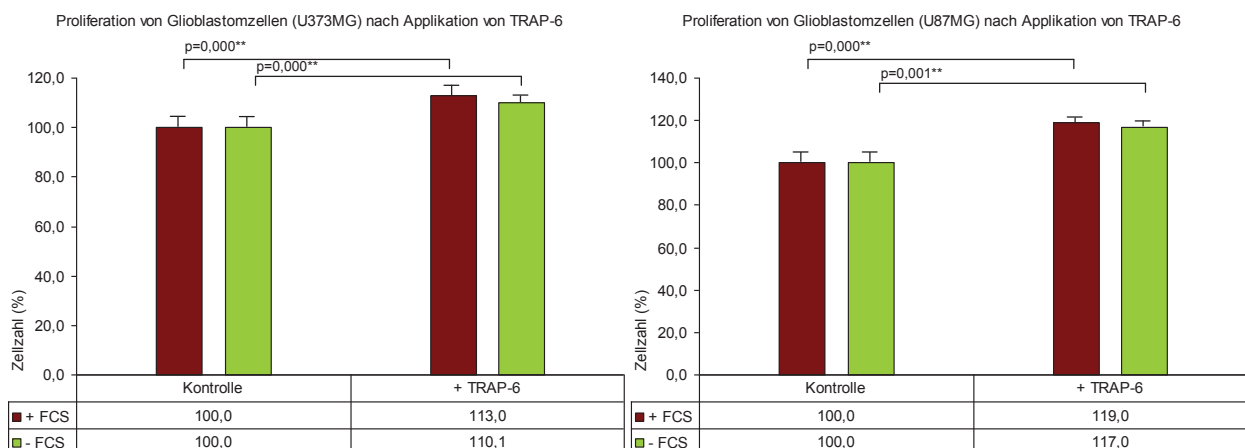


Abb. 20: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von TRAP-6

Gibt man TRAP-6 zu humanen Glioblastomzellen, wird deren Wachstum aktiviert. Es kommt unter Zusatz von FCS zu einem Anstieg der Proliferation auf 113,0% bei U373MG-Zellen und auf 119,0% bei U87MG-Zellen, verglichen mit der Positivkontrolle. Ohne FCS ist der Wirkung des TRAP-6 etwas geringer ausgeprägt. Es bewirkt einen Proliferationsanstieg von 110,1% bei U373MG-Zellen und von 117,0% bei U87MG-Zellen. Diese Ergebnisse sind jeweils mit  $p \leq 0,001$  hoch signifikant (Abb. 20).

## 5.2 Applikation der Gerinnungshemmer

### 5.2.1 Antithrombin III

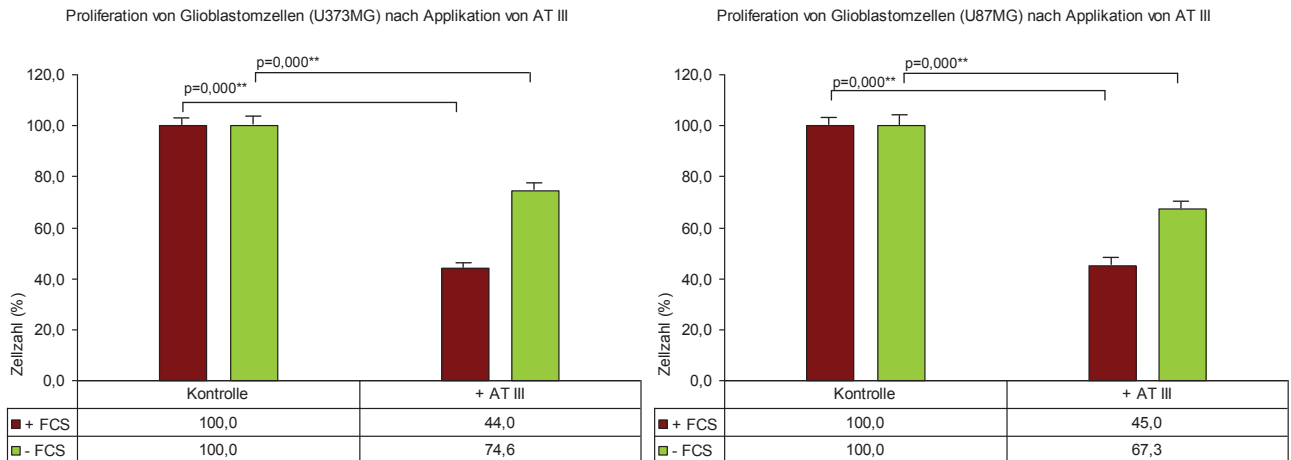


Abb. 21: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Antithrombin III

Die Zugabe von Antithrombin III zu den Glioblastomzellen der Linien U373MG und U87MG führt jeweils zu einer Hemmung der Proliferation auf 44,0% bei U373MG und auf 45,0% bei U87MG unter Verwendung von FCS. Ohne FCS ist der Effekt schwächer. Es kommt hier zu einer Hemmung des Wachstums auf 74,6% bei U373MG und 67,3% bei U87MG. In allen Versuchsreihen ist die Hemmung der Proliferation mit  $p=0,000$  hoch signifikant (Abb. 21).

### 5.2.2 Heparin

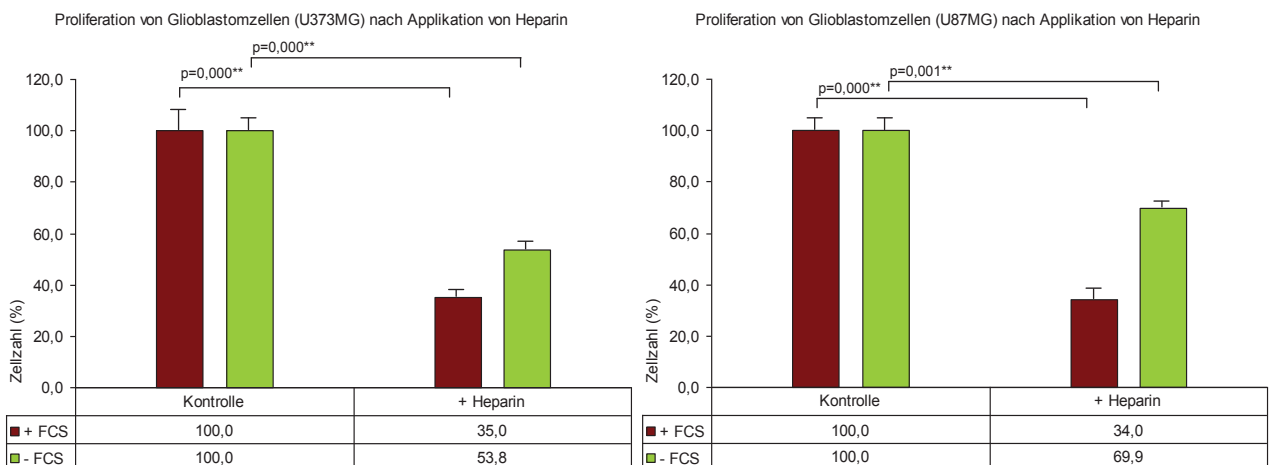


Abb. 22: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Heparin

Die Zugabe von Heparin zu den Glioblastomzellen der Linien U373MG und U87MG führt bei zusätzlicher Applikation von FCS in beiden Versuchsreihen zu einer hoch signifikanten Hemmung des Wachstums auf 35,0% (U373MG) und 34,0% (U87MG). Ohne FCS ist der



Effekt des Heparin schwächer ausgeprägt. Es ergibt sich trotzdem ein hoch signifikanter Abfall der Proliferation auf 53,8% bei U373MG und 69,9% bei U87MG (Abb. 22).

### 5.2.3 Heparin und Antithrombin III

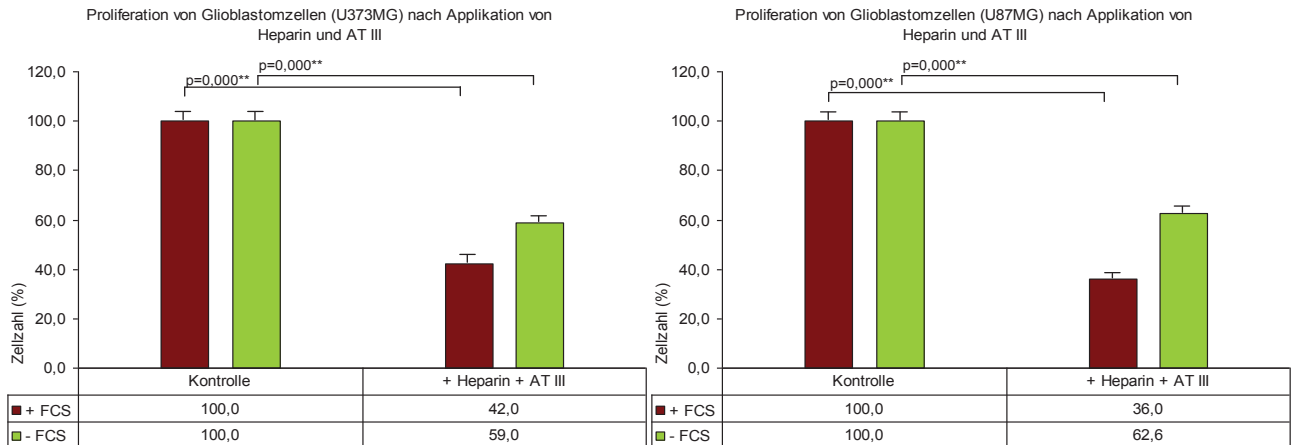


Abb. 23: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Heparin und Antithrombin III

Die gleichzeitige Applikation von Heparin und ATIII bewirkt einen hoch signifikanten Abfall der Proliferation der humanen Glioblastomzelllinien unter zusätzlicher Zugabe von FCS bei U373MG auf 42,0% und bei U87MG auf 36,0%. Ohne FCS ist der hemmende Effekt etwas schwächer ausgeprägt, aber dennoch hoch signifikant. Bei U373MG fällt das Wachstum auf 59,0% und bei U87MG auf 62,6% (Abb. 23).

### 5.2.4 Hirudin

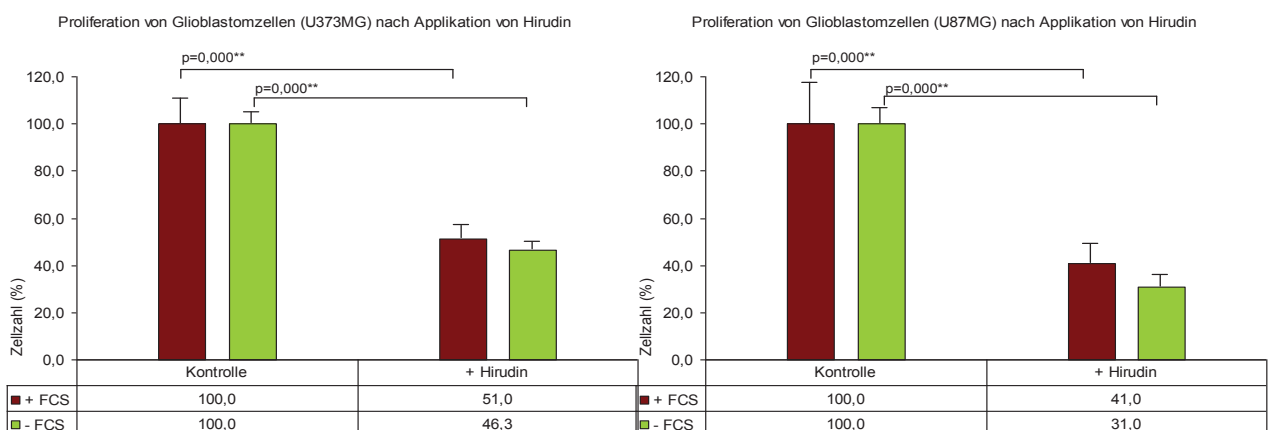


Abb. 24: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Hirudin

Appliziert man Hirudin auf humane Glioblastomzellen, führt es zu einer Hemmung der Proliferation. Sowohl bei den Zellen der Reihe U373MG als auch bei den U87MG-Zellen wird das Wachstum hoch signifikant gehemmt ( $p=0,000$ ). Unter Zugabe von FCS ist dieser

Effekt geringer ausgeprägt. Verglichen mit der Positivkontrolle kommt es zu einem Abfall auf 51% bei U373MG und auf 41% bei U87MG. Ohne FCS fällt die Proliferation stärker ab, auf 46,3% bei U373MG und auf 31,0% bei U87MG (Abb. 24).

## 5.2.5 Enoxaparin

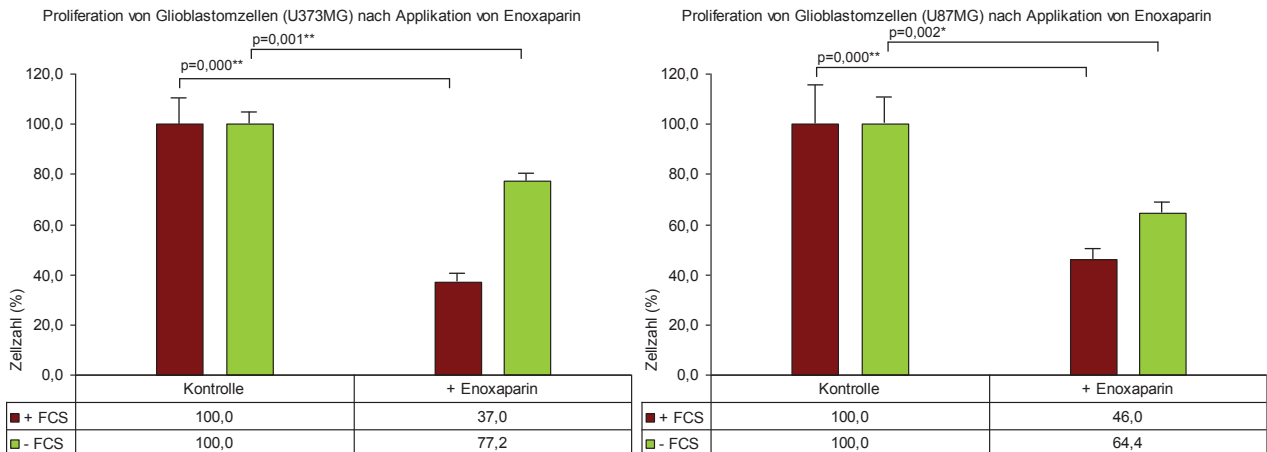


Abb. 25: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Enoxaparin

Appliziert man Enoxaparin zu humanen Glioblastomzellen führt es zu einer Hemmung der Proliferation. Dieser Effekt ist bei Zellen der Linie U373MG stärker ausgeprägt. Es kommt zu einem Abfall des Wachstums auf 37,0%, verglichen mit der Positivkontrolle. Bei den Zellen der Reihe U87MG fällt das Wachstum auf 46,0% ab. Beides ist statistisch hoch signifikant ( $p=0,000$ ). Ohne FCS wird die Proliferation weniger stark gehemmt. Bei den U373MG-Zellen beträgt die Proliferationsrate 77,2%, verglichen mit der Negativkontrolle. Dieses Ergebnis ist ebenfalls hoch signifikant ( $p=0,001$ ). Die Zellen der U87MG-Zelllinie wachsen ohne FCS weniger stark. So kommt es zu einer Wachstumsrate von 64,4%. Dieses Ergebnis ist auch hoch signifikant ( $p=0,002$ ) (Abb. 25).

## 5.2.6 Nadroparin

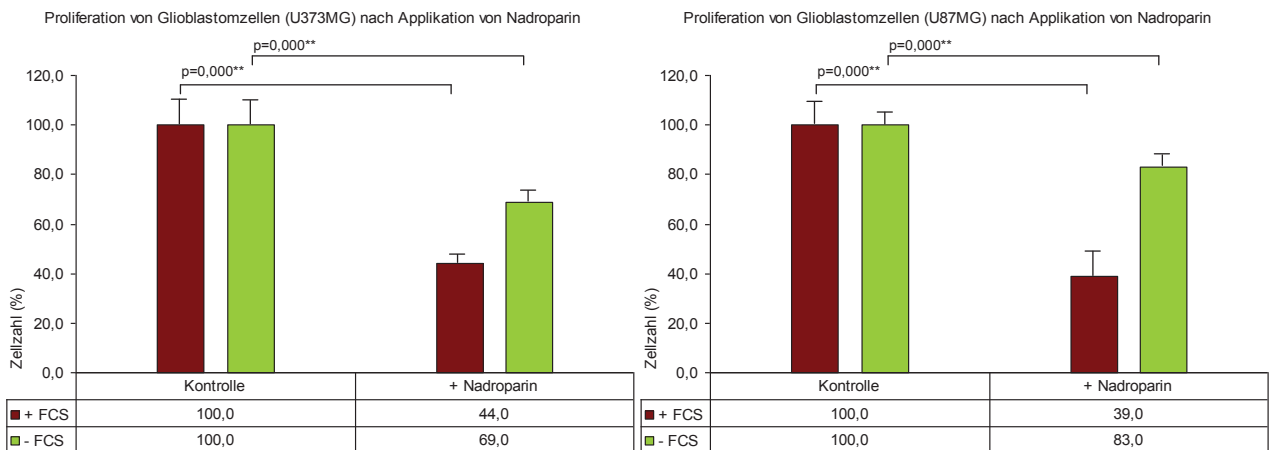


Abb. 26: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Nadroparin

Die Gabe von Nadroparin zu humanen Glioblastomzellen führt unter Zusatz von FCS zu einer Hemmung der Proliferation auf 44,0% bei Zellen der Linie U373MG und auf 39,0% bei Zellen der Linie U87MG, verglichen mit den jeweiligen Ausgangswerten. Dieser Effekt ist hoch signifikant ( $p=0,000$ ). Ohne FCS ist die Auswirkung des Nadroparin auch feststellbar. Es kommt zu einer Hemmung des Wachstums auf 69,0% bei U373MG und auf 83,0% bei U87MG, verglichen mit der entsprechenden Negativkontrollreihe. Auch diese Ergebnisse sind hoch signifikant ( $p=0,000$ ) (Abb. 26).

## 5.2.7 PPACK (H-D-Phe-Pro-Arg-Chloromethylketon)

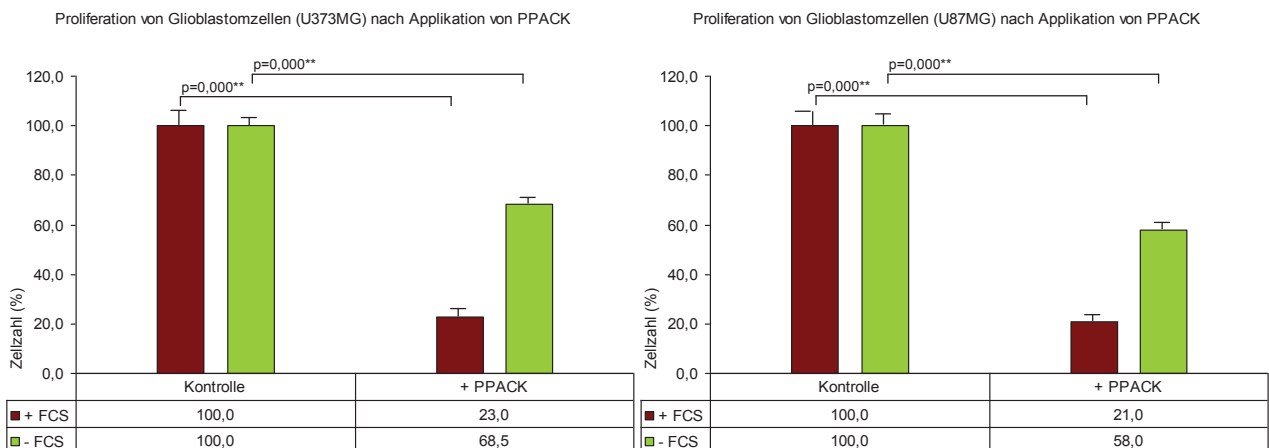


Abb. 27: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von PPACK

Die Applikation von PPACK zu humanen Glioblastomzellen führt zu einem hoch signifikanten Abfall der Proliferation auf 23,0% bei U373MG und auf 21,0% bei U87MG, verglichen mit der jeweiligen Positivkontrolle ( $p=0,000$ ). Ohne FCS ist der hemmende Effekt auch nachweisbar. Es kommt zu einer Wachstumshemmung auf 68,5% bei U373MG und auf

58,0% der Ausgangsrate bei U87MG. Auch dieses Ergebnis ist statistisch hoch signifikant ( $p=0,000$ ) (Abb. 27).

## 5.2.8 Kleberkomponente des Tissucol®

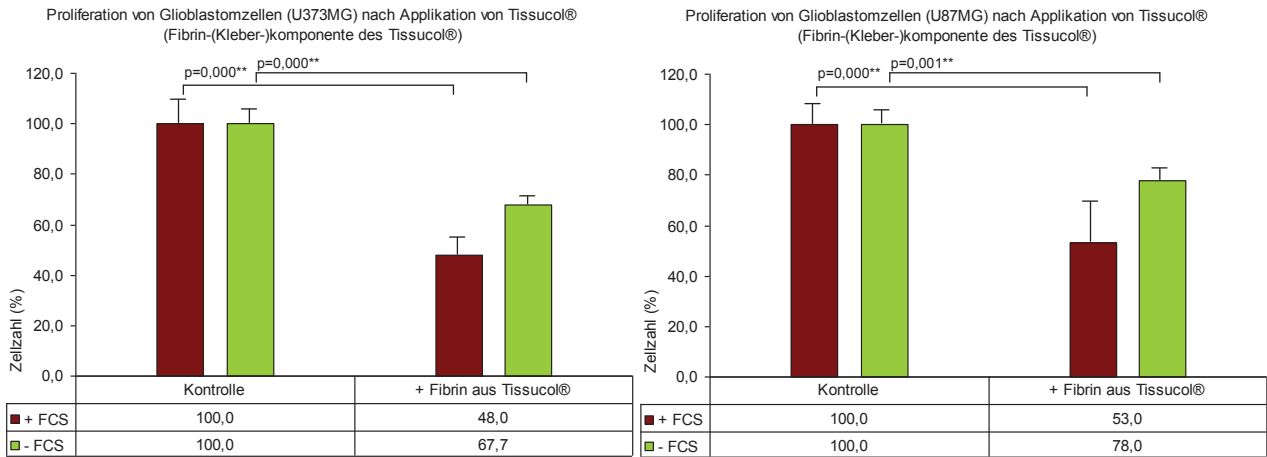


Abb. 28: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation der Kleberkomponente aus Tissucol®

Appliziert man die Kleberkomponente des Tissucol® zu humanen Glioblastomzellen, kommt es unter Zusatz von FCS zu einem Abfall der Proliferation auf 48,0% bei U373MG-Zellen und auf 53,0% bei U87MG-Zellen, verglichen mit der Positivkontrolle ( $p=0,000$ ). Ohne FCS wird das Wachstum etwas geringer gehemmt. Die Kleberkomponente bewirkt unter diesen Bedingungen eine Wachstumshemmung auf 67,7% bei U373MG-Zellen bzw. auf 78,0% bei U87MG-Zellen, verglichen mit der Negativkontrolle. Auch dieses Ergebnis ist mit einem  $p$ -Wert  $\leq 0,001$  hoch signifikant (Abb. 28).

## 5.3 Applikation anderer Substanzen

### 5.3.1 Albumin

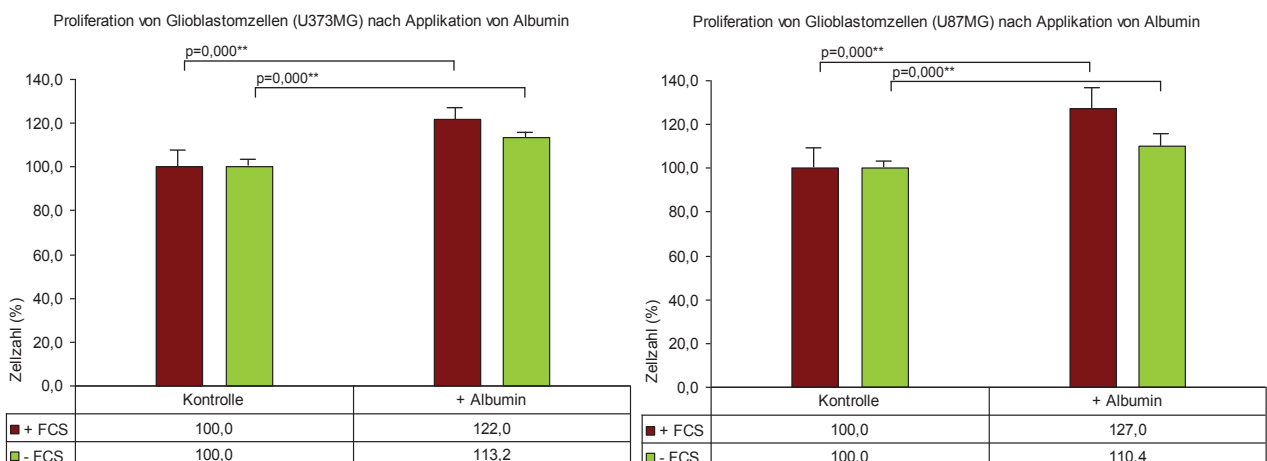


Abb. 29: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Albumin

Die Applikation von Albumin zu den Zelllinien U87MG und U373MG führt unter Zugabe von FCS bei beiden Zelllinien zu einem hoch signifikanten Anstieg der Proliferation ( $p=0,000$ ), verglichen mit der Positivkontrolle. Auch bei der Versuchsreihe ohne FCS konnte im Vergleich zur Negativkontrolle eine hoch signifikante Zunahme des Wachstums ( $p=0,000$ ) erzielt werden (Abb. 29).

## 5.4 Kombinationen der Substanzen

In weiteren Versuchsreihen sollte der Effekt einer kombinierten Gabe der bereits getesteten Substanzen auf die Proliferation der Tumorzellen überprüft werden.

### 5.4.1 Kombinierte Gabe von Albumin und Enoxaparin

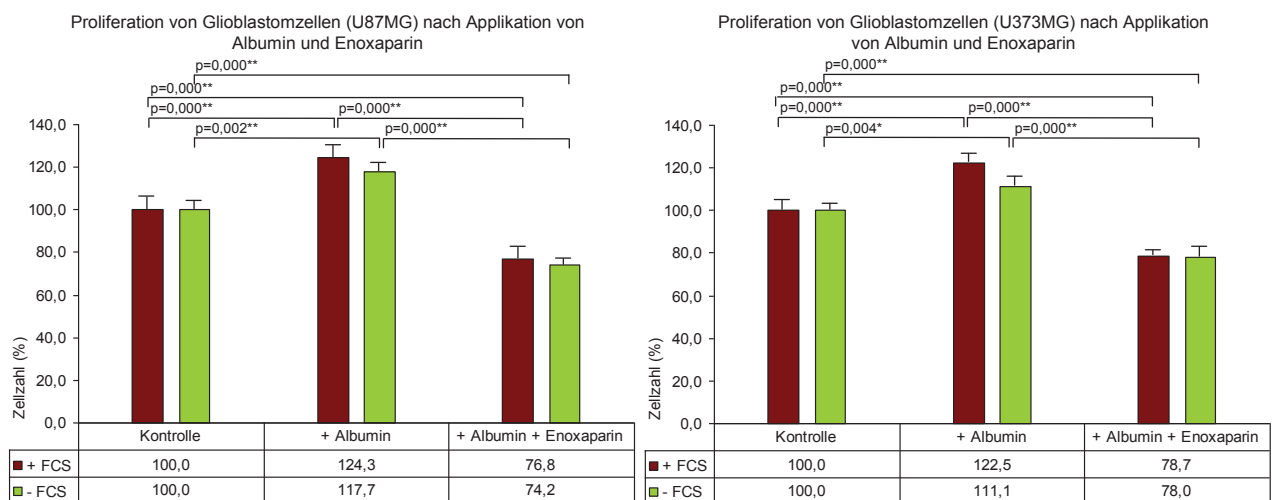


Abb. 30: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Albumin und Enoxaparin

Die Einzelgabe von Albumin auf die Zellen der Linien U373MG und U87MG führt jeweils zu einem hoch signifikanten Anstieg der Proliferation. Unter Zusatz von FCS steigt das Wachstum der U87MG-Zellen auf 124,3% an, verglichen mit der Positivkontrollreihe. Bei den Zellen der Linie U373MG sind es 122,5%. Auch ohne FCS kann ein hoch signifikanter Proliferationsanstieg erzielt werden; 117,7% bei der U87MG-Zellreihe und 111,1% bei den U373MG-Zellen. Im Rahmen des gleichen Experimentes bewirkt eine Kombination der Substanzen Albumin und Enoxaparin eine hoch signifikante Reduktion der Proliferation beider Glioblastomzelllinien U87MG und U373MG ( $p=0,000$ ). Bei den Zellen der Linie U87MG fällt unter Zugabe von FCS das Wachstum auf 76,8%, verglichen mit der Positivkontrolle. Dieses Ergebnis ist hoch signifikant ( $p=0,000$ ). Ohne FCS wachsen 74,2% der Zellen, verglichen mit der Negativkontrolle ( $p=0,000$ ). Die Zellen der Linie U373MG reagieren analog, das heißt, das Wachstum fällt unter Zugabe von FCS auf 78,7%, verglichen

mit der Positivkontrollreihe. Auch bei dieser Zellreihe ist das Testergebnis hoch signifikant ( $p=0,000$ ). Ohne FCS wachsen die Zellen noch langsamer mit 78,0%, verglichen mit der Negativkontrolle ( $p=0,000$ ). Somit zeigt sich, dass die alleinige Zugabe von Enoxaparin zu den Zellen mit Albumin das Wachstum nicht nur hoch signifikant unter die Werte von den Versuchsreihen mit Albumin allein drücken kann, sondern sogar unter die jeweiligen Kontrollwerte (Abb. 30).

#### 5.4.2 Kombinierte Gabe von Albumin und Nadroparin

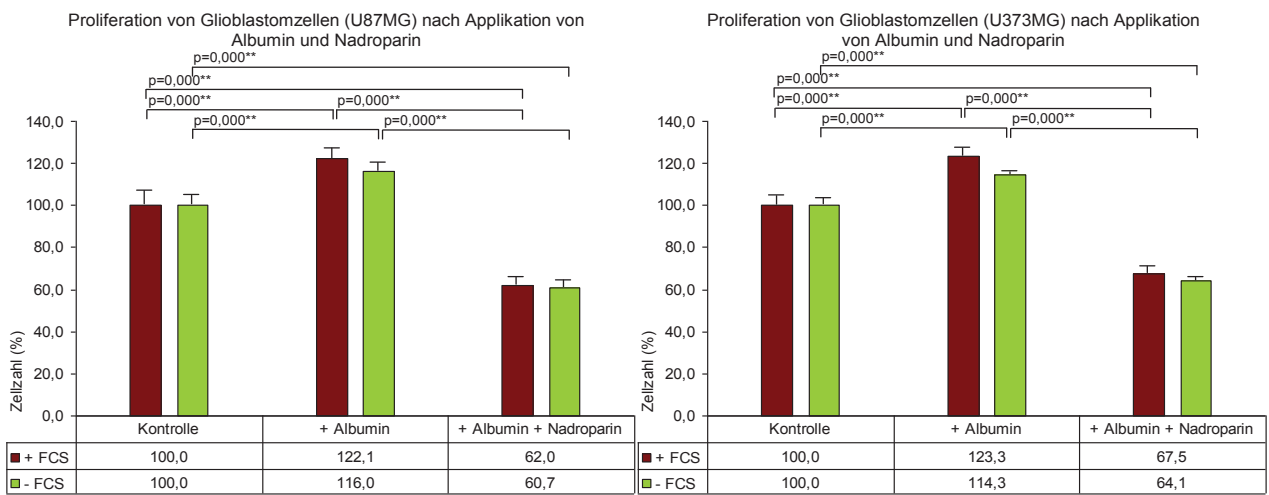


Abb. 31: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Albumin und Nadroparin

Die Einzelgabe von Albumin auf die Zellen der Linien U373MG und U87MG führt mit  $p=0,000$  zu einem hoch signifikanten Anstieg der Proliferation. Unter Zusatz von FCS steigt das Wachstum der U87MG-Zellen auf 122,1%, verglichen mit der Positivkontrollreihe. Bei den Zellen der Linie U373MG sind es 123,3%. Auch ohne FCS kann ein hoch signifikanter Proliferationsanstieg erzielt werden; 116,0% bei der U87MG-Zellreihe und 114,3% bei den U373MG-Zellen. Verglichen mit diesen Versuchsreihen führt die zusätzliche Gabe von Nadroparin zu Albumin bei beiden Zelllinien zu einem hoch signifikanten Abfall der Proliferation ( $p=0,000$ ). Bezogen auf die jeweiligen Kontrollreihen ohne Albumin wird mit FCS das Wachstum der U87MG-Zellen hier auf 62,0% reduziert, das Wachstum der U373MG-Zellen auf 67,5%. Ohne FCS wird die Proliferation noch stärker gehemmt; es wachsen 60,7% der U87MG-Zellen, bzw. 64,1% der U373MG-Zellen, verglichen mit der Negativkontrollreihe (Abb. 31).

### 5.4.3 Kombinierte Gabe von Albumin und Heparin

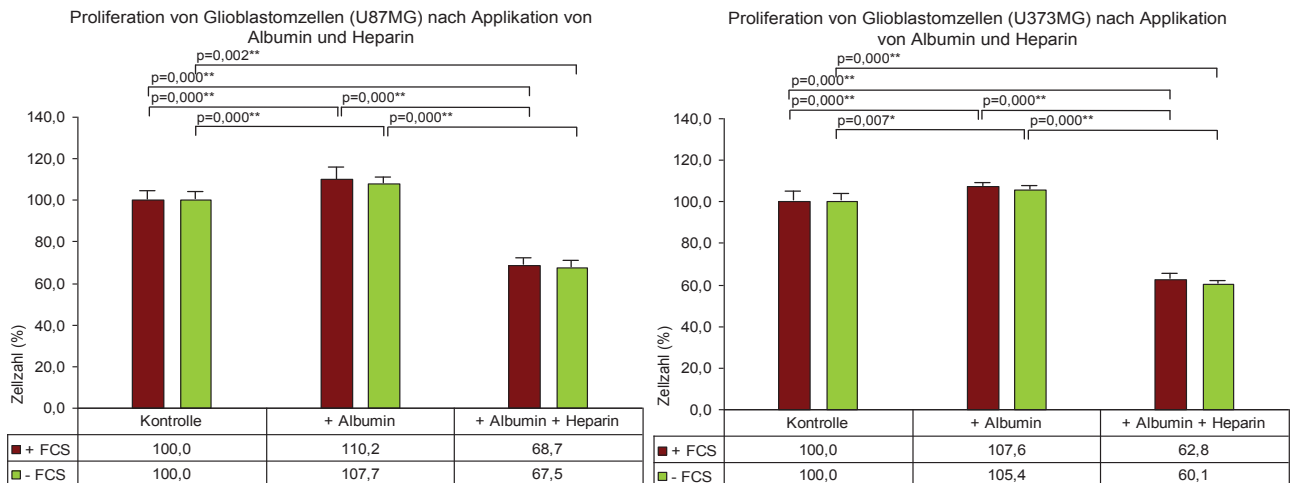


Abb. 32: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Albumin und Heparin

Die singuläre Applikation von Albumin auf die Zellen der Linien U373MG und U87MG führt mit  $p=0,000$  zu einem hoch signifikanten Anstieg der Proliferation. Unter Zusatz von FCS steigt das Wachstum der U87MG-Zellen auf 110,2%, verglichen mit der Positivkontrollreihe. Bei den Zellen der Linie U373MG sind es 107,6%. Auch ohne FCS kann ein hoch signifikanter Proliferationsanstieg erzielt werden; 107,7% bei der U87MG-Zellreihe und 105,4% bei den U373MG-Zellen. Verglichen mit diesen Versuchsreihen führt die zusätzliche Gabe von Heparin zu Albumin bei beiden Zelllinien zu einem hoch signifikanten Abfall der Proliferation ( $p=0,000$ ). Bezogen auf die jeweiligen Kontrollreihen ohne Albumin wird mit FCS das Wachstum der U87MG-Zellen hier auf 68,7% reduziert, das Wachstum der U373MG-Zellen auf 62,8%. Ohne FCS wird die Proliferation noch stärker gehemmt; es wachsen 67,5% der U87MG-Zellen, bzw. 60,1% der U373MG-Zellen, verglichen mit der Negativkontrollreihe (Abb. 32).

## 5.4.4 Kombinierte Gabe von Albumin und Hirudin

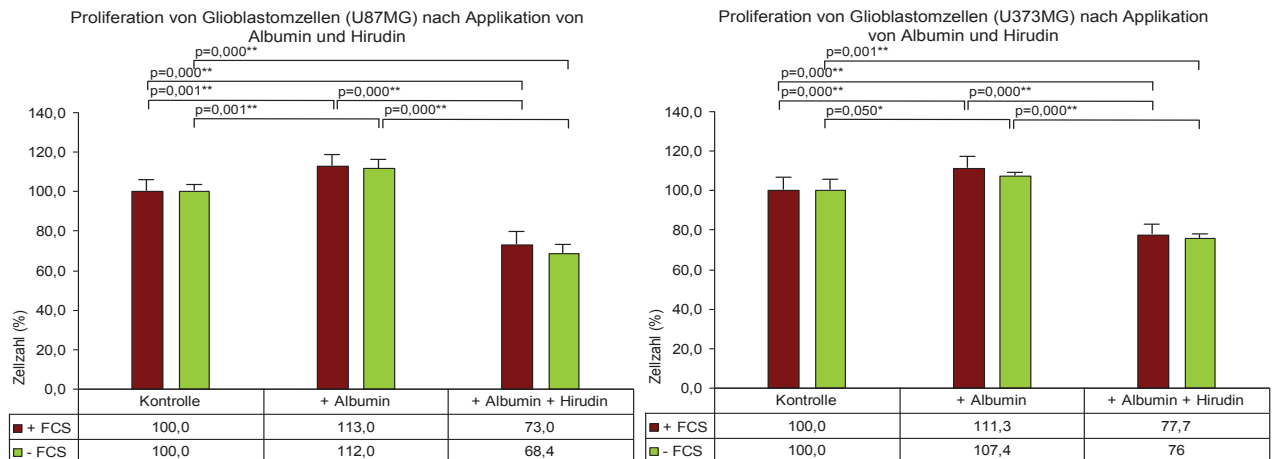


Abb. 33: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Albumin und Hirudin

Die alleinige Applikation von Albumin auf die Zellen der Linien U373MG und U87MG führt zu einem hoch signifikanten Anstieg der Proliferation ( $p=0,000$ ). Unter Zusatz von FCS steigt das Wachstum der U87MG-Zellen auf 113,0%, verglichen mit der Positivkontrollreihe. Bei den Zellen der Linie U373MG sind es 111,3%. Auch ohne FCS kann ein hoch signifikanter Proliferationsanstieg von 112,0% bei der U87MG-Zellreihe und 107,4% bei den U373MG-Zellen erzielt werden. Verglichen mit diesen Versuchsreihen führt die zusätzliche Gabe von Hirudin zu Albumin bei beiden Zelllinien zu einem hoch signifikanten Abfall der Proliferation ( $p=0,000$ ). Bezogen auf die jeweiligen Kontrollreihen ohne Albumin wird mit FCS das Wachstum der U87MG-Zellen hier auf 73,0% reduziert, das Wachstum der U373MG-Zellen auf 77,7%. Ohne FCS wird die Proliferation noch stärker gehemmt; es wachsen 68,4% der U87MG-Zellen, bzw. 76% der U373MG-Zellen, verglichen mit der Negativkontrollreihe (Abb. 33).

## 5.4.5 Kombinierte Gabe von Albumin und PPACK

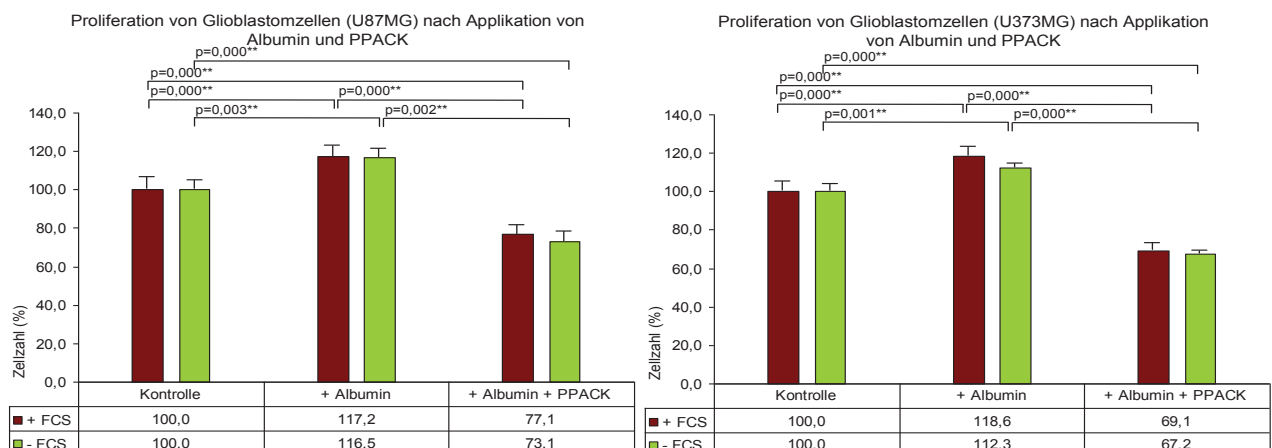


Abb. 34: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Albumin und PPACK



Die Einzelgabe von Albumin auf die Zellen der Linien U373MG und U87MG führt zu einem hoch signifikanten Anstieg der Proliferation. Unter Zusatz von FCS steigt das Wachstum der U87MG-Zellen auf 117,2%, verglichen mit der Positivkontrollreihe. Bei den Zellen der Linie U373MG sind es 118,6%. Auch ohne FCS kann ein Proliferationsanstieg von 116,5% bei der U87MG-Zellreihe und 112,3% bei den U373MG-Zellen erzielt werden. Verglichen mit diesen Versuchsreihen führt die zusätzliche Gabe von PPACK zu Albumin bei beiden Zelllinien zu einem hoch signifikanten Abfall der Proliferation ( $p=0,000$ ). Bezogen auf die jeweiligen Kontrollreihen ohne Albumin wird mit FCS das Wachstum der U87MG-Zellen hier auf 77,1% reduziert, das Wachstum der U373MG-Zellen auf 69,1%. Ohne FCS wird die Proliferation noch stärker gehemmt; es wachsen 73,1% der U87MG-Zellen, bzw. 67,2% der U373MG-Zellen, verglichen mit der entsprechenden Negativkontrollreihe (Abb. 34).

#### 5.4.6 Kombinierte Gabe von Antithrombin III und Albumin

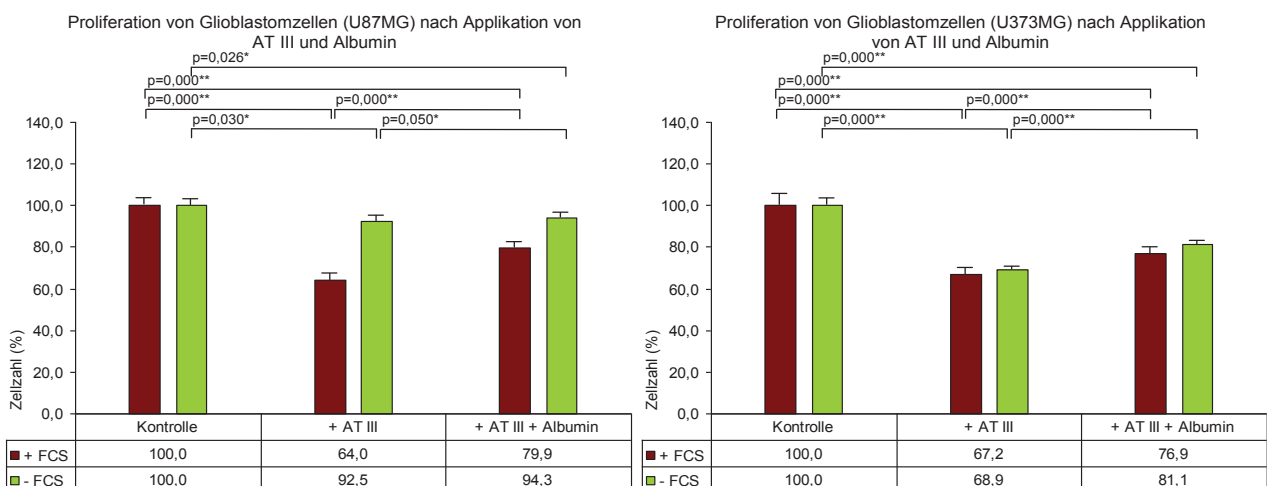


Abb. 35: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von AT III und Albumin

Die singuläre Applikation von Antithrombin III zu den Zellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Reduktion der Proliferation ( $p=0,000$ ). Unter Zusatz von FCS wachsen 64,0% der Zellen der Linie U87MG und 67,2% der Zellen der Linie U373MG, verglichen mit der Positivkontrollreihe. Ohne FCS ist der Effekt des Antithrombin III schwächer ausgeprägt, das heißt, die Proliferation wird weniger stark gehemmt. Es wachsen 92,5% der U87MG-Zellen und 68,9% der U373MG-Zellen im Vergleich mit der Negativkontrolle. Die zusätzliche Applikation von Albumin zu den Zellen mit AT III führt dazu, dass das Wachstum weniger stark gehemmt wird. Im Vergleich zur jeweiligen Kontrollreihe mit FCS wachsen 79,9% der U87MG-Zellen, bzw. 76,9% der

U373MG-Zellen. Ohne FCS wachsen 94,3% der Zellen der Linie U87MG und 81,1% der Zellen der Linie U373MG (Abb. 35).

### 5.4.7 Kombinierte Gabe von Antithrombin III und TachoSil®

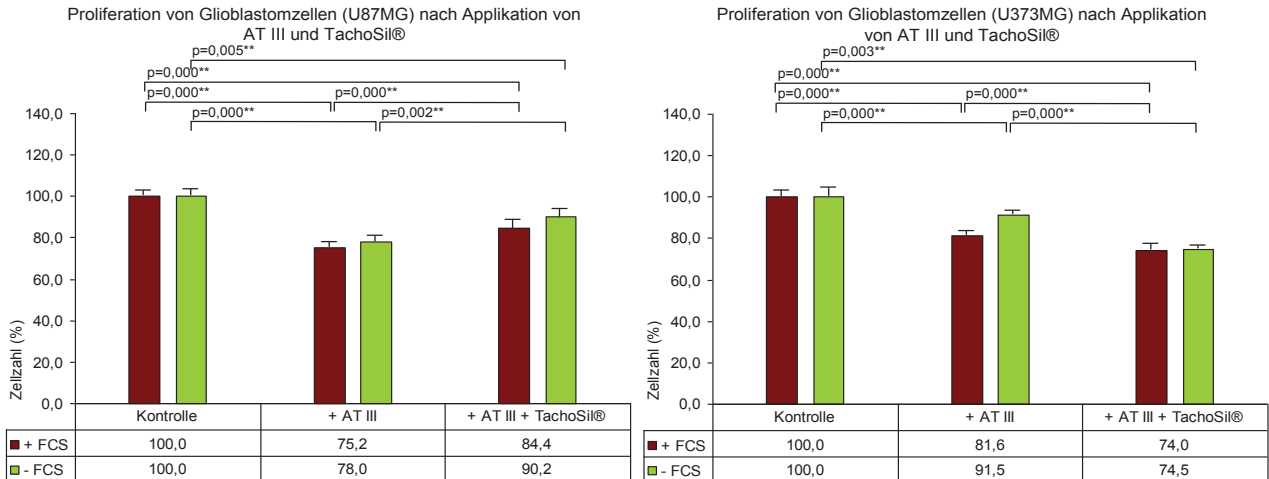


Abb. 36: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von AT III und TachoSil®

Die Einzelgabe von Antithrombin III zu den Zellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Reduktion der Proliferation ( $p=0,000$ ). Unter Zusatz von FCS wachsen 75,2% der Zellen der Linie U87MG und 81,6% der Zellen der Linie U373MG, verglichen mit der Positivkontrollreihe. Ohne FCS wird die Proliferation weniger stark gehemmt. Es wachsen 78,0% der U87MG-Zellen und 91,5% der U373MG-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Die zusätzliche Applikation von TachoSil® zu den Zellen mit AT III führt dazu, dass das Wachstum weniger stark gehemmt wird. Im Vergleich zur jeweiligen Kontrollreihe mit FCS wachsen 84,4% der U87MG-Zellen, bzw. 74,0% der U373MG-Zellen. Ohne FCS wachsen 90,2% der Zellen der Linie U87MG und 74,5% der Zellen der Linie U373MG (Abb. 36).

### 5.4.8 Kombinierte Gabe von Antithrombin III und Thrombin aus FloSeal®

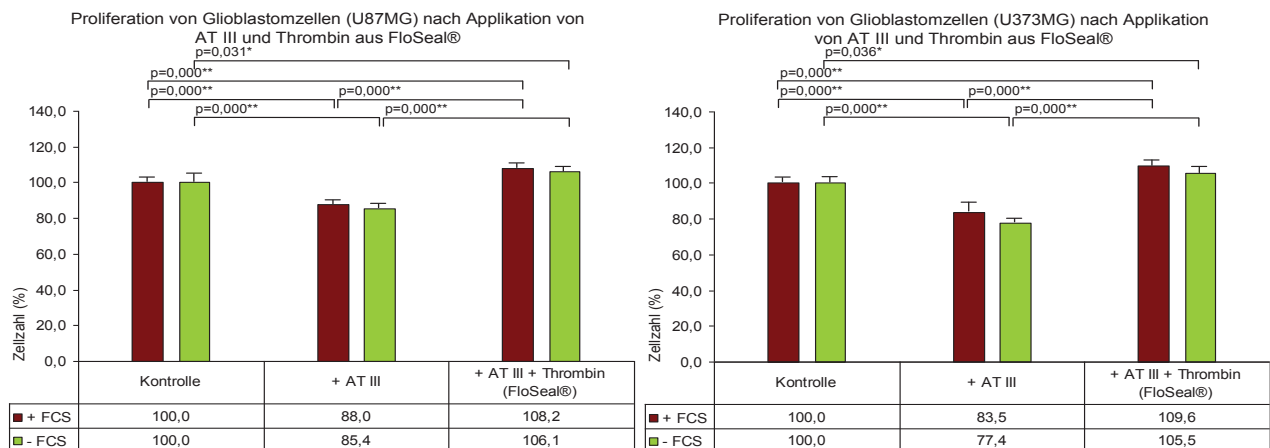


Abb. 37: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von AT III und Thrombin aus FloSeal®

Die Einzelgabe von Antithrombin III zu den Zellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Reduktion der Proliferation ( $p=0,000$ ). Unter Zusatz von FCS wachsen 88,0% der Zellen der Linie U87MG und 83,5% der Zellen der Linie U373MG, verglichen mit der Positivkontrolle. Ohne FCS wachsen 85,4% der U87MG-Zellen und 77,4% der U373MG-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Die zusätzliche Applikation von Thrombin aus FloSeal® zu den Zellen mit AT III führt dazu, dass die Proliferation der Zellen verglichen mit den Versuchsreihen mit AT III allein stark erhöht wird, selbst im Vergleich zur jeweiligen Kontrollreihe ohne AT III kommt es zu einer hoch signifikanten Steigerung des Wachstums. Mit FCS wachsen 108,2% der U87MG-Zellen, bzw. 109,6% der U373MG-Zellen. Ohne FCS wachsen 106,1% der Zellen der Linie U87MG und 105,5% der Zellen der Linie U373MG (Abb. 37).

### 5.4.9 Kombinierte Gabe von Antithrombin III und Thrombin aus Tissucol®

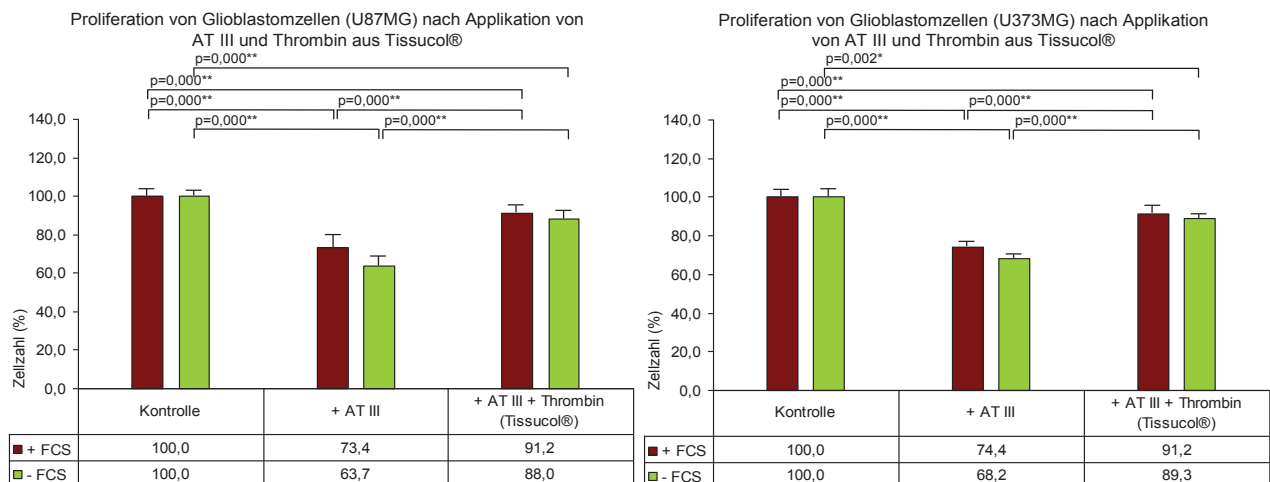


Abb. 38: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von AT III und Thrombin aus Tissucol®

Die singuläre Applikation von Antithrombin III zu den Zellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Wachstumshemmung ( $p=0,000$ ). Unter Zusatz von FCS wachsen 73,4% der Zellen der Linie U87MG und 74,4% der Zellen der Linie U373MG, verglichen mit der Positivkontrolle. Ohne FCS wachsen 63,7% der U87MG-Zellen und 68,2% der U373MG-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Die zusätzliche Applikation von Thrombin aus Tissucol® zu den Zellen mit AT III führt dazu, dass die Proliferation verglichen mit den Versuchsreihen mit AT III allein stark erhöht wird. Im Vergleich zur jeweiligen Kontrollreihe ohne AT III kommt es jedoch zu einer hoch signifikanten Hemmung des Wachstums ( $p=0,000$ ). Mit FCS wachsen 91,2% der U87MG-Zellen, bzw. 91,2% der U373MG-Zellen. Ohne FCS wachsen 88,0% der Zellen der Linie U87MG und 89,3% der Zellen der Linie U373MG (Abb. 38).

#### 5.4.10 Kombinierte Gabe von Antithrombin III + Heparin und Albumin

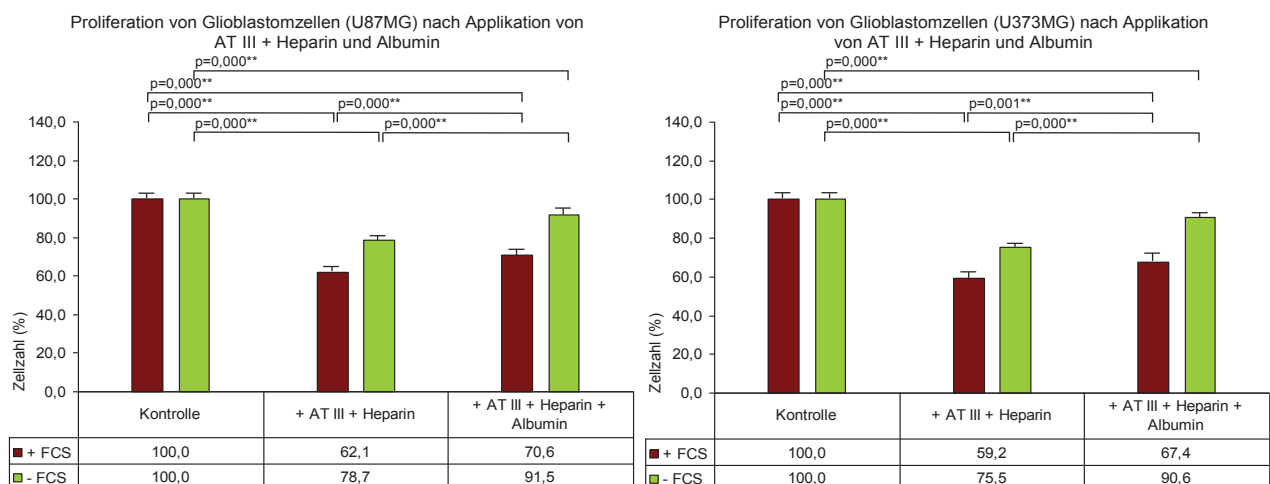


Abb. 39: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von AT III mit Heparin und Albumin

Die singuläre Applikation von Antithrombin III mit Heparin zu den Zellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Wachstumshemmung ( $p=0,000$ ). Unter Zusatz von FCS wachsen 62,1% der Zellen der Linie U87MG und 59,2% der Zellen der Linie U373MG, verglichen mit der Positivkontrolle. Ohne FCS ist der proliferationshemmende Effekt des AT III mit Heparin geringer ausgeprägt, das heißt es wachsen 78,7% der U87MG-Zellen und 75,5% der U373MG-Zellen verglichen mit der Negativkontrolle. Die zusätzliche Applikation von Albumin zu den Zellen mit AT III und Heparin führt dazu, dass die Proliferation im Vergleich mit den Versuchsreihen mit AT III und Heparin allein stark erhöht wird. Im Vergleich zur jeweiligen Kontrollreihe ohne AT III und Heparin kommt es jedoch zu einer hoch signifikanten Hemmung des Wachstums

( $p=0,000$ ). Mit FCS wachsen 70,6% der U87MG-Zellen, bzw. 67,4% der U373MG-Zellen. Ohne FCS werden die Zellen weniger in ihrem Wachstum gehemmt, das heißt es wachsen 91,5% der Zellen der Linie U87MG und 90,6% der Zellen der Linie U373MG (Abb. 39).

### 5.4.11 Kombinierte Gabe von Antithrombin III + Heparin und TachoSil®

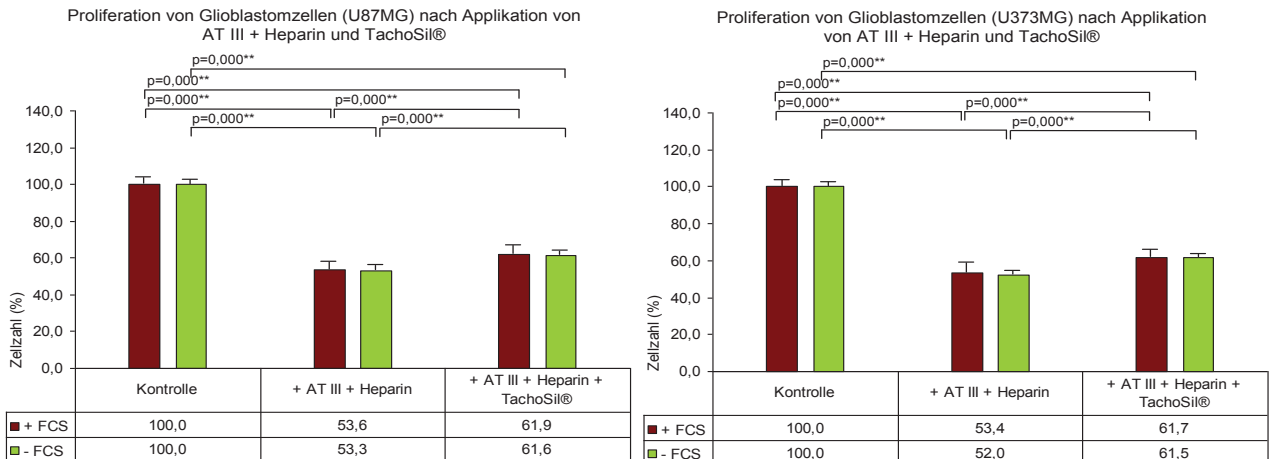


Abb. 40: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von AT III mit Heparin und TachoSil®

Die Einzelgabe von Antithrombin III und Heparin zu den Zellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Wachstumshemmung ( $p=0,000$ ). Unter Zusatz von FCS wachsen 53,6% der Zellen der Linie U87MG und 53,4% der Zellen der Linie U373MG, verglichen mit der jeweiligen Positivkontrolle. Ohne FCS wachsen 53,3% der U87MG-Zellen und 52,0% der U373MG-Zellen verglichen mit der Negativkontrolle. Die zusätzliche Applikation von TachoSil® zu den Zellen mit AT III und Heparin führt dazu, dass die Proliferation im Vergleich mit den Versuchsreihen mit AT III und Heparin allein stark erhöht wird. Im Vergleich zur jeweiligen Kontrollreihe ohne AT III und Heparin kommt es jedoch zu einer hoch signifikanten Hemmung des Wachstums ( $p=0,000$ ). Mit FCS wachsen 61,9% der U87MG-Zellen, bzw. 61,7% der U373MG-Zellen. Ohne FCS wachsen 61,6% der Zellen der Linie U87MG und 61,5% der Zellen der Linie U373MG (Abb. 40).

### 5.4.12 Kombinierte Gabe von Antithrombin III + Heparin und Thrombin aus FloSeal®

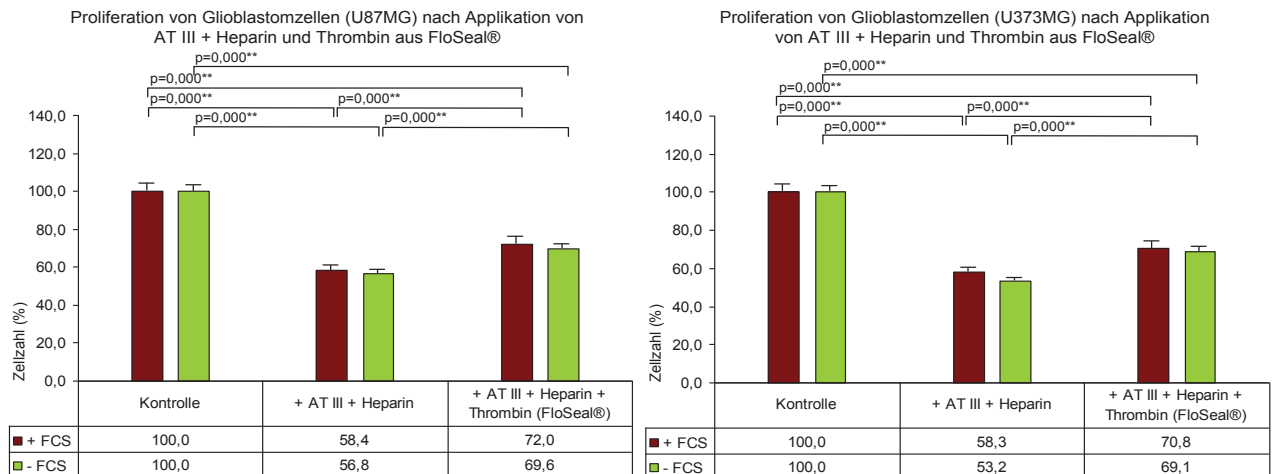


Abb. 41: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von AT III mit Heparin und Thrombin aus FloSeal®

Die alleinige Applikation von Antithrombin III und Heparin zu den Zellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Reduktion der Proliferation ( $p=0,000$ ). Unter Zusatz von FCS wachsen 58,4% der Zellen der Linie U87MG und 58,3% der Zellen der Linie U373MG, verglichen mit der jeweiligen Positivkontrolle. Ohne FCS wachsen 56,8% der U87MG-Zellen und 53,2% der U373MG-Zellen verglichen mit der Negativkontrolle. Die zusätzliche Gabe von Thrombin aus FloSeal® zu den Zellen mit AT III und Heparin führt dazu, dass die Proliferation im Vergleich mit den Versuchsreihen mit AT III und Heparin allein stark erhöht wird. Im Vergleich zur jeweiligen Kontrollreihe ohne AT III und Heparin kommt es jedoch zu einer hoch signifikanten Hemmung des Wachstums ( $p=0,000$ ). Mit FCS wachsen 72,0% der U87MG-Zellen, bzw. 70,8% der U373MG-Zellen. Ohne FCS wachsen 69,6% der Zellen der Linie U87MG und 69,1% der Zellen der Linie U373MG (Abb. 41).

### 5.4.13 Kombinierte Gabe von Antithrombin III + Heparin und Thrombin aus Tissucol®

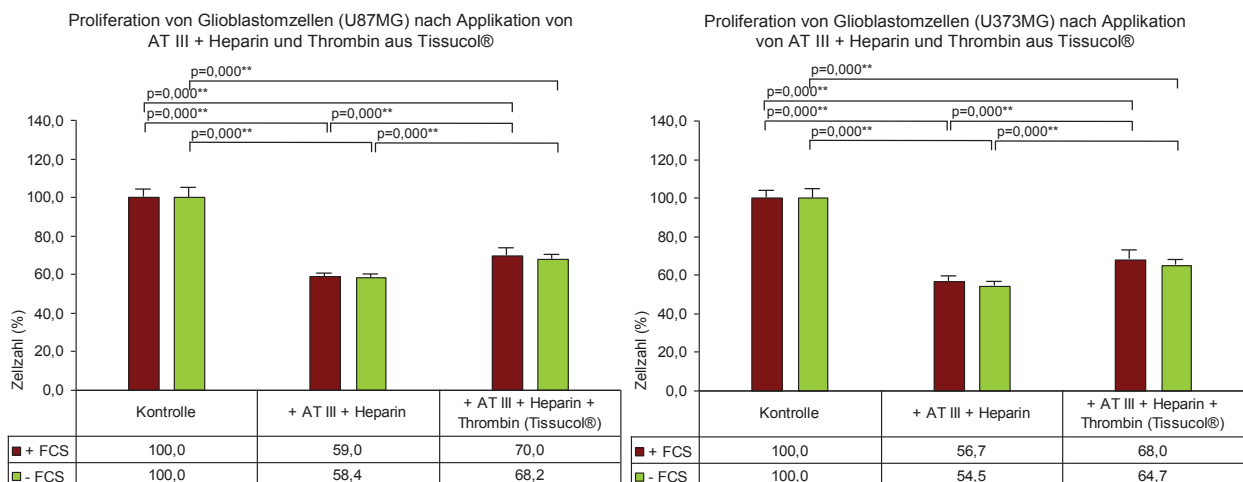


Abb. 42: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von AT III mit Heparin und Thrombin aus Tissucol®

Die alleinige Gabe von Antithrombin III und Heparin zu den Zellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Reduktion der Proliferation ( $p=0,000$ ). Unter Zusatz von FCS wachsen 59,0% der Zellen der Linie U87MG und 56,7% der Zellen der Linie U373MG, verglichen mit der jeweiligen Positivkontrolle. Ohne FCS wachsen 58,4% der U87MG-Zellen und 54,5% der U373MG-Zellen verglichen mit der Negativkontrolle. Die zusätzliche Gabe von Thrombin aus Tissucol® zu den Zellen mit AT III und Heparin führt dazu, dass die Proliferation im Vergleich mit den Versuchsreihen mit AT III und Heparin allein hoch signifikant erhöht wird ( $p=0,000$ ). Im Vergleich zur jeweiligen Kontrollreihe ohne AT III und Heparin kommt es jedoch zu einer hoch signifikanten Hemmung des Wachstums ( $p=0,000$ ). Mit FCS wachsen 70,0% der U87MG-Zellen, bzw. 68,0% der U373MG-Zellen. Ohne FCS wachsen 68,2% der Zellen der Linie U87MG und 64,7% der Zellen der Linie U373MG (Abb. 42).

#### 5.4.14 Kombinierte Gabe von Faktor X und Antithrombin III

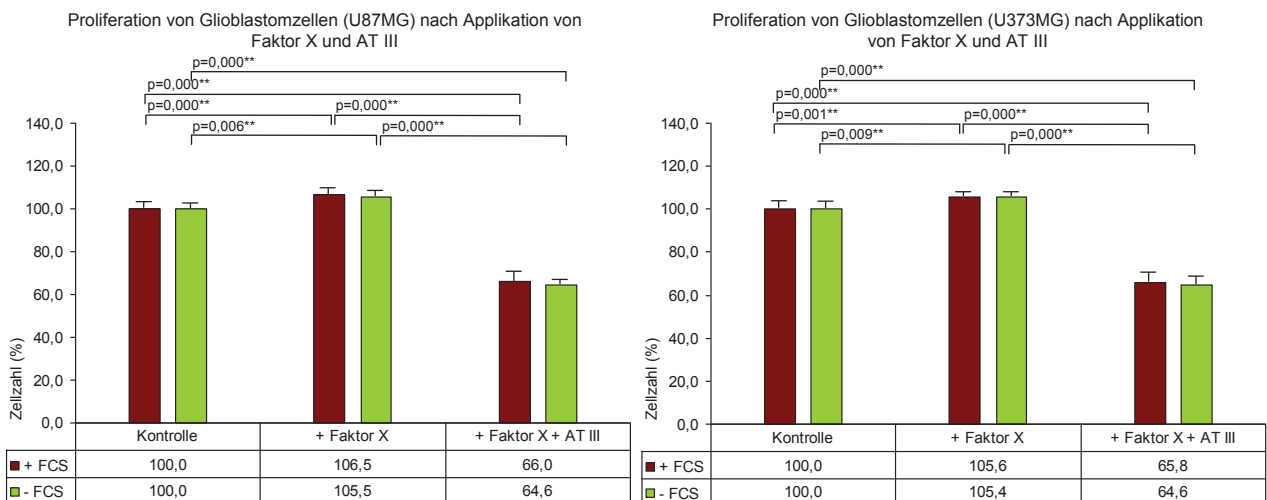


Abb. 43: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Faktor X und Antithrombin III

Die singuläre Applikation von Faktor X zu den humanen Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Steigerung der Proliferation. Unter Zugabe von FCS wachsen 106,5% der Zellen der Linie U87MG, bzw. 105,6% der Zellen der Linie U373MG. Ohne FCS wachsen 105,5% der U87MG-Zellen, bzw. 105,4% der U373MG-Zellen verglichen mit den jeweiligen Kontrollreihen ohne Faktor X. Die Zugabe von AT III zu den Zellen mit Faktor X führt hingegen in allen Versuchsreihen zu einer hoch signifikanten Hemmung des Wachstums. Es kommt sogar verglichen mit den Kontrollreihen ohne Faktor X zu einer starken Reduktion der Proliferation mit FCS auf 66,0% bei U87MG,

bzw. 65,8% bei U373MG und ohne FCS auf 64,6% sowohl bei U87MG als auch bei den Zellen der Reihe U373MG (Abb. 43).

#### 5.4.15 Kombinierte Gabe von Faktor X und Antithrombin III + Heparin

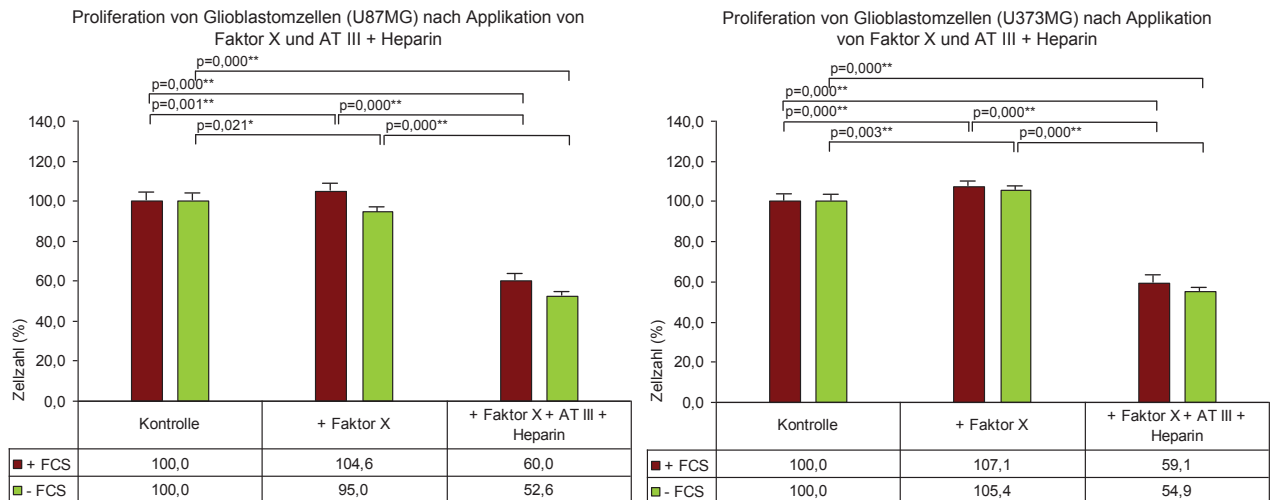


Abb. 44: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Faktor X und Antithrombin III mit Heparin

Die Einzelgabe von Faktor X zu den humanen Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Steigerung der Proliferation. Unter Zugabe von FCS wachsen 104,6% der Zellen der Linie U87MG, bzw. 107,1% der Zellen der Linie U373MG. Ohne FCS wachsen 95,0% der U87MG-Zellen, bzw. 105,4% der U373MG-Zellen verglichen mit den jeweiligen Kontrollreihen ohne Faktor X. Die Zugabe von AT III und Heparin zu den Zellen mit Faktor X führt hingegen in allen Versuchsreihen zu einer hoch signifikanten Hemmung des Wachstums. Es kommt sogar verglichen mit den Kontrollreihen ohne Faktor X zu einer starken Reduktion der Proliferation mit FCS auf 60,0% bei U87MG, bzw. 59,1% bei U373MG und ohne FCS sogar auf 52,6% bei U87MG und 54,9% bei U373MG (Abb. 44).



### 5.4.16 Kombinierte Gabe von Faktor X und Enoxaparin

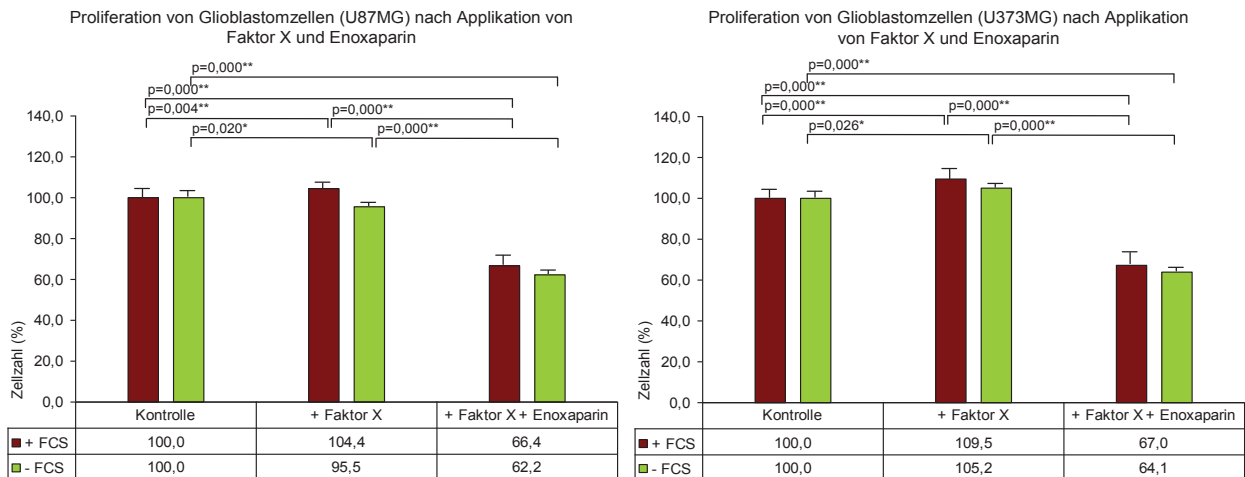


Abb. 45: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Faktor X und Enoxaparin

Die singuläre Applikation von Faktor X zu den humanen Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Steigerung der Proliferation. Unter Zugabe von FCS wachsen 104,4% der Zellen der Linie U87MG, bzw. 109,5% der Zellen der Linie U373MG. Ohne FCS wachsen 95,5% der U87MG-Zellen, bzw. 105,2% der U373MG-Zellen verglichen mit den jeweiligen Kontrollreihen ohne Faktor X. Die Zugabe von Enoxaparin zu den Zellen mit Faktor X führt hingegen in allen Versuchsreihen zu einer hoch signifikanten Hemmung des Wachstums. Es kommt sogar verglichen mit den Kontrollreihen ohne Faktor X zu einer starken Reduktion der Proliferation mit FCS auf 66,4% bei U87MG, bzw. 67,0% bei U373MG und ohne FCS sogar auf 62,2% bei U87MG und 64,1% bei U373MG (Abb. 45).

### 5.4.17 Kombinierte Gabe von Faktor X und Nadroparin

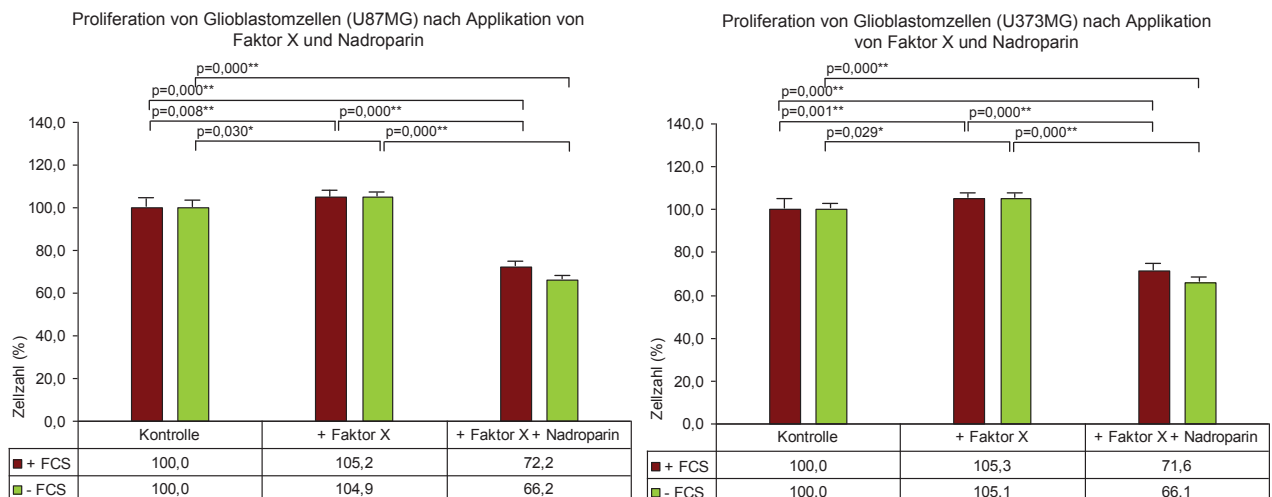


Abb. 46: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Faktor X und Nadroparin

Die Einzelgabe von Faktor X zu den humanen Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Steigerung der Proliferation. Unter Zugabe von FCS wachsen 105,2% der Zellen der Linie U87MG, bzw. 105,3% der Zellen der Linie U373MG. Ohne FCS wachsen 104,9% der U87MG-Zellen, bzw. 105,1% der U373MG-Zellen verglichen mit den jeweiligen Kontrollreihen ohne Faktor X. Die Zugabe von Nadroparin zu den Zellen mit Faktor X führt hingegen in allen Versuchsreihen zu einer hoch signifikanten Reduktion der Proliferation. Es kommt sogar verglichen mit den Kontrollreihen ohne Faktor X zu einer starken Wachstumshemmung mit FCS auf 72,2% bei U87MG, bzw. 71,6% bei U373MG und ohne FCS sogar auf 66,2% bei U87MG und 66,1% bei U373MG (Abb. 46).

### 5.4.18 Kombinierte Gabe von Faktor X und Heparin

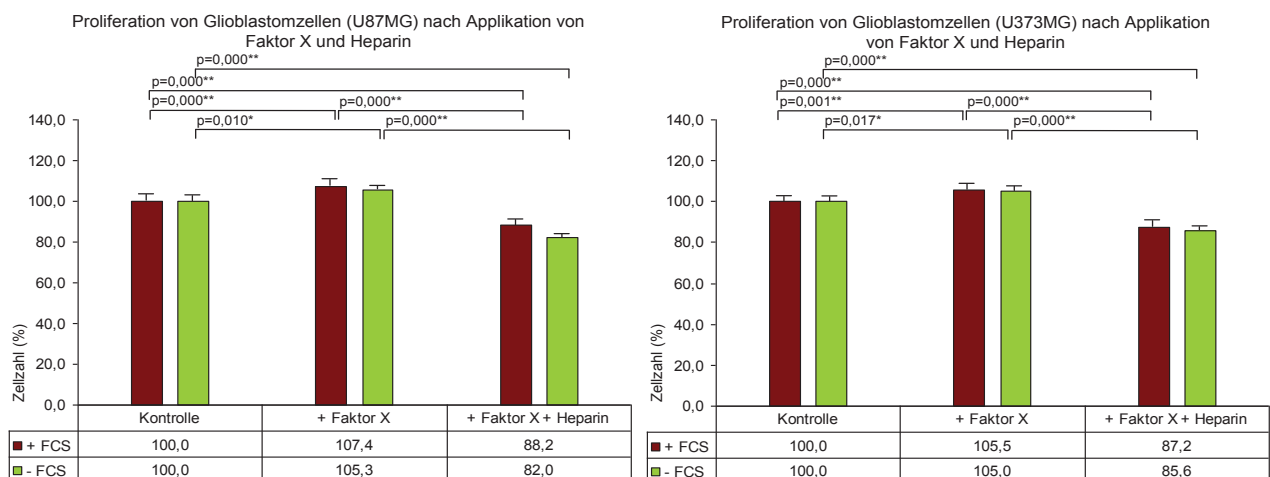


Abb. 47: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Faktor X und Heparin

Die singuläre Applikation von Faktor X zu den humanen Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Steigerung der Proliferation. Unter Zugabe von FCS wachsen 107,4% der Zellen der Linie U87MG, bzw. 105,5% der Zellen der Linie U373MG. Ohne FCS wachsen 105,3% der U87MG-Zellen, bzw. 105,0% der U373MG-Zellen verglichen mit den jeweiligen Kontrollreihen ohne Faktor X. Die Zugabe von Heparin zu den Zellen mit Faktor X führt hingegen in allen Versuchsreihen zu einer hoch signifikanten Reduktion der Proliferation. Es kommt sogar verglichen mit den Kontrollreihen ohne Faktor X zu einer starken Wachstumshemmung mit FCS auf 88,2% bei U87MG, bzw. 87,2% bei U373MG und ohne FCS sogar auf 82,0% bei U87MG und 85,6% bei U373MG (Abb. 47).

### 5.4.19 Kombinierte Gabe von Faktor X und Hirudin

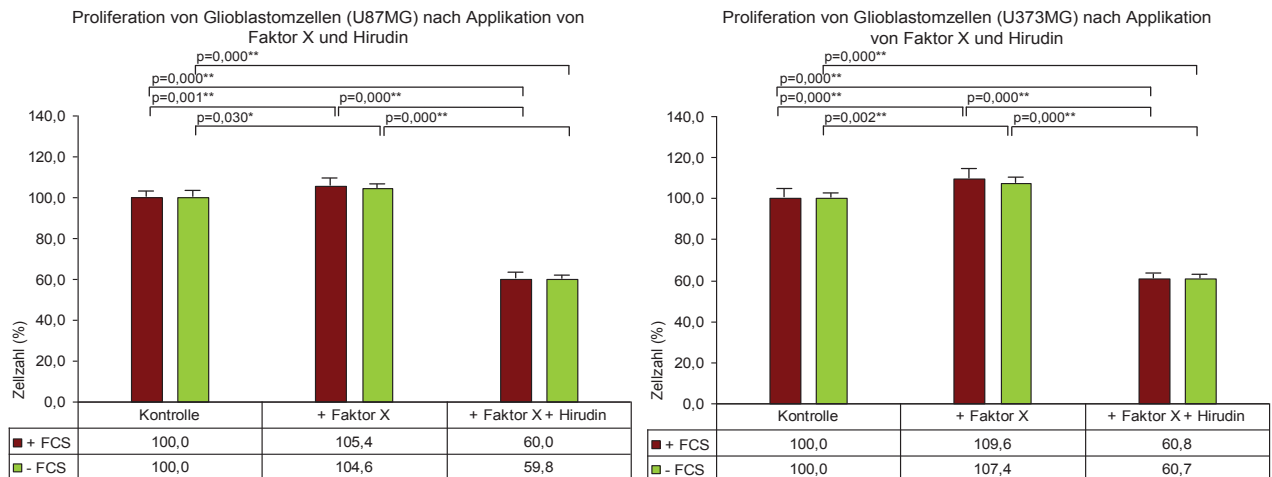


Abb. 48: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Faktor X und Hirudin

Die alleinige Zugabe von Faktor X zu den humanen Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Steigerung der Proliferation. Unter Zusatz von FCS wachsen 105,4% der Zellen der Linie U87MG, bzw. 109,5% der Zellen der Linie U373MG. Ohne FCS wachsen 104,6% der U87MG-Zellen, bzw. 107,4% der U373MG-Zellen verglichen mit den jeweiligen Kontrollreihen ohne Faktor X. Die Zugabe von Hirudin zu den Zellen mit Faktor X führt hingegen in allen Versuchsreihen zu einer hoch signifikanten Reduktion der Proliferation. Es kommt sogar verglichen mit den Kontrollreihen ohne Faktor X zu einer starken Wachstumshemmung mit FCS auf 60,0% bei U87MG, bzw. 60,8% bei U373MG und ohne FCS auf 59,8% bei U87MG und 60,7% bei U373MG (Abb. 48).

### 5.4.20 Kombinierte Gabe der Kleberkomponente aus Tissucol® und Albumin

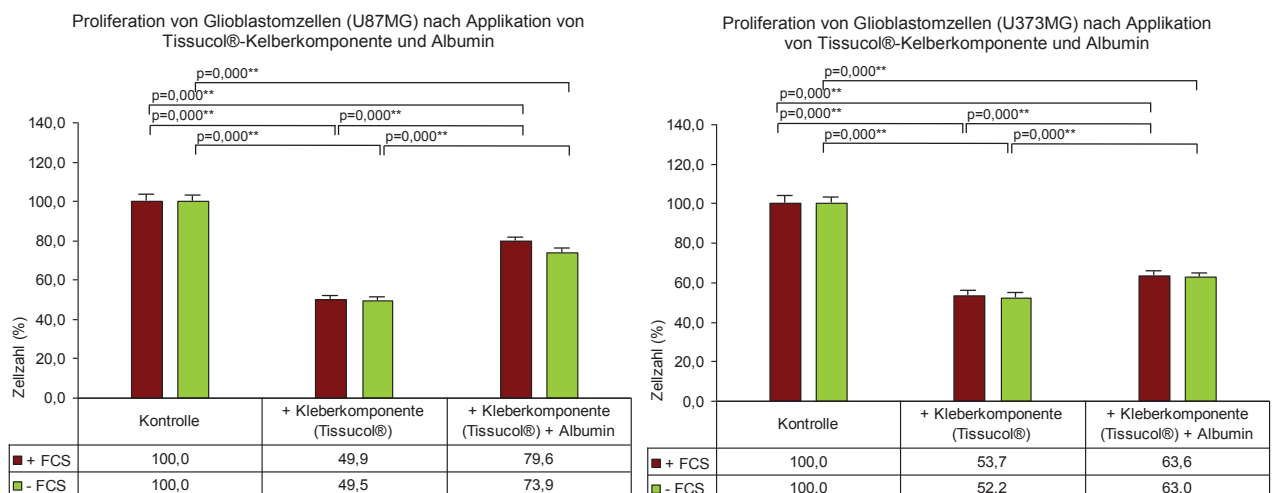


Abb. 49: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation der Kleberkomponente aus Tissucol® und Albumin

Die singuläre Applikation der Kleberkomponente aus Tissucol® zu den humanen Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Reduktion der Proliferation ( $p=0,000$ ). Unter Zugabe von FCS wird das Wachstum der Zellen der Linie U87MG auf 49,9% verglichen mit der Positivkontrollreihe, das Wachstum der U373MG-Zellen auf 53,7% reduziert. Ohne FCS wachsen 49,5% der U87MG-Zellen bzw. 52,2% der U373MG-Zellen verglichen mit der Negativkontrollreihe. Die zusätzliche Gabe von Albumin zu der Versuchsreihe mit der Kleberkomponente des Tissucol® führt zu einer hoch signifikanten Zunahme der Proliferation verglichen mit den Versuchen mit der Kleberkomponente allein, jedoch zu einer Wachstumshemmung bezogen auf die jeweiligen Kontrollreihen ohne Kleberkomponente. Mit FCS wachsen 79,6% der U87MG-Zellen bzw. 63,6% der U373MG-Zellen, ohne FCS sind es 73,9% der U87MG-Zellen bzw. 63,0% der U373MG-Zellen (Abb. 49).

#### 5.4.21 Kombinierte Gabe der Kleberkomponente aus Tissucol® und TachoSil®

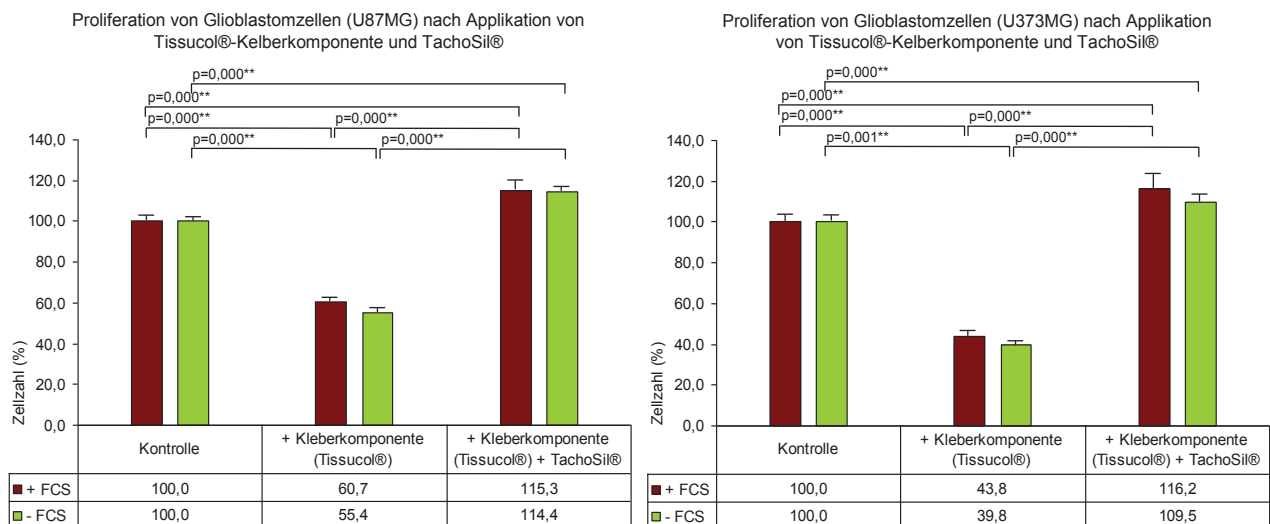
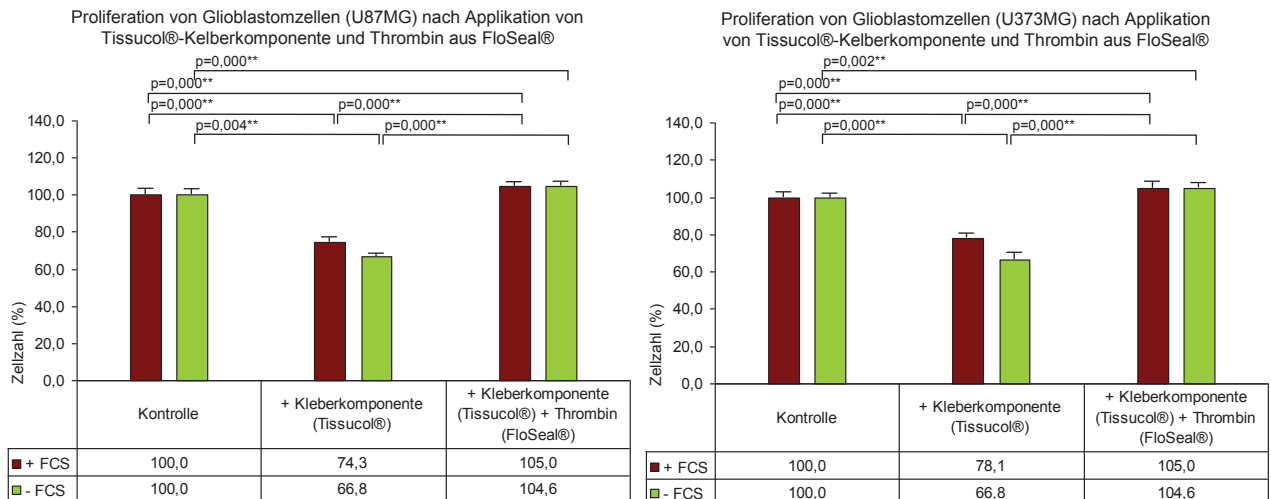


Abb. 50: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation der Kleberkomponente aus Tissucol® und TachoSil®

Die Einzelgabe der Kleberkomponente aus Tissucol® auf die humanen Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Reduktion der Proliferation ( $p=0,000$ ). Unter Zugabe von FCS wird das Wachstum der Zellen der Linie U87MG auf 60,7% verglichen mit der Positivkontrollreihe, das Wachstum der U373MG-Zellen auf 43,8% reduziert. Ohne FCS wachsen 55,4% der U87MG-Zellen bzw. 39,8% der U373MG-Zellen verglichen mit der Negativkontrollreihe. Die zusätzliche Gabe von TachoSil® zu der Versuchsreihe mit der Kleberkomponente des Tissucol® führt zu einer hoch signifikanten Zunahme der Proliferation sowohl bezogen auf die Versuche mit der

Kleberkomponente allein als auch zu einer starken Wachstumssteigerung bezogen auf die jeweiligen Kontrollreihen ohne Kleberkomponente. Mit FCS wachsen 115,3% der U87MG-Zellen bzw. 116,2% der U373MG-Zellen, ohne FCS sind es 114,4% der U87MG-Zellen bzw. 109,5% der U373MG-Zellen (Abb. 50).

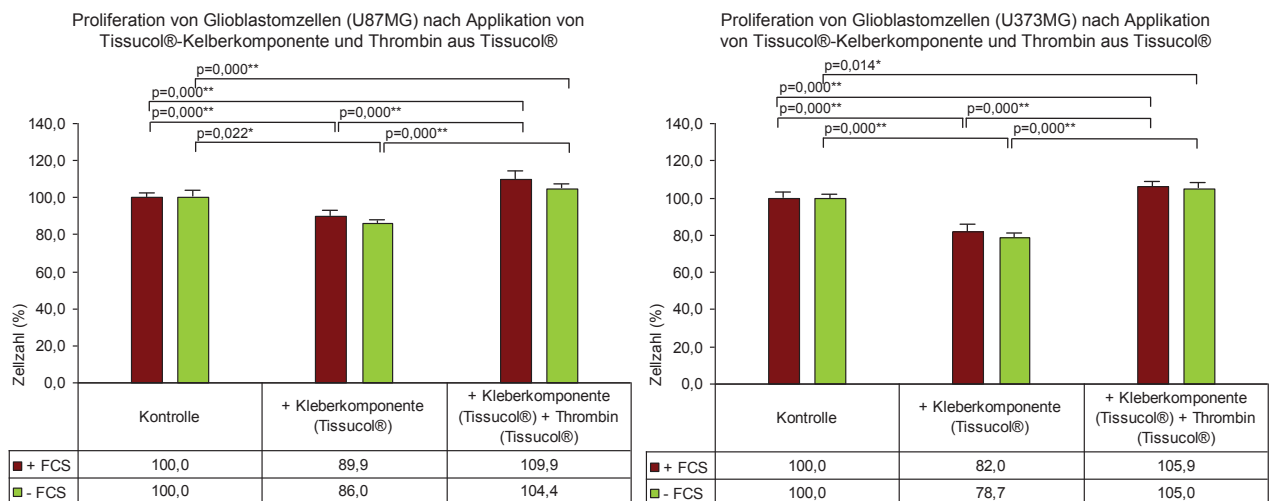
#### 5.4.22 Kombinierte Gabe der Kleberkomponente aus Tissucol® und Thrombin aus Floseal®



**Abb. 51: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation der Kleberkomponente aus Tissucol® und Thrombin aus FloSeal®**

Die einzelne Applikation der Kleberkomponente aus Tissucol® auf die humanen Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Reduktion der Proliferation ( $p=0,000$ ). Unter Zugabe von FCS wird das Wachstum der Zellen der Linie U87MG auf 74,3% verglichen mit der Positivkontrollreihe, das Wachstum der U373MG-Zellen auf 78,1% reduziert. Ohne FCS wachsen 66,8% sowohl der U87MG-Zellen als auch der U373MG-Zellen verglichen mit der Negativkontrollreihe. Im gleichen Experiment führt die zusätzliche Gabe von Thrombin aus FloSeal® zu der Versuchsreihe mit der Kleberkomponente des Tissucol® zu einer hoch signifikanten Zunahme der Proliferation sowohl bezogen auf die Versuche mit der Kleberkomponente allein als auch bezogen auf die jeweiligen Kontrollreihen ohne Kleberkomponente. Mit FCS wachsen 105,0% der U87MG-Zellen bzw. der U373MG-Zellen, ohne FCS sind es jeweils 104,6% (Abb. 51).

### 5.4.23 Kombinierte Gabe der Kleberkomponente aus Tissucol® und Thrombin aus Tissucol®



**Abb. 52: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation der Kleberkomponente aus Tissucol® und Thrombin aus Tissucol®**

Die singuläre Applikation der Kleberkomponente aus Tissucol® auf die humanen Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Reduktion der Proliferation. Unter Zugabe von FCS wird das Wachstum der Zellen der Linie U87MG auf 89,9% verglichen mit der Positivkontrollreihe, das Wachstum der U373MG-Zellen auf 82,0% reduziert. Ohne FCS wachsen 86,0% der U87MG-Zellen und 78,7% der U373MG-Zellen verglichen mit der Negativkontrollreihe. Im gleichen Experiment führt die zusätzliche Gabe von Thrombin aus Tissucol® zu der Versuchsreihe mit der Kleberkomponente des Tissucol® zu einer hoch signifikanten Zunahme der Proliferation sowohl bezogen auf die Versuche mit der Kleberkomponente allein als auch im Vergleich mit den jeweiligen Kontrollreihen ohne Kleberkomponente. Mit FCS wachsen 109,9% der U87MG-Zellen bzw. 105,9% der U373MG-Zellen, ohne FCS sind es 104,6% der U87MG-Zellen und 105,0% der U373MG-Zellen (Abb. 52).

### 5.4.24 Kombinierte Gabe von TachoSil® und Enoxaparin

Die Einzelgabe des TachoSil® zu den Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Zunahme des Wachstums ( $p=0,000$ ). Unter Zusatz von FCS wird die Proliferation auf 105,0% bei den Zellen der Linie U87MG und auf 111,2% bei den U373MG-Zellen erhöht. Ohne FCS ist der Effekt des TachoSil® schwächer aber trotzdem hoch signifikant ausgeprägt. Es wachsen 104,6% der U87MG-Zellen und 105,1% der U373MG-Zellen.

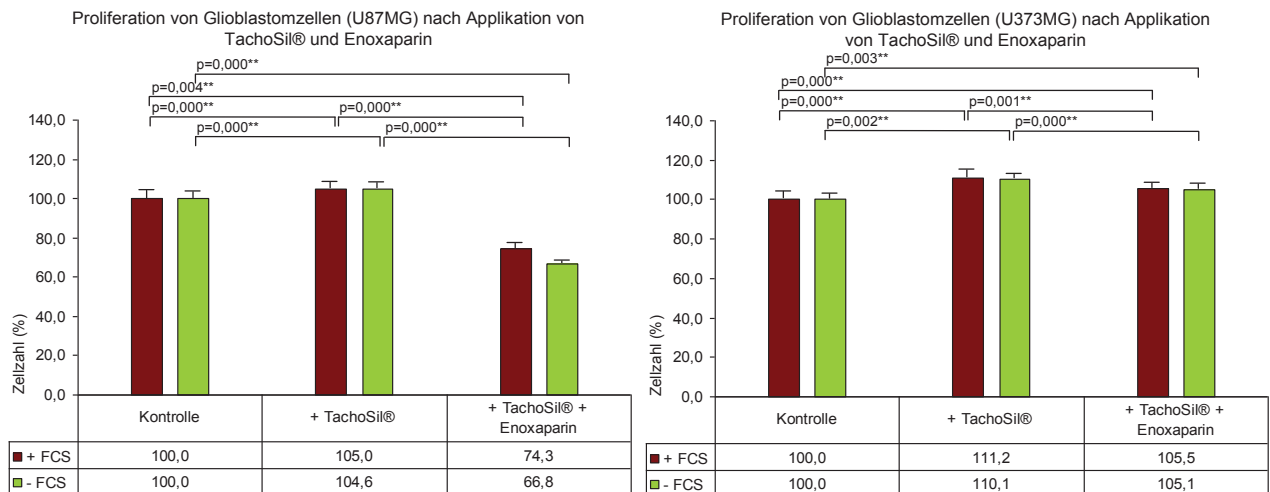


Abb. 53: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von TachoSil® und Enoxaparin

Die zusätzliche Applikation von Enoxaparin führt im gleichen Versuchsaufbau zu einer hoch signifikanten Reduktion des Wachstums der Zellen beider Linien verglichen mit der Versuchsreihe mit TachoSil® allein ( $p=0,000$ ). Im Vergleich zu den Kontrollreihen ohne TachoSil® weisen die zwei Zelllinien unterschiedliche Reaktionsmuster auf. Die Zellen der Linie U87MG werden hoch signifikant in ihrem Wachstum gehemmt. Mit FCS wachsen 74,3%, ohne FCS 66,8%. Die U373MG-Zellen hingegen wachsen unter gleichzeitiger Applikation von TachoSil® und Enoxaparin verstärkt. Mit FCS wachsen 105,5%, ohne FCS 105,1% (Abb. 53).

#### 5.4.25 Kombinierte Gabe von TachoSil® und Nadroparin

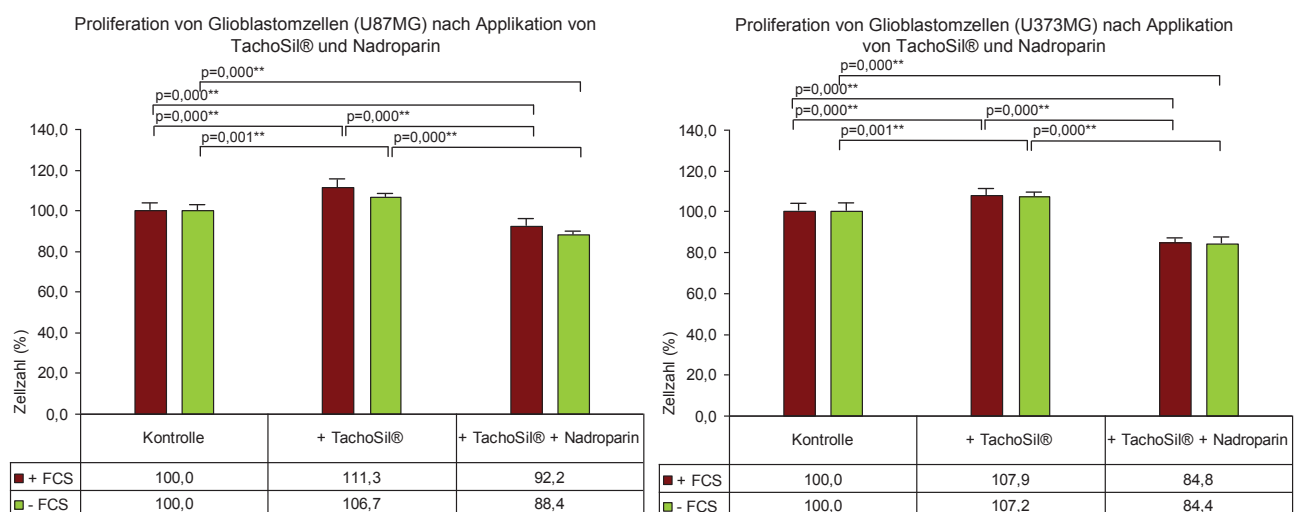


Abb. 54: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von TachoSil® und Nadroparin

Die Einzelgabe des TachoSil® zu den Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Zunahme des Wachstums ( $p=0,000$ ). Unter Zusatz von FCS wird die Proliferation auf 111,3% bei den Zellen der Linie U87MG und auf 107,9% bei den U373MG-Zellen erhöht. Ohne FCS ist der Effekt des TachoSil® schwächer aber trotzdem hoch signifikant ausgeprägt. Es wachsen 106,7% der U87MG-Zellen und 107,2% der U373MG-Zellen. Die zusätzliche Applikation von Nadroparin führt im gleichen Versuchsaufbau zu einer hoch signifikanten Reduktion des Wachstums der Zellen beider Linien verglichen mit der Versuchsreihe mit TachoSil® allein ( $p=0,000$ ). Auch im Vergleich zu den Kontrollreihen ohne TachoSil® werden die zwei Zelllinien hoch signifikant in ihrem Wachstum gehemmt. Mit FCS wachsen 92,2%, ohne FCS 88,4% der U87MG-Zellen. Bei den U373MG-Zellen wachsen unter gleichzeitiger Applikation von TachoSil® und Nadroparin mit FCS 84,8%, ohne FCS 84,4% (Abb. 54).

#### 5.4.26 Kombinierte Gabe von TachoSil® und Heparin

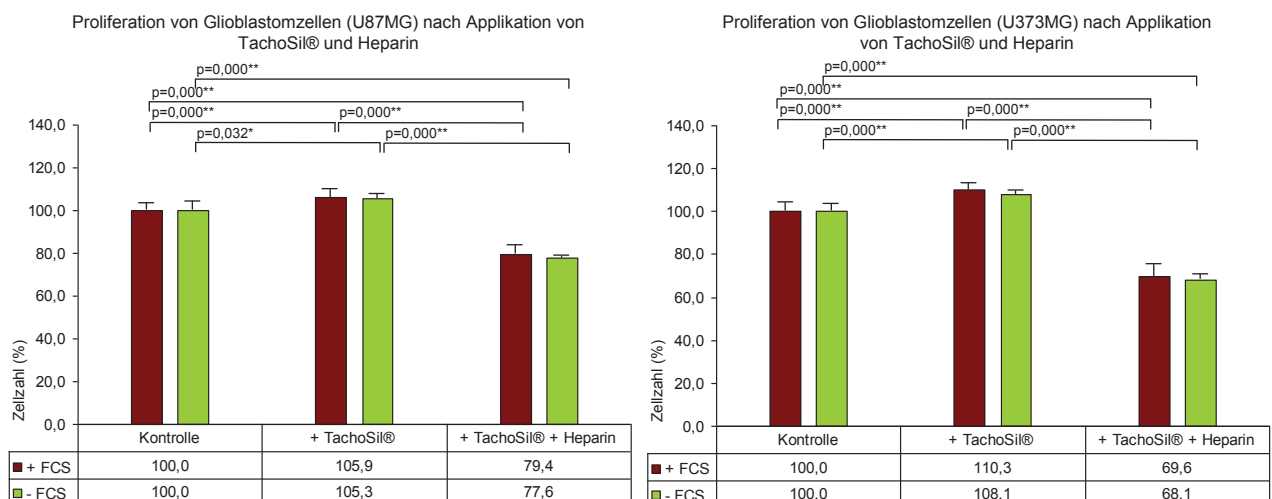


Abb. 55: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von TachoSil® und Heparin

Die singuläre Applikation des TachoSil® zu den Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Zunahme des Wachstums. Unter Zusatz von FCS wird die Proliferation auf 105,9% bei den Zellen der Linie U87MG und auf 110,3% bei den U373MG-Zellen erhöht. Ohne FCS ist der Effekt des TachoSil® etwas schwächer ausgeprägt. Es wachsen 105,3% der U87MG-Zellen und 108,1% der U373MG-Zellen. Die zusätzliche Applikation von Heparin führt im gleichen Versuchsaufbau zu einer hoch signifikanten Reduktion des Wachstums der Zellen beider Linien sowohl verglichen mit der Versuchsreihe mit TachoSil® allein ( $p=0,000$ ) als auch im Vergleich zu den Kontrollreihen ohne TachoSil®. Mit FCS wachsen bei den Zellen der Linie U87MG 79,4%, ohne FCS



77,6%. Bei den U373MG-Zellen wachsen unter gleichzeitiger Applikation von TachoSil® und Heparin mit FCS 69,6%, ohne FCS 68,1% (Abb. 55).

### 5.4.27 Kombinierte Gabe von TachoSil® und Hirudin

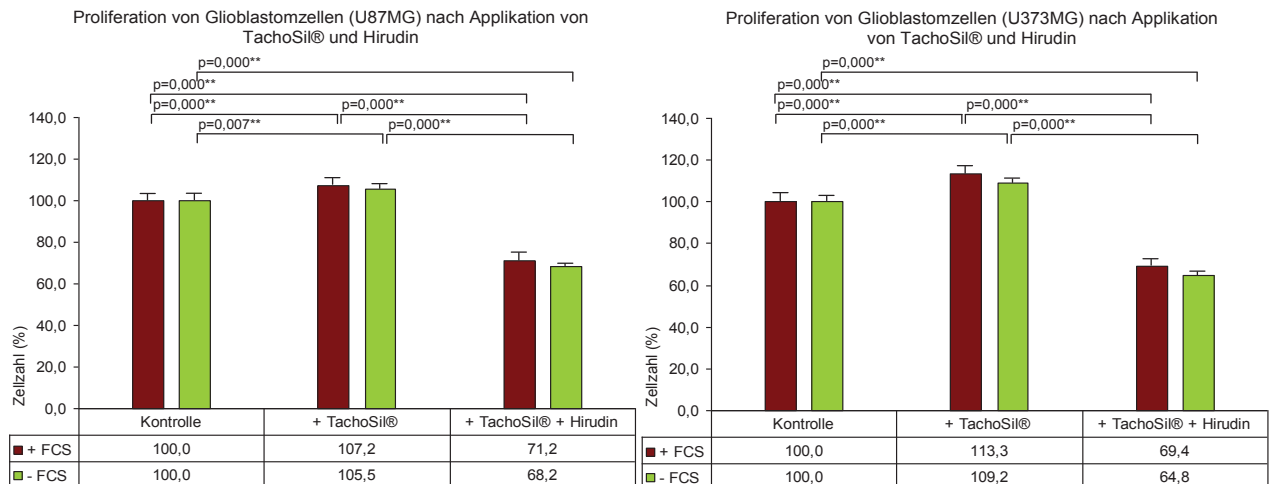


Abb. 56: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von TachoSil® und Hirudin

Die Einzelgabe von TachoSil® zu den Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Zunahme des Wachstums. Unter Zusatz von FCS wird die Proliferation auf 107,2% bei den Zellen der Linie U87MG und auf 113,3% bei den U373MG-Zellen erhöht. Ohne FCS ist der Effekt des TachoSil® etwas schwächer ausgeprägt. Es wachsen 105,5% der U87MG-Zellen und 109,2% der U373MG-Zellen. Die zusätzliche Applikation von Hirudin führt im gleichen Versuchsaufbau zu einer hoch signifikanten Reduktion des Wachstums der Zellen beider Linien sowohl verglichen mit der Versuchsreihe mit TachoSil® allein als auch im Vergleich zu den Kontrollreihen ohne TachoSil® ( $p=0,000$ ). Mit FCS wachsen bei den Zellen der Linie U87MG 71,2%, ohne FCS 68,2%. Bei den U373MG-Zellen wachsen unter gleichzeitiger Applikation von TachoSil® und Hirudin mit FCS 69,4%, ohne FCS 64,8% (Abb. 56).

### 5.4.28 Kombinierte Gabe von TachoSil® und PPACK

Die einzelne Applikation von TachoSil® zu den Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Zunahme des Wachstums. Unter Zusatz von FCS wird die Proliferation auf 114,8% bei den Zellen der Linie U87MG und auf 112,9% bei den U373MG-Zellen erhöht. Ohne FCS ist der Effekt des TachoSil® etwas schwächer ausgeprägt. Es wachsen 113,5% der U87MG-Zellen und 108,2% der U373MG-Zellen.

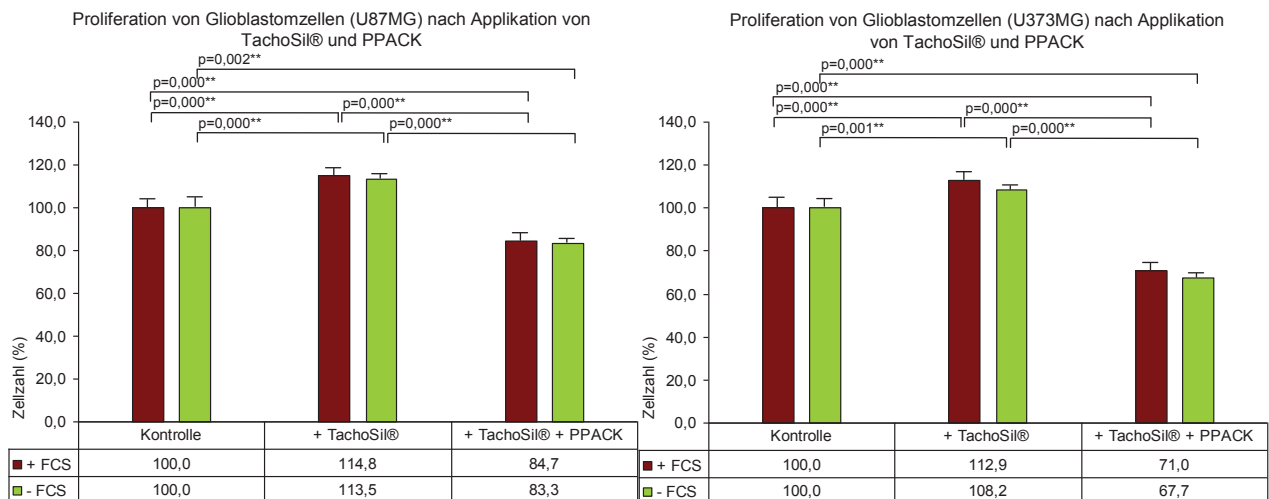


Abb. 57: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von TachoSil® und PPACK

Die zusätzliche Applikation von PPACK zu den Versuchsreihen mit TachoSil® führt im gleichen Versuchsaufbau zu einer hoch signifikanten Reduktion des Wachstums der Zellen beider Linien sowohl verglichen mit TachoSil® allein als auch im Vergleich zu den Kontrollreihen ohne TachoSil®. Mit FCS wachsen bei den Zellen der Linie U87MG 84,7%, ohne FCS 83,3%. Bei den U373MG-Zellen wachsen unter gleichzeitiger Applikation von TachoSil® und PPACK mit FCS 71,0%, ohne FCS 67,7% (Abb. 57).

#### 5.4.29 Kombinierte Gabe von Thrombin aus FloSeal® und Enoxaparin

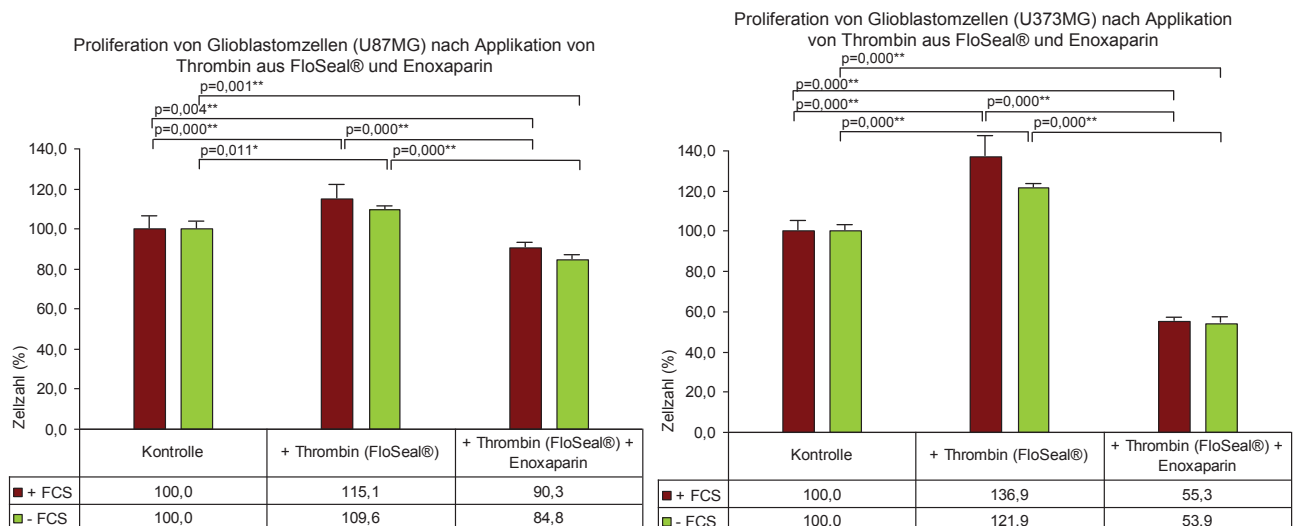


Abb. 58: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Thrombin aus FloSeal® und Enoxaparin

Die singuläre Applikation von Thrombin aus FloSeal® zu den Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Proliferationssteigerung. Unter Zusatz von FCS wird das Wachstum auf 115,1% bei den Zellen der Linie U87MG und

auf 136,9% bei den U373MG-Zellen erhöht. Ohne FCS ist der Effekt des TachoSil® schwächer ausgeprägt. Es wachsen 109,6% der U87MG-Zellen und 121,9% der U373MG-Zellen. Die zusätzliche Gabe von Enoxaparin zu den Versuchsreihen mit Thrombin aus FloSeal® führt bei beiden Zelllinien zu einer hoch signifikanten Abnahme der Proliferation verglichen sowohl mit Thrombin aus FloSeal® allein als auch mit den jeweiligen Kontrollreihen ohne Thrombin ( $p=0,000$ ). Verglichen mit diesen Kontrollreihen wachsen unter Zugabe von FCS 90,3% der U87MG-Zellen und 55,3% der U373MG-Zellen. Ohne FCS sind es 84,8% der U87MG-Zellen bzw. 53,9% der U373MG-Zellen (Abb. 58).

### 5.4.30 Kombinierte Gabe von Thrombin aus FloSeal® und Nadroparin

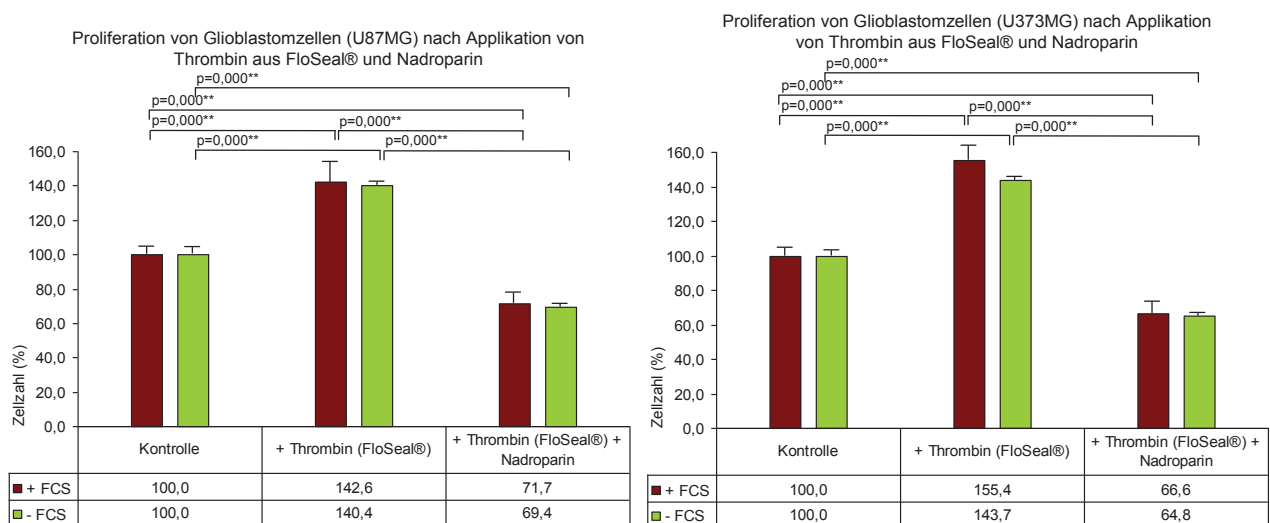


Abb. 59: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Thrombin aus FloSeal® und Nadroparin

Die Einzelgabe von Thrombin aus FloSeal® zu den Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Proliferationssteigerung. Unter Zusatz von FCS wird das Wachstum auf 142,6% bei den Zellen der Linie U87MG und auf 155,4% bei den U373MG-Zellen erhöht. Ohne FCS wachsen 140,4% der U87MG-Zellen und 143,7% der U373MG-Zellen. Die zusätzliche Gabe von Nadroparin zu den Versuchsreihen mit Thrombin aus FloSeal® führt bei beiden Zelllinien zu einer hoch signifikanten Abnahme des Wachstums verglichen sowohl mit Thrombin aus FloSeal® allein als auch mit den jeweiligen Kontrollreihen ohne Thrombin ( $p=0,000$ ). Verglichen mit diesen Kontrollreihen wachsen unter Zugabe von FCS 71,7% der U87MG-Zellen und 66,6% der U373MG-Zellen. Ohne FCS sind es 69,4% der U87MG-Zellen bzw. 64,8% der U373MG-Zellen (Abb. 59).

### 5.4.31 Kombinierte Gabe von Thrombin aus FloSeal® und Heparin

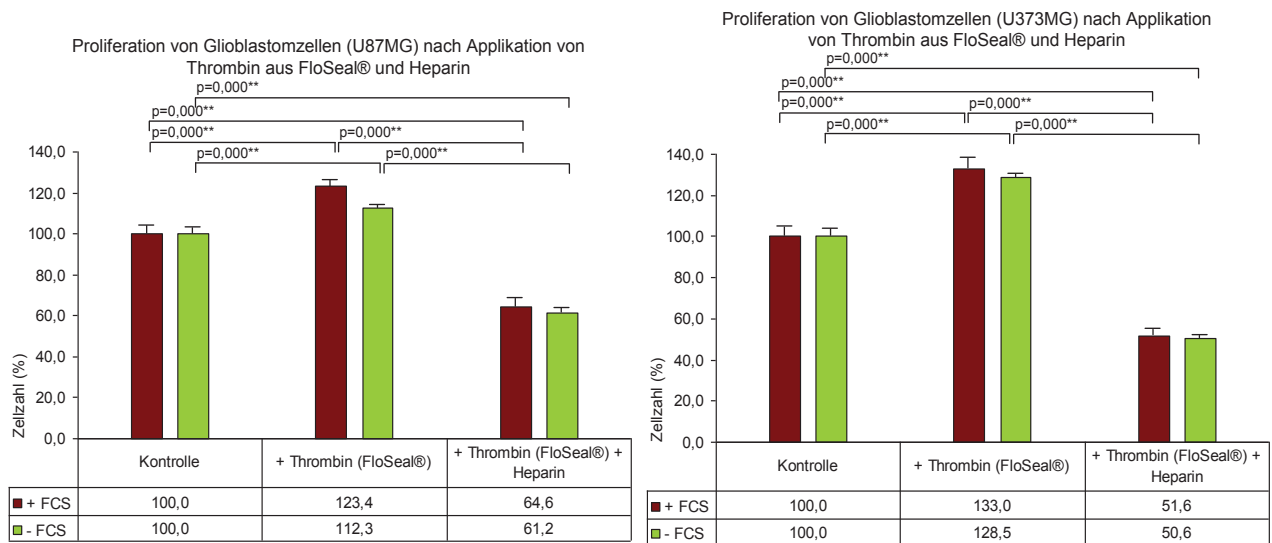


Abb. 60: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Thrombin aus FloSeal® und Heparin

Die singuläre Applikation von Thrombin aus FloSeal® zu den Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Proliferationssteigerung. Unter Zusatz von FCS wird das Wachstum auf 123,4% bei den Zellen der Linie U87MG und auf 133,0% bei den U373MG-Zellen erhöht. Ohne FCS wachsen 112,3% der U87MG-Zellen und 128,5% der U373MG-Zellen. Die zusätzliche Gabe von Heparin zu den Versuchsreihen mit Thrombin aus FloSeal® führt bei beiden Zelllinien zu einer hoch signifikanten Abnahme des Wachstums verglichen sowohl mit Thrombin aus FloSeal® allein als auch mit den jeweiligen Kontrollreihen ohne Thrombin ( $p=0,000$ ). Verglichen mit diesen Kontrollreihen wachsen unter Zugabe von FCS 64,6% der U87MG-Zellen und 51,6% der U373MG-Zellen. Ohne FCS sind es 61,2% der U87MG-Zellen bzw. 50,6% der U373MG-Zellen (Abb. 60).

### 5.4.32 Kombinierte Gabe von Thrombin aus FloSeal® und Hirudin

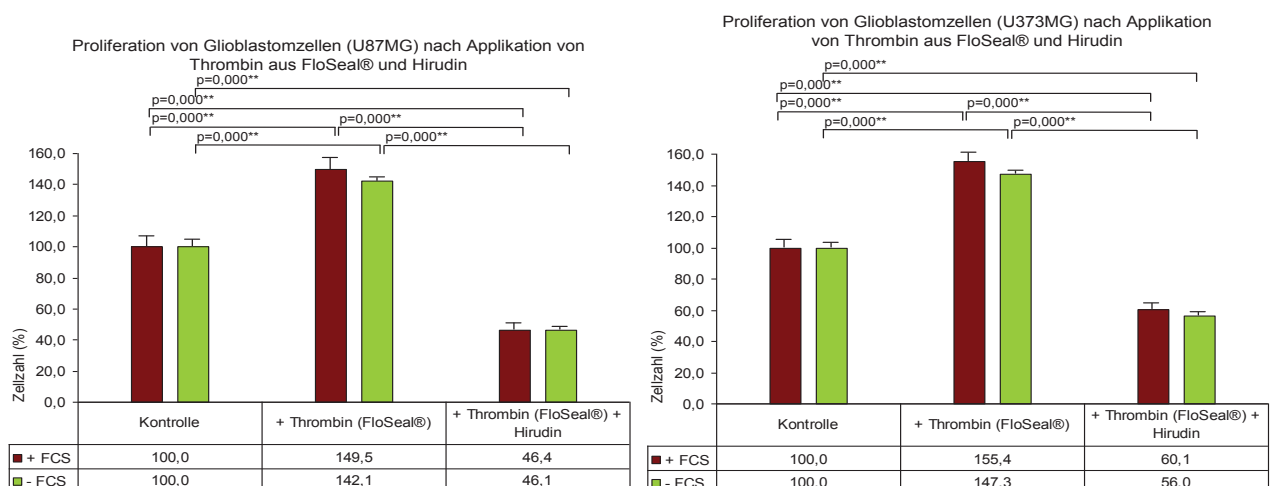


Abb. 61: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Thrombin aus FloSeal® und Hirudin

Die Einzelgabe von Thrombin aus FloSeal® zu den Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Proliferationssteigerung. Unter Zusatz von FCS wird das Wachstum auf 149,5% bei den Zellen der Linie U87MG und auf 155,4% bei den U373MG-Zellen erhöht. Ohne FCS wachsen 142,1% der U87MG-Zellen und 147,3% der U373MG-Zellen. Die zusätzliche Gabe von Hirudin zu den Versuchsreihen mit Thrombin aus FloSeal® führt bei beiden Zelllinien zu einer hoch signifikanten Abnahme des Wachstums verglichen sowohl mit Thrombin aus FloSeal® allein als auch mit den jeweiligen Kontrollreihen ohne Thrombin ( $p=0,000$ ). Verglichen mit diesen Kontrollreihen wachsen unter Zugabe von FCS 46,4% der U87MG-Zellen und 60,1% der U373MG-Zellen. Ohne FCS sind es 46,1% der U87MG-Zellen bzw. 56,0% der U373MG-Zellen (Abb. 61).

### 5.4.33 Kombinierte Gabe von Thrombin aus FloSeal® und PPACK

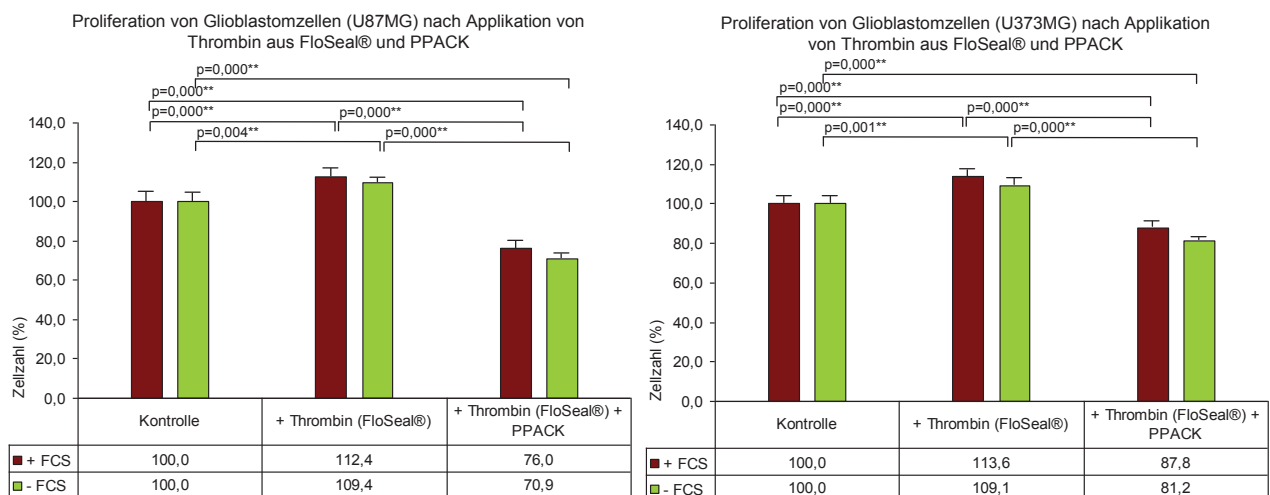


Abb. 62: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Thrombin aus FloSeal® und PPACK

Die alleinige Applikation von Thrombin aus FloSeal® zu den Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Proliferationssteigerung. Unter Zusatz von FCS wird das Wachstum auf 112,4% bei den Zellen der Linie U87MG und auf 113,6% bei den U373MG-Zellen erhöht. Ohne FCS wachsen 109,4% der U87MG-Zellen und 109,1% der U373MG-Zellen. Die zusätzliche Gabe von PPACK zu den Versuchsreihen mit Thrombin aus FloSeal® führt bei beiden Zelllinien zu einer hoch signifikanten Abnahme des Wachstums verglichen sowohl mit Thrombin aus FloSeal® allein als auch mit den jeweiligen Kontrollreihen ohne Thrombin ( $p=0,000$ ). Bezogen auf diese Kontrollreihen wachsen unter Zugabe von FCS 76,0% der U87MG-Zellen und 87,8% der U373MG-Zellen. Ohne FCS sind es 70,9% der U87MG-Zellen bzw. 81,2% der U373MG-Zellen (Abb. 62).

### 5.4.34 Kombinierte Gabe von Thrombin aus Tissucol® und Enoxaparin

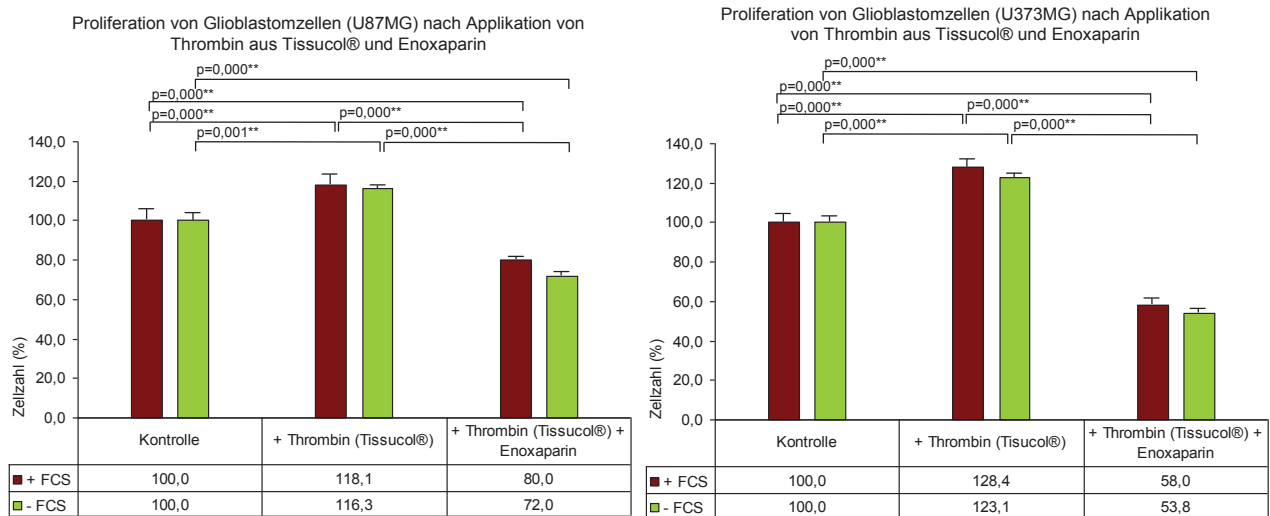


Abb. 63: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Thrombin aus Tissucol® und Enoxaparin

Die Einzelgabe von Thrombin aus Tissucol® zu den Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Wachstumszunahme. Unter Zusatz von FCS wird die Proliferation auf 118,1% bei den Zellen der Linie U87MG und auf 128,4% bei den U373MG-Zellen erhöht. Ohne FCS wachsen 116,3% der U87MG-Zellen und 123,1% der U373MG-Zellen. Die zusätzliche Gabe von Enoxaparin zu den Versuchen mit Thrombin aus Tissucol® führt bei beiden Zelllinien zu einer hoch signifikanten Abnahme des Wachstums verglichen sowohl mit Thrombin aus Tissucol® allein als auch mit den jeweiligen Kontrollreihen ohne Thrombin ( $p=0,000$ ). Bezogen auf diese Kontrollreihen wachsen unter Zugabe von FCS 80,0% der U87MG-Zellen und 58,0% der U373MG-Zellen. Ohne FCS sind es 72,0% der U87MG-Zellen bzw. 53,8% der U373MG-Zellen (Abb. 63).

### 5.4.35 Kombinierte Gabe von Thrombin aus Tissucol® und Nadroparin

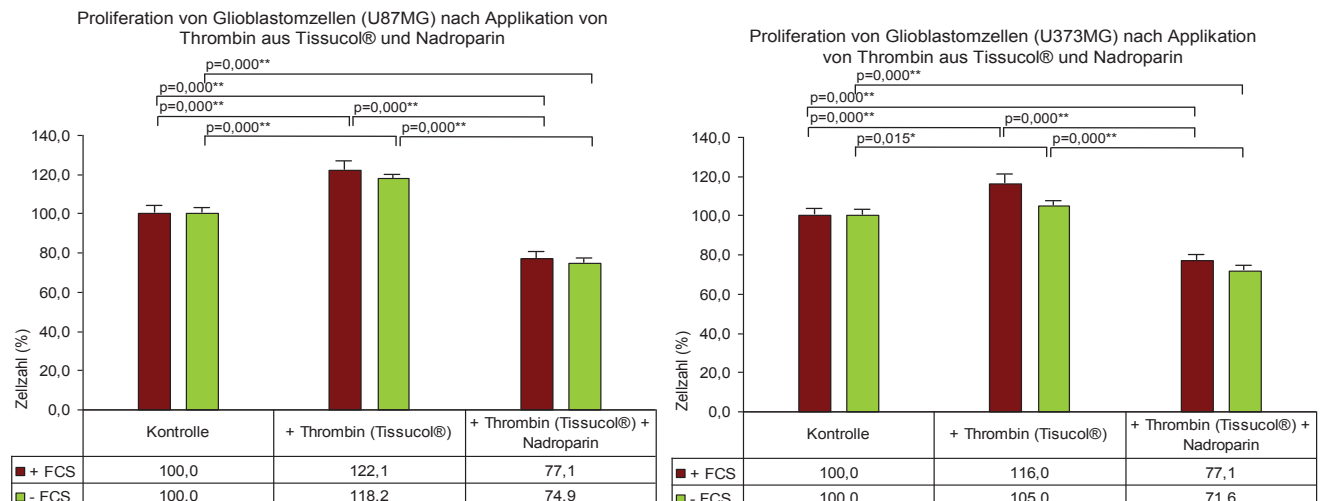


Abb. 64: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Thrombin aus Tissucol® und Nadroparin

Die Einzelgabe von Thrombin aus Tissucol® zu den humanen Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Wachstumszunahme. Unter Zusatz von FCS wird die Proliferation auf 122,1% bei den Zellen der Linie U87MG und auf 116,0% bei den U373MG-Zellen erhöht. Ohne FCS wachsen 118,2% der U87MG-Zellen und 105,0% der U373MG-Zellen. Die zusätzliche Gabe von Nadroparin zu den Versuchen mit Thrombin aus Tissucol® führt bei beiden Zelllinien zu einer hoch signifikanten Abnahme des Wachstums verglichen sowohl mit Thrombin aus Tissucol® allein als auch mit den jeweiligen Kontrollreihen ohne Thrombin ( $p=0,000$ ). Bezogen auf diese Kontrollreihen wachsen unter Zugabe von FCS bei beiden Zelllinien 77,1%. Ohne FCS sind es 74,9% der U87MG-Zellen bzw. 71,6% der U373MG-Zellen (Abb. 64).

### 5.4.36 Kombinierte Gabe von Thrombin aus Tissucol® und Heparin

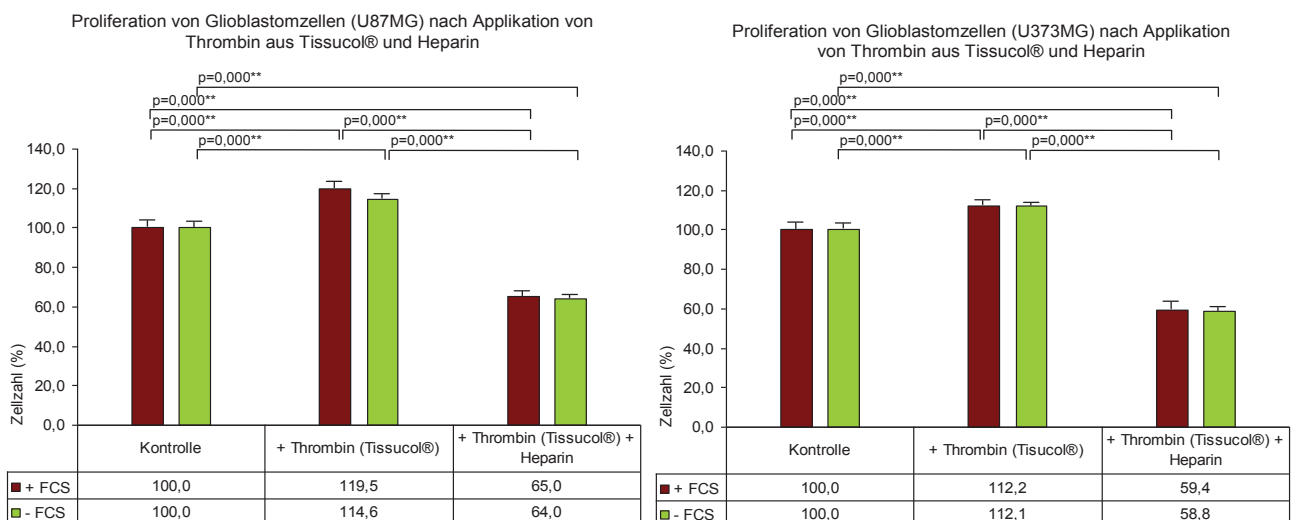


Abb. 65: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Thrombin aus Tissucol® und Heparin

Die singuläre Applikation von Thrombin aus Tissucol® zu den Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Wachstumszunahme. Unter Zusatz von FCS wird die Proliferation auf 119,5% bei den Zellen der Linie U87MG und auf 112,2% bei den U373MG-Zellen erhöht. Ohne FCS wachsen 114,6% der U87MG-Zellen und 112,1% der U373MG-Zellen. Die zusätzliche Gabe von Heparin zu den Versuchen mit Thrombin aus Tissucol® führt bei beiden Zelllinien zu einer hoch signifikanten Abnahme des Wachstums verglichen sowohl mit Thrombin aus Tissucol® allein als auch mit den jeweiligen Kontrollreihen ohne Thrombin ( $p=0,000$ ). Bezogen auf diese Kontrollreihen wachsen unter Zugabe von FCS 65,0% der U87MG-Zellen und 59,4% der U373MG-Zellen. Ohne FCS sind es 64,0% der U87MG-Zellen bzw. 58,8% der U373MG-Zellen (Abb. 65).

### 5.4.37 Kombinierte Gabe von Thrombin aus Tissucol® und Hirudin

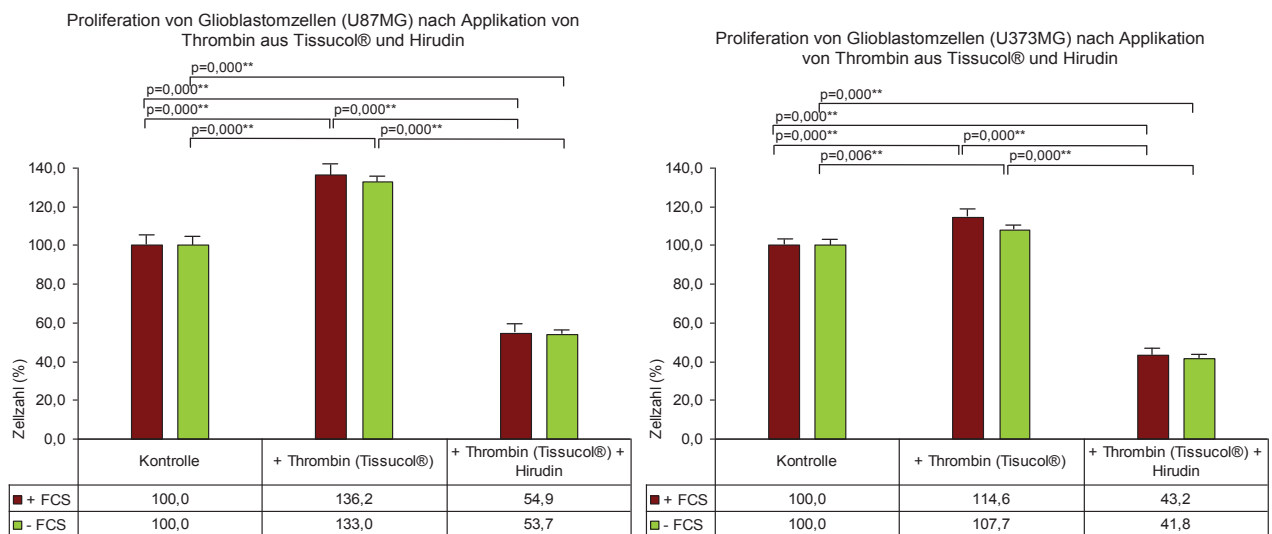


Abb. 66: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Thrombin aus Tissucol® und Hirudin

Die einzelne Applikation von Thrombin aus Tissucol® zu den Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Wachstumszunahme. Unter Zusatz von FCS wird die Proliferation auf 136,2% bei den Zellen der Linie U87MG und auf 114,6% bei den U373MG-Zellen erhöht. Ohne FCS wachsen 133,0% der U87MG-Zellen und 107,7% der U373MG-Zellen. Die zusätzliche Gabe von Hirudin zu den Versuchen mit Thrombin aus Tissucol® führt bei beiden Zelllinien zu einer hoch signifikanten Abnahme des Wachstums verglichen sowohl mit Thrombin aus Tissucol® allein als auch mit den jeweiligen Kontrollreihen ohne Thrombin ( $p=0,000$ ). Bezogen auf diese Kontrollreihen wachsen unter Zugabe von FCS 54,9% der U87MG-Zellen und 53,7% der U373MG-Zellen. Ohne FCS sind es 43,2% der U87MG-Zellen bzw. 41,8% der U373MG-Zellen (Abb. 66).

### 5.4.38 Kombinierte Gabe von Thrombin aus Tissucol® und PPACK

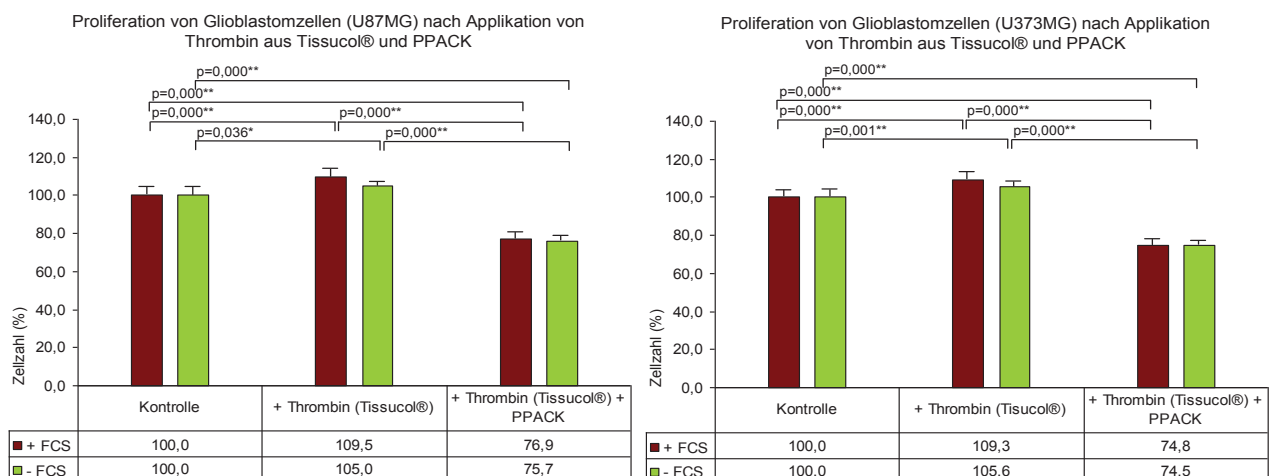


Abb. 67: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von Thrombin aus Tissucol® und PPACK



Die singuläre Applikation von Thrombin aus Tissucol® zu den Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Wachstumszunahme. Unter Zusatz von FCS wird die Proliferation auf 109,5% bei den Zellen der Linie U87MG und auf 109,3% bei den U373MG-Zellen erhöht. Ohne FCS wachsen 105,0% der U87MG-Zellen und 105,6% der U373MG-Zellen. Die zusätzliche Gabe von PACK zu den Versuchen mit Thrombin aus Tissucol® führt bei beiden Zelllinien zu einer hoch signifikanten Abnahme des Wachstums verglichen sowohl mit Thrombin aus Tissucol® allein als auch mit den jeweiligen Kontrollreihen ohne Thrombin ( $p=0,000$ ). Bezogen auf diese Kontrollreihen wachsen unter Zugabe von FCS 76,9% der U87MG-Zellen und 74,8% der U373MG-Zellen. Ohne FCS sind es 75,7% der U87MG-Zellen bzw. 74,5% der U373MG-Zellen (Abb. 67).

### 5.4.39 Kombinierte Gabe von TRAP-6 und PPACK

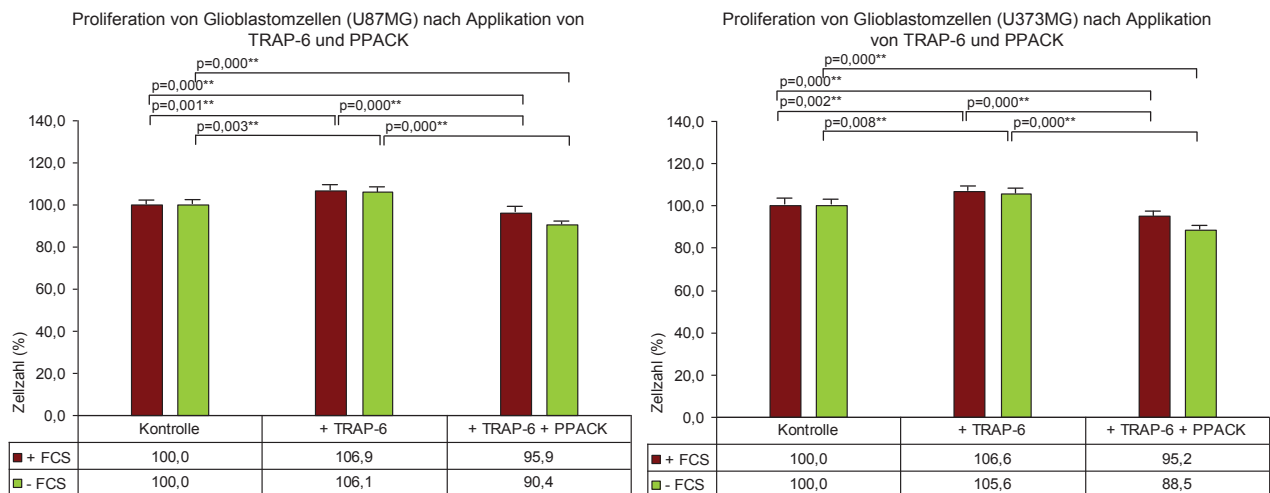


Abb. 68: Darstellung der Proliferation der Glioblastomzellen nach Applikation von TRAP-6 und PPACK

Die singuläre Applikation von TRAP-6 zu den Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führt jeweils zu einer hoch signifikanten Wachstumszunahme. Unter Zusatz von FCS wird die Proliferation auf 106,9% bei den Zellen der Linie U87MG und auf 106,6% bei den U373MG-Zellen erhöht. Ohne FCS wachsen 106,1% der U87MG-Zellen und 105,6% der U373MG-Zellen. Die zusätzliche Gabe von PPACK zu den Versuchen mit TRAP-6 führt bei beiden Zelllinien zu einer hoch signifikanten Abnahme des Wachstums verglichen sowohl mit TRAP-6 allein als auch mit den jeweiligen Kontrollreihen ohne TRAP-6. Bezogen auf diese Kontrollreihen wachsen unter Zugabe von FCS 95,9% der U87MG-Zellen und 95,2% der U373MG-Zellen. Ohne FCS sind es 90,4% der U87MG-Zellen bzw. 88,5% der U373MG-Zellen (Abb. 68).

## **6 Diskussion**

### **6.1 Einführung**

Das Glioblastoma multiforme gehört als WHO-Grad-IV-Tumor zu den bösartigsten Tumoren des menschlichen Organismus. Die Bedeutung der operativen Radikalität für die Prognoseabschätzung wurde inzwischen in Studien bestätigt (Hess 1999, Vuorinen et al. 2003). Vuorinen konnte 2003 bei Patienten über 65 Jahren ein mittleres Überleben von 171 Tagen nach radikaler Operation im Vergleich zu 85 Tagen nach Biopsie nachweisen ( $p=0,035$ ). Eine fluoreszenzgestützte Operation mit 5-Aminolävulinsäure kann die Rate kompletter Resektionen erhöhen und zu einem längeren progressionsfreien Intervall führen (Stummer et al. 2006). 5-ALA ist ein nicht-fluoreszierendes Prodrug, das bei malignen Gliomen zur intrazellulären Akkumulation fluoreszierenden Porphyrins führt. Stummer untersuchte 322 Patienten zwischen 23-73 Jahren mit einem malignen Gliom. Bei 139 Patienten wurde der Tumor mit 5-ALA markiert. Bei 60% dieser Patienten konnte der Tumor komplett reseziert werden verglichen mit 36% der Patienten der Kontrollgruppe ohne 5-ALA. Neben der Resektion stellt die Strahlentherapie einen wichtigen Punkt in der Therapie des Glioblastoms dar. Die Gesamtdosis sollte 54-60Gy betragen, das heißt fraktioniert sollten 1,8-2Gy auf die Tumorregion und einen Randsaum von 2cm appliziert werden (Lapierre et al. 2002). So kann eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit von 6 Monaten erzielt werden (Leitlinie 2008). Stupp veröffentlichte 2005 die Ergebnisse der EORTC-Studie, bei der die alleinige Strahlentherapie und die Kombination aus Strahlentherapie und adjuvanter Chemotherapie mit Temozolomid untersucht wurden. Temozolomid verlängerte die mediane Überlebenszeit von 12,1 Monate auf 14,1 Monate und erhöhte die 2-Jahres-Überlebensrate von 10,4% auf 26,5% (Stupp et al. 2005). Somit ist eine adjuvante Chemotherapie mit 6 Zyklen Temozolomid als neuer Behandlungsstandard indiziert (Dresemann 2010). Dies hat die Chemotherapie mit Nitrosoharnstoffen wie BCNU weitgehend aus der Gliomtherapie verdrängt (Leitlinie 2008). In der Rezidivsituation sollte zunächst eine Reoperation durchgeführt werden, gefolgt von Strahlentherapie und Chemotherapie. Auch hier ist der Einsatz von Temozolomid mit einem mittleren progressionsfreien Intervall von 11 Wochen und einem progressionsfreien Überleben von 21% nach 6 Monaten sinnvoll (Yung et al. 2000). Yung untersuchte den Einsatz von Temozolomid verglichen mit Procarbazin bei 225 Patienten mit einem rezidierten Glioblastom. 60% der Patienten, die mit Temozolomid behandelt wurden lebten nach 6 Monaten noch verglichen mit 44% der Patienten, die mit Procarbazin behandelt wurden ( $p=0,019$ ).

Neue Therapiestrategien wie beispielsweise Hemmung der Migration der Tumorzellen, Hemmung der Angiogenese oder Hemmung der Invasion des Tumors sind zurzeit Gegenstand von Studien.

Bereits A. Trousseau beschrieb 1865 in der „Phlegmasia alba dolens“ eine veränderte Blutzusammensetzung bei Patienten mit Tumorleiden, die zu tiefen Venenthrombosen führte. Morozov war 1968 der Erste, der vermutete, dass die erhöhte Gerinnungsneigung bei Hirntumoren durch Faktoren ausgelöst werden könnte, die vom Tumor sezerniert werden (Morozov 1968, Walsh et al. 1996).

Ornstein erkannte bereits 2002, dass das Gerinnungssystem ein wichtiger Angriffspunkt für neue Therapiestrategien des Glioblastoms ist (Ornstein et al. 2002). Die Aktivierung der Blutgerinnung bei Patienten mit einem malignen Gliom führt sowohl zu dem gehäuften Auftreten tiefer Venenthrombosen als auch zu einem vermehrten Tumorwachstum. Somit liegt die Vermutung nahe, dass eine Hemmung der zentralen Punkte des Gerinnungssystems wie Tissue Faktor und Thrombin auch zu einer Reduktion des Wachstums der Gliomzellen führen könnte.

Der Tissue Faktor als Schlüsselenzym des extrinsischen Gerinnungsweges spielt hier eine wichtige Rolle. Hamada bestätigte 1996, dass die Expression von TF mit zunehmender Malignität eines Glioms steigt (Hamada et al. 1996). Das bedeutet, dass die höchste TF-Konzentration beim Glioblastom, insbesondere um die Tumornekrosezone herum zu finden ist (Rong 2005). Diese Region ist stark hypoxisch und scheint eine wichtige Rolle in Bezug auf die Aggressivität des Tumors zu spielen, da hier vermehrt VEGF, IL-8 und Metalloproteasen exprimiert werden (Brat 2004, Rong 2006). Die Expressionsrate des TF korreliert auch mit der Gefäßdichte im Tumor (Carneiro-Lobo et al. 2009). Dies legt die Vermutung nahe, dass eine Blockierung des TF zu einer Hemmung des Wachstums des Glioblastoms führen könnte. Carneiro-Lobo untersuchte die Wirkung von Ixolaris, einem TF-Blocker, auf die Glioblastomzellen und konnte eine Reduktion der Proliferation nachweisen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es nun zu zeigen, dass ein Aktivator der Gerinnung die Proliferation humaner Gliomzellen *in vitro* erhöhen kann und dass nicht nur eine Blockierung des TF sondern auch von Thrombin als einem Schlüsselenzym der Gerinnungskaskade zu einer Reduktion der Proliferation der Tumorzellen führen kann. Darüber hinaus wurde untersucht, wie sich wiederum eine kombinierte Gabe von Gerinnungsaktivator und –inhibitor auswirkt.

## 6.2 Diskussion der verwendeten Methoden

Zur Durchführung der Experimente wurden zwei humane Glioblastomzelllinien U87MG und U373MG verwendet. Durch Zellpassage wurden die jeweiligen Zelllinien vermehrt und kultiviert. Ziel war es, als Ausgangswert für die Kontrollreihen jeweils  $10^2$  Zellen pro Well anzusetzen. Durch eine unsaubere oder überfüllte Neubauer-Zählkammer oder durch eine zu kurze Sedimentationszeit kann es zu Ungenauigkeiten gekommen sein. Um diese Fehlerquellen möglichst zu minimieren, wurde jeder Versuch mit jeder Zelllinie dreimal durchgeführt und die Ergebnisse prozentual in Relation zur Kontrollreihe angegeben.

Kultivierte Zellen weisen unterschiedliche Wachstumseigenschaften auf. Man unterscheidet vier Wachstumsphasen einer Zelle (Lindl 2002).

- **Lag-Phase:** die Zellproliferation läuft verzögert an, da sich die Zellen auf neue Wachstumsbedingungen einstellen müssen
- **Log-Phase:** die Zellen sind teilungsaktiv, Verdopplungszeit ist konstant
- **Stationäre Phase:** Substratoberfläche ist erschöpft, keine Zunahme der Zellzahl mehr, Gleichgewicht zwischen Vermehrung und Zelltod
- **Absterbe-Phase:** abnehmende Lebendzellzahl

Den optimalen Zeitpunkt zur Zellpassage stellt die stationäre Phase dar. Ist eine Konfluenz der Zellen eingetreten, das heißt ist der Boden der Zellkulturflasche bedeckt, sollte eine Subkultivierung durchgeführt werden. Die Eigenschaften der Zellen verändern sich, es kommt zur Kontaktinhibition, was die Reproduzierbarkeit der Versuche schwierig macht. Um diese Fehlerquelle zu minimieren, wurde alle zwei Tage ein Wechsel des Zellkulturmediums sowie eine Kontrolle des Zellwachstums unter dem Mikroskop durchgeführt und sofort bei Konfluenz der Zellen diese passagiert. Alle Versuche wurden mit Zellen aus zwei Glioblastomzelllinien U87MG und U373MG durchgeführt.

## 6.3 Diskussion der Rolle des Fetalen Kälberserums

Um nahezu physiologische Verhältnisse für die untersuchten Glioblastomzellen zu schaffen, wurde den Zellen spezielles Medium zugesetzt. Als Quelle von Wachstumsfaktoren oder Proteinen ist die zusätzliche Applikation des fetalen Kälberserums unerlässlich. Es ist auch unter der Bezeichnung Fetal Bovine Serum bekannt. FCS enthält Aminosäuren, Kohlenhydrate, anorganische Salze, aber auch Hormone wie Insulin und Hydrocortison. Darüber hinaus sind Anheftungsfaktoren wie Fibronectin enthalten. Die Zusammensetzung

und der Gehalt der Inhaltsstoffe unterliegen jedoch natürlichen Schwankungen. So kann es zu unterschiedlichen Auswirkungen auf das Zellkulturwachstum kommen (Boxberger 2006).

Um den Effekt des FCS auf das Wachstum der Zellen zu überprüfen entstanden die zwei Kontrollreihen. Die Positivkontrollreihe mit Medium und FCS und die Negativkontrollreihe nur mit Medium ohne FCS. In allen Versuchsreihen konnte ein hoch signifikanter Proliferationsanstieg in den Positivkontrollreihen unter Zusatz von FCS verzeichnet werden. Ohne FCS kam es hingegen zu einem Absterben der Zellen. Auch bei den Versuchsreihen, zu denen die Substanzen zugesetzt worden sind bewirkte FCS eine Steigerung der Wirkung der jeweiligen Substanz. Ohne FCS war der Effekt, den das Präparat, egal ob Aktivator oder Inhibitor der Gerinnung, auf die Proliferation der Glioblastomzellen hat geringer ausgeprägt. Nur bei den Versuchen mit Hirudin kam es ohne FCS zu einer stärkeren Wachstumshemmung, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass Hirudin der stärkste Antagonist des Thrombin ist und seine Wirkung auch ohne die Inhaltsstoffe des FCS optimal entfalten kann.

Auch auf die Versuche mit Albumin hat die Applikation von FCS einen großen Einfluss. Da Albumin keine Auswirkung auf die Blutgerinnung hat, sondern als Transportprotein für den Transport niedermolekularer Substanzen sowie für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks verantwortlich ist (Löffler 2003) war zunächst kein signifikanter Effekt auf das Wachstum der Glioblastomzellen zu erwarten. Unter Applikation von FCS kam es jedoch zu einem hoch signifikanten Anstieg der Proliferation. Bisher gibt es keine Angaben zur Auswirkung von Albumin auf das Wachstum von Glioblastomzellen in der Literatur. Ashman et al. fanden jedoch 2005 heraus, dass Albumin das Wachstum der Endothelzellen im proximalen Tubulus der Niere über Stimulation des Arginin-Ornithin-Polyamin-Reaktionsweges anregt (Ashman et al. 2005). Somit könnte auch ein ähnlicher Effekt bei Glioblastomzellen ausgelöst werden. Dies würde erklären, warum auch ohne FCS die Zellen der Versuchsreihen mit Albumin vermehrt wachsen. Da die Proliferation der Glioblastomzellen mit Albumin ohne FCS jedoch nicht so stark gesteigert wird wie mit FCS ist die Auswirkung der zusätzlichen Applikation des Serums auf die Untersuchungsergebnisse hoch signifikant.

#### **6.4 Diskussion der Ergebnisse nach Applikation der Gerinnungsaktivatoren**

Die pathologische Hochregulation des Gerinnungssystems in malignen Tumoren ist bereits seit 1865 bekannt (Trousseau 1865). In der vorliegenden Arbeit soll nun die Auswirkung gerinnungsaktiver Präparate, die im Klinikalltag verwendet werden auf die Proliferation humaner Glioblastomzellen überprüft werden. Als Aktivatoren der Blutgerinnung wurden aufgrund des Wirkstoffes Thrombin TachoSil® und FloSeal®, die Thrombinkomponente des Tissucol®, Faktor X sowie TRAP-6 untersucht.

Die Rolle von Thrombin ist für das Wachstum von Glioblastomzellen von großer Bedeutung. Hua beschrieb 2005, dass Thrombin die Proliferation der humanen Glioblastomzellen erhöht. Er untersuchte Ratten-Glioblastomzellen und konnte eine Induktion der Zellproliferation in vitro feststellen (Hua et al. 2005). In einer zweiten Studie untersuchte er 2008 die Wirkung von Thrombin auf Glioblastomzellen in vivo. Hierzu injizierte er 344 Ratten Glioblastomzellen, die mit und ohne Thrombin behandelt wurden und untersuchte sie 12 Tage später. Er fand heraus, dass Thrombin zu einer Zunahme der Tumormasse geführt hat (Hua et al. 2008). Dieser proliferative Effekt von Thrombin kann mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. In allen Versuchsreihen konnte ein hoch signifikanter Anstieg des Wachstums der humanen Glioblastomzellen beider Zelllinien U87MG und U373MG nachgewiesen werden. Die Ursache der erhöhten Proliferation ist auf die vielfältigen zellulären Auswirkungen des Thrombin zurückzuführen. Über die Protease-aktivierten Rezeptoren werden die Signale des Thrombin an die Zelle vermittelt (Coughlin 2000). PAR-1, PAR-3 und PAR-4 können durch Thrombin aktiviert werden. So kommt es unter anderem zur Plättchenaktivierung und Bildung eines Thrombus. Kaufmann bestätigte 1998 das Vorkommen von PAR-1 auf der Oberfläche humaner Glioblastomzellen über Immunfluoreszenz mit dem Anti-PAR-1 Antikörper Mab 31-2 (Kaufmann 1998). Über PAR-1 wird eine Endothelzellaktivierung ermöglicht, die zur Thrombozytenaggregation führt. Thrombin triggert vor allem die Produktion von Plättchen-aktivierendem Faktor (Zimmerman 1996) durch die Endothelzellen, aber auch die Produktion von IL-6 und IL-8 (Johnson 1998). Neben diesen Funktionen induziert Thrombin die Produktion von Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF. Yamahata bestätigte 2002 die Rolle von Thrombin bei der für das Tumorstadium essenziellen Neoangiogenese an drei humanen Gliomzelllinien U87MG, U373MG und U105MG. In allen drei Zelllinien erhöhte Thrombin die VEGF-Expression (Yamahata 2002). Auch auf Nervenzellen übt Thrombin einen proliferativen Effekt aus, wie Neveu 1993 veröffentlichte. Es stimuliert die Synthese und Sekretion des NGF, wodurch die Zellproliferation erhöht wird (Neveu 1993). Analog zu den Ergebnissen der vorliegenden

Arbeit konnte Hayakawa 2007 die Aktivierung der Proliferation humaner Glioblastomzellen durch Thrombin nachweisen. Seine Studie zeigt, dass das erhöhte Zellwachstum unter anderem auf eine Erhöhung des PDGF zurückzuführen ist. PDGF ist verantwortlich für die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (Ross 1974, Hayakawa 2007). Auch Shih beschrieb 2006 eine Überexpression von PDGF in malignen Gliomen (Shih 2006). Dies scheint mit der für sekundäre Glioblastome typischen Mutation des Tumorsuppressorgens p53 einherzugehen (Shapiro 2001).

Die genannten Effekte von Thrombin erklären die hoch signifikante Steigerung der Proliferation in den Versuchsreihen mit TachoSil®, FloSeal® und der Thrombinkomponente aus Tissucol®.

Neben Thrombin führte auch die Applikation des Gerinnungsfaktors X zu einer hoch signifikanten Wachstumssteigerung beider Zellkulturlinien. Zacharski konnte 1991 nachweisen, dass der Gerinnungsfaktor X von Tumorzellen exprimiert wird. Er fand den Faktor Xa bei Tumoren der Lunge, der Niere und beim malignen Melanom (Zacharski et al. 1991). Shikamoto bestätigte 1999 das Vorkommen des Faktor X auf humanen Glioblastomzellen mittels PCR (Shikamoto et al. 1999). Die zentrale Funktion des Faktor Xa ist die Aktivierung der Endstrecke der Blutgerinnung. Über die Ausbildung des Prothrombinaktivator-Komplexes wird Thrombin gebildet. So übt der aktivierte Faktor Xa indirekt einen proliferativen Effekt auf die humanen Glioblastomzellen aus, was mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Auch über die Aktivierung des PAR-2, der von Glioblastomzellen exprimiert wird (Kaufmann 1998) kann Faktor Xa die Proliferation der Zellen der Linien U87MG und U373MG erhöhen.

Eine Aktivierung des Thrombinrezeptors kann auch mit synthetisch hergestellten Peptiden, den TRAPs (Thrombin-Rezeptor aktivierende Peptide) erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung der Applikation von TRAP-6 auf humane Glioblastomzellen untersucht. Vouret-Craviari zeigte 1992, dass eine Aminosäuresequenz aus fünf Aminosäuren ausreicht um den Thrombinrezeptor zu aktivieren (Vouret-Craviari et al. 1992). Die Versuchsreihen mit TRAP-6, bestehend aus den Aminosäuren Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn (SFLLRN) zeigten jeweils eine hoch signifikante Steigerung der Proliferation der Glioblastomzellen beider Zelllinien, was durch die Aktivierung des PAR-1 über TRAP-6 zu erklären ist.

## **6.5 Diskussion der Ergebnisse nach Applikation der Gerinnungsinhibitoren**

Das Gerinnungssystem ist bei Patienten mit einem malignen Tumor wie dem Glioblastom aktiviert, was sowohl zu einer gesteigerten intravasalen Gerinnung als auch zu einer Progression des Wachstums der Tumorzellen führt. Neben den Auswirkungen der Gerinnungsaktivatoren auf die Proliferation humaner Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG soll mit der vorliegenden Arbeit auch der Effekt von Gerinnungshemmern auf das Wachstum der Zellen untersucht werden. Hierzu wurden die Substanzen Heparin, Antithrombin III, Hirudin, Enoxaparin, Nadroparin, PPACK und die Kleberkomponente des Tissucol® getestet.

Heparin ist ein indirekter Thrombininhibitor, das heißt es wirkt über den zusätzlichen Kofaktor Antithrombin III auf das Thrombinmolekül. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl die Wirkung von Heparin allein als auch im Komplex mit Antithrombin III getestet. Bereits der Zusatz von Heparin allein bewirkt eine hoch signifikante Reduktion der Proliferation beider Glioblastomzelllinien. Heparin bindet an die ABE 2 des Thrombinmoleküls, wodurch eine Hemmung dessen bewirkt wird (Pötzsch 2010). Dadurch kann Thrombin seine bereits beschriebenen proliferativen Effekte auf die Tumorzellen nicht mehr ausüben. Studien zeigten bereits, dass Heparin durch eine Hemmung der Zellmigration zu einer Reduktion von Metastasen führen kann (Vlodavsky et al. 1995). Dos Santos bestätigte mit seinen Untersuchungen, dass Heparin-ähnliche Peptide einen antiproliferativen Effekt auf Glioblastomzellen der Linie U87MG haben (Dos Santos et al. 2010). Die vorliegende Arbeit bestätigt den antineoplastischen Effekt von Heparin. Bei den Versuchsreihen mit Antithrombin III kam es ebenfalls zu einer Hemmung der Proliferation der Glioblastomzellen. Dieser Effekt ist auf die Hemmung des Thrombinmoleküls zurückzuführen. Heparin als Zusatz katalysiert die von ATIII bewirkte Hemmung von Thrombin um den Faktor 1000. Durch Bildung eines stabilen Enzym-Inhibitor-Komplexes aus Heparin, ATIII und Thrombin wird letzteres inaktiviert (Löffler 2003). Dieser Wirkmechanismus ist vermutlich die Ursache für das in den Versuchen nachgewiesene reduzierte Wachstum der humanen Glioblastomzellen.

Bereits Mitte der 70er Jahre wurde entdeckt, dass kleine Heparinfragmente eine hohe Anti-Faktor-Xa-Aktivität besitzen und dabei weniger Nebenwirkungen als unfraktionierte Heparine aufweisen (Pötzsch 2010). Im Gegensatz zu unfraktioniertem Heparin bestehen die niedermolekularen Heparine aus 5-17 Monosacchariden. In der vorliegenden Arbeit wurden Enoxaparin als Wirkstoff von Clexane® und Nadroparin als Wirkstoff von Fraxiparin® untersucht. Zur Prophylaxe tiefer Venenthrombosen bei Patienten, die an einem malignen



Gliom leiden werden LMWH bereits im Klinikalltag eingesetzt (Schmidt et al. 2002). Sun et al. untersuchten 2009 ob LMWH einen Effekt auf die Sekretion von VEGF durch Karzinomzellen haben. Sie wiesen mittels PCR eine supprimierte VEGF-Expression und Sekretion nach Applikation eines LMWH und somit einen hemmenden Effekt der niedermolekularen Heparine auf die Angiogenese und damit das Tumorwachstum nach (Sun et al. 2009). Balzarotti bestätigte 2006 bereits nicht nur den Vorteil einer Therapie mit LMWH in Bezug auf das Auftreten einer TVT oder Lungenembolie sondern auch in Bezug auf das Wachstum der Glioblastomzellen. Er untersuchte die Auswirkung von Enoxaparin auf die Migration und das Wachstum von Glioblastomzellen in vitro und konnte eine signifikante Wachstumshemmung nachweisen (Balzarotti et al. 2006). Die Ergebnisse von Balzarotti können mit den Ergebnissen der Versuche der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Enoxaparin führte in beiden Zellkulturlinien zu einer hoch signifikanten Reduktion der Proliferation. Auch Nadroparin bewirkte in allen Versuchsreihen eine hoch signifikante Wachstumshemmung.

Im Gegensatz zu den Heparinen stellt Hirudin einen direkten Thrombinantagonisten dar. Pötzsch beschrieb 2010 Hirudin als einen bifunktionellen direkten Thrombininhibitor, der über die ABE 1 und die Umgebung des aktiven Zentrums des Thrombinmoleküls wirkt. Yamahata untersuchte 2002 die Rolle von Thrombin in Bezug auf die Hochregulation des VEGF in malignen Gliomen und erkannte, dass Hirudin die Ausbildung von VEGF hoch signifikant hemmen konnte (Yamahata et al. 2002). Dies resultiert in einer Hemmung der Angiogenese und damit des Tumorwachstums. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen dies durch eine hoch signifikante Reduktion der Proliferation humaner Glioblastomzellen nach Applikation von Hirudin.

PPACK (H-D-Phe-Pro-Arg-Chloromethylketon) wurde als selektiver Thrombininhibitor als Alternative zum Heparin entwickelt (Lyon 1995). Die Tripeptidsequenz Phe-Pro-Arg hemmt das aktive Zentrum des Thrombinmoleküls irreversibel, wodurch die Funktionen von Thrombin verloren gehen (Steinmetzer 2004). Die Annahme, dass dann auch der proliferative Effekt von Thrombin gehemmt wird, konnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Eine Applikation von PPACK auf humane Glioblastomzellen bewirkte in allen Versuchsreihen eine hoch signifikante Reduktion der Proliferation.

Der für die vorliegende Arbeit wichtigster Bestandteil der Kleberproteinlösung des Tissucol® ist das Aprotinin. Es ist ein Fibrinolysehemmer (Aktories 2009). Day et al. wiesen 2006 nach, dass Aprotinin über eine Blockierung des Thrombinrezeptors PAR-1 eine thrombininduzierte Aktivierung von Endothelzellen verhindern kann (Day et al. 2006). Dies resultiert in einer

Hemmung der Neoangiogenese. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diesen Effekt des Aprotinin, denn in allen Versuchsreihen kam es zu einer hoch signifikanten Wachstumshemmung der humanen Glioblastomzellen.

## **6.6 Diskussion der Ergebnisse der kombinierten Gabe der gerinnungsaktiven Substanzen**

Die Ergebnisse der Versuchsreihen mit den gerinnungsaktiven Substanzen allein führten zu der Frage, wie sich eine Kombination der bereits getesteten Stoffe auf die Proliferation der humanen Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG auswirkt.

### **6.6.1 Kombinationen mit Faktor Xa**

In der vorliegenden Arbeit wurde eine kombinierte Gabe des Faktor Xa mit den Gerinnungshemmern Heparin, ATIII, Enoxaparin, Nadroparin und Hirudin untersucht.

Die Zugabe von Heparin zu Faktor Xa bewirkt eine hoch signifikante Hemmung der Proliferation beider Zelllinien verglichen mit den Versuchsreihen mit Faktor Xa allein und sogar verglichen mit den jeweiligen Kontrollreihen. Dieser Effekt ist durch die Anti-Xa-Aktivität von Heparin zu erklären (Löffler 2003). Bei den Versuchsreihen mit ATIII und Faktor Xa kommt es ebenfalls zu einer hoch signifikanten Reduktion des Wachstums der Glioblastomzellen, verglichen mit den Versuchsreihen mit Faktor Xa, was auf die hohe antagonistische Affinität von ATIII zu Faktor Xa zurückzuführen ist (Löffler 2003, Lüllmann 2006). Eine kombinierte Gabe von Heparin und ATIII führt zu einer stärkeren Proliferationshemmung. Dieser Effekt ist durch die von Heparin um den Faktor 1000 katalysierte Reaktion zu erklären (Löffler 2003). Auch die niedermolekularen Heparine Enoxaparin und Nadroparin konnten in Kombination mit Faktor Xa eine hoch signifikante Reduktion der Proliferation der Glioblastomzellen bewirken. Diese kleineren Heparinfragmente besitzen eine hohe Anti-Faktor-Xa-Affinität und können dadurch den proliferationsfördernden Effekt von Faktor Xa aufheben (Pöttsch 2010). Der Zusatz der NMH zu Faktor Xa führte sogar zu einer Hemmung des Wachstums verglichen mit den Kontrollreihen ohne Faktor Xa, was die Ergebnisse der Studie von Balzarotti 2006 bestätigt, der einen wachstumshemmenden Effekt von Enoxaparin auf Glioblastomzellen nachweisen konnte (Balzarotti 2006). Der Zusatz von Hirudin zu den Versuchsreihen mit Faktor Xa bewirkte ebenfalls eine hoch signifikante Reduktion der Proliferation. Hirudin hat zwar vermutlich keine Auswirkung auf den Faktor Xa, wirkt aber in den durchgeführten Experimenten wahrscheinlich durch seine antagonistische Wirkung in Bezug auf Thrombin.

Durch direkte Hemmung von Thrombin wird weniger VEGF exprimiert (Yamahata 2002), was über eine Hemmung der Neoangiogenese in einer Wachstumshemmung der Glioblastomzellen resultiert.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass sich in allen Versuchsreihen der proliferationsfördernde Effekt von Faktor Xa durch Zusatz eines Hemmstoffes der Blutgerinnung antagonisieren lässt, was eine hoch signifikante Hemmung des Wachstums der humanen Glioblastomzellen bewirkt.

### **6.6.2 Kombinationen mit der Kleberkomponente aus Tissucol®**

In weiteren Versuchsreihen wurde eine kombinierte Gabe der Kleberkomponente des Tissucol® mit TachoSil®, FloSeal®, der Thrombinkomponente aus Tissucol® und Albumin untersucht.

Obwohl die alleinige Applikation der Kleberkomponente des Tissucol® auf die humanen Glioblastomzellen eine hoch signifikante Reduktion des Wachstums bewirkt führt die kombinierte Gabe von thrombinhaltigen Substanzen wie TachoSil®, FloSeal® und der Thrombinkomponente des Tissucol® in allen Versuchsreihen zu einer hoch signifikanten Steigerung der Proliferation. Der wichtigste Bestandteil der Kleberkomponente, das Aprotinin, wirkt als Fibrinolysehemmer (Aktories 2009) und hat eine Affinität zum Thrombinrezeptor PAR-1, den es blockiert. Durch die in den Versuchsreihen zusätzlich applizierte Thrombinmenge, die in den getesteten Substanzen enthalten ist, wurde das Aprotinin vermutlich von der Bindungsstelle am PAR-1 wieder verdrängt und seine hierüber vermittelte antiproliferative Wirkung (Day et al. 2006) wieder aufgehoben. So lässt sich die Wachstumssteigerung der Glioblastomzellen erklären. Besonders hervorzuheben ist hier die Aktivierung der Proliferation nach zusätzlicher Applikation der Thrombinkomponente des Tissucol®, da im Klinikalltag beide Substanzen gleichzeitig eingesetzt werden. Die zusätzliche Gabe von Albumin führt auch zu einer hoch signifikanten Erhöhung der Proliferation der Glioblastomzellen. Albumin wirkt nicht über das Gerinnungssystem, sondern vermutlich direkt an den Endothelzellen. Ashman konnte 2005 einen proliferativen Effekt von Albumin an den Endothelzellen der Niere nachweisen (Ashman et al. 2005). Ob ein ähnlicher Mechanismus bei Glioblastomzellen zu finden ist müsste noch untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich in allen Versuchsreihen mit der Kleberkomponente des Tissucol® nachweisen, dass der proliferationshemmende Effekt aus den Experimenten mit der Kleberkomponente allein durch den Zusatz eines Gerinnungsaktivators und durch Albumin aufgehoben wird und sogar zu einer zusätzlichen Steigerung des Wachstums führt.

### 6.6.3 Kombinationen mit TachoSil®

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer gleichzeitigen Gabe von TachoSil® mit Heparin, Enoxaparin, Nadroparin, Hirudin und PPACK auf die Proliferation der humanen Glioblastomzellen untersucht.

Heparin als indirekter Thrombininhibitor führt bei zusätzlicher Applikation mit TachoSil® auch ohne den Kofaktor ATIII zu einer hoch signifikanten Reduktion der Proliferation der Glioblastomzellen. Es bewirkt sogar eine Abnahme des Wachstums im Vergleich zu den Kontrollreihen ohne TachoSil®. Dieser Effekt ist durch die Bindung von Heparin an die ABE 2 des Thrombinmoleküls zu erklären (Steinmetzer 2004). Es wäre in weiterführenden Experimenten zu untersuchen, ob diese Reaktion dosisabhängig ist. Auch die NMH Enoxaparin und Nadroparin führen über den genannten Wirkmechanismus zu einer Proliferationshemmung verglichen mit den Versuchsreihen mit TachoSil® allein. Die Zellen der Linie U373MG zeigten bei den Versuchen mit TachoSil® + Enoxaparin zunächst zwar auch eine Reduktion des Wachstums, verglichen mit den Kontrollreihen ohne TachoSil® kam es jedoch zu einer Zunahme der Proliferation. Vermutlich ist dieser Effekt auf bestimmte Eigenschaften der Zellen dieser Linie zurückzuführen, da dieses Reaktionsmuster nicht bei den U87MG-Zellen aufgetreten ist. Die zusätzliche Applikation von Hirudin bewirkte wie vermutet eine hoch signifikante Reduktion des Wachstums der humanen Glioblastomzellen. Auch hier ist der direkte Antagonismus zum Thrombin als Ursache anzusehen. PPACK als Inhibitor des aktiven Zentrums des Thrombinmoleküls bewirkt ebenfalls eine Proliferationsreduktion und muss in der getesteten Dosierung sogar stärker wirken als die Thrombindosis im TachoSil®, denn es bewirkt sogar eine Abnahme des Wachstums verglichen mit den Kontrollreihen ohne TachoSil®.

Zusammenfassend lässt sich bei diesen Versuchsreihen feststellen, dass die kombinierte Gabe von TachoSil® mit einem Hemmstoff der Gerinnung bzw. einem Thrombinantagonist zu einer hoch signifikanten Reduktion der Proliferation der Glioblastomzellen führt. Hierbei sind aber die Eigenschaften der Zelllinien sowie die Dosierungen der Substanzen in Bezug auf das Ergebnis der Experimente weiter zu untersuchen.

#### **6.6.4 Kombinationen mit FloSeal®**

In weiteren Versuchsreihen wurden die Auswirkungen einer kombinierten Gabe von FloSeal® mit Heparin, Enoxaparin, Nadroparin, Hirudin und PPACK auf die Proliferation humaner Glioblastomzellen untersucht.

Auch bei diesen Experimenten bewirkte die zusätzliche Gabe von Heparin zu FloSeal® eine hoch signifikante Reduktion der Proliferation der Glioblastomzellen. Dieser Effekt lässt sich erneut durch den Antagonismus von Heparin zu Thrombin erklären. Analog dazu führt die Applikation der niedermolekularen Heparine Enoxaparin und Nadroparin bei beiden Zelllinien zu einer hoch signifikanten Wachstumshemmung. Hirudin als physiologisch stärkster Thrombininhibitor bewirkte auch die stärkste Proliferationshemmung. Auch PPACK führte als Thrombinantagonist in Kombination mit FloSeal® zu einer Reduktion des Wachstums.

Es ist auch bei diesen Experimenten eine proliferationshemmende Wirkung der Kombination von Hemmstoffen der Blutgerinnung, insbesondere von Thrombinantagonisten und der thrombinhaltigen Substanz FloSeal® erkennbar.

#### **6.6.5 Kombinationen mit der Thrombinkomponente des Tissucol®**

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer kombinierten Applikation der Thrombinkomponente des Tissucol® mit Heparin, Enoxaparin, Nadroparin, Hirudin und PPACK auf die Proliferation der humanen Glioblastomzellen untersucht.

Analog zu den Versuchsreihen mit den thrombinhaltigen Substanzen FloSeal® und TachoSil® führt eine kombinierte Gabe der Thrombinkomponente des Tissucol® mit Heparin, Enoxaparin, Nadroparin, Hirudin und PPACK in allen Versuchsreihen zu einer hoch signifikanten Reduktion des Wachstums der humanen Glioblastomzellen beider Zelllinien U87MG und U373MG. Dieser Effekt lässt sich durch die bereits erwähnte Antagonisierung des Thrombinmoleküls durch die zusätzlich applizierten Substanzen erklären. Die niedermolekularen Heparine Enoxaparin und Nadroparin sowie PPACK führen hierbei zu einer prozentual geringeren Proliferationshemmung verglichen mit Heparin und Hirudin. Es wäre durch weiterführende Experimente zu untersuchen ob durch eine Anpassung der Dosierung dieser Substanzen eine zusätzliche Reduktion des Wachstums der Glioblastomzellen zu erzielen ist.

### **6.6.6 Kombinationen mit Antithrombin III**

In weiteren Experimenten wurde die kombinierte Gabe von ATIII und TachoSil®, FloSeal®, der Thrombinkomponente aus Tissucol® sowie Albumin auf die Proliferation der humanen Glioblastomzellen untersucht.

ATIII kann die Gerinnungsfaktoren XIIa, XIa, IXa und mit hoher Affinität die Faktoren Xa und Thrombin durch Bildung eines stabilen Enzym-Inhibitor-Komplexes hemmen (Löffler 2003). Eine zusätzliche Applikation von TachoSil® zu den Versuchsreihen mit ATIII führte zu einer Steigerung der Proliferation verglichen mit den Experimenten mit ATIII allein. Im Vergleich zu den Kontrollreihen ohne ATIII führte die Kombination ATIII + TachoSil® jedoch zu einer Reduktion des Wachstums der Glioblastomzellen. Die Versuche mit der thrombinhaltigen Substanz FloSeal®, in der 10 U/ml Thrombin enthalten sind, führte in Kombination mit ATIII zu einer hoch signifikanten Steigerung der Proliferation, auch verglichen mit den Kontrollreihen ohne ATIII. Somit kann man vermuten, dass die Thrombindosis des TachoSil® mit 2 U/cm<sup>2</sup> zu gering ist um die beschriebene Wirkung des ATIII vollständig aufzuheben. Auch die gleichzeitige Gabe der Thrombinkomponente des Tissucol® zu den Versuchsreihen mit ATIII führte zu einer Erhöhung der Proliferation verglichen mit den Versuchsreihen mit ATIII allein. In Bezug auf die Kontrollreihen ohne ATIII kam es jedoch zu einer Hemmung des Wachstums. Albumin führte in Kombination mit ATIII ebenfalls zu einer Steigerung der Proliferation verglichen mit den Versuchsreihen mit ATIII allein. Im Vergleich zu den Kontrollreihen kam es jedoch auch zu einer hoch signifikanten Wachstumshemmung. Da Albumin vermutlich über eine direkte Aktivierung der Endothelzellen wirkt (Ashman 2005) hat seine zusätzliche Applikation wahrscheinlich keinen direkten Effekt auf ATIII, sondern setzt andere Mechanismen in Gang, die zu den genannten Ergebnissen führen.

Zusammenfassend kann die proliferationshemmende Wirkung von Antithrombin III durch FloSeal® antagonisiert werden. Die anderen getesteten Substanzen bewirkten zwar eine Zunahme der Proliferation verglichen mit den Versuchsreihen mit ATIII allein, konnten den wachstumshemmenden Effekt des ATIII in Bezug auf die Kontrollreihen aber nicht aufheben.

### **6.6.7 Kombinationen von Antithrombin III + Heparin**

In der vorliegenden Arbeit wurde die kombinierte Gabe von ATIII + Heparin und TachoSil®, FloSeal®, der Thrombinkomponente aus Tissucol® sowie Albumin auf die Proliferation der humanen Glioblastomzellen untersucht.

Da Heparin als Kofaktor zu ATIII dessen Reaktionen um den Faktor 1000 katalysieren kann ist zu vermuten, dass es bei diesen Versuchsreihen zu einer stärkeren Wirkung von ATIII auf die zu untersuchenden Substanzen kommt. TachoSil® als Zusatz zu ATIII + Heparin bewirkt zwar eine Zunahme der Proliferation der Glioblastomzellen verglichen mit den Versuchsreihen mit ATIII + Heparin allein. In Bezug auf die Kontrollreihen wird jedoch das Wachstum der Zellen hoch signifikant gehemmt. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Experimenten mit ATIII ohne Heparin lässt sich feststellen, dass das Wachstum bei den Versuchsreihen mit ATIII + Heparin stärker gehemmt wird. Diese Ergebnisse bestätigen den beschriebenen Effekt des Heparin. Analog zu den beschriebenen Ergebnissen mit TachoSil® sind die Ergebnisse der kombinierten Gabe mit FloSeal®, der Thrombinkomponente aus Tissucol® und Albumin zu werten. Im Gegensatz zu den Experimenten mit ATIII ohne Heparin führte der Zusatz von FloSeal® unter Applikation von Heparin zu einer Hemmung der Proliferation, auch verglichen mit den Kontrollreihen.

Zusammenfassend lässt sich mit den Experimenten dieser Versuchsreihen erneut der katalysierende Effekt von Heparin auf ATIII nachweisen und bestätigen.

#### **6.6.8 Kombination von TRAP-6 und PPACK**

Eine kombinierte Gabe von TRAP-6 und PPACK auf die humanen Glioblastomzellen bewirkt bei beiden Zelllinien U87MG und U373MG eine hoch signifikante Reduktion der Proliferation. TRAP-6 wirkt als Thrombinrezeptor-aktivierendes Peptid mit der Aminosäuresequenz SFLLRN (Scarborough et al. 1992). Es lagert sich an die Aminosäuren 42-44 des Thrombinrezeptors an und aktiviert diesen damit, wodurch unter anderem die Neoangiogenese aktiviert und damit das Tumorwachstum gesteigert wird (Maragoudakis 2002). PPACK, ein Tripeptid aus den Aminosäuren Phe-Pro-Arg hingegen wirkt als Hemmstoff des aktiven Zentrums des Thrombinmoleküls (Steinmetzer 2004). Es lagert sich an die Aminosäure His 57, wodurch Thrombin irreversibel geblockt wird. Durch TRAP-6 wird folglich der Thrombinrezeptor aktiviert, das Thrombinmolekül ist jedoch durch PPACK irreversibel gehemmt. Somit kann Thrombin nicht wirken und das Wachstum der Glioblastomzellen wird reduziert. Dieser Vorgang erklärt vermutlich das Ergebnis dieser Versuchsreihe.

### **6.6.9 Kombinationen mit Albumin**

In der vorliegenden Arbeit wurde die kombinierte Gabe von Albumin mit Heparin, Enoxaparin, Fraxiparin, Hirudin und PPACK auf die Proliferation humaner Glioblastomzellen untersucht.

Albumin hat als einzige getestete Substanz dieser Arbeit keinen direkten Bezug zur Gerinnungskaskade. In der vorliegenden Arbeit bewirkt eine alleinige Gabe von Albumin jedoch ein erhöhtes Wachstum der Glioblastomzellen, wobei der Mechanismus nicht ausreichend geklärt ist. Wie bereits erwähnt führt eine Applikation von Albumin auf Zellen des proximalen Tubulus der Niere zu einer erhöhten Endothelzellproliferation (Ashman 2005). Ein ähnlicher Effekt ließe sich auch bei Glioblastomzellen vermuten. Eine zusätzliche Gabe von Heparin zu den Versuchsreihen mit Albumin führt zu einer hoch signifikanten Proliferationshemmung. Analog reagieren die Zellen auf die niedermolekularen Heparine Enoxaparin und Nadroparin. Dieser Effekt ist wahrscheinlich durch die Heparin-induzierte Hemmung des von den Glioblastomzellen selbst exprimierten Gerinnungsfaktors X und Thrombin zu erklären. Auch eine zusätzliche Gabe von Hirudin und PPACK bewirken eine hoch signifikante Wachstumshemmung. Vermutlich sind die Ergebnisse der Versuchsreihen mit Albumin auf eine Antagonisierung von Thrombin zurückzuführen und nicht auf eine direkte Interaktion der Substanzen mit Albumin, da bisher keine Wechselwirkungen von Albumin mit den untersuchten Inhibitoren der Gerinnung bekannt sind.



## 7 Schlussfolgerung

Bisher wurde in vielen experimentellen und klinischen Studien die pathologische Gerinnung bei Tumorpatienten nachgewiesen und insbesondere die Schlüsselrolle des Enzyms Thrombin in Bezug auf das Wachstum von Glioblastomen betont. In der vorliegenden Arbeit soll nun die Auswirkung medizinisch genutzter gerinnungsaktiver Präparate auf die Proliferation humaner Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG untersucht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Applikation im Klinikalltag verwendeter thrombinhaltiger Substanzen wie TachoSil®, FloSeal® und der Thrombinkomponente von Tissucol® zu einer hoch signifikanten Wachstumssteigerung der Glioblastomzellen in vitro führt. Daher ist der kritiklose Einsatz der genannten Stoffe bei der Therapie von Patienten, die an einem Glioblastom leiden zu überdenken. Weiterhin konnte der proliferative Effekt des Gerinnungsfaktors Xa bestätigt werden. Da bekannt ist, dass Gliomzellen den Faktor X auf ihrer Oberfläche exprimieren wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass dies zu einem verstärkten Wachstum der Glioblastome führen kann. Obwohl Albumin keinen Effekt auf das Gerinnungssystem und damit auf Thrombin hat, konnte nachgewiesen werden, dass Glioblastomzellen unter der Applikation von Albumin verstärkt wachsen. Dass der Thrombinrezeptor für die erhöhte Proliferation der Glioblastomzellen verantwortlich ist konnte durch die Versuchsreihen mit TRAP-6 bestätigt werden.

Im Gegensatz dazu konnten die Experimente zeigen, dass gerinnungshemmende Substanzen hingegen zu einer hoch signifikanten Reduktion der Proliferation der Glioblastomzellen der Linien U87MG und U373MG führen. Insbesondere durch den Thrombinantagonismus der untersuchten Substanzen Heparin, Enoxaparin, Nadroparin, Hirudin, der Kleberkomponente des Tissucol® und PPACK sind diese Ergebnisse zu erklären. Somit ist eine Behandlung eines Glioblastompatienten mit einem Gerinnungshemmer nicht nur protektiv, was das Auftreten tiefer Venenthrombosen angeht, sondern kann sich auch in Bezug auf das Tumorwachstum und damit die Langzeitprognose positiv auswirken.

Interessant für den klinischen Alltag sind die Ergebnisse der Untersuchungen einer kombinierten Gabe einer gerinnungsfördernden mit einer gerinnungshemmenden Substanz. Es konnte gezeigt werden, dass der proliferative Effekt der Gerinnungsaktivatoren dadurch minimiert werden kann.

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen das in-vitro-Verhalten der Glioblastomzellen. Durch weiterführende Studien wäre zu klären ob Glioblastome in vivo das gleiche Reaktionsmuster aufweisen. Dann ließen sich neue Therapieoptionen für das Glioblastoma multiforme aufzeigen, die einen Benefit für jeden Patienten darstellen können.

## 8 Literaturverzeichnis

Aktories K. 2009. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10te Aufl. Urban & Fischer.

Anraku M, Yamasaki K, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M. 2001. Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin. *Pharm Res*, 18 (5):632-639.

Arbit E. 2006. More on: The role of thrombin in gliomas. *J Thromb Haemost*, 4 (1):286; author reply 287.

Ashman N, Harwood SM, Kieswich J, Allen DA, Roberts NB, Mendes-Ribeiro AC, Yaqoob MM. 2005. Albumin stimulates cell growth, l-arginine transport, and metabolism to polyamines in human proximal tubular cells. *Kidney Int*, 67 (5):1878-1889.

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

Auguste KI, Quinones-Hinojosa A, Gadhary C, Zada G, Lamborn KR, Berger MS. 2003. Incidence of venous thromboembolism in patients undergoing craniotomy and motor mapping for glioma without intraoperative mechanical prophylaxis to the contralateral leg. *J Neurosurg*, 99 (4):680-684.

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

Berchtold R. 2006. Chirurgie. 5te Aufl. Urban & Fischer.

Black PC, Mize GJ, Karlin P, Greenberg DL, Hawley SJ, True LD, Vessella RL, Takayama TK. 2007. Overexpression of protease-activated receptors-1,-2, and-4 (PAR-1, -2, and -4) in prostate cancer. *Prostate*, 67 (7):743-756.

- Bock SC, Wion KL, Vehar GA, Lawn RM. 1982. Cloning and expression of the cDNA for human antithrombin III. *Nucleic Acids Res*, 10 (24):8113-8125.
- Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A. 2005. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell*, 120 (3):303-313.
- Borensztajn KS, Spek CA. 2008. Protease-activated receptors, apoptosis and tumor growth. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 36 (3-4):137-147.
- Boxberger. 2006. Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur: Einführung in Grundlagen und Techniken. Aufl. Wiley-VCH.
- Brandes AA SE, Salmistraro G, Ermani M, Carollo C, Berti F, Zampieri P, Baiocchi C, Fiorentino MV. 1997. Incidence of risk of thromboembolism during treatment high-grade gliomas: a prospective study. *Eur J Cancer*, 33 (10):1592-1596.
- Brat DJ, Van Meir EG. 2004. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab Invest*, 84 (4):397-405.
- Braun PJ. 1990. Binding properties of hirudin determined by gel filtration and gel electrophoresis. *Thromb Res*, 59 (3):657-662.
- Chang JY. 1983. The functional domain of hirudin, a thrombin-specific inhibitor. *FEBS Lett*, 164 (2):307-313.
- Coelho AM, Ossovskaya V, Bunnett NW. 2003. Proteinase-activated receptor-2: physiological and pathophysiological roles. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*, 1 (1):61-72.
- Cooper CR, Chay CH, Gendernalik JD, Lee HL, Bhatia J, Taichman RS, McCauley LK, Keller ET, Pienta KJ. 2003. Stromal factors involved in prostate carcinoma metastasis to bone. *Cancer*, 97 (3 Suppl):739-747.

- Coughlin SR. 2000. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*, 407 (6801):258-264.
- Coughlin SR, Camerer E. 2003. PARTICIPATION in inflammation. *J Clin Invest*, 111 (1):25-27.
- Dahlback B. 2000. Blood coagulation. *Lancet*, 355 (9215):1627-1632.
- Day JR, Landis RC, Taylor KM. 2006. Aprotinin and the protease-activated receptor 1 thrombin receptor: antithrombosis, inflammation, and stroke reduction. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*, 10 (2):132-142.
- Dotz J, Seemuller U, Maschler R, Fritz H. 1985. The complete covalent structure of hirudin. Localization of the disulfide bonds. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 366 (4):379-385.
- Dos Santos C, Karaky R, Renoir D, Hamma-Kourbali Y, Albanese P, Gobbo E, Griscelli F, Opolon P, Dalle S, Perricaudet M, Courty J, Delbe J. Antitumorigenic effects of a mutant of the heparin affin regulatory peptide on the U87 MG glioblastoma cell line. *Int J Cancer*, 127 (5):1038-1051.
- Dresemann G. Temozolomide in malignant glioma. *Onco Targets Ther*, 3:139-146.
- Even-Ram S, Uziely B, Cohen P, Grisaru-Granovsky S, Maoz M, Ginzburg Y, Reich R, Vlodaysky I, Bar-Shavit R. 1998. Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat Med*, 4 (8):909-914.
- Francis JL, Biggerstaff J, Amirkhosravi A. 1998. Hemostasis and malignancy. *Semin Thromb Hemost*, 24 (2):93-109.
- Gessler F, Voss V, Dutzmann S, Seifert V, Gerlach R, Kogel D. 2010. Inhibition of tissue factor/protease-activated receptor-2 signaling limits proliferation, migration and invasion of malignant glioma cells. *Neuroscience*, 165 (4):1312-1322.

- Granovsky-Grisaru S, Zaidoun S, Grisaru D, Yekel Y, Prus D, Beller U, Bar-Shavit R. 2006. The pattern of Protease Activated Receptor 1 (PAR1) expression in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*, 103 (3):802-806.
- Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y, Takeshima H, Nishi T, Ushio Y. 1996. Expression of tissue factor in glioma. *Noshuyo Byori*, 13 (2):115-118.
- Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y, Takeshima H, Nishi T, Ushio Y. 1996. Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma. *Cancer*, 77 (9):1877-1883.
- Hayakawa Y, Kurimoto M, Nagai S, Kurosaki K, Tsuboi Y, Hamada H, Hayashi N, Endo S. 2007. Thrombin-induced cell proliferation and platelet-derived growth factor-AB release from A172 human glioblastoma cells. *J Thromb Haemost*, 5 (11):2219-2226.
- Hess KR. 1999. Extent of resection as a prognostic variable in the treatment of gliomas. *J Neurooncol*, 42 (3):227-231.
- Hua Y, Tang L, Keep RF, Hoff JT, Heth J, Xi G, Muraszko KM. 2008. Thrombin enhances glioma growth. *Acta Neurochir Suppl*, 102:363-366.
- Hua Y, Tang L, Keep RF, Schallert T, Fewel ME, Muraszko KM, Hoff JT, Xi G. 2005. The role of thrombin in gliomas. *J Thromb Haemost*, 3 (9):1917-1923.
- Jenkins EO, Schiff D, Mackman N, Key NS. 2010. Venous thromboembolism in malignant gliomas. *J Thromb Haemost*, 8 (2):221-227.
- Johnson K, Choi Y, DeGroot E, Samuels I, Creasey A, Aarden L. 1998. Potential mechanisms for a proinflammatory vascular cytokine response to coagulation activation. *J Immunol*, 160 (10):5130-5135.
- Kaufmann R, Patt S, Schafberg H, Kalff R, Neupert G, Nowak G. 1998. Functional thrombin receptor PAR1 in primary cultures of human glioblastoma cells. *Neuroreport*, 9 (4):709-712.

- Kleihues P, Ohgaki H. 1999. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol*, 1 (1):44-51.
- Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G. 2002. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol*, 64 (3):259-273.
- Lee AY, Levine MN. 2003. Venous thromboembolism and cancer: risks and outcomes. *Circulation*, 107 (23 Suppl 1):I17-21.
- Lee KR, Betz AL, Kim S, Keep RF, Hoff JT. 1996. The role of the coagulation cascade in brain edema formation after intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)*, 138 (4):396-400; discussion 400-391.
- Lee KR, Colon GP, Betz AL, Keep RF, Kim S, Hoff JT. 1996. Edema from intracerebral hemorrhage: the role of thrombin. *J Neurosurg*, 84 (1):91-96.
- Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. 2008:1-26
- Löffler G PP. 2003. *Biochemie und Pathobiochemie*. 7te Aufl. Berlin Heidelberg New York: Springer.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvett A, Scheithauer BW, Kleihues P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 114 (2):97-109.
- Loynes JT, Zacharski LR. 2003. The coagulation system as a target for experimental therapy of human gliomas. *Expert Opin Ther Targets*, 7 (3):399-404.
- Lüllmann H MK. 2006. *Pharmakologie und Toxikologie*. 16te Aufl. Georg Thieme Verlag.
- Lyon ME, Fine JS, Henderson PJ, Lyon AW. 1995. D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone (PPACK): alternative anticoagulant to heparin salts for blood gas and electrolyte specimens. *Clin Chem*, 41 (7):1038-1041.

- Maragoudakis ME, Tsopanoglou NE, Andriopoulou P. 2002. Mechanism of thrombin-induced angiogenesis. *Biochem Soc Trans*, 30 (2):173-177.
- Markwardt F. 1994. The development of hirudin as an antithrombotic drug. *Thromb Res*, 74 (1):1-23.
- Marras LC, Geerts WH, Perry JR. 2000. The risk of venous thromboembolism is increased throughout the course of malignant glioma: an evidence-based review. *Cancer*, 89 (3):640-646.
- Morozov VV. 1968. [The coagulant and anticoagulant blood systems in brain tumors of supratentorial localization]. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova*, 68 (4):505-509.
- Neveu I, Jehan F, Jandrot-Perrus M, Wion D, Brachet P. 1993. Enhancement of the synthesis and secretion of nerve growth factor in primary cultures of glial cells by proteases: a possible involvement of thrombin. *J Neurochem*, 60 (3):858-867.
- Nowak G LM, Zieger M. 2007. Thrombininduziertes Tumorwachstum. *Hämostaseologie*, (27):105–110.
- Ohgaki H, Kleihues P. 2005. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol*, 109 (1):93-108.
- Okamoto T, Nishibori M, Sawada K, Iwagaki H, Nakaya N, Jikuhara A, Tanaka N, Saeki K. 2001. The effects of stimulating protease-activated receptor-1 and -2 in A172 human glioblastoma. *J Neural Transm*, 108 (2):125-140.
- Olson ST, Bjork I. 1994. Regulation of thrombin activity by antithrombin and heparin. *Semin Thromb Hemost*, 20 (4):373-409.
- Ornstein DL, Meehan KR, Zacharski LR. 2002. The coagulation system as a target for the treatment of human gliomas. *Semin Thromb Hemost*, 28 (1):19-28.

- Otten HM, Prins MH, Smorenburg SM, Hutten BA. 2000. Risk assessment and prophylaxis of venous thromboembolism in non-surgical patients: cancer as a risk factor. *Haemostasis*, 30 Suppl 2:72-76; discussion 63.
- Pötzsch M. 2010. *Hämostaseologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie*. Aufl. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Rodas RA, Fenstermaker RA, McKeever PE, Blaivas M, Dickinson LD, Papadopoulos SM, Hoff JT, Hopkins LN, Duffy-Fronckowiak M, Greenberg HS. 1998. Correlation of intraluminal thrombosis in brain tumor vessels with postoperative thrombotic complications: a preliminary report. *J Neurosurg*, 89 (2):200-205.
- Rong Y, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. 2006. 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65 (6):529-539.
- Rong Y, Post DE, Pieper RO, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. 2005. PTEN and hypoxia regulate tissue factor expression and plasma coagulation by glioblastoma. *Cancer Res*, 65 (4):1406-1413.
- Rong Y, Belozarov VE, Tucker-Burden C, Chen G, Durden DL, Olson JJ, Van Meir EG, Mackman N, Brat DJ. 2009. Epidermal growth factor receptor and PTEN modulate tissue factor expression in glioblastoma through JunD/activator protein-1 transcriptional activity. *Cancer Res*, 69 (6):2540-2549.
- Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. 1974. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71 (4):1207-1210.
- Rudroff C, Seibold S, Kaufmann R, Zetina CC, Reise K, Schafer U, Schneider A, Brockmann M, Scheele J, Neugebauer EA. 2002. Expression of the thrombin receptor PAR-1 correlates with tumour cell differentiation of pancreatic adenocarcinoma in vitro. *Clin Exp Metastasis*, 19 (2):181-189.



- Sallah S, Wan JY, Nguyen NP. 2002. Venous thrombosis in patients with solid tumors: determination of frequency and characteristics. *Thromb Haemost*, 87 (4):575-579.
- Sawaya R, Zuccarello M, Elkalliny M, Nishiyama H. 1992. Postoperative venous thromboembolism and brain tumors: Part I. Clinical profile. *J Neurooncol*, 14 (2):119-125.
- Scarborough RM, Naughton MA, Teng W, Hung DT, Rose J, Vu TK, Wheaton VI, Turck CW, Coughlin SR. 1992. Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J Biol Chem*, 267 (19):13146-13149.
- Schmidt F, Faul C, Dichgans J, Weller M. 2002. Low molecular weight heparin for deep vein thrombosis in glioma patients. *J Neurol*, 249 (10):1409-1412.
- Sciacca FL, Ciusani E, Silvani A, Corsini E, Frigerio S, Pogliani S, Parati E, Croci D, Boiardi A, Salmaggi A. 2004. Genetic and plasma markers of venous thromboembolism in patients with high grade glioma. *Clin Cancer Res*, 10 (4):1312-1317.
- Shapiro JR. 2001. Genetics of nervous system tumors. *Hematol Oncol Clin North Am*, 15 (6):961-977.
- Shibata K, Yada K, Matsumoto T, Sasaki A, Ohta M, Kitano S. 2004. Protease-activating-receptor-2 is frequently expressed in papillary adenocarcinoma of the gallbladder. *Oncol Rep*, 12 (5):1013-1016.
- Shih AH, Holland EC. 2006. Platelet-derived growth factor (PDGF) and glial tumorigenesis. *Cancer Lett*, 232 (2):139-147.
- Shikamoto Y, Morita T. 1999. Expression of factor X in both the rat brain and cells of the central nervous system. *FEBS Lett*, 463 (3):387-389.

- Silvani A, Salmaggi A, Eoli M, Lamperti E, Boiardi A. 2003. Venous thromboembolism in malignant glioma patients treated by chemoradiotherapy. *Neurol Sci*, 24 (4):272.
- Steinmetzer T, Stürzebecher, J. 2004. Rationales Design von Thrombinhemmstoffen. *Pharm Unserer Zeit*, 3:196-205.
- Stouffer GA, Runge MS. 1998. The role of secondary growth factor production in thrombin-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Semin Thromb Hemost*, 24 (2):145-150.
- Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ. 2006. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol*, 7 (5):392-401.
- Stupp R, Roila F. 2009. Malignant glioma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 20 Suppl 4:126-128.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352 (10):987-996.
- Sun Z, Hu ZL, Ning XH, Zhou JF, Shao YJ, Duan JH, Yang XD, Bai CM. 2009. [Inhibitory effect of low molecular weight heparin on the secretion of vascular endothelial growth factor by tumor cells in vitro]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 31 (11):826-830.
- Takano S, Tsuboi K, Tomono Y, Mitsui Y, Nose T. 2000. Tissue factor, osteopontin, alphavbeta3 integrin expression in microvasculature of gliomas associated with vascular endothelial growth factor expression. *Br J Cancer*, 82 (12):1967-1973.
- Tellez C, Bar-Eli M. 2003. Role and regulation of the thrombin receptor (PAR-1) in human melanoma. *Oncogene*, 22 (20):3130-3137.

- Trepel.M. 2008. Neuroanatomie Struktur und Funktion. 4te Aufl. Urban & Fischer.
- Trousseau. 1872. Lectures on clinical medicine, delivered at the Hôtel Dieu, Paris, by A Trousseau ed 3, vol 5. Translated from the 3rd ed of 1868 by Sir John Rose Cormack. The New Sydenham Society, London, 5:281-332.
- Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. 1999. On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis. Potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by up-regulation of its receptors. *J Biol Chem*, 274 (34):23969-23976.
- Vlodavsky I, Mohsen M, Lider O, Svahn CM, Ekre HP, Vigoda M, Ishai-Michaeli R, Peretz T. 1994. Inhibition of tumor metastasis by heparanase inhibiting species of heparin. *Invasion Metastasis*, 14 (1-6):290-302.
- Vouret-Craviari V, Van Obberghen-Schilling E, Rasmussen UB, Pavirani A, Lecocq JP, Pouyssegur J. 1992. Synthetic alpha-thrombin receptor peptides activate G protein-coupled signaling pathways but are unable to induce mitogenesis. *Mol Biol Cell*, 3 (1):95-102.
- Vukovich TC, Gabriel A, Schaeffer B, Veitl M, Matula C, Spiss CK. 1997. Hemostasis activation in patients undergoing brain tumor surgery. *J Neurosurg*, 87 (4):508-511.
- Vuorinen V, Hinkka S, Farkkila M, Jaaskelainen J. 2003. Debulking or biopsy of malignant glioma in elderly people - a randomised study. *Acta Neurochir (Wien)*, 145 (1):5-10.
- Walsh DC, Kakkar AK. 2001. Thromboembolism in brain tumors. *Curr Opin Pulm Med*, 7 (5):326-331.
- Witt I. 2002. Molekularbiologische Grundlagen und Diagnostik der hereditären Defekte von Antithrombin III, Protein C und Protein S. *Hämostaseologie*, (22):57-66.
- Xu Y, Gu Y, Keep RF, Heth J, Muraszko KM, Xi G, Hua Y. 2009. Thrombin up-regulates vascular endothelial growth factor in experimental gliomas. *Neurol Res*, 31 (7):759-765.

- Yamahata H, Takeshima H, Kuratsu J, Sarker KP, Tanioka K, Wakimaru N, Nakata M, Kitajima I, Maruyama I. 2002. The role of thrombin in the neo-vascularization of malignant gliomas: an intrinsic modulator for the up-regulation of vascular endothelial growth factor. *Int J Oncol*, 20 (5):921-928.
- Yuan TC, Lin MF. 2004. Protease-activated receptor 1: a role in prostate cancer metastasis. *Clin Prostate Cancer*, 3 (3):189-191.
- Yung WK, Albright RE, Olson J, Fredericks R, Fink K, Prados MD, Brada M, Spence A, Hohl RJ, Shapiro W, Glantz M, Greenberg H, Selker RG, Vick NA, Rampling R, Friedman H, Phillips P, Bruner J, Yue N, Osoba D, Zaknoen S, Levin VA. 2000. A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *Br J Cancer*, 83 (5):588-593.
- Zacharski LR, Dunwiddie C, Nutt EM, Hunt J, Memoli VA. 1991. Cellular localization of activated factor X by Xa-specific probes. *Thromb Haemost*, 65 (5):545-548.
- Zania P, Kritikou S, Flordellis CS, Maragoudakis ME, Tsopanoglou NE. 2006. Blockade of angiogenesis by small molecule antagonists to protease-activated receptor-1: association with endothelial cell growth suppression and induction of apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther*, 318 (1):246-254.
- Zimmerman GA, Elstad MR, Lorant DE, McLntyre TM, Prescott SM, Topham MK, Weyrich AS, Whatley RE. 1996. Platelet-activating factor (PAF): signalling and adhesion in cell-cell interactions. *Adv Exp Med Biol*, 416:297-304.
- Gebrauchsinformation Human-Albumin Kabi 20%, octapharma, 2005  
 Gebrauchsinformation TISSUCOL Duo S 2ml Immuno, Baxter, 2005  
 Gebrauchsinformation TachoSil, wirkstoffhaltiger Schwamm, Nycomed  
 Gebrauchsinformation FloSeal® Matrix Haemostatic Sealant, Baxter, 2005  
[http://www.transfusionsmedizin.uni-erlangen.de/e1848/e177/inhalt393/Kurzskript\\_Gerinnung\\_Labordiagnostik\\_Physiologie.pdf](http://www.transfusionsmedizin.uni-erlangen.de/e1848/e177/inhalt393/Kurzskript_Gerinnung_Labordiagnostik_Physiologie.pdf)  
[http://www.klinik.uni-ainz.de/Zentrallabor/Lab-Web/Praktikumsskript/Kap-7\\_Gerinnung\\_Praktikumsskript\\_WS2004.pdf](http://www.klinik.uni-ainz.de/Zentrallabor/Lab-Web/Praktikumsskript/Kap-7_Gerinnung_Praktikumsskript_WS2004.pdf)

## **9 Anhang**

### **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. R. Kalff für die Überlassung des Promotionsthemas bedanken.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. med. S. A. Kuhn für die gute Betreuung, die gute Beratung bei allen Fragen zum Thema und zur praktischen Durchführung der Experimente und vor allem für die hilfreichen Hinweise bezüglich der Statistik und die immer wieder motivierenden Worte.

Ferner möchte ich mich bei Frau Dr. K. Hoffmann für die Beratung bei der Durchführung der Statistik bedanken.

Weiterhin möchte ich meiner Familie, meinem Freund und meiner Tochter für die moralische Unterstützung und Motivation während der Fertigstellung der Promotion danken.

## Lebenslauf

**Name:** Iris Gischel

**Geburtsdatum:** 31.08.1984

**Geburtsort:** Schmalkalden

**Schulbildung:** 09/1990 – 07/1994: Staatliche Grundschule Immelborn  
08/1994 – 07/2002: „Herzog-Georg-Gymnasium“ Bad Liebenstein  
2002 Schulabschluss: Abitur

**Universitäre Ausbildung:** 10/2002 – 11/2008: Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
08/2004: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
08/2007 – 07/2008: Praktisches Jahr  
11/2008: Abschluss des Studiums der Humanmedizin mit dem 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

**Berufliche Tätigkeit:** seit 01/2009: Assistenzärztin der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Sophien-und Hufelandklinikums Weimar

Jena, den .....

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. med. S. A. Kuhn, Prof. Dr. med. R. Kalff, Dr. K. Hoffmann

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

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

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

Jena, den.....