

Anatomisches Institut der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Gratzl)

Wechselwirkung zwischen Blutplättchen, Zellen eines kleinzelligen  
Lungenkarzinoms und Endothel unter kontrollierten  
Strömungsbedingungen

Patrick Arnold Bode

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. L. Wurzinger (LMU)  
2. Univ.-Prof. Dr. P. C. Maurer

Die Dissertation wurde am 09.10.2001 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin  
am 13.02.2002 angenommen.

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Systemische Abnormalitäten der Hämostase bei malignen Erkrankungen .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Thrombozyten und hämatogene Metastasierung .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Tumorzelladhäsion und deren Blockade .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Fragestellung.....</b>	<b>9</b>
<b>2. Material und Methode.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Staupunkt-Adhäsio-Aggregometer als experimentelles Strömungsmodell .....</b>	<b>10</b>
2.1.1 Aufbau des Staupunkt-Adhäsio-Aggregometers (SPAA) .....	10
2.1.2 Strömungsexperimente mit dem SPAA und ihre Dokumentation.....	13
<b>2.2 Präparation der im SPAA verwendeten Zellen .....</b>	<b>15</b>
2.2.1 Präparation und Kultivierung von Endothelzellen.....	15
2.2.2 Präparation und Kultivierung von SCLC-Zellen.....	17
<b>2.3 Präparation von Plasmaproben .....</b>	<b>18</b>
2.3.1 Herstellung von plättchenreichem Plasma (PRP) .....	18
2.3.2 Herstellung von plättchenarmen Plasma (PPP) .....	18
<b>2.4 Aggregometer (APACT) als experimentelles Aggregationsmodell.....</b>	<b>18</b>
2.4.1 Aufbau des APACT (Automated Platelet Aggregation and Coagulation Tracer) .....	18
2.4.2 Versuche im Aggregometer .....	19
<b>2.5 Versuche in Stase.....</b>	<b>20</b>
2.5.1 Versuchsanordnung.....	20
2.5.2 Versuchsauswertung.....	21
<b>2.6 Einsatz von ADP-Scavenger und Entzündungsmediatoren .....</b>	<b>21</b>
2.6.1 Zugabe von ADP-Scavenger zum PRP.....	21
2.6.2 Inkubation von Endothelzellen mit Entzündungsmediatoren.....	21
<b>2.7 Blockade von Membranrezeptoren an Endothel- und SCLC-Zellen .....</b>	<b>22</b>
2.7.1 Inkubation des Plasmas mit RGDS.....	22
2.7.2 Inkubation der Endothel-Zellen mit Antikörpern .....	22
<b>2.8 Immunoblot/-zytochemie von Membranrezeptoren.....</b>	<b>22</b>
2.8.1 Immunzytochemie der SCLC-Zellen auf Integrin $\alpha_{IIb},\beta_3$ .....	22
2.8.2 Immunoblot der SCLC-Zellen auf Integrin $\alpha_{IIb},\beta_3$ .....	23
2.8.3 Immunzytochemie der Endothelzellen auf P-Selektin.....	23
<b>2.9 Bildgebende Dokumentation .....</b>	<b>23</b>
2.9.1 Dunkelfeldmikroskopie/Videoprint .....	23
2.9.2 Phasenkontrastmikroskopie (Phako) .....	24
2.9.3 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) .....	24
2.9.4 Rasterelektronenmikroskopie .....	25
<b>2.10 Statistik.....</b>	<b>25</b>

### **3. Ergebnisse..... 26**

<b>3.1 Einfluß von SCLC-Zellen auf die Aggregation von Blutplättchen im Aggregometer (APACT) .....</b>	<b>26</b>
3.1.1 Tumorzell-induzierte Plättchen-Aggregation (TCIP-Aggregation) im APACT ..	26
3.1.2 ADP-induzierte Plättchen-Aggregation im APACT .....	27
3.1.3 Einfluß von ADP-Scavenger auf die TCIP-Aggregation.....	29
3.1.4 Einfluß von SCLC-Zell-Überstand auf die Plättchenaggregation .....	32
<b>3.2 Einfluß von SCLC-Zellen auf die Adhäsion von Blutplättchen im Staupunkt-Adhäsio-Aggregometer (SPAA) .....</b>	<b>33</b>
3.2.1 Tumorzell-induzierte Plättchen-Adhäsion (TCIP-Adhäsion) an immobilisiertem Fibrinogen .....	33
3.2.2 Blockade der TCIP-Adhäsion an immobilisiertem Fibrinogen .....	35
3.2.3 TCIP-Adhäsion an humanen Endothelzellen (HUVEC) .....	36
3.2.4 Blockade der TCIP-Adhäsion an HUVEC .....	38
<b>3.3 Einfluß von SCLC-Zellen auf die Adhäsion von Blutplättchen unter statischen Bedingungen (Stase).....</b>	<b>38</b>
3.3.1 SCLC-Zell-induzierte Plättchen-Adhäsion an immobilisiertem Fibrinogen .....	38
3.3.2 SCLC-Zell-induzierte Plättchen-Adhäsion an HUVEC .....	38
<b>3.4 „Rollen“ und Adhäsion von SCLC-Zellen an HUVEC im SPAA .....</b>	<b>39</b>
3.4.1 „Rollen“ und Adhäsion an unstimulierten HUVEC .....	39
3.4.2 „Rollen“ von SCLC-Zellen an IL-1 $\beta$ -stimulierten HUVEC .....	40
3.4.3 Adhäsion von SCLC-Zellen an IL-1 $\beta$ -stimulierten HUVEC .....	42
<b>3.5 Adhäsion von SCLC-Zellen an verschiedenen Oberflächen in Stase.....</b>	<b>45</b>
3.5.1 Adhäsion von SCLC-Zellen an immobilisiertem Fibrinogen .....	45
3.5.2 Adhäsion von SCLC-Zellen an unstimulierten HUVEC .....	46
3.5.3 Adhäsion von SCLC-Zellen an stimulierten HUVEC .....	46
<b>3.6 Oberflächen-Rezeptoren und die Adhäsion von SCLC-Zellen an HUVEC .....</b>	<b>47</b>
3.6.1 Immunzytochemie/Immunoblot zur Darstellung des Integrin $\alpha_{IIB},\beta_3$ .....	47
3.6.2 Blockade des Membranrezeptors Integrin $\alpha_{IIB},\beta_3$ mit RGDS im SPAA.....	48
3.6.3 Immunzytochemie zur Darstellung von P-Selektin auf HUVEC .....	49
3.6.4 Spezifische Blockade von P-Selektin an HUVEC im SPAA .....	49
3.6.5 Spezifische Blockade von P-Selektin an HUVEC in Stase .....	50
3.6.6 Unspezifische Blockade der Selektine an HUVEC im SPAA.....	51
3.6.7 Unspezifische Blockade der Selektine an HUVEC in Stase .....	52
3.6.8 Blockade von ICAM-1 an HUVEC im SPAA .....	52

<b>4. Diskussion.....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 Tumorzell-induzierte Plättchen-Aggregation (TCIP-Aggregation) .....</b>	<b>54</b>
<b>4.2 Tumorzell-induzierte Plättchen-Adhäsion (TCIP-Adhäsion) und Tumorzell-     Plättchen-Interaktion unter Stase und Flow .....</b>	<b>60</b>
4.2.1 TCIP-Adhäsion und Tumorzell-Plättchen-Interaktion unter Stase .....	61
4.2.2 TCIP-Adhäsion und Tumorzell-Plättchen-Interaktion unter flow im SPAA.....	62
<b>4.3 Adhäsion von SCLC-Zellen in Abwesenheit von Plättchen an Endothel unter Stase     und Flow .....</b>	<b>65</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>74</b>
<b>6. Bibliographie.....</b>	<b>76</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1 Systemische Abnormalitäten der Hämostase bei malignen Erkrankungen**

Bereits vor über hundert Jahren wurde von Armand Trousseau zum ersten Mal ein Zusammenhang zwischen malignen Erkrankungen und einer Aktivierung des Gerinnungssystems erkannt. Er schrieb 1856, daß bei Krebspatienten ein „besonderer Zustand des Blutes zu spontaner Koagulation prädisponiert“ (18). Ein Jahrzehnt später berichtete Billroth, daß er bei Autopsien Tumorzellen in Thrombemboli gefunden hatte (11).

Trousseau beobachtete 1865, daß unerklärliche Episoden von migratorischer Thrombophlebitis bei Patienten mit Symptomen im Bereich des Gastrointestinal-Traktes auf eine neoplastische Erkrankung hinwiesen (18). So können venöse Thrombosen bei sonst völlig asymptomatischen Patienten das erste Anzeichen einer Neoplasie sein. Die zeitgenössische Literatur berichtet über klinisch manifeste hämostatische Abnormalitäten bei bis zu fünfzehn Prozent und eine subklinische Gerinnungsaktivierung bei fast allen Krebspatienten (40) (43) (44). Pathologische Veränderungen der Hämostase sind heute die zweithäufigste Todesursache bei Krebspatienten. Obwohl Thrombosen meist eine systemische Hyperkoagulabilität zugrunde liegt, könnten sie auch durch direkte Tumorzell-Invasion in das Gefäß-System entstehen (18). Thrombembolische Erkrankungen treten nicht bei allen Neoplasien gleich häufig auf. Die höchste Inzidenz besteht bei promyeloischer Leukämie, Primär-Tumoren des zentralen Nervensystems, muzinsezernierenden Tumoren des Pankreas und v.a. bei Lungenkarzinomen (18). Lungenkarzinome sind die Neoplasien, die am häufigsten mit klinisch evidenten thrombembolischen Krankheiten assoziiert sind. Die Gerinnungsaktivierung und die Thrombenbildung werden daher mit der Pathogenese des Tumorwachstums und der Metastasierung in Verbindung gebracht (7). Dennoch sind viele funktionelle Zusammenhänge bisher unklar.

Oleksowicz und Mitarbeiter beschrieben bei der Inkubation von Plättchenreichem Plasma (PRP) mit Tumorzellen (MCF-7 Zellen) eine massive Aggregation der Thrombozyten im Aggregometer - eine sogenannte Tumorzell-induzierte Plättchenaggregation (TCIPA) (51). Heinmöller und Mitarbeiter beschrieben ebenfalls bei Inkubation von PRP mit Zellen eines Lungenkarzinoms im Aggregometer eine starke Aggregation der Thrombozyten (27). Auch Chiang und Mitarbeiter berichteten über Tumorzell-induzierte Plättchenaktivierung (TCIPA) bei Colon- und Mammakarzinomen. Ein direkter Zellkontakt zwischen Tumorzellen und

Thrombozyten konnte jedoch nicht beobachtet werden (11;12). Die Stimulierung der Thrombozyten durch Tumorzellen, klinisch bei Krebspatienten als systemische Thrombozyten-Aktivierung bekannt, scheint vielmehr durch Sekretion von potenten Stimulantien durch Tumorzellen stattzufinden.

Alle drei Forschungsgruppen blockierten die TCIPA durch Zusatz von verschiedenen Enzymen. So blockten Oleksowicz und Mitarbeiter mit Apyrase, zum Abbau von ADP, Heinmöller und Mitarbeiter mit Hirudin als Thrombinantagonisten und Chiang und Mitarbeiter mit Schlangenvenom-Peptiden wie Trigramin und Rhodostomin, RGD enthaltende Antiplättchen-Peptide, die Tumorzell-induzierte Plättchenaktivierung im Aggregometer.

Die systemische Thrombozytenaktivierung durch im Gefäßsystem zirkulierende Tumorzellen mit der Entstehung thrombembolischer Erkrankungen konnte experimentell abhängig von der Tumorzellart auf unterschiedliche molekulare Stimuli zurückgeführt werden. Diese systemisch, wie lokal stattfindende Aktivierung von Thrombozyten zur Adhäsion und Aggregation scheint neben der Verursachung thrombembolischer Komplikationen eine Rolle bei der Metastasierung von Tumorzellen zu spielen.

## **1.2 Thrombozyten und hämatogene Metastasierung**

Die Rolle von Thrombozyten bei der hämatogenen Tumormetastasierung konnte noch nicht vollständig geklärt werden. In Tiermodellen wird eine spontane Metastasenbildung von einer Thrombozytopenie begleitet. Wird eine Thrombozytopenie experimentell induziert, so sinkt die Metastasierungsrate von Tumorzellen in vivo (18) und in vitro (48). Auch die Anzahl der Metastasen ist proportional zur Eigenschaft der Tumorzellen, Thrombozytenaggregation hervorzurufen. Diese Tumorzell-induzierte Plättchen-Aggregation findet sich sowohl in vivo als auch in vitro (18;27;50) und wird der Sekretion von potenten Stimulantien wie ADP aus Tumorzellen (18) (71) (52) oder der Initiierung der Thrombinbildung (48) zugeschrieben. Diese durch Tumorzellen bedingte Aktivierung des Gerinnungssystems hat neben dem Entstehen thrombembolischer Erkrankungen vor allem auch einen Einfluß auf die Metastasierung von Tumorzellen. Unter verschiedenen Tumorzell-Linien wurde geschätzt, daß von den - in das Blutgefäßsystem gelangenden - Tumorzellen 0,0001% bis 1,28% Metastasen induzieren (18). Um hämatogen zu metastasieren, müssen zirkulierende Tumorzellen zunächst am Endothel der Gefäßwand haften und dann die Gefäßwand

penetrieren bzw. permeieren. Die z.T. entstehenden Plättchen-Thromben könnten einerseits die in sie eingebetteten Tumorzellen vor der Immunabwehr schützen und andererseits ihre Anhaftung an der Gefäßwand unterstützen. So beschreiben einige Autoren eine Adhäsion von Tumorzellen an Endothel über bereits adhärierende Thrombozyten (1) (31). Viele Tumorzellen fördern die Bildung von Thrombin, das erstens Adhäsionsrezeptoren wie z.B. das Integrin  $\alpha_{IIb},\beta_3$  auf den Thrombozyten aktiviert und zweitens zur thrombozytären Degranulation führt. Dadurch werden u.a. Fibrinogen, Fibronectin und von Willebrand Faktor freigesetzt, die wiederum die Zelladhäsion an der Gefäßwand medieren können. In der Tat erhöhte in Versuchen die Zugabe von Thrombin die Metastasenrate bis zu 400-fach (37).

Neueste Untersuchungen der Interaktion von Blutzellen wie z.B. Leukozyten mit dem Endothel beziehen Strömungsmodelle ein, die die Scherabhängigkeit dieser Wechselwirkung aufzeigen (3;8) und damit die Nähe zu physiologischen Verhältnissen im Gefäßbett gewährleisten. Im Gegensatz dazu gibt es wenige vergleichende Arbeiten zur Tumorzellmetastasierung, die den Strömungsaspekt berücksichtigen. Eine Ausnahme stellen die Arbeiten von Felding-Habermann, Ruggeri und Koautoren (19) dar, die zeigen konnten, daß Melanomzellen an Kollagen I zwar unter Stase hafteten, bei wandparalleler Blutströmung jedoch nicht. Erst wenn Thrombozytenthromben bereits an Kollagen I adhären waren, konnten Melanomzellen mit einer intakten  $\beta_3$ -Integrin-Untereinheit (entweder des Integrin  $\alpha_{IIb},\beta_3$  oder des Integrin  $\alpha_V,\beta_3$ ) an den Thrombozytenthromben haften. Ganz ähnliche Befunde beschrieben Dardik und Mitarbeiter für vier verschiedene Tumorzelllinien (16). Nierodzik und Koautoren zeigten, daß Tumorzelladhäsion und Metastasierung *in vitro* und *in vivo* unter wandparallelen Strömungsbedingungen über das thrombozytäre Integrin  $\alpha_{IIb},\beta_3$  und Fibronectin, und von Willebrand Faktor als Liganden vermittelt wurde (48). Smith und Mitarbeiter wiesen für laminare wandparallele Strömung ebenfalls eine Abhängigkeit der Adhäsion von Lymphomzellen an Fibronectin, Vitronectin und RGD-Peptiden von einer  $\beta_3$ -Integrin-Untereinheit an den Tumorzellen nach, während die Adhäsion an unstimuliertem Endothel einem anderen noch ungeklärten Mechanismus folgte (59).

Grundsätzlich kann nicht davon ausgegangen werden, daß eine Metastasierung nur bei Verletzungen der Gefäßwand mit freiliegendem Kollagen, Fibronectin oder Vitronectin auftritt. Eine Metastasierung findet wahrscheinlich auch bei intaktem Endothel statt. Für diese Situation könnte ein möglicher Mechanismus die Stimulation des Endothels mit Interleukinen oder TNF (Tumor Nekrose Faktor) sein, welche einen dramatischen Anstieg der

Tumorzelladhäsion am Endothel hervorruft. So beschrieben Giavazzi und Mitarbeiter und Yoshida und Mitarbeiter, daß mit einer Stimulierung des Endothels (HUVEC) durch IL-1 $\beta$  ein „Rollen“ und ein Haften von Tumorzellen an Endothel unter wandparallelen Strömungsbedingungen induziert werden konnte, wohingegen auf unstimuliertem Endothel keine der Tumorzellen rollten oder adhärten (21) (70). Ein Rollen von Zellen an Endothel, wie es zuerst für Leukozyten beschrieben wurde, bezeichnet ein intermittierend verlangsamtes Entlangrollen von Zellen an Endothelzellen. Das Rollen mündet z.T. in eine feste Adhäsion am Endothel und läuft rezeptor-vermittelt ab.

### **1.3 Tumorzelladhäsion und deren Blockade**

Tozeren und Mitarbeiter zeigten ein „Rollen“ und eine Adhäsion von Tumorzellen unterschiedlicher Mammakarzinome bei der laminaren Bestromung von, mit Tumor-Nekrose-Faktor stimuliertem, Endothel. Zu einer Tumorzelladhäsion kam es lediglich bei stimuliertem Endothel, zusätzlich konnte durch Inkubation des Endothels mit einem Antikörper gegen E-Selektin die Tumorzelladhäsion am Endothel wieder geblockt werden (66). Pottratz und Mitarbeiter untersuchten, in vitro unter statischen Bedingungen, die Adhäsion von Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC) an bovinen Endothelzellen, die mit Tissue Plasminogen Aktivator (TPA) stimuliert wurden (55). Durch die Stimulation des Endothels, kam es zu einer gesteigerten P-Selektin-Expression auf dem Endothel wodurch die Tumorzelladhäsion verstärkt werden konnte. Die Inkubation des stimulierten Endothels mit einem Antikörper gegen P-Selektin konnte die Tumorzelladhäsion inhibieren. Tang und Mitarbeiter wiederum beschrieben PECAM-1 als Adhäsions-Rezeptor auf Tumorzellen und blockierten die Tumorzelladhäsion am Endothel unter statischen Bedingungen durch Inkubation der Tumorzellen mit einem Antikörper gegen PECAM-1 (63).

Neben diesen Studien untersuchten nur wenige Forschungsgruppen die Adhäsion unterschiedlicher Tumorzellen in Experimenten unter statischen und fluiddynamischen Strömungsbedingungen. Dabei wurden verschiedene Rezeptoren auf Seiten des Endothels als auch der Tumorzellen für die Adhäsion verantwortlich gemacht – u.a. P- und E-Selektin (9;21;38), VCAM-1 (32;42), PECAM-1 (63) oder ICAM-1 (4;35;39).

Der Mechanismus der Adhäsion von Tumorzellen an Endothel scheint je nach Tumorzelllinie stark zu differieren. Zusätzlich bestehen Unterschiede zwischen statischen und Strömungsbedingungen, Thrombozyten spielen dabei eine noch nicht vollständig geklärte Rolle.

#### **1.4 Fragestellung**

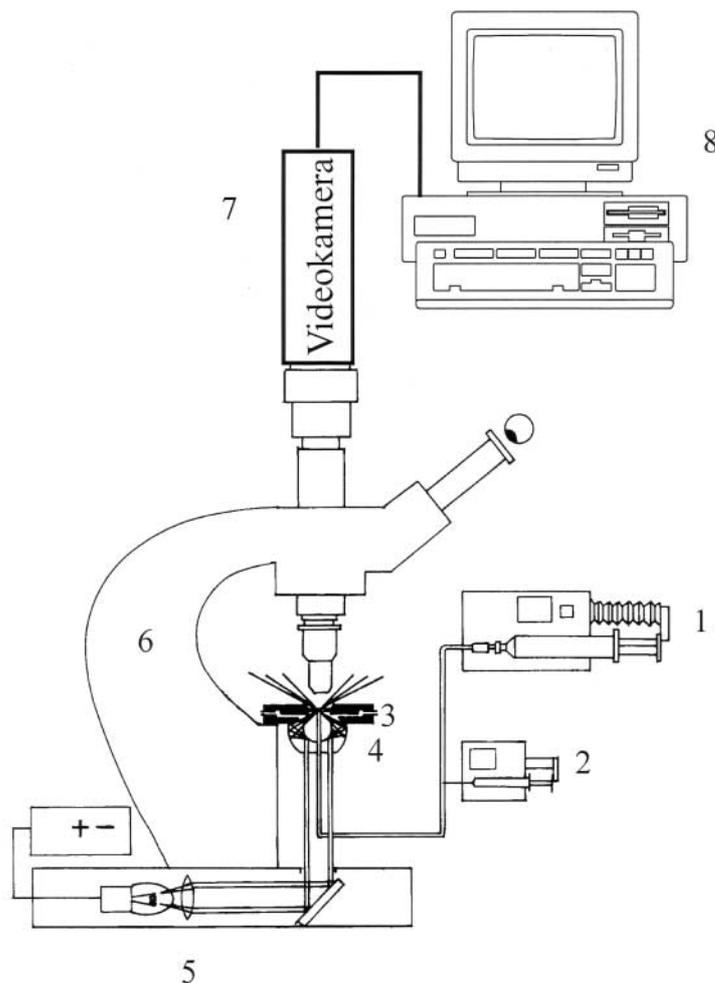
1. Im ersten Teil der vorliegenden Studie sollte die Aktivierung von Thrombozyten durch Zellen eines humanen kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC) untersucht werden. Zentrale Frage war dabei welcher Mechanismus der Tumorzell-induzierten Plättchenaggregation (TCIP-Aggregation) zugrundeliegt.
2. Der zweite Teil konzentrierte sich auf die durch SCLC-Zellen induzierte Adhäsion (TCIP-Adhäsion) von Blutplättchen an Endothel-Monolayer (HUVEC) und immobilisiertem Fibrinogen. Dabei sollte insbesondere der Effekt von Stase und physiologischen Strömungsbedingungen verglichen und der Aktivierungsmechanismus geklärt werden.
3. Im dritten Abschnitt wurde die Interaktion von Tumorzellen und Endothel bearbeitet. Im Vergleich zu Stasebedingungen wurde die Adhäsion unter Strömung und das Rollverhalten der SCLC-Zellen analysiert um die verantwortlichen Rezeptoren für die Tumorzelladhäsion an Endothel zu identifizieren.

## 2. Material und Methode

### 2.1 Staupunkt-Adhäsio-Aggregometer als experimentelles Strömungsmodell

#### 2.1.1 Aufbau des Staupunkt-Adhäsio-Aggregometers (SPAA)

Bei dem verwendeten Staupunkt-Adhäsio-Aggregometer handelt es sich um eine in vitro Meßvorrichtung zur Quantifizierung der Adhäsion und Aggregation verschiedener Zellen an unterschiedlichen Oberflächen unter definierten Strömungsbedingungen. Das SPAA besteht aus Dunkelfeldmikroskop und Strömungskammer (*Abb. 2.1*).



**Abb. 2.1: Schematische Zeichnung des Staupunkt-Adhäsio-Aggregometers (SPAA)**

Dargestellt ist der technische Versuchsaufbau bei Versuchen mit dem Staupunktadhäsioaggregometer. Über den schematisch dargestellten Perfusor fließt Plasma in die im Mikroskop befindliche Strömungskammer. Über die am Mikroskop angebrachte Video-Kamera können die dunkelfeldmikroskopischen Bilder online auf Video aufgezeichnet und über einen Monitor visualisiert werden.

Die Strömungskammer des SPAA besteht aus einem Ring und einer Deckplatte aus Edelstahl. An der Oberseite des Rings passen in eine Nut Glasplättchen (Kindler, Deutschland) mit einem Durchmesser von 22 mm, die mit der Stahldeckplatte mit Gummiring, dicht abschließend an die Kammer angepresst werden. Die Deckplatte hat eine zentrale Aussparung für das Objektiv des Mikroskops. An der Unterseite des Edelstahlrings ist eine runde Plexiglasplatte mit einem zentralen Stutzen eingefasst. In der Mitte des Stutzens befindet sich eine zylindrische Bohrung mit einem Durchmesser  $D = 0.6$  mm und der Länge  $L = 10$  mm.

Durch diese Bohrung fließt die Flüssigkeit (Plasma, Zellsuspension) in die Kammer und senkrecht gegen die Glasdeckplatte. Die Zellsuspension wird von einem Perfusor (Braun, Deutschland) in den Zulaufschlauch gepumpt, der durch eine Bohrung im Zentrum eines Dunkelfeldkondensors geführt wird. Das Schlauchende ist am Plexiglasstutzen befestigt. Die Zellsuspension fließt aus der Strömungskammer über zwei gegenüberliegende Bohrungen seitlich im Edelstahling, die nach außen in zwei ausgeschweiften Auslaufstutzen enden. Deren Enden sind wiederum mit Silikonschläuchen verbunden, die in ein Plastikgefäß drainieren.

Die im Strömungsmodell durch konvektiven Transport beförderte Suspension trifft je nach beströmten Bereich unterschiedlich auf die Oberfläche auf. Im Zentrum der Staupunktströmung existieren ausschließlich senkrecht zu beströmten Oberfläche stehende Geschwindigkeitskomponenten, die hier ihr Maximum erreichen. Die wandparallele Strömung hingegen ist in diesem Bereich gleich null. Das Gegenteil tritt in der Peripherie der beströmten Oberfläche auf. Hier geht die Geschwindigkeitskomponente senkrecht zur Oberfläche gegen null, hingegen werden die zur Oberfläche parallelen Geschwindigkeitskomponenten groß. Das bedeutete, daß mit zunehmenden Abstand vom Staupunktzentrum die senkrechten Geschwindigkeitskomponenten abnehmen während die wandparallelen bis zu einer Wandscherrate von  $170\text{s}^{-1}$  zunehmen (**Abb. 2.2**).



Durch diesen sogenannten „Vroman effect“ (68) wird Fibrinogen an der Glas-Oberfläche adsorbiert. So daß, wie Reinger et al. zeigten eine homogene von immobilisiertem Fibrinogen bedeckte Glas-Oberfläche entsteht. Als endotheliale Oberfläche dienten Glasplättchen deren Oberfläche homogen mit einem dichten Rasen humaner Endothelzellen bewachsen war (siehe Kapitel 2.2.1).

### **2.1.2 Strömungsexperimente mit dem SPAA und ihre Dokumentation**

Die Strömungsexperimente mit lebenden Zellen erforderten physiologische Temperaturen. Durch die Zirkulation von +37°C warmen Wasser im Objektisch wurde eine Temperatur von +37°C +/-1°C in der Strömungskammer erreicht. Zusätzlich wärmten, in den gleichen Warmwasserkreislauf eingebaute, Wärmekissen die zwei Zulauf-Reservoirs.

Die in den Experimenten gegen immobilisiertes Fibrinogen und Endothel strömenden Flüssigkeiten befanden sich in Polyethylen-Spritzen (Braun, Deutschland, 25ml). Über einen Perfusor (Braun, Secura FT) strömte dann die temperierte Flüssigkeit mit einem Volumenstrom von 19ml/h in einem Polyethylenschlauch in die Strömungskammer. In den Schlauch war ein Y-Stück aus Plastik eingesetzt, über das mit einem anderen Perfusor (Braun-Melsungen, Typ 871012) weitere Flüssigkeiten - z.B. Medien wie Adenosindiphosphat-Lösung (ADP) oder Suspensionen kleinzelliger Lungen-Karzinomzellen (SCLC) - dazuströmen konnten. Die zulaufende Zell-Suspension befand sich in einer 1ml-Spritze (Braun), in der ein kleiner, mit Plastik überzogener, durch einen Elektromagneten angetriebener Magnet („Rührfischchen“), die Suspension in der Spritze mischte und so der Sedimentation und Aggregation der Tumorzellen entgegenwirkte. Da sich das Y-Stück 9 +/-1 cm von der Kammer entfernt im Polyethylenschlauch befand, kamen Plasma und zulaufende Suspension schon vor Auftreffen auf die zu beströmende Oberfläche in Kontakt. Die Zell-Suspension strömte mit 4ml/h und 8ml/h zu, was zu einer Kontaktzeit von 45s bzw. 25s von SCLC-Zellen und Plasma vor Kontakt mit der Stauplatte führte.

Bei Strömungs-Experimenten zur Betrachtung der Tumorzell-Adhäsion an humanen Endothelzellen wurden die Endotheloberflächen mit einer Suspension aus plättchenarmen Plasma (PPP) und SCLC-Zell-Suspension beströmt. Dazu wurde in eine 25ml Silikonspritze (Braun, Deutschland) PPP und SCLC-Zell-Suspension im Verhältnis 9:1 aufgezogen.

Die über den Perfusor mit der Geschwindigkeit von 20ml/h an die Endotheloberfläche strömende Plasma-Tumorzellsuspension wurde ebenfalls durch ein in der Spritze befindlichen „Rührfisch“ stetig gemischt. Die Kontaktzeiten zwischen Tumorzellen und Plasma betrug 5-15 Minuten vor Auftreffen auf die Endotheloberfläche in der Staupunktammer.

Die erläuterte Staupunktammer selber befand sich in der Objektebene eines Dunkelfeldmikroskops (Zeiss, Deutschland) an das eine S/W-Videokamera (Sony, Japan, EVI - 1011P CCD) angeschlossen war. Über diese Videokamera wurde während des gesamten Versuchsablaufs die dunkelfeldmikroskopischen Bilder online gefilmt und über einen Videorekorder (Panasonic, Japan, A6 - 6200 VHS) auf VHS-Videokassetten (Fuji, Japan) aufgezeichnet um sie dann zu einem späteren Zeitpunkt auszuwerten.

Bildinformationen entstanden dadurch, daß die korpuskulären Elemente (Thrombozyten oder SCLC-Zellen) der auf die Oberfläche strömenden Suspension Licht streuten. Die auf die Oberfläche zuströmenden bzw. an ihr adhätierenden Zellen erschienen so als helle Punkte vor dunklem Hintergrund. Auf den an der Oberfläche primär adhätierenden Thrombozyten bauten sich dann nachfolgend Thrombozytenaggregate auf. Aggregate können unter Strömung nur an bereits adhätierenden und hierdurch immobilisierten Thrombozyten entstehen. Folglich entsprach die mit Thrombozytenaggregaten bedeckte Oberfläche der mit adhätenten Thrombozyten bedeckten Oberfläche.

Die auf VHS-Videokassetten aufgezeichneten Farbbilder wurden über eine Video-Karte in einen Personal Computer (Gateway, Irland) eingelesen und als Graustufen-Bilder abgespeichert. Die gespeicherten Bilder wurden wiederum in einem dafür eigens entwickelten Programm (TUM-Show®, Matthias Rumitz, Deutschland) in Schwarzweiß-Bilder konvertiert, so stellten sich nun die adhätenten Zellen als weiße Flächen vor schwarzem Hintergrund dar. Dann wurde die Anzahl an weißen Pixeln bezogen auf die gesamte Bild-Fläche berechnet, so daß sich am Ende Prozentwerte der von adhätierenden Zellen belegten Oberfläche errechnen ließen. Bei der quantitativen Auswertung des Tumorzell-Rollens und der –Adhäsion an Endotheloberflächen wurde nicht die relative Flächenbelegung, sondern die absolute Zahl der am Endothel rollenden und adhätierenden Tumorzellen berechnet. Der bei den Versuchen zur Auswertung herangezogene Bereich der beströmten Oberfläche hatte die Form eines Quadrats mit einer Fläche von 0,4mm<sup>2</sup>.

## **2.2 Präparation der im SPAA verwendeten Zellen**

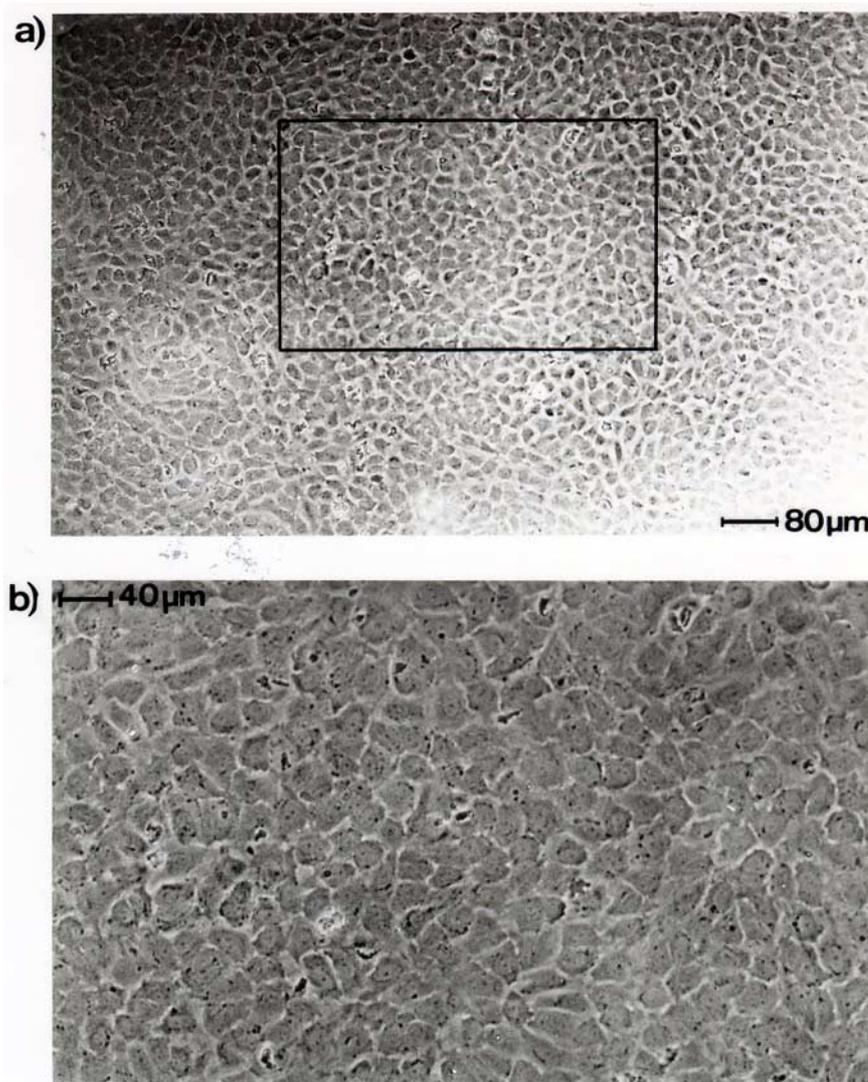
### **2.2.1 Präparation und Kultivierung von Endothelzellen**

Die humanen Endothelzellen (**Human Umbilical Vein Endothelial Cells/ HUVEC**) wurden aus humanen Nabelschnurvenen mit einer veränderten Methode, wie sie zuerst von Jaffe (33) beschrieben wurde, gewonnen. Die Nabelschnüre befanden sich bis zu 36 Stunden postpartal in steriler PBS-Pufferlösung (phosphate buffered saline ohne  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mg}^{2+}$ ; Biochrom, Deutschland) bei  $+4^{\circ}\text{C}$ . Unter sterilen Bedingungen mit Laminar-Airflow wurden die Nabelschnüre äußerlich mit Isopropanol und sterilen Tupfern gesäubert und dann beide Enden 1cm breit mit einem sterilen Skalpell reseziert. Dann wurde die Nabelschnurvene mit ca. 60ml PBS (steril) durchspült bis keine Blutreste mehr vorhanden waren. Anschließend wurde die Vene mit  $+37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  warmer Kollagenase (Sigma, Deutschland; gelöst in PBS mit einer Endkonzentration von 180U/ml; 20-30ml) im Wasserbad bei  $+37^{\circ}\text{C}$  für 12 Minuten inkubiert.

Der Inhalt der Nabelschnur (Kollagenase und gelöste Endothelzellen) wurde in ein, mit 10ml Kulturmedium (Biochrom, Deutschland; 199 Earle + 5% Fetales Kälberserum (FKS)) gefülltes, Zentrifugenröhrchen (Becton/Dickinson, Deutschland; 50ml Volumen) gegeben und 10 Minuten bei 180g (Zentrifuge, Hettich, Deutschland) zentrifugiert. Der abgesaugte Überstand wurde verworfen, das Pellet in 20ml Kulturmedium suspendiert und auf eine Petrischale (Schott, Deutschland; Glas; Durchmesser 9 cm) mit den darin befindlichen 6-7 Glasplättchen verteilt. Die Petrischale wurde dann in einem Brutschrank ( $+37^{\circ}\text{C}$  und  $5\%\text{CO}_2$ ) aufbewahrt.

Nach ca. 1 Stunde wurden die Glasplättchen dreimal in sterilem PBS gewaschen und danach erneut mit Kulturmedium - ca. 20ml - bedeckt und wieder bei  $+37^{\circ}\text{C}$  und in einer mit  $5\%\text{CO}_2$  angereicherten Atmosphäre kultiviert. Im Abstand von 48-72 Stunden wurden die Zellen erneut gewaschen und das Medium erneuert. Die Endothelzellen erreichten nach vier bis sechs Tagen Konfluenz und wurden innerhalb der nächsten drei Tage für Experimente verwendet. Für unsere Versuche wurden ausschließlich Endothelmonolayer die lückenlos und ohne überschießendes Zellwachstum die Oberfläche des Glasplättchens bedeckten verwendet.

Diese konfluenten Endothelzellrasen wiesen das typische „kopfsteinpflasterartige“ Aussehen auf und selbst bei fortdauernder Kultivierung erfolgten keine weiteren Zellteilungen mehr (Kontaktinhibition) (*Abb. 2.3*). Bei Versuchsbeginn wurden die mit Endothelzellen beschichteten Glasplättchen jeweils aus der Petrischale genommen zweimal in 37°C warmes PBS-Bad getaucht und danach mit der endothelbeschichteten Seite nach unten auf einen Plasmotropfen in die Staupunktkammer gelegt und befestigt.



**Abb. 2.3: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen eines EC-Monolayers**

Bei 20- (a) und 40-facher Vergrößerung (b) im Phasenkontrastmikroskop dargestellte Endothel-Monolayer. Deutlich zu erkennen die Homogenität des Monolayers mit kopfsteinpflasterartigem Aussehen.

### **2.2.2 Präparation und Kultivierung von SCLC-Zellen**

Bei den verwendeten Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms handelte es sich um humane SCLC-Zellen des Typs H69+ und H24+. Diese von menschlichen Lungenkarzinomen gewonnenen Zellen wurden in speziellem Kulturmedium (RPMI, Biochrom, Deutschland, mit 5ml Penicillin/Streptomycin auf 1Liter, pH 7,0 + 5% FKS) bei +37°C und 5%CO<sup>2</sup> im Brutschrank (Heraeus, Deutschland) kultiviert.

Die unter diesen Kulturbedingungen nach 6-8 Tagen dichten Zellkulturen, wurden entweder für die Versuche geerntet oder auf neue Kulturflaschen ausgesät. Zur Aussaat wurden die SCLC-Zellkulturen - unter sterilen Bedingungen und Laminar-Airflow - in Zentrifugenröhrchen (Becton/Dickinson, Deutschland; 15ml) gegeben und dann bei 180g für 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und verworfen und das Pellet in 5ml NPE (NaCl 150mM, Pipes 10mM, EDTA 1mM; pH 7,2; +37°C+/-1°C; Biochrom) suspendiert. NPE löste die Aggregation der SCLC-Zellen untereinander und ermöglichte so ein besseres Waschen der Tumorzellen. Darauf wurde die Zellsuspension erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und verworfen, und das Pellet in Kulturmedium suspendiert und auf neue Kulturflaschen verteilt.

Um die Zahl der durch diese Waschschrte lysierten SCLC-Zellen zu quantifizieren wurde die SCLC-Zellsuspension nach diesem Vorgang mit Toluidinblau gefärbt. Nur lysierte Zellen mit defekter Plasmamembran nehmen den Farbstoff auf. Es ergab sich eine Lyserate von maximal 1,2+/-0,7%.

Zur Ernte der SCLC-Zellen für einen Versuchstag wurden die Zellen ebenfalls in zwei Schritten gewaschen, jedoch zuletzt nicht in Kulturmedium suspendiert sondern in PBS - pro Pellet in ca. 4-6 ml. Darauf wurden die SCLC-Zellsuspensionen bis zum Versuchsbeginn im Brutschrank aufbewahrt und vor Aspiration in eine 1ml-Spritze mit einer Eppendorf-Pipette noch einmal gemischt. Um die Konzentration der SCLC-Zellen in der Suspension zu bestimmen, wurden die SCLC-Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die durchschnittliche Konzentration der SCLC-Zellen betrug 3.256 +/- 282 Zellen/ml.

## **2.3 Präparation von Plasmaproben**

### **2.3.1 Herstellung von plättchenreichem Plasma (PRP)**

Gesunden Probanden (n = 7, Alter 23-45 Jahre), wurde nach mindestens zehntägiger Medikamentenkarenz und sechsständiger Nahrungskarenz, mit einer Stahlkanüle (Butterfly, Braun, Venofix®, Durchmesser 1,1mm) eine Kubitalvene punktiert und in eine 2ml-Spritze (Braun) Blut aspiriert, das sogleich verworfen wurde. Darauf wurden weitere 30ml Vollblut über die gleiche Kanüle entnommen. Das Blut wurde durch langsames Ziehen am Spritzenstempel in eine Silikonspritze (Becton/Dickinson) aufgenommen, in die zuvor 3ml Heparin, mit PBS verdünnt, aufgezogen worden waren (Konzentration 20U/ml). Die Spritze wurde nun vorsichtig dreimal geschwenkt um Heparin und Vollblut zu vermischen. Das heparinisierte Vollblut (Endkonzentration 2U unfraktioniertes Heparin/ml Vollblut) wurde langsam in ein Zentrifugenröhrchen (Becton/Dickinson, 50ml) gefüllt und bei 260g für 10min zentrifugiert. Der Plasma-Überstand wurde in eine Perfusorspritze aufgenommen, wobei sorgfältig darauf geachtet wurde keine Erythrozyten zu aspirieren. Der Rest des Vollbluts wurde noch einmal bei 590g für 10 Minuten zentrifugiert und ebenfalls in die Perfusorspritze aufgenommen. So wurde aus 30ml Vollblut 12-15ml PRP gewonnen. Die mit PRP gefüllte Spritze wurde bis zum Versuchsbeginn unter Kulturbedingungen gelagert.

### **2.3.2 Herstellung von plättchenarmen Plasma (PPP)**

Zur Herstellung von PPP wurde das gewonnene PRP nocheinmal bei 590g für 25 Minuten zentrifugiert. Der plättchenarme Überstand wurde dann vorsichtig in eine Perfusorspritze aufgenommen und danach bis zum Versuchsbeginn unter Kulturbedingungen aufbewahrt.

## **2.4 Aggregometer (APACT) als experimentelles Aggregationsmodell**

### **2.4.1 Aufbau des APACT (Automated Platelet Aggregation and Coagulation Tracer)**

Das Meßprinzip zur quantitativen Bestimmung der Aggregation beruht auf der von Born (5) entwickelten Methode. Grundlage bildet die turbidimetrische Bestimmung von Zellsuspensionen. Ein in den Silikonküvetten befindliches Metallstäbchen wird hierfür durch einen Elektromagneten zur Rotation gebracht und vermischt die Zellsuspension mit dem dazugegebenen Agens. Simultan wird über eine photometrische Messmethode die Transmission von Licht durch die entsprechende Zellsuspension quantitativ bestimmt. Da plättchenreiches Plasma aufgrund der Lichtstreuung an den einzelnen, suspendierten Thrombozyten eine sehr geringe Transmission für langwelliges Licht aufweist, plättchenfreies

Plasma dieses hingegen nahezu ungehindert durchläßt, kann die prozentuale Lichtdurchlässigkeit eines Plasmas als Maß für die Aggregation herangezogen werden. Durch Aggregation der Thrombozyten kommt es zur Abnahme der Anzahl lichtstreuender Partikel. Um die aufgrund unterschiedlicher Plättchen-Konzentrationen auftretenden Transmissionsunterschiede auszugleichen wurde vor jedem Versuch das PRP auf einen Wert von 0% Transmission und das PPP auf einen Wert von 100% Transmission eingestellt.

Für die im Aggregometer verwendeten Plasmen gelten die gleichen Bedingungen der Präparation wie für die Strömungsversuche (siehe Kap. 2.3). Das Zweikanalaggregometer (APACT) der Firma Labor/Fibrintimer® (Deutschland) enthält zwei Meßkanäle mit Lichtschutzhauben in einem Wärmeblock, der auf 37,4 °C angewärmt wird. In diesen Meßkanälen können gleichzeitig zwei Plasmasuspensionen photometrisch auf den Grad der Aggregation von Thrombozyten analysiert werden. Im Wärmeblock befinden sich außerdem 16 Positionen zur thermostatierten Lagerung von Reagenzflaschen bzw. Silikonküvetten. Zur Datenausgabe befindet sich an der Rückseite des Gerätes eine neunpolige Schnittstelle über die mit einem eigens dafür entwickelten Programm (TUM-Show-Exe2®, Matthias Rumitz) die im Aggregometer gewonnenen Daten ausgewertet werden können.

#### **2.4.2 Versuche im Aggregometer**

Als Küvettenansatz für die Versuche wurden 225µl PRP + 25µl ADP-Lösung oder SCLC-Zell-Suspension und 200µl PRP + 50µl SCLC-Zellsuspension verwendet. Zur Untersuchung des Einflusses von ADP auf die Thrombozytenaggregation wurde PRP für 30 Minuten vor Versuchsbeginn mit ADP-Scavenger (siehe Kap. 2.6.) inkubiert und dann in gleichen Konzentrationen, wie oben beschrieben, ADP-Lösung bzw. SCLC-Zellsuspensionen dazugegeben. Bei der Zugabe von ADP-Lösung zum PRP kam es anfangs (bis ca. 30 Sekunden) zu einem Abfall der Lichttransmission auf Werte von -2% bis -10%. Diese kurzzeitige Verringerung der Lichtdurchlässigkeit führt man auf den durch den ADP-Stimulus bedingten „shape-change“ der Thrombozyten zurück. Hierbei kommt es zur Protrusion von Pseudopodien, die einen Anstieg der Lichtstreuung der Blutplättchen und damit eine reduzierte Lichttransmission bedingt.

Bei der Zugabe von SCLC-Zellsuspension kam es anfangs (bis ca. 50 Sekunden) ebenfalls zu einem Abfall der Lichttransmission allerdings bis auf Werte von -50% . Dieser starke Abfall der Transmission ist darauf zurückzuführen, daß im Gegensatz zur ADP-Lösung, die SCLC-Zellsuspension korpuskuläre Bestandteile in Form von Tumorzellen (Durchmesser 10-12 µm) enthält und es neben dem „shape-change“ der Thrombozyten zusätzlich zu einer stark gesteigerten Lichtstreuung durch die Tumorzellen kommt. Da das Aggregometer nicht für die Zugabe von lichtstreuenden Korpuskuli vorgesehen ist und der 0%-Wert der Lichttransmission auf das PRP kalibriert wird, kommt es hier zu einer Verschiebung der Werte der Lichttransmission nach unten um den Prozentsatz, den die Lichtstreuung der zugegebenen Tumorzellen bewirkt. Um diesen Fehler zu berücksichtigen und ausschließlich Transmissionsveränderung durch Thrombozyten-Aggregationen zu betrachten, wurde der Nullpunkt der Transmission an den maximalen Transmissionsabfall angeglichen.

## **2.5 Versuche in Stase**

### **2.5.1 Versuchsanordnung**

In den statischen Versuchen stand die Untersuchung der Adhäsion und Aggregation von Blutplättchen und SCLC-Zellen an den zwei Oberflächen - immobilisiertes Fibrinogen und Endothel - ohne den Einfluss der Strömung im Vordergrund. Zur Präparation von Plasmaproben zur Gewinnung von plättchenarmen (PPP) und plättchenreichem Plasma (PRP) wurde wie unter Kapitel 2.3 verfahren. Die Gewinnung von SCLC-Zellsuspensionen und Endothelmonolayer lief ebenfalls unter den, zu den Strömungsversuchen beschriebenen, Bedingungen ab (siehe Kap. 2.2).

Zu Versuchsbeginn wurde jeweils ein Glasplättchen (mit/ohne Endothelmonolayer) in eine Petrischale (Becton/Dickinson, Ø 35mm) gelegt. Dann wurden je nach Versuch PBS, PRP oder PPP zusammen mit SCLC-Zellen im Mischungsverhältnis 1:3 auf das Glasplättchen gegeben und 60 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in sterilem PBS wurde das Glasplättchen in Fixans (10% Glutaraldehyd, Sigma, Deutschland; Verdünnung mit PBS) gegeben.

### **2.5.2 Versuchsauswertung**

Zur Auswertung der Zell-Adhäsion unter statischen Versuchsbedingungen wurde eine Fläche von ebenfalls 0,4 mm<sup>2</sup> im Phasenkontrastmikroskop nach Anzahl der Zell-Adhäsionen ausgewertet. Es wurden hierbei absolute Zahlen der adhärierenden Zellen an immobilisiertem Fibrinogen bzw. Endothel angegeben.

## **2.6 Einsatz von ADP-Scavenger und Entzündungsmediatoren**

### **2.6.1 Zugabe von ADP-Scavenger zum PRP**

Um in unseren Versuchen eventuell freigesetztes ADP zu entfernen, wurde es durch geeignete Enzym-Substratgemische zu ATP phosphoryliert, das seinerseits erst in Konzentrationen über 100µM plättchensstimulierend wirkt. Eine Konzentration, die bis zwei Größenordnungen über der in unseren Versuchen liegt. Diese Enzym-Substratkomplexe - ADP-Scavenger - aus Phosphoenolpyruvat (2mM), Pyruvatkinase (10U/ml), Kreatinphosphat (4mM) und Kreatinphosphatkinase (8U/ml) (Alle: Sigma, Deutschland) wurden jeweils 30 Minuten vor Versuchsbeginn zum PRP dazugegeben. Als Kontrolle für die Wirksamkeit der ADP-Scavenger wurde PRP, das mit ADP-Scavenger inkubiert wurde mit ADP (Endkonzentration 5µM, in PBS suspendiert) als stimulierendem Agens im Aggregometer getestet. Im Vergleich wurde PRP, ohne Zugabe von ADP-Scavenger, mit ADP stimuliert.

### **2.6.2 Inkubation von Endothelzellen mit Entzündungsmediatoren**

Endothel-Monolayer wurden mit IL-1β (siehe 2.6.2) in einer Endkonzentration von 100pg/ml unter Kulturbedingungen für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Endothel-Monolayer aus IL-1β-haltigem Kulturmedium genommen und durch sanftes Schwenken in PBS gewaschen. Um eine Alteration des Endothels durch den Entzündungsmediator auszuschliessen mußte das Endothel vor Versuchsbeginn im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert werden. Hier stellte sich jedoch das homogene Bild des Endothelmonolayer mit klassischem „cobblestone pattern“ ohne jede Alteration dar.

## **2.7 Blockade von Membranrezeptoren an Endothel- und SCLC-Zellen**

### **2.7.1 Inkubation des Plasmas mit RGDS**

Der Einfluß einer Hemmung von Membranrezeptoren der SCLC-Zellen auf die Adhäsion an Endothel wurde mit dem Tetrapeptid RGDS (Arginin, Glycin, Asparaginsäure, Serin; Sigma, Deutschland) getestet. Hierfür wurde das PPP mit dem Tetrapeptid RGDS - gelöst in Bidest - mit einer Endkonzentration von 1mM für 10 Minuten vor dem Strömungsversuch bei 37°C° inkubiert.

### **2.7.2 Inkubation der Endothel-Zellen mit Antikörpern**

Hier wurden die Endothel-Monolayer nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  vor den Experimenten zum Einen mit einem monoklonalen Antikörper gegen P-Selektin (Padgem, CD 62P, Dako, Deutschland), zum Anderen mit einem monoklonalen Antikörper gegen ICAM-1 (Dianova, Deutschland) in der Endkonzentration 10 $\mu$ g/ml für 10-15 Minuten bei 37°C $\pm$ 1°C° inkubiert. Ausserdem wurden die Endothel-Monolayer mit dem Polysaccharid Fucoidan (Sigma, Deutschland) in der Endkonzentration 10 $\mu$ g/ml für 10-15 Minuten inkubiert. Die monoklonalen Antikörper sowie Fucoidan wurden in serumfreiem Kulturmedium (199 Earle, Biochrom, Deutschland) suspendiert , davon wurden jeweils 150 $\mu$ l für 10-15 Minuten auf ein mit Endothel bedecktes Glasplättchen gegeben.

## **2.8 Immunoblot/-zytochemie von Membranrezeptoren**

### **2.8.1 Immunzytochemie der SCLC-Zellen auf Integrin $\alpha_{11b},\beta_3$**

Zur Immunmarkierung von Membranrezeptoren wurden SCLC-Zellpellets in Paraformaldehyd/Glutaraldehyd (3%/0,1%) für 10 Minuten fixiert , dann in Amoniumchlorid NH<sub>4</sub>CL für 4 Minuten gestoppt anschließend in PBS gewaschen und mit einem primären monoklonalen Antikörper gegen Integrin  $\alpha_{11b},\beta_3$  (Dako, Deutschland; Verdünnung 1:800, Maus gegen Mensch) für 12 Stunden bei +4C° inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären gold-konjugierten Antikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur (Ziege gegen Maus, 6nm Gold, Aurion, Niederlande). Die Darstellung erfolgte im Lichtmikroskop. Verstärkung des Signals erfolgte mit Silver-Enhancement (Kit, Aurion, Niederlande ).

### **2.8.2 Immunoblot der SCLC-Zellen auf Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$**

Für den Western-/Immunoblot inkubierten wir SCLC-Zell-Blots und als Kontrolle Thrombozyten-Blots mit einem primären monoklonalen Antikörper gegen Glykoprotein 3a (Dako, Deutschland; Monoclonal Mouse Anti-Human Platelet, CD61) in einer Verdünnung von 1:500 (gelöst in 0,5% Milchpulver/TBS-Tween) bei +4C° für 12 Stunden. Nach dreimaligem Waschen in TBS-Tween (Sigma, Deutschland) wurden die Blots mit dem sekundären Antikörper, Anti-Mouse-POX (Dianova, Deutschland), in der Verdünnung 1:3000 (gelöst in 0,5% Milchpulver/TBS-Tween) bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS-Tween wurde die ECL-Detektion in der Dunkelkammer durch Zugabe von ECL-Fotoemulsion (Amersham, Deutschland) auf die Blots initiiert. Nach 1 Minute wurde die ECL-Emulsion abgekippt und danach ein Film zur Belichtung auf die Blots gelegt. Sobald Banden sichtbar waren, wurde der Film gewässert und fixiert (Fixans: Sigma, Deutschland).

### **2.8.3 Immunzytochemie der Endothelzellen auf P-Selektin**

Zur Immunmarkierung von Membranrezeptoren wurden Endothelzell-Pellets in Paraformaldehyd/Glutaraldehyd (3%/0,1%) für 10 Minuten fixiert, dann in Amoniumchlorid NH<sub>4</sub>Cl für 4 Minuten gestoppt anschließend in PBS gewaschen und mit einem primären monoklonalen Antikörper gegen P-Selektin (Padgem, Dako; 1:800, Maus gegen Mensch,) für 12 Stunden bei +4C° inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären gold-konjugierten Antikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur (Ziege gegen Maus, 6nm Gold, Aurion, Niederlande). Die Darstellung erfolgte im Lichtmikroskop. Verstärkung des Signals erfolgte mit Silver-Enhancement (Kit, Aurion, Niederlande).

## **2.9 Bildgebende Dokumentation**

### **2.9.1 Dunkelfeldmikroskopie/Videoprint**

Von den im Dunkelfeldmikroskop ablaufenden Strömungsversuchen wurden, wie in Kapitel 2.1.2 erwähnt, Video-Mitschnitte angefertigt. Von diesen auf VHS-Videokassetten mitgeschnittenen Bildinformationen konnten mit einem Video-Printer (Sony, Japan) einzelne Standbilder auf Hochglanz-Papier (Sony, Japan) gedruckt werden.

### **2.9.2 Phasenkontrastmikroskopie (Phako)**

Nach Beendigung des Versuches wurden die Glasplättchen, wie in Kapitel 2.7.1. beschrieben, in 2,5%Glutaraldehyd fixiert. Die fixierten Glasplättchen wurden bei  $+4^{\circ}\text{C}/-1^{\circ}\text{C}$  im Fixans für 24 Stunden aufbewahrt, so daß auch zu einem späteren Zeitpunkt Photographien der Präparate erstellt werden konnten. Zur photographischen Dokumentation der Präparate wurde jeweils eine Petrischale mit dem darin befindlichen Präparat auf den Objektisch eines Phasenkontrastmikroskops (Nikon, Japan) gestellt und bestimmte Bereiche des Präparates mit verschiedenen Vergrößerungen (10-, 20- und 40-fach) mit einer vollautomatischen Photo-Kamera (Nikon, Japan) fotografiert. Für die Photographien wurden S/W-Negativfilme (Ilford, Deutschland) verwendet. Abzüge der Negative wurden in herkömmlichen Fotolaboren gefertigt.

### **2.9.3 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)**

Direkt nach Beendigung eines Versuches wurden die mit Zellen bedeckten Glasplättchen in einer Petrischale (Becton/Dickinson, Deutschland,  $\varnothing$  35mm) mit Glutaraldehyd (2,5%; Serva, Deutschland; verdünnt mit PBS steril) für mindestens 24 Stunden bei einer Temperatur von  $4^{\circ}\text{C}/- 1^{\circ}\text{C}$  fixiert. Anschließend mußten die Glasplättchen in PBS gewaschen und mit 1% Osmiumtetroxid (Merck, Deutschland) für 30 - 60 Minuten nachkontrastiert werden. Nach erneutem Waschen in PBS erfolgte die Entwässerung der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 96%, 100%).

Danach wurden die Präparate in Epon (Merck, Deutschland) und Alkohol mit steigender Epon-Konzentration bis zu reinem Epon eingebettet. Nach Aufbewahrung für mindestens 12 Stunden bei Zimmertemperatur, erfolgte die Aushärtung in 100%igem Epon bei  $60^{\circ}\text{C}/-2^{\circ}\text{C}$  für ca. 72 Stunden. Schnitte der Präparate wurden mit einer Dicke von 30-50nm im Ultratom (LKB, Deutschland) angefertigt und auf Kupfernetze aufgenommen.

Als letzter Schritt stand die Nachkontrastierung der Präparate mit Uranylacetat (Merck, Deutschland) für 10 Minuten und Bleicitrat (Merck) für 2 Minuten an. Die Präparate konnten dann, nachdem sie nocheinmal in PBS gewaschen worden waren, im TEM (Zeiss, EM10, Deutschland) begutachtet werden.

#### **2.9.4 Rasterelektronenmikroskopie**

Für die Rasterelektronenmikroskopie (SEM, JEOL 6300 F, Japan) mußten die Proben nach dem Entwässern in der aufsteigenden Äthanolreihe noch mit flüssigem Kohlendioxid über den kritischen Punkt getrocknet werden. Die Proben wurden dann mit Leitsilber auf Probenhalter aufgeklebt und in einer Kathodenzerstäuberanlage (M-Scope 500, England) mit einer Chrom- bzw. Platinschicht überzogen.

#### **2.10 Statistik**

Bei den im Ergebnisteil graphisch dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung vom Mittelwert. Zum Vergleich von verbundenen Stichproben wurde, wenn die Daten eine statistische Analyse zuließen, der Student t-Test angewandt. Zur Bestimmung der Signifikanz bei graphischen Darstellungen einer Kinetik wurden die Werte zu einem bestimmten Zeitpunkt (meist  $t = 140\text{sec.}$ , mit \* markiert) verglichen.

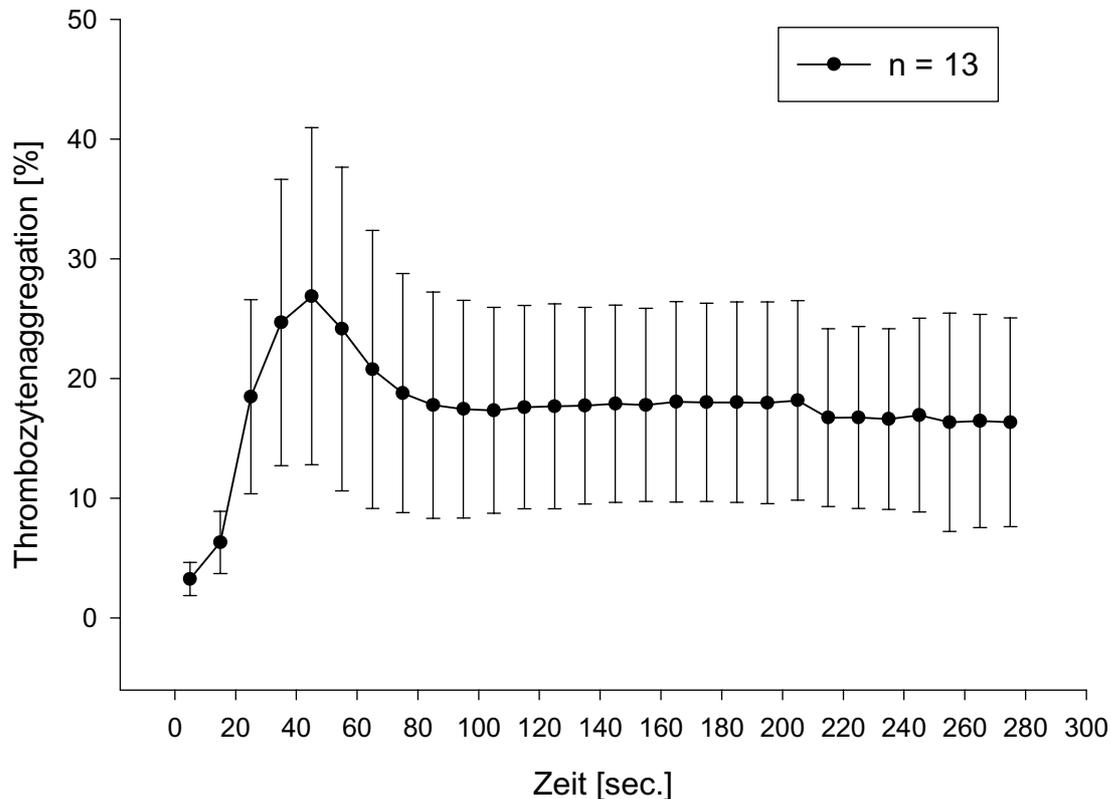
## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Einfluß von SCLC-Zellen auf die Aggregation von Blutplättchen im Aggregometer (APACT)**

#### **3.1.1 Tumorzell-induzierte Plättchen-Aggregation (TCIP-Aggregation) im APACT**

Im Aggregometer (APACT) wurde der Einfluß von Zellen eines humanen kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC) auf Blutplättchen im menschlichen Blutplasma untersucht. Die Tumorzellen des Typs H69+ und H24+ induzierten im APACT die Aggregation von Thrombozyten in plättchenreichem Plasma (PRP).

Die Zugabe von SCLC-Zell-Suspension zu PRP (Volumenverhältnis 1:10) im Aggregometer führte anfangs zu einem Transmissionsabfall auf  $-22,4\% \pm 5,8\%$  in 10 Sekunden. Danach kam es zu einem Anstieg der Transmission mit einer maximalen Steigung von  $1,6\%/sec.$  (Mittelwert)  $\pm 0,6\%/sec.$  (Standardabweichung vom Mittelwert) zum Zeitpunkt  $t = 19sec.$   $\pm 3sec.$ . Das Transmissionsmaximum wurde zum Zeitpunkt  $t = 45 sec.$  mit einem Wert von  $27\% \pm 11\%$  erreicht. Danach kam es zu einem Abfall der Transmission auf einen Wert von  $17,5\% \pm 8,5\%$  bei 120 Sekunden. Im weiteren Kurvenverlauf kam es nur noch zu einem minimalen Abfall der Transmissionswerte (*Abb. 3.1*).



**Abb. 3.1: SCLC-Zell-induzierte Thrombozytenaggregation im APACT**

Kinetik der SCLC-Zell-induzierten Thrombozytenaggregation im Aggregometer. Die Kurve zeigt den photometrisch ermittelten prozentualen Wert der Thrombozytenaggregation [n=13] in Abhängigkeit von der Zeit. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung vom Mittelwert.

Während der Versuche untersuchten wir die Plasma-Tumorzell-Suspension im Phasenkontrastmikroskop. Deutlich wurde hier eine, mit dem Kurvenverlauf korrelierende, Größenverteilung der Thrombozytenaggregate. Die größten Aggregate lagen zum Zeitpunkt des Transmissionsmaximums vor. Mit Abfall der Aggregation auf Werte um 17,5% zeigte sich mikroskopisch eine zunehmende Desaggregation der Thrombozytenaggregate, die nach ca. 80 Sekunden weitestgehend stagnierte. Es konnten keine Koaggregate zwischen SCLC-Zellen und Thrombozyten beobachtet werden. Die SCLC-Zellen aggregierten jedoch untereinander und erreichten eine starke Aggregation zum Ende der Versuche.

### 3.1.2 ADP-induzierte Plättchen-Aggregation im APACT

Vergleichend wurde PRP im Aggregometer mit ADP-Lösung (Adenosin-Diphosphat) mit der Endkonzentration 5µM inkubiert und der Verlauf der Transmissionswerte über den gleichen Zeitraum betrachtet. Die Zugabe der ADP-Lösung führte zu einem Abfall der Lichttransmission auf Werte von -3,5% +/-1,7% in einem Zeitraum von ca. 10 Sekunden.

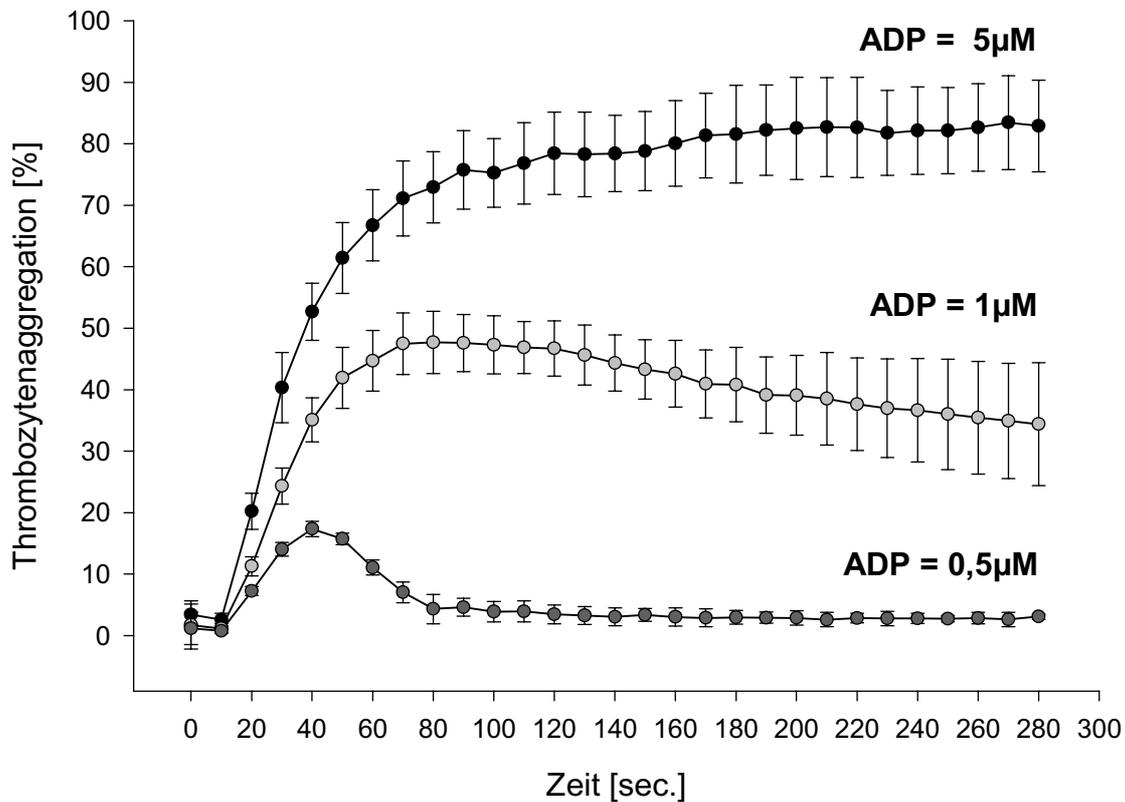
Nach diesem Transmissionsabfall stieg die Kurve mit einer maximalen Steigung von 3,2 %/sec. +/- 0,6%/sec. steil an, um nach 40-80 Sekunden den Wendepunkt mit prozentualen Transmissionswerten bis zu 80% zu erreichen. Danach erreichte die Transmission bei 4 Minuten und 40 Sekunden einen Wert von 88,8% +/- 7,6% (**Abb. 3.2**).

Die mikroskopische Untersuchung des Plasmas während der Versuche zeigte eine deutlich stärkere Aggregation von Blutplättchen unter 5  $\mu$ molaren ADP-Stimulus als unter SCLC-Zell-Stimulus. Nach ADP-Stimulation lagen grössere Thrombozytenaggregate vor. Es kam im Gegensatz zur SCLC-Zell-induzierten Thrombozytenaktivierung im Versuchszeitraum von 4min. und 40sec. nicht zu einer Desaggregation der Thrombozyten.

Um die Kinetik der Thrombozytenaktivierung im APACT bei niedriger molekularen ADP-Stimuli zu betrachten wurde unter gleicher Versuchsanordnung PRP mit geringer konzentriertem ADP - 1  $\mu$ M und 0,5 $\mu$ M - stimuliert. Im Vergleich zum Verlauf der Thrombozytenaggregation unter 5 $\mu$ molarem ADP-Stimulus stellte sich der Verlauf bei Stimulation mit ADP der End-Konzentration 1 $\mu$ M bis zum Zeitpunkt t=40 Sekunden ähnlich wie der unter 5 $\mu$ M Stimulus dar. Allerdings wurde lediglich ein Aggregationsmaximum von 47,9% +/- 4,8% bei 105 Sekunden erreicht. Nach diesem Maximum kam es zu einem langsamen Rückgang der Thrombozytenaggregation auf einen Wert von 34,4% +/-9.9% nach 4 Minuten und 40 Sekunden. Korrelierend zeigten sich lichtmikroskopisch zum Maximum der Thrombozytenaggregation nach 105 Sekunden die größten Thrombozytenaggregate. Danach war eine Desaggregation der Thrombozyten nachweisbar. Die Grössen der Standardabweichungen vom Mittelwert implizieren dabei, daß bei einem Teil der Proben eine sehr geringe Desaggregation, bei einem anderen dagegen eher eine starke Desaggregation stattfand (**Abb 3.2**).

Bei Stimulation der Blutplättchen im APACT mit ADP der Konzentration 0,5 $\mu$ M, zeigte sich ebenfalls bis zum Zeitpunkt t = 40 Sekunden ein Kurvenverlauf wie unter höher molekularem ADP-Stimulus mit einem schnellen Anstieg der Thrombozytenaggregation. Allerdings wurde nach 45 Sekunden bereits das Aggregationsmaximum von 17,4% +/-1,24% erreicht um schon nach weiteren 35 Sekunden auf einen Wert von 4,34% +/-2,38% abzufallen (**Abb. 3.2**).

Im Phasenkontrastmikroskop untersuchte Stichproben der Plasma-ADP-Suspension zeigten zum Zeitpunkt der maximalen Aggregation auch das Korrelat in Form grosser Thrombozytenaggregate die anschließend bis zum Zeitpunkt von 80 Sekunden fast vollständig desaggregierten.



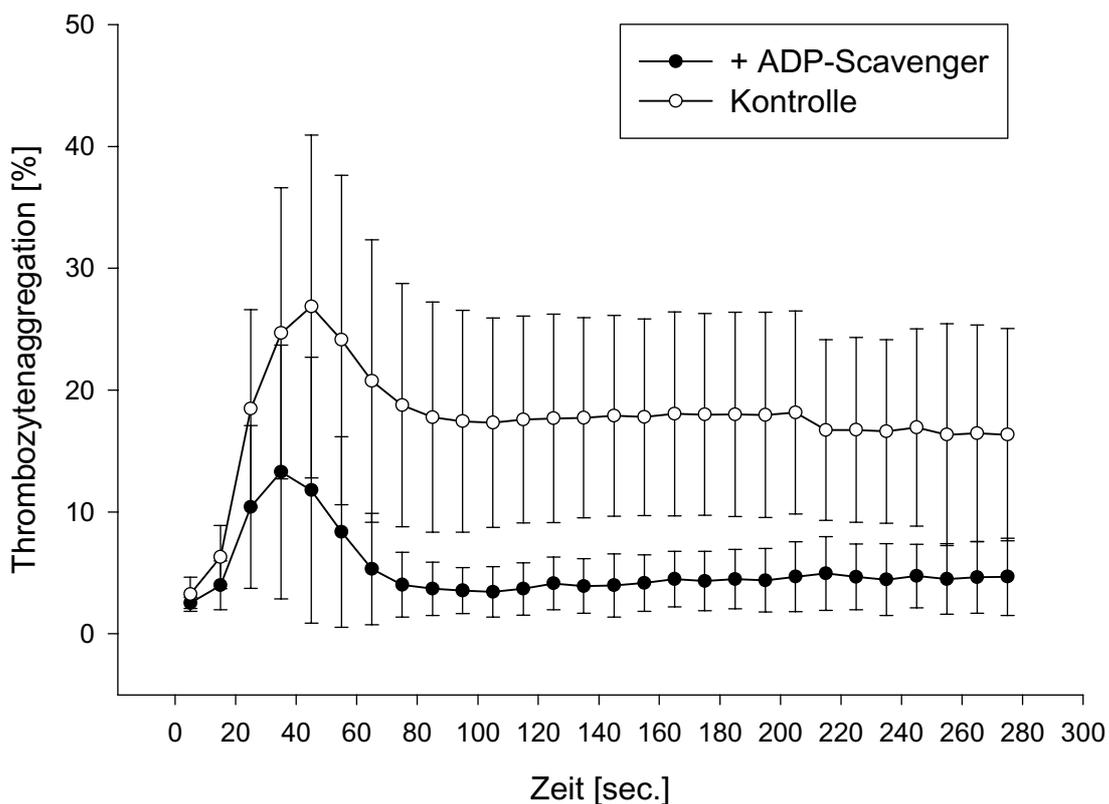
**Abb. 3.2: ADP-induzierte (5 μm, 1 μm, 0,5 μm) Thrombozytenaggregation im APACT**

Kinetik der durch ADP vermittelten (5 μm, 1 μm und 0,5 μm) Thrombozytenaggregation im APACT. Die Kurven [n = 6] zeigen die photometrisch ermittelten prozentualen Werte der Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Zeit. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung vom Mittelwert.

### 3.1.3 Einfluß von ADP-Scavenger auf die TCIP-Aggregation

Um ADP als möglichen molekularen Stimulus der Tumorzell-induzierten Plättchen-Aggregation (TCIP-Aggregation) durch SCLC-Zellen genauer zu untersuchen, wurden die Versuche im Aggregometer mit Enzym-Substratkomplexen zur Entfernung von ADP durchgeführt. Dabei zeigte sich eine hoch signifikante (\*\*\*,  $p > 0,0001$ , bei  $t = 140$  sec.) Reduktion der TCIP-Aggregation durch SCLC-Zellen. Wie in den Kontrollen ohne ADP-Scavenger zeigten die Lichttransmissionskurven anfangs einen Abfall von 19,9%  $\pm$  5,3% bedingt durch zusätzliche Lichtstreuung der SCLC-Zellen.

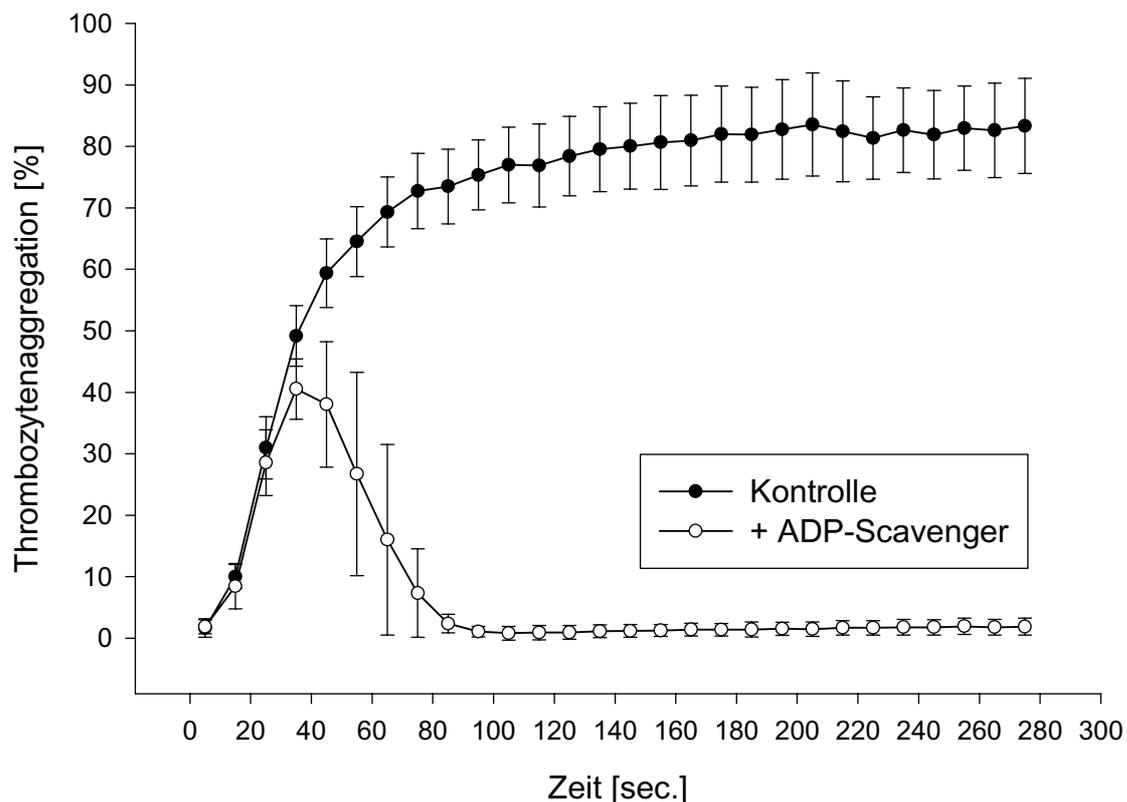
Dann kam es, wie unter Kapitel 3.1 beschrieben, zu einem schnellen Anstieg der Lichttransmission auf einen Wert von 13,3% +/- 10,4%. Dieser Punkt der maximalen Aggregation der Thrombozyten wurde nach 35 Sekunden erreicht. Innerhalb weiterer 45 Sekunden fiel die Transmission jedoch wieder auf einen Wert von 3,6% +/- 2,4% zurück. Bis zur Beendigung des Versuches nach 4 Minuten und 40 Sekunden kam es nochmal zu einem minimalen Anstieg der Transmission auf einen Wert von 4,9% +/- 3,2. Die lichtmikroskopische Kontrolle des Plasmas zeigte zum Zeitpunkt der maximalen Aggregation nach 35 Sekunden, Plättchenaggregate von geringerer Größe als ohne Zugabe von ADP-Scavenger. Die Tumorzellen lagen auch hier als kleinere Aggregate vor, die an Grösse zum Ende des Versuches leicht zunahmen. Mit dem Rückgang der Transmission bis zum Zeitpunkt  $t = 80$  Sekunden zeigte sich auch hier eine starke Desaggregation der Thrombozyten. Zum Ende des Versuches lag der Großteil der Blutplättchen einzeln vor. (**Abb. 3.3**).



**Abb. 3.3: TCIP-Aggregation +/- ADP-Scavenger im APACT**

Kinetik der SCLC-Zell-induzierten Thrombozytenaggregation im Aggregometer mit [n=6] und ohne [n=13] Zugabe von ADP-Scavenger. Die Kurve zeigt den prozentualen Wert der Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Zeit. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung vom Mittelwert.

Vergleichend wurde auch bei der ADP-induzierten Thrombozyten-Aktivierung ADP-Scavenger eingesetzt. Nach kurzzeitigem Abfall der Transmission um 4,6% +/- 3,3 innerhalb von 10 Sekunden zeigte sich ein schneller Anstieg der Transmissionswerte auf einen Wert von 41,2% +/- 6,6% am Wendepunkt der Kurve nach 40 Sekunden. Innerhalb von weiteren 50 Sekunden fielen die Transmissionswerte auf 1,4% +/- 0,7% zurück (*Abb. 3.4*).



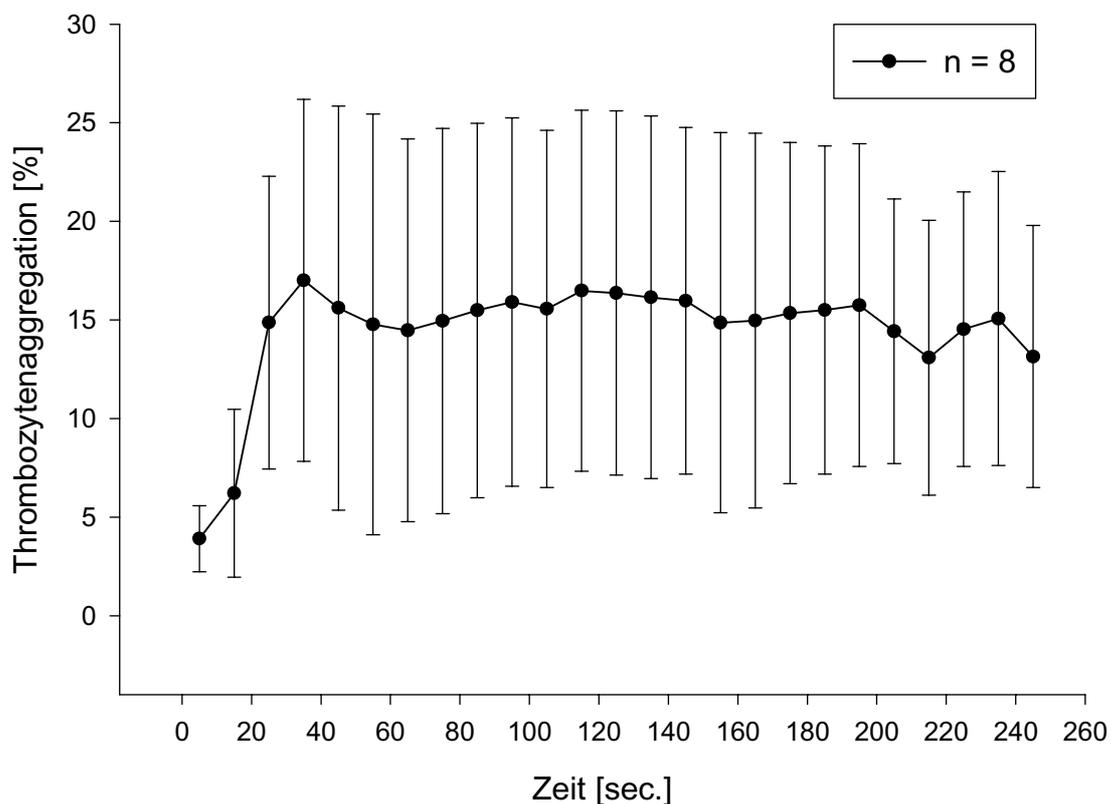
**Abb. 3.4: ADP-induzierte (5µm) Thrombozytenaggregation im APACT +/- ADP-Scavenger**

Kinetik der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation im Aggregometer mit [n=5] und ohne Zugabe [n=12] von ADP-Scavenger. Die Kurve zeigt den photometrisch ermittelten prozentualen Wert der Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Zeit. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung vom Mittelwert.

Im Phasenkontrastmikroskop zeigten sich zum Zeitpunkt der maximalen Aggregation Plättchenaggregate von geringerer Größe als ohne Zugabe von ADP-Scavenger. Mit dem Rückgang der Transmission bis zum Zeitpunkt  $t = 90$  Sekunden war auch hier eine nahezu vollständige Desaggregation der Thrombozyten zu beobachten. Zum Ende des Versuches lag der Großteil der Thrombozyten einzeln vor.

### 3.1.4 Einfluß von SCLC-Zell-Überstand auf die Plättchenaggregation

Um den Einfluß molekularer Agentien aus SCLC-Zellen auf Thrombozyten ohne die Anwesenheit der Zellen zu untersuchen, wurde Überstand der SCLC-Zellen im Aggregometer dem PRP zugegeben. Die Zugabe von SCLC-Zell-Überstand zu PRP im Aggregometer führte zu einem Transmissionsanstieg auf  $2,2 \pm 5,3\%$  in 10 Sekunden. Der anfängliche Transmissionsabfall wie bei Zugabe von SCLC-Zell-Suspension konnte nicht beobachtet werden. Danach kam es zu einem weiteren Anstieg der Transmission mit einer maximalen Steigung von  $1,9\%/sec.$   $\pm 1,0\%/sec.$  zum Zeitpunkt  $t = 19sec.$   $\pm 3sec.$ . Das Transmissionsmaximum wurde zum Zeitpunkt  $t = 35 sec.$  mit einem Wert von  $17,0\% \pm 9,2\%$  erreicht. Im weiteren Kurvenverlauf kam es nur noch zu einem minimalen Abfall der Transmissionswerte (*Abb. 3.5*).



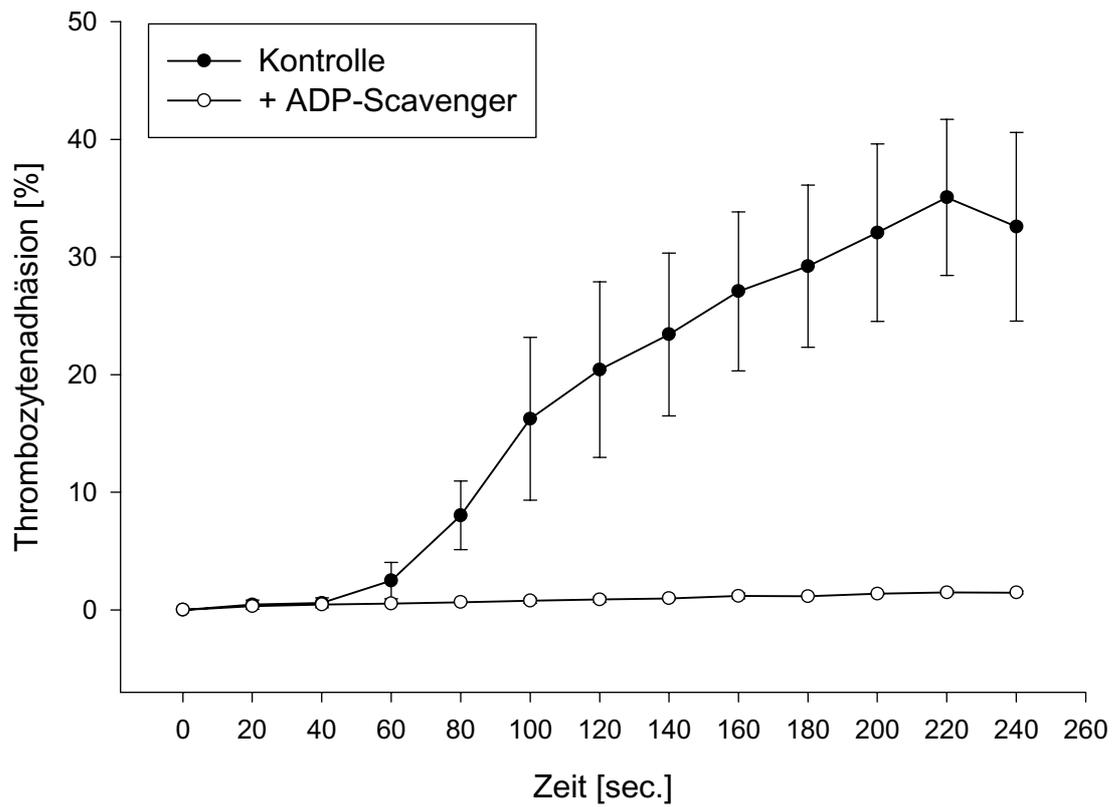
**Abb. 3.5: SCLC-Zellüberstand-induzierte Thrombozytenaggregation im APACT**

Kinetik der, durch Überstand von Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC) induzierten, Thrombozytenaggregation im Aggregometer. Die Kurve zeigt den photometrisch ermittelten prozentualen Wert der Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Zeit. Aufgetragen sind die Mittelwerte [ $n = 8$ ] mit der jeweiligen Standardabweichung vom Mittelwert.

## **3.2 Einfluß von SCLC-Zellen auf die Adhäsion von Blutplättchen im Staupunkt-Adhäsio-Aggregometer (SPAA)**

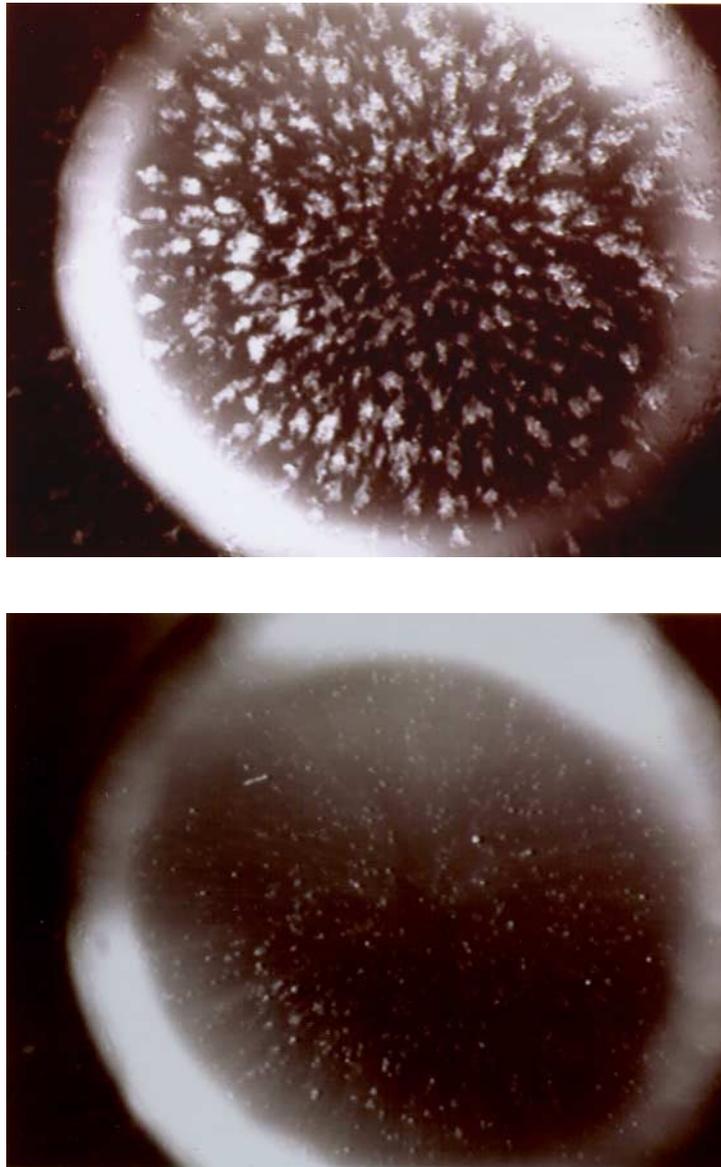
### **3.2.1 Tumorzell-induzierte Plättchen-Adhäsion (TCIP-Adhäsion) an immobilisiertem Fibrinogen**

Um neben dem Einfluß von SCLC-Zellen auf das Aggregations-Verhalten von Blutplättchen auch den Einfluß auf das Adhäsions-Verhalten zu betrachten, wurden Glasoberflächen mit plättchenreichem Plasma (PRP) unter SCLC-Zell-Zugabe im Staupunkt Adhäsio-Aggregometer (SPAA) beströmt. Durch die Beströmung mit Plasma bildete sich wie unter Kapitel 2.2 beschrieben eine homogene mit immobilisiertem Fibrinogen belegte Oberfläche. Dabei konnte, wie unter 2.1.3. beschrieben, die mit Thrombozyten-Aggregaten bedeckte Oberfläche als direktes Maß für die Plättchen-Adhäsion verwendet werden. Wurde die Fibrinogen-Oberfläche nur mit PRP beströmt kam es in vier Minuten Beströmung nur zu einer geringen Adhäsion von Thrombozyten - meist als einzelne Zellen oder Doubletten. Mit dem Zulauf von SCLC-Zellsuspension zum PRP kam es nach 30-50 Sekunden zum kontinuierlichen Aufbau einer starken Plättchen-Adhäsion und -Aggregation auf der beströmten Oberfläche (**Abb. 3.6**). Bei Versuchsende nach vier Minuten wurde eine maximale Belegung mit Plättchen-Adhäsionen von ca. 40% der beströmten Fibrinogenoberfläche erreicht. Die Adhäsion und Aggregation der Blutplättchen verlief gleichmäßig radial-symmetrisch entlang den Stromlinien der Staupunktströmung (**Abb. 3.7 oben**). Es konnte keine Adhäsion von Tumorzellen an adhärenen Thrombozyten und umgekehrt beobachtet werden.



**Abb. 3.6: TCIP-Adhäsion an immobilisiertem Fibrinogen +/- ADP-Scavenger**

Kinetik der SCLC-Zell-induzierten Thrombozyten-Adhäsion an immobilisiertem Fibrinogen. Die obere Kurve [n=10] zeigt die Thrombozyten-Adhäsion ohne Zugabe von ADP-Scavenger. Die untere Kurve [n=5] zeigt den Verlauf der Thrombozyten-Adhäsion bei Inkubation des PRP mit ADP-Scavenger. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung vom Mittelwert.



**Abb. 3.7: Video-Prints der TCIP-Adhäsion an immobilisiertem Fibrinogen**

3.7 (oben): Radial-symmetrisch ausgerichtete SCLC-Zell-induzierte Thrombozyten-Adhäsionen und -Aggregate auf einer Oberfläche mit immobilisiertem Fibrinogen nach 4 Minuten Bestromung im SPAA. Die Aggregate erscheinen als helle Bereiche vor dunklem Hintergrund. 3.7 (unten): Nahezu vollständig ausbleibende Thrombozyten-Adhäsion nach 4 Minuten Bestromung bei Inkubation des PRP mit ADP-Scavenger. Darstellung im Dunkelfeldmikroskop.

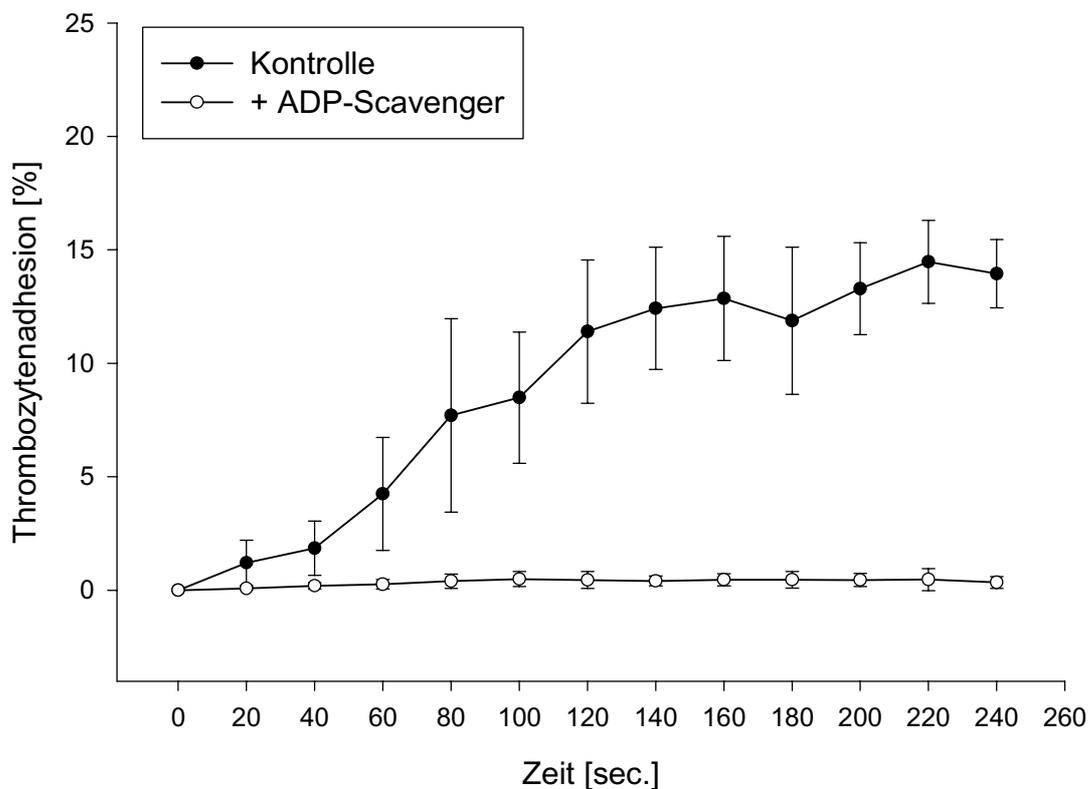
### **3.2.2 Blockade der TCIP-Adhäsion an immobilisiertem Fibrinogen**

Um ADP als möglichen Stimulus der SCLC-Zell-induzierten Thrombozyten-Adhäsion an immobilisiertem Fibrinogen auszuschalten, wurden - wie bei den Aggregations-Versuchen - ADP-Scavenger im Strömungsversuch eingesetzt. Der ADP-Scavenger führten zu einer hoch signifikanten (\*\*\*,  $p > 0,0001$ ) Verringerung der TCIP-Adhäsion an immobilisiertem Fibrinogen (*Abb. 3.6*). Das mit ADP-Scavenger inkubierte PRP strömte mit Beginn des

Versuches auf die Glasoberfläche in der Strömungskammer. Bei Zulauf der SCLC-Zell-Suspension kam es im Gegensatz zu den Versuchen ohne ADP-Scavenger lediglich zu einer geringen Stimulierung und zu einer schwachen Adhäsion der Blutplättchen an der Oberfläche. Nach vier Minuten Beströmung des Glasplättchens waren maximal 2% der beströmten Oberfläche mit Thrombozyten belegt (*Abb.3.6, 3.7 unten*).

### 3.2.3 TCIP-Adhäsion an humanen Endothelzellen (HUVEC)

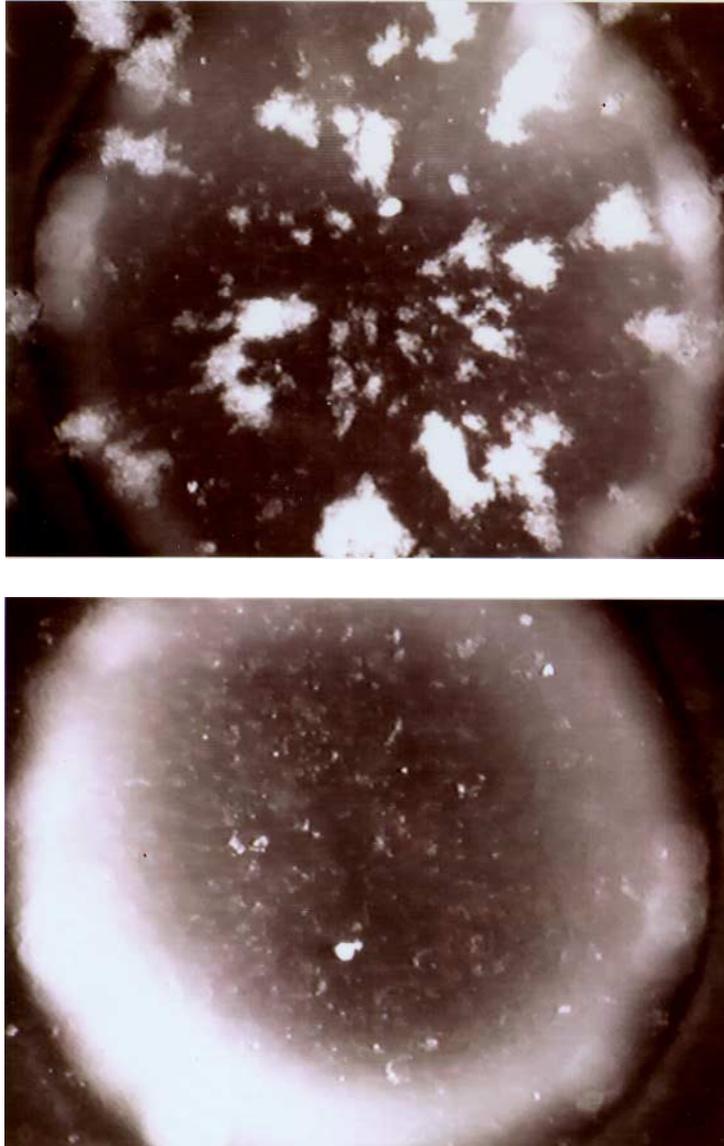
Neben der Beströmung von immobilisiertem Fibrinogen war die Betrachtung der SCLC-Zell-induzierten Thrombozyten-Adhäsion an Endothel von grösserer physiologischer Bedeutung. Bei der Beströmung von Endothel-Monolayer mit Plasma ohne Zugabe von Tumorzellen, adhärten nur vereinzelt Thrombozyten am Endothel. Sobald in den Experimenten SCLC-Zell-Suspension zum Plasma hinzufloß kam es durch die Stimulierung der Thrombozyten nach 30-50 Sekunden zu einer zunehmenden Plättchen-Adhäsion und -Aggregation am Endothel. Bei Versuchsende nach vier Minuten waren mehr als 15% der beströmten Oberfläche mit Thrombozyten-Adhäsionen belegt (*Abb. 3.8*).



**Abb. 3.8: TCIP-Adhäsion an HUVEC +/- ADP-Scavenger**

Kinetik der SCLC-Zell-induzierten Thrombozyten-Adhäsion an Endothel. Die obere Kurve zeigt die Thrombozyten-Adhäsion von unbehandeltem PRP [n=6] die untere Kurve zeigt den Verlauf der Thrombozyten-Adhäsion bei Inkubation des PRP mit ADP-Scavenger [n=6].

Bei der Betrachtung der Verteilung der Thrombozyten-Aggregate auf der beströmten Endotheloberfläche zeigte sich ein anderes Muster als bei Beströmung von immobilisiertem Fibrinogen. Die Verteilung der Plättchen-Adhäsionen und -Aggregationen wies hier im Gegensatz zur Fibrinogen-Oberfläche keine so klare radial-symmetrische Anordnung auf, sondern verlief ungleichmäßiger (*Abb. 3.9*).



**Abb. 3.9 Dunkelfeldmikroskopische Video-Prints der TCIP-Adhäsion an HUVEC**

3.9 (oben) zeigt eine starke SCLC-Zell-induzierte Plättchen-Adhäsion und -Aggregation an der Endothel-Oberfläche nach 4 Minuten Beströmung. Charakteristisch ist die unsymmetrische Verteilung der grossen Plättchen-Aggregate nach 4 Minuten Beströmung. 3.9 (unten) zeigt eine hoch signifikant reduzierte Plättchen-Adhäsion an der beströmten Endothel-Oberfläche nach vier Minuten bei Inkubation des PRP mit ADP-Scavenger.

### **3.2.4 Blockade der TCIP-Adhäsion an HUVEC**

Zur Blockade der SCLC-Zell-induzierten Thrombozyten-Adhäsion an Endothel unter Strömungsbedingungen wurde wie bei Strömungsversuchen auf immobilisiertem Fibrinogen ADP-Scavenger eingesetzt. Das mit ADP-Scavenger inkubierte PRP strömte mit Beginn des Versuchs auf die Endotheloberfläche in der Strömungskammer. Bei Zulauf der SCLC-Zell-Suspension kam es im Gegensatz zu den Versuchen ohne ADP-Scavenger lediglich zu einer geringen Stimulierung und zu einer schwachen Adhäsion der Blutplättchen an der Endotheloberfläche. Der ADP-Scavenger reduzierte die Adhäsion von Blutplättchen am Endothel hoch signifikant (\*\*\*,  $p > 0,0001$ ,  $t = 140$  sec.) Nach vier Minuten Beströmung wurde eine Belegung von weniger 2% der beströmten Oberfläche mit Thrombozyten nicht überschritten (*Abb 3.8, 3.9b*).

### **3.3 Einfluß von SCLC-Zellen auf die Adhäsion von Blutplättchen unter statischen Bedingungen (Stase)**

#### **3.3.1 SCLC-Zell-induzierte Plättchen-Adhäsion an immobilisiertem Fibrinogen**

Bei der Inkubation von Glas-Oberflächen [n=6] mit PRP für 60 Minuten bei +37°C kam es lediglich zu einer Adhäsion von 46 +/-6 Thrombozyten auf einer Fläche von 0,4mm<sup>2</sup>. Auch die Zugabe von SCLC-Zellen zum PRP [n=6] (Verhältnis 1:3) führte nicht zu einer Steigerung der Zahl, der am immobilisiertem Fibrinogen adhärierenden Thrombozyten. Die Inkubation des PRP mit ADP-Scavenger verringerte nicht die Zahl adhärierender Thrombozyten.

#### **3.3.2 SCLC-Zell-induzierte Plättchen-Adhäsion an HUVEC**

Bei der Inkubation von Endothel [n=6] mit PRP bei +37°C für 60 Minuten kam es zu einer Sedimentation und Adhäsion von Thrombozyten. Nach der Inkubation wurden die mit Thrombozyten bedeckten Endothel-Glasplättchen dreimal unter starker Scherbelastung gewaschen um nicht adhärierende Thrombozyten herunterzuwaschen. Die Thrombozyten adhärten als einzelne Zellen und bildeten keine Aggregate. Nach 60 Minuten betrug die durchschnittliche Zahl der fest adhärierenden Thrombozyten 3132 +/- 298 auf einer Fläche von 0,4mm<sup>2</sup>.

Bei der Zugabe von SCLC-Zell-Suspension zum PRP (Verhältnis = 1ml : 3ml) und einer anschließenden Inkubation der Endotheloberfläche [n=6] kam es weder zu einer Verstärkung noch zu einer Verringerung der Zahl adhärierender Thrombozyten. Es konnte kein direkter Kontakt zwischen Thrombozyten und am Endothel adhärenen Tumorzellen beobachtet

werden. Thrombozyten adhärten am Endothel unabhängig von Zellen des SCLC. Der Einsatz von ADP-Scavenger hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die Zahl der an der Endothel-Oberfläche adhärierenden Thrombozyten.

### **3.4 „Rollen“ und Adhäsion von SCLC-Zellen an HUVEC im SPAA**

#### **3.4.1 „Rollen“ und Adhäsion an unstimulierten HUVEC**

Neben der, in den vorangegangenen Kapiteln betrachteten, Interaktion von SCLC-Zellen und Thrombozyten wurde hier die Frage untersucht ob und über welchen Mechanismus SCLC-Zellen am Endothel adhärten. Dazu strömte in unserem Modell (SPAA) Plasma mit Zulauf von SCLC-Zell-Suspensionen gegen Endothelzellen (HUVEC). Dieser schon in vorangegangenen Kapiteln erläuterte Versuchsablauf führte neben der erwähnten Aktivierung von Blutplättchen außerdem zu einem „Rollen“ und einer geringen Adhäsion von SCLC-Zellen an der Endotheloberfläche. „Rollen“ bezeichnet dabei eine gegenüber der wandnahen Strömung verlangsamte „stop and go“- Bewegung an der beströmten Oberfläche. Das langsame Strömen („go“) ist dabei von kurzfristigem Haften („stop“) unterbrochen. Adhärten die SCLC-Zellen am Endothel, so geschah dies unabhängig von adhärenen Blutplättchen. SCLC-Zellen hafteten weder auf Thrombozyten-Aggregaten noch bildeten sich Thrombozyten-Aggregate auf haftenden Tumorzellen.

Um ausschließlich die SCLC-Zell-Adhäsion an der Endothel-Oberfläche ohne Plättchen-Einfluß zu untersuchen wurden die Strömungsversuche mit PPP (plättchenarmes Plasma) anstelle von PRP (plättchenreiches Plasma) durchgeführt (Kap. 2.1.2). Auch in Abwesenheit von Blutplättchen kam es nur vereinzelt zu festen Adhäsionen von SCLC-Zellen am Endothel. In 4 Minuten Bestromung adhärten weniger als 10 SCLC-Zellen an der beströmten Endothel-Oberfläche (0,4mm<sup>2</sup>).

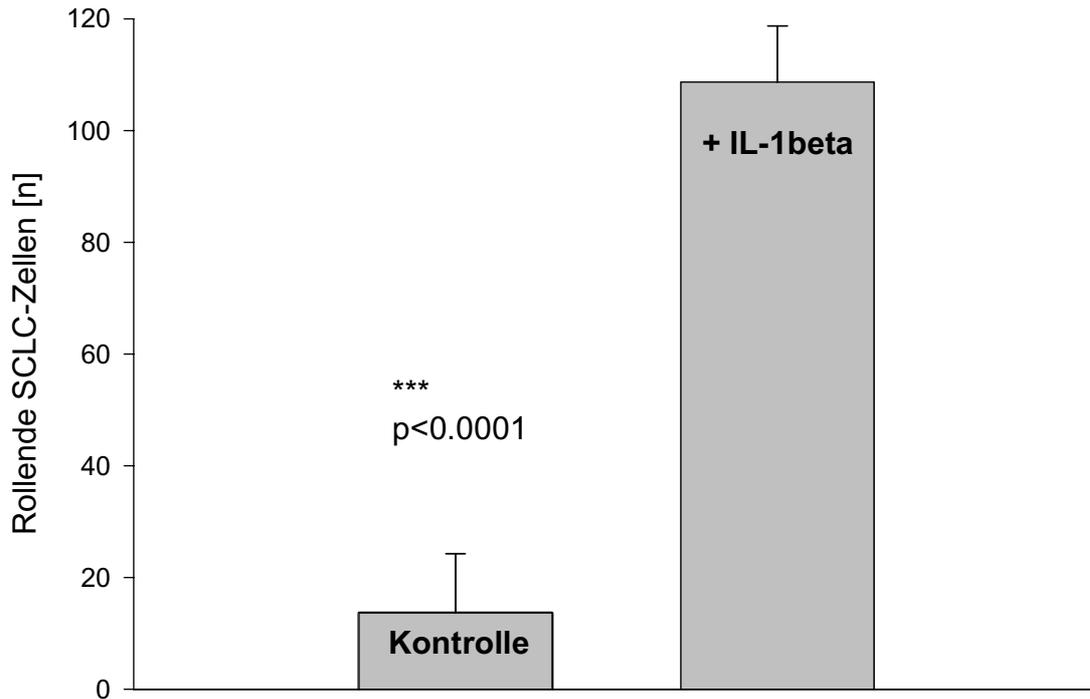


**Abb. 3.10: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer an HUVEC adhärierenden SCLC-Zelle**

Adhäsion einer SCLC-Zelle an einer Endothel-Zelle nach 4 Minuten Beströmung von Endothel mit PPP und SCLC-Zellsuspension. Neurosekretorische Granula und doppelt angeschnittener Zellkern der SCLC-Zelle sind gut zu sehen. Es ist deutlich der dichte Kontakt zwischen Endothel- und SCLC-Zelle zu erkennen.

### **3.4.2 „Rollen“ von SCLC-Zellen an IL-1 $\beta$ -stimulierten HUVEC**

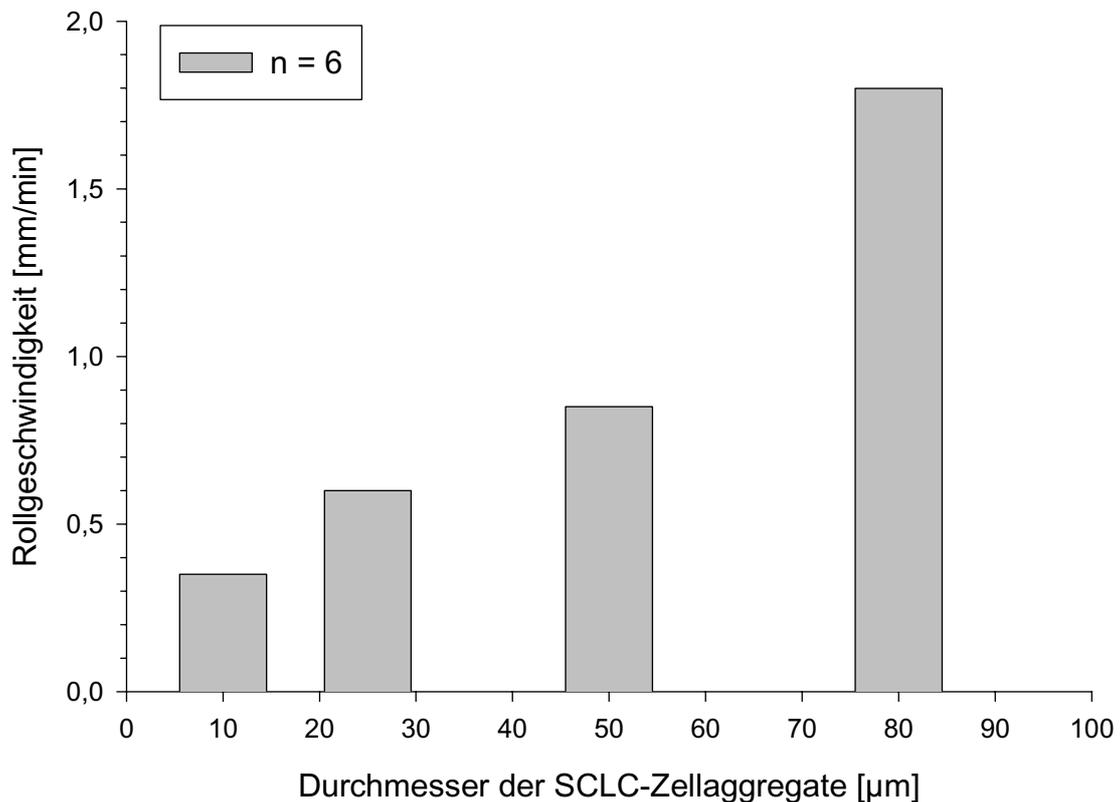
Bei diesen Versuchen wurde vor Versuchsbeginn die zu beströmende Endotheloberfläche mit dem Entzündungsmediator IL-1 $\beta$  (100pg/ml) für vier Stunden inkubiert. Anschließend wurde das stimulierte Endothel mit PPP und SCLC-Zell-Suspension beströmt. An der Endotheloberfläche kam es im Vergleich zum unstimulierten Endothel zu einer hoch signifikanten (\*\*\*,  $p > 0,0001$ ) Zunahme der Anzahl der SCLC-Zell-Aggregate, die an der Endothel-Oberfläche „rollten“ (**Abb. 3.11**).



**Abb. 3.11 Rollen von SCLC-Zellen an HUVEC +/- IL-1 $\beta$ -Inkubation**

Dargestellt ist die absolute Zahl der am Endothel rollenden SCLC-Zellen während 4 Minuten Beströmung in Abhängigkeit von der Endothel-Stimulation mit IL-1 $\beta$  (100pg/ml). Verglichen wird unstimuliertes Endothel [n=5] mit stimuliertem [n=5] Endothel. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung vom Mittelwert.

Die anströmenden SCLC-Zell-Aggregate wurden beim Rollen je nach Durchmesser aus der wandnahen Strömungsgeschwindigkeit von 85mm/min auf Geschwindigkeiten bis zu 0,3 mm/min abgebremst. Die Roll-Geschwindigkeit war direkt proportional zur Grösse der Zell-Aggregate. Die höchste Roll-Geschwindigkeit von SCLC-Zellen an der Endotheloberfläche lag bei 1,82mm/min (**Abb.3.12**).

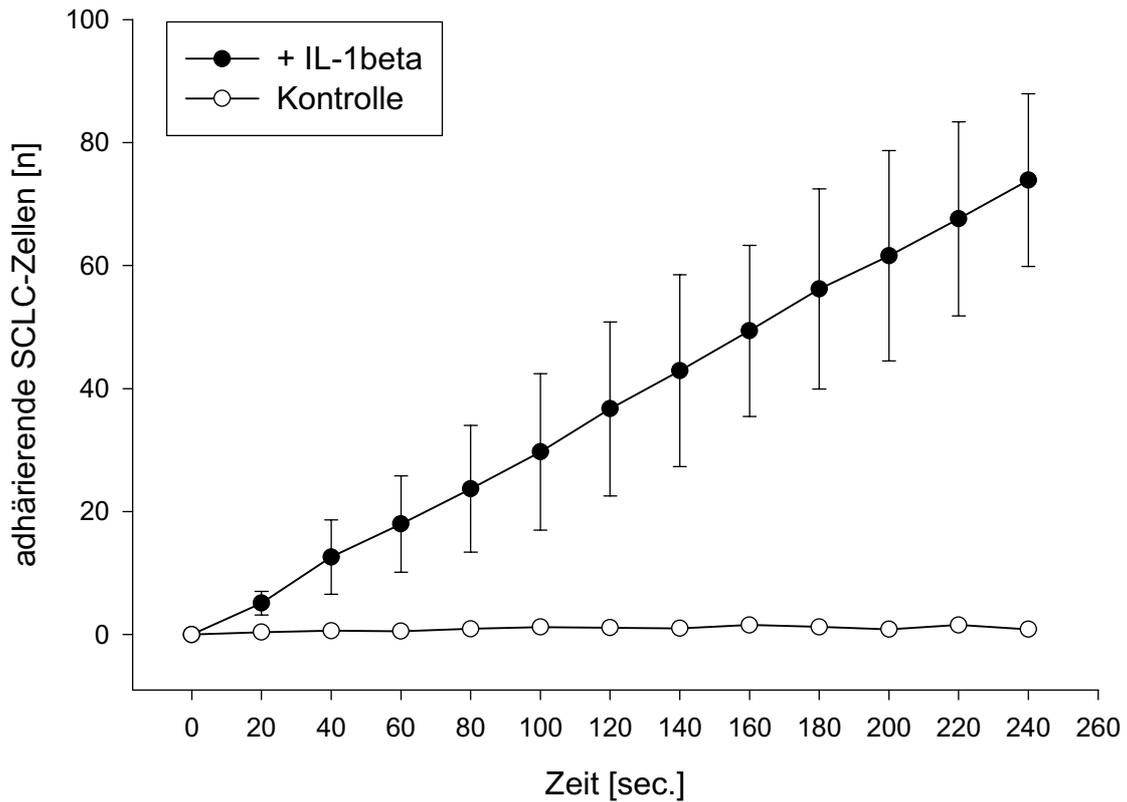


**Abb. 3.12: Roll-Geschwindigkeit der SCLC-Zell-Aggregate auf IL-1 $\beta$  inkubierten HUVEC**

Darstellung der Abhängigkeit der Rollgeschwindigkeit der SCLC-Zell-Aggregate am Endothel in von deren Durchmesser. Mit zunehmendem Durchmesser der Aggregate stieg auch die Rollgeschwindigkeit der Aggregate an der mit IL-1 $\beta$  stimulierten Endotheloberfläche.

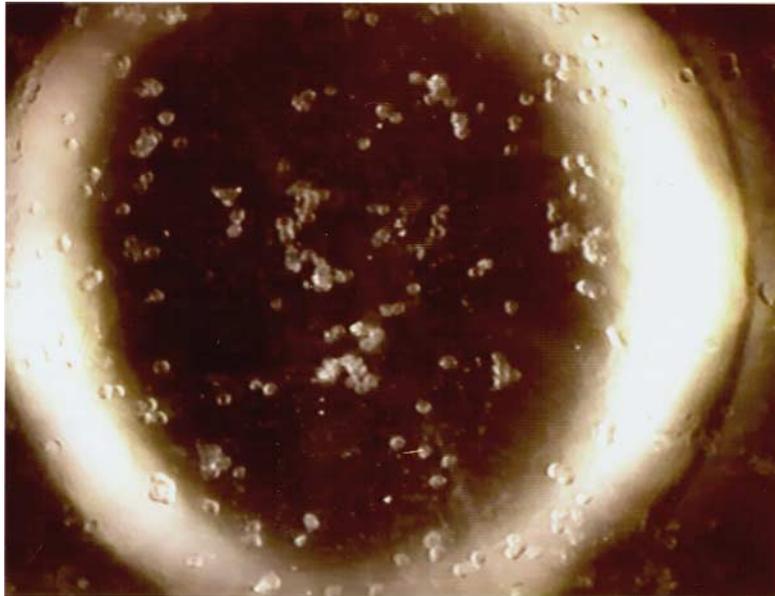
### 3.4.3 Adhäsion von SCLC-Zellen an IL-1 $\beta$ -stimulierten HUVEC

Um die Adhäsion der SCLC-Zellen an Endothel untersuchen zu können wurde versucht die Zahl einzeln anströmender SCLC-Zellen zu steigern und die Zahl anströmender Zell-Aggregate zu verringern. Dazu wurden die Tumorzellen nicht wie bisher über einen separaten Zulauf dem Plasma zugeführt sondern vor Versuchsbeginn zusammen mit dem PPP in eine Perfusorspritze gegeben (siehe Kap.2.1.2). Durch die Suspension der SCLC-Zellen in Plasma kam es zu einer verminderten Aggregation der SCLC-Zellen untereinander, dies führte dazu, daß die SCLC-Zellen vermehrt als Einzel-Zellen auf die Endothel-Oberfläche strömten. Neben dem „Rollen“ der z.T. noch bestehenden SCLC-Zell-Aggregate zeigte sich jetzt eine grosse Zahl von - an der Endothel-Oberfläche - adhärierenden SCLC-Zellen. Es adhärten vor allem als einzelne Zellen vorliegende Tumorzellen . (*Abb. 3.13, 3.14*).



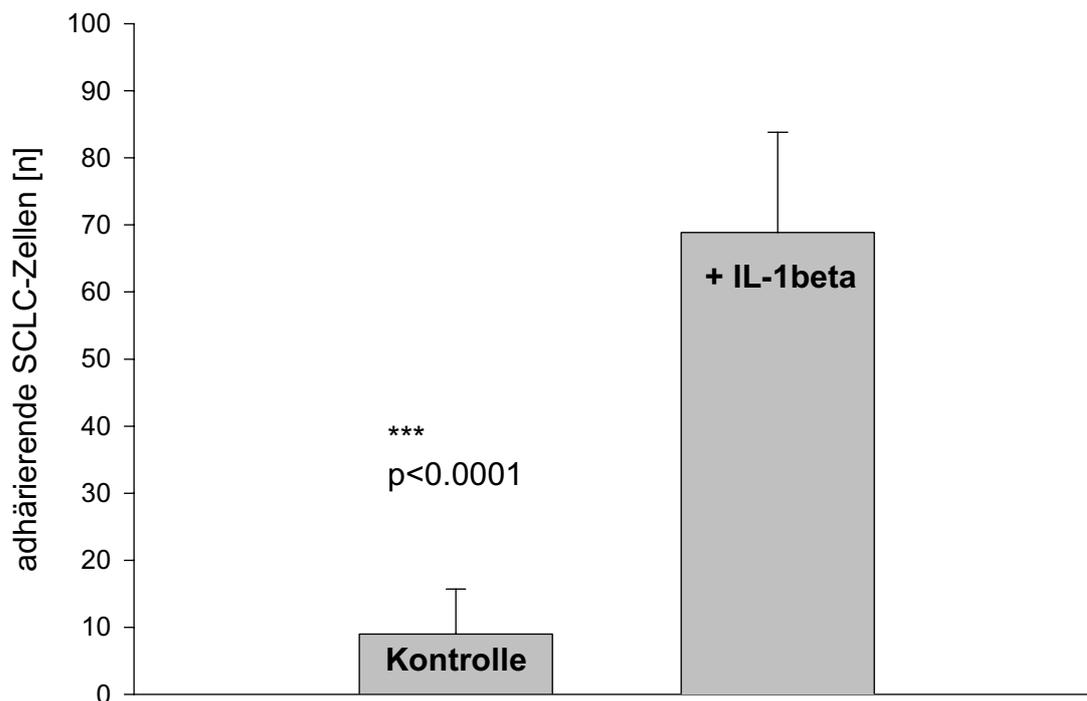
**Abb. 3.13: SCLC-Zell-Adhäsion an IL-1 $\beta$ -stimulierten HUVEC im SPAA**

Kinetik der Adhäsion von SCLC-Zellen an Endothel, das mit IL-1 $\beta$  inkubiert wurde [n=10]. Annähernd linearer Verlauf der zunehmenden SCLC-Zell-Adhäsionen an der beströmten Endothel-Oberfläche in Abhängigkeit von der Zeit. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung vom Mittelwert.



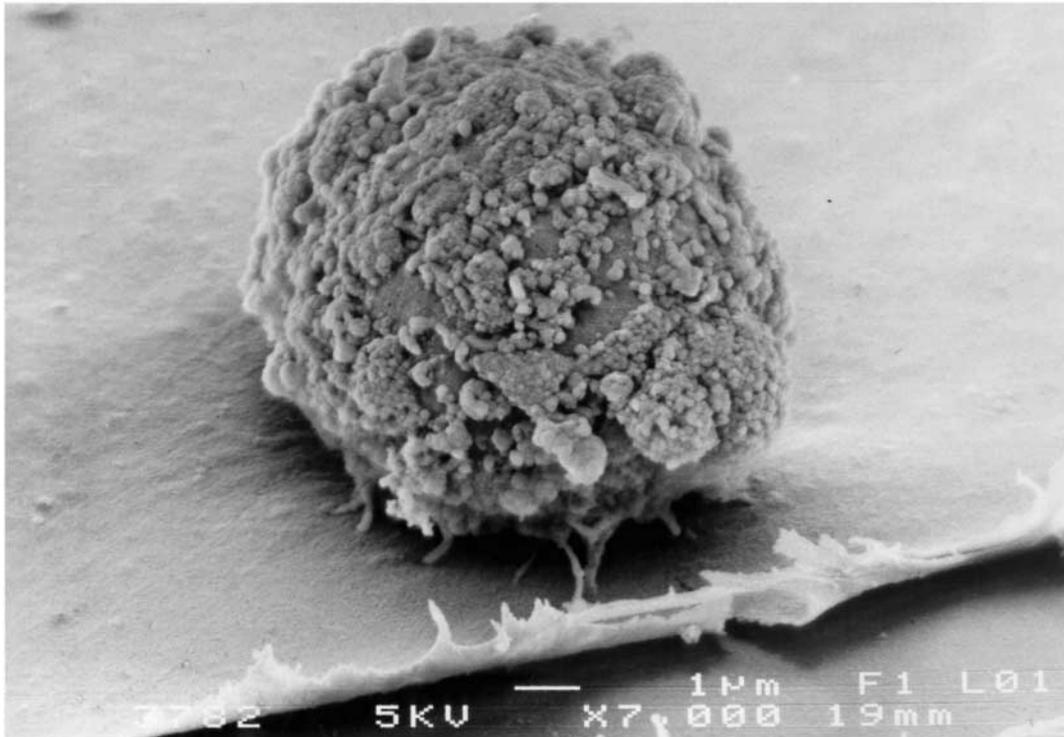
**Abb. 3.14: Video-Print der SCLC-Zell-Adhäsion an Endothel im SPAA**

Video-Print der Darstellung der Tumorzell-Adhäsion an IL-1 $\beta$ -stimuliertem Endothel im Dunkelfeldmikroskop des SPAA. Deutlich zu erkennen die runden adhärenen SCLC-Zellen.



**Abb. 3.15: SCLC-Zell-Adhäsion an HUVEC +/- IL-1 $\beta$  im SPAA**

Bei der Bestromung von IL-1 $\beta$ -stimulierten Endothel-Oberfläche mit PPP und SCLC-Zell-Suspension [n=12] für 4 Minuten adhärten bis zu 85 SCLC-Zellen an der Endotheloberfläche. Bei der Bestromung von unstimulierten Endothel [n=6] adhärten maximal 18 SCLC-Zellen. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung vom Mittelwert.



**Abb. 3.16. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer adhärierenden SCLC-Zelle**

Rasterelektronenmikroskopische Darstellung einer an stimuliertem Endothel adhärierenden SCLC-Zelle. Zu sehen die prominenten Nukleoli der Endothelzellen. Die Tumorzelle zeigt eine inhomogene rauhe Membranoberfläche mit fester Verbindung zum Endothelmonolayer, der sich im unteren Bildbereich von der Unterlage gelöst hat.

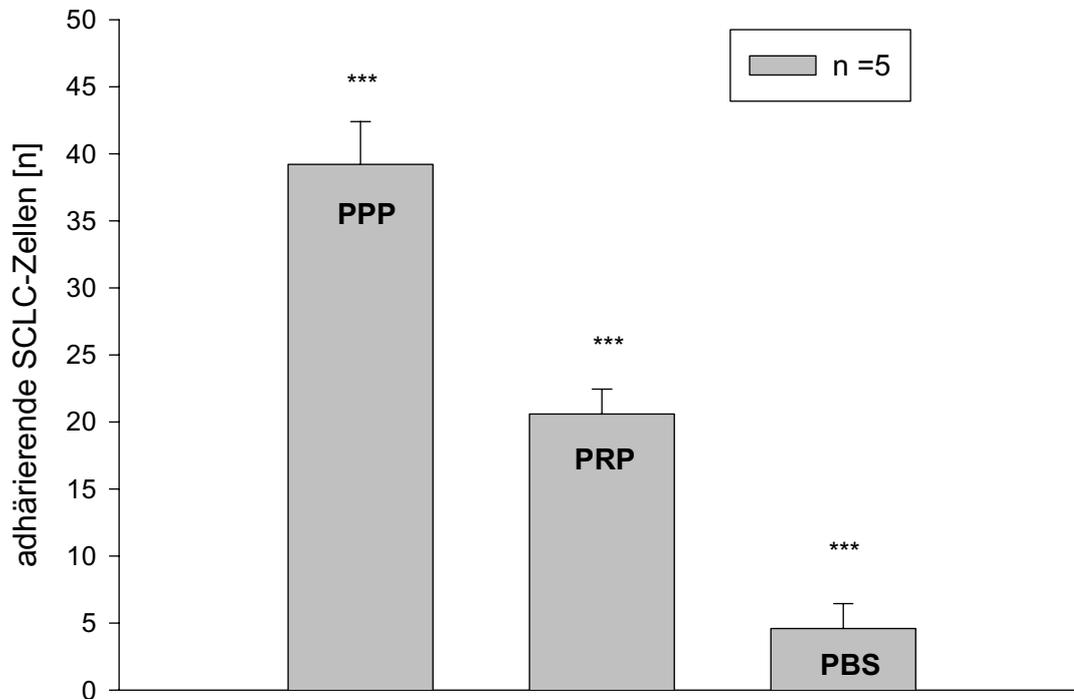
### **3.5 Adhäsion von SCLC-Zellen an verschiedenen Oberflächen in Stase**

#### **3.5.1 Adhäsion von SCLC-Zellen an immobilisiertem Fibrinogen**

SCLC-Zellen wurden zusammen mit PPP oder PBS (Verhältnis SCLC-Zellen zu Suspensionsmedium 1:3) für 60 Minuten unter Kulturbedingungen auf Glasplättchen gegeben. Nach dreimaligem Waschen wurden die, mit adhären SCLC-Zellen belegten, Glasplättchen im Phasenkontrastmikroskop quantitativ ausgewertet und fotografiert. Mit PBS als Suspensionsmedium adhärten lediglich 3-5 SCLC-Zellen, mit PPP 18-20 SCLC-Zellen auf der betrachteten Fläche von 0,4mm<sup>2</sup>.

### 3.5.2 Adhäsion von SCLC-Zellen an unstimulierten HUVEC

SCLC-Zellen wurden zusammen mit PPP, PRP oder PBS auf Endothel-Oberflächen gegeben und für 60 Minuten unter Kulturbedingungen inkubiert. Mit PBS als Suspensionsmedium adhärten lediglich 4,6 +/- 2,7 SCLC-Zellen, mit PRP 20,9 +/- 3,2 und mit PPP 38,4 +/- 4,3 SCLC-Zellen auf einer Fläche von 0,4 mm<sup>2</sup> (**Abb. 3.17**).

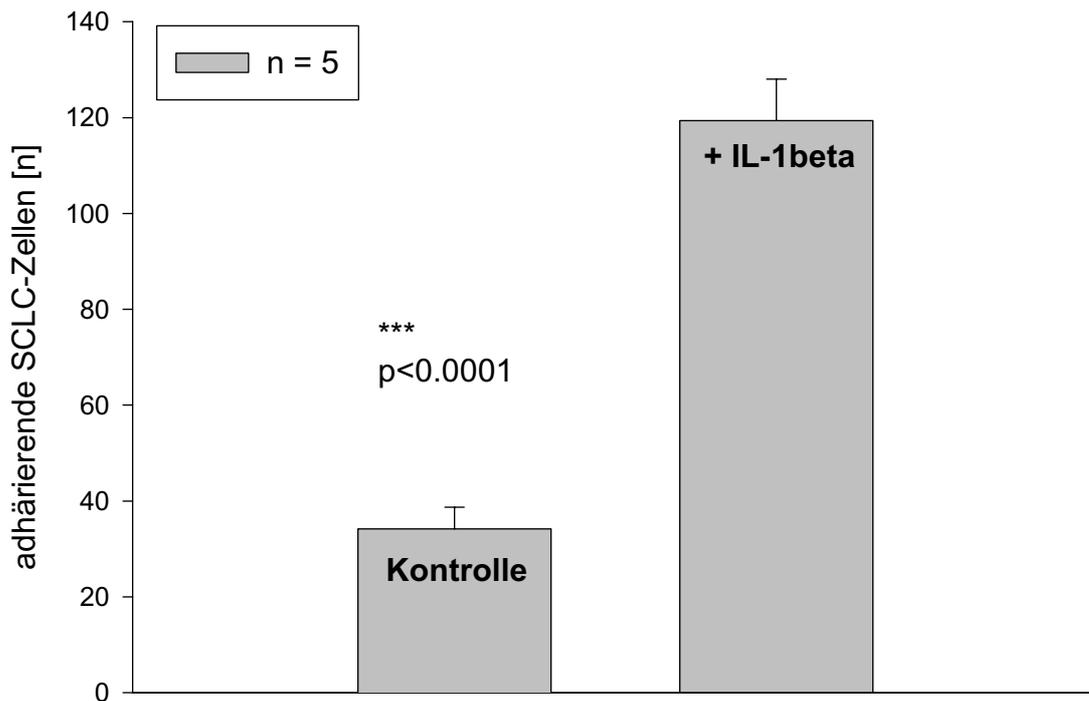


**Abb. 3.17: SCLC-Zell-Adhäsion an HUVEC mit PPP/PRP/PBS unter statischen Bedingungen**

Darstellung der Zahl adhärierender SCLC-Zellen in Abhängigkeit vom Suspensionsmedium. Nach Inkubation mit PPP/PRP/PBS bei 37°C und 5% CO<sup>2</sup> [jeweils n=5] unter statischen Bedingungen zeigt sich abhängig vom Suspensionsmedium eine deutlich differierende Zahl adhärierender SCLC-Zellen.

### 3.5.3 Adhäsion von SCLC-Zellen an stimulierten HUVEC

SCLC-Zellen wurden zusammen mit PPP im Mischungsverhältnis 1:9 auf Endothel-Oberflächen gegeben und für 60 Minuten inkubiert. Bei der Stimulation der Endothel-Oberflächen mit IL-1 $\beta$  vor Versuchsbeginn kam es wie unter Strömungsbedingungen zu einer hoch signifikanten (\*\*\*, p<0,0001) Steigerung der an der Endothel-Oberfläche adhärierenden SCLC-Zellen (**Abb. 3.18**).



**Abb. 3.18: SCLC-Zell-Adhäsion an IL-1 $\beta$ -stimulierten HUVEC unter statischen Bedingungen**

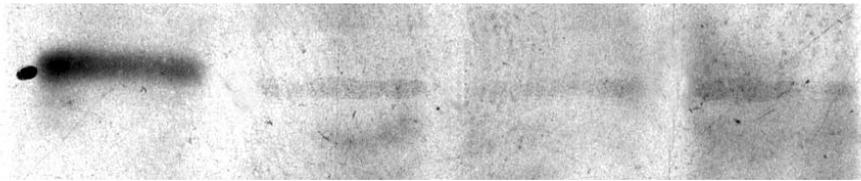
Darstellung der absoluten Zahl der am Endothel adhären den Tumorzellen nach 60 Minuten Inkubation unter statischen Bedingungen – mit [n=5] und ohne [n=5] Stimulation mit IL-1 $\beta$ . Aufgetragen sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung vom Mittelwert.

### **3.6 Oberflächen-Rezeptoren und die Adhäsion von SCLC-Zellen an HUVEC**

#### **3.6.1 Immunzytochemie/Immunoblot zur Darstellung des Integrin $\alpha_{IIb},\beta_3$**

Bei der immunzytochemischen Behandlung von SCLC-Zellen mit einem primären Antikörper gegen Integrin  $\alpha_{IIb},\beta_3$  (Maus gegen Mensch) und einem fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper (Ziege gegen Maus), zeigte sich ein deutlich fluoreszierendes Signal an der Oberfläche der SCLC-Zellen durch Fluoreszenz-Mikroskopie. Thrombozyten, deren Oberfläche wie Reininger et al. (57) zeigten eine große Dichte an dem Integrin  $\alpha_{IIb},\beta_3$  aufweisen, dienten als positive Kontrolle.

Bei der Darstellung des Membranrezeptors Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  an SCLC-Zellen mit Western-/Immunoblot war eine deutliche Bande im Bereich von 100kDa sichtbar - entsprechend der Molekülmasse des Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Die positive Kontrolle zum Nachweis von Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  mit Thrombozyten wies diese Bande ebenfalls im Bereich von 100kDa auf, allerdings mit stärkerer Markierung. Dies entspräche einer geringeren Dichte des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  an der Oberfläche von SCLC-Zellen im Vergleich zu Thrombozyten (**Abb. 3.19**).

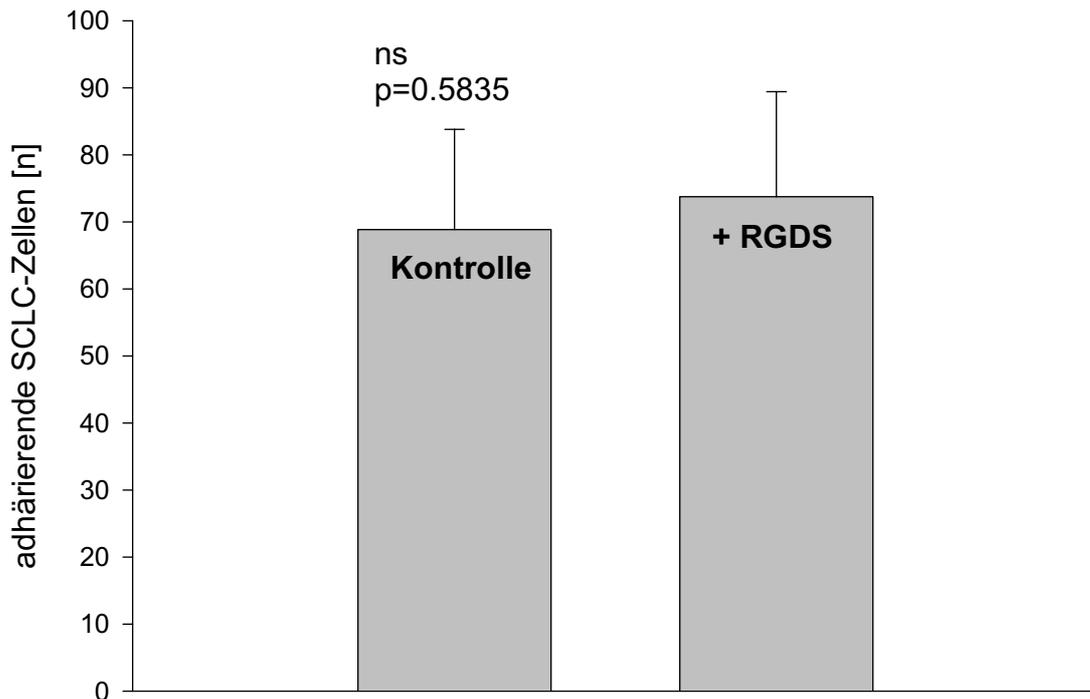


**Abb. 3.19: Immunoblot von SCLC-Zellen auf Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$**

Im Bereich von 100kDa deutlich sich darstellende Markierung bei der Kontrolle mit Thrombozyten und bei den drei SCLC-Suspensionen mit verschiedenen Proteinkonzentrationen. Das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  weist eine Proteinmasse von 100kDa auf. Immunmarkierung gegen Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  am Schnitt.

### **3.6.2 Blockade des Membranrezeptors Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ mit RGDS im SPAA**

Da der Oberflächenrezeptor Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  mit immunologischen Verfahren auf SCLC-Zellen gefunden werden konnte, wurde mit einem Tetrapeptid [Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS)], das relativ unspezifisch an Integrine bindet, der Membranrezeptor blockiert. Das Tetrapeptid wurde zehn Minuten vor Versuchsbeginn der SCLC-Zellsuspension in Plasma (PPP) zugegeben (Endkonzentration 1mM). Mit Versuchsbeginn strömte das mit RGDS inkubierte Plasma mit der Tumorzell-Suspension auf Endothel, das mit IL-1 $\beta$  stimuliert wurde. Die Adhäsion von SCLC-Zellen konnte jedoch durch die Inkubation mit dem Tetrapeptid nicht signifikant ( $p=0,5835$ ; ns) beeinflusst werden (**Abb. 3.20**).



**Abb. 3.20: SCLC-Zell-Adhäsion an stimulierten Endothelzellen mit RGDS im SPAA**

Darstellung der SCLC-Zell-Adhäsion an IL-1 $\beta$ -stimuliertem Endothel ohne Zugabe von RGDS [n=12] im Vergleich zur SCLC-Zelladhäsion mit Zugabe von RGDS [n=4] nach 4 Minuten Staupunktströmung. Es zeigt sich deutlich, daß die Blockade des Membranrezeptors Integrin  $\alpha_{11b},\beta_3$  durch RGDS nicht zu einer Verminderung der SCLC-Zell-Adhäsion am Endothel führte. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung vom Mittelwert.

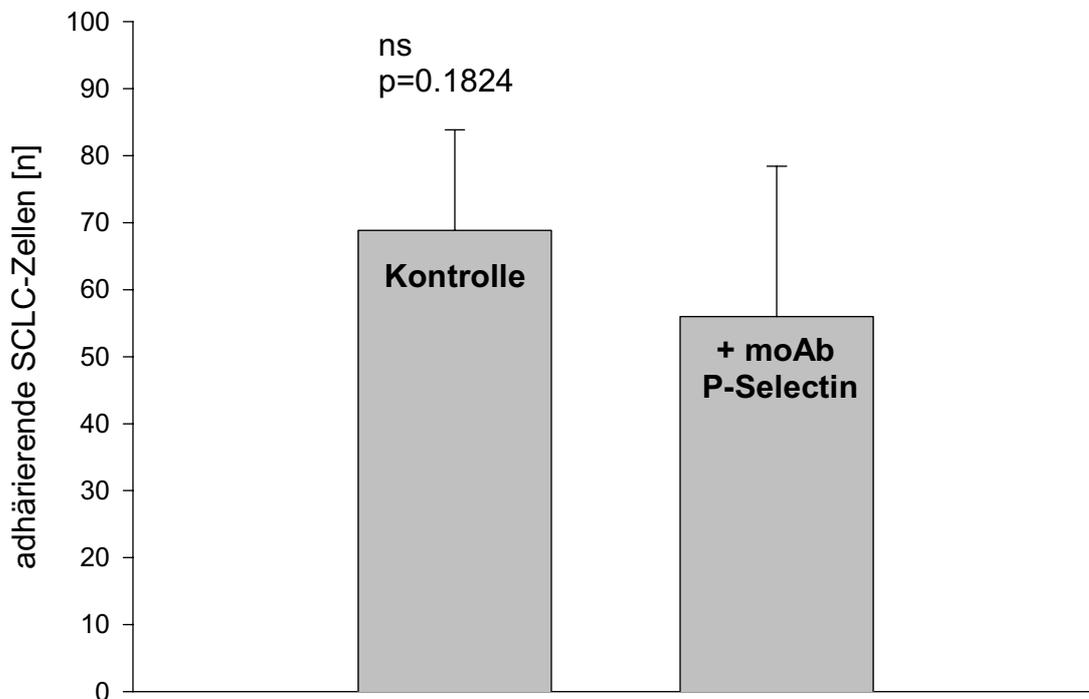
### 3.6.3 Immunzytochemie zur Darstellung von P-Selektin auf HUVEC

Bei der immunzytochemischen Behandlung von humanen Endothelzellen mit einem primären Antikörper (Maus gegen Mensch) gegen P-Selektin (Padgem, CD 62P) und einem gold-konjugierten sekundären Antikörper (Ziege gegen Maus), zeigte sich ein deutliches Signal an der Oberfläche der Endothelzellen im Phasenkontrastmikroskop. Das Endothel war zuvor - wie bei Strömungsversuchen - mit IL-1 $\beta$  stimuliert worden um die Expression von P-Selektin hochzuregulieren.

### 3.6.4 Spezifische Blockade von P-Selektin an HUVEC im SPAA

Da es bei der Stimulation von Endothelzellen zu einer Hochregulierung der Expression von P-Selektin kommt wurde versucht die Adhäsion von SCLC-Zellen auf IL-1 $\beta$ -stimuliertem Endothel durch die Blockade von P-Selektin mit einem monoklonalen Antikörper (CD62P) zu verhindern. Vor Beströmung des stimulierten Endothels mit Plasma und SCLC-Zellsuspension

wurde das Endothel mit einem monoklonalen Antikörper gegen P-Selektin inkubiert. Darauf strömte das Gemisch aus Tumorzellen und plättchenarmen Plasma für vier Minuten auf die Endotheloberfläche in der Staupunktströmung (SPAA). Es zeigte sich eine nicht signifikante Verringerung ( $p=0.1824$ ; ns) der Zahl adhätierender SCLC-Zellen (*Abb. 3.21*).



**Abb. 3.21: SCLC-Zelladhäsion an stimuliertem HUVEC +/- moAb gegen P-Selektin im SPAA**

Darstellung der SCLC-Adhäsion an IL-1 $\beta$ -stimuliertem Endothel [n=12] ohne und mit zusätzlicher Inkubation des Endothels mit einem monoklonalen Antikörper gegen P-Selektin [n=5]. Es zeigt sich eine nicht signifikante Reduzierung der SCLC-Zell-Adhäsion an Endothel. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung vom Mittelwert.

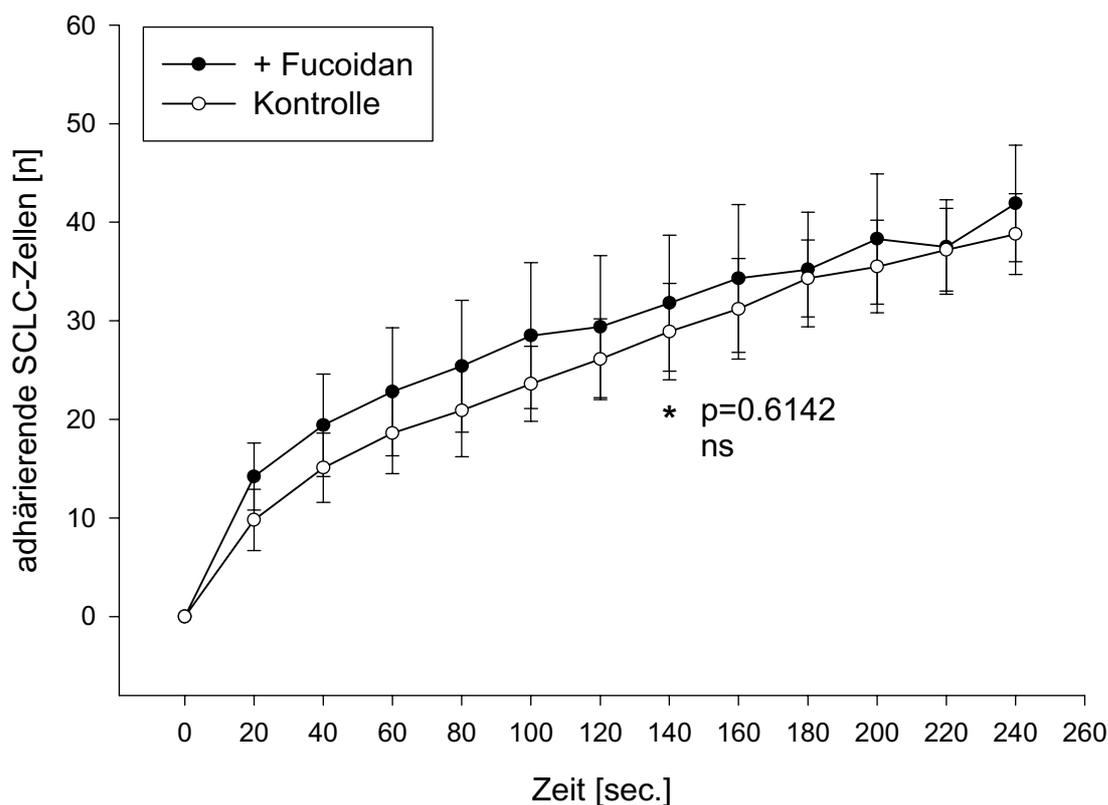
### 3.6.5 Spezifische Blockade von P-Selektin an HUVEC in Stase

Neben der Blockade von P-Selektin am Endothel unter Strömungsbedingungen im SPAA wurde P-Selektin am Endothel unter statischen Versuchsbedingungen geblockt. Die konfluenten Endothelmonolayer wurden vor Versuchsbeginn mit einem monoklonalen Antikörper gegen P-Selektin (Padgem, CD 62P) inkubiert. Dann wurde das Plasma und die SCLC-Zellsuspension auf das Endothel gegeben und für 60 Minuten bei Kulturbedingungen inkubiert.

Anschließend wurde die Belegung des Endothels mit adhärenen SCLC-Zellen auf einer Fläche von 0,4 mm<sup>2</sup> im Phasenkontrastmikroskop quantitativ ausgewertet. Es zeigte sich kein Unterschied in der Zahl der adhärenen SCLC-Zellen, zwischen unbehandeltem Endothel und Endothel, das mit dem Antikörper gegen P-Selektin behandelt wurde.

### 3.6.6 Unspezifische Blockade der Selektine an HUVEC im SPAA

Um neben der spezifischen Blockade von P-Selektin, weitere Selektine als Rezeptoren für eine SCLC-Zelladhäsion an Endothel auszuschliessen, wurde unter Strömungsbedingungen Endothel mit einem Polysaccharid (Fucoïdan) zur unspezifischen Blockade der Selektine inkubiert. Das Endothel wurde zuerst mit IL-1 $\beta$  stimuliert und daraufhin mit Fucoïdan inkubiert. Die Behandlung mit Fucoïdan führte zu einer nicht signifikanten ( $p=0,6142$ ; ns) Veränderung der Tumorzelladhäsion (*Abb. 3.22*).

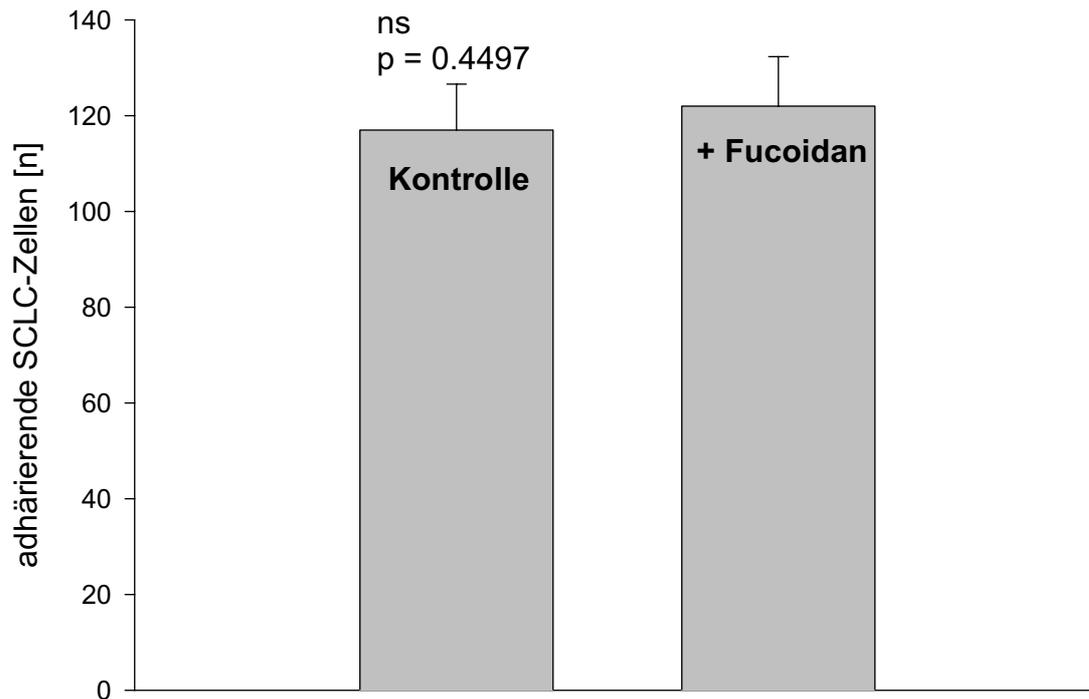


**Abb. 3.22: SCLC- Zell-Adhäsion an IL-1 $\beta$ -stimulierten HUVEC +/- Fucoïdan im SPAA**

Kinetik der SCLC-Zelladhäsion an stimuliertem Endothel mit [n = 5] und ohne [n = 6] Inkubation mit Fucoïdan im Strömungsexperiment. Aufgetragen ist die absolute Zahl adhärenender Tumorzellen in Abhängigkeit von der Zeit. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung vom Mittelwert.

### 3.6.7 Unspezifische Blockade der Selektine an HUVEC in Stase

Unter statischen Versuchsbedingungen zeigte sich nach Inkubation der konfluenten Endothelmonolayer mit Tumorzell-Plasma-Suspension für 60 Minuten ein nicht signifikanter (ns,  $p=0,4497$ ) Unterschied der SCLC-Zell-Adhäsion unter Fucoïdan-Einsatz. So adhärten 119 +/- 9 SCLC-Zellen bei Inkubation des Endothels mit Fucoïdan [ $n = 5$ ] und 115 +/-8 ohne Fucoïdan-Zusatz [ $n = 6$ ] (*Abb. 3.23*).



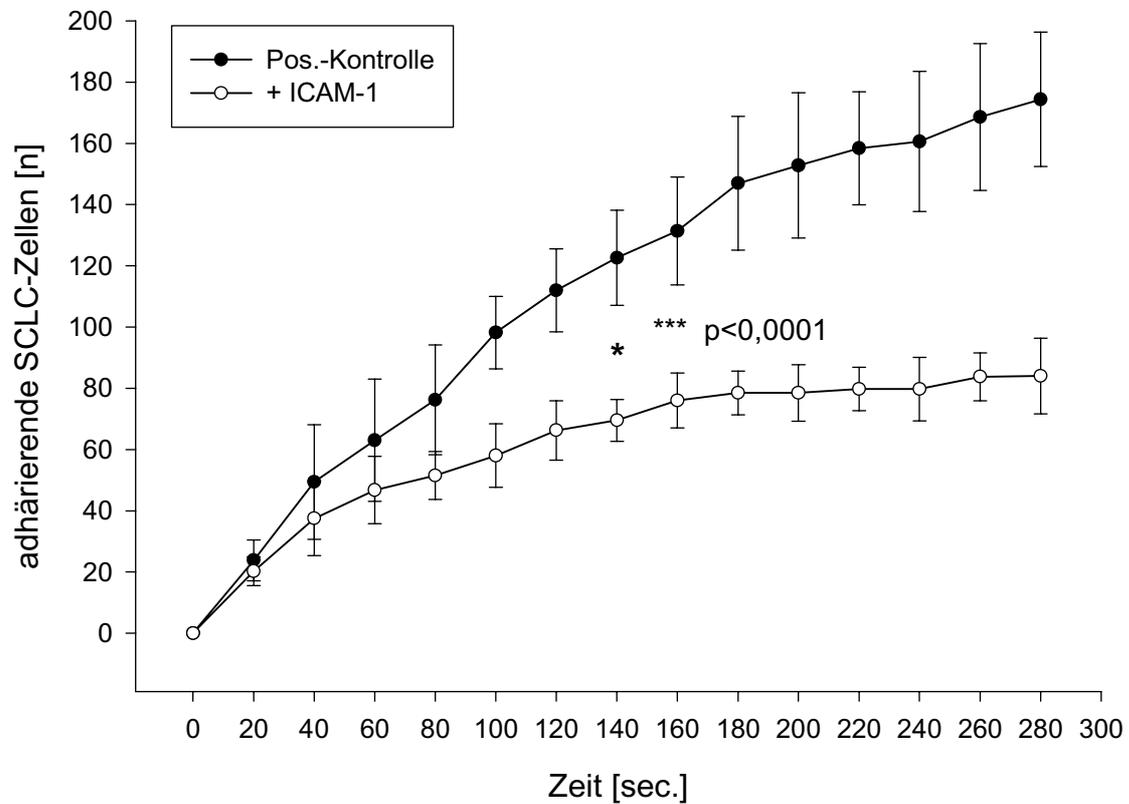
**Abb. 3.23: SCLC-Zelladhäsion an IL-1 $\beta$ -stimulierten HUVEC Inkubation +/- Fucoïdan in Stase**

Dargestellt ist die absolute Zahl der am stimulierten Endothel-Monolayer adhärierenden Tumorzellen nach 60 Minuten mit und ohne Behandlung des Endothels mit Fucoïdan. Es zeigt sich eine nicht signifikante Veränderung der SCLC-Zelladhäsion. Aufgetragen sind die Mittelwerte und die Standardabweichung vom Mittelwert.

### 3.6.8 Blockade von ICAM-1 an HUVEC im SPAA

Um die Rolle von ICAM-1 als möglichen Rezeptor für eine SCLC-Zelladhäsion an Endothel abzuklären, wurde unter Strömungsbedingungen Endothel mit einem monoklonalen Antikörper (Maus gegen Mensch) gegen den Oberflächenrezeptor ICAM-1 inkubiert. Das Endothel wurde vor Behandlung mit dem moAb gegen ICAM-1 mit IL-1 $\beta$  stimuliert.

Dann strömten in PPP suspendierte SCLC-Zellen auf die Endothel-Monolayer im SPAA. Es zeigte sich eine hoch signifikante (\*\*\*,  $p < 0,0001$ ) Reduzierung der Tumorzelladhäsion am Endothel. (Abb. 3.24)



**Abb. 3.24: SCLC-Zelladhäsion an HUVEC +/- moAb gegen ICAM-1 im Strömungsexperiment**

Kinetik der SCLC-Zelladhäsion [ $n = 5$ ] an – mit IL-1 $\beta$  stimulierten Endothel-Monolayer – mit und ohne Inkubation des Endothels mit einem moAb gegen ICAM-1. Hoch signifikante Reduzierung der Tumorzelladhäsion durch Inkubation der HUVECs mit einem moAb gegen ICAM-1. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung vom Mittelwert.

## **4. Diskussion**

Die vorliegende Studie hatte drei Untersuchungsschwerpunkte, die in folgender Reihenfolge diskutiert werden.

1. Als erstes sollte der Mechanismus der Thrombozyten-Aktivierung durch Tumorzellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC) im Aggregometer dargelegt werden. Hier konnte gezeigt werden, daß ADP als Induktor der Tumorzell-induzierten Plättchen-Aktivierung (TCIPA) im Aggregometer fungierte.
2. Im zweiten Teil der Studie stand der Mechanismus der Tumorzell-induzierten Plättchen-Adhäsion an immobilisiertem Fibrinogen und humanem Endothel unter Strömungsbedingungen im Vordergrund. Es stellte sich heraus, daß auch diese durch ADP induziert war.
3. Im letzten Teil der Studie stand die Frage nach dem Mechanismus der Tumorzell-Adhäsion an Endothel unter statischen und fluiddynamischen Bedingungen im Vordergrund. Hier konnten auf Seite der Endothelzellen verschiedene Oberflächenrezeptoren als Vermittler der Tumorzell-Adhäsion ausgeschlossen werden. Der Oberflächenrezeptor ICAM-1 zeigte eine Vermittlung der Tumorzell-Adhäsion am Endothel.

### **4.1 Tumorzell-induzierte Plättchen-Aggregation (TCIP-Aggregation)**

Im ersten Teil unserer Studie stand die Aktivierung des Gerinnungssystems bei Krebspatienten als Ursache für thrombembolische Komplikation im Vordergrund. Der Mechanismus der, vor allem bei Patienten mit Lungentumoren entstehenden, Thrombosen und Embolien sollte in vitro in unserem Versuchsaufbau genauer betrachtet werden. Viele Studien befassen sich mit den Mechanismen der sogenannten Tumorzell-induzierte Plättchenaktivierung (TCIPA), wobei sich herausstellte daß die Plättchen-Aktivierung abhängig vom histologischen Typs des Tumors unterschiedlich abläuft. Wie es zu einer systemischen Gerinnungsaktivierung bei den verschiedenen Tumorzellen kommt ist für viele Neoplasien noch ungeklärt.

Tumorzellen aktivieren und interagieren mit Blutplättchen direkt durch rezeptor-vermittelte Verbindung, durch vom Tumor abstammende Plasmamembran-Vesikel oder durch Sekretion potenter molekularer Stimulatoren (18). Stimulatoren wie ADP (2)(6) oder Thrombin-Sekretion (7) durch Tumorzellen und Sekretion von Proteinase mit plättchen-aktivierenden Eigenschaften wurden beschrieben (29).

Wenige Studien existieren, welche den Mechanismus der Plättchenaktivierung durch Lungen-Tumoren genauer untersuchen. So steht im ersten Teil dieser Studie die Plättchenaktivierung durch Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC) im Vordergrund.

In unserer Studie zeigte sich bei den Versuchen zur TCIP-Aggregation durch Zellen des SCLC (H69 und H24+) im Aggregometer eine starke Aktivierung und Aggregation der Blutplättchen. Direkt nach Zugabe der SCLC-Zellsuspension zum PRP kam es zu einem relativ starkem Abfall der Transmission. Dieser Abfall konnte - wie unter 2.4.2 beschrieben - darauf zurückgeführt werden, daß SCLC-Zellen als korpuskuläre Bestandteile eine verstärkte Lichtstreuung bedingen, welche sich zum Transmissionsabfall durch den shape-change der Thrombozyten addiert. Um eine adäquate quantitative Betrachtung der Plättchen-Aggregation zu gewährleisten wurde deswegen der Nullpunkt der Transmission auf den Punkt des maximalen Transmissionsabfalls verschoben.

Die Kinetik der Thrombozyten-Aggregation zeigte einen, von der Kinetik der Plättchen-Aggregation bei ADP-Stimulation, abweichenden Verlauf; dabei bestand keine Latenzzeit bis zur Aktivierung der Thrombozytenaggregation. Dies bestätigte die Ergebnisse von Heinmöller et al. (26), sie untersuchten ebenfalls die durch Zellen des SCLC (H69 und H80M1) induzierte Thrombozyten-Aggregation in einem Zwei-Kammer-Aggregometer (APACT) unter gleichen Versuchsbedingungen wie in unserer Studie. Die Konzentration der Tumorzellen lag allerdings mit dem Faktor  $10^2$  über unseren Konzentrationen. Sie beschrieben eine starke Thrombozytenaggregation durch SCLC-Zellen ohne Latenzzeit ganz im Gegensatz zur TCIPA durch NSCLC-Zellen (non small cell lung carcinoma). Auch Chiang et al. beschrieben für die TCIPA durch Zelllinien von Mamma- und Colon-Karzinomen eine Latenzphase von 30 Sekunden bis 9 Minuten (11;12). Im Vergleich zu diesen Ergebnissen wurde in unserer Studie relativ früh das Aggregationsmaximum erreicht um danach wieder um ein Drittel der Maximal-Aggregation zurückzufallen. Dieses Aggregationslevel wurde dann bis zum Ende des Versuches weitestgehend gehalten. Eine erneuter Anstieg der Plättchen-Aggregation - in Form einer zweiten Aggregationskurve - wie von Heinmöller et al. bei der TCIPA durch

SCLC-Zellen beschrieben konnte in unseren Versuchen nicht beobachtet werden (27). Dies könnte seine Ursache darin haben, daß Heinmöller et al. andere Zelllinien verwendeten und es wohlmöglich in dem von ihnen angewendeten Aggregometer zu einer mechanischen Zellschädigung kommen könnte.

Bei der lichtmikroskopischen Kontrolle der Plasmasuspension im Verlauf der TCIPA zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein enger Zell-Zell-Kontakt zwischen Thrombozyten und Tumorzellen wie er von Boukerche et al., Grossi et al. und Chopra (6) (14) (25) für unterschiedliche Tumorzellen beschrieben wurde. So berichteten auch Heinmöller et al. (27) bei der TCIPA durch SCLC von einem zu Beginn des Transmissions-Anstiegs deutlichen Zellkontakt zwischen Tumorzellen und Plättchen im Gegensatz zur TCIPA durch Zellen vom Pankreas-Karzinom (26), bei der nur vereinzelt direkter Zellkontakt beobachtet werden konnte.

Unmittelbar zu Beginn unserer Versuche lagen Thrombozyten überwiegend einzeln vor und SCLC-Zellen meist als kleine Aggregate. Mit dem Anstieg der Transmission kam es zu einer schnell ansteigenden Aggregation von Thrombozyten die nach Durchlaufen des Aggregationsmaximum wieder langsam desaggregierten. Gegenläufig zur abnehmenden Thrombozyten-Aggregation nahm die Zahl und Größe der SCLC-Zell-Aggregate zum Ende der Versuche stark zu.

Diese Beobachtungen erklären auch den Verlauf der Aggregationskurve in unseren Versuchen. Nach einem anfänglichen Transmissionsabfall durch die Streuung der SCLC-Zellen kommt es zu einem Anstieg der Transmission durch die zunehmende Aggregation der aktivierten Thrombozyten. Der dann entstehende Abfall der Transmission durch die sich steigernde Desaggregation der Thrombozyten wird durch die vermehrte Aggregation der SCLC-Zellen gegenläufig beeinflusst, sodaß sich ein nahezu gleichbleibendes Level der Lichttransmission hält (Abb. 3.1).

Der von Heinmöller et al. (27) als eine Voraussetzung für eine TCIPA durch SCLC-Zellen hypothetisierte direkte, interzelluläre, rezeptor-vermittelte, Kontakt zwischen Tumorzellen und Blutplättchen konnte für unsere Zelllinien ausgeschlossen werden.

So stellte sich die Frage nach dem Mechanismus der Plättchen-Aktivierung durch die Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms in unseren Versuchen. Um den Verdacht auf eine Stimulation der Thrombozyten durch lösliche molekulare Stimulantien unabhängig von direktem Zellkontakt zu bestätigen, untersuchten wir die Plättchen-Aggregation bei Zugabe von Tumorzell-Überstand.

Verschiedene Studien hatten gezeigt, daß neben der, Tumorzellen enthaltenden Suspension, auch der zellfreie Überstand Thrombozyten zur Aggregation aktivierte. So berichteten Oleksowicz et al. (51) von TCIP-Aggregation durch zellfreien Überstand der MCF-7 -Zellen eines Mamma-Karzinoms, Grignani et al. (24) zeigten TCIPA durch zellfreien Überstand von Melanom-Zellen und Zucchella et al. (73) sowie Heinmöller et al. (27) zeigten eine Plättchenaktivierung durch zellfreien Überstand von unterschiedlichen histologischen Typen des SCLC.

Diese Ergebnisse bestätigte auch unsere Studie, bei der zellfreier Überstand der Zellen des SCLC ein Plättchenaktivierung induzierte (Abb.3.5). Die Plättchenaggregation war jedoch um ca. 10% geringer als bei zellhaltiger Suspension. Die höhere Plättchen-Aggregation in Anwesenheit von Tumorzellen könnte auf das Freiwerden stimulierender Agentien aus den Tumorzellen während des Aggregations-Experiments zurückzuführen sein.

Eine Tumorzell-Lyse könnte durch freiwerdende, in den SCLC-Zellen gespeicherte Mediatoren wie Serotonin oder ADP, einen stimulierenden Effekt auf die Aggregation von Thrombozyten haben. Die negative Anfärbung der Tumorzellen mit Toluidinblau nach Durchlaufen des Experimentes schloss jedoch eine signifikante Lyse der Zellen in unserem Versuchssystem aus. So macht die TCIP-Aggregation durch zellfreien Überstand eine Stimulierung der Thrombozyten durch einen von den Tumorzellen sezernierten molekularen Stimulus wahrscheinlich.

In Studien wurden für die TCIPA in vitro unterschiedliche molekulare Stimuli verantwortlich gemacht. Einige beschrieben eine durch Thrombin vermittelte Thrombozytenaktivierung bei der TCIPA durch Zellen vom Mamma-Karzinom (12), vom Adeno-Karzinom der Prostata (62) und vom Pankreas-Karzinom (26), die durch Zusatz von Hirudin z.T. vollständig blockiert werden konnte.

Zucchela et al. (73) hingegen untersuchten eine Zelllinie eines kleinzelligen Lungenkarzinoms und konnten eine Tumorzell-induzierte Plättchen-Aggregation durch ADP-Produktion der SCLC-Zellen nachweisen, die durch Apyrase (ein ADP-hydrolysierendes Enzym) vollständig eliminiert wurde.

Auch Hamilton, Grignani und Ordinas beschrieben für unterschiedliche Tumor-Zelllinien eine Aktivierung der Plättchenaggregation durch ADP, die durch ADP-Scavenger (Apyrase) inhibiert wurde(52) (23). Diese Ergebnisse korrelierten mit unseren Versuchen. So konnte in der vorliegenden Studie durch die Inkubation des PRP mit ADP-Scavenger die Tumorzell-induzierte Plättchenaggregation fast vollständig blockiert werden (Abb. 3.3).

Nach Zugabe der SCLC-Zellsuspension zeigte sich anfangs ein Anstieg der Lichttransmission im Aggregometer wie nach SCLC-Zell-Zugabe ohne Scavenger-Zusatz. Dieser kurzfristige Anstieg der Plättchenaktivierung könnte durch den anfänglichen Effekt des molekularen Stimulus der Tumorzellen bedingt sein, der erst nach Entfernung des ADP durch den Scavenger unwirksam wurde. Im Gegensatz zur vollständigen Unterdrückung der Thrombozyten-Aggregation durch unser Scavenger-System bei Stimulation mit ADP-Lösung ( $5\mu\text{M}$ ) (Abb.3.4), blieb bei der Stimulation mit Tumorzellen eine gegenüber dem PPP minimal erhöhte Lichttransmission erhalten. Dies kann auf eine mit der Versuchsdauer zunehmende Aggregation der SCLC-Zellen und einer damit verbundenen Streuungs-Verminderung zurückgeführt werden, welche die durch Thrombozyten-Desaggregation verursachte Lichtstreuung überlagerte. So zeigten lichtmikroskopische Kontrollen zu Ende der Versuche vollständig desaggregierte Thrombozyten und grössere SCLC-Zell-Aggregate.

Heinmöller et al. (27) , zeigten in Ihrer Studie hingegen eine biphasischen Aggregationskurve bei der Aktivierung der Thrombozyten durch Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms. Dabei konnte durch Einsatz von Apyrase (ADP-Scavenger) die erste Aggregationsphase vollständig blockiert werden, die zweite Phase blieb unbeeinflusst. Hirudin aber blockte die zweite Aggregationskurve und ließ die erste unbeeinflusst. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen, welche die Hypothese artikulieren, daß Thrombin, durch Tumorzellen aktiviert, die Plättchenaggregation induziert und ADP als zusätzlicher Plättchen-aktivierender Mechanismus fungiert, zeigten unsere Ergebnisse eine Induktion der Thrombozyten-Aggregation ausschließlich durch ADP.

Das im Vergleich zur Plättchen-Aktivierung durch 5µmolares ADP deutlich geringere Aggregationsmaximum unter Tumorzell-Stimulation und die auftretende postmaximale Desaggregation der Thrombozyten, ließen einen niedriger-molekularen ADP-Stimulus für die Plättchenaktivierung durch SCLC-Zellen vermuten. Die Aggregationskurven mit ADP-Stimuli der Konzentration 1- und 0,5µM (Abb.3.2) bestätigten diese Vermutung.

So zeigte der Verlauf der Thrombozytenaggregation nach 1µmolarem ADP-Stimulus einen schnellen Transmissionsanstieg auf ein Maximum von ca. 50% im Gegensatz zu nahezu 90% nach 5µmolarem ADP-Stimulus. Nach Durchlaufen des Aggregationsmaximums konnte ein langsam progredierender Transmissionsabfall beobachtet werden, fast dem Verlauf der Transmission bei SCLC-Zell-Stimulation entsprechend.

Bei 0,5 µmolarem Stimulus wurde nur ein Transmissionsmaximum von unter 20% erreicht, dem ein sofortiger Transmissionsabfall auf nahezu 0% folgte. Der Vergleich des Aggregations-Verlaufs unter 1- und 0,5µmolaren ADP-Stimulus mit dem unter SCLC-Zell Stimulation legte nahe, daß es sich bei der durch die Tumorzellen bedingten, ADP-induzierten, Plättchenstimulation um einen Stimulus in der Größenordnung zwischen 0,5 und 1µmolar handelt. Diese Ergebnisse korrelierten mit den Ergebnissen anderer Studien zur TCIPA durch ADP. Diese Studien analysierten zusätzlich die Konzentration des ADP-Gehalts in zellfreiem Überstand der verschiedenen Tumorzellen durch HPLC (High Pressure Liquid Chromatography). Oleksowicz et al. beschrieben eine lineare Korrelation zwischen Aggregationsmaximum und der ADP-Endkonzentration im Bereich zwischen 0,1- und 1,0µmolar (50) für die TCIPA durch Zellen eines Mamma-Karzinoms.

Grignani et al. identifizierten eine Aggregations-Konzentration für ADP von 1 bis 2 µMol/l im zellfreien Überstand von Melanom-Zellen und Zellen eines Harnwegs-Karzinom (23). Zucchella et al. (73), die als einzige ebenfalls die SCLC-induzierte Thrombozyten-Aggregation durch ADP quantifizierten beschrieben eine ADP-Konzentration im zellfreien Überstand von 0,5 - 1,0 µMol/l.

Im ersten Abschnitt unserer Studie zeigten wir, daß die verwendeten Zelllinien eines kleinzelligen Lungenkarzinoms Blutplättchen in vitro über freigesetztes ADP zur Aggregation aktivieren. Aufgrund der Vergleiche mit Aggregationskurven nach Zugabe von unterschiedlich konzentriertem ADP war anzunehmen, daß in unseren Zellsuspensionen mit der durchschnittlichen Zelldichte von 3.000 +/- 280 Tumorzellen/ml die ADP-Konzentration

zwischen 0,5 und 1,0  $\mu\text{Mol/l}$  liegen dürfte. Der zellfreie Überstand der Zelllinien induzierte ebenfalls eine Thrombozyten-Aggregation. Die SCLC-Zell induzierte Plättchen-Aggregation konnte mit ADP-Scavenger vollständig inhibiert werden. Eine direkte, rezeptorvermittelte Zell-Zell Interaktion - wie von anderen Autoren postuliert - ist somit höchst unwahrscheinlich. Diese Ergebnisse machen einen möglichen Mechanismus der Entstehung von Thrombembolien durch Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms deutlich. Da thrombembolische Komplikationen die zweithäufigste Todesursache bei Patienten mit SCLC darstellen, könnte der Einsatz von geeigneten Substanzen zur Inhibition der ADP-induzierten Plättchen-Aggregation die Mortalität dieser Patienten reduzieren. Für die Entstehung thrombembolischer Komplikationen beim SCLC ist auch die plasmatische Komponente des Hämostasesystems von Bedeutung. Zacharski et al. (72) hatten zum Beispiel durch Hemmung der plasmatischen Gerinnung mit adjuvanter Warfarin-Therapie bereits die Überlebensrate bei Patienten mit einem kleinzelligen Lungenkarzinom signifikant gesteigert.

#### **4.2 Tumorzell-induzierte Plättchen-Adhäsion (TCIP-Adhäsion) und Tumorzell-Plättchen-Interaktion unter Stase und Flow**

Für die Entstehung von Abscheidungsthromben in intakten und geschädigten Gefäßen ist die primäre Adhäsion von Thrombozyten erforderlich. An diese adhärierenden Thrombozyten lagern sich dann in einem Aggregations-Prozess weitere Thrombozyten an und bilden zusammen mit Fibrin einen Thrombus. Um diese Thrombozyten-Adhäsion als Grundlage der Thrombus-Entstehung in Zusammenhang mit Zellen des SCLC genauer zu betrachten wurde in diesem Teil der Studie die Tumor-Zell induzierte Thrombozyten-Adhäsion an humanem Endothel und immobilisiertem Fibrinogen unter Stase und Strömungs-Bedingungen genauer untersucht. Bei den Oberflächen mit immobilisiertem Fibrinogen handelte es sich um gewaschene Glasplättchen, die mit Plasma beströmt wurden. Dabei adsorbiert durch die Bestromung der Glasoberfläche mit Plasmabestandteilen, wie im Kapitel 2.1.1 beschrieben Fibrinogen an der Glasoberfläche. So entsteht wie Reininger et al. (56) zeigten eine homogene Fläche von immobilisiertem Fibrinogen.

Die bei Lungenkrebs-Patienten sehr häufig auftretenden Gerinnungsstörungen in Form von Thrombophlebitiden und Abscheidungsthromben, die vor allem am Endothel von Aufzweigungen im Gefäßbett entstehen, konnten in unserem Strömungsmodell unter physiologischen Strömungsbedingungen *in vitro* experimentell untersucht und quantitativ ausgewertet werden.

Des Weiteren untersuchten wir ob es bei der durch Tumorzellen induzierten Adhäsion von Thrombozyten an Endothel zu einem direkten Plättchen-Tumorzell-Kontakt kommt und inwieweit die Thrombozyten-Adhäsion die Tumorzell-Adhäsion am Endothel und immobilisiertem Fibrinogen unterstützt.

Neben den zahlreich existierenden Studien zur Tumorzell-induzierten Thrombozyten-Aktivierung im Aggregometer, gibt es nur wenige Studien die sich mit der Tumorzell-induzierten Plättchen-Adhäsion an humanem Endothel unter Strömungsbedingungen befassen. Im Vordergrund der Forschung zur Tumorzell-induzierten Plättchen-Adhäsion an Endothel stehen Versuche unter statischen Bedingungen. Wobei der Schwerpunkt der Betrachtungen auf die Untersuchung der Förderung der Tumorzell-Adhäsion durch Plättchen-Adhäsion gelegt wird. Die Plättchen-Adhäsion an Endothel und an auf Glas immobilisiertem Fibrinogen, als Voraussetzung für die Entstehung thrombembolischer Komplikationen, wird in keiner Studie explizit betrachtet.

#### **4.2.1 TCIP-Adhäsion und Tumorzell-Plättchen-Interaktion unter Stase**

Viele der Studien, die sich mit der Stimulierung von Thrombozyten in Zusammenhang mit Tumor-Metastasierung auseinandersetzen berichten von einer Promoter-Funktion der Thrombozyten bei der Tumorzell-Adhäsion an Endothel. Honn et al. (29) beschrieben bei statischen Versuchen mit Zellen eines amelanotischen Melanoms die Vermittlung der Tumorzell-Adhäsion am Endothel durch vorausgehende Plättchen-Adhäsion. Auch die Autoren Menter et al (46), Helland et al (28) und Abecassis et al. (1) zeigten eine direkte Interaktion zwischen Tumorzellen und Plättchen unter statischen Versuchsbedingungen - ebenfalls die Thrombozyten-Adhäsion als Vermittlung der Tumorzell-Adhäsion an Endothel hervorhebend. Stone et al. (61) die, wie in unserer Studie, mit Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms experimentierten stellten eine direkte Bindung von Plättchen an, durch SCLC-Zellen exprimiertes, P-Selektin in rosettenartiger Anordnung fest. Anschließend adhärten die Tumorzellen über die gebundenen Thrombozyten am Endothel .

In unserer Studie konnten diese Ergebnisse keineswegs bestätigt werden. So zeigte sich bei der Untersuchung der Thrombozyten-Adhäsion an immobilisiertem Fibrinogen und Endothel unter statischen Bedingungen eine geringe Thrombozyten-Adhäsion. Der Zusatz von Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms konnte diese basale Adhäsion-Rate nicht steigern. Auch konnte kein direkter Kontakt zwischen Tumorzellen und Thrombozyten festgestellt werden. SCLC-Zellen adhärten ohne direkten Kontakt mit den Plättchen einzugehen.

So unterstützten die Thrombozyten nicht die SCLC-Zelladhäsion an immobilisiertem Fibrinogen und Endothel vielmehr kam es unter Plättchen-Zusatz zu einer geringeren Tumorzell-Adhäsion als mit plättchenfreiem Plasma. Der Zusatz von ADP-Scavenger hatte keinen Einfluß auf die Thrombozytenadhäsion.

Die Ergebnisse machen deutlich, daß die Thrombozyten-Adhäsion an Endothel und immobilisiertem Fibrinogen unter statischen Versuchsbedingungen nicht durch Zellen des SCLC beeinflußt wird. Thrombozyten konnten nicht die Adhäsion von SCLC-Zellen an den verschiedenen Oberflächen steigern. Vielmehr zeigte sich eine Reduktion der SCLC-Adhäsion bei Zusatz von plättchenreichem Plasma. Diese Beobachtung läßt den Verdacht einer Rezeptor-Kompetition zwischen SCLC-Zellen und Plättchen am Endothel und immobilisierten Fibrinogen aufkommen. So scheinen im Gegensatz zu vielen Studien, die eine Tumorzell-Adhäsion am Endothel nur durch rezeptorvermittelte Bindung an adhärierenden Thrombozyten beschreiben (v.a. Integrin  $\alpha_{IIb},\beta_3$ )(16;48), Tumorzellen des SCLC unabhängig von Thrombozyten am Endothel und Fibrinogen-bedeckten Oberflächen zu adhäreren.

#### **4.2.2 TCIP-Adhäsion und Tumorzell-Plättchen-Interaktion unter flow im SPAA**

Dardik et al. untersuchten neben statischen Versuchsbedingungen auch die Interaktion zwischen Tumorzellen, Thrombozyten und Subendothel unter Strömungsbedingungen. Ihre Studie zeigte, daß im Gegensatz zur Tumorzell-Plättchen Interaktion unter Stase, bei oberflächenparalleler Strömung mit Scherraten zwischen 150 s<sup>-1</sup> und 500 s<sup>-1</sup>, adhärerende Thrombozyten die Tumorzell-Adhäsion signifikant steigerten (16). In einer weiteren Studie von Dardik et al. wurde die Thrombozyten - und Tumorzell-Interaktion an Endothel ebenfalls unter Strömungsbedingungen untersucht. Auch hier fungierte die durch Tumorzellen induzierte Plättchen-Adhäsion am Endothel als Promoter für eine darauf entstehende Tumorzell-Adhäsion (17).

Um den Einfluss von Tumorzellen auf Thrombozyten und deren Adhäsion unter physiologischen Strömungsverhältnissen, wie sie im menschlichen Gefäßsystem an Gefäßaufzweigungen herrschen, zu betrachten, beströmten wir in einer Staupunktströmung humane Endothelzellen bzw. immobilisiertes Fibrinogen mit SCLC-Zellen und plättchenreichen Plasma (PRP). Bei der Bestromung von immobilisiertem Fibrinogen mit plättchenreichem Plasma kam es zu einer minimalen Plättchen-Adhäsion die durch Zusatz von SCLC-Zell-Suspension signifikant gesteigert werden konnte (Abb. 3.6). Mit Zulauf von SCLC-Zell-Suspension zeigte sich nach einer Latenzzeit zwischen 40 und 60 Sekunden eine annähernd linear steigende Thrombozyten-Adhäsion. Tumorzellen adhärten nur sehr vereinzelt und entwickelten zu keinem Zeitpunkt der Bestromung einen direkten Kontakt zu Thrombozyten. Weder adhärten Thrombozyten an adhärierenden Tumorzellen noch adhärten Tumorzellen an, bereits an der Oberfläche adhärierenden, Thrombozyten.

Wie aus früheren Versuchen von Reiningger et al. (57) nicht anders zu erwarten war haften bei Bestromung von konfluenten Endothelzell-Rasen mit plättchenreichem Plasma nur sehr wenige Thrombozyten, (weniger als 2% der beströmten Endothel-Oberfläche). Mit Zulauf von SCLC-Zell-Suspension zeigte sich auch hier nach einer Latenzzeit zwischen 40 und 60 Sekunden eine annähernd linear steigende Thrombozyten-Adhäsion. Adhärierende Thrombozyten belegten nach 4 Minuten in unsymmetrischer Verteilung mehr als 15% der beströmten Oberfläche. Auch hier konnte kein direkter Tumorzell-Thrombozyten Kontakt beobachtet werden. Wenige Tumorzellen adhärten am Endothel unabhängig von adhärierenden Thrombozyten. Sowohl die in vielen Studien beschriebene Promoter-Rolle der Thrombozyten bei der Adhäsion von Tumorzellen als auch ein „Shielding“ von Thrombozyten auf adhärierenden Tumorzellen zeigte sich nicht. „Shielding“ bezeichnet ein in vivo beobachtetes haften von Thrombozyten an Tumorzellen im Gefäßsystem, dabei fungiert die Thrombozyten-Haftung als Schutz für die Tumorzellen vor humoraler wie zellulärer Immunabwehr.

Da in diesen Versuchen keine direkte zelluläre Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten beobachtet werden konnte, musste erneut die Möglichkeit einer molekularen Stimulation der Thrombozyten durch ein sezerniertes Produkt der SCLC-Zellen in Betracht gezogen werden.

Mit unseren Ergebnissen zum Mechanismus der TCIP-Aggregation im Aggregometer korrelierend, konnte die Tumorzell-induzierte Plättchen-Adhäsion an Endothel und immobilisiertem Fibrinogen durch den Einsatz von ADP-Scavenger vollständig blockiert werden. Es zeigt sich im Gegensatz zu den Versuchen im Aggregometer keine Latenz der vollständigen Blockade der Tumorzell-induzierten Plättchen-Adhäsion.

Somit stimulierten Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms nicht nur Thrombozyten zur Aggregation (1. Teil der Studie) sondern auch zur Adhäsion an immobilisiertem Fibrinogen und Endothel, die durch den Einsatz von Enzym-Substrat-Komplexen zur Entfernung von ADP blockiert werden konnte. So scheint auch die Thrombozyten-Adhäsivität durch Freisetzen von ADP aus den Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms stimuliert zu werden. Die dabei sich aufzwingende Frage, über welchen Mechanismus die Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms ADP freisetzen kann hier nicht vollständig beantwortet werden. Die von manchen Autoren beschriebene kurzzeitige direkte Interaktion zwischen Tumorzellen und Blutplättchen, können wir in unseren Versuchsmodellen nicht sicher ausschließen, da es unmittelbar zu Beginn des Kontaktes zwischen PRP und SCLC-Zellen (im Zulauf der Strömungskammer) zu einer temporären, direkten Interaktion hätte kommen können. Somit wäre ein - allerdings unwahrscheinlicher - potentieller Mechanismus der Freisetzung von ADP durch Zellen des SCLC eine kurzzeitige rezeptorvermittelte Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten, welche die Tumorzellen zur ADP-Sekretion stimuliert. Allerdings muss für die Sekretion von ADP durch SCLC-Zellen eine direkte Interaktion zwischen Tumorzelle und Plättchen nicht die Voraussetzung sein. So beschrieben auch Heinmöller et al. (26) bei der TCIPA durch Zellen eines Pankreas-Karzinoms das Fehlen einer direkten Tumorzell-Plättchen Interaktion.

Neben der Tumorzell-induzierten Plättchen-Adhäsion und -Aggregation in vitro, zeigte sich keine unterstützende Funktion der Thrombozyten bei der Tumorzell-Adhäsion an Endothel als einen wichtigen Schritt der hämatogenen Metastasierung. Der Einsatz von antikoagulatorischen Substanzen als Mittel gegen den Schritt der Adhäsion von Tumorzellen am Endothel, wie in vielen Studien proklamiert {(26;30;53)}, dürfte bei der Metastasierung von Zellen des SCLC ohne Erfolg sein.

Zacharski et al. allerdings zeigten eine Verdopplung der Überlebenszeit von Patienten mit metastasierendem SCLC unter adjuvanter Therapie mit Warfarin (72) und postulierten, daß dies die Hypothese der Promoter-Rolle des Gerinnungssystems bei der hämatogenen Metastasierung unterstütze. Wir vermuten jedoch, vor dem Hintergrund unserer Ergebnisse, daß die Reduktion der Mortalität durch den Einsatz von Warfarin auf die Reduktion thrombembolischer Komplikationen zurückzuführen ist.

#### **4.3 Adhäsion von SCLC-Zellen in Abwesenheit von Plättchen an Endothel unter Stase und Flow**

Unsere Ergebnisse postulieren eine SCLC-Zell-Adhäsion am Endothel vollkommen unabhängig von Thrombozyten und lassen dadurch den Verdacht einer direkten rezeptorvermittelten Interaktion zwischen Endothel und Tumorzelle vermuten. Im letzten Teil dieser Studie untersuchten wir deshalb den Mechanismus der Tumorzell-Adhäsion am Endothel unter statischen und dynamischen Versuchsbedingungen unabhängig von Blutplättchen. Die hämatogene Dissemination von Tumorzellen bei Patienten mit metastasierenden Neoplasien ist ein sehr komplexer Prozess. Er vollzieht sich in mehreren Schritten. Als erstes penetrieren, aus dem Primär-Tumor losgelöste, Tumorzellen die Gefäßwand und dringen in das Gefäß-System ein. Dann zirkulieren die Tumorzellen im Blutkreislauf, sind humoraler, zellulärer Immunabwehr und Scherkräften ausgesetzt (19), und adhäreren an der Gefäßwand mit nachfolgender Extravasation (54) (64). An diesem Ort entsteht dann perivasaal eine Tochtergeschwulst. Vor allem der Schritt der Adhäsion am Endothel bzw. Subendothel des Gefäßsystems ist ein entscheidender Schritt in der hämatogenen Metastasierung und Focus vieler internationaler Studien.

Das Gros der Autoren untersuchte die Interaktion von Tumor- und Endothelzellen unter statischen Versuchsbedingungen. In den meisten dieser Studien wurde die Adhäsion der Tumorzellen am Endothel durch Stimulation des Endothels mit Zytokinen gesteigert. So aktivierten einige Autoren das Endothel, vor Inkubation mit verschiedenen Tumorzellen, mit Zytokinen der Gruppe der Interleukine (9;38;65; 42), andere aktivierten das Endothel mit TPA (55) oder TNF-alpha (66). Alle Autoren beschrieben eine Steigerung der Adhäsionsrate der verschiedenen Tumorzellen durch die Stimulation der Endothel-Zellen. Die erhöhte Zahl der am Endothel adhäreren Tumorzellen konnte in diesen Studien auf eine gesteigerte Expression von Selektinen (38,9,65) und anderen zellulären Adhäsionsmolekülen (CAMs) (13, 42) am Endothel zurückgeführt werden.

Auch wir untersuchten zuerst die Adhäsion von Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms an humanen Endothel-Zellen unter statischen (no flow) Versuchsbedingungen. Es zeigte sich hierbei ein differierendes Adhäsions-Verhalten der Tumorzellen in Abhängigkeit von verwendeten Inkubations-Medien (Abb.3.17). In Abwesenheit von Plasma-Bestandteilen (PBS-Suspension) kam es zu einer geringen Tumorzell-Adhäsion am Endothel, der Zusatz von Plättchenreichem Plasma (PRP) führte zu einer signifikanten Steigerung der Adhäsionsrate. Die stärkste SCLC-Zell-Adhäsion am Endothel wurde durch Zusatz von plättchenarmen Plasma (PPP) erreicht. Beobachtung der Versuche unter dem Phasenkontrast-Mikroskop zeigte eine Tumorzell-Adhäsion ohne Kontakt zu bereits adhärierenden Thrombozyten. So spielen Plasma-Bestandteile eine wichtige Rolle bei der Tumorzell-Adhäsion am Endothel. Thrombozyten im Plasma reduzieren jedoch die Zahl adhärierender Tumorzellen.

Diese Beobachtungen korrelieren auch mit den Beobachtungen von Languino et al., welche die Leukozyten-Adhäsion an humanen Endothelzellen untersuchten. Sie beschrieben eine 2- bis 5-fache Steigerung der Leukozyten-Adhäsion durch Zusatz von humanem Plasma bzw. Fibrinogen. Fibrinogen fungierte hier als Ligand zwischen Leukozyten-Rezeptor CD 18 und ICAM-1-Rezeptor am Endothel (39).

Wie bereits erläutert ist eine Adhäsion der Tumorzellen am Endothel wahrscheinlich über Rezeptoren an der Endothel-Oberfläche vermittelt, die auch Thrombozyten binden. Dies würde eine Konkurrenz zwischen Tumorzellen und Thrombozyten um Rezeptoren am Endothel bedeuten. Die Frage welche Rezeptoren die Adhäsion medieren wird noch später diskutiert.

Auch wir stimulierten das Endothel mit Zytokinen um einen Anstieg der Tumorzell-Adhäsion zu erreichen. Inkubation des Endothels mit IL-1 $\beta$  resultierte in einer signifikanten Steigerung der Tumorzell-Adhäsion am Endothel. So adhärte im gleichen Zeitraum mehr als die dreifache Menge der SCLC-Zellen am Endothel sowohl unter statischen als unter fluiddynamischen Bedingungen (Abb. 3.15 und 3.18). Um die Tumorzell-Adhäsion nicht nur unter statischen Bedingungen sondern auch unter fluiddynamischen Bedingungen wie sie im Gefäßsystem herrschen zu untersuchen, beobachteten wir die Adhäsion von Tumorzellen mit plättchenarmen Plasma an Endothel-Oberflächen im Staupunkt-Adhäsio-Aggregometer. Es existieren relativ wenige Studien, welche sich der Tumorzell-Adhäsion unter

Strömungsbedingungen an humanem Endothel annehmen. Die Autoren arbeiten vorwiegend mit laminarer Strömung in wandparallelen Strömungskammern (21;22;35). Diese Bedingungen entsprechen jedoch nicht den Strömungs-Verhältnissen an Aufzweigungen im Gefäßsystem, an denen neben wandparalleler Strömung, Sekundärströmungen mit Strömungskomponenten senkrecht zur Gefäßwand auftreten und so die Entstehung von Fibrin-Thromben und Tumorzell-Endothel Kontakt unterstützen. Der bei der Staupunktströmung bestehende konvektive Antransport gegen die Endothelzell-Oberfläche, bedingt in dieser Hinsicht für eine Zell-Adhäsion förderliche, Strömungsverhältnisse (58).

Einige Autoren beschrieben *in vivo* ein rezeptorvermitteltes Rollen von Leukozyten an Endothel in entzündeten Organsimen (41). Das Rollen der Leukozyten wird als Vorform der Adhäsion interpretiert. Diese Beobachtungen wurden auch bei verschiedenen Tumorzellen in Strömung beschrieben. So berichteten Giavazzi et al. - wie auch viele andere Autoren - vom Rollen von verschiedenen Tumorzellen an humanen Endothel-Zellen (21). Sie zeigten eine signifikante Steigerung des Rollens von Tumorzellen an Endothel unter wandparalleler Strömung bei Stimulation der Endothelzellen mit Entzündungsmediatoren wie Interleukin-1 $\beta$  oder TNF (21;66).

In unserem Strömungsmodell zeigte sich bei Vorinkubation der Endothelzell-Monolayer mit Interleukin-1 $\beta$  ein Rollen der SCLC-Zellen. Es konnte ein annähernd linearer Anstieg der Rollgeschwindigkeit mit Zunahme der Grösse der SCLC-Zellaggregate beobachtet werden (Abb. 3.12). Lagen SCLC-Zellen einzeln vor so rollten sie mit äußerst geringer Geschwindigkeit am Endothel entlang und adhärten vermehrt im Vergleich zu Zell-Aggregaten. Der Grund dafür liegt darin, daß Zell-Aggregate im Vergleich zu Einzelzellen den Strömungskräften mehr Widerstand bieten und zudem in wandfernere Flüssigkeitsschichten vorragen in denen höhere Strömungsgeschwindigkeiten vorherrschen. Die aus einem langsamen Rollen hervorgehende Adhäsion könnte durch eine verlängerte Kontaktzeit zwischen Tumorzellen und Endothel-Rezeptoren bei niedrigen Rollgeschwindigkeiten bedingt sein. Die grössere Zahl adhärrierender Tumorzellen unter statischen Versuchsbedingungen würde ebenfalls durch die lange Kontaktzeit zwischen Tumorzellen und Endothel erklärt.

Auch Yoshida et al. (70) und Giavazzi et al. (21) beschrieben eine Abhängigkeit der Tumorzell-Adhäsion von bestehenden Scherraten, so kam es vor allem zu einer starken Adhäsion der Tumorzellen an IL-1 $\beta$ -stimuliertem Endothel unter niedrigen Scherraten. Neben der Adhäsion der Tumorzellen nach vorausgehendem Rolling adhärte auch ein grosser Teil der Tumorzellen unmittelbar nach dem ersten Oberflächenkontakt am Endothel.

Diese Ergebnisse machen deutlich, daß die Inkubation des Endothels mit Entzündungsmediatoren sowohl zu einer Steigerung der Tumorzell-Adhäsion als auch zu einem Rollen der Tumorzellen am Endothel führt. Korrelierend mit den Ergebnissen vieler Studien könnte dies auf eine verstärkte Expression von Oberflächen-Rezeptoren am Endothel zurückzuführen sein; Oberflächen-Rezeptoren, die sowohl ein Rollen als auch eine Adhäsion der Tumorzellen am Endothel medieren. So beschrieben auch Giavazzi et al. (21), Tozeren et al. (66) und Tozawa et al. (65) eine durch Interleukin-Stimulus gesteigerte Expression von E-Selektin an Endothel, mit der Folge eines gesteigerten Rollens und einer gesteigerten Adhäsion am Endothel.

Neben der Expression von Selektinen auf Endothelien durch Stimulation mit Entzündungsmediatoren, wurde auch eine Expression von Adhäsions-Molekülen der IG-Gen-Superfamily wie VCAM-1, ICAM-1 und Lu-ECAM-1 beschrieben (13) (22;65). Alle Studien zeigten eine Inhibierung des Tumorzell-Rollens und der Tumorzell-Adhäsion bei Blockade der Oberflächen-Rezeptoren mit spezifischen Antikörpern. Die einzige bisher veröffentlichte Studie zur SCLC-Zell-Adhäsion an Endothel-Zellen (hier bovinen) in vitro, beschrieb eine verstärkte Expression von P-Selektinen an Endothel, das mit Tissue Plasminogen Activator (TPA) inkubiert wurde. Die Tumorzell-Adhäsion konnte durch Antikörper gegen P-Selektin signifikant reduziert werden.

Die Dominanz der Selektine bei der Adhäsion und dem Rollen von Tumorzellen an Endothel in vielen Studien, führte dazu, daß wir in unserer Studie ebenfalls die Rolle der Selektine bei der Tumorzell-Adhäsion an Endothel untersuchten. Die immunzytochemische Untersuchung der Endothelzellen zeigte eine starke Expression von P-Selektin am Endothel nach Stimulation mit IL-1 $\beta$ . Die Tumorzell-Adhäsion sowie das Rollen der SCLC-Zellen am Endothel konnte allerdings durch den Einsatz eines monoklonalen Antikörpers gegen P-Selektin an stimuliertem Endothel nicht signifikant reduziert werden (Abb. 3.21).

Dies widerspricht den Ergebnissen Pottratz et al. (55), die ebenfalls mit Zellen des SCLC arbeiteten und eine starke Reduktion der P-Selektin-vermittelten Tumorzell-Adhäsion an bovinen Endothel durch Inkubation des Endothels mit einem spezifischen Antikörper gegen P-Selektin beschrieben. Pottratz arbeitete allerdings mit bovinem Endothel und humanen Tumorzellen. Die Heterogenität des verwendeten Systems bei Pottratz et al. stellt die Ergebnisse der Studie unter physiologischen Gesichtspunkten in Frage und dürfte sicher ein entscheidender Grund für die Differenz zu unseren Ergebnissen sein.

Die Expression von P-Selektin am Endothel nach Stimulation muß nicht zwangsläufig bedeuten, daß die Tumorzell-Adhäsion und das Rollen ausschließlich über diesen Oberflächenrezeptor vermittelt werden. Um weitere Selektine als Rezeptoren für eine Tumorzell-Adhäsion auszuschließen inkubierten wir das stimulierte Endothel mit Fucoidan einem Polysaccharid zur unspezifischen Blockade von Selektinen. Stone et al. (61) hatten durch den Einsatz von Fucoidan die Adhäsion von Zellen des SCLC an Blutplättchen inhibiert. Der Einsatz von Fucoidan in unserem System hatte jedoch keinen Einfluß auf die Adhäsion der Tumorzellen am Endothel (Abb. 3.22). So konnten die Selektine als Vermittler der SCLC-Zell-Adhäsion an humanem Endothel - im Gegensatz zu vielen internationalen Studien mit anderen Tumorzellen - ausgeschlossen werden (15),(21),(38),(32).

Um weitere Rezeptoren als mögliche Vermittler der Tumorzell-Adhäsion abzuklären untersuchten wir die Membran von SCLC-Zellen auf das Vorhandensein von Oberflächenrezeptor Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Dieses Integrin wurde Anfangs ausschließlich auf der Oberfläche von Blutplättchen beschrieben (64); als promiskuitiver Rezeptor bindet es u.a. Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin und von Willebrand-Faktor und konnte für die Aggregation von Thrombozyten und deren Adhäsion an Endothel und Tumorzellen verantwortlich gemacht werden (61) (16) (4). Reininger et al. (57) hatten gezeigt daß die Adhäsion von Blutplättchen an intaktem Endothel unter Staupunktströmung durch das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  auf den Plättchen vermittelt wird. In manchen Studien zur TCIPA wurde das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  als entscheidender Rezeptor für die Tumorzell-induzierte Plättchen-Aggregation identifiziert, dabei befand sich das Integrin nicht ausschließlich auf den Thrombozyten sondern auch auf den Tumorzellen (19;50).

So beschrieben verschiedene Autoren eine Expression von Integrin  $\alpha_{IIb},\beta_3$  auf unterschiedlichen Tumorzellen. Ein Grossteil der Studien zeigte eine - mit Antikörpern vollständig inhibierbare - Vermittlung der Tumorzell-Adhäsion an Fibronectin- und Endothel-Oberflächen über das Integrin  $\alpha_{IIb},\beta_3$  (10;64;67). Wir konnten mit Western-/Immunoblot erstmals das Integrin  $\alpha_{IIb},\beta_3$  bei Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms nachweisen (Abb. 3.19). Die Stärke des Signals der Rezeptoren lag jedoch unter der bei Thrombozyten. So musste von einer geringeren Rezeptordichte des Integrins auf den Tumorzellen im Vergleich zu Thrombozyten ausgegangen werden. Ganz im Gegensatz zu unseren Ergebnissen beschrieben Feldmann et al. (20) lediglich die Expression der Integrin-Untereinheiten  $\beta_1, \beta_2, \alpha_3$  und  $\alpha_6$  auf SCLC-Zellen. Feldman et al. postulierten eine Adhäsion von Zellen des SCLC an Laminin über die Integrin-Untereinheiten  $\alpha_3,\beta_1$ , welche durch Einsatz eines monoklonalen Antikörpers gegen diesen Rezeptor signifikant geblockt werden konnte.

Die in unserer Studie durchgeführte Inkubation von SCLC-Zellen mit RGDS - einem Tetrapeptid zur Blockade des Integrin  $\alpha_{IIb},\beta_3$  - führte jedoch nicht zu einer signifikanten Blockade der SCLC-Adhäsion an stimulierten Endothel-Oberflächen (Abb. 3.20). So konnten wir auch das SCLC-Zell-seitige Integrin  $\alpha_{IIb},\beta_3$  als Rezeptor bei der Tumorzell-Adhäsion am Endothel ausschliessen.

Neben der häufig beschriebenen Tumorzell-Adhäsion an Oberflächenrezeptoren der Gruppe der Selektine auf Endothelzellen zeigten, wie schon erwähnt, viele Studien eine Tumorzell-Adhäsion an Oberflächenrezeptor der Gruppe der Immunglobulin-Superfamily- ICAM-1. Die Autoren stimulierten wie wir humanes Endothel mit Zytokinen wie Interleukin- $1\beta$ , Interleukin- $1\alpha$  oder TNF um die Expression von ICAM-1 an Endothel hochzuregulieren. Anschließend untersuchten sie die Adhäsion verschiedener Tumorzellen an Endothelzellen. So beschreiben Johnson et al. (34) eine Steigerung der Expression von ICAM-1 an HUVEC durch Stimulation mit IL- $1\beta$  und zeigten eine signifikante Steigerung der Adhäsion von Zellen eines kolorektalen Karzinoms am Endothel unter statischen Bedingungen.

Die Adhäsion konnte durch Einsatz eines monoklonalen Antikörpers gegen ICAM-1 blockiert werden. Auch Kaji et al.(36), Steinbach et al. (60) und Marchetti et al. (45) zeigten eine gesteigerte Expression von ICAM-1 an IL-1 $\beta$  stimuliertem Endothel und eine dadurch signifikant gesteigerte Tumorzell-Adhäsion, die durch Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen ICAM-1 blockiert werden konnte. Diese Studien arbeiteten allerdings ausschließlich unter statischen Versuchsbedingungen und berücksichtigen damit nicht die Strömungsbedingungen bei der Adhäsion von Tumorzellen im menschlichen Gefäßsystem.

Lediglich zwei Arbeiten von Neelamegham et al. (47) und Yoong et al. (69) beleuchteten die Rolle des Oberflächen-Rezeptors ICAM-1 bei der Zell-Adhäsion unter Strömungs-Bedingungen, allerdings untersuchten sie nicht die Adhäsion von Tumorzellen sondern von neutrophilen Granulozyten und T-Zellen. Vor dem Hintergrund dieser Studien-Ergebnisse untersuchten wir die Adhäsion von Tumorzellen des SCLC über den Oberflächenrezeptor ICAM-1 an Endothel unter fluiddynamischen Bedingungen. Das Endothel stimulierten wir, wie in allen Versuchen zur Adhäsion von Tumorzellen, mit IL-1 $\beta$  um eine Steigerung der Expression der Oberflächenrezeptoren wie ICAM-1 zu erreichen. Anschließend inkubierten wir die Endothelmonolayer mit einem monoklonalen Antikörper gegen ICAM-1. Die Inkubation des Endothels mit dem Antikörper führte zu einer hoch signifikanten Reduzierung der Tumorzell-Adhäsion unter Strömungsbedingungen (Abb. 3.24).

So zeigten wir, daß ICAM-1 die Adhäsion von Tumorzellen des SCLC an humanem Endothel vermittelt. Diese Ergebnisse korrelierten mit den Ergebnissen der Studien unter Stase. Über welchen Gegenrezeptor auf der Seite der Tumorzellen die Adhäsion stattfand wurde in dieser Studie nicht weiter untersucht. LFA-1 und MAC-1 als mögliche Gegenrezeptoren von ICAM-1 wurden auf der Oberfläche von Zellen des SCLC nicht beschrieben. Die Tatsache daß für die Adhäsion der Tumorzellen Plasmabestandteile eine wichtige Rollen spielten macht jedoch eine Adhäsion der Tumorzellen über Fibrinogen als Liganden an ICAM-1 wahrscheinlich. So beschrieben auch Languino et al. (39) eine Adhäsion von Leukozyten an ICAM-1 auf Endothelzellen über Fibrinogen. An das an ICAM-1 gebundene Fibrinogen könnten dann viele verschiedene Rezeptoren der Tumorzellen binden.

Diese *in vitro* Ergebnisse könnten auch klinische Bedeutung haben, so könnte der Einsatz von Antikörpern zur Blockade von ICAM-1 bei Patienten die an kleinzelligem Lungenkarzinom erkrankten zur Reduktion der sehr häufig auftretenden hämatogenen Metastasierung führen. Schaberg et al. (63) beschrieben in ihrer Studie eine gegenüber Nichtrauchern signifikant verstärkte Expression von ICAM-1 an Endothelien der Lungengefäße von Rauchern. Diese Ergebnisse korrelieren mit den klinischen Erfahrungen, daß kleinzellige Karzinome der Lunge gehäuft bei Rauchern auftreten und hier zu häufigen Metastasen führen.

So könnte die gesteigerte Inzidenz von hämatogenen Metastasen der SCLC bei Rauchern mit der gesteigerten Expression von ICAM-1 in den Gefäßen der Patienten zusammenhängen. Dies würde auch mit unseren Ergebnissen *in vitro* korrelieren und wiederum einen deutlichen Benefit für Patienten mit SCLC durch den Einsatz von Antikörpern gegen ICAM-1 wahrscheinlich machen.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Adhäsion von SCLC-Zellen an humanen Endothelzellen unter statischen und dynamischen Versuchsbedingungen können folgendermaßen zusammengefasst werden. Sowohl unter statischen als auch Strömungsbedingungen zeigte sich eine Abhängigkeit der Tumorzell-Adhäsion von der Anwesenheit von Plasmabestandteilen, wobei Blutplättchen eine Reduktion der Tumorzell-Adhäsion bewirkten. Die postulierte Promoterrolle der Plättchen bei der Tumorzell-Adhäsion konnte somit für SCLC-Zellen nicht bestätigt werden. Durch Stimulation des Endothels mit IL-1 $\beta$  konnte sowohl ein Rollen als auch eine hochsignifikante Steigerung der Tumorzell-Adhäsion am Endothel induziert werden. Immunzytochemisch wiesen wir eine gesteigerte Expression von P-Selektin an der Oberfläche der Endothelzellen nach. Die Blockade des Rezeptors mit einem monoklonalen Antikörper führte jedoch nicht zu einer signifikanten Reduktion des Rollens bzw. der Tumorzell-Adhäsion am Endothel. Auch die unspezifische Blockade weiterer Selektine am Endothel durch Fucoidan führt nicht zu einer signifikanten Wirkung. Somit konnten Selektine an der Oberfläche von Endothel als Vermittler der Adhäsion von SCLC-Zellen ausgeschlossen werden. Erstmals konnte das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  auf der Oberfläche von SCLC-Zellen mit Immuno-/Westernblot nachgewiesen werden. Die Blockade des Membran-Rezeptors an den SCLC-Zellen führte allerdings nicht zu einer signifikanten Reduzierung der Tumorzell-Adhäsion.

Die Blockade des Oberflächenrezeptors ICAM-1 am Endothel führte zu einer hoch signifikanten Reduzierung der Tumorzell-Adhäsion unter fluiddynamischen Bedingungen. Das Zelladhäsions-Molekül ICAM-1 konnte somit als Vermittler der SCLC-Zelladhäsion an Endothel nachgewiesen werden. Dies könnte den Einsatz von geeigneten Medikamenten zur Blockade von ICAM-1 bei Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom klinisch sinnvoll machen.

## **5. Zusammenfassung**

Es ist bekannt, daß zahlreiche Tumoren embolische und thrombotische Komplikationen bedingen können. Verschiedene Tumorzellen stimulieren Blutplättchen *in vitro* und *in vivo* zur Adhäsion und Aggregation an Endothelien. Auch weiß man, daß hämatogen metastasierende Tumorzellen zur Bildung einer Tochtergeschwulst zunächst im menschlichen Gefäßsystem am Endothel adhären. Vor dem Hintergrund dieser Befunde untersuchten wir in der vorliegenden, aus drei Teilen bestehenden, Studie *in vitro* die Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation an Endothel und immobilisiertem Fibrinogen in Gegenwart von Zellen eines kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC); sowie die Adhäsion der Tumorzellen selbst an Endothel, unter statischen und Strömungs-Bedingungen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Tumorzell-induzierte Plättchenaktivierung durch Zellen des humanen kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC) *in vitro* in einem Plättchen-Aggregometer untersucht. Zellen zweier SCLC-Zelllinien induzierten eine Aggregation der Blutplättchen. Durch Einsatz eines Enzym-Substrat-Komplexes zur Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP-Scavenger) konnte nachgewiesen werden, daß die SCLC-induzierte Plättchen-Aggregation auf ADP zurückzuführen ist. Die Kinetik der Thrombozyten-Aggregation durch SCLC-Zellen zeigte einen Verlauf wie unter Stimulation mit ADP-Konzentrationen zwischen 1 und 0,5µM.

Im zweiten Teil dieser Studie stand die Aktivierung der Blutplättchen zur Adhäsion an immobilisiertem Fibrinogen und Endothel-Oberflächen durch Zellen des SCLC in Strömung und Stase im Vordergrund. Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms induzierten unter Staupunktströmung (Scherraten  $< 170\text{s}^{-1}$ ) über ADP eine Adhäsion von Blutplättchen an immobilisiertem Fibrinogen und Endotheloberflächen. Der Einsatz von ADP-Scavenger führte auch hier zu einer vollständigen Inhibition der Plättchen-Adhäsion an immobilisiertem Fibrinogen und Endothel. Die Adhäsion von Blutplättchen unter statischen Bedingungen wurde durch den Einsatz von ADP-Scavenger nicht beeinflusst.

Im letzten Teil wurde die Adhäsion von SCLC-Zellen an Endothel in Stase und Strömung untersucht. Durch Stimulation der Endothelmonolayer mit Interleukin-1 $\beta$  konnte eine hoch signifikante Steigerung der Adhäsion von, in Plasma suspendierten, Zellen des SCLC sowohl in Stase als auch in Strömung beobachtet werden. Unter Strömungsbedingungen zeigte sich zudem eine hoch signifikante Steigerung des Rollens (langsames Entlangrutschen am Endothel, als Vorstufe der Adhäsion) von Tumorzellen an Endothel.

Bei der Suche nach dem für die Tumorzelladhäsion verantwortlichen Rezeptor konnte erstmals mit Immuno-/Westernblot die Anwesenheit von Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  an SCLC-Zellen nachgewiesen werden. Die Blockade des Oberflächen-Integrins führte allerdings nicht zu einer Reduzierung der Tumorzelladhäsion am Endothel unter statischen und Strömungs-Bedingungen. Auf der Seite des Endothels konnte mit Immunzytochemie nach Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  eine hohe Expression von P-Selektin nachgewiesen werden. Die Blockade dieses Oberflächenrezeptors mit einem monoklonalen Antikörper blieb allerdings ohne Einfluss auf die Tumorzell-Adhäsion. Auch die unspezifische Blockade der Selektine durch das Polysaccharid Fucoidan hatte keinen Einfluß auf die Tumorzell-Adhäsion. Dagegen reduzierte ein monoklonaler Antikörper gegen ICAM-1, ein Zelladhäsionsmolekül der Ig-Superfamily, die SCLC-Zell-Adhäsion an Endothel unter Strömung hoch signifikant.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, daß Zellen eines kleinzelligen Lungenkarzinoms Blutplättchen über ADP in vitro zur Aggregation und zur Adhäsion an Endothel und immobilisiertem Fibrinogen unter physiologischen Strömungsverhältnissen stimulieren. Die Entstehung der bei Patienten mit SCLC häufig auftretenden thrombembolischen Komplikationen scheint über eine ADP-Sekretion der Tumorzellen vermittelt zu sein. Therapeutisch könnte diese ein Ansatz für die medikamentöse Reduktion thrombembolischen Komplikationen bei Patienten mit SCLC sein. Die Tumorzell-Adhäsion an humanem Endothel bei hämatogener Metastasierung scheint zu einem grossen Teil über ICAM-1 an Endothelzellen vermittelt zu sein. So könnte auch dies ein therapeutischer Ansatz sein für die Reduktion der bei Patienten mit SCLC häufig auftretenden hämatogenen Metastasierung.

## **6. Bibliographie**

1. **Abecassis, J., R. Millon-Collard, C. Klein-Soyer, F. Nicora, J.P. Fricker, A. Beretz, M. Eber, D. Muller, and J.P. Cazenave.** 1987. Adhesion of human breast cancer cell line MCF-7 to human vascular endothelial cells in culture. Enhancement by activated platelets. *Int.J.Cancer* **40**:525-531.
2. **Bastida, F., A. Ordinas, and S.L. Giardani.** 2001. Differentiation of platelet-aggregating effects of human tumor cell lines based on inhibition studies with apyrase, hirudin and phospholipase. *Cancer Res.* **42**:4352-4353.
3. **Berlin, C., R.F. Bargatze, J.J. Campbell, U.H. von Andrian, M.C. Szabo, S.R. Hasslen, R.D. Nelson, E.L. Berg, S.L. Erlandsen, and E.C. Butcher.** 1995. alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* **80**:413-422.
4. **Bombeli, T., B.R. Schwartz, and J.M. Harlan.** 1998. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIbalpha. *J.Exp.Med.* **187**:329-339.
5. **Born, G.V.R.** 1962. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* **194**:927-928.
6. **Boukerche, H., O. Berthier-Vergnes, E. Tabone, J.F. Dore, L.L. Leung, and J.L. McGregor.** 1989. Platelet-melanoma cell interaction is mediated by the glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* **74**:658-663.
7. **Buccheri, G., D. Ferrigno, C. Ginardi, and C. Zuliani.** 1997. Haemostatic abnormalities in lung cancer: prognostic implications. *Eur.J.Cancer* **33**:50-55.
8. **Campbell, J.J., J. Hedrick, A. Zlotnik, M.A. Siani, D.A. Thompson, and E.C. Butcher.** 1998. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* **279**:381-384.

9. **Cavenagh, J.D., S.E. Gordon, F.M. Gibson, and M.Y. Gordon.** 1993. Acute myeloid leukaemia blast cells bind to human endothelium in vitro utilizing E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *Br.J.Haematol.* **85**:285-291.
10. **Chen, Y.Q., M. Trikha, X. Gao, R. Bazaz, A.T. Porter, J. Timar, and K.V. Honn.** 1997. Ectopic expression of platelet integrin alphaIIb beta3 in tumor cells from various species and histological origin. *Int.J.Cancer* **72**:642-648.
11. **Chiang, H.S., M.W. Swaim, and T.F. Huang.** 1994. Characterization of platelet aggregation induced by human colon adenocarcinoma cells and its inhibition by snake venom peptides, trigramin and rhodostomin. *Br.J.Haematol.* **87**:325-331.
12. **Chiang, H.S., M.W. Swaim, and T.F. Huang.** 1995. Characterization of platelet aggregation induced by human breast carcinoma and its inhibition by snake venom peptides, trigramin and rhodostomin. *Breast Cancer Res.Treat.* **33**:225-235.
13. **Chirivi, R.G., M.I. Nicoletti, A. Remuzzi, and R. Giavazzi.** 1994. Cytokines and cell adhesion molecules in tumor-endothelial cell interaction and metastasis. *Cell Adhes.Commun.* **2**:219-224.
14. **Chopra, H., J.S. Hatfield, Y.S. Chang, I.M. Grossi, L.A. Fitzgerald, C.Y. O'Gara, L.J. Marnett, C.A. Diglio, J.D. Taylor, and K.V. Honn.** 1988. Role of tumor cytoskeleton and membrane glycoprotein IRGpIIb/IIIa in platelet adhesion to tumor cell membrane and tumor cell-induced platelet aggregation. *Cancer Res.* **48**:3787-3800.
15. **Daneker, G.W., S.A. Lund, S.W. Caughman, C.A. Staley, and W.C. Wood.** 1996. Anti-metastatic prostacyclins inhibit the adhesion of colon carcinoma to endothelial cells by blocking E-selectin expression. *Clin.Exp.Metastasis* **14**:230-238.

16. **Dardik, R., Y. Kaufmann, N. Savion, N. Rosenberg, B. Shenkman, and D. Varon.** 1997. Platelets mediate tumor cell adhesion to the subendothelium under flow conditions: involvement of platelet GPIIb-IIIa and tumor cell alpha(v) integrins. *Int.J.Cancer* **70**:201-207.
17. **Dardik, R., Z.M. Ruggeri, N. Savion, S. Gitel, U. Martinowitz, V. Chu, and D. Varon.** 1993. Platelet aggregation on extracellular matrix: effect of a recombinant GPIb-binding fragment of von Willebrand factor. *Thromb.Haemost.* **70**:522-526.
18. **Dvorak, H., R. Colman, J. Hirsh, and V. Marder.** 1994. Abnormalities of Hemostasis in Malignant Disease: Basic Principles and Clinical Practice, Anonymous Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice.
19. **Felding, H.B., R. Habermann, E. Saldivar, and Z.M. Ruggeri.** 1996. Role of beta3 integrins in melanoma cell adhesion to activated platelets under flow. *J.Biol.Chem.* **271**:5892-5900.
20. **Feldman, L.E., K.C. Shin, R.B. Natale, and R.F. Todd.** 1991. Beta 1 integrin expression on human small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* **51**:1065-1070.
21. **Giavazzi, R., M. Foppolo, R. Dossi, and A. Remuzzi.** 1993. Rolling and adhesion of human tumor cells on vascular endothelium under physiological flow conditions. *J.Clin.Invest.* **92**:3038-3044.
22. **Goetz, D.J., S.M. el, D.A. Hammer, and B.U. Pauli.** 1996. Lu-ECAM-1-mediated adhesion of melanoma cells to endothelium under conditions of flow. *Int.J.Cancer* **65**:192-199.
23. **Grignani, G. and G.A. Jamieson .** 1988. Platelets in tumor metastasis: generation of adenosine diphosphate by tumor cells is specific but unrelated to metastatic potential. *Blood* **71**:844-849.

24. **Grignani, G., L. Pacchiarini, M.M. Ricetti, P. Dionigi, V. Jemos, M. Zucchella, and P. Fratino.** 1989. Mechanisms of platelet activation by cultured human cancer cells and cells freshly isolated from tumor tissues. *Invasion Metastasis* **9**:298-309.
25. **Grossi, I.M., J.S. Hatfield, L.A. Fitzgerald, M. Newcombe, J.D. Taylor, and K.V. Honn.** 1988. Role of tumor cell glycoproteins immunologically related to glycoproteins Ib and IIb/IIIa in tumor cell-platelet and tumor cell-matrix interactions. *FASEB J.* **2**:2385-2395.
26. **Heinmoller, E., T. Schropp, O. Kisker, B. Simon, R. Seitz, and R.J. Weinel.** 1995. Tumor cell-induced platelet aggregation in vitro by human pancreatic cancer cell lines. *Scand.J.Gastroenterol.* **30**:1008-1016.
27. **Heinmoller, E., R.J. Weinel, H.H. Heidtmann, U. Salge, R. Seitz, I. Schmitz, K.M. Muller, and H. Zirngibl.** 1996. Studies on tumor-cell-induced platelet aggregation in human lung cancer cell lines. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* **122**:735-744.
28. **Helland, I.B., B. Klementsens, and L. Jorgensen.** 1997. Addition of both platelets and thrombin in combination accelerates tumor cells to adhere to endothelial cells in vitro. *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim.* **33**:182-186.
29. **Honn, K.V., P. Cavanaugh, C. Evens, J.D. Taylor, and B.F. Sloane.** 1982. Tumor cell-platelet aggregation: induced by cathepsin B-like proteinase and inhibited by prostacyclin. *Science* **217**:540-542.
30. **Honn, K.V., J.M. Onoda, C.A. Diglio, M.M. Carufel, J.D. Taylor, and B.F. Sloane.** 1984. Inhibition of tumor cell-platelet interactions and tumor metastasis by the calcium channel blocker, nimodipine. *Clin.Exp.Metastasis* **2**:61-72.

31. **Honn, K.V., D.G. Tang, and J.D. Crissman.** 1992. Platelets and cancer metastasis: a causal relationship? *Cancer Metastasis Rev.* **11**:325-351.
32. **Ishikawa, T., A. Imura, K. Tanaka, H. Shirane, M. Okuma, and T. Uchiyama.** 1993. E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 mediate adult T-cell leukemia cell adhesion to endothelial cells. *Blood* **82**:1590-1598.
33. **Jaffe, E.A., R.L. Nachman, C.G. Becker, and C.R. Minick.** 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: Identification of morphology and immunologic criteria. *J.Clin.Invest.* **52**:2745-2756.
34. **Johnson, J.** 1999. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* **18**:345-357.
35. **Jones, D.A., L.V. McIntire, C.W. Smith, and L.J. Picker.** 1994. A two-step adhesion cascade for T cell/endothelial cell interactions under flow conditions. *J.Clin.Invest.* **94**:2443-2450.
36. **Kaji, M., H. Ishikura, T. Kishimoto, M. Omi, A. Ishizu, C. Kimura, T. Takahashi, and H.Y.T. Kato.** 1995. E-Selectin expression induced by pancreas-carcinoma-derived interleukin-1alpha results in enhanced adhesion of pancreas-carcinoma cells to endothelial cells. *Int.J.Cancer* **60**:712-717.
37. **Karakantza, M., J.D. Cavenagh, S.E. Gordon, and F.M. Gibson.** 1995. Adhesion molecule expression on CD34+ progenitor cells from normal and aplastic anaemia bone marrow. *Br.J.Haematol.* **91**:800-803.
38. **Lafrenie, R.M., S. Gallo, T.J. Podor, M.R. Buchanan, and F.W. Orr.** 1994. The relative roles of vitronectin receptor, E-selectin and alpha 4 beta 1 in cancer cell adhesion to interleukin-1-treated endothelial cells. *Eur.J.Cancer* **30A**:2151-2158.
39. **Languino, L.R., J. Plescia, A. Duperray, A.A. Brian, E.F. Plow, J.E. Geltosky, and D.C. Altieri.** 1993. Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell* **73**:1423-1434.

40. **Levine, M. and J. Hirsh.** 1990. The diagnosis and treatment of thrombosis in the cancer patient. *Semin.Oncol.* **17**:160-171.
41. **Ley, K., P. Gaetgens, C. Fennie, M.S. Singer, L.A. Lasky, and S.D. Rosen.** 1991. Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood* **77**:2553-2555.
42. **Liesveld, J.L., K.E. Frediani, A.W. Harbol, J.F. DiPersio, and C.N. Abboud.** 1994. Characterization of the adherence of normal and leukemic CD34+ cells to endothelial monolayers. *Leukemia* **8**:2111-2117.
43. **Luzzatto, G. and A.I. Schafer.** 1990. The prethrombotic state in cancer. *Semin.Oncol.* **17**:147-159.
44. **Mannucci, P.M., M. Vaglini, M. Maniezzo, E. Magni, D. Mari, and N. Cascinelli.** 1985. Hemostatic alterations are unrelated to the stage of tumor in untreated malignant melanoma and breast carcinoma. *Eur.J.Cancer Clin.Oncol.* **21**:681-685.
45. **Marchetti, M., A. Falanga, S. Giovanelli, E. Oldani, and T. Barbui.** 1996. All-trans-retinoic acid increases adhesion to endothelium of the human promyelocytic leukaemia cell line NB4. *Br.J.Haematol.* **93**:360-366.
46. **Menter, D.G., J.M. Onoda, J.D. Taylor, and K.V. Honn.** 1984. Effects of prostacyclin on tumor cell-induced platelet aggregation. *Cancer Res.* **44**:450-456.
47. **Neelamegham, S., A.D. Taylor, A.R. Burns, C.W. Smith, and S.I. Simon.** 1998. Hydrodynamic shear shows distinct roles for LFA-1 and Mac-1 in neutrophil adhesion to intercellular adhesion molecule-1. *Blood* **92**:1626-1638.
48. **Nierodzik, M.L., A. Klepfish, and S. Karparkin.** 1995. Role of platelets, thrombin, integrin IIb-IIIa, fibronectin and von Willebrand factor on tumor adhesion in vitro and metastasis in vivo. *Thromb.Haemost.* **74**:282-290.

49. **Oleksowicz, L., J.P. Dutcher, F.M. Deleon, E. Paietta, and P. Etkind.** 1997. Human breast carcinoma cells synthesize a protein immunorelated to platelet glycoprotein-Ib alpha with different functional properties. *J.Lab.Clin.Med.* **129**:337-346.
50. **Oleksowicz, L., Z. Mrowiec, E. Schwartz, M. Khorshidi, J.P. Dutcher, and E. Puszkin.** 1995a. Characterization of tumor-induced platelet aggregation: the role of immunorelated GPIb and GPIIb/IIIa expression by MCF-7 breast cancer cells. *Thromb.Res.* **79**:261-274.
51. **Oleksowicz, L., Z. Mrowiec, E. Schwartz, M. Khorshidi, J.P. Dutcher, and E. Puszkin.** 1995b. Characterization of tumor-induced platelet aggregation: the role of immunorelated GPIb and GPIIb/IIIa expression by MCF-7 breast cancer cells. *Thromb.Res.* **79**:261-274.
52. **Ordinas, A., M. Diaz-Ricart, L. Almirall, and E. Bastida.** 1990. The role of platelets in cancer metastasis. *Blood Coagul.Fibrinolysis* **1**:707-711.
53. **Pearlstein, E., P.L. Salk, G. Yogeewaran, and S. Karpatkin.** 1980. Correlation between spontaneous metastatic potential, platelet-aggregating activity of cell surface extracts, and cell surface sialylation in 10 metastatic-variant derivatives of a rat renal sarcoma cell line. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **77**:4336-4339.
54. **Poggi, A., M. Stella, and M.B. Donati.** 1993. The importance of blood cell-vessel wall interactions in tumour metastasis. *Baillieres.Clin.Haematol.* **6**:731-752.
55. **Pottratz, S.T., T.D. Hall, W.M. Scribner, H.N. Jayaram, and V. Natarajan.** 1996. P-selectin-mediated attachment of small cell lung carcinoma to endothelial cells. *Am.J.Physiol.* **271**:L918-L923
56. **Reininger, A.J., J. Agneskirchner, P.A. Bode, Spannagl, and L.J. Wurzinger.** 2000. c7E3 Fab inhibits Low Shear Flow Modulated Platelet Adhesion to Endothelium and Surface-adsorbed Fibrinogen by Blocking Platelet GP IIb/IIIa as well as Endothelial Vitronectin Receptor. *Thromb.Haemost.* **83**:217-223.

57. **Reininger, A.J., M.A. Korndörfer, and L.J. Wurzinger.** 1998. Adhesion of ADP-activated platelets to intact endothelium under stagnation point flow in vitro is mediated by the integrin alphaIIb beta3. *Thromb.Haemost.* 54-61.
58. **Reininger, A.J., C.B. Reininger, and L.J. Wurzinger.** 1993. The influence of fluid dynamics upon adhesion of ADP-stimulated human platelets to endothelial cells. *Thrombosis Research* 245-249.
59. **Smith, T., Z. Yun, D.G. Menter, L.V. McIntire, and G.L. Nicolson.** 1996. Computerized analysis of tumor cell interactions with extracellular matrix proteins, peptides, and endothelial cells under laminar flow. *Biotechnol.Bioeng.* **50**:598-607.
60. **Steinbach, F., K. Tanabe, J. Alexander, M. Edinger, R. Tubbs, W. Brenner, M. Stockle, A.C. Novick, and E.A. Klein.** 1996. The influence of cytokines on the adhesion of renal cancer cells to endothelium. *J.Urol.* **155**:743-748.
61. **Stone, J.P. and D.D. Wagner.** 1993. P-selectin mediates adhesion of platelets to neuroblastoma and small cell lung cancer. *J.Clin.Invest.* **92**:804-813.
62. **Swaim, M.W., H.S. Chiang, and T.F. Huang.** 1996. Characterisation of platelet aggregation induced by PC-3 human prostate adenocarcinoma cells and inhibited by venom peptides, trigramin and rhodostomin. *Eur.J.Cancer* **32A**:715-721.
63. **Tang, D.G., Y.Q. Chen, P.J. Newman, L. Shi, X. Gao, C.A. Diglio, and K.V. Honn.** 1993. Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium. *J.Biol.Chem.* **268**:22883-22894.
64. **Timar, J., M. Trikha, K. Szekeres, R. Bazaz, J. Tovari, S. Silletti, A. Raz, and K.V. Honn.** 1996. Autocrine motility factor signals integrin-mediated metastatic melanoma cell adhesion and invasion. *Cancer Res.* **56**:1902-1908.
65. **Tozawa, K., S. Sakurada, K. Kohri, and T. Okamoto.** 1995. Effects of anti-nuclear factor kappa B reagents in blocking adhesion of human cancer cells to vascular endothelial cells. *Cancer Res.* **55**:4162-4167.

66. **Tozeren, A., H.K. Kleinman, D.S. Grant, D. Morales, A.M. Mercurio, and S.W. Byers.** 1995. E-selectin-mediated dynamic interactions of breast- and colon-cancer cells with endothelial-cell monolayers. *Int.J.Cancer* **60**:426-431.
67. **Trikha, M., J. Timar, S.K. Lundy, K. Szekeres, K. Tang, D. Grignon, A.T. Porter, and K.V. Honn.** 1996. Human prostate carcinoma cells express functional alphaIIb(beta)3 integrin. *Cancer Res.* **56**:5071-5078.
68. **Wojciechowski, P. and J.L. Brash.** 1991. The Vroman effect in tube geometry: the influence of flow on protein adsorption measurements. *J Biomater Sci Polymer Edn* **2**:203-216.
69. **Yoong, K.F., G. McNab, S.G. Hubscher, and D.H. Adams.** 1998. Vascular adhesion protein-1 and ICAM-1 support the adhesion of tumor-infiltrating lymphocytes to tumor endothelium in human hepatocellular carcinoma. *J Immunol.* **160**:3978-3988.
70. **Yoshida, N., T. Yoshikawa, S. Nakagawa, K. Sakamoto, Y. Nakamura, Y. Naito, and M. Kondo.** 1999. Effect of shear stress and a stable prostaglandin I<sub>2</sub> analogue on adhesive interactions of colon cancer cells and endothelial cells. *Clin.Exp.Immunol.* **117**:430-434.
71. **Yudoh, K., H. Matsui, and H. Tsuji.** 1997. Nitric oxide induced by tumor cells activates tumor cell adhesion to endothelial cells and permeability of the endothelium in vitro. *Clin.Exp.Metastasis* **15**:557-567.
72. **Zacharski, L.R., W.G. Henderson, Rickles, F.R., W.B. Forman, C.J. Cornell, R.J. Forcier, R. Edwards, Headly, E, S.H. Kim, J.R. O'Donnell, R. O'Dell, K. Tornoyos, and H.C. Kwaan.** 1981. Effect of warfarin on survival in small cell carcinoma of the lung. *JAMA* **245**:831-835.
73. **Zucchella, M., L. Dezza, L. Pacchiarini, F. Meloni, F. Tacconi, E. Bonomi, G. Grignani, and A. Notario.** 1989. Human tumor cells cultured "in vitro" activate platelet function by producing ADP or Thrombin. *Haematologica* **74**:541-545.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich einigen Personen meinen besonderen Dank aussprechen. Als Erstes möchte ich Herrn Prof. Dr. Wurzinger und PD Dr. Reiningger für Ihre fürsorgliche und äußerst kompetente Unterstützung bei schwierigen methodischen und anderen - im Verlauf der langen experimentellen Tätigkeit auftretenden - Fragen danken. Als nächstes möchte ich mich für die motivierende Unterstützung meiner experimentellen Tätigkeit durch Herrn Prof. Dr. Gratzl und Herrn Prof. Dr. Mayerhofer bedanken. Besonderer Dank gebührt Frau Tiefenbacher, die mir unermüdlich mit großer Hilfe zur Seite stand. Ausserdem möchte ich Herrn Bulling für seine große Hilfsbereitschaft bei EDV-Problemen sowie Herrn Mauermayer für seine phototechnische Unterstützung danken. Insgesamt möchte ich allen Mitarbeitern des Anatomischen Instituts der TUM für ihre Anregungen und Hilfe in manchen Fragen danken.

*Diese Arbeit ist Annette und Peter M. Bode gewidmet*