

Aus der Klinik für Urologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zur akuten vaskulären Toxizität der Chemotherapie bei
Hodentumor-Patienten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Werner Jan Struss

aus Pretoria

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. K.-P. Dieckmann

2. Prof. Dr. A. Heidenreich

3. Priv.-Doz. Dr. M. Schostak

Datum der Promotion: 18.11.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
1.1 Epidemiologie des Hodenkrebses	4
1.2 Ätiologie von Keimzelltumoren	4
1.3 Klinische Manifestation	5
1.4 Klassifikation	5
1.5 Therapie	7
1.6 Komplikationen der Therapie	8
1.7 Kardiovaskuläre Nebenwirkungen	9
1.8 Aktueller Sachstand zur Pathogenese der akuten kardiovaskulären Ereignisse nach Chemotherapie	10
1.9 Klinische Laborparameter in dieser Studie	10
1.10 Arbeitshypothese der vorliegenden Studie	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Studien-Design, Patienten	13
2.2 Klinische Durchführung	15
2.3 Labortechnische Durchführung	15
2.4 Datenerfassung, statistische Methoden	19
3. Ergebnisse	20
4. Diskussion	34
5. Zusammenfassung	42
6. Literatur	44
7. Erklärung	53
8. Curriculum vitae	54
9. Danksagung	55

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie des Hodenkrebses

Die häufigste maligne Erkrankung von Männern in Alter zwischen 15-35 Jahren ist der Hodenkrebs. Hodentumoren entsprechend etwa 2,1% aller Tumorerkrankungen beim Mann. Nach Angaben des Robert Koch Institutes, Berlin, erkranken in Deutschland etwa 4100 Männer jährlich. Die Inzidenz beträgt aktuell 10 Neuerkrankungen/100 000 Männer/Jahr (Robert Koch Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, 2008). Bemerkenswert ist die asymmetrische geographische Verbreitung von Hodenkrebs. Die Erkrankung ist häufig in Nord-Europa und Nordamerika, Neuseeland und Australien, selten dagegen in Südamerika und Südeuropa. Ausgesprochen rar ist die Erkrankung in Asien und Afrika (Kolonel *et al*, 1982), (Manecksha & Fitzpatrick, 2009), (Bray *et al*, 2006).

1.2 Ätiologie der Keimzelltumoren

Noch ist die Ätiologie der germinalen Hodentumoren unklar (McGlynn & Cook, 2009). Es gibt jedoch gesicherte klinische und epidemiologische Risikofaktoren, die als Marker eines erhöhten Erkrankungsrisikos gelten (Garner *et al*, 2005). Der numerisch höchste Risikofaktor ist der vorangegangene Hodentumor. Bei diesen Patienten besteht ein etwa 30-fach erhöhtes relatives Risiko gegenüber der Normalbevölkerung, an einem kontralateralen Tumor zu erkranken. Patienten mit Maldeszensus testis tragen ein 4-6-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko. Dabei ist auch das Erkrankungsrisiko des kontralateralen, normal deszendierten Hoden deutlich erhöht. Die operative Korrektur des Hodenhochstandes reduziert das Erkrankungsrisiko wahrscheinlich nicht, sondern erlaubt eine lediglich genauere klinische Überwachung (Dieckmann & Pichlmeier, 2003).

Genetische Faktoren spielen eine gesicherte Rolle in der Pathogenese des Hodenkrebses. Für männliche Geschwister eines betroffenen Patienten besteht ein 4-8-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko (Kratz *et al*, 2010).

Der Testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN) gilt als Präneoplasie. Die Theorie der Pathogenese impliziert, dass ein relativer Östrogenüberschuss während der embryonalen Gonadenentwicklung zur Fehlsteuerung der fetalen Keimzellen führt, und dass somit die Entwicklung zur TIN gebahnt wird (Hoei-Hansen *et al*, 2005).

1.3 Klinische Manifestation

Nach der Pubertät geht aus den TIN-Zellen der manifeste germinale Tumor hervor, wobei die hierbei steuernden Prozesse noch nicht endgültig geklärt sind. Der Keimzelltumor wächst dann expansiv, und schließlich infiltriert der Tumor in die Blut- und Lymphgefäße, wodurch Metastasierungen vorprogrammiert sind. Fast alle Keimzelltumoren streuen zunächst lymphgen in die retroperitonealen Lymphknoten. In der Regel treten hämatogene Fernmetastasen erst nach dem Lymphknotenbefall auf. Die Lunge ist der häufigste Ort der Organmetastasierung, aber auch Skelettsystem und Gehirn können im weiteren Verlauf befallen werden (Oechsle & Bokemeyer, 2011). Nur ca. 25-30% aller Seminome weisen Metastasierungen bei der Erstdiagnose auf (Tandstad *et al*, 2011), wohingegen die Nichtseminome in etwa 50% bei Diagnosestellung bereits metastasiert sind (Daugaard *et al*, 1990),(Sokoloff *et al*, 2007).

1.4 Klassifikation

In 1997 wurde nach einem internationalen Konsensus der American Joint Committee on Cancer und der International Union Against Cancer (UICC) die klinische Stadieneinteilung neu definiert, wobei die alte Lugano-Klassifikation als Grundlage diente (Cavalli *et al*, 1980). Im wesentlichen handelt es sich um eine 3-Etagen Einteilung (Abbildung 1):

Stadium I: ausschließlichen der Hoden ist befallen.

Stadium II: Retroperitoneale lymphogene Metastasierung. Hier besteht eine weitergehende Unterteilung in drei Subgruppen gemäß dem Durchmesser der metastatisch befallenen Lymphknoten.

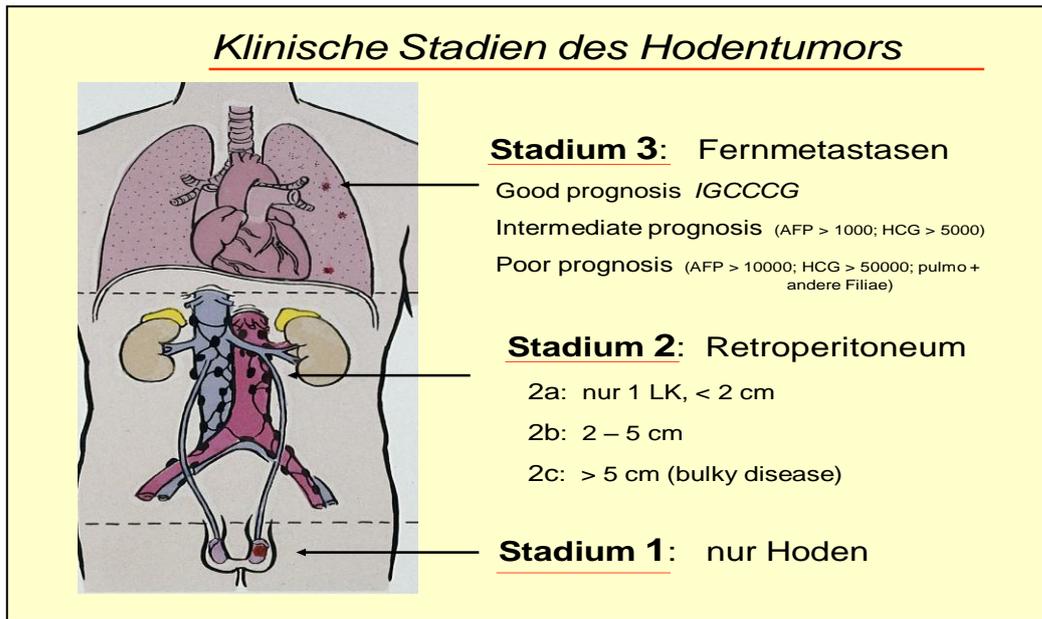
II a: Ein Lymphknoten mit Durchmesser bis 2cm

II b: Lymphknoten mit Durchmesser von 2cm bis 5cm

II c: Lymphknoten mit Durchmesser größer als 5cm

Stadium III: beschreibt supradiaphragmatische Lymphknotenmetastasierungen und/oder hämatogene Metastasierungen.

Abbildung 1



Die Stadien mit Metastasierung werden heute nach der International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG) nach prognostischen Kriterien subklassifiziert (International Group, 1997). Hierbei spielen die Topographie der Metastasen, die Tumormasse und die Höhe der Tumormarker eine entscheidende Rolle. Die Gruppe der „Good Prognosis“ hat eine 5 Jahres Überlebensrate von 95%, die „Intermediate Prognosis“ Gruppe 80% und die „Poor Prognosis“ Gruppe von nur noch 45-50%.

Tabelle 1.1: Klassifikation der Prognose-Kriterien nach Tumormarker nach IGCCCG

	LDH (U/l)	beta-HCG (IU/l)	AFP (ng/ml)
S0	≤ N	≤ N	≤ N
S1 (Good Prognosis)	< 1.5 x N	< 5000	< 1000
S2 (Intermediate Prognosis)	1.5 - 10 x N	5000-50000	1000-10000
S3 (Poor Prognosis)	> 10 x N	> 50000	> 10000

N: oberer Wert der Norm

1.5 Therapie

Die inguinale Ablatio testis mit Absetzen des Samenstranges am inneren Leistenring ist die erste therapeutische Maßnahme bei nahezu allen Hodentumoren. Nach der histologischen Sicherung des Tumors ist eine bildgebende Diagnostik zur Bestimmung der Erkrankungsausbreitung erforderlich. Danach wird stadienspezifisch und histologie-spezifisch gemäß den internationalen Leitlinien (Krege *et al*, 2008a), (Krege *et al*, 2008b),(Winter & Albers, 2011), (Albers *et al*, 2011) die weitere Behandlung festgelegt (Übersicht in Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2: Therapien

Tabelle 1.2: Standardtherapie beim Seminom			
	Primäre Therapie	Standard	Alternativ
Stadium I	Inguinale Ablatio testis	1 Zyklus Carboplatin	Strahlentherapie 20Gy oder Surveillance
Stadium IIa	Inguinale Ablatio testis	Strahlentherapie 30Gy	3 Zyklen PEB
Stadium IIb	Inguinale Ablatio testis	3 Zyklen PEB	Strahlentherapie 36Gy
Stadium IIc	Inguinale Ablatio testis	3 Zyklen PEB	-
Stadium III	Inguinale Ablatio testis	4 Zyklen PEB	-
Tabelle 1.2: Nicht-Seminom Standardtherapie			
Stadium I	Inguinale Ablatio testis	2 Zyklen PEB /	Surveillance, RLA
Good Prognosis	Inguinale Ablatio testis	3 Zyklen PEB + RTR	
Intermediate Prognosis	Inguinale Ablatio testis	4 Zyklen PEB + RTR	
Poor Prognosis	Inguinale Ablatio testis	4 Zyklen PEB + RTR	

Abkürzungen: PEB Cisplatin, Etoposid, Bleomycin

RLA Retroperitoneale Lymphadenektomie, RTR Residualtumorresektion

Die Polychemotherapie ist die wichtigste Maßnahme beim kurativen Therapie- Ansatz. Die Standardtherapie besteht aus den drei Chemotherapeutika Cisplatin, Etoposid und

Bleomycin (sog. PEB-Schema), das auf den Erfahrungen der Universität Indiana basiert (Einhorn, 2002). Die Therapiedauer eines Therapiezyklus PEB beträgt 21 Tage.

Tabelle 1.3: PEB-Schema

Cisplatin	20mg/m ²	Tag 1-5
Etoposid	100mg/m ²	Tag 1-5
Bleomycin	30mg	Tag 1, 8, 15

Die Wirkung von Cisplatin beruht auf einer Hemmung der DNA-Replikation durch Querverknüpfungen der beiden DNA-Stränge. Cisplatin reagiert bevorzugt mit Guanin und Adenin und führt somit zur Quervernetzung innerhalb eines DNA-Stranges als auch zwischen benachbarten DNA-Strängen. Zusätzlich führt es zur Hemmung der DNA-Reparatur und hemmt somit die Telomeraseaktivität. Auch Punktmutationen werden aufgelöst. Schließlich führt die Wirkung des Zytostatikums zur Einleitung des programmierten Zelltodes, der Apoptose (Einhorn, 1990), (Kollmannsberger & Bokemeyer, 2003).

Etoposid ist ein Glycosid, das aus der Wurzel des amerikanischen Maiapfels gewonnen wird. Das Chemotherapeutikum führt zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen in der DNA, zusätzlich hemmt es Topoisomerase II und unterdrückt somit die Zytokinese. Hierdurch wird die Apoptose eingeleitet (Bosl & Motzer, 1997).

Das Glycosid Bleomycin wird vom Actinobacterium *Streptomyces verticillus* gewonnen. Bleomycin interkaliert in der DNA und führt zu DNA-Fragmentierung. Zusätzlich hemmt das Bleomycin die DNA-abhängige Polymerase, und somit wird die Synthese von DNA gehemmt (Nichols, 2001).

Die Polychemotherapie wirkt nicht nur - wie gewünscht - auf die Tumorzellen sondern auch auf alle anderen gesunden Körperzellen. Daher bewirkt sie auch zahlreiche unerwünschte Wirkungen, sog. Komplikationen (Hartmann *et al*, 1999),(Boyer & Raghavan, 1992),(Kollmannsberger *et al*, 1999),(Chaudhary & Haldas, 2003).

1.6 Komplikationen der Therapie

Cisplatin ist im Blut an Albumin gebunden. Bei der Verteilung von Cisplatin finden sich hohe Konzentrationen in Niere, Leber, Milz, Prostata, Gonaden, Harnblase, Pankreas

und Muskulatur. Die häufigsten klinischen Nebenwirkungen von Cisplatin sind Übelkeit/Erbrechen und Durchfall. Nephrotoxizität und Hörschaden sind ebenfalls häufig. Zusätzlich kann Cisplatin zu Neuropathien und Knochenmarksuppression führen. Auch Elektrolytentgleisungen wie Hypomagnesämie, Hypokaliämie und sekundäre Hypokalziämie sind bekannt.

Die bekannteste Nebenwirkung von *Etoposid* ist Alopezie, aber auch Parageusia (ein metallischer Geschmack) wird von einigen Patienten berichtet. Weitere wichtige Nebenwirkungen sind Emesis, Nausea, Knochenmarksuppression mit Leukopenie, Erthyrozytopenie und Thrombopenie. Eine gefürchtete Spätfolge ist die Entstehung von Leukämien, allerdings wird diese Komplikation nur nach Überschreitung einer kumulativen Gesamtdosis von 2g/m^2 beobachtet (Kollmannsberger *et al*, 1998).

Die wichtigste unerwünschte Wirkung von *Bleomycin* ist die Entstehung einer Lungenfibrose mit der daraus resultierenden Lungenfunktionseinschränkung. Sonstige Nebenwirkungen sind Dermographismus, Akne, Hyperpigmentation, Raynaud Syndrom und Alopezie.

1.7 Kardiovaskuläre Nebenwirkungen

Zusätzlich zu den oben genannten Nebenwirkungen der PEB-Chemotherapie werden seit einigen Jahren zunehmend kardiovaskuläre sowie thrombogene Ereignisse beobachtet. Dabei wird unterschieden zwischen Akut- und Spätschäden. Durch kontrollierte Langzeitbeobachtungen wurde gefunden, daß nach Chemotherapie ein signifikant erhöhtes Risiko an Myokardinfarkten und zerebralen Insulten besteht (Huddart *et al*, 2003),(Meinardi *et al*, 2000). Als Ursachen hierfür werden einerseits chemotherapie-bedingte vaskuläre Schädigungen vermutet und metabolische Veränderungen als Folge der Chemotherapie mit der mittelbaren, sekundären Folge von vaskulären Stenosen (Haugnes *et al*, 2010). Andererseits sind auch im direkten zeitlichen Zusammenhang mit der Chemotherapie akute Myokardinfarkte, zerebrale Insulte sowie periphere arterielle Verschlüsse berichtet worden (Dieckmann *et al*, 2010). Solche akuten Ereignisse während der Chemotherapie können nicht durch langfristige metabolische Störungen und degenerative Prozesse erklärt werden. Vielmehr müssen hierbei akute toxische Einflüsse auf das Gefäßsystem angenommen werden. Insgesamt sind diese akuten vaskulären Ereignisse während der Chemotherapie noch weitgehend unverstanden.

1.8 Aktueller Sachstand zur Pathogenese der akuten kardiovaskulären Ereignisse nach Chemotherapie

In einer holländischen Studie konnte 2005 gezeigt werden, daß unter der Chemotherapie mit PEB ein geringer Anstieg des kardiovaskulären Risikos eintritt (Nuver *et al*, 2005a), wobei auch ein leicht erhöhtes Myokardinfarkttrisiko gefunden wurde. Im einzelnen fanden diese Autoren eine Erhöhung des von Willebrand Faktors im Gefolge der Chemotherapie. Dieser Faktor wird vom Gefäßendothel bei Schädigung freigesetzt und leitet physiologische Reparaturprozesse ein. Außerdem fanden Nuver und Mitarbeiter sonografisch eine signifikante Zunahme der Intima-Media Schichtdicke der Karotisarterien im Verlauf der Chemotherapie. Auch dieser Befund weist eindeutig auf das vaskulär-schädigende Potential der Chemotherapie hin.

In einer frühen Studie an 13 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen wurde bereits 1985 daraufhin gewiesen, daß der von Willebrand Faktor als Folge von Gefäßveränderungen nach einer Cisplatin-haltigen Chemotherapie ansteigen kann (Licciardello *et al*, 1985). Die Ergebnisse der vorstehend referierten Studien sind bisher noch nicht überprüft worden.

Die vorliegende Studie untersucht daher die Frage, ob frühe subtile Schäden am Gefäßsystem durch die Chemotherapie ausgelöst werden. Hierzu werden laborchemische Parameter, die als Indikatoren für Gefäßveränderungen gut gesichert sind (Kannel, 2005), (Bruhn *et al*, 2011), systematisch bei Hodentumorpatienten im Verlauf der Chemotherapie untersucht.

1.9 Klinische Laborparameter in dieser Studie

Die folgenden Parameter sind bekanntermaßen eng mit der Hämostaseologie vernetzt. Lipoprotein (a) [Lp(a)] ist ein LDL-ähnliches Partikel mit Normwerten zwischen 0.2-200mg/dl. Die genaue Funktion von Lp(a) ist unbekannt. Vermutet wird eine Funktion innerhalb der Fibrinolyse. Die chemische Struktur von Lp(a) korreliert mit Plasminogen und Tissue Plasminogen Faktor und konkurriert um dessen Bindungsstelle, somit reduziert Lp(a) die Fibrinolyse. Zusätzlich stimuliert Lp(a) die Sekretion von PAI-1 was wiederum zur Thrombogenese führt. Da Lp(a) LDL-haltig ist, führen erhöhte Lp(a)-Werte langfristig zur Arteriosklerose.

Homocystein ist eine Aminosäure, die im Methioninstoffwechsel biosynthetisiert wird.

Erhöhte Homocysteinwerte sind einerseits genetisch bedingt, aber auch die Ernährung beeinflusst den Serumspiegel. Homocysteinämie ist ein anerkannter Risikofaktor für kardiovaskuläre Schädigungen, da Homocystein auf der biochemischen Ebene die arterielle Wandarchitektur verändert (Dionisio *et al*, 2010). Homocystein verhindert die Formation von strukturellen Gefäßwandkomponenten wie Kollagen, Elastin und Proteoglykanen. Homocysteinämie ist assoziiert mit vermehrten arteriellen und venösen Thromboembolien (McCully, 2007).

Das Glykoprotein von Willebrand Faktor (vWF) wird in den Endothelien, subendothelialen Bindegewebe und Megakaryozyten gebildet. Der von Willebrand Faktor spielt eine entscheidende Rolle bei der Bindung von bestimmten Proteinen, insbesondere Faktor VIII, an Wundflächen mittels Kollagen (Kannel, 2005). Gleiches gilt für die Adhäsion von Thrombozyten. Ischämische Insulte sind assoziiert mit erhöhten vWF-Werten. Meßtechnisch wird indirekt über die Messung des vWF-Antigens (vWF-Ag) die Menge des vorhandenen von Willebrand Faktors quantifiziert.

Kollagenbindungskapazität (CBK) ist ein Maß für die Funktionalität des vorliegenden von Willebrand Faktors. Meßtechnisch signalisiert diese qualitative Darstellung die Bindungsfähigkeit und damit die biologische Aktivität des vorhandenen von Willebrand Faktors (Schneppenheim & Budde 2008).

Plasminogenaktivator-Inhibitor 1 (PAI 1) ist ein Serin-Protease Inhibitor. PAI-1 wird hauptsächlich von Endothelzellen gebildet. Durch die Inhibition von tissue Plasminogen Aktivator (tPA) und Urokinase wird die Aktivierung von Plasminogen und somit die Fibrinolyse verhindert. Somit fördert PAI1 mittelbar die Bildung von intravaskulären Gerinnungsprozessen durch Hemmung der Fibrinolyse (Pearson *et al*, 1997). Bei Patienten mit erhöhtem PAI-Spiegel sind arterielle und venöse Gefäßverschlüsse beschrieben worden.

Das Steroid Cholesterin befindet sich in Zellmembranen und spielt bei deren Permeabilität eine entscheidende Rolle. Zusätzlich ist es ein Baustein bei der Synthese von Gallenflüssigkeit und Steroidhormonen. Erhöhte Cholesterinwerte sind hochsignifikant mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert. Hypercholesterinämie führt langfristig zur Arteriosklerose und zur damit verbundenen Koronaren Herzerkrankung (KHK). Ein erhöhter Cholesterinspiegel ist ein gesicherter Risikofaktor für Myokard- und zerebrale Infarkte, sowie für die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK).

Low-Density Lipoprotein (LDL) bindet Cholesterin und Triglyceride und fördert somit

dessen Transport durch die Blutgefäße. Ebenso wie erhöhte Cholesterinwerte sind erhöhte LDL-Werte signifikant mit kardiovaskulären Verschlusskrankheiten assoziiert (Otokozawa *et al*, 2010).

High-Density Lipoprotein (HDL) fungiert als Transporter von lipophilen Substanzen im Blutplasma. Hohe HDL-Spiegel im Blut verringern kardiovaskuläre Ereignisse, sogar bei gleichzeitig erhöhtem (Gesamt)-Cholesterin-Wert.

Troponin I bindet in den Herzmuskelzellen das Actin an den Actin-Tropomyosin-Komplex innerhalb der Myofilamente. Troponin I wird akut von geschädigten Myokardzellen freigesetzt. Daher korrelieren erhöhte Werten von Troponin I mit der Myokardschädigung im Rahmen eines Infarktes.

1.10 Arbeitshypothese der vorliegenden Studie

Die PEB-Chemotherapie ist aufgrund klinischer Evidenz assoziiert mit dem Risiko von akuten vaskulären Komplikationen. Diese Ereignisse können nicht durch die schon bekannten metabolischen bzw. degenerativen Langzeitwirkungen der Chemotherapie erklärt werden. Anzunehmen ist vielmehr, daß von den angewandten Zytostatika eine akute vaskuläre und thrombogene Toxizität ausgeht.

Akute Gefäßwandschäden sowie ein akut erhöhtes thrombogenes Potenzial können durch die im vorstehenden Abschnitt beschriebenen Laborparameter nachgewiesen werden.

Die vorliegende Studie hat zum Ziel, durch Messung von geeigneten Laborparametern weitere Hinweise und somit Bestätigung für die bisher lediglich klinisch wahrgenommene vaskuläre Toxizität der PEB-Chemotherapie zu finden.

Die Hypothese der Studie ist, daß es während und nach PEB-Chemotherapie zu einer meßbaren Erhöhung der Laborparameter vWF, PAI1, Homocystein, Lp (a), Troponin1, Cholesterin sowie LDL kommt. Die ausgewählten Laborparameter sollen bei dem Patientenkollektiv als longitudinale Verlaufsbeobachtung vor, während und nach der chemotherapeutischen Behandlung gemessen werden. Signifikante Erhöhungen eines oder mehrerer der Parameter wären als ernstzunehmender Hinweis auf die postulierte vaskuläre und thrombogene Toxizität der PEB-Chemotherapie zu werten.

2. Materialien und Methoden

2.1 Studien-Design, Patienten

Die Laborparameter, die mit vaskulären Schädigungen assoziiert sind, werden bei einer Serie von konsekutiven Hodentumor-Patienten vor der Chemotherapie und dann im Verlauf wiederholt sowie abermals nach Abschluß der Chemotherapie gemessen. Das Studienkollektiv umfaßt 33 konsekutive Patienten (Tabelle 2.1), bei denen ein histologisch gesicherter Keimzelltumor des Hodens vorliegt (reines Seminom n=9, Nichtseminom n=24). Das mediane Alter beträgt 37 Jahre (Spannbreite 20-55). Bei 14 Patienten bestand ein klinisches Stadium I, bei 13 Patienten ein Stadium II und bei 6 Patienten ein Stadium III. Keiner der Patienten litt an einer ernsten Begleiterkrankung. Die Rekrutierung erfolgte in der Zeit von März 2007 bis Juni 2010. Bei allen Patienten war die Indikation zur Chemotherapie entsprechend den europäischen Leitlinien gestellt worden (Krege et al 2008). Die Chemotherapie bestand jeweils aus dem klassischen PEB Schema in Standarddosis (Tabelle 1.3: Übersicht PEB-Schema). 14 Patienten erhielten zwei Therapiezyklen, ein Patient erhielt nur 1 Zyklus, 13 erhielten 3 Zyklen, und 5 Patienten wurden mit 4 Zyklen Chemotherapie behandelt. Alle Patienten hatten vor Studienbeginn ihr Einverständnis zu den Blutentnahmen gegeben. Sämtliche Serumproben wurden im Rahmen der klinisch benötigten Blutentnahmen gewonnen. Persönliche Daten wurden nach der vollständigen Auswertung vernichtet, so dass einzelne Studienteilnehmer rückwirkend nicht mehr zu identifizieren sind.

Tabelle 2.1: Studienkollektiv

Patienten	Alter	Histologie	Klinisches Stadium (Lugano)	Anzahl Chemotherapiezyklen
1	37	NS	2b	3
2	35	NS	2a	3
3	44	S	2b	2
4	49	S	2c	3
5	45	S	3	4
6	29	NS	1	2
7	20	NS	2c	4
8	26	NS	1	2
9	41	NS	1	2
10	38	NS	2b	3
11	28	NS	2a	3
12	21	NS	1	2
13	38	NS	2	3
14	55	S	3	3
15	25	NS	2a	3
16	27	NS	2b	3
17	27	NS	2c	4
18	40	NS	1	2
19	28	NS	1	2
20	32	NS	1	2
21	29	NS	1	2
22	38	NS	1	2
23	31	NS	1	2
24	48	S	3	4
25	43	S	3	3
26	36	S	2c	3
27	48	NS	3	1
28	26	NS	1	2
29	33	NS	1	2
30	44	NS	1	2
31	44	S	2c	3
32	50	S	2b	3
33	32	NS	3	4

Anmerkung: die Patienten mit 4 Zyklen Chemotherapie befanden sich im Stadium der intermediären Prognose nach IGCCCG. Alle anderen Patienten mit Stadium 2 – 3 nach Lugano wiesen das Stadium der guten Prognose nach IGCCCG auf.

2.2 Klinische Durchführung

Die erste Blutentnahme erfolgte vor Therapiebeginn am 1. Tag der jeweiligen Therapiezyklen; die nächste Blutentnahme erfolgte unmittelbar nach Abschluss des 1. Zyklus am 16. Tag.

Weitere Blutentnahmen erfolgten unmittelbar bei Beginn des nächsten Therapiezyklus sowie jeweils unmittelbar nach Abschluß des jeweiligen Zyklus (Tag 16). Somit wurden bei den Patienten mit drei Chemotherapiezyklen insgesamt 6 Serumproben gewonnen, bei den Patienten mit vier Zyklen dementsprechend 8 Proben.

Die Blutentnahmen erfolgten jeweils am nüchternen Patienten.

Tabelle 2.2: Schema der Blutentnahmen

Zyklenzahl nach PEB-Schema	Tag im Zyklus	Laborbestimmungen
1	1	1. Venöse Blutentnahme
1	16	2. Venöse Blutentnahme
2	1	3. Venöse Blutentnahme
2	16	4. Venöse Blutentnahme
3	1	5. Venöse Blutentnahme
3	16	6. Venöse Blutentnahme
4	1	7. Venöse Blutentnahme
4	16	8. Venöse Blutentnahme

11 Patienten wurden zu einer späten zusätzlichen Verlaufskontrolle nach Abschluss der gesamten Therapie einbestellt. Das Zeitintervall zwischen Chemotherapie-Abschluss und der späten Kontrolle variiert zwischen 3 und 35 Monaten.

2.3 Labortechnische Durchführung

Die laborchemischen Analysen von Troponin-I, Cholesterin, HDL, LDL erfolgten im Zentrallabor des Albertinen-Krankenhauses. Alle anderen Parameter wurden im Gerinnungslabor von Prof. Budde analysiert (AescuLabor Hamburg GmbH, später Asklepios MVZ Nord GmbH in Kooperation mit Medilys Laborgesellschaft GmbH). Zur

Anwendung kamen ausschließlich qualitätsgesicherte Standardanalyseverfahren. Im einzelnen handelte es sich um die folgenden Analysemethoden:

Cholesterin: Meßtechnisch wird Cholesterin durch enzymatische Colorimetrie bestimmt. Cholesterin liegt im Serum in veresterter Form vor (Cholesterinester sind chemische Verbindungen zwischen Cholesterin und verschiedenen Fettsäuren). Bei der Messung werden zunächst die Cholesterinester unter Einwirkung der Cholesterinesterase in freies Cholesterin und Fettsäuren gespalten. Das Cholesterin wird unter Mitwirkung von Cholesterinoxidase zu Cholest-4-en-3-on oxidiert. Bei diesem Reaktionsschritt entsteht unter katalytischer Wirkung von Peroxidase ein roter Chinonimin-Farbstoff. Dessen Farbintensität ist direkt proportional zur Cholesterinkonzentration und wird durch Messung der Extinktionsänderung bei einer Wellenlänge von 512nm bestimmt.

HDL: Zur Bestimmung von HDL wird ein ähnliches Meßprinzip wie bei der Cholesterin-Bestimmung verwendet. Hier wird allerdings die Cholesterinesterase und Cholesterinoxidase an den Aminogruppen von Polyethylenglykol (PEG) gebunden. Daher entsteht am Ende des enzymatischen Prozesses ein blauer Chinoniminfarbstoff. Die Farbintensität des gebildeten blauen Chinonimins wird durch Messung der Extinktion bei 583nm bestimmt.

LDL wird nicht gemessen sondern kann in Kenntnis der Konzentrationen von Gesamtcholesterin und HDL sowie des VLDL (very low density lipoprotein) mittels der Friedewald-Formel berechnet werden:

$$\text{LDL} = \text{Gesamt Cholesterin} - \text{HDL} - \text{VLDL-Cholesterin (wobei VLDL-Cholesterin} = \text{Triglyceride} / 5)$$

Troponin I wird durch Chemilumineszenz-Mikropartikel Immunoassay bestimmt. Die Methode besteht aus 2 Phasen:

1. Phase : Die Serumprobe wird mit einem Anti-Troponin I-Antikörper versehen. Der Trop-I-AK befindet sich auf einem magnetischen Mikropartikel.
2. Phase: Das Anti-Trop-I-acridinium-Konjugat wird dem o.g. Ansatz beigefügt. Bei dieser chemischen Reaktion wird elektromagnetische Strahlung im Bereich des sichtbaren Lichtes emittiert (sog. Chemilumineszenz). Die Quantität der Strahlung korreliert mit der im Ansatz vorhandenen Troponin-Menge. Die Chemilumineszenz wird als relative light units (RLU) gemessen und mittels Kalibrierungskurven in die Konzentration von Troponin I umgerechnet.

Plasminogen Activator Inhibitor (PAI)-1: Die PAI-1-Plasmaspiegel werden mittels Bio-Immun-Assay bestimmt. In einem mehrschrittigen Verfahren wird an Mikrotiterplatten in zwei verschiedenen Puffersystemen eine Antikörperreaktion mit dem tissue-type Plasminogen Activator aus den Plasmaproben durchgeführt. Nach Inkubation mit Plasminogen und Fibrinogen wird die Absorption von Licht von 405 nm Wellenlänge in den beiden Ansätzen mit den verschiedenen Puffersystemen gemessen. Die Plasmakonzentration von PAI-1 wird dann indirekt aus der Meßwert-Differenz berechnet.

Homocystein: Homocysteinbestimmung beruht auf der Technik des Fluoreszenzpolarisations-Immunoassays (FPIA). Bei diesem vielschrittigen Meßansatz wird im Prinzip das gebundene Serum-Homocystein (oxidierte Form) zu freiem Homocystein reduziert und anschließend durch SAH-Hydrolase mit Adenosin zu S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) umgewandelt. Nach der nun folgenden Antikörperreaktion und anschließender Beigabe eines fluoreszierenden Markers wird eine Anregung mit polarisiertem Licht vorgenommen. Die Menge des aus dem Ansatz ausfallenden polarisierten Lichtes korreliert mit der Serumkonzentration von Homocystein.

Lipoprotein (a): Für die Messung von Lipoprotein (a) wird das Verfahren der Nephelometrie eingesetzt. Das Prinzip ist hierbei die optische Messung von gestreutem Licht aus einer Flüssigkeitssuspension. Um Lp(a) nephelometrisch zu messen, müssen die entsprechenden Moleküle an Partikel gekoppelt werden, die dann in der Meßsuspension Streulicht erzeugen. Hierfür werden Polystyrol-Partikel in einer definierten Konzentration verwendet, die mit spezifischen Antikörpern gegen Lp(a) beschichtet sind. Das Lp(a) aus der Serumprobe lagert sich nun an die Partikel und bildet dort Immunkomplexe. Licht in definierter Menge und Wellenlänge wird nun durch die Suspension geleitet. Die Intensität des Streulichts ist abhängig von der Konzentration des Lpa in der Untersuchungsprobe. Die Auswertung erfolgt durch Vergleich mit einem Standard von bekannter Konzentration. Durch die Kopplung von AK oder AG an Latexpartikeln wird das Streulichtsignal wesentlich verstärkt, so dass empfindliche Messungen von Spurenproteinen möglich sind. Bei der Auswertung der nephelometrischen Messung ist die Heidelberger-Kurve zu beachten. Dies ist eine Kalibrierungskurve, die die Beziehung zwischen Antigenmenge und dem Messsignal bei konstanter AK-Menge darstellt.

vWF-Ag und CBK wurden mit der ELISA-Technik untersucht. Das „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ Verfahren (ELISA) beruht darauf, dass zur Bestimmung der gewünschten Parameter spezifische Antikörper mittels eines Trägermaterials an sogenannte Mikrotiterplatten gekoppelt werden (Patzke 2011). Die zu untersuchenden Patientenserum werden mit dieser immunologischen Kontaktfläche zusammengebracht. Der gesuchte Stoff im Serum, wie z. B. im gegebenen Falle die vWF-Moleküle, haftet an den Antikörpern und bildet entsprechende Komplexe. In einem zweiten Schritt werden die Immunkomplexe dann durch sekundäre Antikörper erkennbar und meßbar gemacht. Beim ELISA wird anstelle von Mikrotiterplatten ein lösliches Substrat

verwendet, da hierdurch eine quantitative Auswertung mit erhöhter Sensitivität ermöglicht und gleichzeitig die Reproduzierbarkeit verbessert wird.

Tabelle 2.3: Auflistung der untersuchten Laborparameter, deren Normalwerte sowie die erforderliche Versandform für die gewonnenen Serumproben

<u>Labor-Parameter:</u>	<u>Referenz-Werte:</u>	<u>Aufbewahrungs-Behälter:</u>
Lipoprotein(a)	< 25mg/dl	Serumröhrchen
Homocystein	5-15uMol/l	Spezialröhrchen
von Willebrand Faktor Antigen	50-160%	Citratröhrchen
Collagenbindungskapazität	50-250%	Citratröhrchen
Plasminogenaktivator-Inhibitor I	4-43ng/ml	Citratröhrchen
Cholesterin (gesamt)	150-240mg/dl	Serumröhrchen
HDL	27-65mg/dl	Serumröhrchen
LDL	60-205mg/dl	Serumröhrchen
Troponin-I	<0.5ng/ml	Serumröhrchen

2.4 Datenerfassung, statistische Methoden

Die Meßergebnisse wurden zunächst schriftlich in Papierform archiviert. Nach Abschluss der Datengewinnung wurden die Daten auf Vollständigkeit und Stimmigkeit überprüft. Fehlende Angaben oder falsche Eingaben wurden korrigiert und, sofern dies möglich war, nachgeliefert. Später wurden alle Daten in elektronischer Form in einem kommerziell verfügbaren Datenbankprogramm gespeichert (MS Excel für Windows, Version XP). Für die definitive statistische Auswertung wurden die Daten in das Programm SASv9.2 transformiert.

Die Auswertung umfaßte zunächst eine deskriptive Darstellung der Meßwerte in Tabellenform. Box whiskers plots wurden dann erstellt für die Darstellung der Medianwerte des untersuchten Patientenkollektivs. Schließlich wurden sogenannte Spaghetti-plots erstellt zur Darstellung der individuellen Meßwert-Verläufe.

Die individuellen Endwerte wurden mit den Ausgangswerten statistisch verglichen unter Anwendung des signed rank Wilcoxon Tests (Armitage *et al*, 2001), wobei ein p-Wert von < 0.05 als signifikant angesehen wurde.

3. Ergebnisse

Von den bei den 33 konsekutiven Patienten geplanten 176 Blutentnahmen konnten 147 planmäßig durchgeführt werden. Somit ergibt sich eine Quote von fehlenden Meßwerten von 16.5%. Details zu dieser Problematik sind der Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Tabelle 3.1: Praktischer Verlauf der Materialgewinnung

Zykluszahl	1. Zyklus		2. Zyklus		3. Zyklus		4. Zyklus	
Zyklustag	1	16	1	16	1	16	1	16
durchgeführte Blutentnahmen (n)	33	26	31	24	16	11	4	2
Fehlwerte	0	7	1	8	2	7	1	3

Die Gesamtmenge der erhobenen Labormeßdaten sowie deren deskriptiv statistische Aufarbeitung ist sehr umfangreich, und nicht alle Details sind von gleichrangiger Bedeutung. Um eine Fokussierung auf die klinisch relevanten Ergebnisse zu ermöglichen, wird im folgenden eine zusammenfassende Darstellung der essentiellen Ergebnisse in Übersichtstabellen sowie in grafischer Form gegeben.

Die Parameter Lipoprotein (a), Homocystein, PAI 1, Cholesterin, HDL, LDL und Troponin-I zeigten keine signifikanten Schwankungen der Meßwerte im Verlauf der Chemotherapie. Auf eine detaillierte Dokumentation dieses umfangreichen Datenmaterials wird aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Zur Illustration der fehlenden Veränderungen während der Chemotherapie werden die genannten Parameter mit ihren Meßwert-Verläufen grafisch dargestellt (Abbildungen 3.3 bis 3.9).

Signifikante Veränderungen fanden sich hingegen bei den Parametern von Willebrand Faktor (vWF) und Kollagenbindungskapazität (CBK). Die Ergebnisse der

Basisauswertung („Rohdaten“) sind in den Tabellen 3.2a und 3.2b zusammengefaßt. Hier sind die Meßwerte von vWF-Ag und CBK zu den jeweiligen Meßzeitpunkten in absteigender Reihenfolge dargestellt. Zeitpunkt „99“ signalisiert die späte Kontrollmessung nach mehreren Monaten, die nur bei insgesamt 11 Patienten durchgeführt werden konnte. In der Waagerechten sind die dazugehörigen statistischen Auswertungen dargestellt, i.e. Median, Interquartilbereiche, arithmetisches Mittel („mean“), Standardabweichung, Minimalwert und Maximalwert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die Ergebnisse in zwei separaten Tabellen dargestellt. Die weitere statistische Aufarbeitung erfolgte in den Tabellen 3.3a,b. Hier wird die Abweichung der Meßwerte vom oberen Grenzwert der Norm („ULN“) als Relativwert (Quotient aktueller Meßwert: oberer Normalwert) im zeitlichen Verlauf dargestellt. Die Daten in dieser Tabelle besitzen keine Maßeinheiten, da es sich um Relativwerte handelt. Die Tabellen sind identisch aufgebaut wie Tabelle 3.2a,b.

Als drittes erfolgt die Darstellung der Differenzwerte der Meßergebnisse vom individuellen Ausgangswert (aktueller Meßwert minus Ausgangswert) im zeitlichen Verlauf (Tabellen 3.4a, b). Die Tabellen sind inhaltlich wie die vorangehenden Tabellen aufgebaut. Die Daten in diesen Tabellen enthalten wieder die üblichen Maßeinheiten der jeweiligen Laborparameter.

Um die Veränderungen der einzelnen Laborparameter grafisch besser erkennbar zu machen, wurden box-whiskers Diagramme gebildet, die in den Abbildungen 3.1-3.9 dargestellt sind. Hierbei sind die medianen Meßwerte der Patientenkohorte dargestellt.

Um auch die Verläufe der individuellen Patienten darzustellen, wurden sog. Spaghetti-Diagramme angefertigt (Abb. 3.10-3.14). Hier wurden im Gegensatz zu den voranstehenden Auswertungen individuelle Patienten dargestellt und nicht Mittelwerte oder Medianwerte von Patientenkollektiven. Diese plots wurden nur von den Parametern angefertigt, bei denen eine erste Vor-Einschätzung eine mögliche signifikante Veränderung signalisiert hatte (Kollagenbindungskapazität, von Willebrand Faktor, Cholesterin, LDL und PAI).

Mit dem Wilcoxon signed rank Test wurde geprüft, ob die Abweichungen der einzelnen

Laborparameter vom Ausgangswert bzw. die Abweichungen vom oberen Grenzwert der Norm („ULN“) statistisch signifikant sind. Diese Ergebnisse sind für die einzelnen Parameter und die jeweiligen Meßzeitpunkte in Tabelle 3.5 aufgeführt.

Die Tabelle 3.5 bestätigt rechnerisch die bereits o.g. primäre Einschätzung, daß die folgenden Parameter keinerlei erkennbare Veränderung im zeitlichen Verlauf unter Chemotherapie zeigen: Homozystein, Lipoprotein (a), Troponin-I, Cholesterin, HDL und LDL.

Eine sehr große Streubreite der Meßwerte findet sich beim PAI-1; die Abweichungen gegenüber dem Ausgangswert sind jedoch nicht signifikant. Überraschend findet sich aber eine signifikante Erniedrigung der PAI-1 Spätmessung im Vergleich zu den Meßwerten während der Chemotherapie ($p=0,001$; Tab. 3.5).

Eine signifikante Erhöhung zeigt der von Willebrand Faktor (vWF) sowie die mit diesem Faktor assoziierte Kollagenbindungskapazität (CBK). Der Anstieg dieser Werte wird vor allem bei den grafischen Darstellungen der box-whiskers Diagramme (Abb. 3.1 und 3.2) und in den Spaghetti-Diagrammen (Abb. 3.11, 3.12) deutlich. Der Anstieg des vWF bis zum Ende des 3. Zyklus ist im Wilcoxon signed rank Test signifikant ($p=0,002$; Tab. 3.5). Überraschend kommt es danach aber wieder zu einem leichten Abfall, so daß am Ende des 4. Zyklus das Signifikanzniveau bei Vergleich gegenüber dem Ausgangswert nicht mehr erreicht wird. Zur Interpretation dieser Befundkonstellation hilft der Blick auf die Spaghetti-plots. Hier zeigt sich, daß nur noch 4 Patienten bezüglich des vWF im 4. Zyklus gemessen werden konnten und nur ein einziger Patient zeigt im vierten Zyklus einen niedrigeren Wert als in den vorangehenden Zyklen. Drei Patienten zeigen bis zum Beginn des 4. Zyklus einen konstanten vWF-Anstieg. Insgesamt zeigen die Spaghetti-Diagramme für vWF und CBK fast ausschließlich End-Werte (nach Chemotherapie), die deutlich höher liegen als die Ausgangswerte. Die wenigen Werte im vierten Zyklus, die wieder einen Rückgang des vWF und der CBK zeigen, müssen als zufällige Schwankungen bei kleiner Fallzahl ($n=5$) an diesem Meßpunkt angesehen werden. Der Anstieg von vWF und CBK während der Chemotherapie darf somit als klinisch und statistisch signifikant angesehen werden. Interessant ist aber darüber hinaus, daß die Spätmessungen (nach > 3 Monaten) von vWF und CBK wieder klar im Normbereich liegen.

Insgesamt resultiert also bei vWF und CBK eine signifikante Erhöhung der Werte unter

der laufenden Chemotherapie, die sich nach einigen Monaten wieder normalisiert.

Tabelle 3.2a: Diskriptive Statistik der Laborparameter ("Rohdaten" Teil 1)

Parameter	Zyklus	Tag	N	Nmiss	Min	Q1	Median	Q3	Max	Mean	SD
CBK (%)	1	1	33	0	46	79	96	135	250	110,7	49,2
	1	15	26	7	67	92	136	178	320	151,2	73,3
	2	1	31	1	60	114	179	257	346	185,2	81,1
	2	15	24	8	84	140	172	198	352	175,8	59,5
	3	1	16	2	77	129	196	279	592	225,3	125,8
	3	15	11	7	83	109	154	301	344	192,7	94,7
	4	1	4	1	87	150	266	405	492	277,5	171,4
	4	15	2	3	93	93	105	116	116	104,5	16,3
	99	99	11	0	45	89	102	124	199	105,3	406

Tabelle 3.2b (Rohdaten, Teil 2)

Parameter	Zyklus	Tag	N	Nmiss	Min	Q1	Median	Q3	Max	Mean	SD
VWF-Ag (%)	1	1	33	0	47	74	101	131	226	107,5	44,8
	1	15	26	7	69	92	123	166	343	146,8	71,7
	2	1	31	1	67	121	176	270	330	188,6	84,6
	2	15	24	8	78	122	173	199	360	171,6	66,5
	3	1	16	2	108	142	201	271	580	234,8	127,1
	3	15	11	7	76	101	148	307	339	193,6	99,5
	4	1	4	1	87	169	287	351	378	259,5	126,4
	4	15	2	3	94	94	140	186	186	140	65,1
	99	99	11	0	47	79	92	104	180	97,2	36,5

Tabelle 3.3a: Auswertung der Laborparameter hinsichtlich ihrer Abweichung vom oberen Grenzwert der Norm ("ULN")

Parameter	Zyklus	Tag	N	Nmiss	Min	Q1	Median	Q3	Max	Mean	SD
CBK (N-fach ULN)	1	1	33	0	18,4	31,6	38,4	54,4	100	44,303	19,676
	1	15	26	7	26,8	36,8	54,4	71,2	128	60,462	29,322
	2	1	31	1	24	45,6	71,6	102,8	138,4	74,077	32,450
	2	15	24	8	33,6	55,8	68,6	79	140,8	70,333	23,794
	3	1	16	2	30,8	51,4	78,4	111,6	236,8	90,100	50,324
	3	15	11	7	33,2	43,6	61,6	120,4	137,6	77,091	37,871
	4	1	4	1	34,8	60	106,2	162	196,8	111,00	68,547
	4	15	2	3	37,2	37,2	41,8	46,4	46,4	41,800	6,505
	99	99	11	0	18	35,6	40,8	49,6	79,6	42,109	16,249

Tabelle 3.3b: Auswertung der Laborparameter hinsichtlich ihrer relativen Abweichung vom oberen Grenzwert der Norm ("ULN") Darstellung als N-faches der Norm

Parameter	Zyklus	Tag	N	Nmiss	Min	Q1	Median	Q3	Max	Mean	SD
VWF-Ag (N-fach ULN)	1	1	33	0	29,38	46,25	66,25	85	141,25	68,317	28,579
	1	15	26	7	43,13	57,5	76,88	103,75	214,38	91,756	44,824
	2	1	31	1	41,88	75,63	110	168,75	206,25	117,89	52,846
	2	15	24	8	48,75	76,26	107,82	124,07	225	107,24	41,554
	3	1	16	2	67,5	88,44	125,32	169,38	362,5	146,76	79,407
	3	15	11	7	47,5	63,13	92,5	191,88	211,88	121,03	62,185
	4	1	4	1	54,38	105,32	179,07	219,07	236,25	162,19	78,990
	4	15	2	3	58,75	58,75	87,5	116,25	116,25	87,50	40,659
	99	99	11	0	29,38	49,38	57,5	65	112,5	60,74	22,840

Tabelle 3.4a: Auswertung der Laborparameter hinsichtlich ihrer relativen Abweichung vom individuellen Ausgangswert. Angaben in den jeweiligen Maßeinheiten der Laborparameter

Parameter	Zyklus	Tag	N	Nmiss	Min	Q1	Median	Q3	Max	Mean	SD
CBK (%)	1	1	33	0	46	79	96	135	250	110,7	49,2
	1	15	26	7	-38	11	31	63	209	44,3	56,6
	2	1	31	1	-9	31	58	138	247	79	63,5
	2	15	24	8	-21	43	72	94	236	74,3	58,1
	3	1	16	2	-63	62	99	149	400	113,4	103,4
	3	15	11	7	-6	42	75	146	204	86,8	63,1
	4	1	4	1	-23	-18	105	318	414	150	209,3
	4	15	2	3	-17	-17	2	20	20	1,5	26,2
	99	99	11	0	-93	-19	7	23	43	-3,5	38,6

Tabelle 3.4b

Parameter	Zyklus	Tag	N	Nmiss	Min	Q1	Median	Q3	Max	Mean	SD
VWF-Ag (%)	1	1	33	0	47	74	101	131	226	107,5	44,8
	1	15	26	7	-42	13	31	49	205	45,9	60,9
	2	1	31	1	-35	24	83	140	256	85,1	70
	2	15	24	8	-36	35	67	109	233	72	59,8
	3	1	16	2	-25	61	97	166	402	123	104,8
	3	15	11	7	-19	32	72	156	206	88,8	71,7
	4	1	4	1	-33	4	124	225	242	114,3	131,6
	4	15	2	3	-26	-26	22	70	70	22	67,9
	99	99	11	0	-63	-7	1	21	25	-1,2	24

Abbildung 3.1: Kollagenbindungskapazität im zeitlichen Verlauf unter Chemotherapie, box-whiskers plot

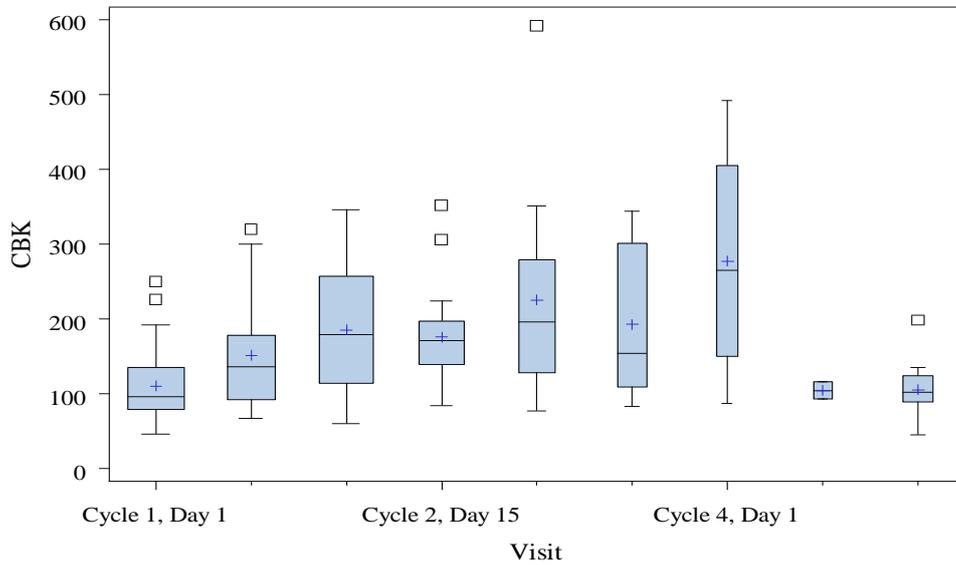


Abbildung 3.2: Von Willebrand Faktor Antigen im zeitlichen Verlauf unter Chemotherapie, box-whiskers plot

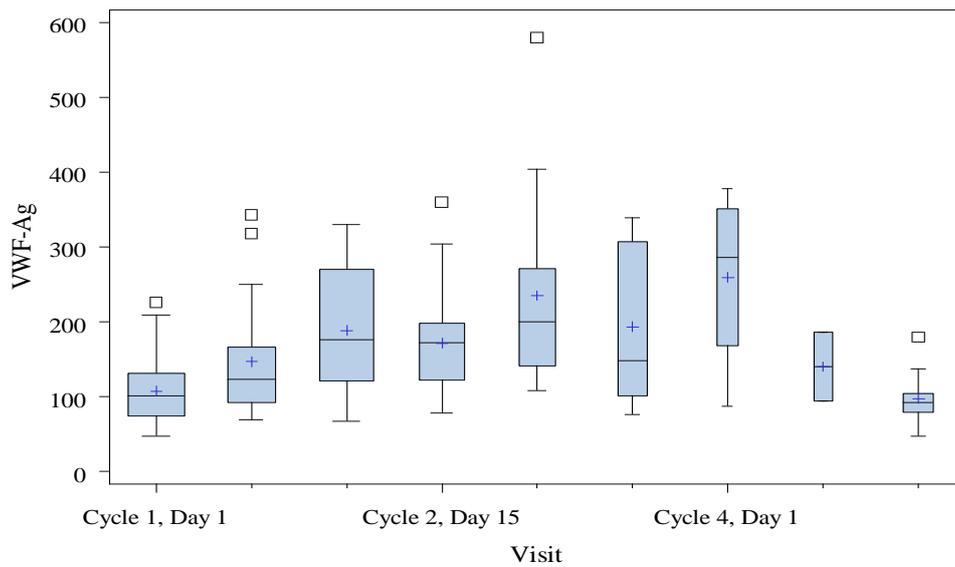
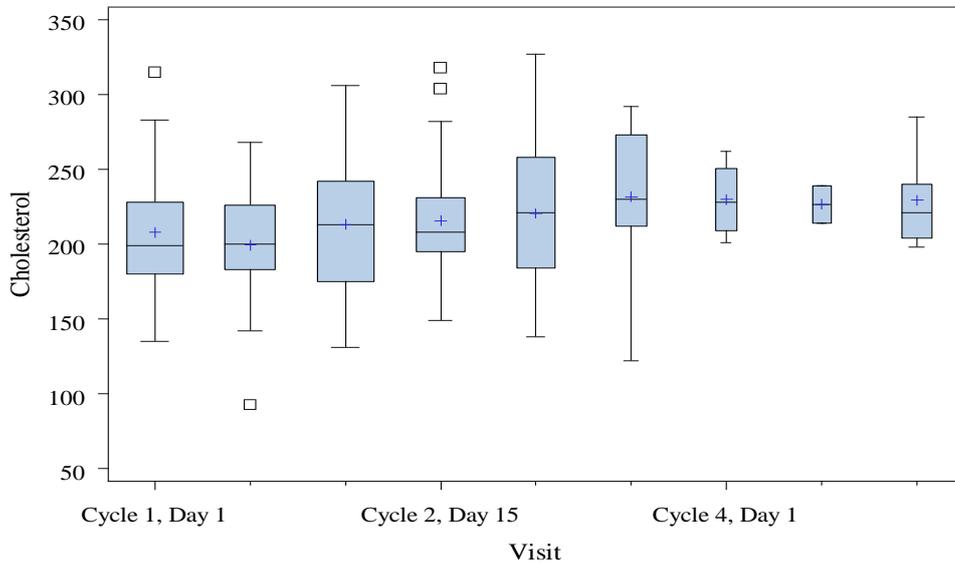
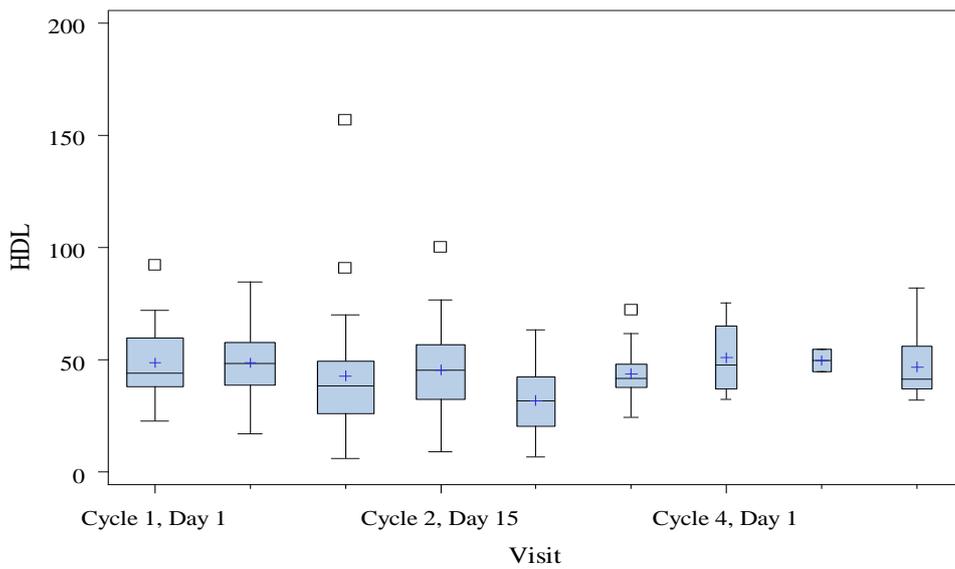


Abbildung 3.3: Cholesterin-Serumspiegel im zeitlichen Verlauf unter Chemotherapie, box-whiskers plot



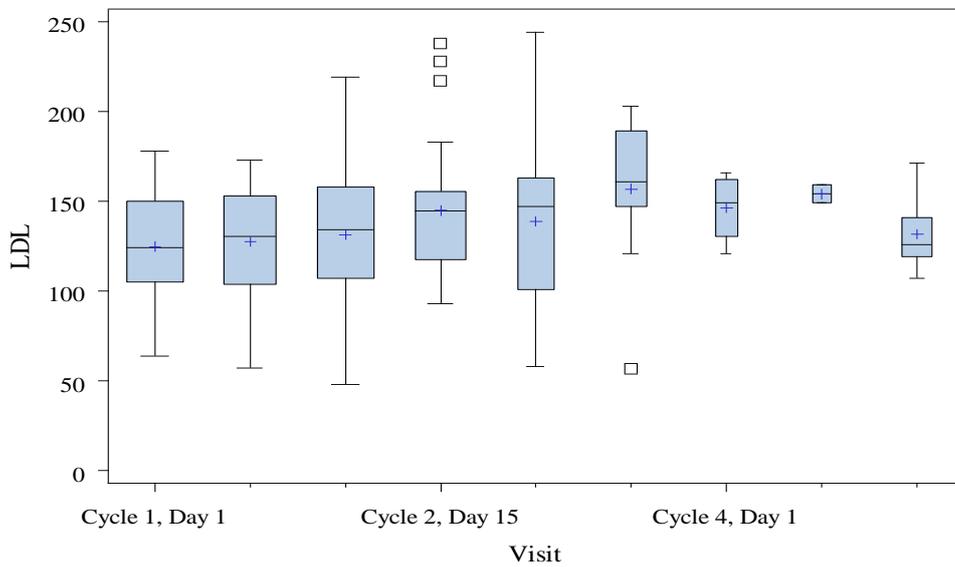
Box width varies with n

Abbildung 3.4: High density Lipoprotein (HDL) im zeitlichen Verlauf unter Chemotherapie, box-whiskers plot



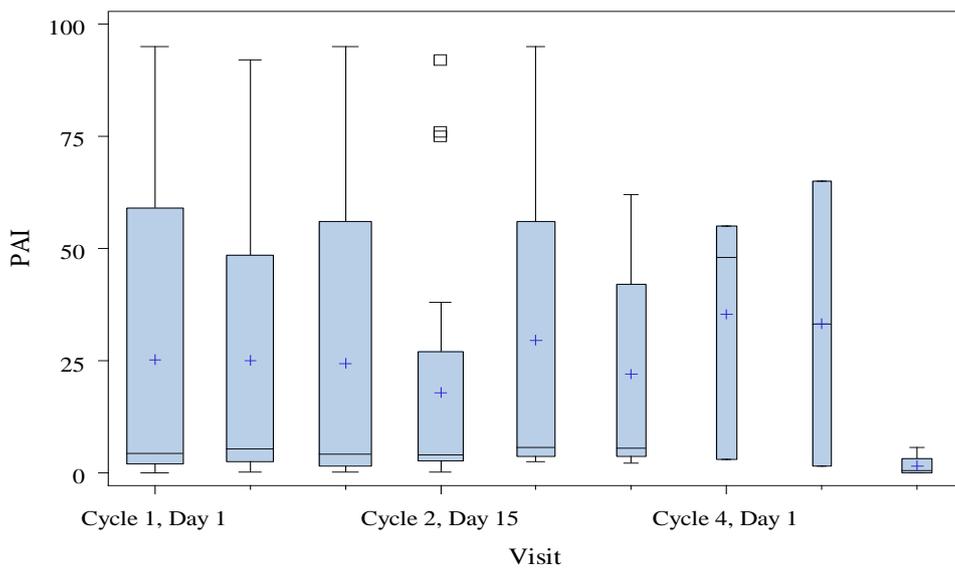
Box width varies with n

Abbildung 3.5: Low density Lipoprotein im zeitlichen Verlauf unter Chemotherapie



Box width varies with n

Abbildung 3.6: PAI im zeitlichen Verlauf unter Chemotherapie, box-whiskers plot



Box width varies with n

Abbildung 3.7: Homozystein im zeitlichen Verlauf unter Chemotherapie, box-whiskers plot

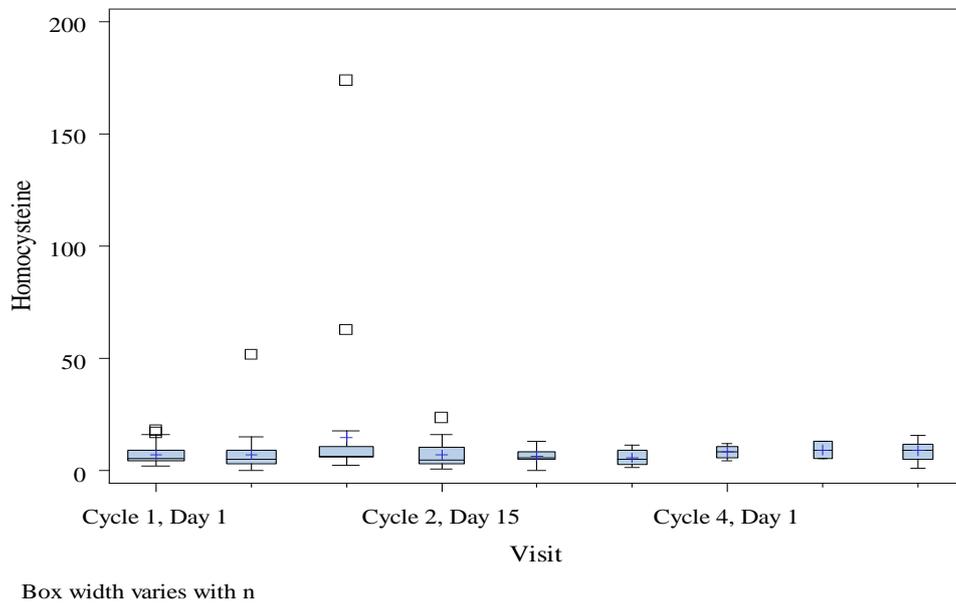


Abbildung 3.8: Lipoprotein (a) im zeitlichen Verlauf unter Chemotherapie, box-whiskers plot

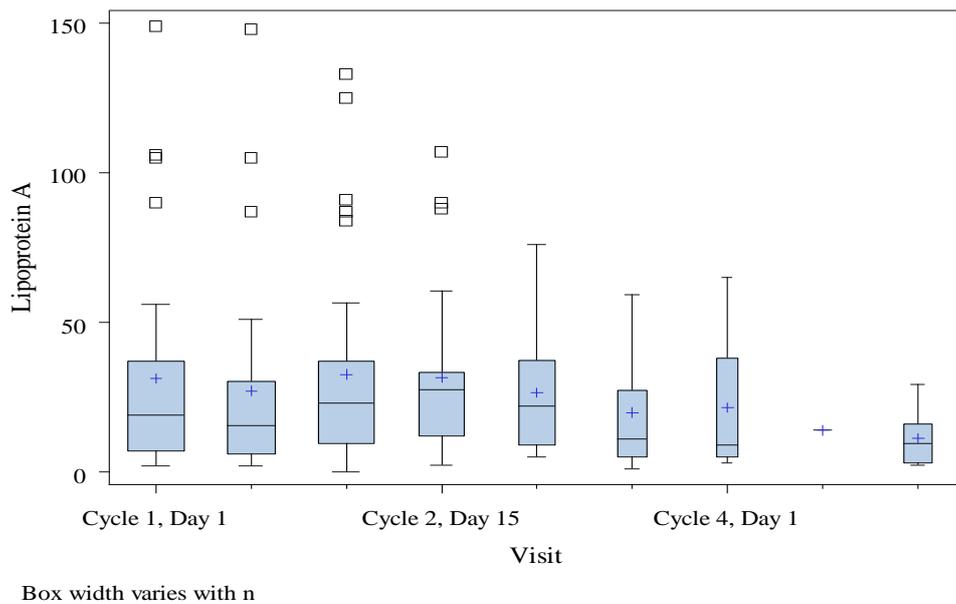


Abbildung 3.9: Troponin T im zeitlichen Verlauf unter Chemotherapie, box-whiskers plot

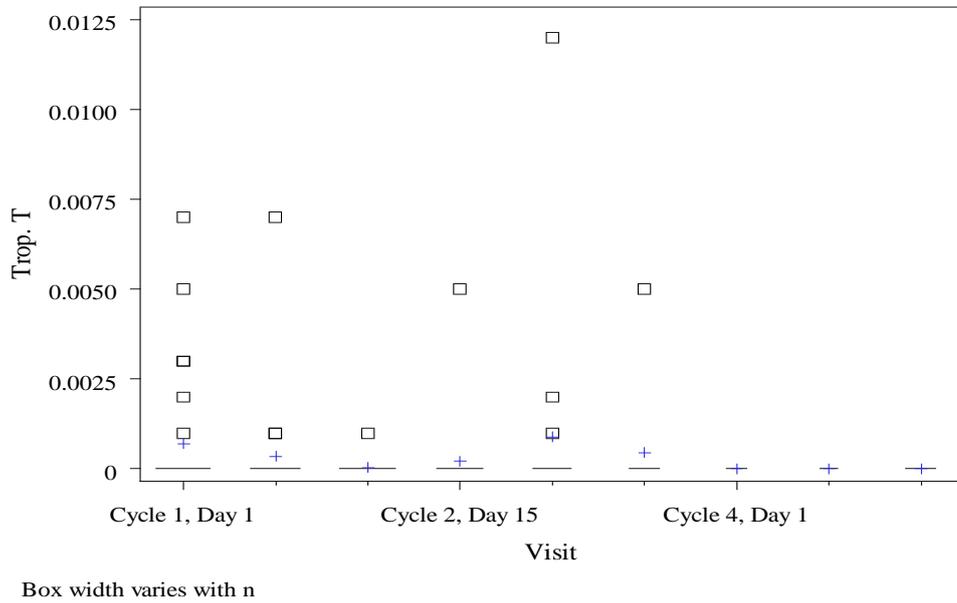


Abbildung 3.10: Individuelle Verläufe des von Willebrand Faktors unter Chemotherapie (Meßeinheit %)

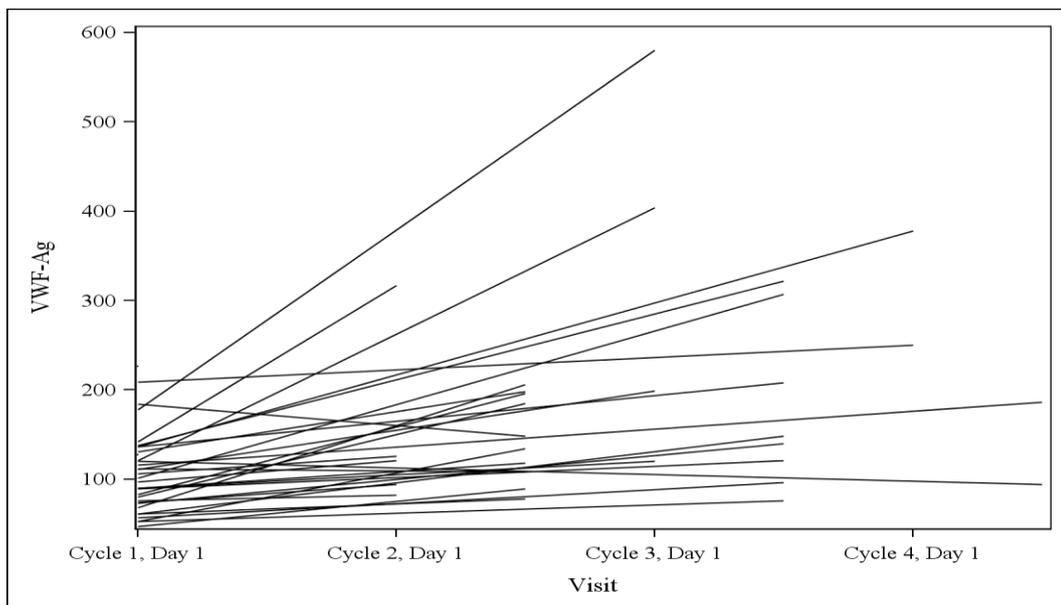


Abbildung 3.11: Individuelle Verläufe des Kollagenbindungskapazität unter Chemotherapie (Meßeinheit %)

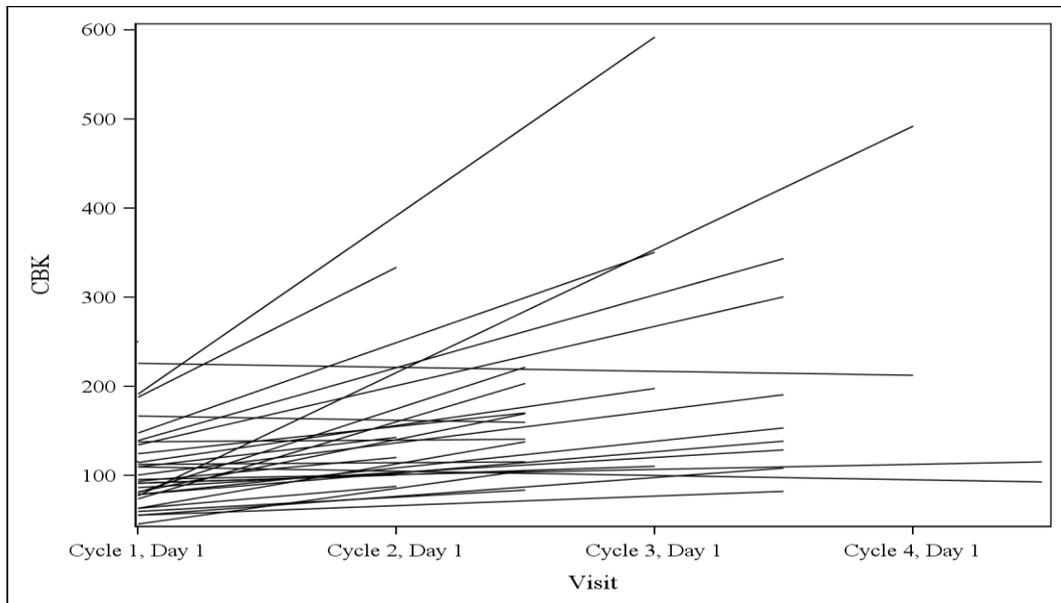
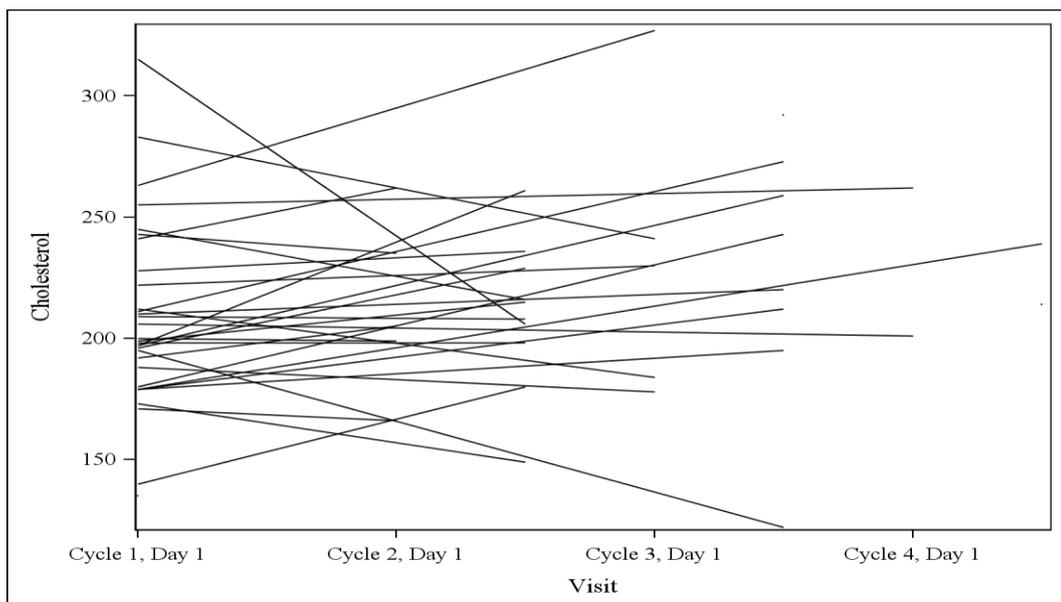


Abbildung 3.12: Individuelle Verläufe des Cholesterinspiegels unter Chemotherapie (Meßeinheit mg%)



**Abbildung 3.13: Individuelle Verläufe des Serum-LDL unter Chemotherapie
(Meßeinheit mg%)**

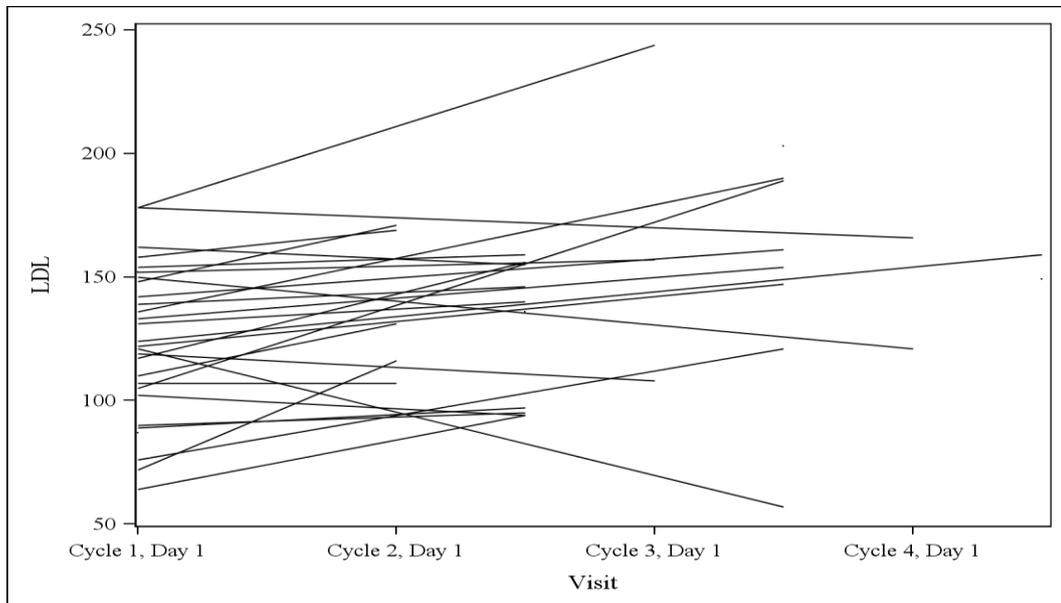


Abbildung 3.14: Individuelle Verläufe des PAI unter Chemotherapie (Meßeinheit mg%)

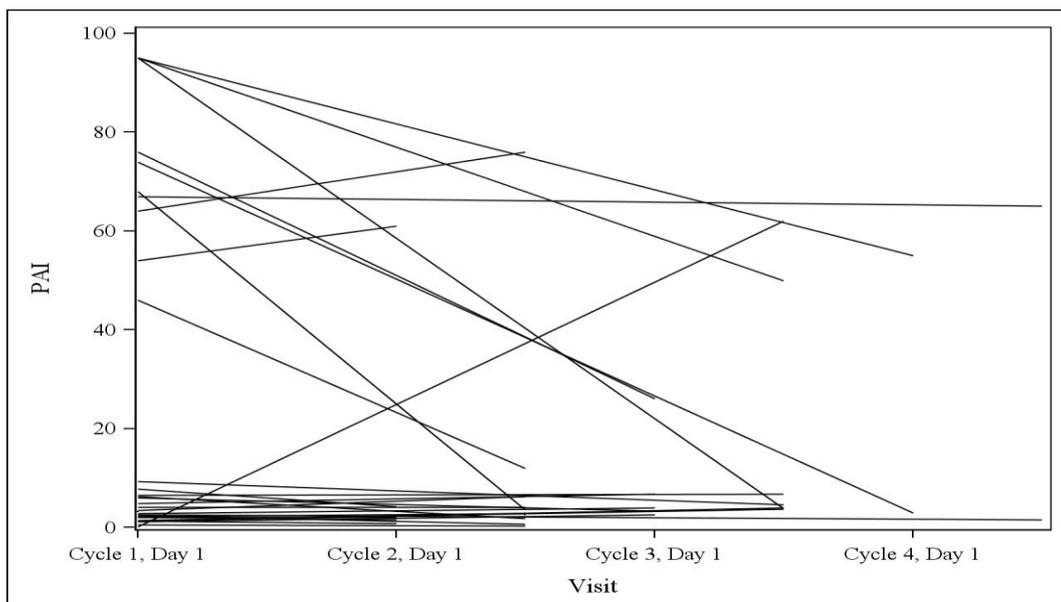


Tabelle 3.5 Wilcoxon signed rank Test für Abweichungen der Laborparameter vom Ausgangswert (original value) und vom oberen Grenzwert der Norm (ULN)

Parameter	Zyklus	Tag	N	P-Werte (Original Werte)	P-Werte (ULN)
Homocystein	3	15	11	0,1230	0,0420
	4	1	4	0,5000	0,5000
	4	15	2	1,0000	1,0000
LDL	99	99	11	0,1299	0,3320
	1	15	23	0,3668	0,6485
	2	1	27	0,7145	0,5134
	2	15	21	0,0582	0,0139
	3	1	12	0,7334	0,8657
	3	15	9	0,0977	0,0078
	4	1	3	0,7500	0,7500
	4	15	1	1,0000	1,0000
	99	99	10	0,3164	0,3203
Lipoprotein A	1	15	26	0,0350	0,0273
	2	1	32	0,7816	0,8767
	2	15	24	0,2839	0,2920
	3	1	16	0,7720	0,2968
	3	15	11	1,0000	0,3750
	4	1	4	0,2500	0,2500
	4	15	2	0,5000	0,5000
PAI	99	99	10	0,0059	0,0059
	1	15	23	0,0124	0,0006
	2	1	28	0,1045	0,1116
	2	15	22	0,3885	0,1207
	3	1	17	0,5308	1,0000
	3	15	10	0,3223	0,1094
	4	1	3	0,2500	0,2500
Troponin-I	4	15	2	0,5000	0,5000
	99	99	11	0,0098	0,0010
	1	15	24	0,5313	.
	2	1	28	0,0625	.
	2	15	22	0,6250	.
	3	1	15	0,5000	.
	3	15	9	1,0000	.
VWF-Ag	4	1	3	1,0000	.
	4	15	1	.	.
	99	99	11	.	.
	1	15	26	<0,0001	0,0001
	2	1	31	<0,0001	<0,0001
	2	15	24	<0,0001	<0,0001
	3	1	16	<0,0001	<0,0001
VWF-Ag	3	15	11	0,0020	0,0020
	4	1	4	0,2500	0,2500
	4	15	2	1,0000	1,0000
	99	99	11	0,7480	0,9658

4. Diskussion

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Studie ist die signifikante Erhöhung des von Willebrand Faktors (vWF) und der damit assoziierten Kollagenbindungskapazität (CBK) im Gefolge der Chemotherapie.

Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Studie von Nuver et al. (Nuver *et al*, 2005a), die erstmals bei Hodentumor-Patienten eine vWF-Erhöhung unter Chemotherapie fanden. Jene Autoren fanden bei 62 Patienten prätherapeutisch einen vWF-Spiegel von 98% (Median) und einen Anstieg am Ende der Chemotherapie auf 130%. Dieser Anstieg ist zwar moderat jedoch statistisch signifikant. Ein sehr ähnliches Ergebnis findet sich auch in unserer Studie, wenngleich ein direkter Vergleich der Meßwerte mit der Nuver-Studie nicht möglich ist. In unserer Auswertung wurden andere statistische Vergleichsmethoden gewählt, jedoch zeigen v.a. die Spaghetti-Diagramme von vWF und CBK, daß tatsächlich die weit überwiegende Mehrzahl der Patienten einen moderaten Anstieg der Werte verzeichnet. Die box-whiskers Diagramme zeigen einen nahezu konstanten Anstieg der medianen vWF Medianwerte unter der Chemotherapie. Lediglich am Ende des vierten Zyklus zeigt die box-whiskers Darstellung wieder einen Rückgang der Medianwerte. Am 1.Tag des 4. Zyklus ist der mediane vWF-Wert auf insgesamt 186% angestiegen. Der Anstieg ist somit sehr augenfällig und auch statistisch signifikant im Wilcoxon signed rank Test. Beide Rechenmodelle, also der Vergleich mit dem Ausgangswert („original value“) sowie der Vergleich mit dem oberen Wert der Norm („ULN“), führen zu einem signifikantem Ergebnis. Diese Homogenität der verschiedenen statistischen Ergebnisse bestärkt insgesamt das gefundene klinische Ergebnis des vWF-Anstieges. Die in der vorliegenden Studie gefundene Erhöhung des vWF-Wertes unter der Chemotherapie entspricht auch im numerischen Ausmaß etwa den Angaben der Arbeitsgruppe um Nuver. Der Rückgang des medianen vWF-Spiegels am Ende des vierten Zyklus paßt zunächst nicht mit der vorgenannten Einschätzung einer Erhöhung überein. Allerdings konnten an diesem Zeitpunkt nur noch insgesamt zwei Patienten untersucht werden. Eine solche Messung ist daher vielen Zufälligkeiten unterworfen, und eine sinnvolle Benennung eines Medianwertes bei n=2 ist hier nicht möglich. Die Meßwerte dieser zwei zuletzt untersuchten Patienten dürfen daher für die Betrachtung des

Gesamtergebnisses außer acht gelassen werden.

Die vorliegende Studie bestätigt auch eine frühe Untersuchung von Licciardello et al. (Licciardello *et al*, 1985), die bei Patienten mit Tumoren aus dem Kopf-Hals Bereich unter Cisplatin-haltiger Therapie einen sehr deutlichen Anstieg von vWF fanden.

Methodenkritisch muß an dieser Stelle eingeräumt werden, daß in der vorliegenden Studie 16.5% aller geplanten Messungen nicht durchgeführt werden konnten (Tabelle 3.1). Die Aussagekraft der vorliegenden Ergebnisse wird daher sicher durch diesen methodischen Mangel geschmälert. Zur Erläuterung dieser relativ hohen Fehlquote muß gesagt werden, daß die Blutentnahmen für die Studien-Messungen im Rahmen des klinischen Routinebetriebes durchgeführt wurden. Obwohl alle am klinischen Betrieb beteiligten Mitarbeiter (Pflegepersonal und Stationsärzte) grundsätzlich über die Studie informiert waren, ist die gesonderte Vorbereitung der entsprechenden Blutentnahme-Röhrchen gelegentlich offensichtlich aus menschlichen Gründen versäumt worden. Solche technischen bzw. menschlichen Fehler sind jedoch ein regelmäßiges Merkmal aller klinischen Studien. Eine Fehlquote von knapp 17% ist zwar nicht unbeträchtlich, jedoch liegt diese Größenordnung durchaus noch im Rahmen der bei klinischen Studien anzutreffenden Mangelquote. Der hierdurch bedingte Qualitätsverlust ist somit auch noch als tolerabel einzuschätzen, und eine signifikante Verzerrung der Meßergebnisse ist nicht anzunehmen. Für diese Einschätzung spricht insbesondere auch die außerordentlich eindeutige Dokumentation der individuellen Meßwert-Verläufe in den sogenannten Spaghetti plots. Dort zeigt sich, daß mit Ausnahme von zwei Patienten, alle Probanden einen deutlichen Anstieg des vWF-Wertes im Verlauf der Chemotherapie aufweisen.

Die Aussagekraft der vorliegenden Studie wird sicher auch durch die insgesamt noch geringe Zahl an Patienten (n=33) limitiert. Wünschenswert für eine statistisch klare Aussage wären Patientenzahlen von deutlich über n=100. Allerdings muß hier eingeräumt werden, daß der Hodenkrebs eine vergleichsweise niedrige Inzidenz aufweist und nur maximal die Hälfte aller Fälle überhaupt der Chemotherapie bedarf. Die Rekrutierung der Patienten hat daher über drei Jahre in Anspruch genommen. Aus diesem Grunde ist die Gesamtzahl von 33 Patienten mit Chemotherapie dann doch als

eine wohl akzeptable und realistische Kollektivgröße anzusehen.

Aus methodisch-statistischer Sicht muß auch das Problem der Vielfachuntersuchung („sog. „multiple testing“) erwähnt werden. Hiermit ist die Möglichkeit gemeint, daß bei vielfachen Testansätzen auch einmal ein zufällig signifikantes Ergebnis gefunden werden kann. In der vorliegenden Studie wurden jedoch insgesamt nur 9 verschiedene Parameter getestet, was aus methodisch-statistischer Sicht noch kaum in die Problemzone des „multiple testing“ fallen dürfte. Außerdem unterscheiden sich die getesteten Parameter zum Teil sehr deutlich hinsichtlich ihrer biologischen Funktionen. Somit erscheint eine Beeinflussung des vorliegenden Ergebnisses durch das Problem des „multiple testing“ eher eine nur theoretische Erwägung zu sein.

Prinzipiell wird ein Anstieg des vWF vornehmlich durch Schädigung des Endothels hervorgerufen (Goto, 2001),(Ruggeri & Ruggeri, 2004),(Reininger, 2008). Der Faktor wird dabei aus den Endothelzellen in die Blutbahn freigesetzt. Die physiologische Funktion des Faktors ist die Förderung der Thrombozytenaggregation und der Koagulation der Plättchen an der verletzten Gefäßwandstelle (Schneppenheim & Budde, 2008). Der Auslöser für die Freisetzung des vWF bei den Patienten der vorliegenden Studie ist unzweifelhaft die zytostatische PEB Chemotherapie.

Der von Willebrand Faktor verhält sich auch wie ein „Akute Phase Protein“, das bei infektiösen Ereignissen ansteigen kann (Schneppenheim & Budde, 2008) ähnlich wie das „C“ reaktive Protein (CRP). Somit wäre es vorstellbar, daß das vorliegende Ergebnis auch durch interkurrente chemotherapie-assoziierte Infektionen beeinflusst worden ist. Da jedoch keiner der teilnehmenden Patienten ein solches klinisch relevantes Ereignis zu verzeichnen hatte, ist auch dieser Störfaktor auszuschließen.

Daß Gefäßwandschäden unter der PEB-Chemotherapie auftreten können, ist bisher wenig beachtet worden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, daß dieser Problematik zukünftig klinisch mehr Beachtung geschenkt werden sollte. Auf der anderen Seite ist die nun erkennbar gewordene vaskuläre Toxizität nicht wirklich erstaunlich, denn die Kombinationstherapie mit PEB ruft eine wahre Fülle von verschiedenartigen akuten und chronischen Nebenwirkungen hervor (Bokemeyer *et al*,

1996), (Chaudhary & Haldas, 2003). Die Annahme ist plausibel, daß die starke zytotoxische Wirkung von PEB vor dem Gefäßendothel nicht Halt macht. Möglicherweise werden also Endothelzellen, wie viele andere replizierende Körperzellen auch, durch direkte zytotoxische Wirkung in Apoptose überführt, so daß an der Gefäßwand direkte Schäden entstehen. Am wahrscheinlichsten ist, daß diese Schäden– wie etwa nach Schnee- und Eisbefall am Straßenbelag - am ehesten an leicht vorgeschädigten Stellen auftreten. Das junge Alter der meisten Hodentumor-Patienten könnte hier protektiv wirken, denn einerseits bestehen im frühen Erwachsenenalter zumeist noch wenige Gefäßwandschäden im Sinne einer Atherosklerose. Somit bestünde weniger Angriffsfläche für die endotheltoxische Chemotherapie. Andererseits ist es vorstellbar, daß die körpereigenen reparativen Mechanismen bei jungen Menschen kraftvoller und effektiver wirken könnten als bei älteren Menschen. Möglicherweise sind die tatsächlich eintretenden vaskulären Schäden unter der Chemotherapie aufgrund des jungen Alters der Patienten bisher weitgehend unbemerkt geblieben oder aber als sporadische bzw. singuläre Ereignisse nicht in systematische Betrachtungen aufgenommen worden. Allerdings ist diesbezüglich erwähnenswert, daß bereits 1980 (Vogelzang *et al*, 1980) und 1981 (Bodensteiner, 1981) erste Fallberichte über koronare Ereignisse unter der Hodentumor-Chemotherapie publiziert wurden, die aber im Schrifttum nur auf eine äußerst geringe Resonanz stießen.

Der hier gefundene Anstieg des von Willebrand Faktors unter der Chemotherapie signalisiert offenkundig eine subtile Schädigung des Gefäßendothels. An diesen „Schadstellen“ setzen nun Reparationsprozesse ein, vornehmlich Thrombozytenaggregationen. Bei Hinzutreten von weiteren prokoagulativen Prozessen kann es an den genannten Schadstellen dann leicht zu überschießenden intravasalen Gerinnungsprozessen kommen mit nachfolgender Gefäßlumen-Einengung und schwerwiegenden klinischen Symptomen (Gerl, 1998). Solche prokoagulativen Kofaktoren könnten beispielsweise die schon 1865 von Trousseau beschriebene allgemeine Hyperkoagulabilität von Tumorpatienten sein (De Cicco, 2004) oder auch eine Cisplatin-getriggerte Hyperkoagulabilität, wie sie zumindest unter Laborbedingungen bereits nachgewiesen wurde (Lü *et al*, 2008). Die vorliegende Untersuchung stützt die vorstehende Theorie zur Pathogenese der akuten vaskulären

Toxizität bei Hodentumor-Patienten durch den indirekten Nachweis der Gefäßwandschädigungen.

Noch 1992 wurde in einer Übersichtsarbeit aus Indianapolis, der Institution mit der weltweit umfangreichsten Erfahrung in der Chemotherapie von Hodentumoren, berichtet, daß bei der PEB-Chemotherapie kaum vaskuläre Probleme auftreten (Nichols *et al*, 1992). Diese Einschätzung wurde erst zehn Jahre später relativiert durch Erfahrungsberichte aus europäischen Behandlungszentren, die gefunden hatten, daß nach Chemotherapie ein signifikant erhöhtes Langzeit-Risiko von vaskulären Komplikationen besteht (Meinardi *et al*, 2000),(Strumberg *et al*, 2002),(Huddart *et al*, 2003). Eine norwegische Studie bestätigte kürzlich, daß nach Chemotherapie bei Hodentumor-Patienten im Langzeitverlauf ein signifikant erhöhtes Risiko besteht für die Entwicklung von Myokardinfarkten, Hypertonie und zerebralen Insulten. Diese Autoren berichten, daß Patienten nach PEB-Therapie ein 5.7 fach erhöhtes Herzinfarkttrisiko und ein 2.6 fach erhöhtes Atherosklerose-Risiko aufweisen gegenüber Patienten, die nur operiert worden waren (Haugnes *et al*, 2010). Das im Langzeitverlauf deutlich erhöhte Risiko von vorzeitiger Atherosklerose und aller damit assoziierten Komplikationen ist heute unbestritten. Die Kenntnis über dieses spezifische Folgerisiko der Chemotherapie hat inzwischen auch Eingang in die klinische Praxis gefunden, indem Blutdruckmessungen und anamnestische Evaluation von Gefäßproblemen als Bestandteil der Nachsorgeuntersuchungen empfohlen wurden (Pottek *et al*, 2005), (Cathomas *et al*, 2010).

Die Ursache dieser späten vaskulären Toxizität ist komplex und heute noch nicht endgültig aufgeklärt (Steingart, 2005),(Vaughn *et al*, 2008). Eine wesentliche Rolle dürften aber metabolische Prozesse spielen, wie etwa die bekannte Erhöhung des Serum-Cholesterinspiegels im Spätverlauf nach Chemotherapie (Oh *et al*, 2007). Auch andere metabolische Mechanismen müssen beteiligt sein, denn es kommt nach Chemotherapie häufig zu einer Erhöhung des Body Mass Index und zu einer erheblichen Inzidenz-Zunahme des metabolischen Syndroms (Sagstuen *et al*, 2005), (Nuver *et al*, 2005b). Auch endokrine Mechanismen könnten involviert sein, denn bei einer nicht geringen Zahl von Hodentumor-Patienten kommt es zu einer progredienten endokrinen Insuffizienz der Rest-Gonade mit der Ausbildung eines Testosteronmangels

(Berger *et al*, 1996),(Brennemann *et al*, 1997). Insgesamt ist die Langzeit-Schädigung des Gefäßsystems nach Chemotherapie daher wohl die mittelbare Folge einer Summation von subtilen Veränderungen im metabolischen und endokrinen Bereich, die zwar ursprünglich von der Chemotherapie ausgelöst wurden aber erst durch ihre degenerative Langzeitwirkung zu den bekannten schweren vaskulären Schäden führen.

Seit wenigen Jahren wird zunehmend auch eine *akute vaskuläre Toxizität* der Chemotherapie bekannt. So wurden seit 1980 insgesamt über 30 Fälle mit Myokardinfarkt in direktem zeitlichen Zusammenhang mit der Chemotherapie berichtet (Gerl, 1994), (Ozben *et al*, 2007), (Ghosh *et al*, 2008). Auch sporadische Berichte über ischämische zerebrale Insulte (Etgen *et al*, 2009) und akute Verschlüsse großer arterieller Gefäße (Verdonk *et al*, 2008), (Le Ho *et al*, 2009) wurden wiederholt publiziert. Kürzlich wurde in einer deutschlandweiten Prävalenzstudie ermittelt, daß bei mindestens 0.3% aller chemotherapierten Hodentumor-Patienten akute vaskuläre Komplikationen auftreten (Dieckmann *et al*, 2010). Zu diesen Ereignissen zählen Myokardinfarkte, zerebrale Insulte und periphere arterielle Gefäßverschlüsse. Eine wesentliche Erkenntnis jener Studie war, daß die beobachteten vaskulären Ereignisse überwiegend thromboembolischen Ursprungs sind, also nicht etwa auf chronische degenerative Prozesse an der Gefäßwand zurück zu führen sind. Somit scheint es sich hier um eine zweite Art von vaskulärer Schädigung zu handeln. Die akut während der Chemotherapie auftretenden vaskulären Ereignisse können pathogenetisch nicht auf lang wirkende degenerative Prozesse im Gefolge der Therapie zurück zu führen sein, denn die Expositionsdauer ist hierfür zu kurz. Diese zweite Art der vaskulären Toxizität ist thromboembolischen Ursprungs, wie klinisch durch koronarangiographische Untersuchungen belegt werden konnte (Dieckmann *et al*, 2010). Offenbar werden – wie oben beschrieben - durch die Chemotherapie an Gefäßwand und im Gerinnungssystem pro-koagulative Prozesse freigesetzt. Auch direkte kardiotoxische, also nicht vaskulärbedingte Effekte der Chemotherapie können eine Rolle bei der Entstehung von therapie-assoziierten Myokardinfarkten spielen, wie durch peri-therapeutische wiederholte kardiale Funktionsmessungen gezeigt werden konnte (Altena *et al*, 2009). Direkte kardiotoxische Effekte sind bekannt bei der Verwendung von Anthrazyklinen, wie Doxorubicin oder Epirubicin, die bei der Therapie von Mammakarzinomen zum Einsatz kommen (Hershman & Shao, 2009). Diese

Medikamentengruppe ist jedoch bei den Keimzelltumoren nicht indiziert. Daher dürfte eine direkte kardiotoxische Wirkung der PEB-Therapie beim Hodentumor wohl keine Rolle bei den beobachteten Myokardinfarkten gespielt haben.

Ob direkte Gefäßwandschäden auch eine Rolle bei der vaskulären Langzeit-Toxizität der Chemotherapie beim Hodentumor spielen, ist dagegen weitaus unklarer. Erhellend könnte hier die in den Spätmessungen der vorliegenden Studie beobachtete Normalisierung des vWF und der CBK sein. Diese wichtige Beobachtung könnte so interpretiert werden, daß offenbar die unter der Chemotherapie auftretenden akuten Gefäßwandschäden nach einigen Monaten so weit ausge bessert sind, daß keine Erhöhung der Signalstoffe vWF und CBK mehr nachweisbar ist. Die vorliegende Studie konnte diese Normalisierung erstmals nachweisen. Die Studien von Nuver *et al.* (Nuver *et al.*, 2005a) sowie von Licciardello (Licciardello *et al.*, 1985) hatten bisher lediglich eine Erhöhung der genannten Werte am Ende der Chemotherapie darlegen können. Die vorliegende Studie erlaubt damit erstmals die Schlußfolgerung, daß frühe und späte vaskuläre Toxizität der Chemotherapie wahrscheinlich eine unterschiedliche Pathogenese aufweisen.

Die Einschätzung, daß die frühen und die späten Gefäßwandschäden nach Chemotherapie pathogenetisch unterschiedlich sind, wird auch durch die weiteren Ergebnisse der vorliegenden Studie belegt. So fand sich beispielsweise kein signifikanter Anstieg des Cholesterinwertes und des low density lipoproteins (LDL) während der Zeit der Chemotherapie, obwohl diese Parameter sehr eng mit der Entstehung von degenerativen atherosklerotischen Gefäßschäden assoziiert sind. Auch das als Risiko-Indikator für degenerative kardiovaskuläre Erkrankungen angesehene Homozystein zeigte in der vorliegenden Studie keinerlei Abweichung vom Ausgangswert im Verlauf der Chemotherapie. Dieser Befund stützt ebenfalls die Einschätzung, daß die vaskuläre Akut-Schädigung durch Chemotherapie keinesfalls auf degenerative, chronische Effekte zurück zu führen ist.

Die anderen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, wie die Konstanz der Serumspiegel von Lipoprotein (a) und PAI-1, zeigen, daß durch die Chemotherapie offenbar kaum oder zumindest nur sehr wenig direkte Einflüsse auf das Gerinnungssystem eintreten. Eine fehlende Beeinflussung des PAI-1 Wertes durch die Chemotherapie war auch

schon von Nuver et al. beschrieben worden (Nuver *et al*, 2005a). Im Gegensatz zum vWF, der als Folge einer zytotoxischen Gefäßwandschädigung aus den Endothelzellen freigesetzt wird, stellen die anderen genannten Parameter physiologische Inhibitoren der Fibrinolyse dar. Sind diese Parameter vermehrt vorhanden, so hätte dies einen thrombogenen Effekt, weil die Fibrinolyse behindert würde. Lipoprotein (a) und PAI-1 verändern sich jedoch nicht unter der Therapie. Somit darf geschlußfolgert werden, daß die akute vaskuläre Toxizität der PEB-Therapie vornehmlich auf einer Schädigung der Gefäßwand beruht und nicht so sehr auf einer verstärkten Thromboseneigung.

Bei insgesamt 8 Patienten wurde in der vorliegenden Studie ein leicht erhöhter Troponin I Wert im Verlauf der Chemotherapie gemessen. Keiner dieser Patienten hatte jedoch ein akutes kardiales Ereignis. Interessanterweise hatten auch 5 Patienten bereits vor Beginn der Chemotherapie erhöhte Troponin-I Spiegel, ebenfalls ohne eine damit verknüpfte klinische Symptomatik. Somit müssen diese sporadischen Troponin - Erhöhungen wohl als zufällige falsch-positive Schwankungen interpretiert werden.

Insgesamt bestätigt die vorliegende Arbeit das Auftreten einer akuten Schädigung am Gefäßendothel durch die Hodentumor-Chemotherapie. Diese Nebenwirkung ist bisher nur wenig beachtet worden. Die Evidenz für das Auftreten dieser speziellen Toxizität ist nunmehr so eindeutig, daß eine aktive prophylaktische Verabreichung von Antikoagulantien klinisch in Erwägung gezogen werden sollte, sofern bei einem Patienten schon bei Therapiebeginn eindeutige Risikomerkmale für Gefäßkrankheiten vorliegen (hoher Body Mass Index, Rauchen, Hypertonie, eigene Anamnese).

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit liefert bestätigende Evidenz für die Hypothese, daß durch Cisplatin-haltige Chemotherapie bei Hodentumor-Patienten eine signifikante vaskuläre Akut - Toxizität ausgelöst wird. Diese Hypothese war durch klinische Beobachtungen von akuten vaskulären Ereignissen bei laufender PEB-Chemotherapie (Platin, Etoposid, Bleomycin) sowie durch eine holländische Pilot-Studie generiert worden.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei 33 Hodentumor-Patienten sequentielle Messungen von Parametern vorgenommen, die mit Endothelschäden assoziiert sind oder die eine Veränderung der intravasalen Gerinnungsbereitschaft anzeigen oder die mit degenerativen vaskulären Prozessen assoziiert sind. Im einzelnen handelte es sich um die folgenden Parameter: Von Willebrand Faktor (vWF), Kollagenbindungskapazität (CBK), Homozystein, Lipoprotein (a), Cholesterin, Low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL), Troponin I, Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI). Alle Laboruntersuchungen erfolgten mit konventionellen Standardmethoden im klinischen Routinelabor. Die Messungen wurden jeweils vor und nach jedem Chemotherapiezyklus durchgeführt. Bei insgesamt 11 Patienten wurde eine zusätzliche späte Messung nach 3 – 24 Monaten durchgeführt.

Die Meßwerte wurden tabellarisch erfaßt und deskriptiv statistisch ausgewertet. Die individuellen Endwerte wurden mit den Ausgangswerten statistisch verglichen unter Anwendung des signed rank Wilcoxon Tests.

Es fand sich ein signifikanter Anstieg des von Willebrand Faktors (vWF) sowie der mit diesem Parameter assoziierten Kollagenbindungskapazität (CBK) ($p = 0.002$).

Die Spätmessungen des vWF und der CBK zeigten keine signifikanten Abweichungen vom Ausgangswert mehr, d.h. die zwischenzeitliche Erhöhung hatte sich zurück gebildet.

Alle anderen Parameter zeigten während der gesamten Chemotherapie keine signifikanten Veränderungen.

Prinzipiell tritt eine Erhöhung des von Willebrand Faktors bei einer Schädigung des Gefäßendothels auf. Durch die Freisetzung dieses Faktors aus den Endothelzellen werden Reparaturprozesse in Gang gesetzt. Die hier gefundene signifikante Erhöhung des von Willebrand Faktor zeigt, daß durch die Chemotherapie offenkundig Schädigungen am Gefäßendothel ausgelöst werden.

Das Ergebnis dieser Arbeit stellt somit eine wichtige Unterstützung dar für die Hypothese der akuten vaskulären Toxizität der Hodentumor-Chemotherapie. Das Ergebnis bestätigt eine holländische Studie aus dem Jahre 2005 (Nuver *et al*, 2005a). Neu ist die Erkenntnis, daß der Anstieg des vWF nur vorübergehend ist, denn die Spätmessungen der vorliegenden Arbeit zeigten ausschließlich Normalwerte nach Abschluß der Chemotherapie.

Damit gibt die vorliegende Arbeit auch eindeutige Hinweise darauf, daß die in der Literatur gut belegte vaskuläre Spättoxizität der Chemotherapie und die hier untersuchte akute vaskuläre (Früh-) Toxizität dieser Therapie offenbar eine unterschiedliche Pathogenese haben.

Die Chemotherapie der Hodentumoren ist ein Paradebeispiel für erfolgreiche Chemotherapie einer Krebserkrankung. Im Spektrum der unerwünschten Nebenwirkungen muß der akuten vaskulären Toxizität nunmehr ein gesicherter Platz zugewiesen werden. Prophylaktische antikoagulative Maßnahmen (z. B. Acetylsalicyläure) sollten bei augenfälligen Risikopatienten zu Beginn der Chemotherapie klinisch in Erwägung gezogen werden.

6. Literatur

Albers P, Albrecht W, Algaba F, Bokemeyer C, Cohn-Cedermark G, Fizazi K, Horwich A, Laguna MP (2011) EAU Guidelines on Testicular Cancer: 2011 update. *Eur Urol* **60**: 304-319

Altena R, Perik PJ, van Veldhuisen DJ, de Vries EG, Gietema JA (2009) Cardiovascular toxicity caused by cancer treatment: strategies for early detection. *Lancet Oncol* **10**: 391-9

Armitage P, Berry G, Matthews JNS (2001) *Statistical methods in medical research (4th ed.)*. Oxford: Blackwell Scientific

Berger CC, Bokemeyer C, Schuppert F, Schmoll HJ (1996) Endocrinological late effects after chemotherapy for testicular cancer. *Br J Cancer* **73**: 1108-14

Bodensteiner DC (1981) Fatal coronary artery fibrosis after treatment with bleomycin, vinblastine, and cis-platinum. *South Med J* **74**: 898-899

Bokemeyer C, Berger CC, Kuczyk MA, Schmoll HJ (1996) Evaluation of long-term toxicity after chemotherapy for testicular cancer. *J Clin Oncol* **14**: 2923-32

Bosl GJ, Motzer RJ (1997) Testicular germ-cell cancer. *N Engl J Med* **337**: 242-253

Boyer M, Raghavan D (1992) Toxicity of treatment of germ cell tumors. *Semin Oncol* **19**: 128-142

Bray F, Ferlay J, Devesa SS, McGlynn KA, Moller H (2006) Interpreting the international trends in testicular seminoma and nonseminoma incidence. *Nat Clin Pract Urol* **3**: 532-543

Brennemann W, Stoffel Wagner B, Helmers A, Mezger J, Jager N, Klingmuller D (1997) Gonadal function of patients treated with cisplatin based chemotherapy for germ cell cancer. *J Urol* **158**: 844-850

Bruhn HD, Hach-Wunderle V, Schambeck CM, Scharf RE (2011) *Hämostaseologie für die Praxis*. , 2. Auflage, Stuttgart: Schattauer

Cathomas R, Helbling D, Stenner F, Rothermundt C, Rentsch C, Shahin O, Seifert HH, Zaugg K, Lorch A, Mayer F, Beyer J, De Santis M, Gillessen S (2010) Interdisciplinary evidence-based recommendations for the follow-up of testicular cancer patients: a joint effort. *Swiss Med Wkly* 140:356-369

Cavalli F, Monfardini S, Pizzocaro G (1980) Report on the International Workshop on staging and treatment of testicular cancer. *Eur J Cancer* **16**: 1367-1372

Chaudhary UB, Haldas JR (2003) Long-term complications of chemotherapy for germ cell tumours. *Drugs* **63**: 1565-1577

Daugaard G, Hansen HH, Rorth M (1990) Treatment of malignant germ cell tumors. *Ann Oncol* **1**: 195-202

De Cicco M (2004) The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. *Crit Rev Oncol Hematol* **50**: 187-196

Dieckmann KP, Gerl A, Witt J, Hartmann JT, Group. GTCS (2010) Myocardial infarction and other major vascular events during chemotherapy for testicular cancer. *Ann Oncol* **21**: 1607-1611

Dieckmann KP, Pichlmeier U (2003) Epidemiologie der testikulären Keimzelltumoren. *Onkologe* **9**: 943-954

Dionisio N, Jardín I, Salido GM, Rosado JA (2010) Homocysteine, intracellular signaling and thrombotic disorders. *Curr Med Chem* **17**: 3109-3119

Einhorn LH (1990) Treatment of testicular cancer: a new and improved model. *J Clin Oncol* **8**: 1777-1181

Einhorn LH (2002) Curing metastatic testicular cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 4592-4595

Etgen T, Weidenhöfer G, Kubin T (2009) Cisplatin-associated occlusion of the internal carotid artery. *Onkologie* **32**: 754-757

Garner MJ, Turner MC, Ghadirian P, Krewski D (2005) Epidemiology of testicular cancer: An overview. *Int J Cancer* **116**: 331-339

Gerl A (1994) Vascular toxicity associated with chemotherapy for testicular cancer. *Anticancer Drugs* **5**: 607-614

Gerl A (1998) Does chemotherapy for testicular cancer increase cardiovascular risk? In *Germ Cell Tumours IV: The Proceedings of the Fourth Germ Cell Tumour Conference, Leeds November 1997.*, Jones WG, Appleyard, I., Harnden, P., Joffe, J.K. (ed), pp 397-400. London: John Libbey & Company

Ghosh N, Chow CM, Korley V, Chisholm R (2008) An unusual case of chronic coronary artery dissection: did cisplatin play a role? *Can J Cardiol* **24**: 795-797

Goto S (2001) Role of von Willebrand factor for the onset of arterial thrombosis. *Clin Lab* **47**: 327-334

Hartmann JT, Kollmannsberger C, Kanz L, Bokemeyer C (1999) Platinum organ toxicity and possible prevention in patients with testicular cancer. *Int J Cancer* **83**: 866-869

Haugnes HS, Wethal T, Aass N, Dahl O, Klepp O, Langberg CW, Wilsgaard T, Bremnes RM, Fossa SD (2010) Cardiovascular risk factors and morbidity in long-term survivors of testicular cancer: a 20-year follow-up study. *J Clin Oncol* **28**: 4649-57

Hershman DL, Shao T (2009) Anthracycline cardiotoxicity after breast cancer treatment. *Oncology (Williston Park)* **23**: 227-234

Hoei-Hansen CE, Rajpert-De Meyts E, Daugaard G, Skakkebaek NE (2005) Carcinoma in situ testis, the progenitor of testicular germ cell tumours: a clinical review. *Ann Oncol* **16**: 863-868

Huddart RA, Norman A, Shahidi M, Horwich A, Coward D, Nicholls J, Dearnaley DP (2003) Cardiovascular disease as a long-term complication of treatment for testicular cancer. *J Clin Oncol* **21**: 1513-1523

International, Group GCCC (1997) International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. *J Clin Oncol* **15**: 594-603

Kannel WB (2005) Overview of hemostatic factors involved in atherosclerotic cardiovascular disease. *Lipids* **40**: 1215-1220

Kollmannsberger C, Beyer J, Droz JP, Harstrick A, Hartmann JT, Biron P, Flechon A, Schoffski P, Kuczyk M, Schmoll HJ, Kanz L, Bokemeyer C (1998) Secondary leukemia following high cumulative doses of etoposide in patients treated for advanced germ cell tumors. *J Clin Oncol* **16**: 3386-91

Kollmannsberger C, Bokemeyer C (2003) Therapie von metastasierten Keimzelltumoren bei Patienten mit "Good prognosis" Kriterien. *Onkologe* **9**: 980-984

Kollmannsberger C, Kuczyk M, Mayer F, Hartmann JT, Kanz L, Bokemeyer C (1999) Late toxicity following curative treatment of testicular cancer. *Semin Surg Oncol* **17**: 275-81

Kolonel LN, Ross RK, Thomas DB, Thompson DJ (1982) Epidemiology of testicular cancer in the Pacific Basin. *Natl Cancer Inst Monogr* **62**: 157-160

Kratz CP, Mai PL, Greene MH (2010) Familial testicular germ cell tumours. *Best Pract*

Krege S, Beyer J, Souchon R, Albers P, Albrecht W, Algaba F, Bamberg M, Bodrogi I, Bokemeyer C, Cavallin-Ståhl E, Classen J, Clemm C, Cohn-Cedermark G, Culine S, Daugaard G, De Mulder PH, De Santis M, de Wit M, de Wit R, Derigs HG, Dieckmann KP, Dieing A, Droz JP, Fenner M, Fizazi K, Flechon A, Fosså SD, Garcia Del Muro X, Gauler T, Geczi L, Gerl A, Germa-Lluch JR, Gillessen S, Hartmann JT, Hartmann M, Heidenreich A, Hoeltl W, Horwich A, Huddart R, Jewett M, Joffe J, Jones WG, Kisbenedek L, Klepp O, Kliesch S, Koehrmann KU, Kollmannsberger C, Kuczyk M, Laguna P, Leiva Galvis O, Loy V, Mason MD, Mead GM, Mueller R, Nichols C, Nicolai N, Oliver T, Ondrus D, Oosterhof GO, Paz Ares L, Pizzocaro G, Pont J, Pottek T, Powles T, Rick O, Rosti G, Salvioni R, Scheiderbauer J, Schmelz HU, Schmidberger H, Schmoll HJ, Schrader M, Sedlmayer F, Skakkebaek NE, Sohaib A, Tjulandin S, Warde P, Weinknecht S, Weissbach L, Wittekind C, Winter E, Wood L, von der Maase H (2008a) European Consensus Conference on Diagnosis and Treatment of Germ Cell Cancer: A Report of the Second Meeting of the European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG): Part II. *Eur Urol* **53**: 497-513

Krege S, Beyer J, Souchon R, Albers P, Albrecht W, Algaba F, Bamberg M, Bodrogi I, Bokemeyer C, Cavallin-Ståhl E, Classen J, Clemm C, Cohn-Cedermark G, Culine S, Daugaard G, De Mulder PH, De Santis M, de Wit M, de Wit R, Derigs HG, Dieckmann KP, Dieing A, Droz JP, Fenner M, Fizazi K, Flechon A, Fosså SD, Garcia Del Muro X, Gauler T, Geczi L, Gerl A, Germa-Lluch JR, Gillessen S, Hartmann JT, Hartmann M, Heidenreich A, Hoeltl W, Horwich A, Huddart R, Jewett M, Joffe J, Jones WG, Kisbenedek L, Klepp O, Kliesch S, Koehrmann KU, Kollmannsberger C, Kuczyk M, Laguna P, Leiva Galvis O, Loy V, Mason MD, Mead GM, Mueller R, Nichols C, Nicolai N, Oliver T, Ondrus D, Oosterhof GO, Paz Ares L, Pizzocaro G, Pont J, Pottek T, Powles T, Rick O, Rosti G, Salvioni R, Scheiderbauer J, Schmelz HU, Schmidberger H, Schmoll HJ, Schrader M, Sedlmayer F, Skakkebaek NE, Sohaib A, Tjulandin S, Warde P, Weinknecht S, Weissbach L, Wittekind C, Winter E, Wood L, von der Maase H (2008b) European Consensus Conference on Diagnosis and Treatment of Germ Cell Cancer: A

Report of the Second Meeting of the European Germ Cell Cancer Consensus group (EGCCCG): Part I. *Eur Urol* **53**: 478-496

Le Ho H, Vauleon E, Boucher E, Gedouin D, Kerbrat P, Raoul JL (2009) Acute ischemia of the lower limb during chemotherapy for testicular cancer: A report of two cases. *Acta Oncol* **48**: 940-942

Licciardello JT, Moake JL, Rudy CK, Karp DD, Hong WK (1985) Elevated plasma von Willebrand factor levels and arterial occlusive complications associated with cisplatin-based chemotherapy. *Oncology* **42**: 296-300

Lü C-F, Yu H-J, Hou J-X, Zhou J (2008) Increased procoagulant activity of red blood cells in the presence of cisplatin. *Chin Med J (Engl)* **121**: 1775-1780

Manecksha RP, Fitzpatrick JM (2009) Epidemiology of testicular cancer. *BJU Int* **104**: 1329-1333

McCully KS (2007) Homocysteine, vitamins, and vascular disease prevention. *Am J Clin Nutr* **86**: 1563S-1568S

McGlynn KA, Cook MB (2009) Etiologic factors in testicular germ-cell tumors. *Future Oncol* **5**: 1389-1402

Meinardi MT, Gietema JA, van der Graaf WT, van Veldhuisen DJ, Runne MA, Sluiter WJ, de Vries EG, Willemse PB, Mulder NH, van den Berg MP, Koops HS, Sleijfer DT (2000) Cardiovascular morbidity in long-term survivors of metastatic testicular cancer. *J Clin Oncol* **18**: 1725-1732

Nichols CR (2001) Chemotherapy of disseminated germ cell tumors. *World J Urol* **19**: 82-89

Nichols CR, Roth BJ, Williams SD, Gill I, Muggia FM, Stablein DM, Weiss RB, Einhorn LH (1992) No evidence of acute cardiovascular complications of chemotherapy for testicular cancer: an analysis of the Testicular Cancer Intergroup Study. *J Clin Oncol* **10**: 760-765

Nuver J, Smit AJ, van der Meer J, van den Berg MP, van der Graaf WT, Meinardi MT, Sleijfer DT, Hoekstra HJ, van Gessel AI, van Roon AM, Gietema JA (2005a) Acute Chemotherapy-Induced Cardiovascular Changes in Patients With Testicular Cancer. *J Clin Oncol* **23**: 9130-9137

Nuver J, Smit AJ, Wolffenbuttel BH, Sluiter WJ, Hoekstra HJ, Sleijfer DT, Gietema JA (2005b) The metabolic syndrome and disturbances in hormone levels in long-term survivors of disseminated testicular cancer. *J Clin Oncol* **23**: 3718-3725

Oechsle K, Bokemeyer C (2011) Treatment of brain metastases from germ cell tumors. *Hematol Oncol Clin North Am* **25**: 605-613

Oh JH, Baum DD, Pham S, Cox M, Nguyen ST, Ensor J, Chen I (2007) Long-term complications of platinum-based chemotherapy in testicular cancer survivors. *Med Oncol* **24**: 175-181

Otokozawa S, Ai M, Asztalos BF, White CC, Demissie-Banjaw S, Cupples LA, Nakajima K, Wilson PW, Schaefer EJ (2010) Direct assessment of plasma low density lipoprotein and high density lipoprotein cholesterol levels and coronary heart disease: results from the Framingham Offspring Study. *Atherosclerosis* **213**: 251-255

Ozben B, Kurt R, Oflaz H, Sezer M, Basaran M, Goren T, Umman S (2007) Acute anterior myocardial infarction after chemotherapy for testicular seminoma in a young patient. *Clin Appl Thromb Hemost* **13**: 439-442.

Patzke J (2011) Von Willebrand Faktor Antigen. In *Hämostaseologie für die Praxis.*, Bruhn HD, Hach-Wunderle V, Schambeck CM, Scharf RE (Hrsg.), 2. Aufl., S. 81-83. Stuttgart: Schattauer

Pearson TA, LaCava J, Weil HF (1997) Epidemiology of thrombotic-hemostatic factors and their associations with cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* **65**: 1674S-1682S

Pottek TS, Hartmann M, Bokemeyer C (2005) Nachsorge und Spättoxizitäten bei Hodentumoren. *Dtsch Ärztebl* **102**: A3342-A3348

Reininger AJ (2008) Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. *Haemophilia* **14 Suppl 5**: 11-26

Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (2008) *Krebs in Deutschland 2003 - 2004. Häufigkeiten und Trends.*, 6. Aufl. Berlin: Robert Koch Institut

Ruggeri ZM, Ruggeri ZM (2004) Platelet and von Willebrand factor interactions at the vessel wall. *Hämostaseologie* **24**: 1-11

Sagstuen H, Aass N, Fossa SD, Dahl O, Klepp O, Wist EA, Wilsgaard T, Bremnes RM (2005) Blood pressure and body mass index in long-term survivors of testicular cancer. *J Clin Oncol* **23**: 4980-4990

Schneppenheim R, Budde U (2008) *Von Willebrand disease and von Willebrand factor. Current aspects of diagnosis and treatment.* Bremen: Uni-Med Verlag

Sokoloff MH, Joyce GF, Wise M, Urologic Diseases in America Project Testis cancer (2007). *J Urol* **177**: 2030-2041

Steingart R (2005) Mechanisms of late cardiovascular toxicity from cancer chemotherapy. *J Clin Oncol* **23**: 9051-9052

Strumberg D, Brugge S, Korn MW, Koeppen S, Ranft J, Scheiber G, Reiners C, Mockel C, Seeber S, Scheulen ME (2002) Evaluation of long-term toxicity in patients after cisplatin-based chemotherapy for non-seminomatous testicular cancer. *Ann Oncol* **13**: 229-236

Tandstad T, Smaaland R, Solberg A, Bremnes RM, Langberg CW, Laurell A, Stierner UK, Ståhl O, Cavallin-Ståhl EK, Klepp OH, Dahl O, Cohn-Cedermark G (2011) Management of Seminomatous Testicular Cancer: A Binational Prospective Population-Based Study From the Swedish Norwegian Testicular Cancer Study Group (SWENOTECA). *J Clin Oncol* **29**: 719-725

Vaughn DJ, Palmer SC, Carver JR, Jacobs LA, Mohler ER (2008) Cardiovascular risk in long-term survivors of testicular cancer. *Cancer* **112**: 1949-1953

Verdonk RC, Rutgers B, Hospers GA (2008) Celiac Trunk Thrombosis and Splenic Infarction During Chemotherapy for a Testicular Germ Cell Tumor. *Urology* **71**: 602

Vogelzang NJ, Frenning DH, Kennedy BJ (1980) Coronary artery disease after treatment with bleomycin and vinblastine. *Cancer Treat Rep* **64**: 1159-1160

Winter C, Albers P (2011) Testicular germ cell tumors: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* **7**: 43-53

7. Erklärung

„Ich, Werner Struss, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:
„Untersuchungen zur akuten vaskulären Toxizität der Chemotherapie bei Hodentumor-
Patienten“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt,
ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer
Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

8. Curriculum vitae

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

9. Danksagung

Hiermit möchte ich meiner Familie, insbesondere meinem Vater ganz herzlich für das ständige Interesse, sowie für ermunternde Zusprachen und Unterstützung danken. Ich danke auch meinem Onkel, Herrn Dr. phil. Lothar Struss, für seinen langjährigen Beistand.

Meine Arbeit möchte ich meinen Großeltern widmen.

Außerdem danke ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Klaus-Peter Dieckmann, meinem wissenschaftlichen Betreuer, nicht nur für die Überlassung des Themas, sondern vor allem für seine Anregungen und tatkräftigen Ratschläge.

Weiterhin danke ich verbindlichst Herrn PD Dr. Uwe Pichlmeier für seine Unterstützung bei der statistischen Auswertung sowie Herrn Prof. Dr. U. Budde und seinen Mitarbeitern für labortechnische Hilfeleistungen.