

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und
Tumorimmunologie der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Proinflammatorische und prothrombogene Wirkung von Feinstaub
PM₁₀ im Blut von Patienten mit metastasiertem und
fortgeschrittenem Pankreaskarzinom

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Eike Thomas Wolter

aus Stuttgart

Datum der Promotion:
04. März 2022

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungen	VI
Zusammenfassung	VII
Summary	IX
1. Einführung	1
1.1 Hämostase.....	1
1.2 Inflammation und Hämostase.....	3
1.3 Diagnostik venöser Thromboembolien (VTE).....	4
1.4 Tumorerkrankungen und Venöse Thromboembolien (VTE).....	6
1.4.1 Therapie und Prophylaxe Tumor-assoziiertes venöser Thromboembolien.....	8
1.5 Das Pankreaskarzinom.....	9
1.5.1 Definition und Epidemiologie.....	9
1.5.2 Klinische Symptome.....	11
1.5.3 Diagnostik und Therapie.....	12
1.5.3.1 Diagnostik.....	12
1.5.3.2 Therapie des Pankreaskarzinoms.....	13
1.5.3.2.1 Resektables Adenokarzinom des Pankreas.....	13
1.5.3.2.2 Palliative Systemtherapie.....	15
1.6 Feinstaub.....	17
1.6.1 Definition und größenabhängige Aufnahme von PM über den Respirationstrakt.....	17
1.6.2 Gesundheitliche Wirkungen von Feinstaub.....	18
2. Fragestellung	21
3. Material & Methoden	22
3.1 Material.....	22
3.1.1 Verbrauchsmittel.....	22
3.1.2 Geräte.....	23
3.1.3 Kits.....	24
3.1.4 Software.....	24
3.1.5 Reagenzien.....	25
3.2 Methoden.....	25
3.2.1 Sammlung von PM ₁₀ und Herstellung der PM ₁₀ -Suspension.....	25
3.2.2 Bestimmung der Partikelkonzentration mit dem CASY.....	26
3.2.3 Bestimmung des Endotoxingehalts in der PM ₁₀ -Suspension mit dem LAL- Test.....	26
3.2.4 Stimulationstest mit Heparinvollblut.....	26
3.2.5 Auswahl und Rekrutierung der Patienten.....	27
3.2.6 Auswahl und Rekrutierung der gesunden Probanden.....	28
3.2.7 Zytokinmessungen mit Cytometric Bead Array (CBA)-Technologie.....	29
3.2.8 Messung von Gerinnungsfaktoren mit Multiplex Bead Array-Technologie.....	30

3.2.9 Statistik	31
4. Ergebnisse	33
4.1 Proinflammatorische Zytokine in Heparinvollblut nach 4h Stimulation mit UV-behandelter PM ₁₀ -Suspension	33
4.2 Proinflammatorische Zytokine in Heparinvollblut nach 20h Stimulation mit UV-behandelter PM ₁₀ -Suspension	35
4.3 T-Zell Zytokine IL-2, IL-10 und IFN-gamma in Heparinvollblut nach 20 h Stimulation mit UV-behandelter PM ₁₀ -Suspension	37
4.4 Gerinnungsfaktoren Antithrombin, Plasminogen/Plasmin, Prothrombin und Faktor XIII in Heparinvollblut nach 4 h Stimulation mit UV-behandelter PM ₁₀ -Suspension	39
4.5 Konzentration und Größenverteilung der Partikel in der PM ₁₀ -Suspension	43
4.6 Mikroskopische Analyse von Heparinvollblut nach Stimulationstest mit unbehandelter versus UV-behandelte PM ₁₀ -Suspension	44
4.7 Vergleich des Endotoxingehalts der unbehandelten und UV-behandelten PM ₁₀ -Suspension mit dem LAL-Test	45
4.8 Vergleich der proinflammatorischen Eigenschaften der unbehandelten mit der UV-behandelten PM ₁₀ -Suspension in Heparinvollblut nach 4h Stimulation	46
4.9 Proinflammatorische Zytokine in Heparinvollblut nach 4h Stimulation mit LPS	48
5. Diskussion	51
5.1 IL-6 und IL-8 in Heparinvollblut werden nach 4h Stimulation mit UV-behandelter PM ₁₀ -Suspension in Patienten mit metastasiertem und fortgeschrittenem Pankreaskarzinom signifikant stärker produziert als in der gesunden Kontrollgruppe	51
5.2 Anstieg der Konzentration von IL-6 in Heparinvollblut zwischen 4h und 20h nach Stimulation mit UV-behandelter PM ₁₀ -Suspension	53
5.3 Schwache T-Zell-Zytokinantwort in Heparinvollblut nach 20 h Stimulation mit UV-behandelter PM ₁₀ -Suspension	54
5.4 Gerinnungsfaktoren Antithrombin und Prothrombin sind unabhängig von Stimulation mit PM ₁₀ höher in Patienten mit metastasiertem und fortgeschrittenem Pankreaskarzinom	56
5.5 Konzentration von Faktor XIII in Heparinvollblut nach 4 h Stimulation mit UV-behandelter PM ₁₀ -Suspension erniedrigt	58
5.6 Charakterisierung der Größenverteilung der Feinstaubpartikel der PM ₁₀ -Suspension zeigte Dominanz der lungengängigen Fraktion PM _{2,5-1,0}	59
5.7 Vergleich der UV-behandelten PM ₁₀ -Suspension mit der unbehandelten PM ₁₀ -Suspension weist auf unterschiedlichen Endotoxingehalt und verändertes proinflammatorisches Wirkungsprofil hin	59
5.8 Proinflammatorische Zytokinantwort in Heparinvollblut nach 4h Stimulation mit LPS unterscheidet sich nur wenig bei gesunden Probanden und Patienten mit metastasiertem oder fortgeschrittenem Pankreaskarzinom	61
6. Limitationen der Studie	63
6.1 Auswahl des Feinstaubgemischs	63
6.2 Modell der Vollblutinkubation vor dem Hintergrund der verwendeten PM ₁₀ -Suspension	63
6.3 Prothrombogene Wirkung der PM ₁₀ -Suspension	65

7. Schlussfolgerung	68
8. Literaturverzeichnis	69
Eidesstattliche Versicherung	79
Lebenslauf	80
Publikationsliste	81
Danksagung	83

Tabellenverzeichnis

	<u>Seite</u>
Tabelle 1: Validierter klinischer Score zur Ermittlung der klinischen Wahrscheinlichkeit (KW) einer Venenthrombose:	6
Tabelle 2: Alters- und verdachtsleveladaptiertes diagnostisches Vorgehen bei neu aufgetretenen Oberbauch- und Rückenschmerzen	13
Tabelle 3: Charakterisierung der in die Studie eingeschlossenen Patienten.	28
Tabelle 4: Beschreibung der beiden Studienpopulationen.	29

Abbildungsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abbildung 1: Plasmatische Gerinnungskaskade und primäre Hämostase	2
Abbildung 2: Negatives Feedback in der Gerinnungskaskade.....	3
Abbildung 3: Pathogenese der Virchow Trias bei Tumorerkrankungen.....	7
Abbildung 4: VTE-Inzidenz in Abhängigkeit von Tumorentität und Tumorstadium.....	8
Abbildung 5: Deutsche Krebsregisterdaten.....	11
Abbildung 6: Mögliche operative Optionen beim Pankreaskarzinom.	14
Abbildung 7: Therapiestruktur beim Adenokarzinom des Pankreas.....	17
Abbildung 8: Größenverteilung der verschiedenen Feinstaubfraktionen.....	18
Abbildung 9: Gewinnung der PM ₁₀ -Suspension.	26
Abbildung 10: Expression von IL-8, IL-6, TNF-alpha und IL-1beta in Heparinvollblut nach Stimulation mit PM ₁₀ -Suspension für 4h.....	35
Abbildung 11: Expression von IL-6 und TNF-alpha in Heparinvollblut nach Stimulation mit PM ₁₀ -Suspension für 20h.	36
Abbildung 12: Expression von IL-2, IFN-gamma und IL-10 in Heparinvollblut nach Stimulation mit PM ₁₀ -Suspension für 20h.	39
Abbildung 13: Konzentration von Antithrombin, Plasminogen/Plasmin, Prothrombin und Faktor XIII in Heparinvollblut nach Stimulation mit PM ₁₀ -Suspension für 4h.	42
Abbildung 14: Größenverteilung der Partikel in der PM ₁₀ -Suspension gemessen in CASY Cell Counter.....	43
Abbildung 15: Mikroskopische Darstellung der Zellen nach Stimulation von Heparinvollblut für 17 h mit PM ₁₀ -Suspension (Konzentration 1x 10 ⁷ /ml).....	45
Abbildung 16: LAL-Test zur Bestimmung der Endotoxinkonzentration in der PM ₁₀ -Suspension.....	46
Abbildung 17: Expression von TNF-alpha, IL-6, IL-1beta und IL-8 in Heparinvollblut nach Stimulation mit PM ₁₀ -Suspension für 4h.....	48
Abbildung 18: Expression von IL-8, IL-6, TNF-alpha und IL-1beta in Heparinvollblut nach Stimulation mit LPS für 4h.....	50

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
TF	Tissue Factor
VTE	Venöse Thrombembolie
DIC	Disseminated Intravasal Coagulation
IL-1beta, -2, -4, -6, -8, 10, -12p70, -17a...	Interleukin- 1beta, -2, -4, -6, -8 , -10, 12p70, -17a
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
IFN-gamma	Interferon-gamma
NMH	Niedermolekulares Heparin
DOAC	Direct Oral Anticoagulant
UFP	Ultrafine Particle
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
TVT	Tiefe Venenthrombose
ConA	Concanavalin A
LPS	Lipopolysaccharid
LAL	Lumulus Amebocyte Lystate
PBS	Phosphate Buffered Saline
CBA	Cytometric Bead Array
PM₁₀ UV	Particulate Matter ₁₀ UV-behandelt
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
KW	Klinische Wahrscheinlichkeit
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
t-PA	Gewebe-Plasminogen-Aktivator
CVI	Chronische Venöse Insuffizienz
FPC	familiäres Pankreaskarzinom
PanIN	intraepithelialer Neoplasie
PM₁₀	Particulate Matter ₁₀

Zusammenfassung

Feinstaub (PM, particulate matter) stellt eine heterogene Fraktion des Schwebstaubs dar und kann sowohl natürlichen Ursprungs als auch anthropogen verursacht sein. Von medizinischer Relevanz ist Feinstaub vor allem, wenn seine Größe eine Penetration der menschlichen Lunge zulässt. PM mit aerodynamischem Durchmesser $< 10 \mu\text{m}$ (PM_{10}) ist hierzu in der Lage. Sowohl Langzeit- als auch Kurzzeitwirkungen von Luftverschmutzung durch Feinstaub sind mit der Inzidenz von Erkrankungen nahezu aller Organsysteme positiv korreliert worden. Mechanistische Studien liegen vor allem zum Endpunkt Atemwegserkrankungen vor. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass PM einen Risikofaktor für venöse Thromboembolien (VTE) darstellt und eine proinflammatorische Zytokinantwort induziert. Das Pankreaskarzinom (Adenokarzinom des Pankreas) ist eine Krebserkrankung mit vergleichsweise schlechter Prognose und liegt bezogen auf alle Krebssterbefälle in Deutschland an vierter Stelle. Das Pankreaskarzinom ist als besonders thrombogene Tumorerkrankung beschrieben worden.

Ausgehend von der pathophysiologischen Bedeutung zytokinvermittelter Inflammation für die Hämostase und der proinflammatorischen Wirkung von PM_{10} , wurde in der vorliegenden Arbeit Heparinblut von Patienten mit Pankreaskarzinom mit hohem Risiko für VTE und Heparinblut einer gesunden Kontrollgruppe untersucht. Die Blutproben wurden *in vitro* mit einer PM_{10} -Suspension stimuliert und die proinflammatorische Zytokinantwort sowie die Konzentration von Gerinnungsfaktoren gemessen.

Die Messung der proinflammatorischen Zytokine ergab, dass nach 4h Stimulation mit PM_{10} -Suspension die Konzentration der Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) im Heparinblut von Pankreaskarzinompatienten signifikant höher war als im Heparinblut der gesunden Kontrollgruppe. Die Ergebnisse der Zytokinmessung nach 20-stündiger Inkubation mit PM_{10} -Suspension demonstrierten, dass nach diesem längeren Zeitraum die Menge an IL-6 in beiden Gruppen massiv anstieg und sich annäherte, da der Anstieg in der Gruppe der gesunden Probanden deutlich stärker war. Die Messungen der T-Zellzytokine nach 20 h Stimulation mit PM_{10} -Suspension ergaben für Interleukin-2 (IL-2) und Interferon-gamma (IFN-gamma) insgesamt sehr niedrige Zytokinkonzentrationen. Die Messung der Gerinnungsfaktoren nach 4h Stimulation zeigte, dass sowohl Antithrombin als auch Prothrombin auf Stimulation mit PM_{10} -Suspension keine Veränderung zeigten, in der unbehandelten Kontrolle in Patienten mit Pankreaskarzinom jedoch signifikant höher vorlagen als in der Gruppe der gesunden Probanden. Faktor XIII oder *Fibrin stabilizing factor*

XIII war in der Gruppe der Pankreaskarzinompatienten nach Stimulation mit PM₁₀-Suspension statistisch signifikant reduziert im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass PM₁₀ im Heparinblut von Pankreaskarzinompatienten stärker proinflammatorisch ist als in der gesunden Kontrollgruppe. Es wurden in dieser Studie erstmals IL-6, IL-8 und der Gerinnungsfaktor XIII zusammen als PM₁₀-sensible Parameter identifiziert. Patienten mit Pankreaskarzinom wurden in dieser Arbeit erstmals als möglicherweise besonders vulnerable Bevölkerungsgruppe für VTE im Zusammenhang mit der Umweltnoxe PM₁₀ charakterisiert.

Summary

Particulate matter (PM) is a heterogeneous mixture of suspended small airborne particles and can be of natural or anthropogenic origin. Particulate matter is of medical relevance in particular, if its size allows penetration into the human lung. PM with an aerodynamic diameter of $< 10 \mu\text{m}$ (PM_{10}) is capable of doing this. Both long-term and short-term effects of air pollution due to particulate matter have been positively correlated with the incidence of diseases in virtually all organ systems. It has been shown that PM is a risk factor for venous thromboembolism (VTE) and induces a pro-inflammatory cytokine response. Pancreatic carcinoma (adenocarcinoma of the pancreas) has been described as a particularly thrombogenic tumor disease.

Based on the pathophysiological significance of cytokine-mediated inflammation for hemostasis and the pro-inflammatory effect of PM_{10} , the present study examined heparin blood of patients with pancreatic cancer at a high risk for VTE and heparin blood of a healthy control group. The blood samples were stimulated in vitro with a PM_{10} suspension, and both the pro-inflammatory cytokine response as well as the concentration of blood coagulation factors were measured.

The measurement of pro-inflammatory cytokines showed that after 4h stimulation with PM_{10} suspension the concentration of cytokines interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) in the heparin blood of pancreatic cancer patients was significantly higher than in the heparin blood of the healthy control group. The results of the cytokine measurement after 20 h incubation with PM_{10} suspension demonstrated that after this longer incubation period the amount of IL-6 in both groups increased massively and converged since the increase was significantly higher in the healthy group. The measurement of coagulation factors after 4h stimulation revealed that both antithrombin and prothrombin showed no change on stimulation with PM_{10} suspension. However, they were significantly higher in the untreated control group of pancreatic cancer patients compared to the untreated healthy controls. Factor XIII or fibrin stabilizing factor XIII, was however statistically significantly lower in the group of pancreatic cancer patients after stimulation with PM_{10} suspension compared to the healthy control group.

In summary, this work shows that PM_{10} is more pro-inflammatory in the heparin blood of pancreatic cancer patients than in the healthy control group. In this study for the first time IL-6, IL-8 and coagulation factor XIII were identified together as PM_{10} -sensitive parameters. For the first time, patients with pancreatic carcinoma were identified as a population group potentially particularly vulnerable to the environmental pollutant PM_{10} .

1. Einführung

1.1 Hämostase

Der physiologische Vorgang der Blutstillung wird Hämostase genannt und besteht aus einem delikaten Gleichgewicht aus einerseits Fibrinbildung und andererseits Fibrinolyse unter Einbeziehung von Thrombozyten. Ziel ist die genau orchestrierte Thrombusbildung und –auflösung.

Es wird eine primäre und sekundäre Phase unterschieden. Bei einer Verletzung des Endothels kommt es zur Freisetzung von ADP, Polyphosphaten und Calcium. Nachfolgend erfolgt die Plättchenadhäsion am Ort der Läsion vermittelt durch den von-Willebrand-Faktor, einer Art Adaptorprotein, welches Thrombozyten mit der Gefäßwand verbinden kann. ADP vermittelt u. a. die blutungsbegrenzende Vasokonstriktion. Nach dieser primären Phase unter Ausbildung eines weißen Plättchenthrombus führt die parallel ablaufende Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade (sekundäre Phase) im Endergebnis zur Vernetzung von Fibrinmolekülen (Abbildung 1). Hierbei entsteht ein stabiler Thrombus aus Erythrozyten und Thrombozyten, der den Endotheldefekt abdeckt (heroldVersteeg, Heemskerk et al. 2013).

Die sekundäre Phase kann in einen extrinsischen und intrinsischen Teil unterteilt werden, der eine gemeinsame Endstrecke hat. In beiden Fällen kommt es zur konsekutiven, proteolytischen Spaltung von Plasmaproteinen (Gerinnungsfaktoren), die letztlich die Serinprotease Thrombin aktivieren. Thrombin wiederum aktiviert das Vorläufermolekül von Fibrin und ermöglicht so dessen Ausfällung und Polymerisation. Eine adäquate Thrombusstabilität wird u. a. durch Quervernetzung von Fibrinmolekülen durch Faktor XIII sichergestellt.

Plasminogen zu Plasmin aktiviert (Verstraete and Collen (1986). Plasmin ist auch bei der therapeutischen Lysetherapie ein zentrales Zielmolekül von rtPA/Alteplase.

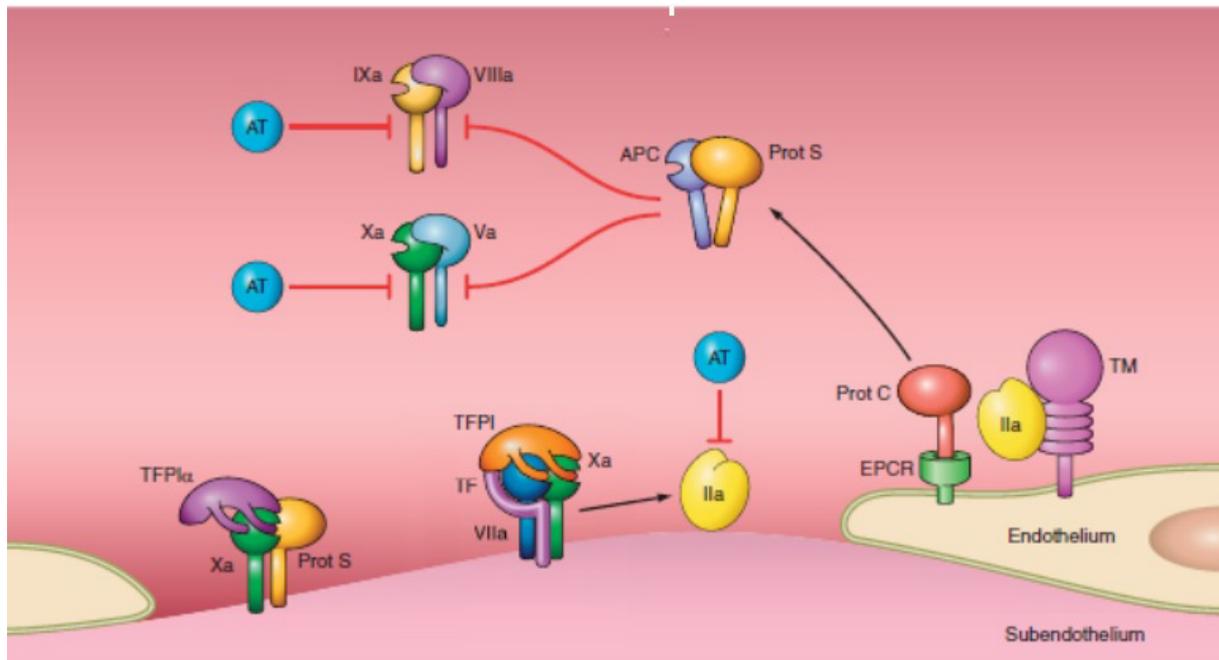


Abbildung 2: Negatives Feedback in der Gerinnungskaskade

(Modifiziert nach (Versteeg, Heemsker et al. 2013): Der Tissue-faktor-Protein-Inhibitor (TFPI) hemmt die Kaskade durch Bindung an den TF-FVIIa-FXa-Komplex. Bei ausreichend gebildeter Menge an Thrombin (IIa) bindet dieses an zellständiges Thrombomodulin und kann so mit dem Protein C- EPCR (Endothelialer Protein C-Rezeptor) interagieren. Das hierdurch aktivierte Protein C (APC) inhibiert zusammen mit dem Co-faktor Protein S u. a. den Tenase-Komplex (Xa-Va-Komplex). Antithrombin (AT) übt ebenfalls eine hemmende Wirkung auf Thrombin aus, indem es dieses sowohl indirekt als auch direkt hemmt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine funktionierende Hämostase verletzte Blutgefäße abdichtet, ohne die Viskosität und Fluidität auf systemischer Ebene zu beeinträchtigen. Sie ist außerdem in der Lage, Thromben nach Wiederherstellung der Gewebsintegrität lokal und zielgerichtet aufzulösen, ohne Blutungen zu verursachen. Eine Störung dieses Gleichgewichts kann zu sowohl arteriellen als auch venösen Thromboembolien oder Blutungsereignissen führen.

1.2 Inflammation und Hämostase

Entzündung und Gerinnung sind zwei physiologische Vorgänge, die eng miteinander verbunden und reziprok verschaltet sind (O'Brien 2012). Am Pathomechanismus einer systemischen Entzündungsreaktion mit ihrer die Hämostase betreffenden Exazerbation, der Verbrauchskoagulopathie (DIC), wird deutlich wie unmittelbar die Wechselwirkungen sind. Dieser multifaktorielle, systemische Prozess ist einerseits über die zytokingetriggerte Produktion von Faktor VII (Levi, van der Poll et al. 2006) und die Prothrombinase-

aktivierenden Effekte bakterieller Toxine vermittelt. Andererseits spielt die Hemmung von Protein C durch Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) (Esmon 2008) und die Interleukin-6-(IL-6)-vermittelte selektive Induktion koagulatorischer, nicht aber fibrinolytischer Vorgänge (Stouthard, Levi et al. 1996) eine wichtige Rolle. Interessanterweise konnte für die proinflammatorischen Zytokine TNF-alpha, IL-6 und Interleukin-8 (IL-8) gezeigt werden, dass sie bei Patienten mit VTE auch nach Beendigung der medikamentösen Antikoagulation erhöht sind (Saghazadeh, Hafizi et al. 2015). Darüber hinaus wird die Expression von Faktor VII/TF auf Monozyten und auf Endothelzellen der Blutgefäße durch die proinflammatorischen Zytokine, Interleukin-1 (IL-1), IL-6 und TNF-alpha induziert (Grignani and Maiolo 2000).

Zusammenfassend ist die Studienlage dergestalt, dass eine zentrale mechanistische Bedeutung zytokinvermittelter Inflammation für das Gerinnungssystem besteht.

1.3 Diagnostik venöser Thromboembolien (VTE)

Unter dem Begriff VTE werden allgemein venöse Thromboembolien subsumiert, die sich aus Thrombosen der Extremitäten, Beckenvenenthrombosen (TVT) und Lungenarterienembolien (LAE) zusammensetzen. Auch Katheter-induzierte Thrombosen fallen unter diesen Begriff. Die TVT entsteht aus einem Ungleichgewicht zwischen Gerinnung und Fibrinolyse mit intravasaler Thrombusbildung als Folge. Aufgrund einer ausgeprägten Selbstheilungstendenz der TVT löst sich der meist distal an den Extremitäten entstandene Thrombus von selbst wieder auf (Porfidia, Carnicelli et al. (2016)). Geschieht dies nicht, kommt es zur Apposition weiteren Thrombusmaterials und eine Embolie, also ein weiter proximal gelegener Gefäßverschluss, wird wahrscheinlicher. Häufigster Embolieort venöser Thromben nach Aszension sind die Lungenarterien, wobei abhängig vom Ausmaß der Gefäßstenose, die meisten LAE asymptomatisch verlaufen und ebenfalls eine ausgeprägte Selbstheilungstendenz aufweisen (Esmon (2009)). Nichtsdestotrotz ist die Letalität symptomatischer, mit einer Rechtsherzsymptomatik einhergehender LAE beträchtlich (Calder, Herbert et al. (2005)).

Im Unterschied zur oft symptomarmen aszendierenden Thrombose tritt bei den deszendierenden Thrombosen der Beckenvenen eine deutliche klinische Symptomatik mit Schmerzen, Ödem, livider Verfärbung und Überwärmung auf. Auch Thrombophlebitiden, also Thrombosen, die von superfiziellen Beinvenen wie der *Vena saphena magna* ausgehen, können sich unter hohem Embolierisiko in tiefere Beinvenenabschnitte fortsetzen (Litzendorf and Satiani 2011). Erfolgt keine Rekanalisation des betroffenen Gefäßes bzw. keine

Spontanheilung, kommt es zu einem bindegewebigen Umbau des Thrombus. Diese geht einher mit einer permanenten Flussbehinderung des Blutes mit nachfolgender Klappendestruktion und einem Defekt der physiologischen Muskelpumpe bei Bewegung. Diese chronische venöse Insuffizienz (CVI) tritt als postthrombotisches Syndrom (PTS) (Kahn (2009) in Erscheinung und führt bei Chronifizierung zu Komplikationen wie dem *Ulcus cruris venosum*.

In der Diagnostik der TVT spielen formalisierte Scores eine wichtige Rolle. Sie haben eine hohe Sensitivität. Aufgrund ihrer niedrigen Spezifität führen sie allerdings zu einer großen Zahl falsch-positiver Befunde. Am besten validiert ist der Score nach Wells (Tabelle 1 (Wells, Hirsh et al. 1995) dessen einfache Graduierung des Risikos in „hoch“ oder „nicht hoch“ es erlaubt, die klinische Wahrscheinlichkeit (KW) zu ermitteln. Diese ist Ausgangspunkt des diagnostischen Algorithmus‘ (S2-Leitlinie 2015). Bei mittlerer KW ist ein D-Dimer-Test indiziert. D-Dimere sind Fibrinolyseprodukte und stellen das messbare Korrelat einer abgelaufenen Aktivierung des Gerinnungssystems dar. Ihr Vorhandensein beweist allerdings kein thromboembolisches Ereignis, da sie auch bei Trauma, aktiver Tumorerkrankung oder postoperativ erhöht nachweisbar sein können. Bei hoher klinischer KW soll ein Kompressionsultraschall der Beinvenen (KUS) zur Abklärung erfolgen, während bei niedriger/mittlerer KW dies nur bei positivem D-Dimer-Nachweis empfohlen wird (S2-Leitlinie 2015). Bei positivem Befund wird behandelt, bei unklarem Befund ist eine Wiederholung des Kompressionsultraschalls nach 4-7 Tagen empfohlen, welcher prinzipiell vom Leistenband bis zur Knöchelregion erfolgen sollte. Thrombosen in der Beckenstrombahn und der *Vena cava inferior* werden am besten mit Schnittbildverfahren (CT) diagnostiziert (Wildberger, Mahnken et al. 2005). Der Beginn einer Antikoagulation empfiehlt sich bei hoher KW und nur zeitverzögerter Möglichkeit zur Bildgebung.

Klinische Charakteristik	Score
Aktive Tumorerkrankung	1,0
Lähmung oder kürzliche Immobilisation der Beine	1,0
Bettruhe (>3 Tage); große Chirurgie (<12 Wochen)	1,0
Schmerz / Verhärtung entlang der tiefen Venen	1,0
Schwellung ganzes Bein	1,0
Unterschenkelschwellung >3 cm gegenüber Gegenseite	1,0
Eindrückbares Ödem am symptomatischen Bein	1,0
Kollateralvenen	1,0
Frühere, dokumentierte TVT	1,0
Alternative Diagnose mindestens ebenso wahrscheinlich wie Venenthrombose	-2,0

Tabelle 1: Validierter klinischer Score zur Ermittlung der klinischen Wahrscheinlichkeit (KW) einer Venenthrombose:

Der Wells-Score (Wells, Hirsh et al. 1995) ermöglicht standardisiert die Graduierung der KW basierend auf Anamnese und klinischer Untersuchung. Bei einem Score $\geq 2,0$ ist die Wahrscheinlichkeit für eine TVT hoch, bei einem Score $\leq 2,0$ ist sie nicht hoch/niedrig.

1.4 Tumorerkrankungen und Venöse Thromboembolien (VTE)

Maligne Erkrankungen stellen einen erheblichen Risikofaktor für das Auftreten venöser Thrombosen und Lungenarterienembolien dar. Beide treten bei Patienten mit aktiver Tumorerkrankung bis zu sechsfach häufiger auf als in der Allgemeinbevölkerung (Chew, Wun et al. (2006), Heit, Silverstein et al. (2000)). Die zugrundeliegende Pathogenese ist multifaktoriell und entspricht der Komplexität des Gerinnungssystems, dessen physiologische Balance von plasmatischen, thrombozytären, endothelialen und vaskulären Faktoren abhängt. Die ursächliche Störung dieser Balance wird von der *Virchow Trias* beschrieben. Sie setzt sich zusammen aus Veränderungen an der Gefäßwand und Endothelschäden, Veränderungen der Strömungsgeschwindigkeit und Veränderungen in der Blutzusammensetzung. Abbildung 3 illustriert, an welcher Stelle eine Tumorerkrankung in dieses Wechselspiel aus Pro- und Antikoagulation eingreifen kann.

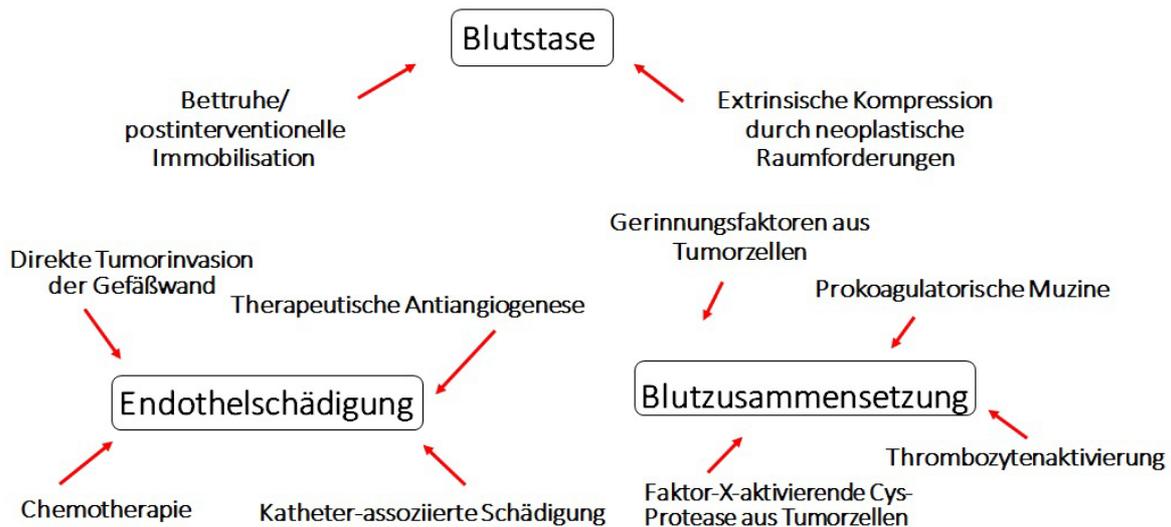


Abbildung 3: Pathogenese der Virchow Trias bei Tumorerkrankungen

(Modifiziert nach Lyman and Khorana (2009). Maligne Prozesse können auf allen drei Ebenen der Virchow Trias zur Entstehung von VTE beitragen (rote Pfeile).

Hinsichtlich der Blutzusammensetzung wird zwischen direkten Effekten von Tumorzellen im Sinne einer Sekretion von Gerinnungsfaktoren und indirekten Effekten unterschieden (Lyman and Khorana (2009)). Letztere resultieren z. B. aus der Aktivierung von Endothelzellen und Leukozyten durch Zytokine, die eine Akute-Phase-Reaktion provozieren. Auch die Aktivität von prokoagulatorischen muzinösen Glykoproteinen (Falanga, Panova-Noeva et al. (2009)) und die Produktion von Proteasen, die Faktor Xa, ein zentrales Molekül der plasmatischen Gerinnungskaskade (Abbildung 1) aktivieren, spielen eine wichtige Rolle (Ay, Dunkler et al. (2011)). Endothelschädigungen können sowohl iatrogen als auch tumorvermittelt auftreten. Blutstase ist ein Phänomen, das bei Tumorerkrankungen insbesondere durch die neoplastische Kompression von Blutgefäßen begünstigt werden kann. Auch perioperative Immobilität trägt zum erhöhten Thromboserisiko bei Tumorpatienten bei.

Das Auftreten von VTE führt im Verlauf von Tumorerkrankungen häufig zu Komplikationen und stellt innerhalb dieser Patientengruppe die zweithäufigste Todesursache dar (Khorana, Francis et al. (2007)). Hier sind patientenbezogene und tumor-assoziierte Risikofaktoren von Bedeutung (Connolly and Khorana (2009)). Erstere beinhalten vor allem Alter, Geschlecht (Ay, Dunkler et al. (2011)), Komorbiditäten und Immobilität, während letztere hinsichtlich Lokalisation, Stadium, Tumorentität und Zeitpunkt nach Tumordiagnose relevant sind. Auch behandlungsassoziierte Risikofaktoren wurden beschrieben. Insbesondere Chemotherapien (Heit, Silverstein et al. (2000)) und antihormonelle Therapien erhöhen das Risiko für die Inzidenz von VTE. Interessanterweise kann in 20% aller Fälle einer neudiagnostizierten VTE von einer bekannten oder bis dato unbekanntem Tumorerkrankung ausgegangen werden

(Laporte, Mismetti et al. (2008). Aufgrund der dreifach erhöhten VTE-Rezidivrate (Prandoni, Lensing et al. (2002) hat die zielführende Diagnostik sowie eine effektive Therapie und Prophylaxe bei Tumorpatienten eine besonders wichtige Stellung. Das Pankreaskarzinom ist als besonders thrombogene Tumorerkrankung beschrieben worden, was auch mit der hohen Metastasierungstendenz assoziiert ist. (Chew, Wun et al. (2006) Abbildung 4).

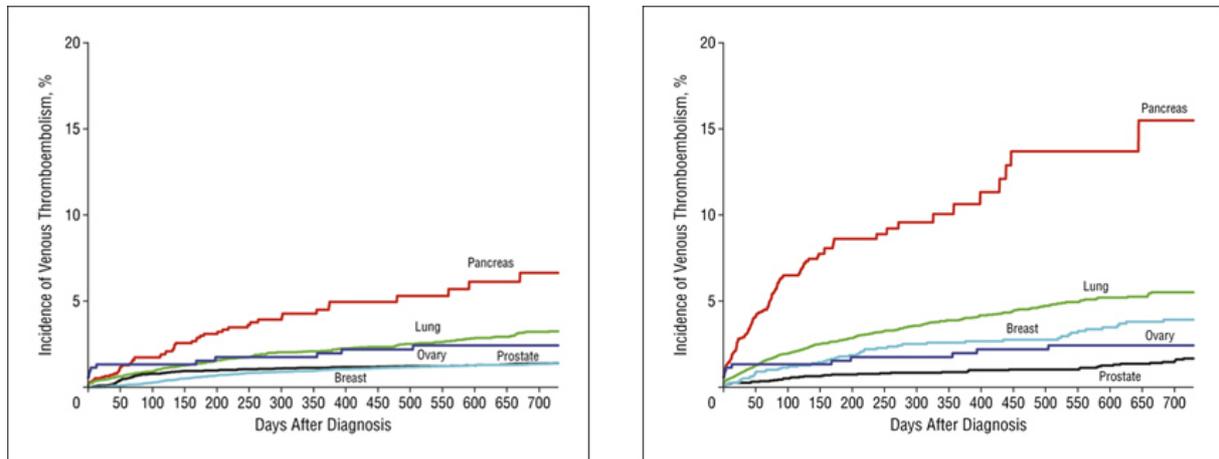


Abbildung 4: VTE-Inzidenz in Abhängigkeit von Tumorentität und Tumorstadium (Chew, Wun et al. (2006): Kaplan-Meier-Kurve der VTE-Inzidenz a.) im lokal fortgeschrittenen Tumorstadium bei Diagnose, b.) VTE-Inzidenz im metastasierten Zustand bei Diagnose der VTE zeigt eine ausgesprochen hohe Inzidenz beim metastasierten Pankreaskarzinom.)

1.4.1 Therapie und Prophylaxe Tumor-assoziiertes venöser Thromboembolien

Zur Klärung der Frage, für welchen Tumorpatienten eine Prophylaxe günstig ist, hat sich in der klinischen Praxis der Khorana-Score als nützlich erwiesen (Khorana and Connolly 2009). In ihn fließen der Body Mass Index (BMI), die Leukozytenzahl vor Chemotherapie, der Hämoglobinwert, die Thrombozytenzahl vor Chemotherapie und die Entität des Primärtumors mit entsprechendem Risikoprofil für VTE ein. Liegt der Khorana-Score bei 3 oder höher, ist eine medikamentöse Thromboseprophylaxe empfehlenswert (Khorana, Noble et al. 2018). Für Patienten mit einem histologisch gesicherten Pankreaskarzinom konnte in der CONKO-004-Studie nachgewiesen werden, dass Enoxaparin zur VTE-Prophylaxe effizient und sicher ist. Relevante Blutungen („major bleedings“) traten bei 5 von 152 (keine VTE-Prophylaxe) versus 7 von 160 (VTE-Prophylaxe mit Enoxaparin) Patienten auf. Die Inzidenz einer VTE hingegen lag bei 15 von 152 in der Gruppe ohne VTE-Prophylaxe versus 2 von 160 in der Gruppe mit Enoxaparin (Pelzer, Opitz et al. 2015). Die Studie Hokusai VTE-Cancer (Raskob, van Es et al. 2018) brachte neue Erkenntnisse zur Therapie von VTE bei Tumorpatienten mit oralen Antikoagulanzen (DOACs). Verglichen wurde die Therapie mit Dabigatran (NMH) oder Edoxaban (DOAC) bei stattgehabtem VTE. Primäre Endpunkte waren das Wiederauftreten eines VTE und Blutungsereignisse. In der Edoxabangruppe traten weniger VTE auf (7.3 %

versus 11.9%), allerdings war die Inzidenz eines Blutungsereignisses höher (6.9 % versus 4.0 %). Die CASSINI-Studie bezieht sich in einer Subgruppenanalyse auch auf Patienten mit Pankreaskarzinom und zeigte, dass die Prophylaxe mit dem DOAC Rivaroxaban die VTE-Inzidenz in einem Zeitraum von 180 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant senken konnte (Khorana, Soff et al. 2019). Obwohl das Risiko für das Auftreten schwerer Blutungen in den Ergebnissen dieser Studie nicht erhöht war, bleibt es immer eine individuelle Entscheidung, ob die medikamentöse VTE-Prophylaxe durchgeführt werden soll. Nichtsdestotrotz stellt das Pankreaskarzinom einen spezifischen Risikofaktor für alle Formen der VTE dar.

Die Therapie der VTE bei Tumorpatienten mit niedermolekularem Heparin (NMH), scheint unfraktioniertem Heparin hinsichtlich des Blutungs- und Rezidivrisikos nach einer Metaanalyse überlegen zu sein (Akl, Kahale et al. 2014). Eine überlappende Umstellung der Therapie von NMH auf Vitamin K-Antagonisten wird für Patienten mit aktiver Tumorerkrankung nach stattgehabter VTE mit Bezug auf die CATCH-Studie nicht empfohlen. Der Behandlungszeitraum mit NMH beträgt mindestens 3 -6 Monate und wird auch bei Rezidiv einer VTE unter Erhöhung der Dosis beibehalten (Carrier et al. 2015a), (Ihaddadene et al. 2014). Bei weiterhin aktiver Tumorerkrankung wird die Antikoagulation entweder mit NMH oder auch direkten oralen Antikoagulantien (DOACs) als verlängerte Erhaltungstherapie fortgeführt (Kearon et al. 2012). DOACs sind einer Kombinationstherapie aus NMH und Vitamin K-Antagonisten im Sicherheits- und Wirksamkeitsprofil nicht unterlegen. Aktuelle Studien zum Vergleich von NMH und DOACs alleine, die über 6 Monate hinausgehen, bleiben abzuwarten. Interessanterweise ist das Risiko für ein Thromboserezidiv auch bei Chemotherapie-induzierter Thrombozytopenie höher als das Risiko für ein Blutungsereignis. Fallen die Thrombozytenzahlen allerdings unter 50.000/ μl , ist die Dosis an NMH zu überprüfen und zu senken (Carrier et al. 2015a).

1.5 Das Pankreaskarzinom

1.5.1 Definition und Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom (Adenokarzinom des Pankreas) tritt im Mittel zwischen dem 70. und 75. Lebensjahr auf und ist somit eher eine Erkrankung des Alters. Erworbene Risikofaktoren sind Rauchen, Diabetes mellitus Typ 2, chronische Pankreatitis und Adipositas. In 70 % der Fälle ist der Pankreaskopf betroffen. Bei besonderer genetischer Belastung ist auch eine Erkrankung früh im Erwachsenenalter möglich. Dies trifft besonders zu, wenn

- mindestens zwei verwandte ersten Grades an einem Pankreaskarzinom erkrankt sind (familiäres Pankreaskarzinom, FPC)
- ein hereditäres Mamma- und Ovarialkarzinom mit Keimbahnmutationen im BRCA2- oder PALB2-Gen vorliegt
- eine Keimbahnmutation im CDKN2A-Gen vorliegt
- ein Peutz-Jeghers- Syndrom mit Keimbahnmutationen im STK11-Gen besteht
- eine hereditäre Pankreatitis mit Keimbahnmutationen im PRSS1 oder SPINK1-Gen besteht.

In der Regel handelt es sich um duktale Adenokarzinome, Ausnahmen stellen azinäre Tumore aus Pankreasparenchymzellen und zystische Adenokarzinome dar. Das Adenokarzinom des Pankreas wird auch als exokrines Pankreaskarzinom bezeichnet. Die Progression von einer Dysplasie duktaler Epithelzellen zum Adenokarzinom erfolgt über eine große Zahl von genetischen Abberationen und Fehlläufen, die sich initial über Vorstufen im Rahmen intraepithelialer Neoplasien (PanIN) manifestieren. Eine wichtige Komponente scheint die Mutation des KRAS-Onkogens zu sein, welches in 88- 100% der Fälle beim Adenokarzinom des Pankreas mutiert vorliegt und mit einer stark mitogenen Komponente ein potenter Initiator in der Karzinomentstehungssequenz des Pankreaskarzinoms ist (Ying, Dey et al. 2016). Weiter spielt der Ausfall von Tumorsuppressorgenen wie SMAD4, CDKN2A und TP53 eine wichtige Rolle (Hidalgo 2010, Ying, Dey et al. 2016).

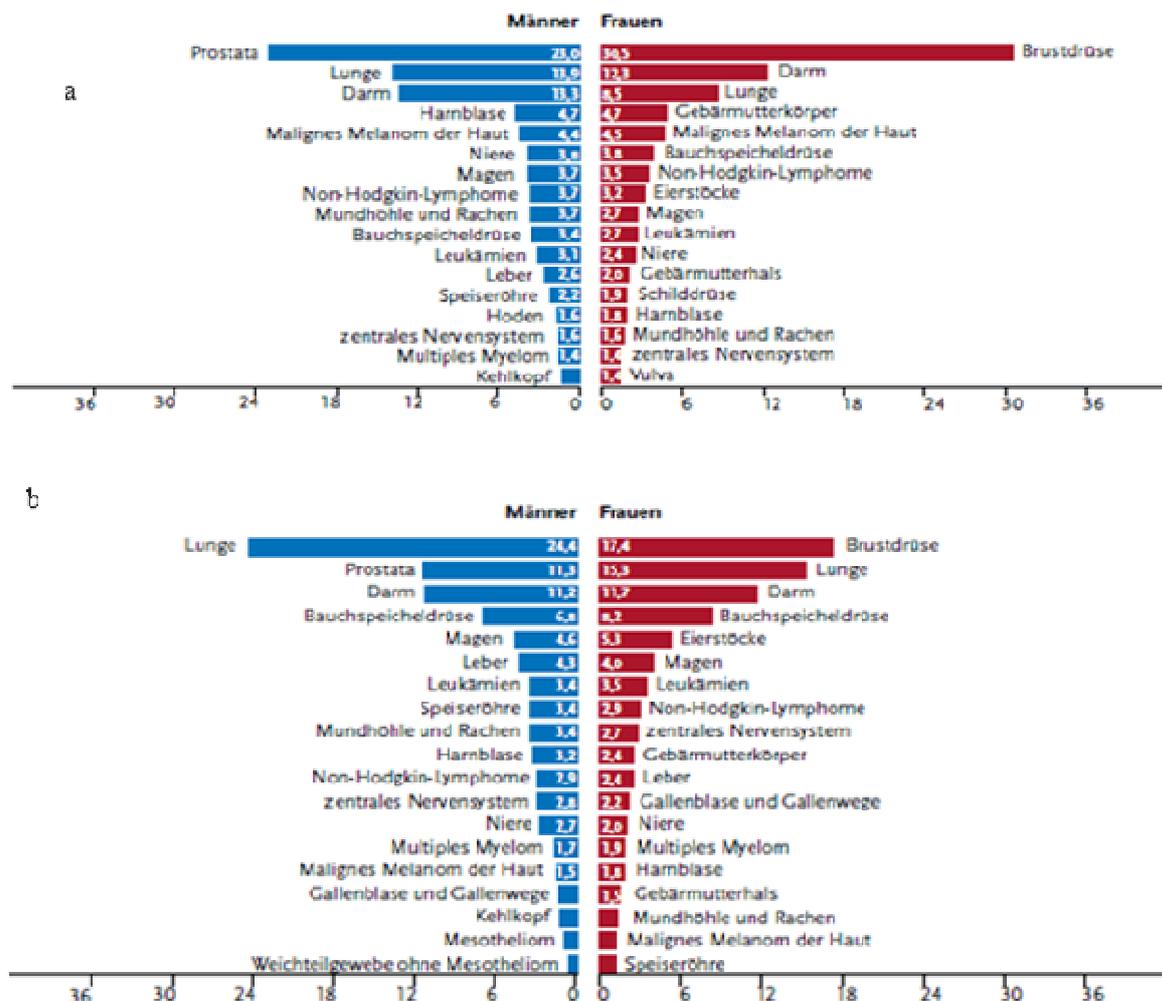


Abbildung 5: Deutsche Krebsregisterdaten
 a. Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs). b. Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2014 (Quelle: Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten).

Das Pankreaskarzinom ist zwar bei Männern nur die zehnthäufigste und bei Frauen die sechshäufigste Krebserkrankung deutschlandweit (Abbildung 5a), liegt aber bei beiden Geschlechtern bezogen auf die Krebssterbefälle (Abbildung 5b) an vierter Stelle. Das lässt erkennen, dass das Pankreaskarzinom eine sehr hohe krebspezifische Mortalität aufweist. Leider hat sich hieran trotz kleiner Fortschritte substanziell in den letzten Jahrzehnten wenig geändert.

1.5.2 Klinische Symptome

Das Adenokarzinom des Pankreas, im Folgenden kurz Pankreaskarzinom, zeichnet sich durch ein Fehlen von Frühsymptomen aus. Erst spät zeigt sich oft eine Trias unspezifischer Symptome:

1. Abdominelle, häufig epigastrische Beschwerden

2. Rückenschmerzen, oft gürtelförmig
3. Neuaufreten eines Diabetes mellitus im Sinne einer endokrinen Insuffizienz.

Zusätzlich treten beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom, insbesondere das des Pankreaskopfes, Pruritus, Ikterus von Haut und Skleren, sowie eine tastbar vergrößerte Gallenblase (Courvoisier-Zeichen) auf. Diese Symptomatik (Bjornsson, Ismael et al. 2003) korreliert mit dem Ausmaß des tumorbedingten Gallenaufstaus und zeigt sich laborchemisch häufig in einer massiven Hyperbilirubinämie und erhöhten Cholestasewerten wie gamma-Glutamyltransferase und Alkalische Phosphatase (Reisman, Gips et al. 1996). Allgemeinere Symptome wie ungewollter Gewichtsverlust und Nachtschweiß treten ebenfalls auf. Paraneoplastisch kann insbesondere eine Thrombophilie und Thrombophlebitis migrans in Erscheinung treten. Je nach Art und Grad der Metastasierung sind Husten und Dyspnoe bei pulmonaler/pleuraler Tumormanifestation oder entsprechend Zeichen der Leberinsuffizienz, Knochenschmerzen oder neurologische Ausfälle bei zerebraler Metastasierung zu erwarten. Ein neu aufgetretener, schmerzloser Ikterus in der zweiten Lebenshälfte ist karzinomsuspekt. Laut Literatur stellen Pankreas- und Gallengangskarzinome mit 20 % hier die häufigste Ursache.

1.5.3 Diagnostik und Therapie

1.5.3.1 Diagnostik

In der Diagnostik des Pankreaskarzinoms wird nach zuletzt gültiger AWMF-Leitlinie der Stufe S3 eine Stufendiagnostik empfohlen. Bei neu aufgetretenen Oberbauch- und Rückenschmerzen, nicht jedoch bei Rückenschmerzen alleine, wird konsensbasiert geraten, alters- und verdachtsleveladaptiert vorzugehen (Klapman, Chang et al. 2005).

Verdachtslevel	Alter (Jahre)	Symptome	Vorgehen
Niedrig	<50	nur Schmerz [‡]	Sonographie bei Symptompersistenz
Mittel	<50	Schmerz plus ^{**}	Sonographie, ggf. CT
	>50	nur Schmerz [‡]	Sonographie, ggf. CT
		Schmerz plus ^{**}	Sonographie, ggf. CT
Hoch	>50	Schmerz plus ^{**}	Sonographie, ggf. CT/Endosonographie

[‡] Neu aufgetretene Schmerzen, die lokalisiert/gürtelförmig in den Rücken ausstrahlen und nachts wahrnehmbar sind, bedürfen altersunabhängig individuell einer weiteren Abklärung. Bei hohem Verdachtslevel ggf. auch bei negativer Sonographie komplementär CT oder Endosonographie einsetzen.

^{**} Schmerz plus andere Symptome (Inappetenz, Gewichtsverlust, Schwäche)

Tabelle 2: Alters- und verdachtsleveladaptiertes diagnostisches Vorgehen bei neu aufgetretenen Oberbauch- und Rückenschmerzen
(Quelle AWMF-Leitlinie exokrines Pankreaskarzinom).

Die kontrastmittelgestützte Computertomographie des Abdomens oder alternativ die Magnetresonanztomographie werden ergänzend eingesetzt und haben einen besonderen Stellenwert vor geplanter Operation zur Klärung der Frage nach Resektabilität, bei der Ausbreitungsdiagnostik und im Therapieverlauf zum Staging. Auch eine Röntgen-Thorax Untersuchung gehört zum präoperativen Staging, wohingegen eine FDG-PET CT präoperativ keinen diagnostischen Mehrwert verspricht. Eine laborchemische Bestimmung des Tumormarkers CA19-9 sollte nach erfolgtem Nachweis einer Raumforderung im Pankreas vor Beginn einer etwaigen Chemotherapie erfolgen. Eine Bürstenzytologie zum Beispiel während einer ERCP gilt aufgrund mangelnder Sensitivität als ungeeignet. Im Unterschied hierzu ist die eine Biopsie vor palliativer Chemotherapie obligat und hochsensibel (Agarwal, Abu-Hamda et al. 2004). Ist Operabilität gegeben, wird auf eine Feinnadelbiopsie verzichtet, da auch bei unklarer Dignität einer Raumforderung des Pankreas diese reseziert werden sollte (Seufferlein 2013).

1.5.3.2 Therapie des Pankreaskarzinoms

1.5.3.2.1 Resektables Adenokarzinom des Pankreas

Beim Pankreaskarzinom stellt die chirurgische Therapie das einzige potenziell kurative Therapieverfahren dar. Es konnte eine klare Unterlegenheit der Radiochemotherapie im Vergleich zur Operation gezeigt werden (Gesamtüberleben median 10.8 Monate versus 22.6 Monate bei Operation), wenn Resektabilität überhaupt gegeben war (Doi, Imamura et al. 2008). Seitens des Patienten stellt das Alter kein einzeln zu betrachtendes Kriterium für oder

gegen Resektabilität dar (Lightner, Glasgow et al. 2004), wohl aber das Vorhandensein von Komorbiditäten. Seitens des Tumors ist aufgrund des immensen Effekts auf das mediane Gesamtüberleben zu beachten, dass weder die Infiltration von Nachbarorganen noch die Infiltration der *V. porta* oder *V. lienalis* eine operative Therapie ausschließen (Wagner, Redaelli et al. 2004). Demgegenüber stellt die Infiltration der *Arteria mesenterica sup.* oder des *Truncus coeliacus* eine relative Kontraindikation für die Operation dar. Beim duktalem Pankreaskarzinom wird keine Resektion des Primarius empfohlen, wenn Fernmetastasen, Organmetastasen, Peritonealkarzinose oder als Fernmetastasen geltende Lymphknotenmetastasen vorliegen (Seufferlein 2013).

Ausmaß und Art des operativen Eingriffs hängen vor allem von der Lokalisation des Primärtumors ab. Beim Pankreaskopfkarzinom wird meist die partielle Duodenopankreatektomie mit oder ohne Erhalt des Pylorus vorgenommen. Beim selteneren Pankreasschwanzkarzinom wird versucht, ausschließlich eine Pankreaslinksresektion durchzuführen. Pankreaskorpuskarzinome werden häufig im Rahmen einer subtotalen Pankreaslinksresektion oder bei entsprechender Ausbreitung, mit einer totalen Duodenopankreatektomie operiert.

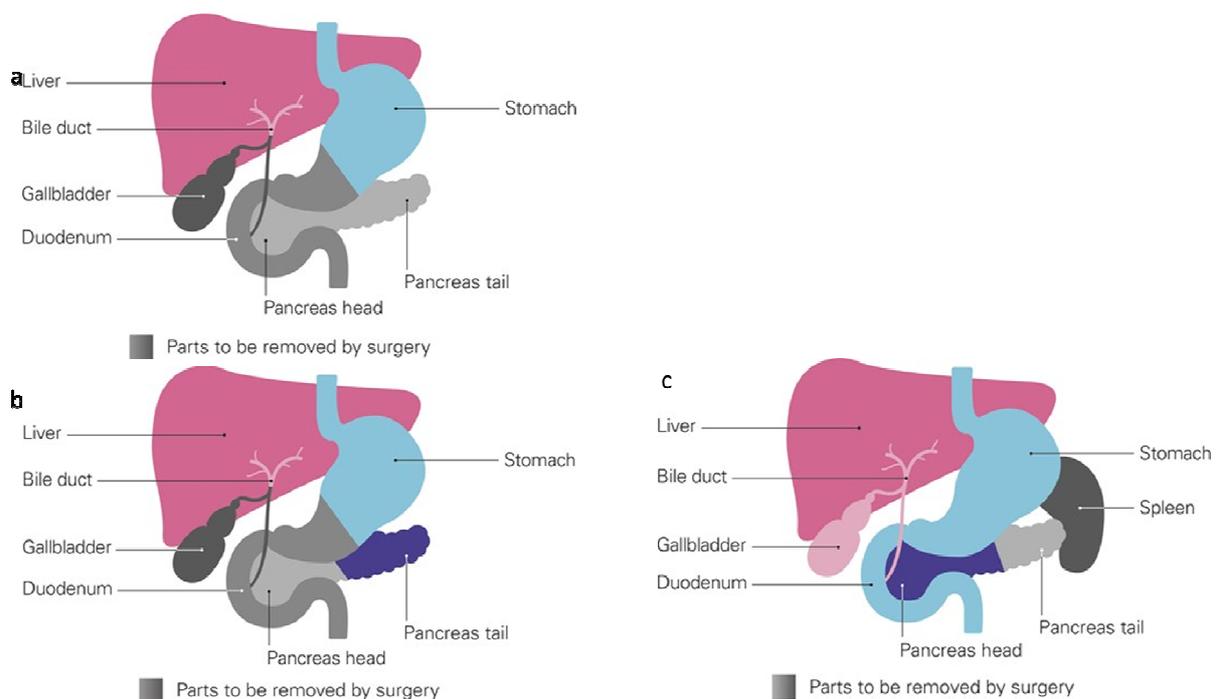


Abbildung 6: Mögliche operative Optionen beim Pankreaskarzinom.

a. Klassische Whipple-Situation mit Entfernung des Pylorus und totaler Pankreatektomie. b. Whipple mit Erhalt des Pankreasschwanz. c. Subtotale Pankreaslinksresektion.

Quelle: www.pancreaticcancer.org.uk

Das Langzeitüberleben ist selbst im nicht-fortgeschrittenen, operablen Stadium schlecht und liegt bei weniger als 20%. (Wagner, Redaelli et al. 2004). Mit adjuvanter Chemotherapie

(FOLFIRINOX) konnte eine 5-Jahresüberlebensrate von 30- 50% gezeigt werden (Conroy, Hammel et al. 2018). Für dieses sehr eingeschränkte Langzeitüberleben ist nichtsdestotrotz eine R0-Resektion notwendig, was die Wichtigkeit einer histopathologischen Schnittrandbeurteilung im Schnellschnitt unterstreicht (Katz, Marsh et al. 2013). Im Rahmen eines kurativen Therapiekonzepts ist beim Pankreaskarzinom ein multimodales Therapiekonzept entscheidend, das vor allem auf eine adjuvante Chemotherapie abgestellt ist. Die adjuvante Radiochemotherapie führte zu keiner Verbesserung des Langzeitüberlebens im Vergleich zur adjuvanten Chemotherapie (Neoptolemos, Dunn et al. 2001).

Es ist beim Pankreaskarzinom ein international anerkanntes Protokoll, für 6 Monate nach Resektion mit dem Antimetaboliten Gemcitabin als Monotherapie zu behandeln. Die randomisierte CONKO-001 Studie lieferte hierzu wegweisende Daten, die nicht nur eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens, sondern auch des krankheitsfreien Überlebens zeigten (Oettle, Neuhaus et al. 2013). Die im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika gute Verträglichkeit ist ein weiterer Gesichtspunkt, der für die Monotherapie mit Gemcitabin spricht, auch wenn Studiendaten vorliegen, die eine ähnliche Wirksamkeit von 5-Fluorouracil, bei eher ungünstigerem Nebenwirkungsprofil zeigen (ESPAC-3 Studie). In einer anderen Studie mit 732 Patienten (ESPAC-4 Studie) konnte gezeigt werden, dass eine Kombinationstherapie mit Gemcitabin und oralem 5-Fluorouracil (Capecitabin) das Gesamtüberleben signifikant verbessert im Vergleich zu Gemcitabin in der Monotherapie (Neoptolemos, Palmer et al. 2017). Einschränkend zu erwähnen ist, dass es beim rezidivfreien Überleben keinen signifikanten Effekt gab. Wird der R-Status nach Operation berücksichtigt, ist bei R1-Resektion, wie sie im klinischen Alltag häufig vorkommt, für die Kombinationstherapie kein signifikanter Vorteil mehr zu sehen. Zusammengefasst stellt sowohl die Monotherapie mit Gemcitabin oder 5-Fluorouracil als auch die Kombinationstherapie aus beiden, eine valide Chemotherapieoption dar. Unter Berücksichtigung der relevanten Toxizität, zeigte sich das modifizierte FOLFIRINOX-Regime im Endpunkt krankheitsfreies Überleben (21 versus 12 Monate) jedoch im Vergleich zur Monotherapie mit Gemcitabin in der Adjuvanz überlegen (Conroy, Hammel et al. 2018).

1.5.3.2.2 Palliative Systemtherapie

Es ist lange bekannt, dass im Rahmen eines palliativen Therapiekonzepts beim metastasierten und lokal fortgeschrittenen Pankreaskarzinom die Chemotherapie, bezogen auf das Gesamtüberleben und auch auf die Lebensqualität, der ausschließlich supportiven Therapie überlegen (Glimelius, Hoffman et al. 1996) ist. Auch hier ist Gemcitabin in der Monotherapie seit den Neunzigerjahren etabliert (Burriss, Moore et al. 1997). Die Remissionsraten liegen im

Bereich von 5- 10%. Trotz dieser niedrigen Remissionsraten, ist ein klinisches Ansprechen häufig gegeben. Speziell die Schmerztherapie wird durch eine begleitende palliative Chemotherapie unterstützt.

Wirksamer als Gemcitabin alleine ist in der Palliativsituation beim metastasierten Pankreaskarzinom die Kombinationschemotherapie FOLFIRINOX bestehend aus 5-Fluorouracil/Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin (Conroy, Desseigne et al. 2011). Erkauft wird diese Wirksamkeit allerdings mit deutlich höherer Toxizität, die häufig therapielimitierend ist und den Einsatz von FOLFIRINOX bei Patienten mit reduziertem Allgemeinzustand stark einschränkt. Vergleicht man Mono-5-FU mit der Kombination aus 5-FU/Folinsäure/Oxaliplatin (CONKO-003-Studie), dann kann eine moderate Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit (2.6 Monate) bei nur minimaler Verlängerung der progressionsfreien Überlebenszeit (0.9 Monate) konstatiert werden. Eine Studie (Ueno, Ioka et al. 2013), in der Gemcitabin mit oralem 5-FU in Kombination mit zwei Enzyminhibitoren zur besseren Bioverfügbarkeit kombiniert wurde, konnte im Vergleich zu Gemcitabin alleine sowohl im Gesamtüberleben als auch im Endpunkt progressionsfreies Überleben einen Vorteil von 1.3 bzw. 1.6 Monate zeigen. Die Verlängerung des Gesamtüberlebens war jedoch statistisch nicht signifikant. Ein weiteres orales 5-FU-Präparat, welches als Prodrug verabreicht wird, ist das Capecitabin. Beeindruckenderweise konnte es in Kombination mit Gemcitabin die Remissionsrate von 17% (Gemitabin alleine) auf 46% steigern, lieferte aber im wichtigen Endpunkt progressionsfreies Überleben einen enttäuschenden Unterschied von nur weniger als einem Monat (Lee, Chung et al. 2017). Ähnlich enttäuschend verlief die GIP-1-Studie (Colucci, Labianca et al. 2010), die Gemcitabin alleine mit Gemcitabin kombiniert mit dem Platinderivat Cisplatin verglich. Im progressionsfreien Überleben war die Kombination sogar dem Gemcitabin als Monotherapie minimal unterlegen. Dies unterstreicht, wie umsichtig hochemetogene Platinderivate wie Cisplatin in der palliativen Systemtherapie des Pankreaskarzinoms eingesetzt werden sollten. Eine Kombination von Gemcitabin mit Nanopartikel-gebundenem Paclitaxel (nab-Paclitaxel) stellt beim metastasierten Pankreaskarzinom eine Alternative zu FOLFIRINOX dar und ist besser wirksam als Gemcitabin alleine (3.7 Monate progressionsfreies Überleben versus 5.5 Monate) (Von Hoff, Ervin et al. 2013). Wenn der reduzierte Allgemeinzustand es erforderlich macht, ist hier bei gutem Ansprechen auch eine Intervalltherapie bis zum Progress möglich.

Als einzigem Vertreter aus der Gruppe der sogenannten „Targeted Therapies“ kommt beim Pankreaskarzinom dem Erlotinib eine gewisse Rolle zu. Dieser orale Tyrosinkinaseinhibitor des EGF-Rezeptors hat unter bestimmten Voraussetzungen wie z.B. dem therapieinduzierten

Auftreten eines akneiformen Exanthems, zu einer geringfügigen Verbesserung des Gesamtüberlebens geführt (Moore, Goldstein et al. 2007). Mit der Hoffnung auf neue, verbesserte Therapieoptionen durch molekulare Therapien bleiben zukünftige Studien abzuwarten. Insbesondere die Erstellung molekularer Profile wird einen zunehmenden Stellenwert einnehmen.

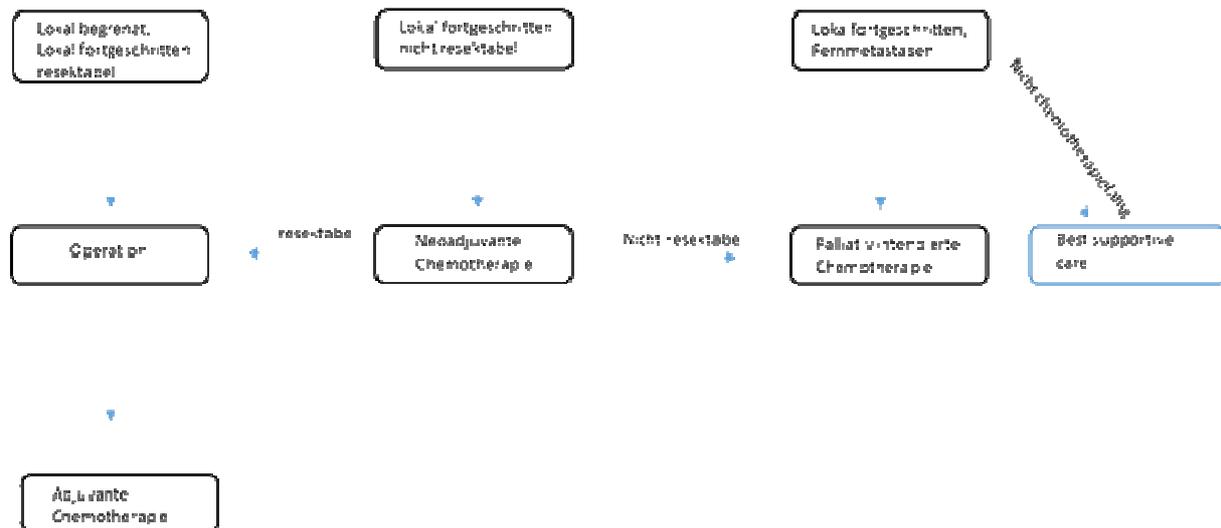


Abbildung 7: Therapiestruktur beim Adenokarzinom des Pankreas.

Von zentraler Bedeutung für die Prognose ist die Resektabilität als Voraussetzung für ein kuratives Konzept. Unabhängig vom Therapiekonzept (palliativ/kurativ siehe Text) spielt der Allgemeinzustand des Patienten bei der Wahl der Chemotherapie eine zentrale Rolle.

1.6 Feinstaub

1.6.1 Definition und größenabhängige Aufnahme von PM über den Respirationstrakt

Feinstaub (PM, particulate matter) entsteht direkt durch Verbrennungsprozesse im Verkehr, in Heizwerken und Heizungsanlagen oder beispielsweise durch Abrieb auf Asphalt oder im Schienenverkehr. Weitere, meist eher lokal auftretende Quellen für Feinstaub sind Feuerwerk, Zigaretten und Grillfeuer. Dieser primäre Feinstaub wird unterschieden von sekundärem Feinstaub, der durch gasförmige Vorläufersubstanzen wie Ammoniak, Schwefel- und Stickoxide entsteht, sich aber erst durch Interaktion mit der Atmosphäre in seiner partikulären Struktur ausbildet.

Hinsichtlich der potenziellen Toxizität von Feinstäuben ist es wichtig zu berücksichtigen, dass es sich um komplexe, extrem heterogene Gemische handelt, die sich in Struktur und Viskosität unterscheiden. Sie stellen durch ihre aerodynamischen Eigenschaften Vehikel für Allergene, anorganische und organische Toxine, Zellfragmente und mikrobielle Strukturen dar. Sie können größenabhängig die Atemwege des Menschen unterschiedlich tief

penetrieren. PM_{10} weist einen aerodynamischen Durchmesser < 10 Mikrometer (μm) auf. Bezeichnenderweise werden sie in der Fachliteratur auch *thoracic particles* genannt, da sie in der Trachea den Larynx passieren und bis in den Bronchealbaum vordringen können. Die *coarse fraction* mit einem Durchmesser von $10\mu m - 2.5\mu m$ kann die Alveoli erreichen, also bis in die Tiefe der Lunge vordringen. Für *fine particles* $< 2.5 \mu m$ wurde in einer systematischen Literaturübersicht (Nakane 2012) herausgearbeitet, dass sie mehrheitlich größenabhängig erst ab einem Durchmesser $< 1 \mu m$ über das Kapillarbett weit distal der Lungenarterien in die systemische Blutzirkulation gelangen können. Für ultrafine particles (UFPs) $< 0.1 \mu m$ ist bewiesen, dass sie sich stark in den Alveolen anlagern (Daigle, Chalupa et al. 2003) und direkt in die systemische Blutzirkulation übergehen können (Nemmar, Vanbilloen et al. 2001).

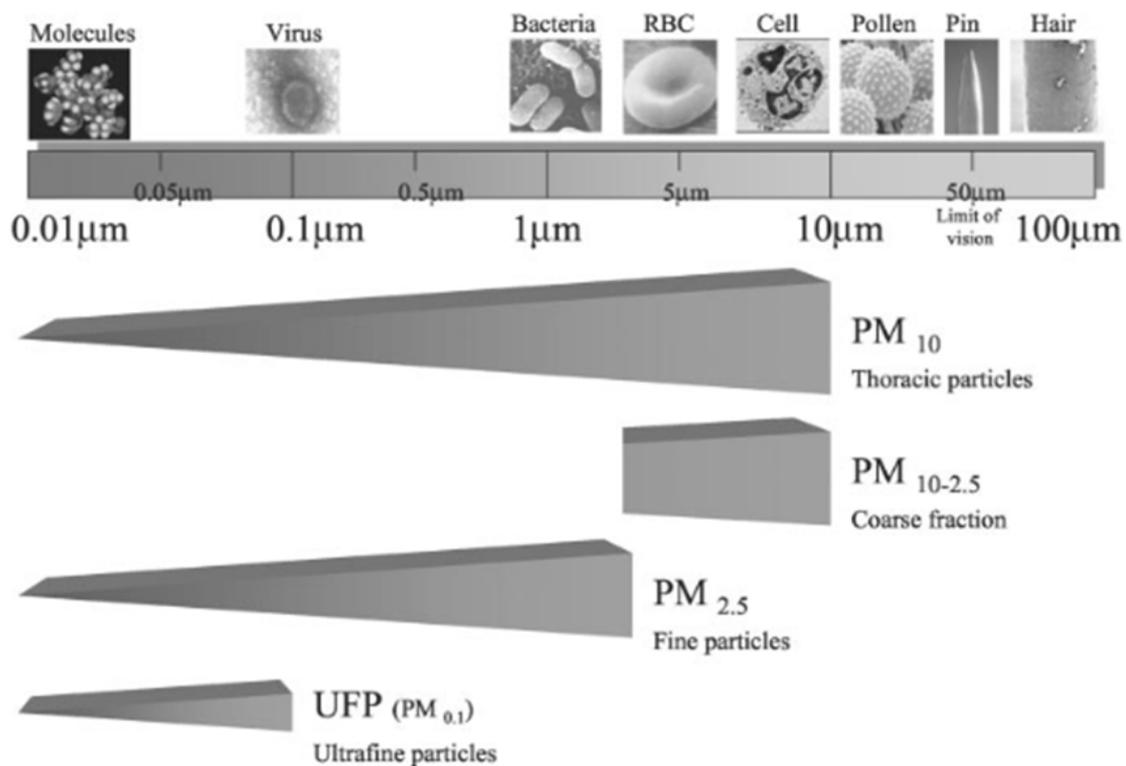


Abbildung 8: Größenverteilung der verschiedenen Feinstaubfraktionen.

Die Balken stellen dar, dass es sich jeweils um Gemische von Partikeln unterschiedlicher Größe handelt. Quelle: Brook et al, Air pollution and cardiovascular disease, Circulation 2004.

1.6.2 Gesundheitliche Wirkungen von Feinstaub

Das globale Ausmaß der Krankheitslasten, das von Feinstaubbelastung ausgeht, wird zunehmend über komplexe mathematische Abschätzungen quantifiziert. Es wurde errechnet, dass alleine in 2015 weltweit 4.2 Millionen Todesfälle durch die Exposition mit $PM_{2.5}$ verursacht wurden (Cohen, Brauer et al. 2017). Obwohl es sich um eine Berechnung handelt,

die mathematisch nur einer Abschätzung im Sinne einer Näherung entspricht, sind die Zahlen beeindruckend, hochrangig publiziert (The Lancet, 2015) und entsprechend von der WHO berücksichtigt worden. Bezogen auf den Faktor Luftverschmutzung ist Mortalität mit Abstand der epidemiologisch am besten untersuchte Endpunkt. Eine positive Assoziation ist unbestritten, wobei für UFPs die Datenlage noch am dünnsten ist (Pope 2015), (Kumar, Morawska et al. 2014). In einer Reihe von Studien handelt es sich um die Gesamtmortalität (*all-cause mortality*) ohne Berücksichtigung der Mortalitätsursache. In den letzten Jahren jedoch erschienen in der Fachliteratur zahlreiche Publikationen, die Langzeit- und Kurzzeitwirkungen von Luftverschmutzung durch Feinstaub mit der Inzidenz von Erkrankungen nahezu aller Organsysteme in Verbindung brachten.

Mechanistische Studien liegen vor allem zum Endpunkt Atemwegserkrankungen vor (Blanchet, Ramgolam et al. 2004). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Feinstaub im Sinne eines Adjuvanz die Immunogenität von Allergenen verstärkt. (de Haar, Hassing et al. 2006). Negative Effekte durch Feinstaub auf die Lungenfunktion wurden in einer epidemiologischen Langzeitstudie an großen Fallzahlen (Framingham Heart Study) mit Erwachsenen demonstriert (Rice, Ljungman et al. 2015). Auch eine Assoziation zwischen chronischer Feinstaubbelastung und chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) scheint zu bestehen (Schikowski, Sugiri et al. 2005). Ohne dass bisher mechanistische Beweise geliefert werden konnten, weisen Daten epidemiologischer Studien darauf hin, dass Feinstaub die kardiovaskuläre Mortalität erhöht. (Dockery, Pope et al. 1993) und mit Schlaganfällen und ischämischen Ereignissen assoziiert ist (Utell, Frampton et al. 2002).

Langzeitexposition mit Feinstaub führt nicht nur im arteriellen System zu pathologischen Veränderungen, sondern stellt einen Risikofaktor für die TVT dar (Baccarelli, Martinelli et al. 2008) und geht mit erhöhten Plasmakonzentrationen prokoagulatorischer Proteine wie Faktor VIII einher (Nemmar, Hoylaerts et al. 2006). Wie in Kapitel 1.2 ausgeführt, sind Inflammation und Gerinnung physiologisch und pathophysiologisch miteinander verbunden, was für die vorliegende Studie von besonderer Bedeutung ist, weil Feinstäube zumindest *in vitro* eine proinflammatorische Zytokinantwort induzieren (Kennedy, Ghio et al. 1998): Dieser Zusammenhang ist *in vitro* auch in späteren Studien ausführlich belegt worden (Fujii, Hayashi et al. 2001), (Baulig, Sourdeval et al. 2003), (Gioda, Fuentes-Mattei et al. 2011).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass abhängig von Größe und resultierender Eindringtiefe der Feinstaubpartikel, die gesundheitlichen Wirkungen und betroffenen Organsysteme sehr verschieden sein können. Die Heterogenität einer jeden

Feinstaubpopulation ist extrem groß und führt ihrerseits zu spezifischen Effekten hinsichtlich der gesundheitlichen Wirkung einer bestimmten Feinstaubexposition.

2. Fragestellung

Feinstaub als Umwelttoxine stellt ein ubiquitäres, globales Gesundheitsrisiko dar. Die Grundstruktur von Feinstaub (PM, particulate matter) ist heterogen und abhängig vom Ursprungsort und den Ausgangssubstanzen. Die Klassifizierung erfolgt häufig auf Basis der Partikelgröße, die für die Alveolargängigkeit und biologische Wirkung von Bedeutung ist. In der hier verwendeten PM₁₀-Suspension aus Großstadtumgebungsstaub sind überwiegend Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser des Bereichs 10 µm bis 1 µm enthalten, wobei Partikel der Größe 1,03 µm die Mehrheit darstellen. Die im Durchmesser kleinsten Partikel der PM₁₀-Suspension befinden sich somit nach aktuellem Stand der Forschung an der physikalischen Grenze zur Fähigkeit, durch die Lungenkapillaren in den Blutstrom zu penetrieren.

In dieser Studie wurde die proinflammatorische und prothrombogene Wirkung von PM₁₀ auf das Blut von Patienten mit metastasiertem und fortgeschrittenem Pankreaskarzinom untersucht. Nach PM₁₀-Inkubation venösen Bluts der Patienten wurde ein Profil der proinflammatorischen Zytokinantwort erstellt. Zentrale Hypothese dieser Arbeit ist, dass Patienten mit metastasiertem oder fortgeschrittenem Pankreaskarzinom stärker proinflammatorisch auf PM₁₀ reagieren als eine gesunde Vergleichsgruppe. Es besteht wissenschaftlicher Konsens darüber, dass proinflammatorische Signalmoleküle prothrombogen wirken. Zweite Hypothese dieser Arbeit ist folglich, dass Blut von Patienten mit metastasiertem oder fortgeschrittenem Pankreaskarzinom stärker prothrombogen auf PM₁₀ reagiert als Blut einer gesunden Vergleichsgruppe.

Zweck dieser Studie ist, die hohe Inzidenz venöser thromboembolischer Ereignisse bei Patienten mit metastasiertem oder fortgeschrittenem Pankreaskarzinom hinsichtlich einer erhöhten Vulnerabilität dieser Patientengruppe gegenüber der Umwelttoxine PM₁₀ einzuordnen.

3. Material & Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmittel

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
Membranfilter Zefluor	PTFE mit PMP-Stützring, Porengröße 1µm, Durchmesser 47 mm R2PL047	Pall Laboratory, USA
Li-Heparin-Röhrchen	Vacutainer, LH 170 I.U., 10 ml, kein Trenngel, REF 367526	Becton Dickinson, UK
NaCl 0,9% isoton	Injektionslösung	Fa. B. Braun Melsungen AG, D
Analyslide Polystyrol 47mm	Petri dish für Membranfilter	Pall Laboratory, USA
Matrix 1,4 ml Blank tubes	PP, round bottom	Thermo Scientific, USA
Bürstenköpfe Sensitive Clean,		Braun GmbH, D
FALCON 15 ml Tube	TubePolystyrene Round- Bottom Tube, 12 x 75 mm,	Corning, USA
Reaktionsgefäße Eppendorf Biopur	PP, Safe-Lock farblos, steril, einzeln, 0,5, 1,0, 2,0 ml	Eppendorf, D
Insight HB	Hemoglobin Test Strips	ACON Laboratories, Inc., USA
Safety-Multifly®Kanülen,	0,8 x 19 mm,	Sarstedt, D
Filterspitzen, MultiGuard Barrier Tips,	steril, RNase-/DNase-u. pyrogenfrei, Human-DNA u. PCR-Inhibitor-frei, LowBinding 0,5-10µl, 1-20µl, NX 1- 200µl, 1-200µl, 100-1000µl,	Sorenson™ BioScience, Inc., USA

3.1.2 Geräte

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
BD FACSCanto™ II, 3-laser, 8-color (4-2-2)	3-laser, 8-color (4-2-2)	BD Biosciences, USA
CASY Cell Counter	Model TTC	Schärfe System GmbH, D
Sicherheitswerkbank	Safe 2020 1.5	Thermo Fisher Scientific GmbH, USA
CO2-Brutschrank	Typ INC 108	Memmert GmbH +Co.KG, D
Kühlzentrifuge Heraeus	Megafuge 40 R	Heraeus GmbH, D
Tischkühlzentrifuge Sigma	Sigma 1-14K	Sigma Laborzentrifugen GmbH, D
Mikrotiterplatten-Photometer	Multiskan FC	Thermo Fisher Scientific Inc., USA"
Low Volume Sampler	LVS3	Sven Leckel Ingenieur Büro GmbH, D
Zahnbürste Oral B,		Braun GmbH, D
Pipetten	Eppendorf Reference, variabel	Eppendorf, D
Insight HB	Hemoglobin Testing System,	ACON Laboratories, Inc., USA"
Axio Vert A1, Inverses	Inverses Durchlichtmikroskop Kamera: AxioCamMR3	Fa. Zeiss, D
Schüttler	UNIMAX 1010 Schüttelfrequenz 30 – 500 1/min	Heidolph, D
OSRAM Germicidal	PURITEC HNS 15W UV-Lampe	Osram, D

3.1.3 Kits

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
BD Cytometric Bead Array (CBA)	Human Inflammatory Cytokine Kit (IL-8, IL-6, IL-1beta, TNF-alpha, IL-10, IL-12p70); Details laut Hersteller vertraulich	BD Biosciences, USA
BD Cytometric Bead Array (CBA)	Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (IL-2, IL-4, IFN-gamma, IL-6, IL-10, TNF-alpha, IL-17a); Details laut Hersteller vertraulich	BD Biosciences, USA
Pierce LAL	Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit	Thermo Scientific, USA
LEGENDplex™ Multi-Analyte Flow Assay Kit	Human Fibronolysis Panel (5-plex) Antithrombin, Plasmin(ogen), Fibrinogen, Prothrombin, Factor XIII	BioLegend, USA

3.1.4 Software

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
BD FACSDiva	FACS Acquisition & Analysis v. 6.1.3 Software	BD Biosciences, USA
Legendplex Software	FCAP Array™ v3 Data Analysis & Acquisition software	Biolegend, USA
Graph Pad Prism 8	Statistiksoftware	Graphpad Software, Inc, USA

3.1.5 Reagenzien

Bezeichnung	Beschreibung	Herstellung
Concanavalin A	Concanavalin aus <i>Canavalia ensiformis</i>) Typ IV-S, lyophilisiertes Pulver, aseptische Aufbereitung	Sigma-Aldrich, USA
Very low Endotoxin Medium	Rosswell Park Memorial Institute 1640 Medium (VLE-RPMI 1640 Medium)	Biochrom GmbH, D
Lipopolysaccharid (LPS) aus E. coli, 1mg/ml	Serotype O111:B4,	Enzo Life Sciences AG, CH
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , low endotoxin	Biochrom GmbH, D
PM₁₀-Suspension	Suspension aus gepooltem Großstadthintergrundstaub, Zubereitung siehe Kapitel 3.2.1	Umweltmedizinisches Labor, Fachgebiet II 1.5, Umweltbundesamt Berlin, D

3.2 Methoden

3.2.1 Sammlung von PM₁₀ und Herstellung der PM₁₀-Suspension

Das *KleinfILTERGERÄT LVS3* der Firma SL wurde mit einem Probenahmekopf für die Sammlung von PM₁₀ bestückt und auf dem Mitarbeiterparkplatz des Umweltbundesamtes, Dienstsitz Corrensplatz, in Berlin-Dahlem, Deutschland positioniert. Es wurden *Membranfilter Zefluor*, der Porengröße 1µm eingesetzt und nach einer Laufzeit von ca. 21h bis 160h gerätebedingt gewechselt. Entsprechende der Porengröße 1µm wurde die Staubfraktion PM₁₀ gesammelt. Der Zeitpunkt der Probenahme erstreckte sich von Juli 2013 bis Dezember 2017. Direkt nach Ende der Probenahme wurden die PM₁₀-beladenen Membranfilter bei – 20 Grad Celsius eingelagert. Um für die weiteren Experimente eine homogene PM₁₀-Suspension zu erhalten, wurden die Stäube gepoolt und homogenisiert. Hierzu wurden die Membranfilter aus der Lagerung in eine sterile Petrischale überführt, mit einer Pinzette am randständigen Kunststoffstützring fixiert (Abbildung 9) und mit einer elektrischen Zahnbürste der *Firma Braun* unter Zugabe von 2ml sterilem PBS abgebürstet. Die erhaltene Suspension wurde in eine neue Petrischale überführt und mit dem nächsten Membranfilter analog verfahren.

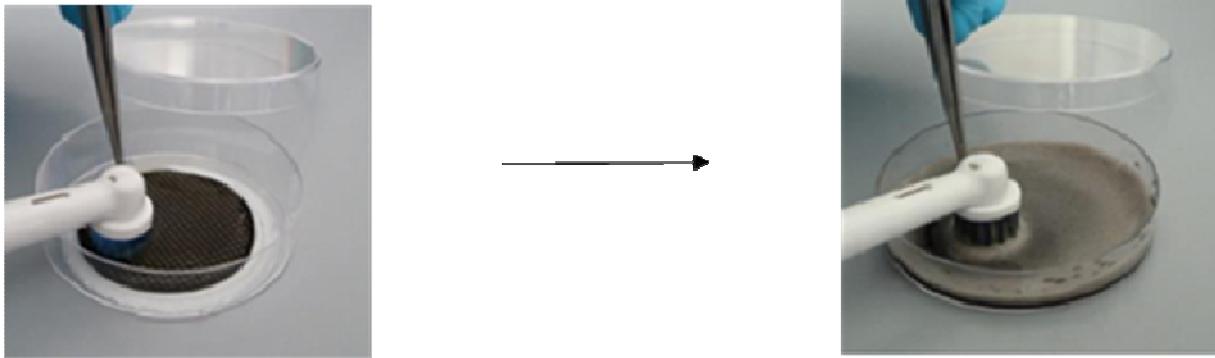


Abbildung 9: Gewinnung der PM₁₀-Suspension.

Der Membranfilter wird mit einer elektrischen Zahnbürste behandelt und die Partikel hierdurch in zugegebenem sterilem PBS gelöst und so in eine Suspension überführt.

3.2.2 Bestimmung der Partikelkonzentration mit dem CASY

Zur Bestimmung der Partikelanzahl und Größe wurde die PM₁₀-Suspension mit dem CASY Cell Counter Model TTC untersucht. 1. Ein CASYcup wurde mit 10ml CASY ton befüllt, die zu untersuchende Suspension zugegeben, die Probe dreimalig gekippt und unter Vermeidung von Blasenbildung in eine 45µm Messkapillare überführt. Die Messung und Analyse der Messergebnisse erfolgte mit der geräteeigenen Software. Nach Bestimmung der Konzentration (particles/ml) wurde die Stammlösung der PM₁₀-Suspension so in PBS (steril) verdünnt, dass die Konzentrationen 1×10^6 vorlag. Diese Aliquots wurden bei – 20 Grad Celsius gelagert.

3.2.3 Bestimmung des Endotoxingehalts in der PM₁₀-Suspension mit dem LAL-Test

Um bei der Auswertung der sich anschließenden Zytokinmessungen mögliche Endotoxinwirkungen der PM₁₀-Suspension auf die Stimulationstests des Heparinvollbluts bewerten zu können, wurde der *Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit* der Firma Pierce durchgeführt. Im Assay katalysiert Endotoxin Gram-negativer Bakterien ein Proenzym des Lumulus Amebocyte Lysate (LAL), welches wiederum proportional zur enthaltenen Endotoxinkonzentration ein chromogenes Substrat aktiviert. Die Korrelation der photometrisch zu messenden Absorbance ist linear zur Endotoxinkonzentration. Durch Anfertigung einer Standardkurve kann diese quantifiziert. Es wurden strikt die Herstellerangaben zur Durchführung des Kits befolgt.

3.2.4 Stimulationstest mit Heparinvollblut

Vollblut von gesunden Probanden und Patienten Pankreaskarzinom (Beschreibung der Studienpopulation siehe unten) wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen mit PM₁₀-Suspension inkubiert (bei 37.0 Grad C°, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit in CO₂-Brutschrank Typ INC 10 Memmert). Ziel war die Bestimmung von Entzündungsmarkern und

Gerinnungsfaktoren im Überstand nach 4h und nach 20h. Es wurde die PM₁₀-Konzentration 1×10^6 particles/ml eingesetzt. Ein Teil der PM₁₀-Suspensionen wurde vor Inkubation 2h mit UV-Strahlung (OSRAM Germicidal PURITEC HNS 15W) unter der Sterilbank mikrobiologisch inaktiviert, um einerseits bei Inkubation über 20 h einen bakteriellen Überwuchs zu verhindern und um andererseits mögliche Endotoxineffekte im Vergleich von nicht UV-behandeltem Staub untersuchen zu können. Als Positivkontrollen dienten Lipopolysaccharid (LPS) von E. coli, Firma Enzo Life Sciences und Concanavalin A, (ConA) Sigma-Aldrich. LPS wurde in einer Konzentration von 500 pg/ml, ConA mit 100 µg/ml eingesetzt. ConA ist als zusätzliche Positivkontrolle für die T-Zellzytokine IL-2, IFN-gamma und IL-10 benutzt worden, da es in seiner Eigenschaft als Lektin Rückschlüsse auf eine effiziente Antigenpräsentation und somit Immunkompetenz im Arm der erworbenen Immunität zulässt.

Versuchsaufbau/-ablauf

Die folgenden Arbeitsschritte wurden in der Sterilwerkbank unter Beachtung steriler Arbeitsweise und mit pyrogenfreien Materialien durchgeführt. Steriles Zellkulturmedium (RPMI/Glut, very low Endotoxin) wurde in 15ml Falcon-Tubes (FALCON 15 ml Polystyrene Round-Bottom steril, pyrogenfrei) vorgelegt, 150 µl PM₁₀-Suspension der Endkonzentration 1×10^6 unter Nachspülen der Pipettenspitzen zugegeben (analog hierzu LPS, ConA und PBS als Negativkontrolle). Anschließend wurden 250µl Vollblut aus Heparin-Röhrchen überführt und das Falcon-Tube nach Blutzugabe vorsichtig 4-5 Mal gekippt, bis die Blutzellen sich homogen in vorgelegter Lösung verteilt haben. Inkubation der Falcon-Tubes verschlossen, senkrecht im Brutschrank bei 37° Celsius, 5 % CO₂ und 95% rel. Luftfeuchte für 4h und 20h. Im nächsten Schritt wurden die Proben der Vollblutinkubation aus dem Inkubator entnommen, vorsichtig mehrfach durchmischt und 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden bei -20° C gelagert.

3.2.5 Auswahl und Rekrutierung der Patienten

Für die Gruppe der Pankreaskarzinompatienten wurden Patienten an der Hämatologisch-Onkologischen Hochschulambulanz der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Med. Klinik m. S. Hämatologie und Onkologie, Campus Virchowklinikum zwischen November 2017 und Juni 2018 aufgesucht. Es existiert ein Ethikvotum (Nummer EA1/148/17) bewilligt durch den Ausschuss der Ethikkommission CCM Charité – Universitätsmedizin Berlin. Alle teilnehmenden Patienten wurden aufgeklärt und stimmten der Nutzung ihrer Daten zu Studienzwecken zu. Alle teilnehmenden Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Abnahme von 10 ml Blut (*Li-Heparin-Röhrchen Vacutainer, BD*) entweder im metastasierten oder lokal

fortgeschrittenen Stadium ihrer Tumorerkrankung. Sie verfügten über mindestens 100 Thrombozyten/nl und 3,57 Leukozyten/nl. Die Blutentnahme erfolgte über einen *in situ* befindlichen venösen Port-Katheter. Die Blutproben wurden bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt innerhalb maximal 60 min in das Labor verbracht.

Patient	Chemotherapie	VTE	Stadium	Antikoagulation	Leukozyten/nl
1	Gemcitabin + nab-Paclitaxel	nein	metastasiert	nein	5.05
2	Gemcitabin	nein	metastasiert	nein	5.65
3	Gemcitabin + nab-Paclitaxel	nein	metastasiert	nein	3.98
4	Gemcitabin + nab-Paclitaxel	TVT	metastasiert	Apixaban	7.63
5	Gemcitabin + nab-Paclitaxel	BVT	metastasiert	Rivaroxaban	7.3
6	Gemcitabin	VPT	metastasiert	nein	6.97
7	5-Fluorouracil + Folinsäure + Oxaliplatin	LAE	fortgeschritten	NMH	5.44
8	Gemcitabin + nab-Paclitaxel	nein	metastasiert	Edoxaban	5.29
9	5-Fluorouracil + Folinsäure + Oxaliplatin	nein	metastasiert	nein	9.97
10	Gemcitabin + nab-Paclitaxel	nein	metastasiert	Marcumar	7.23
11	Gemcitabin + nab-Paclitaxel	nein	metastasiert	nein	13.08
12	Gemcitabin + nab-Paclitaxel	nein	metastasiert	nein	3.57

Tabelle 3: Charakterisierung der in die Studie eingeschlossenen Patienten.

Angegeben sind das letzte Chemotherapieregime, stattgehabte venöse Thromboembolien (VTE) mit TVT (tiefe Venenthrombose Unterschenkel), BVT (Beckenvenenthrombose), VPT (Thrombose der Vena portae, LAE (Lungenarterienembolie), das Krankheitsstadium, Art der Antikoagulation und die Leukozyten bestimmt aus EDTA-Blut.

3.2.6 Auswahl und Rekrutierung der gesunden Probanden

Für die Gruppe der gesunden Probanden wurde aus dem Mitarbeiterkreis des Umweltbundesamts, Dienstsitz Corrensplatz Berlin auf Basis eines separaten Ethikvotums

rekrutiert. Alle Probanden wurden aufgeklärt und stimmten der Nutzung ihrer Daten zu Studienzwecken zu. Es wurden nur Probanden eingeschlossen, bei denen anamnestisch keine aktive Tumorerkrankung vorlag. Die Entnahme von 10 ml Blut erfolgte wie bei der Patientengruppe in *Li-Heparin-Rö. Vacutainer*, des Herstellers *BD* über die Punktion einer peripheren Vene am Unterarm unter Vermeidung längerer Stauungszeiten.

Parameter	Gesunde Probanden	Patienten
Alter	45 ± 10,5	69 ± 6,0
Geschlecht	4-M/9-W	8-M/4-W
Hämoglobin g/dl	15,1 ± 1,35	11,49 ± 1,5

Tabelle 4: Beschreibung der beiden Studienpopulationen.

Dargestellt sind jeweils das arithmetische Mittel (Durchschnitt) und die Standardabweichung (in Jahren für das Alter und in g/dl für die Hämoglobinkonzentration). Das Geschlecht wird in absoluten Zahlen angegeben, M = männlich, W = weiblich.

3.2.7 Zytokinmessungen mit Cytometric Bead Array (CBA)-Technologie

Mit dem *Cytometric Bead Array (CBA)*-des Herstellers *BD* wurden unter Verwendung des *Human Inflammatory Cytokine Kit* in den Überständen der Vollblutkulturen (siehe 2.1.4) die löslichen Immunmediatoren (Zytokine) Interleukin-12 p70 (IL-12 p70), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1beta (IL-1β) und Interleukin-8 (IL-8) quantifiziert. Die löslichen Immunmediatoren von Interesse wurden mittels spezifischer monoklonaler Antikörper an Beads definierter Größe und Fluoreszenzmarkierung gebunden (sogenannte Capture-Beads). Anschließend wurden sie mittels fluoreszierender Detektions-Antikörper markiert und durchflusszytometrisch gemessen (FACS Fluorescence activated cell sorting). Mit der *FACSDiva™ 6.1.3 Software* erfolgte die Datenerfassung am Durchflusszytometer *FACSCanto II, 3-laser, 8-color (4-2-2)*. Durch Mitführung einer Standardverdünnungsreihe erfolgte die Umrechnung der Fluoreszenzintensitäten in entsprechende Zytokinkonzentrationen. Die Testauswertung erfolgte mit der *FCAP Array™ Software*. Der Kit wurde unter strikter Einhaltung der Herstellervorgaben bearbeitet und ausschließlich Reagenzien des Kits verwendet. Kurz zusammengefasst wurde wie folgt vorgegangen:

Nach Ansetzen der seriellen Standardverdünnungsreihe mit lyophilisiertem Standard und Mischen der 6 Capture Bead-Lösungen zu einer Stammsuspension, wurde das Probenmaterial hinzugefügt. Mit den Proben aus der Standardverdünnungsreihe wurde analog verfahren.

Anschließend erfolgte die Zugabe der vorgegebenen Menge an *PE Detection Reagent* pro Messansatz. Nach gründlicher Resuspension wurden die Ansätze 3h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit mitgeliefertem Waschpuffer und Zentrifugation des Beadpeletts. Das wiederum in Waschpuffer gelöste Beadpellet wurde zur Messung mit *FACSDiva™ 6.1.3 Software* am Durchflusszytometer *FACSCanto II* verwendet. Mit dem *Human Inflammatory Cytokine Kit* wurden ausschließlich Proben aus den Überständen analysiert, die 4h inkubiert worden sind, weil diese Zytokine in diesem Zeitfenster erfahrungsgemäß zu erwarten sind.

T-Zell-Zytokine benötigen länger, bis sie im Überstand einer Vollblutkultur gemessen werden können. Aus diesem Grund wurde das *CBA Human Th1/Th2/Th17 Kit* des gleichen Herstellers (BD) genutzt, um die Proben aus den Überständen zu analysieren, die 20h inkubiert worden sind. Hiermit wurden die Zytokine Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-4 (IL-4), Interferon-gamma (IFN-gamma), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10), Tumornekrosefaktor- alpha (TNF-alpha) und Interleukin-17A (IL-17A) unter Verwendung der entsprechenden monoklonalen Antikörper gemessen. Nach 20h Inkubation der Vollblutkulturen stellten wir in Vorexperimenten deutlich mehr Zelldebris fest als nach 4h. Im Zuge der Optimierung der Messqualität fügten wir vor der Messung und Resuspension des Beadpellets bei Bearbeitung des *CBA Human Th1/Th2/Th17 Kit* zwei zusätzliche Zentrifugationsschritte ein. Nach dem zweiten Waschschriff wurde das Beadpellet nochmal resuspendiert und fraktioniert 1 x 5 min bei 1500 rpm und direkt im Anschluss 1 x 5min bei 2000 rpm zentrifugiert und ein letztes Mal resuspendiert.

3.2.8 Messung von Gerinnungsfaktoren mit Multiplex Bead Array-Technologie

Zur Messung der Gerinnungsfaktoren Fibrinogen, Antithrombin, Plasminogen/Plasmin, Prothrombin und Faktor VIII wurde das *Legendplex Kit Human Fibrinolysis Panel* des Herstellers *BioLegend* verwendet. Er basiert auch dem gleichen molekularbiologischen Prinzip wie der in 2.1.6 beschriebene CBA Kit. Zur Messung wurden das gleiche Durchflusszytometer und die gleiche Software benutzt. Die Testauswertung erfolgte mit der vom Hersteller lizenzierten Software *LEGENDplex v.8.0*. Wir folgten bei der Durchführung des Kits weitgehend den Herstellervorgaben. Es wurde eine Standardreihe angefertigt, eine Pufferlösung in 96 well Platte vorgelegt, die 1:500 verdünnten Proben aus den Vollblutstimulationen mit 4h Inkubationsdauer zugefügt und die bei Lieferung bereits gemischten Beads (*Human Fibrinolysis Panel Premixed Beads*) hinzugegeben. Abweichend vom Herstellerprotokoll folgte ein Inkubationsschritt lichtgeschützt über Nacht (17 h) bei 4 Grad C ° auf dem Schüttler bei 500 rpm. Anschließend wurde die 96 well Platte bei 1100 rpm

für 5 min zentrifugiert und der Überstand mit einer einmaligen Bewegung verworfen. Anschließend wurde ohne die Platte zu drehen, die überflüssige Flüssigkeit kurz auf einem sauberen Papiertuch, ablaufen gelassen, um das labile Pellet nicht zu gefährden. Es folgten zwei Wasch- und Zentrifugationsschritte mit Waschpuffer des Herstellers. Im nächsten Schritt wurde der Detektionsantikörper zum Pellet gegeben, für 60 min bei Raumtemperatur bei 500 rpm auf dem Schüttler inkubiert und ohne weiteren Waschschrift die Lösung mit Streptavidin-Phycoerythrin (PE) zugegeben. Nach erneuter Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler bei 500 rpm und Zentrifugation folgten zwei weitere Waschschriffe und Resuspension des Pellets in 200 µl Waschpuffer. Die resuspendierten Pellets konnten dann zur Messung in Matrix Tubes überführt werden. Nach Anpassung der entsprechenden Einstellungen in der Software des Durchflusszytometers, erfolgte die Messung von mindestens 3000 Beads pro Probe.

3.2.9 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde die Prism 8 Graphpad Software benutzt (siehe oben). Es kam für alle Analysen, bei denen die Gruppe der Patienten mit Pankreaskarzinom mit der gesunden Kontrollgruppe verglichen wurde, der Man-Whitney-U-Test auf Signifikanz zum Einsatz. Es handelt sich um einen nichtparametrischen Test zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben. Es wurden Signifikanzniveaux zwischen $p < 0.01$ bis $p < 0.05$ gewählt, die jeweils in den Abbildungstexten benannt werden.

Beim Vergleich der proinflammatorischen Wirkung der UV-behandelten versus der nicht-behandelten PM₁₀-Suspension innerhalb der Gruppe der Patienten mit Pankreaskarzinom, wurde der Wilcoxon matched-pairs-Test auf Signifikanz eingesetzt. Dieser nichtparametrische Test prüft zwei gepaarte Stichproben hinsichtlich ihrer Gleichheit der verbundenen Grundgesamtheiten. Das bedeutet, dass durch die Anwendung des Tests zwei identische Blutproben eines Patienten mit unterschiedlicher PM₁₀-Suspension stimuliert wurden und die gemessenen Werte gepaart in die Grundgesamtheit aller analysierten Blutproben innerhalb der Gruppe der Patienten mit Pankreaskarzinom einfließen.

Zur Darstellung kommt in jeder statistisch ausgewerteten Abbildung eine vertikale Box-Whisker-Plot Darstellung. Innerhalb der Box liegen 50% der erhobenen Messwerte. Daraus folgt, je länger die Box, desto größer die Streuung um den Median, der $n =$ Zahl der Messwerte in jeweils 50% oberhalb und unterhalb des Medians aufteilt. Die Whiskers (engl. „Antennen“) der Box-Whisker-Plot Darstellung wurden benutzt, um den jeweils kleinsten

(Whisker unterhalb des Medians) und größten (Whisker oberhalb des Medians) Messwert im Datensatz zu präsentieren.

Ziel der für diese Arbeit gewählten Darstellung der statistischen Auswertung ist, auf derselben Skala unter Berücksichtigung der Streuung um den Median einen Vergleich zwischen den beiden Datensätzen zu ermöglichen.

4. Ergebnisse

4.1 Proinflammatorische Zytokine in Heparinvollblut nach 4h Stimulation mit UV-behandelter PM₁₀-Suspension

Aus Vorarbeiten von Wissenschaftlern (Bossmann, Bach et al. 2016) des Umweltbundesamtes ist bekannt, dass PM₁₀ eine proinflammatorische Immunantwort induzieren kann. In der vorliegenden Studie sollte untersucht werden, ob Patienten mit Pankreaskarzinom stärker proinflammatorisch auf PM₁₀-Exposition reagieren als gesunde Probanden.

Es wurde für alle Stimulationsexperimente mit Heparinvollblut die gleiche PM₁₀-Suspension der Konzentration 10⁶ particles/ml eingesetzt und als Positivkontrolle LPS benutzt. PBS diente als Negativkontrolle. Der Versuchsablauf ist in Kapitel 3.2.7 ausführlich beschrieben. Untersucht wurden die entsprechenden Überstände nach 4h Inkubation des Heparinvollbluts mittels CBA-Technologie unter Verwendung des *Human Inflammatory Cytokine Kit* von BD. Weder in den Ansätzen des Heparinvollbluts, die mit LPS stimuliert wurden, noch in den Ansätzen, die mit der PM₁₀-Suspension stimuliert wurden, konnte nach 4h IL-10 oder IL-12p70 nachgewiesen werden.

IL-8 jedoch (Abbildung 10a) wurde in der Gruppe der Patienten mit Pankreaskarzinom nach Stimulation mit UV-behandelter PM₁₀-Suspension signifikant ($p = 0.02$, Man-Whitney -U - Test) stärker exprimiert als in der Gruppe der gesunden Probanden. In der Gruppe der Patienten fällt eine deutlich größere Streuung sowohl im oberen und unteren Quartil um den Median, als auch oberhalb der 75. Perzentilen und unterhalb der 25. Perzentilen auf. Im Gegensatz hierzu weist die Gruppe der gesunden Probanden eine sehr geringe Streuung auf. Gemessen am Median liegt die Konzentration von IL-8 bei den Patienten mit Pankreaskarzinom bei 1712 pg/ml, bei den gesunden Probanden liegt der Median nur bei 938 pg/ml. In den Negativkontrollen mit PBS sind kaum messbare Konzentrationen an IL-8 nachweisbar gewesen. Auch IL-6 ist in der Gruppe der Patienten mit Pankreaskarzinom in signifikant höherer Konzentration messbar als in der Gruppe der gesunden Probanden. Wie im Fall von IL-8 ist die Streuung in der Gruppe der Patienten deutlich größer. Bei den gesunden Probanden findet sich der Median am untersten Ende der Box, d. h. die Streuung zwischen der 25. Perzentilen und dem Median ist deutlich geringer. Der Median bei den gesunden Probanden liegt bei 211 pg/ml, der Median der Patienten mit Pankreaskarzinom ist doppelt so hoch und liegt bei 397 pg/ml. Auch im Fall von IL-6 führt PBS in der Negativkontrolle nur zu minimalen IL-6-Konzentrationen.

Zusammenfassend kann für IL-8 und IL-6 gesagt werden, dass die Zytokinantwort von Patienten mit Pankreaskarzinom nach Stimulation mit einer PM₁₀-Suspension *in vitro* signifikant stärker, nämlich fast doppelt so stark ist als in einer Gruppe gesunder Probanden, bei denen keine aktive Tumorerkrankung bekannt ist.

Bei der Betrachtung der Messwerte von TNF-alpha (Abbildung 10c) fällt auf, dass ähnlich wie bei IL-6 und IL-8 die Streuung um den Median und auch die Extrema bei den gesunden Probanden deutlich kleiner sind als bei den Patienten mit Pankreaskarzinom. Der Median liegt mit 279 pg/ml bei den Patienten höher als bei den gesunden Probanden mit 222 pg/ml. Die Negativkontrollen mit PBS liegen in beiden Gruppen im kaum messbaren Bereich. IL-1beta (Abbildung 10d) wurde in beiden Gruppen in sehr niedrigen Konzentrationen sezerniert. Die Streuung der Messwerte war sowohl bei den Patienten mit Pankreaskarzinom als auch den gesunden Kontrollen groß, während sich der Median ähnelte. Er lag bei den Patienten bei 10 pg/ml und bei den gesunden Probanden bei 7.8 pg/ml. Interessanterweise gab es für IL-1beta in den Vollblutüberständen der Patienten auch welche, die überhaupt kein Zytokin produzierten. In der Gruppe der gesunden Probanden hingegen konnten als einziges der untersuchten Zytokine auch in den Negativkontrollen, die mit PBS stimuliert wurden, IL1-beta-Konzentrationen gemessen werden, die in der gleichen Größenordnung wie die gemessenen Konzentrationen nach Stimulation mit PM₁₀-Suspension lagen.

Zusammengefasst deutet dies auf eine Messung unspezifischer Hintergrundexpression von IL1-beta hin, die auf die kurze Inkubationszeit von 4h zurückzuführen ist und in Kapitel 5 diskutiert werden soll.

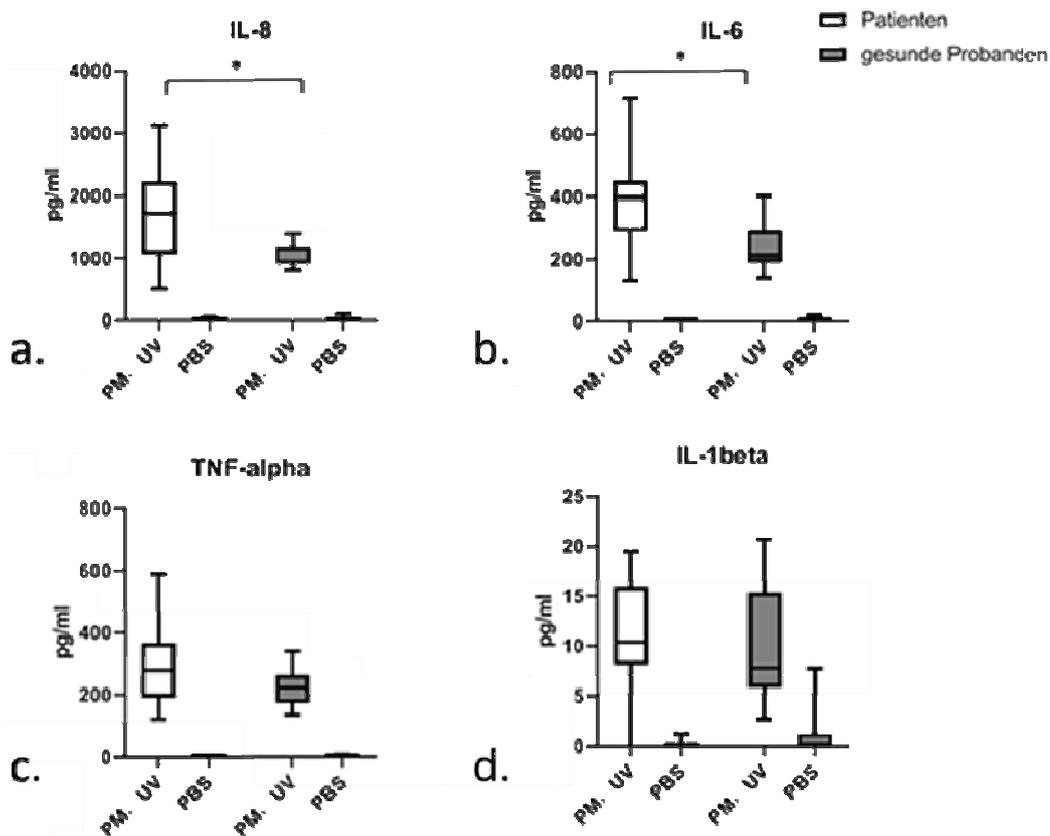


Abbildung 10: Expression von IL-8, IL-6, TNF-alpha und IL-1beta in Heparinvollblut nach Stimulation mit PM_{10} -Suspension für 4h.

Die Ansätze von $n = 12$ gesunden Probanden und $n = 12$ Patienten (Patienten mit Pankreaskarzinom) wurden 4 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5.0% CO_2 im Brutschrank mit UV-behandelten 10^6 particles/ml stimuliert. PBS diente als Negativkontrolle. Im Überstand nach Zentrifugation wurde mittels CBA im Durchflusszytometer die Expression der Zytokine quantitativ bestimmt. Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median, oberes und unteres Quartil innerhalb der Box, Whiskers mit Minimum und Maximum. Man-Whitney-U –Test auf Signifikanz $p = 0.02$.

4.2 Proinflammatorische Zytokine in Heparinvollblut nach 20h Stimulation mit UV-behandelter PM_{10} -Suspension

In Kapitel 4.1 dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Stimulation von Heparinvollblut mit UV-behandelter PM_{10} -Suspension über 4h bei Patienten mit Pankreaskarzinom eine fast doppelt so hohe Sekretion von IL-6 verursacht als bei gesunden Probanden. Es sollte nun überprüft werden, ob auch nach längerer Inkubationszeit Unterschiede nachweisbar sind. In einem analogen Versuchsaufbau und mit Proben aus denselben Blutentnahmen, die für die 4h-Inkubationen benutzt wurden, sind Überstände nach 20 h Inkubation abgenommen worden. Es wurde ebenfalls mit CBA-Technologie unter Nutzung des *Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* von BD IL-6 und TNF-alpha gemessen. Abbildung 11a zeigt deutlich, dass die

Konzentration von IL-6 in beiden Gruppen nach 20h deutlich höher ist als nach 4h. Bei den Pankreaskarzinompatienten hat sich der Median um das 6.5-fache von 397 pg/ml auf 2567 pg/ml erhöht. Auch bei den gesunden Probanden kam es zu einer massiven, fast 10-fachen Steigerung der proinflammatorischen Antwort in Form von IL-6 (im Median von 211 pg/ml auf 2036 pg/ml). Die Streuung vergrößerte sich in beiden Gruppen, bei den gesunden Probanden jedoch in weit größerem Ausmaß. Obwohl die Mediane, verglichen mit der Situation nach 4h Inkubation, sich annähern, ist bei Betrachtung des oberen und des unteren Quartils der Gruppe der gesunden Probanden offensichtlich, dass 75% der untersuchten Blutproben unterhalb des Medians der Gruppe der Pankreaskarzinompatienten liegen. Im großen Unterschied zu IL-6 ist die Konzentration an TNF-alpha (Abbildung 11b) in beiden Gruppen nach 20h nur minimal verändert verglichen mit den Konzentrationen nach 4h Inkubation. Bei den gesunden Probanden ist der Median von 222 pg/ml gestiegen auf 240 pg/ml nach 20h, bei den Patienten hingegen von 279 pg/ml gefallen auf 254 pg/ml.

Zusammengefasst liegt nach 20 h verglichen mit 4h Inkubationszeit eine massive Erhöhung der Konzentration von IL-6. Die Konzentration von TNF-alpha dagegen bleibt nach 20h nahezu unverändert verglichen mit 4h Inkubationszeit. PBS diente als Negativkontrolle und war in beiden Gruppen auch nach 20h im kaum messbaren Bereich (Daten nicht gezeigt).

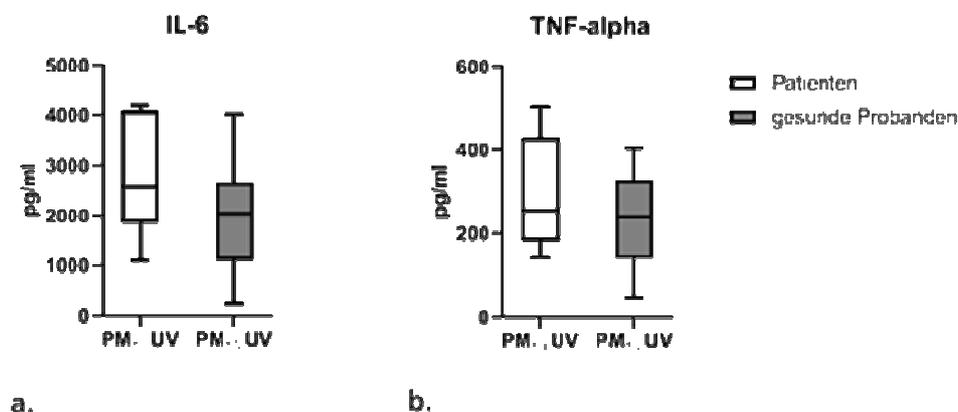


Abbildung 11: Expression von IL-6 und TNF-alpha in Heparinvollblut nach Stimulation mit PM₁₀-Suspension für 20h.

Die Ansätze von n = 12 gesunden Probanden und n = 12 Patienten (Patienten mit Pankreaskarzinom) wurden 20h bei 37 °C und 5.0% CO₂ im Brutschrank mit UV-behandelten 10⁶ particles/ml stimuliert. PBS diente als Negativkontrolle (nicht abgebildet, siehe Text). Im Überstand nach Zentrifugation wurde mittels CBA im Durchflusszytometer die Expression der Zytokine quantitativ bestimmt. Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median, oberes und unteres Quartil innerhalb der Box, Whiskern mit Minimum und Maximum.

4.3 T-Zell Zytokine IL-2, IL-10 und IFN-gamma in Heparinvollblut nach 20 h Stimulation mit UV-behandelter PM₁₀-Suspension

In einem nächsten Schritt sollte der Frage nachgegangen werden, ob neben der angeborenen Immunität, repräsentiert durch die Zytokine IL-6, IL-8, TNF-alpha und IL1-beta auch der adaptive Arm des Immunsystems durch die verwendete PM₁₀-Suspension, repräsentiert durch klassische T-Zellzytokine wie IL-2, IFN-gamma und IL-4, aktiviert wird. Zusätzlich wurde IL-10 gemessen, dem auch und gerade als T-Zellzytokin eine regulative Funktion in der Kontrolle und Begrenzung einer Immunantwort zukommt (Ng, Britton et al. 2013). Die Versuche wurden in 20 h-Inkubationsansätzen durchgeführt und die Überstände aus den Heparinvollblutstimulationen analog zu der Vorgehensweise für die 4h-Inkubationen bearbeitet. Zur Messung der Zytokine IL-2, IFN-gamma, IL-4 und IL-10 wurde das *Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit von BD* benutzt. Die Ergebnisse für IL-6 und TNF-alpha wurden im vorherigen Kapitel 4.2 vorgestellt. Aus technischen Gründen, die trotz intensiver Kommunikation und Konsultation des Herstellers nicht gelöst werden konnten, existieren keine Ergebnisse für das Zytokin IL-17. Für IL-4 wurden sowohl nach Stimulation mit PM₁₀-Suspension als auch durch die Positivkontrolle ConA ausschließlich kaum messbar niedrige Konzentrationen gemessen (Daten nicht abgebildet).

In Abbildung 12a sind die Konzentrationen des Th-1-Zytokins IFN-gamma nach 20h Stimulation dargestellt. Nach Stimulation mit PM₁₀-Suspension konnte in der Gruppe der Patienten mit Pankreaskarzinom keinerlei IFN-gamma gemessen werden. Bei den gesunden Probanden ergab sich ein Median von 7.69 pg/ml, was einer schwachen Expression entspricht. Die Negativkontrolle PBS ergab bei den Pankreaskarzinompatienten keinerlei messbare Konzentration, in der Gruppe der gesunden Probanden jedoch ist eine IFN-gamma-Konzentration von 5.2 pg/ml messbar gewesen, die sich somit kaum von der Konzentration nach Stimulation mit PM₁₀-Suspension unterschied. Die Positivkontrolle ConA welches als Lektin ein potenter T-Zellaktivator ist (Palacios 1982), induzierte in gesunden Probanden eine signifikant stärkere IFN-gamma-Antwort als in den Patienten mit Pankreaskarzinom (P = 0.05, Man-Whitney U-Test). Im Median lag die IFN-gamma Konzentration bei den Patienten bei knapp 36 pg/ml, bei den gesunden Probanden bei 104 pg/ml. Abgesehen von einem Extremwert (600 pg/ml) war die Streuung in der Gruppe eher gering und im oberen und unteren Quartil um den Median gleichverteilt (Abbildung 12a). Für IL-2 als klassischem Vertreter eines Pan-T-Zellzytokins ist die Immunantwort derjenigen von IFN-gamma sehr ähnlich. Die PM₁₀-Suspension löste keinerlei messbare IL-2-Produktion in der Gruppe der Pankreaskarzinompatienten aus, während bei den gesunden Probanden eine schwache IL-2-

Produktion von im Median 9.9 pg/ml gemessen werden konnte. Nach Stimulation mit ConA wurden bei den Pankreaskarzinompatienten im Median 89 pg/ml IL-2 gemessen. Bis auf einen Minimumwert bei 9.0 pg/ml zeigten alle Patienten eine adäquate Immunantwort auf die Positivkontrolle ConA, was einen Unterschied zum Zytokin IFN-gamma darstellt. Bei diesem wiesen mehrere Patienten eine sehr schwache Sekretion auf. In der Gruppe der gesunden Probanden lag der Median nach ConA-Stimulation mit 145 pg/ml deutlich höher als bei den Pankreaskarzinompatienten.

Zusammengefasst zeigten weder die Patienten noch die gesunden Probanden im in vitro Experiment mit Heparinblut eine nennenswerte Sekretion von IL-2 oder IFN-gamma in Antwort auf PM₁₀-Suspension. Nach Stimulation mit ConA zeigten sich jedoch bei beiden Zytokinen große Unterschiede.

Die Messungen von IL-10 ergaben, dass nach Stimulation mit PM₁₀-Suspension in der Gruppe der Patienten mit Pankreaskarzinom signifikant höhere IL-10-Konzentrationen (Median 29 pg/ml versus 17.5 pg/ml, $p < 0.05$) vorlagen als in der Gruppe der gesunden Probanden. Noch extremer fielen die Unterschiede nach Stimulation mit ConA aus. Überraschenderweise ist hier die Konzentration von IL-10 in der Gruppe der gesunden Probanden hoch signifikant ($p < 0.01$) höher als in der Gruppe der Patienten. (Median 63 pg/ml versus 17 pg/ml). Es ist festzustellen, dass die PM₁₀-Suspension in der Gruppe der Pankreaskarzinompatienten eine deutlich stärkere IL-10-Antwort induzierte als die Positivkontrolle ConA. In der Gruppe der gesunden Probanden ist das Gegenteil der Fall, d. h. ConA induzierte eine fast 4-fach stärkere Sekretion von IL-10 als die PM₁₀-Suspension.

Zusammengefasst ist PM₁₀ in diesem in vitro Ansatz mit Heparinvollblut in der Gruppe der Pankreaskarzinompatienten ein deutlich potenterer Auslöser von IL-10 als im Heparinvollblut gesunder Probanden.

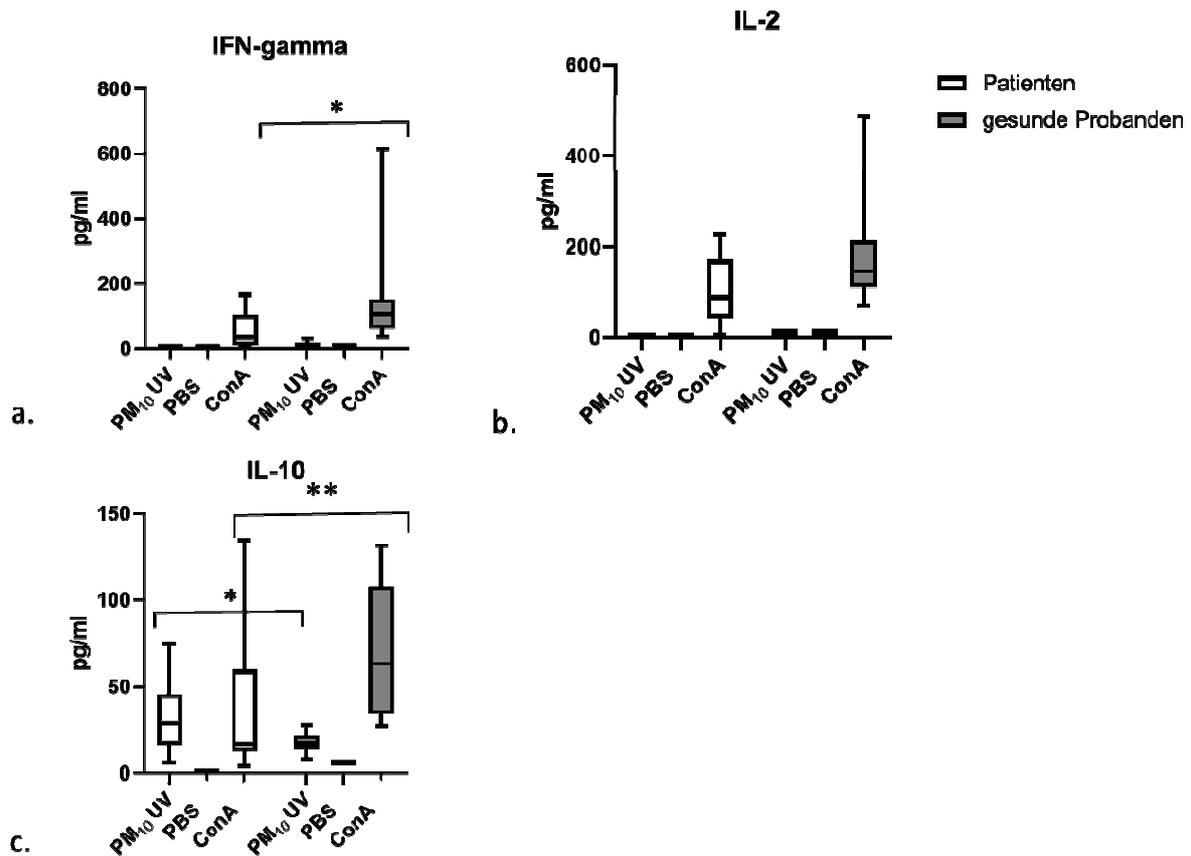


Abbildung 12: Expression von IL-2, IFN-gamma und IL-10 in Heparinvollblut nach Stimulation mit PM₁₀-Suspension für 20h.

Die Ansätze von n = 12 gesunden Probanden und n = 12 Patienten (Patienten mit Pankreaskarzinom) wurden 20h bei 37 °C und 5.0% CO₂ im Brutschrank mit UV-behandelten 10⁶ particles/ml stimuliert. PBS diente als Negativkontrolle, ConA (100µg/ml) als Positivkontrolle. Im Überstand nach Zentrifugation wurde mittels CBA im Durchflusszytometer die Expression der Zytokine quantitativ bestimmt. Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median, oberes und unteres Quartil innerhalb der Box, Whiskern mit Minimum und Maximum. Man-Whitney-U –Test auf Signifikanz p * = 0.05, p** = 0.01.

4.4 Gerinnungsfaktoren Antithrombin, Plasminogen/Plasmin, Prothrombin und Faktor XIII in Heparinvollblut nach 4 h Stimulation mit UV-behandelter PM₁₀-Suspension

Ausgehend von der in der Einleitung skizzierten, physiologisch wie pathophysiologisch gut untersuchten Verknüpfung von Gerinnung und Inflammation, war es Ziel dieser Arbeit neben der Inflammation auch die Konzentration von Gerinnungsfaktoren als Endpunkt zu untersuchen. Es wurde für die gesamte Studie eine gepoolte, identische PM₁₀-Suspension verwendet, um der Heterogenität unterschiedlicher Feinstäube hinsichtlich partikulärer und partikelgebundener Komponenten gerecht zu werden. Unter Verwendung des *Legendplex Kit Human Fibrinolysis Panel* wurden mittels Bead Array, der methodisch analog zur CBA-Technologie aufgebaut ist, die in Abbildung 13 gezeigten Gerinnungsfaktoren Antithrombin, Plasminogen/Plasmin, Prothrombin und Faktor XIII gemessen. Fibrinogen, welches auch im

Panel des Kits enthalten war, lieferte inkonsistente Ergebnisse, so dass diese Daten nicht ausgewertet werden konnten. Es wurden für die Bestimmung der Gerinnungsfaktoren identische Proben benutzt, aus denen auch die Zytokine bestimmt wurden.

Die in Abbildung 13a dargestellten Daten zeigen, dass Antithrombin bei Patienten mit Pankreaskarzinom in den mit PBS inkubierten, d. h. unbehandelten Proben signifikant höher konzentriert vorliegt als bei den gesunden Probanden (Median 12551 ng/ml versus 10030 ng/ml, Man-Whitney-U-Test, $p < 0.01$). Weiter zeigen die Analysen, dass innerhalb der jeweiligen Kohorte „Patienten mit Pankreaskarzinom“ versus „gesunde Probanden“ weder die Stimulation mit PM_{10} -Suspension noch mit LPS die Konzentration von Antithrombin im Vergleich zur Negativkontrolle PBS verändern. Der Median ist jeweils für PM_{10} UV, PBS und LPS innerhalb der Gruppe nahezu gleich, beim Gruppenvergleich jedoch fällt auf, dass bei den gesunden Probanden die Antithrombinkonzentration auf niedrigerem Niveau als in der Gruppe der Patienten mit Pankreaskarzinom vorliegt.

Der verwendete Array kann nicht zwischen Plasmin und Plasminogen unterscheiden, so dass sich Abbildung 13b auf beide Moleküle bezieht. Es fällt auf, dass Plasmin/Plasminogen weder in der Gruppe der Patienten noch in der Gruppe der gesunden Probanden bei Inkubation mit PM_{10} UV, PBS und LPS mehr als nur sehr geringfügige Veränderungen aufwies. Bei PBS und PM_{10} UV lag der Median aller 12 untersuchten Überstände von Proben der Pankreaskarzinompatienten bei ca. 13000 ng/ml, nach Stimulation mit LPS leicht darunter 11260 ng/ml. Die gesunden Probanden wiesen sehr ähnliche Werte im Median (PBS 1170 ng/ml, PM_{10} UV 12454 ng/ml, LPS 12343 ng/ml) auf.

Bei den gemessenen Prothrombinkonzentrationen (Abbildung 13c) gibt es jedoch große Unterschiede zwischen den Gruppen der Patienten und gesunden Probanden. Nach 4 h Inkubation des Heparinbluts mit PBS liegt die Prothrombinkonzentration bei den Pankreaskarzinompatienten im Median bei 7799 ng/ml, bei den gesunden Probanden nur bei 5171 ng/ml. Dieser Unterschied ist statistisch hochsignifikant (Man-Whitney-U-Test $p < 0.01$). Diese Unterschiede bleiben bei Stimulation mit PM_{10} UV bestehen (7181 ng/ml versus 5670 ng/ml), ohne sich zu verändern (siehe Kapitel Diskussion). LPS-Stimulation führte zu einer leichten, statistisch nicht signifikanten Reduzierung der gemessenen Konzentrationen an Prothrombin (Median bei Patienten 6678 ng/ml versus 5549 ng/ml bei gesunden Probanden).

Bei Betrachtung von Abbildung 13d wird auf den ersten Blick deutlich, dass die Faktor XIII-Spiegel nach 4 h Inkubation des Heparinbluts sich sowohl nach Stimulation mit PM_{10} UV als auch mit PBS zwischen den beiden untersuchten Gruppen stark unterscheiden. In den

analysierten Überständen des Heparinbluts der Pankreaskarzinompatienten lassen sich nach Inkubation mit PBS 2675 ng/ml Faktor XIII nachweisen, bei den gesunden Probanden 1907 ng/ml im Median. Dieser Unterschied ist statistisch hochsignifikant (Man-Whitney-U-Test $p < 0.01$). Der Unterschied bleibt, ähnlich wie bei Prothrombin, auch nach Stimulation mit PM_{10} UV bestehen und liegt im Median in der Gruppe der Patienten bei 2264 ng/ml, bei den gesunden Probanden im Median bei 1884 ng/ml (Man-Whitney-U-Test, $p = 0.03$). LPS scheint auf die Faktor XIII-Konzentration kaum einen Einfluss zu haben. Die Werte sind bei den Proben der Pankreaskarzinompatienten im Median bei 2206 ng/ml, also leicht vermindert im Vergleich zum Ansatz mit PBS. In der Gruppe der gesunden Probanden finden sich nach LPS-Stimulation leicht erhöhte Faktor XIII-Konzentrationen (Median 2100 ng/ml).

Zusammengefasst liegen in allen drei Ansätzen (PBS, LPS und PM_{10} UV) die gemessenen Konzentrationen von Faktor XIII, Prothrombin und Antithrombin im Median in der Gruppe der Pankreaskarzinompatienten deutlich über denen der Gruppe der gesunden Probanden. Der Effekt von PM_{10} UV auf die gemessenen Gerinnungsfaktoren ist im Vergleich zur als Negativkontrolle genutzten PBS-Stimulation für Antithrombin und Prothrombin in beiden Gruppen gering. Faktor XIII stellt hier eine Ausnahme dar und ist als einziger in dieser Arbeit untersuchter Gerinnungsfaktor in der Gruppe der Patienten mit Pankreaskarzinom nach PM_{10} -Stimulation im Vergleich mit der Negativkontrolle PBS deutlich erniedrigt.

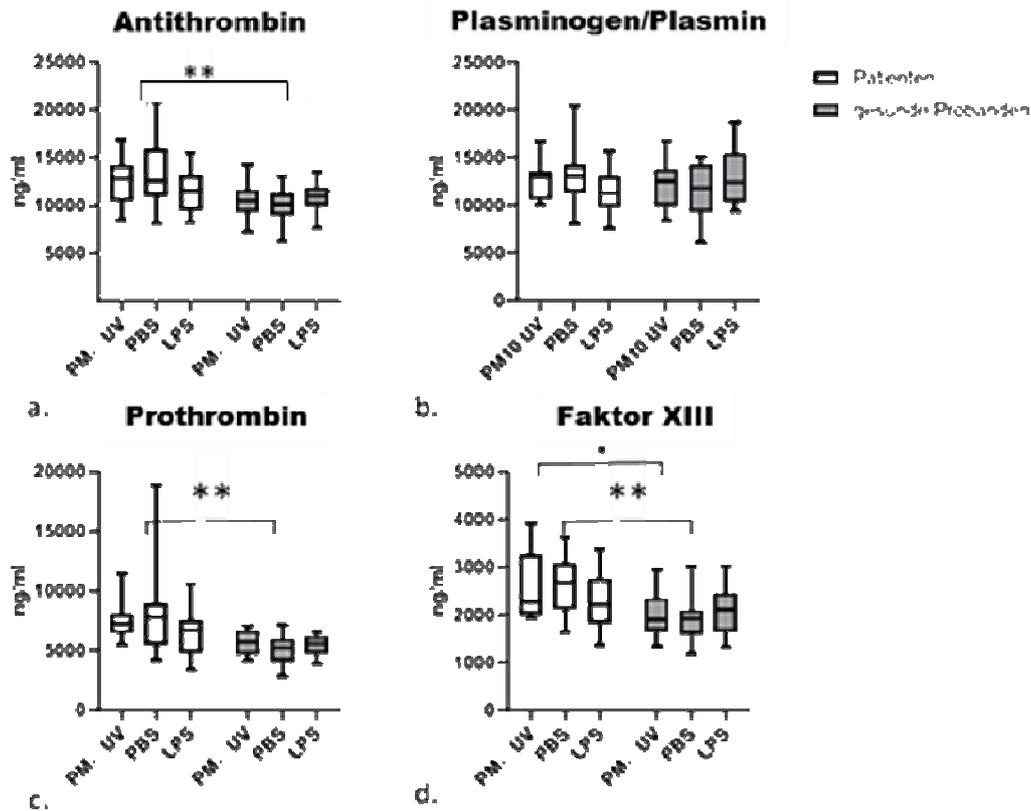


Abbildung 13: Konzentration von Antithrombin, Plasminogen/Plasmin, Prothrombin und Faktor XIII in Heparinvollblut nach Stimulation mit PM₁₀-Suspension für 4h.
 Die Ansätze von n = 13 gesunden Probanden und n = 12 Patienten (Patienten mit Pankreaskarzinom) wurden 4 h bei 37 °C und 5.0% CO₂ im Brutschrank mit UV-behandelten 10⁶ particles/ml stimuliert. PBS diente als Negativkontrolle. Im Überstand nach Zentrifugation wurde mittels CBA im Durchflusszytometer die Konzentration der Gerinnungsfaktoren bestimmt. Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median, oberes und unteres Quartil innerhalb der Box p* = 0.03, p** = 0.01.

4.5 Konzentration und Größenverteilung der Partikel in der PM₁₀-Suspension

Mit dem CASY Cell Counter wurde die gepoolte PM₁₀-Suspension hinsichtlich ihrer absoluten Partikelkonzentration und der vorliegenden Größenverteilung analysiert. Dies war notwendig, da sich die biologische Wirkung der verschiedenen Partikelgrößen unterscheidet (siehe Kapitel 1.6.1 und 1.6.2). Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die zunehmende Partikeloberfläche einer Feinstaubpopulation bei abnehmender Masse, je kleiner ein Partikel ist.

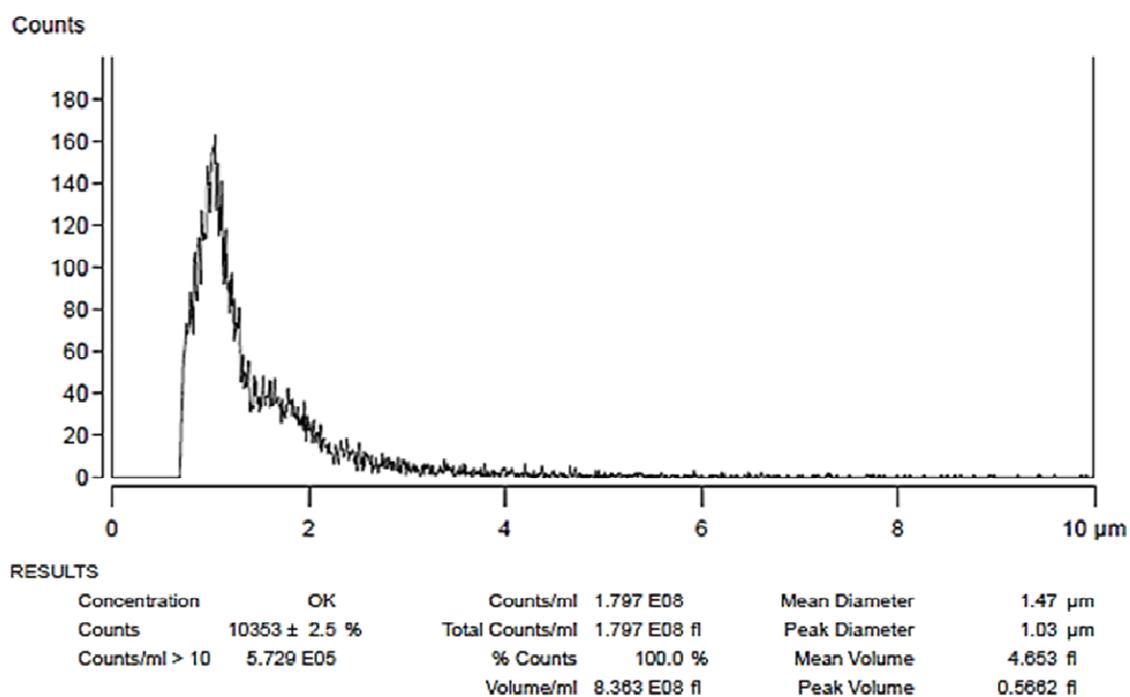


Abbildung 14: Größenverteilung der Partikel in der PM₁₀-Suspension gemessen in CASY Cell Counter. Die Gesamtkonzentration beträgt 1.797×10^8 Partikel/ml. Den größten Anteil stellen Partikel mit der Größe 1.03 µm. Die Durchschnittsgröße der enthaltenen Partikel beträgt 1.47 µm.

Aus Abbildung 14 wird ersichtlich, dass die Partikelfraktion PM_{2.5-1.0} die mit Abstand zahlenreichste Partikelpopulation stellt. Der Cut-off bei 1 µm ist erklärbar durch die Porengröße des bei der Sammlung verwendeten Membranfilters, der Cut-off bei 10 µm durch den verwendeten Probenahmekopf des Sammelgerätes. Im Bereich 2 – 4 µm ist mit zunehmender Größe ein zahlenmäßiger Abfall zu erkennen. Ab ca. 4 µm liegt im erfassten Messbereich bis 10 µm eine konstante Verteilung der Partikel vor, d.h. innerhalb der Partikelfraktion PM₄₋₁₀ ist keine quantitative Dominanz einer einzelnen Partikelfraktion erkennbar. Man kann von einer nahezu linearen Verteilung sprechen. Auffällig ist dagegen der steile Abfall zwischen ca. 1 µm und 1.5 µm.

Zusammengefasst lässt sich in Abbildung 14 eine auf die Gesamtzahl der Partikel bezogene Dominanz der Partikel mit einem Durchmesser $< 2.5 \mu\text{m}$ ausmachen. Innerhalb dieser Population lässt sich eine Teilpopulation abgrenzen, deren Durchmesser im Bereich $1 - 1.5 \mu\text{m}$ liegt.

4.6 Mikroskopische Analyse von Heparinvollblut nach Stimulationstest mit unbehandelter versus UV-behandelte PM₁₀-Suspension

Die Behandlung der PM₁₀-Suspension mit UV-Strahlung (siehe Kapitel 3.2.4) wurde erforderlich, weil makroskopisch bei Inkubation (bei 37.0 Grad C°, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit in CO₂-Brutschrank) ein bakterieller Überwuchs zu sehen war. Das ist zu erwarten gewesen, da beim Sammeln von PM₁₀ in den Kleinfiltergeräten auf einer Membran alle Partikel möglichst mit ihrer nativen Beladung an Umweltbestandteilen und biologisch aktiven Molekülen vorliegen sollen. Dies schließt Bakterien als ubiquitäre Umgebungskeime mit ein. Der bakterielle Überwuchs unter Zellkulturbedingungen im Brutschrank setzte dieser Herangehensweise eine Limitation. In Abbildung 15a ist dargestellt, wie die Zellen des Heparinvollbluts nach 20 h Inkubation mit UV-behandelter, sehr hoch konzentrierter PM₁₀-Suspension ($1 \times 10^7/\text{ml}$) aussahen. Es sind überwiegend viable, helle Zellen und keine Bakterien zu sehen. Abbildung 15b zeigt den Zustand der Zellen, wenn eine identische Probe Heparinvollbluts mit einer identischen Konzentration unbehandelter, PM₁₀-Suspension 20 h inkubiert wurde. Beide PM₁₀-Suspensionen entstammten einer gemeinsam, gepoolten PM₁₀-Stamm suspension (Kapitel 3.2.1). Die unbehandelte PM₁₀-Suspension führte zur Lyse einer sehr großen Anzahl von Zellen. Nur sehr wenige helle, viable Zellen sind zu sehen, dafür aber eine große Anzahl von Mikroben, mutmaßlich Stäbchenbakterien.

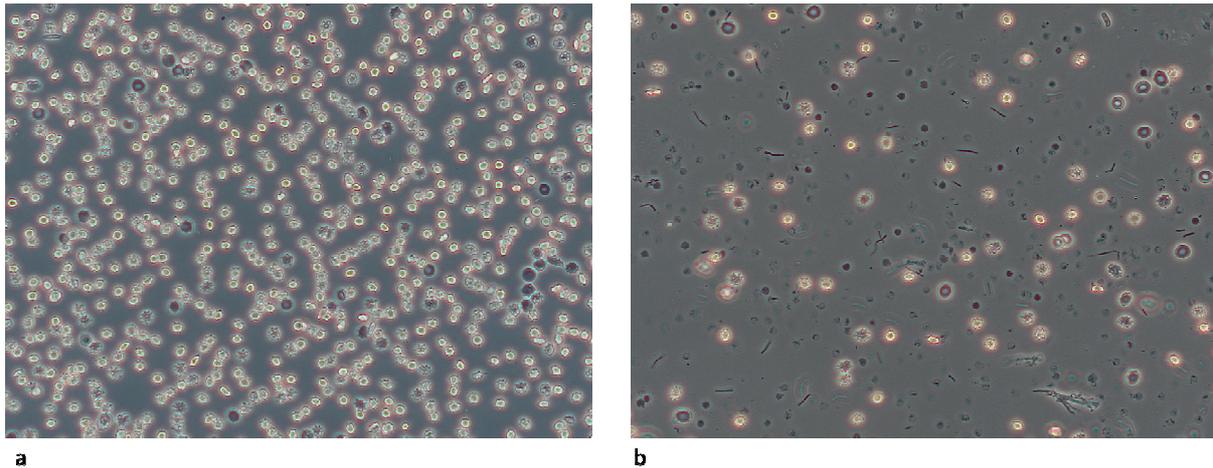


Abbildung 15: Mikroskopische Darstellung der Zellen nach Stimulation von Heparinvollblut für 17 h mit PM_{10} -Suspension (Konzentration $1 \times 10^7/ml$).
a. Zustand der Zellen nach Stimulation mit UV-behandelter PM_{10} -Suspension. b. Zustand der Zellen und mikroskopisch sichtbares Bakterienwachstum nach Stimulation mit unbehandelter PM_{10} -Suspension. Vergrößerung: Objektiv LD a-Plan 40x/0,55 Ph2 entspricht $\times 400$. Inkubationsbedingungen wie beschrieben in Kapitel 3.

Mutmaßlich liegt dem in Abbildung 15 dargestellten Unterschied zwischen Abbildung 15a und Abbildung 15b ein exponentielles, bakterielles Wachstum zugrunde, welches nicht mehr die tatsächliche mikrobielle Belastung in der Umwelt widerspiegelt. Aus diesem Grund wurde entschieden, für diese Arbeit ausschließlich UV-behandelte PM_{10} -Suspension für die Stimulationsexperimente in Heparinvollblut zu verwenden.

4.7 Vergleich des Endotoxingehalts der unbehandelten und UV-behandelten PM_{10} -Suspension mit dem LAL-Test

Es ist bekannt, dass Endotoxin in sehr unterschiedlicher Konzentration in PM_{10} und $PM_{10-2.5}$ enthalten ist (Yoda, Tamura et al. 2017). In den Vorexperimenten zu den Stimulationstests mit Heparinvollblut zeigte sich, dass unter den Inkubationsbedingungen bei 37 Grad C° nach 20 h bakterieller Überwuchs und Hämolyse makroskopisch sichtbar wurden, nicht jedoch bei Inkubation für 4 h (nicht gezeigte Daten). Um eine Inkubation über 20 h zu ermöglichen, wurde die PM_{10} -Suspension mit UV-Strahlung mikrobiologisch inaktiviert (Siehe Kapitel 3.2.4). Damit am Ende der Studie der Anteil von Endotoxinwirkungen an der inflammatorischen und prothrombotischen Potenz der PM_{10} -Suspension besser analysiert werden kann, wurde der Endotoxingehalt mittels LAL-Test quantitativ bestimmt.

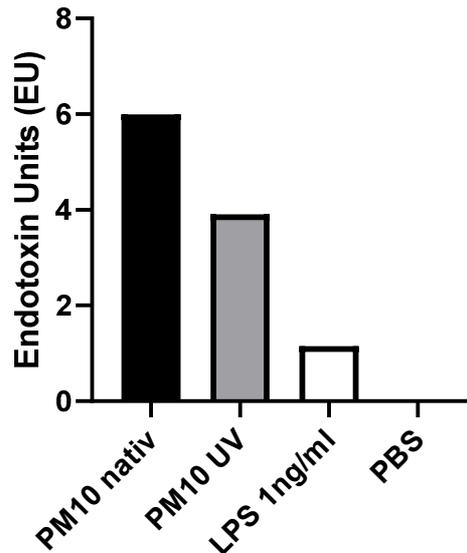


Abbildung 16: LAL-Test zur Bestimmung der Endotoxinkonzentration in der PM₁₀-Suspension.
Legende: PM10 nativ = unbehandelte Probe der für die Stimulationstests im Heparinblut verwendeten PM₁₀-Suspension, PM10 UV = PM₁₀-Suspension nach 2h mikrobiologischer Inaktivierung mit UV-Strahlung, LPS = Lipopolysaccharid (LPS) E. coli, Serotyp O111:B4, PBS (Phosphate Buffered Saline, low endotoxin). Angaben in EU/ml.

In Abbildung 16 wird ersichtlich, dass die UV-Behandlung der PM₁₀-Suspension zu einer Reduktion der LAL-Reaktivität geführt hat. Dies deckt sich mit Angaben in der Fachliteratur (Anderson, Huck et al. 2003). Die LAL-Aktivität gilt als biochemisches, rein quantitatives Maß in der Endotoxinbestimmung und wird in der Einheit EU angegeben. Sie wird genutzt, da verschiedene Endotoxine sich hinsichtlich ihrer Pyrogenität und ihrem Molekulargewicht unterscheiden können. Das in dieser Studie durchgängig verwendete LPS weist in der Konzentration 1 ng/ml eine LAL-Aktivität auf, die ca. einem Sechstel der LAL-Aktivität der unbehandelten PM₁₀-Suspension entspricht. Der in dieser Studie als Negativkontrollen und in den Stimulationstest mit Heparinblut verwendete Puffer (PBS low endotoxin) zeigte keinerlei LAL-Aktivität und ist somit als Negativkontrolle, von der keine proinflammatorische Wirkung ausgeht, geeignet.

4.8 Vergleich der proinflammatorischen Eigenschaften der unbehandelten mit der UV-behandelten PM₁₀-Suspension in Heparinvollblut nach 4h Stimulation

Die UV-Behandlung der PM₁₀-Suspension verringerte den Endotoxingehalt, was im LAL-Test mit der für diese Studie verwendeten PM₁₀-Suspension demonstriert wurde (Kapitel 4.7). Da der LAL-Test jedoch keine direkte Aussagekraft hinsichtlich der Pyrogenität und proinflammatorischen Potenz besitzt, wurde zur weiteren Charakterisierung der UV-

behandelten PM₁₀-Suspension ein direkter Vergleich der unbehandelten, nativen PM₁₀-Suspension und der UV-behandelten PM₁₀-Suspension angestellt. Hierfür wurde analog zu allen anderen Stimulationen dieser Studie vorgegangen und das Heparinvollblut von n = 12 Pankreaskarzinompatienten für 4h mit 1×10^6 /ml nativer PM₁₀-Suspension und 1×10^6 /ml UV-behandelter PM₁₀-Suspension stimuliert.

Abbildung 17 zeigt für alle vier untersuchten Zytokine, dass die unbehandelte PM₁₀-Suspension eine stärkere proinflammatorische Potenz besitzt als die UV-behandelte. Für IL-6, TNF-alpha und IL-1beta ist dieser Unterschied hochsignifikant im Wilcoxon matched-pairs-Test. Die Streuung um den Median ist in allen vier Zytokinen nach Stimulation mit der nativen PM₁₀-Suspension größer. Für IL-8 ist der Unterschied zwar auch signifikant vorhanden, jedoch weniger ausgeprägt als bei TNF-alpha, IL-6 und IL-1beta. Im Fall von IL-1beta gibt es nach Stimulation mit nativem Staub keine einzige Probe an Patientenblut, die nicht reagiert. Nach Stimulation mit UV-behandelter PM₁₀-Suspension reagiert eine einzelne Heparinvollblutprobe nicht mit IL-1beta-produktion (0 pg/ml).

Zusammengefasst zeigen die in Abbildung 17 präsentierten Ergebnisse, dass die native PM₁₀-Suspension stärker proinflammatorisch wirkt als die UV-behandelte PM₁₀-Suspension.

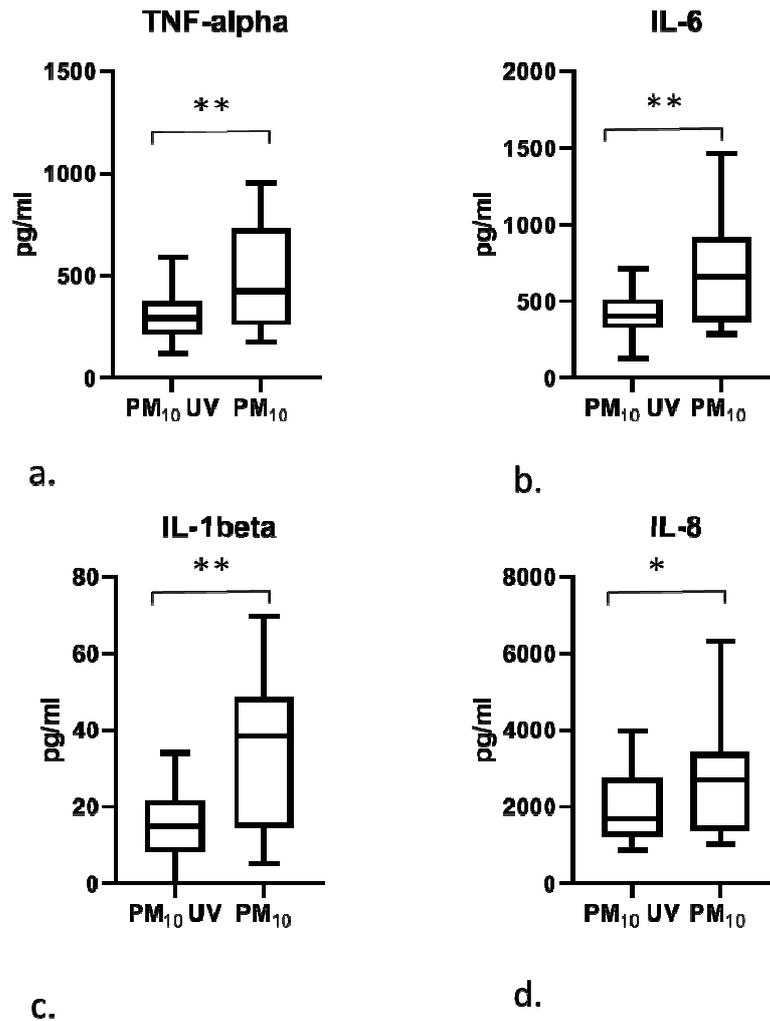


Abbildung 17: Expression von TNF-alpha, IL-6, IL-1beta und IL-8 in Heparinvollblut nach Stimulation mit PM₁₀-Suspension für 4h.

Die Ansätze von n = 12 Patienten (Patienten mit Pankreaskarzinom) wurden 4 h bei 37 °C und 5.0% CO₂ im Brutschrank mit UV-behandelter (PM₁₀ UV, Konzentration 10⁶ particles/ml) und mit nativer PM₁₀-Suspension (PM₁₀, Konzentration 10⁶ particles/ml) stimuliert. Im Überstand nach Zentrifugation wurde mittels CBA im Durchflusszytometer die Expression der Zytokine quantitativ bestimmt. Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median, oberem und unterem Quartil innerhalb der Box, Whiskern mit Minimum und Maximum, Wilcoxon matched-pairs-Test auf Signifikanz *: p < 0.02, **: p < 0.01

4.9 Proinflammatorische Zytokine in Heparinvollblut nach 4h Stimulation mit LPS

Wie in Kapitel 1.6.2 ausgeführt, ist Feinstaub in der Lage, *in vitro* die Expression proinflammatorischer Zytokine in humanem Blut zu induzieren. Ein Ziel dieser Studie ist, die proinflammatorische Antwort in gesunden Probanden mit der von Patienten mit Pankreaskarzinom im metastasierten oder lokal fortgeschrittenen Zustand zu vergleichen. In einem ersten Schritt wurde unter Nutzung der CBA-Technologie das *Human Inflammatory Cytokine Kit* von BD verwendet, um das Endotoxin-abhängige Stimulationspotenzial hinsichtlich der Expression von IL-8, IL-6, TNF-alpha und IL-1beta der beiden

Studienpopulationen vergleichen zu können. Das entsprechende Panel im verwendeten Kit enthält zusätzlich Beads zur Messung von IL-10 und IL-12p70, was für diese Studie nicht von Relevanz war, aus technischen Gründen aber ebenfalls gemessen wurde. IL-10 wurde erwartungsgemäß (De Fijter, Daha et al. 1998) nach einer kurzen Inkubationszeit von Heparinvollblut für 4h im für uns messbaren Bereich nicht exprimiert (Daten nicht gezeigt). IL-12p70 ist ebenfalls erst nach einer längeren Inkubationszeit als 4 h, nämlich eher nach 18 h (Compte, Zouaoui Boudjeltia et al. 2013) zu erwarten und konnte von uns ebenfalls nicht gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

Bezogen auf alle Zytokine, deren Expression in Abbildung 18 dargestellt ist, fällt auf, dass in beiden Gruppen in einzelnen Überständen 0 pg/ml Zytokin exprimiert wurden. Dies konnte rückblickend durch einen Fehler bei der Auswahl des LPS erklärt werden und traf in beiden Studienpopulationen auf n = 2 aus insgesamt n= 12 zu. Es ist in Abbildung 18a zu sehen, dass IL-8 im Median in den beiden untersuchten Studienpopulationen ähnlich stark durch LPS induziert wird. Es fällt auf, dass in der Population der gesunden Probanden eine größere Streuung im obersten Quartil, also oberhalb des 75.Perzentil existiert als bei den Pankreaskarzinompatienten.

Zusammenfassend ist die Expression von IL-8 nach Stimulation mit LPS in 50% der untersuchten Blutproben um den Median in einem quantitativ vergleichbaren Bereich zwischen ca. 300 pg/ml und 1000 pg/ml angesiedelt, liegt also innerhalb der Box.

In Abbildung 18b ist dargestellt, dass die IL-6-Expression im Median mit 1900 pg/ml bei den Pankreaskarzinompatienten nur etwas höher liegt als bei den gesunden Probanden mit 1800 pg/ml. Die Streuung der Messwerte innerhalb des oberen Quartils um den Median ist bei den Pankreaskarzinompatienten ebenfalls etwas größer, bei den gesunden Patienten dagegen ist die Streuung im unteren Quartil um den Median größer. Zusammenfassend liegt die durch LPS auslösbare proinflammatorische Antwort der IL-6-Expression in den untersuchten Gruppen in 50% der untersuchten Blutproben im Bereich zwischen 500 und 3200 pg/ml.

Abbildung 18c demonstriert, dass die proinflammatorische Antwort repräsentiert durch TNF-alpha im Median bei den gesunden Probanden höher war (400 pg/ml vs. 300 pg/ml). Bei den Pankreaskarzinompatienten gab es oberhalb der 75.Perzentile allerdings eine größere Streuung mit einem Maximum, welches das Maximum der gesunden Probanden deutlich übersteigt. Zusammenfassend liegen 50% der Messwerte um den Median jedoch in einem sich überschneidenden Bereich zwischen 200 und 600 pg/ml. Abbildung 18d zeigt, dass IL-1beta in beiden untersuchten Gruppen in sehr viel geringerem Ausmaß produziert wurde als die

Zytokine IL-8, IL-6 und TNF-alpha. Der Median lag bei den gesunden Probanden bei 20 pg/ml und bei den Pankreaskarzinompatienten bei 27 pg/ml. Insgesamt war die Streuung der 50% der Daten um oberhalb und unterhalb des Medians bei den Patienten mit Pankreaskarzinom größer als bei den gesunden Probanden.

Zusammengefasst demonstriert Abbildung 18a-d, dass alle Patienten und gesunden Probanden, deren Blutproben mit intaktem LPS stimuliert wurden, kompetent für die Produktion der Zytokine IL-6, IL-8, IL-1beta und TNF-alpha waren.

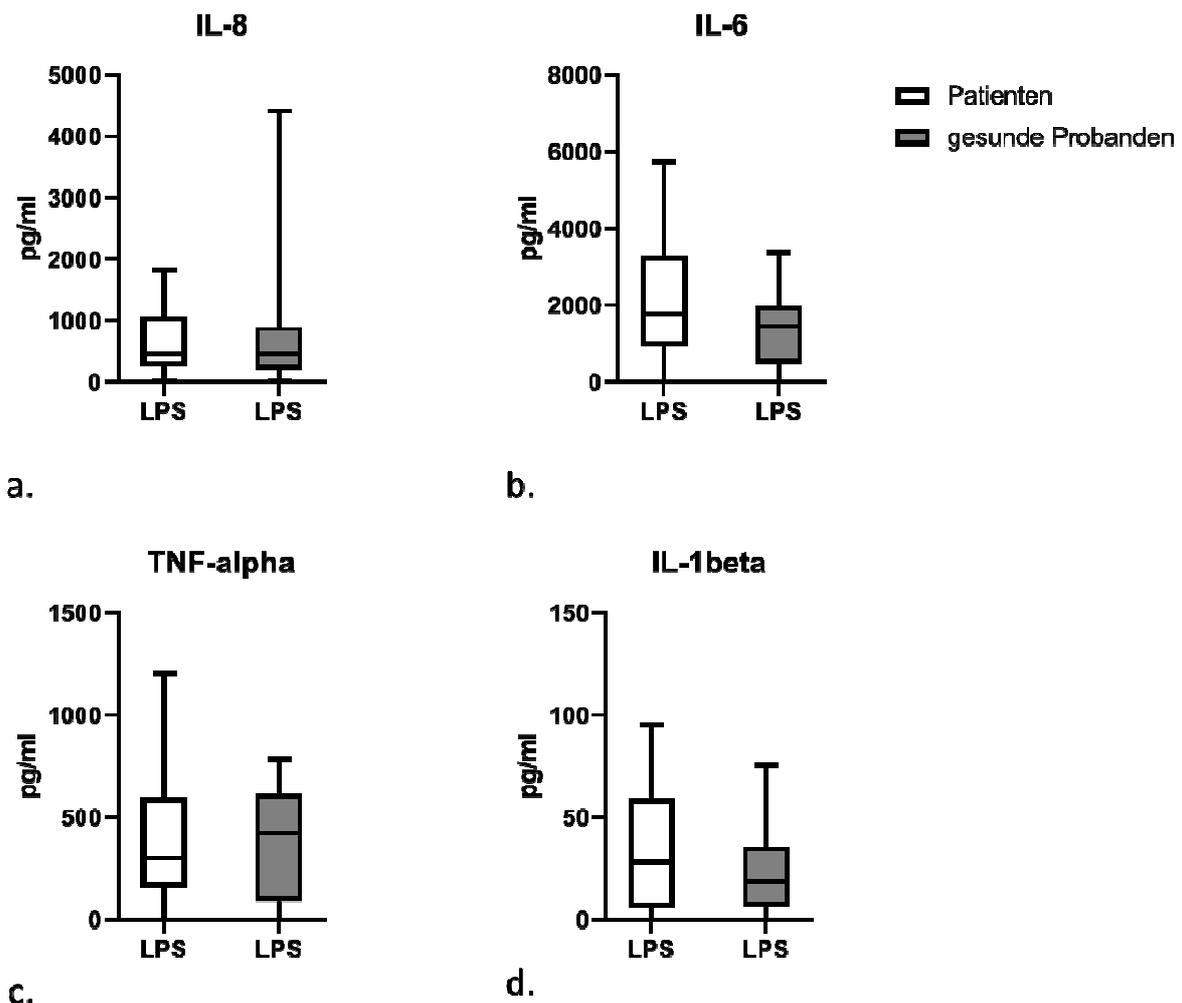


Abbildung 18: Expression von IL-8, IL-6, TNF-alpha und IL-1beta in Heparinvollblut nach Stimulation mit LPS für 4h.

Die Ansätze von n = 13 gesunden Probanden und n = 12 Patienten (Patienten mit Pankreaskarzinom) wurden 4 h bei 37 °C und 5.0% CO₂ im Brutschrank mit 500 pg/ml LPS stimuliert und anschließend zentrifugiert. Im Überstand wurde mittels CBA im Durchflusszytometer die Expression der Zytokine quantitativ bestimmt. Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median, oberes und unteres Quartil innerhalb der Box, Whiskers mit Minimum und Maximum.

5. Diskussion

5.1 IL-6 und IL-8 in Heparinvollblut werden nach 4h Stimulation mit UV-behandelter PM₁₀-Suspension in Patienten mit metastasiertem und fortgeschrittenem Pankreaskarzinom signifikant stärker produziert als in der gesunden Kontrollgruppe

Eine zentrale Fragestellung dieser Studie war, ob bei Patienten mit Pankreaskarzinom nach Stimulation mit PM₁₀-Suspension eine andere, möglicherweise stärker proinflammatorische Zytokinproduktion vorliegt als bei einer gesunden Kontrollgruppe. Am stärksten ausgeprägt war dieser antizipierte Unterschied bei den Zytokinen IL-6 und IL-8.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die IL-6-Produktion nach Stimulation von Heparinvollblut mit PM₁₀-Suspension bei Pankreaskarzinompatienten signifikant stärker war als bei einer gesunden Kontrollgruppe. IL-6 steht am Anfang einer Vielzahl von Entzündungsprozessen und stellt eine wichtige Achse im angeborenen Immunsystem dar (Tanaka, Narazaki et al. 2014), weil es andere Akute - Phase - Proteine induziert, die Hämatopoese beeinflusst und proinflammatorische Wirtsantworten bei Infektionen initiiert. Es ist bekannt, dass Patienten mit Pankreaskarzinom höhere IL-6-Serumspiegel aufweisen als gesunde Probanden (Okada, Okusaka et al. 1998). Eine durch PM₁₀-Suspension induzierte höhere proinflammatorische IL-6-Antwort jedoch, wurde nach Kenntnis des Autors der vorliegenden Arbeit bisher noch nie gezeigt. Dieses Ergebnis hat besondere Relevanz vor dem Hintergrund der Inzidenz und Mortalität thromboembolischer Ereignisse in der Patientengruppe mit Pankreaskarzinom, da in einer tierexperimentellen Studie im Mausmodell gezeigt werden konnte, dass PM₁₀ (Mutlu, Green et al. 2007) IL-6-abhängig prokoagulatorisch wirkt. In der Zusammenschau mit diesem Forschungsergebnis ist es plausibel zu postulieren, dass die proinflammatorischen Eigenschaften von PM₁₀ in Patienten mit Pankreaskarzinom IL-6-vermittelt einen Risikofaktor hinsichtlich thromboembolischer Ereignisse darstellen.

Auch IL-8 wurde im gleichen Experiment nach PM₁₀-Stimulation im Heparinblut von Pankreaskarzinompatienten signifikant stärker produziert. Auffällig ist sowohl bei IL-8 als auch bei IL-6, dass die Streuung der Messwerte um den Median bei den Patienten deutlich größer ist als bei den gesunden Probanden. Die Tatsache, dass die gesunden Probanden nur eine minimale interindividuelle Variabilität aufwiesen, weist darauf hin, dass diese Immunantwort physiologischerweise streng orchestriert abläuft und in Pankreaskarzinompatienten pathophysiologisch gestört sein könnte. Interessanterweise konnte

bereits früher (Salvi, Nordenhall et al. 2000) für Feinstaub aus Dieselaabgasen gezeigt werden, dass nach Exposition von Freiwilligen im Epithel der Atemwege erhöhte IL-8- und GRO-alpha-Konzentrationen messbar waren. GRO-alpha/CXCL1 ist aufgrund seiner mitogenen Eigenschaften ein gut etabliertes Signalmolekül mit Relevanz für die Karzinomentstehung.

Zusammenfassend könnte IL-8 in dieser Personengruppe durch seine Effekte auf die Thrombusstabilität und Erythrozytenstruktur im Blutkoagel die Gerinnungssituation nach PM₁₀-Exposition in Richtung eines thromboembolischen Ereignisses verschieben. Dies ist ein erster mechanistischer Hinweis auf die besondere Vulnerabilität dieser Patientengruppe hinsichtlich Feinstaubeffekten auf die Gerinnungssituation. In weiteren Untersuchungen könnte mittels ROTEM-Analysen die Thrombusstabilität nach PM₁₀-Expositonsszenarien weiter untersucht werden, um einen direkten Effekt nachweisen zu können. Nach Zugabe von IL-8 wäre auf diese Art auch ein IL-8-abhängiger Mechanismus nachzuweisen.

Die Ergebnisse der Zytokinmessung (Kapitel 4.1) im Heparinvollblut zeigten nach 4h Stimulation mit PM₁₀-Suspension, dass kaum proinflammatorisches IL-1beta produziert wurde. Vor der Studie war bereits bekannt, dass die Kinetik von IL1-beta langsamer ist als die von IL-6 und TNF-alpha, so dass das Ergebnis nicht überrascht. Relevant ist jedoch, dass es keine relevanten Unterschiede in den beiden untersuchten Gruppen gibt, da eine veränderte, möglicherweise quantitativ und qualitativ pathologische Immunantwort in der Gruppe der Pankreaskarzinompatienten nach Betrachtung der Situation für IL-6 und IL-8 durchaus auch für IL-1beta plausibel gewesen wäre.

Die Ergebnisse der TNF-alpha-Produktion nach Stimulation mit PM₁₀ zeigten ein ähnliches Muster wie im Fall von IL-6 und IL-8, jedoch ohne statistische Signifikanz im Man-Whitney-U-Test (siehe Kapitel 4.1). Heparinblut von Patienten mit Pankreaskarzinom reagierte mit einer stärkeren TNF-alpha-Produktion als das Blut von gesunden Probanden. Auch die Streuung der einzelnen Messwerte um den Median innerhalb der entsprechenden Kohorte ist, ähnlich wie bei IL-6 und IL-8, bei den gesunden Probanden deutlich geringer als bei den Patienten mit Pankreaskarzinom.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der Vergleich mit einer gesunden Kontrollkohorte im Stimulationsexperiment von Heparinvollblut mit PM₁₀ sowohl die größere Variabilität der einzelnen Messwerte um den Median herum als auch die stark erhöhte Expression von IL-8, IL-6 und TNF-alpha im Heparinblut der Pankreaskarzinompatienten zeigte. Dies spricht für eine Immunpathologie in der Gruppe der Pankreaskarzinompatienten. Es konnte in der vorliegenden Studie jedoch keine mechanistische Untersuchung erfolgen, die eine kausale

Verbindung mit PM_{10} hätte nachweisen können. In der Gruppe der Pankreaskarzinompatienten, bei denen als Einschlusskriterium zur Studie das Vorliegen einer aktiven, behandlungbedürftigen Tumorerkrankung nachgewiesen sein musste, ist beispielsweise zum Zeitpunkt der Blutentnahme von zytostatischen Antitumorthérapien auszugehen. Diese könnten durchaus auch immunmodulierende Effekte haben, die letztlich Anteil an der hier nachgewiesenen PM_{10} -induzierten stärkeren Proinflammation haben. Sichergestellt war in dieser Studie jedoch eine Immunkompetenz durch allzeitig verwendete Positivkontrollen (LPS und ConA, siehe vorherige Kapitel). Darüber hinaus lag bei keinem Patienten eine Leukozytopenie vor.

5.2 Anstieg der Konzentration von IL-6 in Heparinvollblut zwischen 4h und 20h nach Stimulation mit UV-behandelter PM_{10} -Suspension

Im vorhergehenden Kapitel wurden die teilweise statistisch signifikanten Unterschiede in der proinflammatorischen Antwort auf 4-stündige PM_{10} -Stimulation in Heparinvollblut zwischen gesunden Probanden und Patienten mit Pankreaskarzinom diskutiert. Die im Rahmen einer proinflammatorischen Immunantwort sehr früh exprimierte Zytokine IL-6 und TNF-alpha wurden in analogen Experimenten zusätzlich nach 20-stündiger Stimulation gemessen, um zu untersuchen, ob die beiden Gruppen sich in einer antinflammatorischen Gegenregulation im Sinne einer Termination der Proinflammation unterscheiden.

Interessanterweise zeigte sich für IL-6, dass es sowohl im Heparinblut gesunder Probanden als auch dem der Pankreaskarzinompatienten nach 20 h massiv weiter gestiegen war (Abbildung 11). Relativ betrachtet war die Steigerung des Medians bezogen auf die Messwerte zum Zeitpunkt 4h bei den gesunden Probanden stärker als bei den Pankreaskarzinompatienten, so dass von einer Annäherung der im vorhergehenden Abschnitt diskutierten signifikanten Unterschiede in der IL-6-Sekretion nach 20 h gesprochen werden kann. Es stellt sich die Frage, welche Zellen im Heparinblut der Pankreaskarzinompatienten so viel schneller eine IL-6-Antwort auslösen als in gesunden Probanden. In weiteren Untersuchungen könnten hier intrazelluläre Färbungen von IL-6 und eine durchflusszytometrische Analyse der Identifikation einer zellulären Quelle des IL-6 nach PM_{10} -Stimulation dienen. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang auch sogenannte „circulating tumor cells“, die im Fall des Adenokarzinoms des Pankreas als Quelle von IL-6 bereits beschrieben wurden (Fan, Yang et al. 2018).

Die Tatsache, dass die Konzentrationen von TNF-alpha im vorliegenden Experiment nach Stimulation mit PM_{10} -Suspension weder in der gesunden Kontrollgruppe noch in der Gruppe

der Pankreaskarzinompatienten im Vergleich 4h versus 20h nach Stimulation weiter anstieg, warf die Frage auf, ob hier die Gegenregulation mit IL-10 ursächlich sein könnte (Chan, Ming-Lum et al. 2012). Tatsächlich zeigen die Ergebnisse (Abbildung 12), dass die IL-10-Konzentration im Median in der Gruppe der Pankreaskarzinompatienten signifikant höher war als in der Gruppe der gesunden Probanden. Dies entspricht einer inversen Korrelation, da die TNF-alpha-Konzentration im Median bei den Pankreaskarzinompatienten nach 20h leicht abfiel, wohingegen sie in der Gruppe der gesunden Probanden leicht stieg. Der Median der TNF-alpha-Konzentrationen unterschied sich jedoch nach 20 h in den beiden Gruppen kaum und lag auch nach 4h Stimulation nur im statistisch nicht signifikanten Bereich.

Es kann geschlussfolgert werden, dass die Stimulation von Vollblut mit PM₁₀-Suspension in diesem experimentellen Setup für TNF-alpha in scharfem Kontrast zu IL-6 und ganz besonders IL-8 keine gruppenspezifischen Effekte zeigen konnte. Um hier weiter mechanistisch aufklären zu können, wäre es in einem nächsten Schritt, der den Rahmen dieser Studie gesprengt hätte, sinnvoll, zelluläre Quellen für die einzelnen Zytokine zu identifizieren. Zudem ist aufgrund der zunehmenden Streuung um den Median in der Messreihe nach 20h zur weiteren Überprüfung der Hypothese eine größere Stichprobe erforderlich.

5.3 Schwache T-Zell-Zytokinantwort in Heparinvollblut nach 20 h Stimulation mit UV-behandelter PM₁₀-Suspension

Wie in Kapitel 4.3 ausgeführt, wurden für IL-4 keine messbaren Konzentrationen nachgewiesen, ohne dass Zweifel an der Validität der verwendeten Methode aufgetreten sind. Dies steht im Kontrast zu einer Studie, die im Mausmodell eine robuste IL-4-Antwort in einem gut etablierten Asthmamodell nach Stimulation mit PM₁₀ zeigen konnte (Shadie, Herbert et al. 2014). Es muss hier jedoch erwähnt werden, dass in der genannten Studie IL-4 auf mRNA-Ebene nachgewiesen wurde und nicht auf Proteinebene wie in der hier durchgeführten Studie. Die extreme Heterogenität von Großstadthintergrundstaub wie er sowohl in der vorliegenden als auch der zitierten Studie verwendet wurde, kann eine weitere Ursache der divergierenden Ergebnisse für IL-4 sein.

Überraschenderweise ergab die Analyse der Messungen der T-Zellzytokine nach 20 h für IL-2 und IFN-gamma insgesamt sehr niedrige Zytokinkonzentrationen nach Stimulation mit PM₁₀-Suspension. Dies steht im scharfen Kontrast zu den starken Zytokinantworten des Arms der angeborenen Immunität, in dieser Studie vertreten durch IL-8, IL-6 und TNF-alpha. Im Unterschied zum weiter oben diskutierten IL-4 wurde jedoch in der Positivkontrolle, dem

Lektin ConA, eine robuste Zytokinantwort für IFN-gamma und IL-2 sowohl in der Gruppe der Pankreaskarzinompatienten als auch der Gruppe der gesunden Probanden nachgewiesen. Bei beiden Zytokinen, IL-2 und IFN-gamma, war die Zytokinantwort in der gesunden Kontrollgruppe statistisch signifikant stärker als in der Gruppe der Pankreaskarzinompatienten. Dies ist suggestiv für eine relative T-Zellschwäche in der Kohorte der Tumorpatienten. In weiteren Experimenten, die über diese Studie hinausgehen, wäre es aus onkologischer Sicht im Hinblick auf sog. „targeted therapies“ lohnenswert, Untersuchungen zu T-Zelldepletionen regulativer T-Zellen (Treg) oder funktionellen Einschränkungen von T-Zellpopulationen in Patienten mit Pankreaskarzinom weiter zu untersuchen.

Ziel dieser Studie ist jedoch, Effekte von PM₁₀ auf das Immunsystem und die Hämostase näher zu beleuchten. In der Literatur sind sehr wenige Studien zu finden, die Daten zu T-Zellzytokinen nach Stimulation mit PM₁₀ liefern. Für Partikel aus Dieselabgasen wurde im Vollblutmodell überzeugend gezeigt, dass sowohl IL-2 als auch IFN-gamma durch verschiedene Dieselabgase fast vollständig unterdrückt werden (Pierdominici, Maselli et al. 2014). Zusätzlich ergab diese Studie, dass auch Oberflächenmoleküle wie CD25, die als Marker für eine T-Zellaktivierung gelten, herabreguliert waren. Diese Ergebnisse lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Beschaffenheit der verwendeten Partikelsuspensionen und methodischer Abweichungen nicht direkt auf die hier vorliegende Studie übertragen, zeigen aber doch auffällige Parallelen, die mit den konsistenten Daten der hier vorgelegten Arbeit gut zu belegen sind. Fazit ist, dass auf Basis der vorliegenden Ergebnisse ein immunsuppressiver Effekt von PM₁₀ auf T-Zellzytokine plausibel erscheint und in beiden untersuchten Gruppen auftrat. Das regulative Zytokin IL-10 scheint, bezogen auf die in der vorliegenden Studie gezeigten Daten, von diesem postulierten Effekt nicht betroffen zu sein.

Zusammengefasst liefert die vorliegende Studie nach Kenntnis des Autors zum ersten Mal Daten, die darauf hinweisen, dass das adaptive Immunsystem, weder mit einer Th-2-T-Zellantwort vertreten durch IL-4, noch mit einer Th-1-T-Zellantwort auf die verwendete PM₁₀-Suspension reagiert. Dieser Effekt war sowohl bei Pankreaskarzinompatienten als auch bei gesunden Probanden zu sehen. Um diese Beobachtung weiter belegen zu können, müssten zusätzliche Methoden zur Messung der T-Zellaktivität angewendet werden. Besonders attraktiv wären hierzu intrazelluläre Zytokinfärbungen, die mittels Durchflusszytometrie quantifizierbar sind. Die Heterogenität einer jeden PM₁₀-Suspension auch unter Berücksichtigung der Probengewinnung und -prozessierung des gesammelten Großstadthintergrundstaubs stellen hier eine Herausforderung dar.

5.4 Gerinnungsfaktoren Antithrombin und Prothrombin sind unabhängig von Stimulation mit PM₁₀ höher in Patienten mit metastasiertem und fortgeschrittenem Pankreaskarzinom

Im Vergleich zur Normalbevölkerung besteht im Durchschnitt für Patienten mit Pankreaskarzinom ein deutlich erhöhtes Risiko für ein venöses thromboembolisches Ereignis. Eine zentrale Hypothese dieser Arbeit ist, ob die in diesem Patientengut häufig pathologisch veränderte Hämostase durch PM₁₀-vermittelte proinflammatorische Effekte weiter in Richtung eines thromboembolischen Ereignisses verschoben wird. Das Prinzip, also die Verzahnung von Inflammation und Hämostase ist mechanistisch bewiesen und hinreichend publiziert (siehe Einleitung).

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass die verwendete PM₁₀-Suspension im Vollblut von Pankreaskarzinompatienten statistisch signifikant stärkere IL-6- und IL-8-Antworten verursachte als in gesunden Probanden. Die Messung der Gerinnungsfaktoren Antithrombin, Prothrombin und Plasmin/Plasminogen hingegen ergab innerhalb der beiden Kohorten nur sehr geringe Unterschiede zwischen der Negativkontrolle, PM₁₀-Suspension und LPS. Daraus kann gefolgert werden, dass nach 4h Inkubationszeit diese starken proinflammatorischen Signale nach Stimulation mit PM₁₀-Suspension sich möglicherweise noch nicht in einer veränderten Gerinnungssituation niederschlagen. Gründe hierfür könnten die kurze Inkubationszeit von 4h sein oder die Tatsache, dass es sich um heparinisertes Blut handelte, welches nicht in Gänze die Situation im Vollblut widerspiegelt.

Heparin bindet mit hoher Affinität an Antithrombin und könnte so dessen Bindung an den verwendeten Antikörper beeinträchtigt haben. Nach Herstellerangaben sei dies nicht zu erwarten, ist aber anhand theoretischer Überlegungen plausibel. Die Messung von D-Dimeren wäre eine Möglichkeit, Fibrinzerfallsprodukte, also das Endergebnis der gesamten Gerinnungskaskade zu evaluieren. Dies wäre sicherlich eine sinnvolle Ergänzung der vorliegenden Arbeit und sollte zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgen, um die Hypothese der PM₁₀-induzierten, durch Entzündungssignale vermittelten Prokoagulation weiter überprüfen zu können. Hier sind insbesondere Zeitpunkte, die länger als 4h Inkubation erfassen zu berücksichtigen.

Vergleicht man die Antithrombinkonzentration in der Gruppe der gesunden Probanden mit der Gruppe der Pankreaskarzinompatienten, fällt der statistisch hochsignifikante Unterschied in den unbehandelten Negativkontrollen auf. Die hier vorgelegten Messungen suggerieren, dass Patienten mit Pankreaskarzinom einen niedrigeren Verbrauch an Antithrombin aufweisen oder endogen mehr Antithrombin synthetisieren und daher mit höheren

Hintergrundkonzentrationen ausgestattet sind als die gesunde Vergleichsgruppe. Das ist bereits früher in einer ELISA-basierten Analyse (Deskur, Salata et al. 2014) gezeigt worden. Von prognostischer Bedeutung hinsichtlich zukünftiger thromboembolischer Ereignisse ist nach gängiger Fachliteratur allerdings nur die Messung von D-Dimeren (Faille, Ajzenberg et al. 2016) (Sun, Ren et al. 2015), nicht jedoch die von Antithrombin oder Prothrombin.

Für Prothrombin ergab sich eine sehr ähnliche Konstellation wie für Antithrombin: die unbehandelte Negativkontrolle wies bei den Pankreaskarzinompatienten eine statistisch signifikant höhere Konzentration auf als bei den gesunden Probanden. Hohe Level prokoagulatorischer Faktoren wie Prothrombin sind plausibel vereinbar mit dem erhöhten Risiko eines thromboembolischen Ereignissen in Patienten mit Pankreaskarzinom (Rietveld, Schreuder et al. 2018), wie über einen Tissue Factor-abhängigen Mechanismus bereits bewiesen wurde. Es ist ebenso denkbar, dass die erhöhten Antithrombinspiegel in den Proben der Pankreaskarzinompatienten eine physiologische Gegenregulation im Sinne einer Aufrechterhaltung der Hämostase bei erhöhten Prothrombinspiegeln darstellen. Interessanterweise konnte in der oben erwähnten Studie (Deskur, Salata et al. 2014), in der mit ELISA signifikant erhöhte Antithrombinspiegel in Patienten mit Pankreaskarzinom im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen wurden, dies im ELISA-Experiment nicht für Prothrombin gezeigt werden.

Wie im Fall von Antithrombin konnte jedoch auch für Prothrombin durch PM₁₀-Stimulation keine Veränderung gemessen werden, weder bei den gesunden Probanden noch bei den Pankreaskarzinompatienten. Die Ergebnisse weisen zwar deutlich auf eine pathologisch veränderte Hämostase in der Gruppe der Pankreaskarzinompatienten hin, PM₁₀ war in diesem experimentellen Design jedoch kein geeigneter Trigger für eine über Prothrombin messbare weitere Verschärfung der prokoagulatorischen Dysbalance.

Anders als Antithrombin, welches in seiner Funktion als Inaktivator von vor allem Thrombin und Faktor Xa der Entstehung von Fibrin aus Fibrinogen entgegenwirkt, besteht die Funktion von Plasmin darin, Fibrin in kleinere Moleküle zu spalten und damit den Thrombus abzubauen. Plasmin/Plasminogen, welches in dem in dieser Studie benutzten Verfahren nicht unterschieden werden kann, lag bei Patienten mit Pankreaskarzinom und bei den gesunden Probanden im Median in ähnlichen Konzentrationen vor. Dies war für die Stimulation mit PM₁₀, LPS und der Negativkontrolle PBS der Fall. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu der hier mehrfach zitierten ELISA-Studie, die signifikante Unterschiede in den beiden Gruppen für Antithrombin, Prothrombin und Plasminogen gefunden hat. Zu diskutieren sind an dieser

Stelle die Unterschiede in den untersuchten Studienpopulationen. Im arithmetischen Mittel ist in der vorliegenden Arbeit die Gruppe der Patienten mit Pankreaskarzinom 69 Jahre alt, die der gesunden Probanden 45 Jahre. Ein altersabhängiger Effekt im Sinne von höheren Antithrombin- und Prothrombinspiegeln bei älteren Menschen ist zwar in älteren Arbeiten (Cadroy, Pierrejean et al. 1992) beschrieben, bezieht sich aber auf Hochbetagte. Vor dem Hintergrund einer aktiven, im vorliegenden Fall fortgeschrittenen Tumorerkrankung erscheint jedoch das Alter als Störfaktor (Confounder) nachrangig. Eine ebenfalls zu diskutierende Ursache für die in der Patientengruppe höheren Antithrombin- und Prothrombinspiegel im Vergleich zur gesunden Kontrollkohorte, ist die Antikoagulation bei 5 von 12 Patienten. Es kamen als DOAKs ausschließlich direkte Faktor-Xa-Inhibitoren, der Vitamin K-Antagonist Phenprocoumon und NMH zum Einsatz, jedoch kein direkter Thrombininhibitor (Dabigatran). Über einen möglichen Störeffekt dieser Wirkstoffe auf den verwendeten Multibeads-Assay dieser Studie, ist nach Kenntnis des Autors nichts bekannt.

5.5 Konzentration von Faktor XIII in Heparinvollblut nach 4 h Stimulation mit UV-behandelter PM₁₀-Suspension erniedrigt

Faktor XIII, auch bekannt als *Fibrin stabilizing factor XIII* ist biochemisch anders als die meisten Gerinnungsfaktoren keine Protease, sondern eine Transglutaminase. Seine Funktion besteht darin, die Fibrin-Quervernetzung während der Thrombusbildung zu katalysieren und somit entscheidend zur Thrombusstabilität beizutragen. Darüber hinaus besitzt es proangiogene Eigenschaften (Dardik, Loscalzo et al. 2005) und spielt eine Rolle in der Tumorentstehung des Pankreaskarzinoms (Wojtukiewicz, Rucinska et al. 2001). Interessanterweise ist Faktor XIII in der hier vorliegenden Studie der einzige Gerinnungsfaktor, der sich zwischen den beiden untersuchten Gruppen sowohl in der Negativkontrolle als auch nach Stimulation mit PM₁₀-Suspension statistisch signifikant unterschied. Bei der Interpretation dieses Ergebnisses (Abbildung 13) ist allerdings zu berücksichtigen, dass nur in der Gruppe der Pankreaskarzinompatienten ein Abfall der messbaren Faktor XIII-Konzentration nach Stimulation mit PM₁₀-Suspension vorlag, nicht jedoch bei den gesunden Probanden. Ob die Stimulation mit PM₁₀-Suspension in der Gruppe der Pankreaskarzinompatienten einen stärkeren Verbrauch von Faktor XIII induziert hat, weil quantitativ mehr Fibrinquervernetzung stattfand und daher die Konzentration im Vergleich zur Negativkontrolle absank, lässt sich in dieser Studie nicht beweisen. Auch nach Stimulation mit LPS, das als Positivkontrolle benutzt wurde, sank in der Gruppe der

Pankreaskarzinompatienten Faktor XIII ab, in Heparinblut der gesunden Probanden stieg die Konzentration im Median jedoch an.

5.6 Charakterisierung der Größenverteilung der Feinstaubpartikel der PM₁₀-Suspension zeigte Dominanz der lungengängigen Fraktion PM_{2.5-1.0}

Für diese Studie wurde eine PM₁₀-Suspension angefertigt, die PM₁₀ enthält, die über mehrere Jahre am gleichen Standort zu allen Jahreszeiten gesammelt wurde und in einer Stammlösung vereinigt wurde, die für alle Experimente dieser Arbeit benutzt wurde. Es handelt sich formal um eine PM₁₀-Suspension, da Partikel bis zum Größendurchmesser 10 µm enthalten sind. Die Analyse mit dem CASY (Kapitel 3.2.2) ergab jedoch, dass die Fraktion PM_{2.5-1.0} in der verwendeten Suspension zahlenmäßig stark überrepräsentiert ist. Das hat Konsequenzen für die biologische Wirksamkeit, denn Partikel dieser Größe können in der Lunge bis in die Alveolen vordringen und dort Entzündungsreaktionen hervorrufen (Jiang, Song et al. 2004). In dieser Studie wurde ein *in vitro* Ansatz verfolgt und menschliches Blut mit PM₁₀-Suspension inkubiert, was einen relativ artifiziellen Ansatz darstellt: In einem Expositionsszenario in der Umwelt müssten die Feinstaubpartikel nach Inhalation vom Nasopharynx über die Trachea, den Bronchialbaum bis in die Alveolen und schlussendlich bis ans Kapillarbett gelangen. Aufgrund der in Kapitel 4.5 dargestellten Größenverteilung der Partikel mit Schwerpunkt auf der Fraktion PM_{2.5-1.0} für die in dieser Arbeit verwendete PM₁₀-Suspension, ist physikalisch die Lungengängigkeit gegeben. Der Übertritt dieser Fraktion PM_{2.5-1.0} in das periphere Blutsystem über die Lungenkapillaren ist mit Verweis auf das Kapitel zu methodischen Limitationen dieser Studie nicht definitiv bewiesen. Allerdings konnte eine beeindruckende neue Studie (Li, Li et al. 2019), mithilfe von Fluoreszenzdarstellung beweisen, dass Partikel einer vergleichbaren Größe (PM_{2.5}) nicht nur in den Lungenazini zu finden sind, sondern auch in extrapulmonalen Organen. Somit ist eine Verwendbarkeit der vorgelegten Daten zur Überprüfung der angestellten Hypothese dieser Arbeit gegeben.

5.7 Vergleich der UV-behandelten PM₁₀-Suspension mit der unbehandelten PM₁₀-Suspension weist auf unterschiedlichen Endotoxingehalt und verändertes proinflammatorisches Wirkungsprofil hin

In Kapitel 4.7 dieser Arbeit wurde der Endotoxingehalt der für die Stimulationstests im Heparinvollblut verwendeten PM₁₀-Suspension dargestellt. Das war aus zwei Gründen

erforderlich. Zum einen ist der Endotoxingehalt in PM₁₀ generell sehr variabel (Yoda, Tamura et al. 2017). Daher sollte zur Auswertung von Messwerten insbesondere proinflammatorischer Parameter wie sie auch in der vorliegenden Studie erhoben wurden, der Endotoxingehalt initial bestimmt werden. Zum anderen war eine Reduktion des mikrobiellen Wachstums in der PM₁₀-Suspension durch UV-Bestrahlung nötig, da sonst eine 20h-stündige Inkubation des Vollbluts technisch nicht möglich gewesen war. Dieses Vorgehen machte einen Vergleich des Endotoxingehalts behandelter und unbehandelter PM₁₀-Suspension nötig. Das in Abbildung 15 demonstrierte bakterielle Wachstum mit vermutlich zytopathischem Effekt auf Zellen des Vollbluts, konnte durch die vorherige UV-Bestrahlung der PM₁₀-Suspension nach mikroskopischer Analyse vollständig unterbunden werden. Über virales Wachstum in den Versuchsansätzen der Heparinvollbutinkubationen konnte mikroskopisch nur sehr begrenzt eine Aussage getroffen werden. Auch hier gilt jedoch, dass mögliche virale zytopathische Effekte nach UV-Bestrahlung mikroskopisch nicht nachgewiesen werden konnten.

Durch Verwendung der UV-behandelten PM₁₀-Suspension für alle Vergleichsexperimente von Heparinblut gesunder Probanden und Heparinblut von Patienten mit Pankreaskarzinom, war gewährleistet, dass ein starkes bakterielles Wachstum während der Inkubationszeit nicht die erwartete proinflammatorische Wirkung der Feinstaubpartikel maskiert oder artifiziell verstärkt. Solch eine ungehemmte Vermehrung von Mikroben wäre *in vivo* aufgrund einer Immunantwort des Wirts nicht zu erwarten, so dass die UV-Behandlung das *in vitro* System dieser Studie eher einem Expositionsszenario in der Umwelt annähert. Hier nimmt der Autor der Studie mögliche partikuläre Veränderungen beispielsweise in der Beschaffenheit der Oberfläche der partikulären Strukturen bewusst in Kauf.

Die Effekte der UV-Bestrahlung hinsichtlich des Endotoxingehalts untersuchten wir mit dem LAL-Test (Kapitel 3.2.3) und konnten zeigen, dass dieser nach UV-Bestrahlung ca. ein Drittel niedriger ist als in unbehandelter PM₁₀-Suspension. Dies spiegelt die Ergebnisse anderer Forschergruppen (Anderson, Huck et al. 2003) plausibel wider, die zeigten, dass eine UV-Behandlung die Endotoxinkonzentration in Wasserproben senkt. Interessanterweise lagen die Endotoxinkonzentrationen von UV-behandelter und unbehandelter PM₁₀-Suspension deutlich über der, die in LPS von *E. coli* gemessen wurde, welches in dieser Arbeit verwendet wurde. Im Vergleich mit anderem PM₁₀ (Heinrich, Pitz et al. 2003) fällt auf, dass die in der hier durchgeführten Studie verwendete PM₁₀-Suspension einen vergleichsweise hohen Endotoxingehalt aufweist. Bei Heinrich et al. lag der Endotoxingehalt bei 1.2 EU/mg PM₁₀, in der hier durchgeführten Studie bei 4 bzw. 6 EU/ml. Möglicherweise liegt dies auch in der Art

der Resuspension der Partikel in der Trägerlösung begründet. Darüber hinaus sind auch jahreszeitliche Schwankungen des Endotoxingehalts in PM_{10} bekannt.

Der Vergleich mit LPS und die Evaluierung des Endotoxingehalts ist besonders relevant für diese Studie, weil Endotoxin über seine Bindung an den CD14-Rezeptor auf Immunzellen wie Makrophagen eine proinflammatorische Zytokinantwort auslöst (Beutler 2000). Das ubiquitäre und sehr variable Vorhandensein von Endotoxin in PM_{10} macht es schwierig zu beurteilen, wie groß der Anteil an der proinflammatorischen Antwort auf PM_{10} Endotoxin-abhängiger Natur ist. Das ist beim Versuch einer mechanistischen Erklärung der proinflammatorischen Effekte von PM_{10} möglichst zu berücksichtigen.

Durch die in Kapitel 4.7 präsentierten Ergebnisse wurde gezeigt, dass die UV-behandelte PM_{10} -Suspension einen um ca. ein Drittel niedrigeren Endotoxingehalt aufweist als die unbehandelte. Dies sollte in der vorliegenden Studie genutzt werden, um mit CBA-Technologie die Zytokinantwort im Heparinvollblut von Pankreaskarzinompatienten nach 4h Stimulation mit PM_{10} hinsichtlich einer Endotoxin-induzierten Zytokinsekretion zu untersuchen. Die in Kapitel 4.7 dargestellten Ergebnisse demonstrieren, dass für alle vier untersuchten Zytokine TNF-alpha, IL-6, IL1-beta und IL-8 im direkten Vergleich (Wilcoxon matched-pairs-Test) die unbehandelte PM_{10} -Suspension in der gleichen Heparinvollblutprobe eine signifikant stärkere Zytokinsekretion verursachte als die UV-behandelte, die einen niedrigeren Endotoxingehalt aufwies. Am wenigsten ausgeprägt war der Unterschied bei IL-8, was die Hypothese zulässt, dass dieses Zytokin am ehesten durch nicht-Endotoxin-vermittelte Mechanismen getriggert wurde. Ebenfalls ist zu berücksichtigen, dass durch die UV-Bestrahlung der PM_{10} -Suspension auch partikuläre Veränderungen möglich sind, die ihrerseits eine Veränderung der proinflammatorischen Potenz nach sich ziehen könnten.

5.8 Proinflammatorische Zytokinantwort in Heparinvollblut nach 4h Stimulation mit LPS unterscheidet sich nur wenig bei gesunden Probanden und Patienten mit metastasiertem oder fortgeschrittenem Pankreaskarzinom

Die im Kapitel 4.7 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass in den verwendeten PM_{10} -Suspensionen Endotoxin enthalten ist. Davon ausgehend sollte in dieser Arbeit getestet werden, ob beide untersuchten Studienpopulationen (gesunde Probanden versus Patienten mit Pankreaskarzinom) eine robuste Zytokinantwort auf LPS-Stimulation aufweisen. Dies ist notwendig gewesen, um auszuschließen, dass die Patienten mit Pankreaskarzinom bedingt durch zytostatische und zytotoxische Therapieregime zur Behandlung ihrer aktiven

Tumorerkrankung so immunsupprimiert waren, dass ein Vergleich der Zytokinantwort mit gesunden Probanden nicht valide ist. Daher wurde in einem weiteren Experiment, dessen Ergebnisse in Kapitel 4.9 präsentiert wurden, Heparinblut mit dem aus *E. coli* isolierten Endotoxin LPS stimuliert.

Wie in Kapitel 4.9 ausgeführt, unterscheiden sich die Zytokinkonzentrationen nach Stimulation mit LPS gemessen am Median für IL-8, IL-6 und IL1-beta nur wenig. Ausschließlich für TNF-alpha zeigte sich, dass die gesunden Probanden im Median eine stärkere Zytokinproduktion aufwiesen (400 pg/ml vs. 300 pg/ml). Dies ist aus onkologischer Perspektive interessant, da TNF-alpha (Zhao, Fan et al. 2016) auf Grund seiner Effekte auf den Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R) einen wichtigen Faktor für Tumor-Stroma-Interaktionen darstellen könnte. Es gibt zudem Hinweise darauf, dass anti-TNF-alpha-Therapien, sich günstig auf die Chemosensitivität von duktalem Adenokarzinomzellen des Pankreas auswirken (Egberts, Cloosters et al. 2008).

In beiden untersuchten Gruppen trat am gleichen Experimentaltag bei $n=2$ der stimulierten Heparinvollblutproben ein Versagen des Ansprechens auf LPS auf. Es wurden 0 pg/ml Zytokin exprimiert, dies betraf alle untersuchten Zytokine gleichermaßen. Für diese Inplausibilität kam als wahrscheinlichste Ursache die Verwendung falsch konzentrierter bzw. LPS-leerer Aliquots der LPS-Stammlösung in Frage. Bei neu angesetzten LPS-Verdünnungen trat dieser Effekt nie wieder auf. Die hiervon betroffenen Heparinvollblutproben zeigten nach Stimulation mit ConA und auch PM_{10} -Suspension eine Zytokinproduktion, die sich im plausiblen Bereich der Mehrheit der jeweiligen Gruppe (Patient/in vs. gesunder Proband/in) befand, so dass sie für die statistische Auswertung ohne Änderung berücksichtigt wurden.

Zusammengefasst demonstrieren diese Experimente, dass beide Gruppen vergleichbar stark auf die verwendete Positivkontrolle reagieren. Insbesondere liegt in der Gruppe der Pankreaskarzinompatienten keine Schädigung des Immunsystems vor, die so ausgeprägt ist, dass die Vergleichbarkeit der PM_{10} -stimulierten Zytokinantwort mit der Gruppe der gesunden Probanden nicht gegeben wäre. Dies stellt eine wichtige Grundlage für die Validität der vorliegenden Studienergebnisse hervor und unterstreicht, dass die weiter oben diskutierten signifikanten Unterschiede in den gemessenen proinflammatorischen Zytokinen zwischen Pankreaskarzinompatienten und gesunden Probanden nicht ausschließlich auf Endotoxineffekte in der PM_{10} -Suspension zurückzuführen sind.

6. Limitationen der Studie

6.1 Auswahl des Feinstaubgemischs

Eine Begründung der in dieser Studie durchgeführten Vollblutstimulationen ist die Verwendung eines möglichst nativen, real in der großstädtischen Alltagsumgebung vorkommenden Feinstaubgemischs. Auf eine ausführliche Analyse der verwendeten PM₁₀-Suspension wurde in dieser Dissertation verzichtet. Es erfolgte jedoch eine Grundcharakterisierung der PM₁₀-Suspension mittels Messung der Partikelgrößenverteilung und mittels Bestimmung der enthaltenen Endotoxinkonzentration. Die mikrobielle Belastung der verwendeten PM₁₀-Suspension musste, um adäquate Kulturbedingungen für die Vollblutinkubationen zu erzielen, durch UV-Bestrahlung reduziert werden. Dies stellt eine potenzielle Einschränkung hinsichtlich der nativen proinflammatorischen Qualität des Feinstaubgemischs dar. Es ist weiter festzustellen, dass die Resuspension der Feinstaubpartikel wie in Abbildung 9 dargestellt, diese physikalisch verändert. Physikalische Prozesse wie Akkumulation und Koagulation, denen luftgetragene, sehr kleine Partikel < 1 µm generell und auch in der Alveole der menschlichen Lunge unterworfen sind, werden bei vorheriger Resuspension eines Feinstaubgemischs nicht abgebildet.

Synthetisch hergestellte Feinstaubgemische, welche sowohl hinsichtlich der Größe, der Oberflächenbeschaffenheit als auch ihrer chemischen Inhaltsstoffe genau definiert sind, stellen eine Alternative zur verwendeten PM₁₀-Suspension dar. Sie sind zum Nachweis grundlegender toxikologischer Mechanismen von Feinstaubpartikeln gut geeignet und bieten in ihren genau definierten Eigenschaften gegenüber sehr heterogenen aus der Umwelt stammenden Feinstaubgemischen methodische Vorteile. Ziel dieser Studie ist es jedoch, die natürlich vorkommenden Feinstaubgemische als Umwelttoxine in ihrer Gesamtwirkung auf den menschlichen Körper zu untersuchen. Der Fokus liegt auf der potenziell besonders vulnerablen Gruppe der Pankreaskarzinompatienten.

6.2 Modell der Vollblutinkubation vor dem Hintergrund der verwendeten PM₁₀-Suspension

Als eines von mehreren relevanten Organsystemen wurde in dieser Studie das periphere Vollblut gewählt. Diese Wahl impliziert Limitationen, da das periphere Blut keinen unmittelbaren Kontakt zu Körpergrenzflächen aufweist, mit denen Feinstäube bei Inhalation in direkten Kontakt kommen. Ein direkter Kontakt zu potenziell proinflammatorischen Zellen des Blutsystems in Analogie zur vorliegenden Methodik der hier vorgelegten

Vollblutinkubationen, setzt eine Passage der Partikel über das Kapillarbett der Lunge in den systemischen Blutstrom voraus. Ein Großteil der vorliegenden Studien, wie sie Nakane et al 2012 in einer systematischen Literaturübersicht zusammenfassen, beweist diesen Übertritt in das periphere Blutsystem ab einem Größendurchmesser $< 1 \mu\text{m}$ bzw. $< 1000 \text{ nm}$. Nur wenige Studien wie (Liu, Ibricevic et al. 2009) oder (Li, Li et al. 2019) zeigen Ergebnisse, die für eine Passage der Partikel $> 1 \mu\text{m}$ über die Lunge bis in das periphere Blut sprechen. Für die hier verwendete PM_{10} -Suspension im Vollblutinkubationsmodell ist daher zu diskutieren, dass aufgrund der fehlenden ausführlichen Charakterisierung des Feinstaubgemischs das Vorkommen der Partikelgröße $< 1 \mu\text{m}$ nicht bewiesen werden kann. Zum einen erlaubt die Messung der Partikelgrößenverteilung in der PM_{10} -Suspension mittels Casy technisch bedingt laut Hersteller keinen Nachweis von Partikeln $< 0.7 \mu\text{m}$ oder 700 nm . Zum anderen weist die Porengröße des Sammelgeräts einen unteren Cut-off von $1 \mu\text{m}$ auf. Dennoch sind in der verwendeten PM_{10} -Suspension wie in Abbildung 14 ersichtlich Partikel, die kleiner als $< 1 \mu\text{m}$ sind. Der Peak Diameter liegt bei $1,03 \mu\text{m}$. Man beachte hier die Casy-Counts links des Peaks bei $1,03 \mu\text{m}$ auf der X-Achse, die kleiner als $1,03 \mu\text{m}$ sind. Erklärbar ist dies mit der Annahme, dass Partikel $> 1 \mu\text{m}$ im Sammelgerät kleinere Partikel an sich gebunden tragen und mit in die PM_{10} -Suspension eintragen. Es gibt somit starke Hinweise auf das Vorhandensein von Partikeln $< 1 \mu\text{m}$, wie in dieser Arbeit in Abb. 14 ersichtlich wird. Aufgrund der erläuterten Bauart des Sammelgeräts und der Veränderlichkeit von Feinstaubgemischen in wässriger Suspension, sind für einen zweifelsfreien Nachweis dieser Fraktion in der hier verwendeten PM_{10} -Suspension weitere Analysen erforderlich. Dies stellt daher eine methodische Limitation dieser Arbeit dar.

Dass Großstadtumgebungsstaub vergleichbar der hier verwendeten PM_{10} -Suspension, welcher Partikel $< 1 \mu\text{m}$ enthält, wurde beispielsweise von (Meier, Eeftens et al. 2015) beschrieben.

Andere Modelle zu immunologischen Wirkungen von Feinstaubgemischen wurden in dieser Arbeit nicht untersucht, aber diskutiert und zitiert (Fujii, Hayashi et al. 2001), (Baulig, Sourdeval et al. 2003), (Gioda, Fuentes-Mattei et al. 2011). Die Hypothese ist naheliegend, dass Makrophagen der Lunge nach Feinstaubexposition an einer proinflammatorischen Antwort im Sinne einer „first defense“ beteiligt sind und die lokale Zytokinsynthese einen systemischen Effekt haben kann. Daher ist es ein sehr plausibler Ansatz, Immunzellen wie Makrophagen der Lunge und deren Zytokinsekretion als Endpunkt einer Studie zum proinflammatorischen Potenzial von Feinstaubgemischen zu wählen. Sie kommen in vivo physiologisch und anatomisch bedingt früh in Kontakt mit luftgetragenen Feinstaubpartikeln

eines Durchmessers $< 2,5 \mu\text{m}$, ohne dass ein Übertritt der Feinstaubpartikel in das periphere Blut hierfür erforderlich ist.

Die experimentelle Exposition von alveolären Makrophagen aus der Ratte mit Feinstaubpartikeln (Hetland, Cassee et al. 2005) als Primärzellkultur umgeht methodisch die genannten Limitationen der hier vorgelegten Dissertation teilweise, geht jedoch andere methodische Kompromisse ein. Eine konventionelle Monozellkultur in Kulturmedium spiegelt die alveoläre Mikroumgebung der Lunge nur sehr eingeschränkt wider. Das gesamte immunologische Netzwerk sowie zelluläre und plasmatische Arsenal des menschlichen Immunsystems wird in einem Zellkulturexperiment mit einer einzigen Zellpopulation nur sehr eingeschränkt abgebildet. Es wurde daher versucht, durch Ko-Kulturexperimente von Zellkulturlinien des alveolären Epithels (A549) mit Makrophagen die Bedingungen der $\text{PM}_{2.5}$ -Exposition in vivo zu modellieren (Wang, Zhang et al. 2020). Die Autoren demonstrierten, dass die Stärke der Zytokinantwort nach Stimulation mit einer $\text{PM}_{2.5}$ -Suspension stark abhängig davon war, ob die A549-Zellen vollständig in Zellkulturmedium getaucht waren oder im Air-liquid Interface Zellkulturansatz apikal Kontakt zur Umgebungsluft hatten. Für Untersuchungen, die sich auf lokale Effekte in der Lunge beziehen, ist das Air-liquid Interface dennoch eine adäquate Alternative. In der hier vorgelegten Arbeit sollten jedoch systemische Effekte untersucht werden. Die Wahl des peripheren Vollbluts mit seiner physiologischen Vielfalt an immunologischen Interaktionspartnern stellt unter diesem Gesichtspunkt einen methodischen Vorteil dar. Sie erlaubt außerdem die zweite Hypothese dieser Arbeit zu überprüfen, ob Vollblut von Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Pankreaskarzinom, stärker prothrombogen auf Exposition mit einer PM_{10} -Suspension reagiert als das Vollblut gesunder Probanden.

Das für diese Studie gewählte Modell stellt einen Kompromiss dar und weist naturgemäß methodische Limitationen auf. Die Situation des Aufeinandertreffens von luftgetragenen Partikeln und alveolären Oberflächen im Rahmen der inhalativen Exposition mit anschließendem Durchtritt von Feinstaubpartikeln durch das Kapillarnetz in den systemischen Blutkreislauf, kann so nur eingeschränkt modelliert werden.

6.3 Prothrombogene Wirkung der PM_{10} -Suspension

In dieser Dissertation wurden isoliert die Gerinnungsfaktoren Antithrombin, Prothrombin, Plasmin/Plasminogen und Faktor XIII untersucht. Die Untersuchung einzelner Gerinnungsfaktoren erlaubt jedoch nur indirekte Rückschlüsse auf die klinisch tatsächlich vorliegende Gerinnungssituation. Die vorliegende Studie beinhaltet keine funktionellen

Gerinnungstests und kann somit methodisch bedingt keinen direkten Nachweis einer prothrombogenen Wirksamkeit der benutzten PM₁₀-Suspension liefern. Obwohl Gruppenunterschiede zwischen gesunden Probanden und Pankreaskarzinompatienten gesehen wurden, konnte ein spezifisch durch PM₁₀-Suspension hervorgerufener Unterschied nur für Faktor XIII gezeigt werden, was im Diskussionsteil dieser Arbeit erörtert wurde. Aufgrund organisatorischer Abläufe in der Onkologischen Ambulanz der Klinik, konnte in dieser Dissertation leider keine Thrombelastografie (ROTEM) direkt nach der Blutentnahme durchgeführt werden. Bei diesem funktionellen Gerinnungstest wäre ein Vergleich der beiden untersuchten Gruppen wegen der medikamentösen therapeutischen Antikoagulation der Pankreaskarzinompatienten erschwert gewesen. Ein Vergleich innerhalb der jeweiligen Gruppen im Sinne eines Matched-pairs-Test wäre jedoch sehr attraktiv. Die Parameter MCF (Maximum Clot Firmness) und auch die Thrombusstabilität über die Zeit im ROTEM sind hier von besonderem Interesse aufgrund der gezeigten Unterschiede in der Faktor XIII-Konzentration und dessen physiologischer Wirkung der Fibrinquervernetzung und Thrombusstabilisierung.

Das Fehlen eines funktionellen Tests der Gerinnung stellt somit in der vorgelegten Dissertation eine methodische Einschränkung dar. Auch die Thrombozytenaktivierung, wie sie in der klinischen Labordiagnostik beispielsweise durch Simulation der Thrombozytenaktivierung an einer Kollagenmembran (PFA100-Test) vorgenommen werden kann, liefert einen funktionellen Gerinnungsparameter, dessen Untersuchung prothrombogene Eigenschaften von Feinstaubpartikeln funktionell abbilden könnte.

Zusammenfassend konnte die funktionelle Endstrecke der plasmatischen und zellulären Gerinnungskaskade in der vorliegenden Dissertation nicht untersucht werden. Die Rückschlüsse dieser Arbeit auf die Prothrombogenität sind damit indirekt und beschränken sich auf Faktor XIII.

Es bleibt festzustellen, dass für weitere Experimente, die einer ähnlichen Fragestellung wie in der hier vorgelegten Dissertation nachgehen, von einer Ethikkommission kritisch zu prüfende Inhalationsexperimente mit anschließenden Vollblutanalysen an freiwilligen Probanden einen Goldstandard darstellen würden. Ein methodisch sauberer Ansatz wäre bei hoher Invasivität die Untersuchung von bronchoalveolärer Lavage (BAL), um ex vivo humane Lungenmakrophagen zu isolieren. Aus ethischen Gründen wäre hier sehr wahrscheinlich nur die Exposition mit einer niedrigen Konzentration von Feinstaub über einen kurzen Zeitraum möglich. Alternativ könnten Mitarbeiter entsprechend Feinstaub-belasteter Arbeitsplätze als

Probanden erwogen werden. Mithilfe eines solchen Vorgehens könnte, unter Einhaltung aller ethischer Richtlinien und Grundsätze, untersucht werden, welchen Anteil alveoläre Makrophagen im Vergleich zu Zellen im Vollblut an einer proinflammatorischen Antwort nach inhalativer Exposition mit Feinstaub $< 1 \mu\text{m}$ Durchmesser haben.

7. Schlussfolgerung

Die hier vorgelegten Ergebnisse sind suggestiv für einen durch PM₁₀-Stimulation induzierten Verbrauch von Faktor XIII, der in Heparinblut von Patienten mit Pankreaskarzinom vorlag, nicht jedoch in Heparinblut gesunder Probanden. Zusammen mit der in dieser Studie zum ersten Mal nachgewiesenen, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe statistisch signifikant höheren IL-8-Produktion nach PM₁₀-Stimulation von Heparinblut, zeigt diese Studie zwei PM₁₀-sensible Parameter auf, die funktionell miteinander in Verbindung stehen könnten: Sowohl IL-8, wie weiter oben beschrieben durch IL8-Rezeptoren auf Erythrozyten, als auch Faktor XIII als Transglutaminase in der Quervernetzung von Fibrinmolekülen, spielen auf sehr unterschiedliche Art, aber letztlich in funktionell synergistischer Weise, eine zentrale Rolle bei der Ausbildung der Thrombusstabilität. Dies könnte ein erster mechanistischer Hinweis darauf sein, dass Patienten mit Pankreaskarzinom hinsichtlich gesundheitsschädigender Wirkungen von PM₁₀ im Endpunkt VTE eine besonders vulnerable Gruppe darstellen. Unterstrichen wird die Relevanz dieser Ergebnisse für IL-8 und Faktor XIII durch die für IL-6 erhobenen Daten. Diese zeigten im Heparinblut von Pankreaskarzinompatienten eine statistisch signifikant höhere IL-6-Konzentration bereits 4h nach Stimulation mit PM₁₀.

Die hier dargestellten Ergebnisse sind nach bestem Wissen des Autors neue, bisher in der Fachliteratur nicht veröffentlichte Erkenntnisse. Sie geben Anlass, in zukünftigen *in vitro* Studien die für VTE relevanten Endpunkte Thrombusstabilität und D-Dimerkonzentration nach PM₁₀-Stimulation zu untersuchen. Weiterhin bestätigt die vorliegende Arbeit früher publizierte Hinweise (Pierdominici, Maselli et al. 2014) darauf, dass PM₁₀ die T-Zellaktivität hemmt. Aus onkologischer Perspektive wäre das für Patienten mit Pankreaskarzinom mit ohnehin eingeschränktem Allgemeinzustand ein von PM₁₀ ausgehender zusätzlicher Risikofaktor. Offen ist hier allerdings, ob eine PM₁₀-induzierte Hemmung der T-Zellaktivität klinisch relevante immunologische oder gar onkologische Folgen hätte.

Auch wenn aus der vorgelegten Studie keine Handlungsempfehlungen hinsichtlich einer Verhaltensänderung oder Therapieempfehlungen für Patienten mit Pankreaskarzinom abgeleitet werden können, stellt sie jedoch Daten zur Verfügung, die helfen können, die weitreichenden systemischen Folgen des Pankreaskarzinoms in einen umweltmedizinischen Zusammenhang zu stellen.

8. Literaturverzeichnis

- Agarwal, B., E. Abu-Hamda, K. L. Molke, A. M. Correa and L. Ho (2004). "Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration and multidetector spiral CT in the diagnosis of pancreatic cancer." Am J Gastroenterol **99**(5): 844-850.
- Akl, E. A., L. Kahale, I. Neumann, M. Barba, F. Sperati, I. Terrenato, P. Muti and H. Schunemann (2014). "Anticoagulation for the initial treatment of venous thromboembolism in patients with cancer." Cochrane Database Syst Rev(6): Cd006649.
- Anderson, W. B., P. M. Huck, D. G. Dixon and C. I. Mayfield (2003). "Endotoxin inactivation in water by using medium-pressure UV lamps." Appl Environ Microbiol **69**(5): 3002-3004.
- Ay, C., D. Dunkler, R. Simanek, J. Thaler, S. Koder, C. Marosi, C. Zielinski and I. Pabinger (2011). "Prediction of venous thromboembolism in patients with cancer by measuring thrombin generation: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study." J Clin Oncol **29**(15): 2099-2103.
- Baccarelli, A., I. Martinelli, A. Zanobetti, P. Grillo, L. F. Hou, P. A. Bertazzi, P. M. Mannucci and J. Schwartz (2008). "Exposure to particulate air pollution and risk of deep vein thrombosis." Arch Intern Med **168**(9): 920-927.
- Baulig, A., M. Sourdeval, M. Meyer, F. Marano and A. Baeza-Squiban (2003). "Biological effects of atmospheric particles on human bronchial epithelial cells. Comparison with diesel exhaust particles." Toxicol In Vitro **17**(5-6): 567-573.
- Beutler, B. (2000). "Endotoxin, Toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity." Current Opinion in Microbiology **3**(1): 23-28.
- Bjornsson, E., S. Ismael, S. Nejd et and A. Kilander (2003). "Severe jaundice in Sweden in the new millennium: causes, investigations, treatment and prognosis." Scand J Gastroenterol **38**(1): 86-94.
- Blanchet, S., K. Ramgolam, A. Baulig, F. Marano and A. Baeza-Squiban (2004). "Fine particulate matter induces amphiregulin secretion by bronchial epithelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol **30**(4): 421-427.
- Bossmann, K., S. Bach, C. Hoflich, K. Valtanen, R. Heinze, A. Neumann, W. Straff and K. Suring (2016). "Holi colours contain PM10 and can induce pro-inflammatory responses." J Occup Med Toxicol **11**(1): 42.
- Burris, H. A., 3rd, M. J. Moore, J. Andersen, M. R. Green, M. L. Rothenberg, M. R. Modiano, M. C. Cripps, R. K. Portenoy, A. M. Storniolo, P. Tarassoff, R. Nelson, F. A. Dorr, C. D. Stephens and D. D. Von Hoff (1997). "Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial." J Clin Oncol **15**(6): 2403-2413.

- Cadroy, Y., D. Pierrejean, B. Fontan, P. Sie and B. Boneu (1992). "Influence of aging on the activity of the hemostatic system: prothrombin fragment 1+2, thrombin-antithrombin III complexes and D-dimers in 80 healthy subjects with age ranging from 20 to 94 years." Nouv Rev Fr Hematol **34**(1): 43-46.
- Calder, K. K., M. Herbert and S. O. Henderson (2005). "The mortality of untreated pulmonary embolism in emergency department patients." Ann Emerg Med **45**(3): 302-310.
- Chan, C. S., A. Ming-Lum, G. B. Golds, S. J. Lee, R. J. Anderson and A. L. Mui (2012). "Interleukin-10 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha translation through a SHIP1-dependent pathway." J Biol Chem **287**(45): 38020-38027.
- Chew, H. K., T. Wun, D. Harvey, H. Zhou and R. H. White (2006). "Incidence of venous thromboembolism and its effect on survival among patients with common cancers." Arch Intern Med **166**(4): 458-464.
- Cohen, A. J., M. Brauer, R. Burnett, H. R. Anderson, J. Frostad, K. Estep, K. Balakrishnan, B. Brunekreef, L. Dandona, R. Dandona, V. Feigin, G. Freedman, B. Hubbell, A. Jobling, H. Kan, L. Knibbs, Y. Liu, R. Martin, L. Morawska, C. A. Pope, 3rd, H. Shin, K. Straif, G. Shaddick, M. Thomas, R. van Dingenen, A. van Donkelaar, T. Vos, C. J. L. Murray and M. H. Forouzanfar (2017). "Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015." Lancet **389**(10082): 1907-1918.
- Colucci, G., R. Labianca, F. Di Costanzo, V. Gebbia, G. Carteni, B. Massidda, E. Dapretto, L. Manzione, E. Piazza, M. Sannicolò, M. Ciaparrone, L. Cavanna, F. Giuliani, E. Maiello, A. Testa, P. Pederzoli, M. Falconi, C. Gallo, M. Di Maio and F. Perrone (2010). "Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with single-agent gemcitabine as first-line treatment of patients with advanced pancreatic cancer: the GIP-1 study." J Clin Oncol **28**(10): 1645-1651.
- Compte, N., K. Zouaoui Boudjeltia, M. Vanhaeverbeek, S. De Breucker, J. Tassignon, A. Trelcat, T. Pepersack and S. Goriely (2013). "Frailty in old age is associated with decreased interleukin-12/23 production in response to toll-like receptor ligation." PLoS One **8**(6): e65325.
- Connolly, G. C. and A. A. Khorana (2009). "Risk stratification for cancer-associated venous thromboembolism." Best Pract Res Clin Haematol **22**(1): 35-47.
- Conroy, T., F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouche, R. Guimbaud, Y. Becouarn, A. Adenis, J. L. Raoul, S. Gourgou-Bourgade, C. de la Fouchardiere, J. Bennouna, J. B. Bachet, F. Khemissa-Akouz, D. Pere-Verge, C. Delbaldo, E. Assenat, B. Chauffert, P. Michel, C. Montoto-Grillot and M. Ducreux (2011). "FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer." N Engl J Med **364**(19): 1817-1825.
- Conroy, T., P. Hammel, M. Hebbar, M. Ben Abdelghani, A. C. Wei, J. L. Raoul, L. Choné, E. Francois, P. Artru, J. J. Biagi, T. Lecomte, E. Assenat, R. Faroux, M. Ychou, J. Volet, A. Sauvanet, G. Breysacher, F. Di Fiore, C. Cripps, P. Kavan, P. Texereau, K. Bouhier-Leporrier, F. Khemissa-Akouz, J. L. Legoux, B. Juzyna, S. Gourgou, C. J. O'Callaghan, C. Jouffroy-Zeller, P. Rat, D. Malka, F. Castan and J. B. Bachet (2018). "FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer." N Engl J Med **379**(25): 2395-2406.

- Daigle, C. C., D. C. Chalupa, F. R. Gibb, P. E. Morrow, G. Oberdorster, M. J. Utell and M. W. Frampton (2003). "Ultrafine particle deposition in humans during rest and exercise." Inhal Toxicol **15**(6): 539-552.
- Dardik, R., J. Loscalzo, R. Eskaraev and A. Inbal (2005). "Molecular mechanisms underlying the proangiogenic effect of factor XIII." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(3): 526-532.
- De Fijter, J. W., M. R. Daha, W. E. Schroeijers, L. A. van Es and C. Van Kooten (1998). "Increased IL-10 production by stimulated whole blood cultures in primary IgA nephropathy." Clin Exp Immunol **111**(2): 429-434.
- de Haar, C., I. Hassing, M. Bol, R. Bleumink and R. Pieters (2006). "Ultrafine but not fine particulate matter causes airway inflammation and allergic airway sensitization to co-administered antigen in mice." Clin Exp Allergy **36**(11): 1469-1479.
- Deskur, A., D. Salata, M. Budkowska, B. Dolegowska, T. Starzynska and W. Blogowski (2014). "Selected hemostatic parameters in patients with pancreatic tumors." Am J Transl Res **6**(6): 768-776.
- Dockery, D. W., C. A. Pope, 3rd, X. Xu, J. D. Spengler, J. H. Ware, M. E. Fay, B. G. Ferris, Jr. and F. E. Speizer (1993). "An association between air pollution and mortality in six U.S. cities." N Engl J Med **329**(24): 1753-1759.
- Doi, R., M. Imamura, R. Hosotani, T. Imaizumi, T. Hatori, K. Takasaki, A. Funakoshi, H. Wakasugi, T. Asano, S. Hishinuma, Y. Ogata, M. Sunamura, K. Yamaguchi, M. Tanaka, S. Takao, T. Aikou, K. Hirata, H. Maguchi, K. Aiura, T. Aoki, A. Kakita, M. Sasaki, M. Ozaki, S. Matsusue, S. Higashide, H. Noda, S. Ikeda, S. Maetani and S. Yoshida (2008). "Surgery versus radiochemotherapy for resectable locally invasive pancreatic cancer: final results of a randomized multi-institutional trial." Surg Today **38**(11): 1021-1028.
- Egberts, J. H., V. Cloosters, A. Noack, B. Schniewind, L. Thon, S. Klose, B. Kettler, C. von Forstner, C. Kneitz, J. Tepel, D. Adam, H. Wajant, H. Kalthoff and A. Trauzold (2008). "Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis." Cancer Res **68**(5): 1443-1450.
- Esmon, C. T. (2008). "Crosstalk between inflammation and thrombosis." Maturitas **61**(1-2): 122-131.
- Esmon, C. T. (2009). "Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis." Blood Rev **23**(5): 225-229.
- Faille, D., N. Ajzenberg, L. de Chaisemartin, V. Granger, S. Chollet-Martin, E. de Raucourt, P. Hammel, P. Levy, P. Ruzsiewicz and V. Rebours (2016). "OC-06 - Pro-thrombotic biomarkers in pancreatic diseases: are they specific of cancer?" Thromb Res **140 Suppl 1**: S170-171.
- Falanga, A., M. Panova-Noeva and L. Russo (2009). "Procoagulant mechanisms in tumour cells." Best Pract Res Clin Haematol **22**(1): 49-60.

- Fan, K., C. Yang, Z. Fan, Q. Huang, Y. Zhang, H. Cheng, K. Jin, Y. Lu, Z. Wang, G. Luo, X. Yu and C. Liu (2018). "MUC16 C terminal-induced secretion of tumor-derived IL-6 contributes to tumor-associated Treg enrichment in pancreatic cancer." Cancer Lett **418**: 167-175.
- Fujii, T., S. Hayashi, J. C. Hogg, R. Vincent and S. F. Van Eeden (2001). "Particulate matter induces cytokine expression in human bronchial epithelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol **25**(3): 265-271.
- Giorda, A., E. Fuentes-Mattei and B. Jimenez-Velez (2011). "Evaluation of cytokine expression in BEAS cells exposed to fine particulate matter (PM2.5) from specialized indoor environments." Int J Environ Health Res **21**(2): 106-119.
- Glimelius, B., K. Hoffman, P. O. Sjoden, G. Jacobsson, H. Sellstrom, L. K. Enander, T. Linne and C. Svensson (1996). "Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer." Ann Oncol **7**(6): 593-600.
- Grignani, G. and A. Maiolo (2000). "Cytokines and hemostasis." Haematologica **85**(9): 967-972.
- Heinrich, J., M. Pitz, W. Bischof, N. Krug and P. J. A. Borm (2003). "Endotoxin in fine (PM2.5) and coarse (PM2.5–10) particle mass of ambient aerosols. A temporo-spatial analysis." Atmospheric Environment **37**(26): 3659-3667.
- Heit, J. A., M. D. Silverstein, D. N. Mohr, T. M. Petterson, W. M. O'Fallon and L. J. Melton, 3rd (2000). "Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study." Arch Intern Med **160**(6): 809-815.
- Hetland, R. B., F. R. Cassee, M. Låg, M. Refsnes, E. Dybing and P. E. Schwarze (2005). "Cytokine release from alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter: heterogeneity in relation to size, city and season." Part Fibre Toxicol **2**: 4.
- Hidalgo, M. (2010). "Pancreatic cancer." N Engl J Med **362**(17): 1605-1617.
- Jiang, Z., W. Song, X. Zhou and Y. Zhang (2004). "[Study on mouse pulmonary acute injury induced by air-borne PM2.5]." Wei Sheng Yan Jiu **33**(3): 264-266.
- Kahn, S. R. (2009). "How I treat postthrombotic syndrome." Blood **114**(21): 4624-4631.
- Katz, M. H., R. Marsh, J. M. Herman, Q. Shi, E. Collison, A. P. Venook, H. L. Kindler, S. R. Alberts, P. Philip, A. M. Lowy, P. W. Pisters, M. C. Posner, J. D. Berlin and S. A. Ahmad (2013). "Borderline resectable pancreatic cancer: need for standardization and methods for optimal clinical trial design." Ann Surg Oncol **20**(8): 2787-2795.
- Kennedy, T., A. J. Ghio, W. Reed, J. Samet, J. Zagorski, J. Quay, J. Carter, L. Dailey, J. R. Hoidal and R. B. Devlin (1998). "Copper-dependent inflammation and nuclear factor-kappaB activation by particulate air pollution." Am J Respir Cell Mol Biol **19**(3): 366-378.
- Khorana, A. A. and G. C. Connolly (2009). "Assessing risk of venous thromboembolism in the patient with cancer." J Clin Oncol **27**(29): 4839-4847.

- Khorana, A. A., C. W. Francis, E. Culakova, N. M. Kuderer and G. H. Lyman (2007). "Frequency, risk factors, and trends for venous thromboembolism among hospitalized cancer patients." Cancer **110**(10): 2339-2346.
- Khorana, A. A., S. Noble, A. Y. Y. Lee, G. Soff, G. Meyer, C. O'Connell and M. Carrier (2018). "Role of direct oral anticoagulants in the treatment of cancer-associated venous thromboembolism: guidance from the SSC of the ISTH." J Thromb Haemost **16**(9): 1891-1894.
- Khorana, A. A., G. A. Soff, A. K. Kakkar, S. Vadhan-Raj, H. Riess, T. Wun, M. B. Streiff, D. A. Garcia, H. A. Liebman, C. P. Belani, E. M. O'Reilly, J. N. Patel, H. A. Yimer, P. Wildgoose, P. Burton, U. Vijapurkar, S. Kaul, J. Eikelboom, R. McBane, K. A. Bauer, N. M. Kuderer and G. H. Lyman (2019). "Rivaroxaban for Thromboprophylaxis in High-Risk Ambulatory Patients with Cancer." N Engl J Med **380**(8): 720-728.
- Klapman, J. B., K. J. Chang, J. G. Lee and P. Nguyen (2005). "Negative predictive value of endoscopic ultrasound in a large series of patients with a clinical suspicion of pancreatic cancer." Am J Gastroenterol **100**(12): 2658-2661.
- Kumar, P., L. Morawska, W. Birmili, P. Paasonen, M. Hu, M. Kulmala, R. M. Harrison, L. Norford and R. Britter (2014). "Ultrafine particles in cities." Environ Int **66**: 1-10.
- Laporte, S., P. Mismetti, H. Decousus, F. Uresandi, R. Otero, J. L. Lobo and M. Monreal (2008). "Clinical predictors for fatal pulmonary embolism in 15,520 patients with venous thromboembolism: findings from the Registro Informatizado de la Enfermedad TromboEmbolica venosa (RIETE) Registry." Circulation **117**(13): 1711-1716.
- Lee, H. S., M. J. Chung, J. Y. Park, S. Bang, S. W. Park, H. G. Kim, M. H. Noh, S. H. Lee, Y. T. Kim, H. J. Kim, C. D. Kim, D. K. Lee, K. B. Cho, C. M. Cho, J. H. Moon, D. U. Kim, D. H. Kang, Y. K. Cheon, H. S. Choi, T. H. Kim, J. K. Kim, J. Moon, H. J. Shin and S. Y. Song (2017). "A randomized, multicenter, phase III study of gemcitabine combined with capecitabine versus gemcitabine alone as first-line chemotherapy for advanced pancreatic cancer in South Korea." Medicine (Baltimore) **96**(1): e5702.
- Levi, M., T. van der Poll and H. ten Cate (2006). "Tissue factor in infection and severe inflammation." Semin Thromb Hemost **32**(1): 33-39.
- Li, D., Y. Li, G. Li, Y. Zhang, J. Li and H. Chen (2019). "Fluorescent reconstitution on deposition of PM_{2.5} in lung and extrapulmonary organs." Proc Natl Acad Sci U S A **116**(7): 2488-2493.
- Li, D., Y. Li, G. Li, Y. Zhang, J. Li and H. Chen (2019). "Fluorescent reconstitution on deposition of PM_{2.5} in lung and extrapulmonary organs." Proc Natl Acad Sci U S A **116**(7): 2488-2493.
- Lightner, A. M., R. E. Glasgow, T. H. Jordan, A. D. Krassner, L. W. Way, S. J. Mulvihill and K. S. Kirkwood (2004). "Pancreatic resection in the elderly." J Am Coll Surg **198**(5): 697-706.
- Litzendorf, M. E. and B. Satiani (2011). "Superficial venous thrombosis: disease progression and evolving treatment approaches." Vasc Health Risk Manag **7**: 569-575.

- Liu, Y., A. Ibricevic, J. A. Cohen, J. L. Cohen, S. P. Gunsten, J. M. Fréchet, M. J. Walter, M. J. Welch and S. L. Brody (2009). "Impact of hydrogel nanoparticle size and functionalization on in vivo behavior for lung imaging and therapeutics." Mol Pharm **6**(6): 1891-1902.
- Lyman, G. H. and A. A. Khorana (2009). "Cancer, clots and consensus: new understanding of an old problem." J Clin Oncol **27**(29): 4821-4826.
- Meier, R., M. Eeftens, H. C. Phuleria, A. Ineichen, E. Corradi, M. Davey, M. Fierz, R. E. Ducret-Stich, I. Aguilera, C. Schindler, T. Rochat, N. Probst-Hensch, M. Y. Tsai and N. Künzli (2015). "Differences in indoor versus outdoor concentrations of ultrafine particles, PM_{2.5}, PM_{absorbance} and NO₂ in Swiss homes." J Expo Sci Environ Epidemiol **25**(5): 499-505.
- Moore, M. J., D. Goldstein, J. Hamm, A. Figer, J. R. Hecht, S. Gallinger, H. J. Au, P. Murawa, D. Walde, R. A. Wolff, D. Campos, R. Lim, K. Ding, G. Clark, T. Voskoglou-Nomikos, M. Ptasynski and W. Parulekar (2007). "Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group." J Clin Oncol **25**(15): 1960-1966.
- Mutlu, G. M., D. Green, A. Bellmeyer, C. M. Baker, Z. Burgess, N. Rajamannan, J. W. Christman, N. Foiles, D. W. Kamp, A. J. Ghio, N. S. Chandel, D. A. Dean, J. I. Sznajder and G. R. Budinger (2007). "Ambient particulate matter accelerates coagulation via an IL-6-dependent pathway." J Clin Invest **117**(10): 2952-2961.
- Nakane, H. (2012). "Translocation of particles deposited in the respiratory system: a systematic review and statistical analysis." Environ Health Prev Med **17**(4): 263-274.
- Nemmar, A., M. F. Hoylaerts and B. Nemery (2006). "Effects of particulate air pollution on hemostasis." Clin Occup Environ Med **5**(4): 865-881.
- Nemmar, A., H. Vanbilloen, M. F. Hoylaerts, P. H. Hoet, A. Verbruggen and B. Nemery (2001). "Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster." Am J Respir Crit Care Med **164**(9): 1665-1668.
- Neoptolemos, J. P., J. A. Dunn, D. D. Stocken, J. Almond, K. Link, H. Beger, C. Bassi, M. Falconi, P. Pederzoli, C. Dervenis, L. Fernandez-Cruz, F. Lacaine, A. Pap, D. Spooner, D. J. Kerr, H. Friess and M. W. Büchler (2001). "Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial." Lancet **358**(9293): 1576-1585.
- Neoptolemos, J. P., D. H. Palmer, P. Ghaneh, E. E. Psarelli, J. W. Valle, C. M. Halloran, O. Faluyi, D. A. O'Reilly, D. Cunningham, J. Wadsley, S. Darby, T. Meyer, R. Gillmore, A. Anthony, P. Lind, B. Glimelius, S. Falk, J. R. Izbicki, G. W. Middleton, S. Cummins, P. J. Ross, H. Wasan, A. McDonald, T. Crosby, Y. T. Ma, K. Patel, D. Sherriff, R. Soomal, D. Borg, S. Sothi, P. Hammel, T. Hackert, R. Jackson and M. W. Buchler (2017). "Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial." Lancet **389**(10073): 1011-1024.
- Ng, T. H., G. J. Britton, E. V. Hill, J. Verhagen, B. R. Burton and D. C. Wraith (2013). "Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10." Front Immunol **4**: 129.

- O'Brien, M. (2012). "The reciprocal relationship between inflammation and coagulation." Top Companion Anim Med **27**(2): 46-52.
- Oettle, H., P. Neuhaus, A. Hochhaus, J. T. Hartmann, K. Gellert, K. Ridwelski, M. Niedergethmann, C. Zulke, J. Fahlke, M. B. Arning, M. Sinn, A. Hinke and H. Riess (2013). "Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial." Jama **310**(14): 1473-1481.
- Okada, S., T. Okusaka, H. Ishii, A. Kyogoku, M. Yoshimori, N. Kajimura, K. Yamaguchi and T. Kakizoe (1998). "Elevated serum interleukin-6 levels in patients with pancreatic cancer." Jpn J Clin Oncol **28**(1): 12-15.
- Palacios, R. (1982). "Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation." J Immunol **128**(1): 337-342.
- Pelzer, U., B. Opitz, G. Deuschinoff, M. Stauch, P. C. Reitzig, S. Hahnfeld, L. Müller, M. Grunewald, J. M. Stieler, M. Sinn, T. Denecke, S. Bischoff, H. Oettle, B. Dörken and H. Riess (2015). "Efficacy of Prophylactic Low-Molecular Weight Heparin for Ambulatory Patients With Advanced Pancreatic Cancer: Outcomes From the CONKO-004 Trial." J Clin Oncol **33**(18): 2028-2034.
- Pierdominici, M., A. Maselli, S. Cecchetti, A. Tinari, A. Mastrofrancesco, M. Alfe, V. Gargiulo, C. Beatrice, G. Di Blasio, G. Carpinelli, E. Ortona, A. Giovannetti and S. Fiorito (2014). "Diesel exhaust particle exposure in vitro impacts T lymphocyte phenotype and function." Part Fibre Toxicol **11**: 74.
- Pope, C. A., 3rd (2015). "Ischaemic heart disease and fine particulate air pollution." Heart **101**(4): 248-249.
- Porfidia, A., A. Carnicelli, N. Bonadia, R. Pola and R. Landolfi (2016). "Controversies in venous thromboembolism: the unique case of isolated distal deep vein thrombosis." Intern Emerg Med **11**(6): 775-779.
- Prandoni, P., A. W. Lensing, A. Piccioli, E. Bernardi, P. Simioni, B. Girolami, A. Marchiori, P. Sabbion, M. H. Prins, F. Noventa and A. Girolami (2002). "Recurrent venous thromboembolism and bleeding complications during anticoagulant treatment in patients with cancer and venous thrombosis." Blood **100**(10): 3484-3488.
- Raskob, G. E., N. van Es, P. Verhamme, M. Carrier, M. Di Nisio, D. Garcia, M. A. Grosso, A. K. Kakkar, M. J. Kovacs, M. F. Mercuri, G. Meyer, A. Segers, M. Shi, T. F. Wang, E. Yeo, G. Zhang, J. I. Zwicker, J. I. Weitz and H. R. Büller (2018). "Edoxaban for the Treatment of Cancer-Associated Venous Thromboembolism." N Engl J Med **378**(7): 615-624.
- Reisman, Y., C. H. Gips, S. M. Lavelle and J. H. Wilson (1996). "Clinical presentation of (subclinical) jaundice--the Euricterus project in The Netherlands. United Dutch Hospitals and Euricterus Project Management Group." Hepatogastroenterology **43**(11): 1190-1195.

- Rice, M. B., P. L. Ljungman, E. H. Wilker, K. S. Dorans, D. R. Gold, J. Schwartz, P. Koutrakis, G. R. Washko, G. T. O'Connor and M. A. Mittleman (2015). "Long-term exposure to traffic emissions and fine particulate matter and lung function decline in the Framingham heart study." Am J Respir Crit Care Med **191**(6): 656-664.
- Rietveld, I. M., M. Schreuder, P. H. Reitsma and M. H. A. Bos (2018). "Elevated coagulation factor levels affect the tissue factor-threshold in thrombin generation." Thromb Res **172**: 104-109.
- Rosendaal, F. R. and P. H. Reitsma (2009). "Genetics of venous thrombosis." J Thromb Haemost **7 Suppl 1**: 301-304.
- S2-Leitlinie, A. (2015). S2-Leitlinie: Diagnostik und Therapie der Venenthrombose und Lungenembolie, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften.
- Saghazadeh, A., S. Hafizi and N. Rezaei (2015). "Inflammation in venous thromboembolism: Cause or consequence?" Int Immunopharmacol **28**(1): 655-665.
- Salvi, S. S., C. Nordenhall, A. Blomberg, B. Rudell, J. Pourazar, F. J. Kelly, S. Wilson, T. Sandstrom, S. T. Holgate and A. J. Frew (2000). "Acute exposure to diesel exhaust increases IL-8 and GRO-alpha production in healthy human airways." Am J Respir Crit Care Med **161**(2 Pt 1): 550-557.
- Schikowski, T., D. Sugiri, U. Ranft, U. Gehring, J. Heinrich, H. E. Wichmann and U. Kramer (2005). "Long-term air pollution exposure and living close to busy roads are associated with COPD in women." Respir Res **6**: 152.
- Seufferlein, T. a. A., Porzner, M.a, Becker, T.b, Budach, V.c, Ceyhan, G.d, Esposito, I.e, Fietkau, R.f, Follmann, M.g, Friess, H.d, Galle, P.h, Geiler, M.i, Glanemann, M.j, Gress, T.k, Heinemann, V.l, Hohenberger, W.m, Hopt, U.n, Izbicki, J.o, Klar, E.p, Kleeff, J.d, Kopp, I.q, Kullmann, F.r, Langer, T.g, Langrehr, J.s, Lerch, M.t, Löhr, M.u, Lüttges, J.v, Lutz, M.w, Mayerle, J.t, Michl, P.k, Möller, P.x, Molls, M.y, Münter, M.z, Nothacker, M.aa, Oettle, H.ab, Post, S.ac, Reinacher-Schick, A.ad, Röcken, C.ae, Roeb, E.af, Saeger, H.ag, Schmid, R.a. (2013, 31.10.2018). "S3-guideline exocrine pancreatic cancer." Retrieved 11.04.2019, 2019, from <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/032-010OL.html>.
- Shadie, A. M., C. Herbert and R. K. Kumar (2014). "Ambient particulate matter induces an exacerbation of airway inflammation in experimental asthma: role of interleukin-33." Clin Exp Immunol **177**(2): 491-499.
- Stouthard, J. M., M. Levi, C. E. Hack, C. H. Veenhof, H. A. Romijn, H. P. Sauerwein and T. van der Poll (1996). "Interleukin-6 stimulates coagulation, not fibrinolysis, in humans." Thromb Haemost **76**(5): 738-742.
- Sun, W., H. Ren, C. T. Gao, W. D. Ma, L. Luo, Y. Liu, P. Jin and J. H. Hao (2015). "Clinical and Prognostic Significance of Coagulation Assays in Pancreatic Cancer Patients With Absence of Venous Thromboembolism." Am J Clin Oncol **38**(6): 550-556.
- Tanaka, T., M. Narazaki and T. Kishimoto (2014). "IL-6 in inflammation, immunity, and disease." Cold Spring Harb Perspect Biol **6**(10): a016295.

- Ueno, H., T. Ioka, M. Ikeda, S. Ohkawa, H. Yanagimoto, N. Boku, A. Fukutomi, K. Sugimori, H. Baba, K. Yamao, T. Shimamura, M. Sho, M. Kitano, A. L. Cheng, K. Mizumoto, J. S. Chen, J. Furuse, A. Funakoshi, T. Hatori, T. Yamaguchi, S. Egawa, A. Sato, Y. Ohashi, T. Okusaka and M. Tanaka (2013). "Randomized phase III study of gemcitabine plus S-1, S-1 alone, or gemcitabine alone in patients with locally advanced and metastatic pancreatic cancer in Japan and Taiwan: GEST study." J Clin Oncol **31**(13): 1640-1648.
- Utell, M. J., M. W. Frampton, W. Zareba, R. B. Devlin and W. E. Cascio (2002). "Cardiovascular effects associated with air pollution: potential mechanisms and methods of testing." Inhal Toxicol **14**(12): 1231-1247.
- Versteeg, H. H., J. W. Heemskerk, M. Levi and P. H. Reitsma (2013). "New fundamentals in hemostasis." Physiol Rev **93**(1): 327-358.
- Verstraete, M. and D. Collen (1986). "Thrombolytic therapy in the eighties." Blood **67**(6): 1529-1541.
- Von Hoff, D. D., T. Ervin, F. P. Arena, E. G. Chiorean, J. Infante, M. Moore, T. Seay, S. A. Tjulandin, W. W. Ma, M. N. Saleh, M. Harris, M. Reni, S. Dowden, D. Laheru, N. Bahary, R. K. Ramanathan, J. Taberner, M. Hidalgo, D. Goldstein, E. Van Cutsem, X. Wei, J. Iglesias and M. F. Renschler (2013). "Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine." N Engl J Med **369**(18): 1691-1703.
- Wagner, M., C. Redaelli, M. Lietz, C. A. Seiler, H. Friess and M. W. Buchler (2004). "Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma." Br J Surg **91**(5): 586-594.
- Wang, G., X. Zhang, X. Liu and J. Zheng (2020). "Co-culture of human alveolar epithelial (A549) and macrophage (THP-1) cells to study the potential toxicity of ambient PM(2.5): a comparison of growth under ALI and submerged conditions." Toxicol Res (Camb) **9**(5): 636-651.
- Wells, P. S., J. Hirsh, D. R. Anderson, A. W. Lensing, G. Foster, C. Kearon, J. Weitz, R. D'Ovidio, A. Cogo and P. Prandoni (1995). "Accuracy of clinical assessment of deep-vein thrombosis." Lancet **345**(8961): 1326-1330.
- Wildberger, J. E., A. H. Mahnken, M. Das, A. Kuttner, M. Lell and R. W. Gunther (2005). "CT imaging in acute pulmonary embolism: diagnostic strategies." Eur Radiol **15**(5): 919-929.
- Wojtukiewicz, M. Z., M. Rucinska, L. R. Zacharski, L. Kozlowski, L. Zimnoch, Z. Piotrowski, B. J. Kudryk and W. Kisiel (2001). "Localization of blood coagulation factors in situ in pancreatic carcinoma." Thromb Haemost **86**(6): 1416-1420.
- Ying, H., P. Dey, W. Yao, A. C. Kimmelman, G. F. Draetta, A. Maitra and R. A. DePinho (2016). "Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma." Genes Dev **30**(4): 355-385.
- Yoda, Y., K. Tamura and M. Shima (2017). "Airborne endotoxin concentrations in indoor and outdoor particulate matter and their predictors in an urban city." Indoor Air **27**(5): 955-964.

- Zhao, X., W. Fan, Z. Xu, H. Chen, Y. He, G. Yang, G. Yang, H. Hu, S. Tang, P. Wang, Z. Zhang, P. Xu and M. Yu (2016). "Inhibiting tumor necrosis factor-alpha diminishes desmoplasia and inflammation to overcome chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma." Oncotarget 7(49): 81110-81122.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Dr. rer. nat. Eike Thomas Wolter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Proinflammatorische und prothrombogene Wirkung von Feinstaub PM₁₀ in Blut von Patienten mit metastasiertem und fortgeschrittenem Pankreaskarzinom selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte. Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

Publikationsliste

- 06/2017 Bundesgesundheitsblatt der Ausgabe Juni 2017
Environmental health relevance of airborne microorganisms in ambient and indoor air
Autoren: Sandra Walser, Bernhard Brenner, Stefanie Heinze, Regine Szewzyk, Eike Wolter, Caroline Herr
Bundesgesundheitsblatt der Ausgabe Juni 2017
Autoren: Eike Wolter (Erstautor), Anett Neumann, Wolfgang Straff
Monitoring methods and their results in environmental medicine - implications for medical counsellors
- 05/2014 The Journal of Immunology, 28. März 2014
NKT cells determine titer and subtype profile of virus-specific IgG antibodies during herpes simplex virus Infection
Autoren: Martin J Raftery (geteilte Erstautorenschaft), Eike Wolter (geteilte Erstautorenschaft), Simon Fillatreau, Helga Meisel, Stefan H E Kaufmann, Günther Schönrich
- 03/2012 Abstract 22. Jahrestreffen der Gesellschaft für Virologie
Induction of B cell function by CD1d-restricted invariant NKT cells during primary infection with HSV-1 in mice
Autor: Eike Wolter, Poster Präsentation
- 10/2011 Abstract 6th Mini-Herpes-Virus Workshop Berlin
Modulation of B cell function by invariant NKT cells during primary infection with HSV-1 in mice
Autor: Eike Wolter, Vortrag

09/2008

Journal of Peptide Sciences, 24. September 2008

Evaluating the coupling efficiency of phosphorylated amino acids for SPOT synthesis

Autoren: Victor Tapia, Bernhard Ay, Julia Triebus, Eike Wolter, Prisca Boisguerin, Rudolf Volkmer

Danksagung

Mein Dank gilt meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. Marianne Sinn für Ihre vertrauensvolle und konstruktive Betreuung dieses Promotionsprojekts. Ohne ihren engagierten Beitrag und ihre klinische Expertise wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Herrn Dr. med. Wolfgang Straff danke ich für seine wertvollen Beiträge und Ideen zum umweltmedizinischen Konzept dieser Arbeit. Die finanzielle Ausstattung des Forschungsprojekts verdanke ich dem Umweltbundesamt der Bundesrepublik Deutschland. Eine exzellente labortechnische Unterstützung erfuhr ich durch Frau Sabine Bach (MTA) und Frau Dr. rer. nat. Carola Emanuel. Für fruchtbaren wissenschaftlichen Austausch bedanke ich mich bei Frau Dr. med. Katrin Süring, Frau Dr. med. Conny Höflich und Frau Dr. rer. nat. Katrin Bossmann. Herrn M. Sc. Alexander Krug danke ich für die statistische Beratung. Bei Frau Lorraine Kaiser möchte ich mich für ihre Hilfe in vielen Verwaltungsangelegenheiten bedanken.