

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Onkologisches Zentrum - Universitäres Cancer Center Hamburg (UCCH)

Direktor:
Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer

Mikrovesikel-assoziiierter Tissue-Faktor: Bedeutung für die präoperative Diagnose des Ovarialkarzinoms

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Antonia Carlota Claussen
aus Bad Oldesloe

Hamburg 2017

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 29.06.2017**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. med. Florian Langer

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. Thomas Renné

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: -

Inhaltsverzeichnis

I.	Publikation	S. 4
II.	Darstellung der Publikation	S. 15
	1. Einleitung	S. 15
	2. Material und Methoden	S. 16
	3. Ergebnisse	S. 18
	4. Diskussion	S. 21
	5. Zusammenfassung / Conclusion	S. 24
	6. Abkürzungsverzeichnis	S. 25
	7. Literaturverzeichnis	S. 25
III.	Danksagung	S. 29
IV.	Erklärung des Eigenanteils an der Publikation	S. 30
V.	Lebenslauf	S. 31
VI.	Eidesstattliche Versicherung	S. 33

I. Publikation



Full Length Article

Microvesicle-associated tissue factor procoagulant activity for the preoperative diagnosis of ovarian cancer



Carlota Claussen^{a,1}, Alma-Verena Rausch^{b,1}, Susanne Lezius^c, Ali Amirkhosravi^d, Monica Davila^d, John L. Francis^d, Yohei M. Hisada^e, Nigel Mackman^e, Carsten Bokemeyer^a, Barbara Schmalfeldt^b, Sven Mahner^f, Florian Langer^{a,*}

^a II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Onkologisches Zentrum – Universitäres Cancer Center Hamburg (UCCH), Universitätsklinikum Eppendorf, Martinistr. 52, D-20246 Hamburg, Germany

^b Klinik und Poliklinik für Gynäkologie, Zentrum für Operative Medizin, Universitätsklinikum Eppendorf, Martinistr. 52, D-20246 Hamburg, Germany

^c Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie, Universitätsklinikum Eppendorf, Martinistr. 52, D-20246 Hamburg, Germany

^d Florida Hospital Center for Thrombosis Research, 2566 Lee Road, Winter Park, FL 32789, USA

^e University of North Carolina at Chapel Hill, 111 Mason Farm Road, 2312B Medical Biomolecular Research Building, Campus Box #7126, Chapel Hill, NC 27599, USA

^f Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Klinikum der Universität München (LMU), Campus Großhadern und Innenstadt, Marchioninistr. 15, 81377 München, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 November 2015

Received in revised form 29 February 2016

Accepted 1 March 2016

Available online 2 March 2016

Keywords:

Tissue factor

Ovarian cancer

Microvesicles

D-dimer

Venous thromboembolism

ABSTRACT

Background: Tissue factor (TF) is involved in tumor growth and metastasis and contributes to venous thromboembolism (VTE) in cancer, including gynecological malignancies. The diagnostic value of microvesicle-associated TF procoagulant activity (MV TF PCA) in women with suspected ovarian cancer, however, has not been studied. **Objective:** To evaluate MV TF PCA as a diagnostic tool in women with an ovarian mass of unknown etiology and as a predictive biomarker for perioperative VTE.

Methods: Plasma MVs were isolated by high-speed centrifugation and analyzed for TF-specific PCA by single-stage clotting assay. In addition, plasma TF antigen and soluble P-selectin (sCD62P) were measured by ELISA.

Results: D-Dimer, MV TF PCA, and sCD62P, but not the tumor marker, CA-125, significantly differentiated patients with malignant ($n = 40$) from those with benign tumors ($n = 15$) and healthy controls ($n = 34$). In cancer patients, only D-Dimer and CA-125 correlated with the FIGO stage. An abnormal D-dimer had the highest sensitivity for the diagnosis of cancer, while MV TF PCA above the ROC curve-derived cut-off value of 182 U/mL had the highest specificity. By multivariate logistic regression analysis, addition of MV TF PCA conferred diagnostic benefit to the single variables, CA-125 ($p = 0.052$) and D-dimer ($p = 0.019$). Perioperative VTE occurred in 16% of cancer patients and was associated with an advanced FIGO stage, but not MV TF PCA. There was no difference in plasma TF antigen levels between study groups.

Conclusions: MV TF PCA, but not plasma TF antigen, may provide valuable additional information for the diagnostic work-up of women with suspected ovarian cancer.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cancer is characterized by reciprocal interrelations between tumor biology, coagulation activation, and inflammation [1]. In particular, plasma levels of D-dimer, a plasmin-mediated split product of cross-linked fibrin that is commonly used as a marker of systemic coagulation activation, correlates with tumor burden, CA-125 serum levels, and clinical outcome in women with ovarian cancer [2–6]. We and others have previously shown that adding plasma D-dimer improves the

preoperative diagnostic accuracy of CA-125 serum levels when evaluating women with ovarian masses of unknown etiology [7,8].

Tissue factor (TF), the principal initiator of the extrinsic coagulation pathway, plays a critical role in both cancer progression (i.e. primary tumor growth, angiogenesis, and hematogenous metastasis) and cancer-associated clotting abnormalities such as venous thromboembolism (VTE) [1]. TF is variably expressed by primary tumor cells, most probably as a result from specific mutations in oncogenes and tumor suppressor genes, and by non-transformed cells of the tumor microenvironment [9]. Specifically, TF has been shown to be over-expressed in ovarian cancer specimens and to correlate with VTE occurrence in this gynecological malignancy [10–15]. TF is also released into the bloodstream in association with tumor cell- or leukocyte-derived microvesicles (MVs). Plasma levels of TF-bearing MVs are increased in patients with cancer, particularly in those with clinically relevant clotting disorders, and may be predictive of cancer-associated VTE

* Corresponding author at: II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Onkologisches Zentrum, Hubertus Wald Tumorzentrum – Universitäres Cancer Center Hamburg (UCCH), Universitätsklinikum Eppendorf, Martinistr. 52, D-20246 Hamburg, Germany.

E-mail address: flanger@uke.de (F. Langer).

¹ Equal contribution.

[16]. Besides being expressed as a full-length molecule on the surface of tumor cells, leukocytes, or plasma MVs, TF may also circulate as a truly soluble molecule, either as alternatively spliced TF (asTF) or, at least in theory, as (proteolytically) degraded TF [17,18].

Considering the pleiotropic functions of TF in carcinogenesis and tumor progression, the question arises of whether measurement of circulating TF, similar to the measurement of plasma D-dimer, has any value in the preoperative work-up of women with suspected ovarian cancer. In our previous study, we have used a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to quantify TF antigen levels in plasma [7]. In addition, we enumerated circulating TF-bearing MVs by flow cytometry and measured their TF-specific procoagulant activity by an in-house thrombin generation assay (TGA). Using these techniques, we could not find any diagnostic value of circulating TF in the preoperative differentiation of benign from malignant ovarian masses [7]. However, the qualitative nature of the TGA used in that study, which yields either a negative or positive test result, the type of plasma used for MV isolation (platelet-free instead of platelet-poor plasma), and the relatively low number of cancer patients in the total patient population (only 16% of study subjects received a final diagnosis of ovarian cancer) may have precluded a definitive conclusion on this issue.

In this study, we therefore aimed to further define the role of MV-associated TF procoagulant activity (MV TF PCA) in women with suspected ovarian cancer by using a highly sensitive, semi-quantitative, single-stage clotting assay. Our primary objective was to investigate, if a differentiation between benign and malignant tumors was possible based on the levels of MV TF PCA. Our secondary objective was to evaluate the usefulness of MV TF PCA as a predictive biomarker for perioperative VTE in this gynecological malignancy. In addition to MV TF PCA, we measured preoperative plasma levels of D-Dimer and soluble P-selectin, an inflammatory adhesion molecule stored inside platelet α -granules and released upon activation, to assess systemic hypercoagulability.

2. Materials and methods

2.1. Patients

The study protocol was approved by the local ethics committee of the city of Hamburg, Germany (no. 2794). All patients and controls provided written informed consent. Patients were eligible for participation in the study if they had an adnexal mass of unknown etiology that required exploratory laparotomy or laparoscopy. Patients were recruited in the Department of Gynecology of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany, between September 2012 and August 2013. Exclusion criteria were severe renal or hepatic failure, major surgical interventions within the previous 4 weeks, acute infections, and any indication for systemic anticoagulation other than VTE (e.g. atrial fibrillation or mechanical heart valves). All patients received postoperative pharmacological thromboprophylaxis with low-molecular weight heparin (40 mg of enoxaparin subcutaneously per day) that was carried out for at least 3–4 weeks in cases of cancer surgery. Six weeks after surgery, patients were contacted by telephone to obtain information on either established diagnoses or clinical signs and symptoms of VTE.

2.2. Blood sampling and processing

Preoperative blood was drawn into plastic tubes prefilled with 3.2% (0.109 M) sodium citrate by puncture of an antecubital vein under no or minimal stasis. Within 2 h of collection, samples were centrifuged for 18 min at 4000 rpm (1200 $\times g$) to obtain platelet-poor plasma (PPP), which was snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. If patients had received low-molecular weight heparin for VTE prophylaxis or treatment, blood samples were obtained no earlier than 12 or 24 h after the last injection, respectively.

2.3. Measurement of MV TF PCA

A previously described single-stage clotting assay was used to measure MV-associated TF procoagulant activity (MV TF PCA) [19]. Briefly, thawed plasma samples (2×1 mL in 1.5-mL plastic tubes) were centrifuged for 60 min at $16,100 \times g$ in an Eppendorf microcentrifuge. Plasma supernatants were discarded and MV pellets were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS). Following another high-speed centrifugation, resuspended MV pellets from individual patients were pooled and subsequently divided into two 333- μL aliquots (corresponding to one third of the original plasma volume). Inhibitory TF monoclonal antibody, no. 4509 (Sekisui Diagnostics), or control IgG (Sigma-Aldrich) were added (final concentration, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and incubated for 30 min at room temperature. After mixing 100 μL of the MV suspension with 100 μL of normal human plasma in the cuvettes of a KC10 coagulation instrument (Amelung) for 2 min at 37°C , CaCl_2 was added at 5 mM and times until fibrin clot formation were recorded. All measurements were carried out in triplicate. Clotting times were referred to a standard curve obtained by serial dilutions (1:10–1:10,000) of lipidated recombinant human TF (Innovin[®]; Dade Behring) and converted into arbitrary activity units. TF-specific PCA was calculated by subtracting results obtained in the presence of anti-TF from those obtained in the presence of control IgG.

In a subgroup of ten study subjects, isolated MVs were analyzed using both the single-stage clotting assay and the previously described TGA [7]. In additional experiments, citrate-anticoagulated whole blood from five healthy volunteers was incubated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bacterial lipopolysaccharide (LPS; *Escherichia coli* serotype O111:B4; Sigma-Aldrich) for 5 h at 37°C before MVs were isolated from prepared PPP by high-speed centrifugation [20]. Non-treated plasma was obtained immediately after blood drawing. TF antigen in PPP was measured by ELISA (see below) and TF-specific activity was measured using a chromogenic FXa generation endpoint assay as described [20].

Table 1
Demographic and clinical patient characteristics and median levels of biomarkers.

Parameter	Cancer	Benign	Healthy
n	40	15	34
Age, years	59 $\pm$ 14	50 $\pm$ 18	53 $\pm$ 16
Cancer histology, n (%)			
Serous papillary (cyst) adenocarcinoma	32 (80.0)		
Endometrioid carcinoma	4 (10.0)		
Granulosa cell tumor	2 (5.0)		
Mucinous cystadenocarcinoma	1 (2.5)		
Clear cell carcinoma	1 (2.5)		
FIGO stage, n (%)			
I	8 (20.0)		
II	1 (2.5)		
III	24 (60.0)		
IV	7 (17.5)		
I/II (localized)	9		
III/IV (advanced)	31		
Perioperative VTE, n (%) ^a	6 (16)		
DVT	1		
PE	4		
DVT + PE	1		
Khorana score, n (%)			
1–2 (intermediate risk)	31 (77.5)		
≥ 3 (high risk)	9 (22.5)		
Biomarkers, median			
D-dimer (mg/L)	1.70	0.70	0.32
sCD62P (ng/mL)	65	41	41
MV TF PCA (U/mL)	348	118	66
CA-125 (U/mL)	405	155	n. a.

Abbreviations are as follows (in alphabetical order): DVT, deep vein thrombosis; FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics; n. a., not applicable; PE, pulmonary embolism; VTE, venous thromboembolism.

^a Only 38 cancer patients were eligible for VTE assessment.

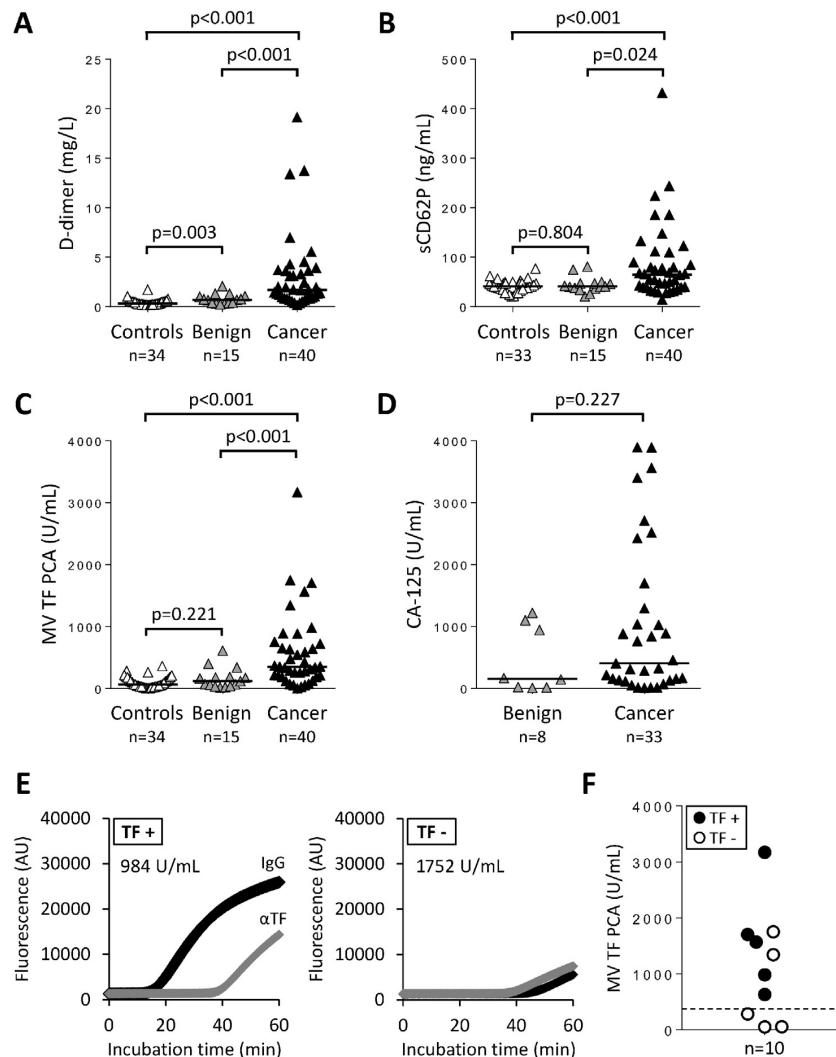


Fig. 1. Levels of hemostatic activation markers and CA-125 in patients with ovarian cancer. Preoperative plasma levels of D-dimer (A), soluble P-selectin (sCD62P, B), microvesicle-associated tissue factor procoagulant activity (MV TF PCA, C), and serum levels of the tumor marker, CA-125 (D), in patients with ovarian cancer as compared to patients with benign tumors and healthy controls. Horizontal lines indicate median levels. The sCD62P plasma level was not available for one healthy control, whereas the serum CA-125 level had not been determined in routine clinical practice in seven patients with benign tumors and seven patients with ovarian cancer. P values are according to Mann-Whitney U test. (E) and (F) In a subgroup of ten study subjects, the single-stage clotting was compared with the thrombin generation assay (TGA) for the assessment of MV-associated TF PCA. Two representative TGA tracings indicating a positive (TF+) and a negative finding (TF-) with corresponding MV TF PCA levels in U/mL (as measured by the clotting assay) are shown in (E), whereas findings of all ten subjects are summarized in (F). Open and filled symbols indicate negative and positive findings by TGA, respectively. The dashed line is set at the highest level of MV TF PCA measured in healthy controls (n = 34). AU denotes arbitrary units and αTF denotes inhibitory TF monoclonal antibody.

2.4. Measurement of plasma D-dimer

Plasma D-dimer was measured using the Innovance® D-dimer test on a BCS® coagulation analyzer (Siemens Healthcare). In this assay, the cut-off value for the exclusion of acute VTE is 0.5 mg/L.

2.5. Measurement of sCD62P and TF antigen

Plasma antigen levels of soluble P-selectin (sCD62P) and TF were measured using commercially available enzyme-linked immunosorbent assays (Quantikine®; R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. TF antigen levels were measured in both PPP and plasma supernatants after centrifugation of PPP for 90 min at

100,000 × g at 10 °C. Recombinant human asTF, which was used to test the specificity of the TF ELISA, was kindly provided by Vladimir Bogdanov (University of Cincinnati, Cincinnati, OH).

2.6. Statistical analysis

Data were presented as mean ± standard deviation (SD) if normally distributed, or as median and (interquartile) range if non-normally distributed. Pairwise comparisons were performed using the Mann-Whitney U test (for independent samples) or the Wilcoxon matched-pairs signed rank test (for related samples). Correlation coefficients (r) were according to the method of Spearman. To determine optimal cut-off values for MV TF PCA and sCD62P, receiver operating characteristic (ROC) curves were used. The association between dichotomized

variables (categorized using the respective cut-off values) and the presence of malignancy was analyzed using the two-sided Fisher's exact test. For the combination of variables, sensitivity, specificity, negative (NPV) and positive predictive value (PPV), and association with malignancy were determined for the new dichotomous variable "both parameters are above the cut off" vs. "at least one parameter is not above the cut off". To assess the additional benefit of the second parameter in a combined analysis, logistic regression models with two independent dichotomous variables were used.

To compare single variables with regards to the prediction of cancer, the areas under the curves (AUCs) of the respective ROCs were calculated for all complete cases and compared according to Hanley and McNeil [21]. A p value of <0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using IBM SPSS-Statistics, version 21, 22, and 23, or GraphPad Prism® software.

3. Results

3.1. Patients

In total, 55 patients with ovarian masses, all of whom underwent exploratory surgery, and 34 healthy age- and sex-matched controls were included in the study. Patient characteristics are shown in Table 1. Fifteen patients had benign tumors, whereas 40 patients received a final diagnosis of ovarian cancer. The majority of patients (80%) had papillary serous (cyst) adenocarcinoma. Histologies of benign tumors included ovarian fibroma ($n = 5$), borderline tumor ($n = 3$), dermoid cyst/teratoma ($n = 3$), mucinous cystadenoma ($n = 2$), and ovarian cyst ($n = 2$).

According to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) staging system, eight patients had stage I, one patient had stage II, 24 patients had stage III, and seven patients had stage IV disease. Consequently, 22.5% and 77.5% of cancer patients had more localized (i.e. FIGO stage, I/II) and advanced disease (i.e. FIGO stage, III/IV), respectively.

There were no significant differences in cardiovascular risk factors (i.e. body mass index, arterial hypertension, diabetes mellitus, hypercholesterolemia, and smoking habits) between the study groups (not shown). Of the 40 patients with ovarian cancer, 28 (70%) were postmenopausal. In the group of patients with benign tumors and in the healthy control group, 60% and 47% of women, respectively, were postmenopausal.

3.2. Levels of hemostatic activation markers

Preoperative levels of D-dimer, sCD62P, and MV TF PCA in the three study groups are shown in Fig. 1 and median levels are reported in Table 1. All three hemostatic activation markers were significantly increased in patients with cancer as compared to healthy controls and patients with benign tumors (Fig. 1A–C). While D-dimer plasma levels were slightly, but statistically significantly higher in patients with benign tumors than in healthy controls (Fig. 1A), no differences between the two groups were found with regard to sCD62P (Fig. 1B) and MV TF PCA (Fig. 1C). Importantly, there was no significant difference in CA-125 serum levels between patients with benign and those with malignant tumors ($p = 0.227$), although values of the tumor marker were only available for 53% and 83% of the patients, respectively (Fig. 1D).

Because our current finding of increased MV TF PCA in patients with ovarian cancer conflicted with that of our previous study [7], we compared the single-stage clotting with the thrombin generation assay (TGA) in a subgroup of ten study subjects. Although the TGA yielded a negative result (i.e. no TF-specific activity detectable) in all three study subjects with low MV TF PCA and a positive result (i.e. TF-specific activity detectable) in the subject with high MV TF PCA, it did not detect MV-associated TF-specific activity in two of the six study subjects with moderate-to-high MV TF PCA (Fig. 1E,F). These findings suggest that the qualitative nature of the TGA used in our previous study is

associated with a proportion of false-negative results when compared to the semi-quantitative clotting assay.

Within the group of cancer patients ($n = 40$), plasma D-dimer significantly correlated with sCD62P ($r = 0.40$, $p = 0.011$) and CA-125 ($r = 0.52$, $p = 0.002$), but not with MV TF PCA ($r = 0.24$, $p = 0.129$). When patients with benign tumors were included ($n = 55$), significant correlations were found for all three parameters: $r = 0.49$ for sCD62P ($p < 0.001$) and CA-125 ($p = 0.001$) and $r = 0.43$ for MV TF PCA ($p = 0.001$). In the total study cohort ($n = 89$), correlation coefficients were 0.54 for sCD62P and 0.53 for MV TF PCA ($p < 0.001$).

3.3. Correlation of hemostatic activation markers with tumor stage

Because only one patient had ovarian cancer stage II, patients with more localized tumors (i.e. FIGO stage, I/II) were grouped and compared to those with more advanced disease (i.e. FIGO stage III or IV). According to this classification, only serum CA-125 and plasma D-dimer, but not sCD62P and MV TF PCA, significantly correlated with the FIGO stage (Fig. 2), although there was a trend towards higher sCD62P plasma levels in patients with advanced stage ovarian cancer (Fig. 2C).

3.4. Diagnostic value of hemostatic activation markers

To evaluate the usefulness of hemostatic activation markers for the preoperative diagnosis of ovarian cancer, we determined appropriate cut-off values for sCD62P and MV TF PCA by ROC curve analysis using the complete data set, because these two parameters are not commonly used in clinical practice. For D-dimer and CA-125, however, the upper limits of established normal reference ranges were used (i.e. 0.5 mg/L for D-dimer and 35 U/mL for CA-125). According to this definition, an abnormal plasma D-dimer had the highest sensitivity and negative predictive value (NPV), whereas MV TF PCA above 182 U/mL and an abnormal CA-125 had the highest specificity and positive predictive value (PPV), respectively (Table 2). Importantly, applied cut-off values for D-dimer, sCD62P, and MV TF PCA, but not for CA-125, yielded a statistically significant separation regarding the health status of the study subject (i.e. "cancer" vs. "benign/healthy").

Next, we investigated the usefulness of combined biomarkers for the preoperative diagnosis of ovarian cancer. When the tumor marker, CA-125, was combined with either one of the three hemostatic activation markers, the test result "both parameters above the cut off" showed a statistically significant association with the presence of cancer, with positive predictive values (PPVs) exceeding 90% (Table 2). Using a logistic regression model, trends towards an additional benefit were found for D-dimer ($p = 0.051$) and MV TF PCA ($p = 0.052$).

In clinical practice, the risk of malignancy index (RMI), which incorporates menopausal status, serum CA-125, and ultrasound findings, is used to predict the likelihood of ovarian cancer in women with adnexal masses. Compared to the original scoring system, RMI 1, the revised scoring system, RMI 2, gives greater weight to ultrasound findings and menopausal status and has been shown to be more reliable in discriminating benign from malignant ovarian disease [22]. Similar to the tumor marker, CA-125, the RMI 2 alone did not yield a statistically significant separation regarding the health status of the study subject (Table 2). The most likely explanation for this finding is the relatively small sample size (i.e. no healthy controls were included in the analysis) and the fact that patients had already been referred to a specialized center because of a high suspicion of ovarian cancer. Combination with D-dimer, sCD62P or MV TF PCA improved the test characteristics of the RMI 2, with trends towards an additional benefit for D-dimer ($p = 0.08$) and MV TF PCA ($p = 0.055$) (Table 2). When comparing individual ROC curves of the three hemostatic activation markers with that of the RMI 2 in patients with a complete data set (i.e. with no variable missing), the prediction of ovarian cancer was significantly improved using D-dimer ($p = 0.039$) and tended to be improved using MV TF PCA ($p = 0.071$) (Table 3).

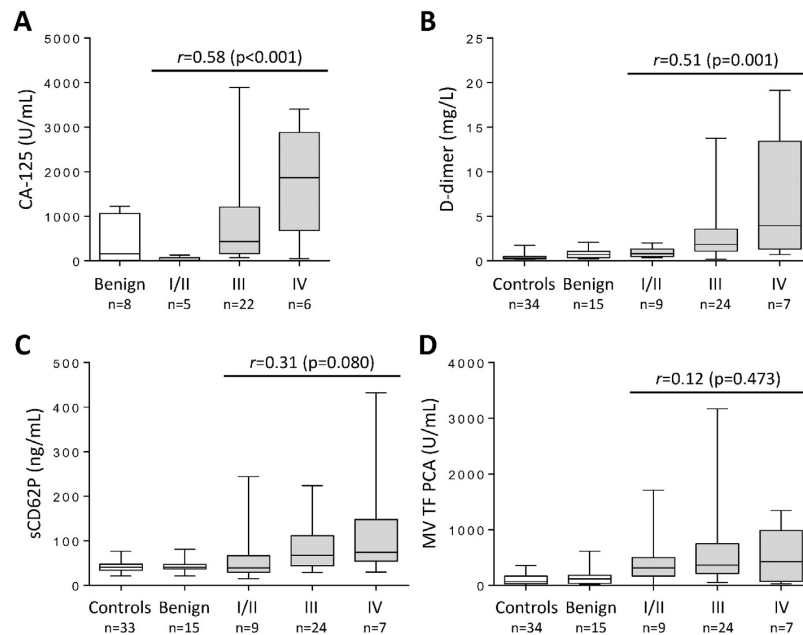


Fig. 2. Correlation of hemostatic activation markers and CA-125 with the tumor stage. Due to the low number of patients with more localized disease, patients with FIGO stage I or II ovarian cancer were grouped in one category. Boxes and whiskers indicate median and (interquartile) range. CA-125 serum levels were not available for seven patients with benign tumors and seven patients with ovarian cancer, whereas the sCD62P plasma level was missing for one control subject. Correlation coefficients (r) and p values are according to the method of Spearman.

Collectively, these findings indicate that the diagnostic value of CA-125 and the RMI 2 in the preoperative work-up of women with ovarian masses may be improved by the additional assessment of hemostatic activation markers, in particular D-dimer and MV TF PCA. Importantly, D-dimer plasma levels significantly correlated with the FIGO stage in patients with proven ovarian cancer, whereas no such correlation was found for MV TF PCA (Fig. 2), suggesting that both parameters provided complementary information. Consistent with this hypothesis, adding

MV TF PCA to D-dimer yielded a statistically significant benefit in the preoperative diagnosis of ovarian cancer ($p = 0.019$) (Table 2).

3.5. Correlation of hemostatic activation markers with perioperative VTE

Complete follow-up was not available for two patients with ovarian cancer. Of the 38 evaluable cancer patients, six (16%) experienced perioperative venous thromboembolism (VTE), including one isolated deep

Table 2

Sensitivity, specificity, negative (NPV), and positive predictive value (PPV) for biomarkers and the revised risk of malignancy index (RMI 2) in the preoperative diagnosis of ovarian cancer. For combined variables, test characteristics were calculated for “both parameters are abnormal” (i.e. above the cut off). All values exceeding 90% are highlighted in bold. In categories with multiple values, the highest value is underlined. The RMI 2 was calculated according to Morgante et al. [22] using a cut-off value of 125 to discriminate benign from malignant ovarian disease.

Parameter	Cut off	Sensitivity	Specificity	NPV	PPV	p value ^a	p value ^b
Single variables							
Biomarkers							
CA-125	35 U/mL	87.9%	37.5%	42.9%	85.3%	0.120	
D-dimer	0.5 mg/L	92.5%	63.3%	91.2%	67.3%	<0.001	
sCD62P	42.5 pg/mL	70.0%	56.3%	69.2%	57.1%	0.018	
MV TF PCA	182 U/mL	80.0%	<u>77.6%</u>	82.6%	74.4%	<0.001	
Clinical scoring system							
RMI 2	125	97.0%	25.0%	66.7%	84.2%	0.092	
Combined variables							
Biomarkers							
CA-125 + D-dimer	–	<u>84.8%</u>	62.5%	50.0%	90.3%	0.013	0.051
CA 125 + sCD62P	–	66.7%	75.0%	35.3%	91.7%	0.049	0.130
CA-125 + MV TF PCA	–	72.7%	75.0%	40.0%	92.3%	0.035	0.052
D-dimer + sCD62P	–	67.5%	79.2%	74.5%	<u>73.0%</u>	<0.001	0.109
D-dimer + MV TF PCA	–	77.5%	<u>89.8%</u>	<u>83.0%</u>	86.1%	<0.001	0.019
MV TF PCA + sCD62P	–	55.0%	87.5%	70.0%	78.6%	<0.001	0.100
Clinical scoring system							
RMI 2 + D-dimer	–	90.9%	50.0%	57.1%	88.2%	0.018	0.080
RMI 2 + sCD62P	–	66.7%	<u>75.0%</u>	35.3%	91.7%	0.049	0.137
RMI 2 + MV TF PCA	–	78.8%	<u>75.0%</u>	46.2%	92.9%	0.007	0.055

^a The p value corresponds to the association of abnormal values with malignancy (Fisher's exact test).

^b The p value corresponds to the additional benefit of the second (i.e. right-sided) variable (respective p value of multivariate logistic regression analysis).

Table 3

Comparative ROC curve analysis. Area under the curve (AUC) and corresponding 95% confidence intervals (CIs) for the receiver operating characteristic (ROC) curves of the respective biomarkers and the risk of malignancy index (RMI 2) for complete cases are shown; *p* values represent the comparison of the respective AUC to the AUC of CA-125 and RMI 2 [21].

Parameter	AUC	95% CI	vs. CA-125	vs. RMI 2
CA-125	0.640	0.418–0.862		
RMI 2	0.580	0.334–0.826		
D-dimer	0.830	0.703–0.956	<i>p</i> = 0.081	<i>p</i> = 0.039
sCD62P	0.688	0.519–0.856	<i>p</i> = 0.726	<i>p</i> = 0.475
MV TF PCA	0.833	0.703–0.964	<i>p</i> = 0.135	<i>p</i> = 0.071

vein thrombosis (DVT) and five pulmonary embolisms (PEs) (Tables 1 and 4). The isolated DVT and one of the PEs occurred preoperatively, whereas all other events were diagnosed within 6 weeks after surgery, two of them occurring during combination chemotherapy (Table 4). All patients with perioperative VTE had advanced disease, i.e. FIGO stage III or IV (*p* = 0.041 according to Mann-Whitney *U* test). In contrast, VTE occurrence was associated neither with the tumor marker, CA-125 (Fig. 3A), nor with any of the investigated hemostatic activation markers (Fig. 3B–D). In addition, no association was found between perioperative VTE and two markers of systemic inflammation, plasma fibrinogen (Fig. 3E) and C-reactive protein (CRP) (Fig. 3F).

In cancer patients receiving ambulatory chemotherapy, the risk of VTE can be predicted using a validated risk assessment tool, the so-called Khorana score, which includes site of cancer, hematological parameters (i.e. platelet and leukocyte counts and hemoglobin level), and body mass index [23]. A summary score of <3 is associated with a low-to-intermediate risk, whereas a summary score of ≥3 is associated with a high risk of VTE within the first 2 months of chemotherapy. In our study, the Khorana score was not associated with the occurrence of perioperative VTE, with only two VTE patients having a score of ≥3 (not shown). When correlating the Khorana score with individual laboratory parameters, significant findings were found for sCD62P and fibrinogen, while there were only trends towards higher D-dimer and CRP levels in patients with a Khorana score of ≥3 (Fig. 4).

3.6. Plasma TF antigen

In our previous study, we did not find a significant difference in plasma TF antigen levels between patients with ovarian cancer and those with benign tumors or healthy controls using the IMUBIND® TF ELISA (Sekisui Diagnostics) [7]. In that study, we measured TF antigen in platelet-poor plasma (PPP), which contained both MV-associated and soluble TF. To investigate if quantification of soluble TF antigen provides any additional information in our current study, we essentially depleted all patient and control plasmas of phospholipid vesicles by ultracentrifugation (90 min at 100,000 × *g*). Again, we did not find a significant difference in TF antigen levels between cancer patients and the other two groups (Fig. 5A).

Next, we explored if ultracentrifugation resulted in a significant loss of TF antigen from the plasma of cancer patients. To this end, plasma TF antigen was measured both before and after ultracentrifugation in a subgroup of 17 cancer patients with available plasma samples. TF antigen levels remained essentially unchanged in these patients (Fig. 5B), suggesting that MV-associated TF did not substantially contribute to the signal picked up by the commercial Quantikine® TF ELISA (R&D Systems). Consistently, we did not find a significant correlation between MV TF PCA and TF antigen in non-ultracentrifuged PPP samples (Fig. 5C).

Because these findings raised the possibility that the commercial TF ELISA applied in our current study did not detect MV-associated TF antigen, we used a previously described ex vivo model of LPS-induced TF generation to address this issue [20]. First, we confirmed that treatment of citrate-anticoagulated whole blood from five healthy volunteers with LPS resulted in the shedding of TF-bearing plasma MVs, as assessed by a chromogenic FXa generation assay after isolation of MVs from PPP (Fig. 5D). Next, we measured TF antigen in the original PPP samples (i.e. before MV isolation) and could not find a difference in the levels of TF antigen between plasmas from control and LPS-treated whole blood (Fig. 5E). Furthermore, we could not detect a positive signal with this ELISA from plasma MVs isolated from LPS-treated whole blood (suspended in buffer) or lipidated recombinant human full-length TF, Innovin® (suspended in either buffer or plasma at 0–200 pg/mL). Collectively, these findings indicate that the commercial ELISA, when used according to the manufacturer's instructions, does not detect lipidated (i.e. MV-associated) TF antigen at (patho)physiologically relevant concentrations.

The commercial TF ELISA used in our current study (Quantikine®) is calibrated against recombinant human TF spanning the extracellular domain, which is encoded by exons 2–5 of the *F3* gene and comprises amino acid residues 1–219. In contrast to lipidated full-length TF (residues 1–263), this molecule is soluble in water and does not require detergent to be extracted from lipid membranes. Residues 1–165 of asTF, encoded by exons 1–4 of the *F3* gene, are identical to those of full-length TF, whereas residues 166–206 form a unique C-terminus. Because this molecule lacks a transmembrane domain rendering it soluble in water, we investigated if asTF accounted for at least some of the signal picked up by the ELISA. However, <0.5% of the expected antigen concentration was detected, when recombinant human asTF was subjected to the ELISA (Fig. 5F).

4. Discussion

The main and novel findings of our current study are that levels of MV TF PCA are increased in women with ovarian cancer and that combined analysis of plasma D-dimer and MV TF PCA may provide valuable additional information in the preoperative diagnosis of this gynecological malignancy.

Our observation that plasma D-dimer correlates with tumor burden (i.e. the FIGO stage) is consistent with previous reports on women with ovarian cancer [2–6]. In fact, elevated plasma D-dimer is a characteristic

Table 4

Clinical characteristics and levels of hemostatic activation markers and CA-125 in patients experiencing perioperative VTE.

ID	VTE	FIGO stage	MV TF PCA (U/mL)	TF PPP (pg/mL)	TF SN (pg/mL)	CA-125 (U/mL)	D-dimer (mg/L)	sCD62P (ng/mL)
15	PE four weeks before surgery	IV	984	149	135	2709	19.2	432
22	PE three weeks after surgery (before CTX)	IV	429	13	15	2426	13.4	74
26	PE three days after surgery (before CTX)	III	586	8	9	3561	5.5	80
39	Bilateral DVT + PE six weeks after surgery (during CTX)	III	653	20	22	288	0.5	35
42	DVT five months before surgery	IV	27	n. d.	44	50	1.3	55
51	PE five weeks after surgery (during CTX)	III	184	n. d.	20	215	1.4	29

Abbreviations are as follows (in alphabetical order): CTX, chemotherapy (paclitaxel, carboplatin, bevacizumab); DVT, deep vein thrombosis; FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics; MV, microvesicle; PCA, procoagulant activity; PE, pulmonary embolism; PPP, platelet-poor plasma; SN, supernatant; TF, tissue factor; VTE, venous thromboembolism.

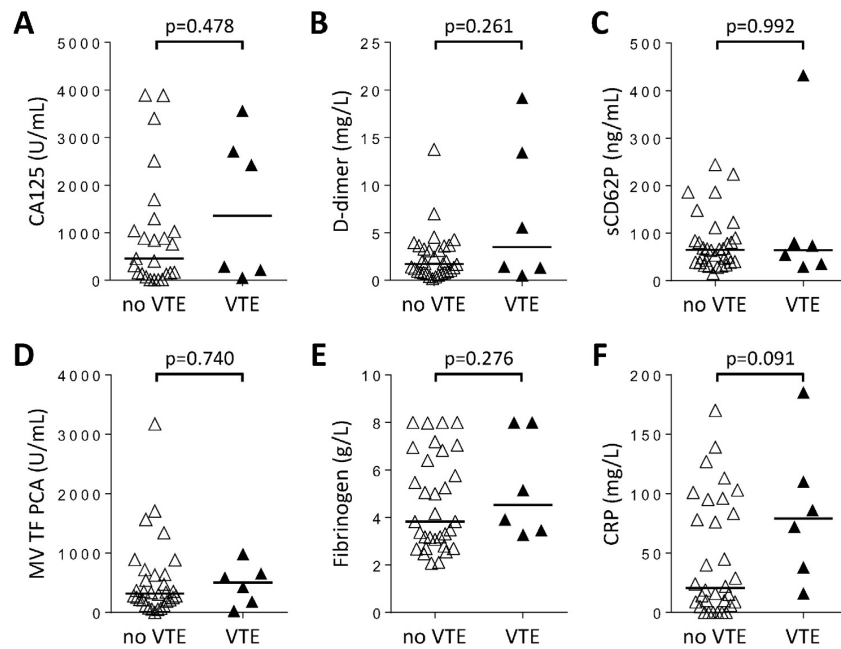


Fig. 3. Levels of CA-125, hemostatic activation markers, fibrinogen, and C-reactive protein (CRP) in cancer patients with and without perioperative venous thromboembolism (VTE). Horizontal lines indicate median levels. CA-125 serum levels were not available for seven patients. *P* values are according to Mann-Whitney *U* test.

feature in most patients with advanced solid malignancies [24–28]. A similar association is known for the tumor marker, CA-125, which is typically elevated in women with advanced ovarian cancer. Consistently, both parameters were strongly associated with the FIGO stage and showed a significant correlation with each other in our current

study (Fig. 2). However, the clinical usefulness of CA-125 as a screening tool for ovarian cancer is hampered by its lack of specificity (i.e. elevated serum levels may be found in non-malignant ovarian, peritoneal or pleural disorders) and the fact that levels may be normal in a significant proportion of women with early-stage cancers [29].

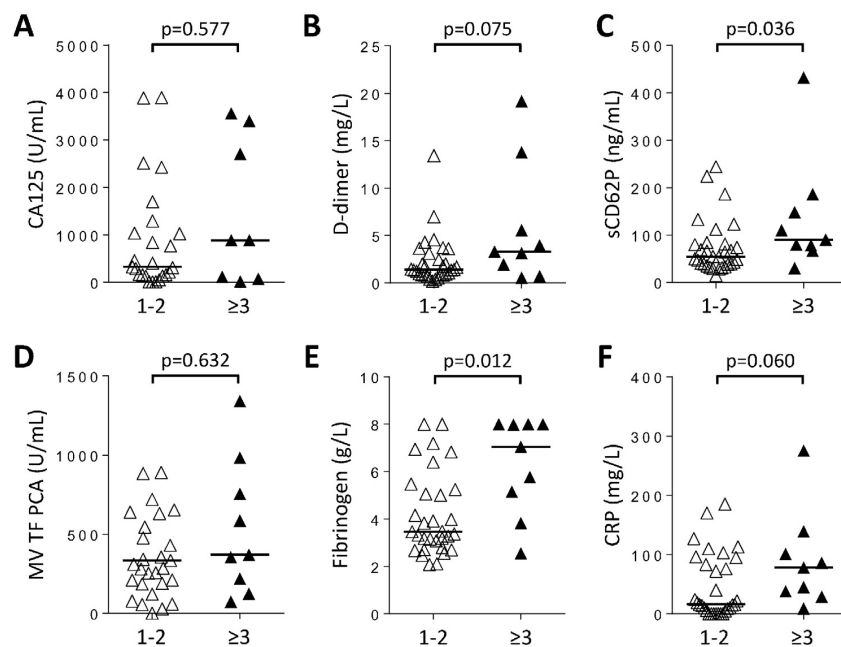


Fig. 4. Levels of CA-125, hemostatic activation markers, fibrinogen, and C-reactive protein (CRP) in cancer patients in relation to their Khorana score. Horizontal lines indicate median levels. CA-125 serum levels were not available for seven patients. In cancer patients receiving ambulatory chemotherapy, a Khorana score of <3 indicates a low-to-intermediate risk of venous thromboembolism (VTE), whereas a score of ≥3 indicates a high risk of VTE. *P* values are according to Mann-Whitney *U* test.

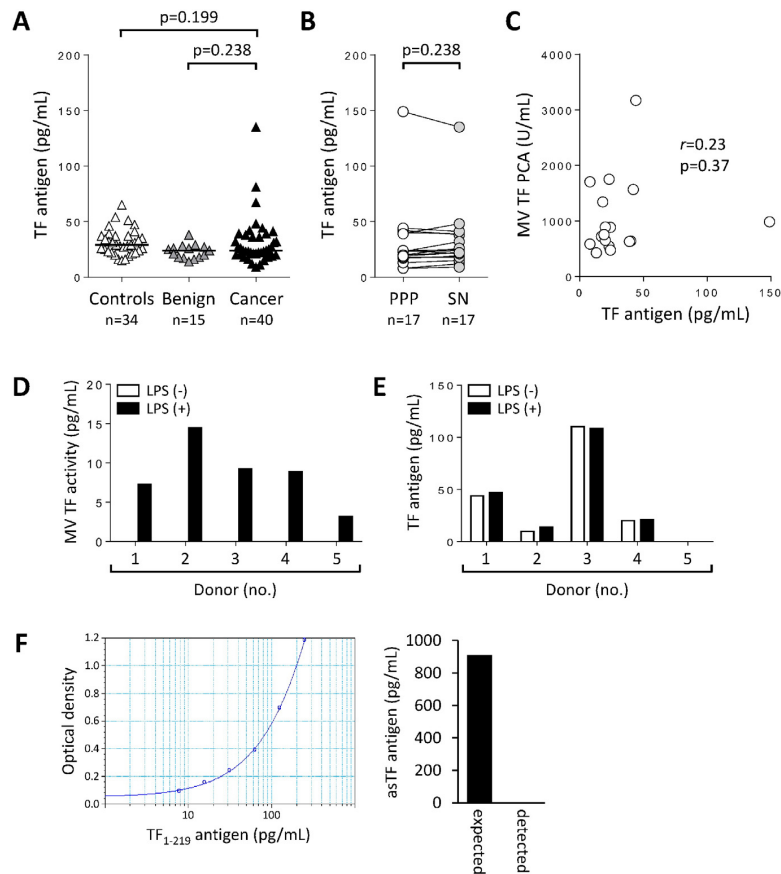


Fig. 5. Plasma TF antigen is not increased in patients with ovarian cancer. (A) TF antigen was measured in supernatants of ultracentrifuged plasma samples from healthy controls and patients with ovarian cancer or benign tumors. Horizontal lines indicate median levels. *P* values are according to Mann-Whitney *U* test. (B) In a subgroup of 17 patients with available plasma samples, TF antigen was measured in both platelet-poor plasma (PPP) and supernatants (SN) of ultracentrifuged plasma samples. *P* value is according to Wilcoxon matched-pairs signed rank test. (C) Correlation between MV TF PCA and TF antigen in platelet-poor plasma from patients with ovarian cancer ($n = 17$). Correlation coefficient (r) and *p* value are according to the method of Spearman. (D) In five healthy donors, MVs were isolated from prepared PPP following stimulation of whole blood with LPS for 5 h at 37 °C and analyzed for TF activity by a previously described chromogenic FXa generation assay [20]. (E) TF antigen was also measured in PPP by ELISA. (F) Recombinant human asTF is not detected by the commercial TF ELISA, which is calibrated against recombinant human soluble TF spanning the extracellular domain (TF₁₋₂₁₉). The standard curve (left panel) and findings after dissolving 200 pg of asTF in 220 µL buffer (right panel) are shown.

The finding that sCD62P levels are increased in women with ovarian cancer (Fig. 1B) is consistent with a state of systemic coagulation activation and inflammation, and a trend towards higher sCD62P levels in women with more advanced disease further supports this hypothesis (Fig. 2C). In contrast, MV TF PCA, although dramatically increased in the group of cancer patients (Fig. 1C), did not show an obvious association with tumor stage (Fig. 2D). This observation may indicate that shedding of TF-bearing MVs in ovarian cancer is regulated by tumor characteristics other than tumor mass. For instance, the release of MV-associated TF has been shown to be dependent on specific oncogenes and tumor suppressor genes [9] and is specifically regulated by the actin-binding protein, filamin-A, and protease-activated receptors in clear-cell ovarian carcinoma [30].

Although MV TF PCA significantly correlated with plasma D-dimer in the total study cohort ($r = 0.53$, $n = 89$) and in patients undergoing surgery ($r = 0.43$, $n = 55$), no such correlation was found in the subgroup of patients with ovarian cancer ($r = 0.24$, $n = 40$). Similar observations were made in a previous study, in which MV-associated TF activity correlated with plasma D-dimer in patients with pancreatic, but not in those with colorectal, stomach or brain cancer [31]. It could be speculated that, at least in some tumor entities, TF expressed in primary tumors or metastatic foci significantly contributes to systemic

coagulation activation and that the degree of fibrin generation and degradation is substantially influenced by other, TF-independent factors such as carcinoma mucins or activators of the intrinsic coagulation pathway [32,33].

Nevertheless, based on the findings presented here, a two-step diagnostic approach may be warranted in future studies: in women presenting with ovarian masses of unknown etiology, a normal plasma D-dimer is associated with a high NPV (i.e. a low likelihood of ovarian cancer). These patients may either be observed (watch-and-wait strategy) or surgically treated in a non-specialized center. In women with an abnormal plasma D-dimer, however, further testing for CA-125 and MV TF PCA may help to identify those patients with a high likelihood of ovarian malignancy who benefit from transfer to a specialized center with extensive experience in gynecological cancer surgery. Using an identical D-dimer cut-off value of 0.5 mg/L, Worasethsin and Narkwichan [8] have calculated values for sensitivity (91.8%), specificity (71.9%), NPV (95.2%), and PPV (58.9%) for the preoperative diagnosis of ovarian cancer in 200 women with adnexal masses that were quite similar to those of our current study (Table 2).

D-dimer and MV TF PCA also tended to improve a more complex diagnostic algorithm, the RMI 2, which incorporates the tumor marker, CA-125, and other clinically relevant information (i.e. the menopausal

status and ultrasound findings). Future studies should further investigate, how (additional) assessment of hemostatic activation markers compares to the OVA1® (ASPiRA LABS®, Vermillion Inc.), an FDA-cleared blood test exclusively based on the levels of five ovarian cancer biomarkers (i.e. apolipoprotein A1, β_2 -microglobulin, CA-125, prealbumin, and transferrin).

The measurement of MV TF PCA is technically demanding and far from being standardized. It is therefore of utmost importance to critically evaluate the various methodologies used for MV TF PCA assessment, especially if seemingly discrepant findings are reported in independent studies. In our previous study, we used a qualitative thrombin generation assay (TGA) to measure TF activity of MVs isolated from platelet-free plasma (PFP) [7]. MV-associated TF-dependent PCA was detected in 10% (3/30), 23% (17/75), and 30% (6/20) of healthy controls, patients with benign tumors, and patients with malignant tumors, respectively. Although MV TF PCA was more likely to be detected in patients with ovarian cancer, these findings did not reach statistical significance. Compared to the single-stage clotting assay applied in our current study or other semi-quantitative tests such as the previously described chromogenic FXa generation assay [20], the TGA may have not been sensitive enough to pick up subtle differences in circulating MV TF PCA. Our findings obtained in a subgroup of ten patients with parallel assessment of MV-associated TF activity (i.e. by TGA and single-stage clotting assay) may support this hypothesis (Fig. 1E,F). Furthermore, the use of PFP instead of PPP has been shown to result in a significant loss of MV TF PCA [20], which may have further decreased the sensitivity of the TGA in our previous study. In addition to these inherent differences in assay characteristics, the distinct proportions of cancer patients in the overall study populations between our previous (16%) and our current investigation (45%) may have contributed to the seemingly discrepant finding with regard to MV TF PCA levels. In both studies, however, only 20–25% of cancer patients had more localized disease (i.e. FIGO stage I or II).

Considering the potential relevance of circulating MV TF PCA in the diagnostic work-up of women with presumed ovarian cancer, the question arises of whether other more applicable tests can substitute for the cumbersome, time-consuming procedure of MV isolation. The possibility to accurately enumerate TF-bearing plasma MVs by flow cytometry is highly controversial, since commercially available TF antibodies may lack specificity and a large proportion of circulating MVs (i.e. those with a diameter of <0.3 μ m) may be missed by this technique. Furthermore, flow cytometry of MV-associated TF does not differentiate between functionally active and inactive (i.e. cryptic) TF. In our previous study, we did not find any difference in median numbers of TF-positive MVs between the three study groups, a finding essentially confirmed by another investigation [34].

Even more controversial is the detection of plasma TF antigen by ELISA. The specificity of the commercial TF ELISA used in our previous study (IMUBIND®, Sekisui Diagnostics) has been questioned due to the detection of TF-like antigen and/or a substantial non-specific background in plasma samples [20,35]. Although we used a different commercial TF ELISA in our current study (Quantikine®, R&D Systems), we obtained similar findings: plasma TF antigen levels were not significantly different in healthy controls compared to patients with either benign or malignant ovarian tumors (Fig. 5A). Although we cannot completely rule out the possibility that very small MVs were not pelleted by ultracentrifugation, our findings presented in Fig. 5B suggest that the signal detected by the Quantikine® ELISA was not due to MV-associated TF. This hypothesis is supported by our observation that the Quantikine® ELISA did not detect any increase in plasma TF antigen after stimulation of whole blood with LPS despite efficient shedding of TF-bearing MVs (Fig. 5D,E). In addition, the Quantikine® TF ELISA appears to detect a non-specific antigen in plasma since there is a large difference in baseline levels in healthy volunteers. In this regard, it is noteworthy mentioning that a minor, albeit statistically significant increase in plasma TF antigen was detected in five out of six donors

using the IMUBIND® ELISA in a comparable ex vivo model of human endotoxemia [20]. In contrast to the IMUBIND® ELISA, which is calibrated against solubilized full-length TF (TF_{1–263}) and uses detergent-containing buffers, the Quantikine® ELISA is calibrated against the recombinant TF ectodomain (TF_{1–219}) and does not use detergent, which may preclude the detection of lipidated TF at (patho) physiologically relevant concentrations. Because the Quantikine® ELISA also does not detect asTF (Fig. 5F), the signal picked up in plasma is either non-specific or, at least theoretically, mediated by degraded TF [18]. We conclude that there is no correlation between the MV TF PCA assay and the Quantikine® TF ELISA in our current study.

A previous study has shown that exceedingly high preoperative TF antigen levels of ≥ 190 pg/mL are associated with a poor clinical outcome in women with ovarian cancer [10]. In our current study, all three cancer patients with a plasma TF antigen level of >65 pg/mL (Fig. 5A) had FIGO stage III or IV disease. Furthermore, the patient with the highest plasma TF antigen level had experienced preoperative PE (Table 4). Based on these preliminary observations and the above considerations, the prognostic significance of plasma TF antigen in this gynecological malignancy may warrant further investigation.

Both experimental and clinical evidence indicates that TF is critically involved in cancer-associated clotting abnormalities, including VTE [1, 36]. In this regard, levels of circulating MV TF PCA have been shown to be predictive of VTE in some [37–39], but not all studies [31,40]. In our current study, we did not find an obvious association of MV TF PCA (or other hemostatic activation markers) with the occurrence of perioperative VTE. However, patients were not systematically screened for (asymptomatic) DVT, which may be detected in up to 25% of women with ovarian cancer before surgery [41], and, considering the multifactorial pathophysiology of postoperative VTE, the sample size was likely too small to pick up any significant differences. Consistent with this notion, two of the four postoperative VTEs occurred during combination chemotherapy with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab, a humanized monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor (VEGF) that has previously been associated with an increased risk of thrombosis [42]. The analysis of biomarker prediction of postoperative VTE is thus hampered by multiple confounding factors. Nevertheless, findings presented in Fig. 3 and Fig. 4 are consistent with the aforementioned close interrelations between cancer, inflammation, and coagulation.

In summary, our current study shows for the first time that MV TF PCA levels provide valuable additional information in the diagnostic work-up of women with suspected ovarian cancer. In this regard, the time-consuming and technically demanding assessment of MV TF PCA cannot be replaced by the quantification of plasma TF antigen by the Quantikine® ELISA when used according to the manufacturer's instructions. Future studies should thus further focus on the standardization of assays to measure MV TF PCA and plasma TF antigen in patients with cancer.

Conflicts of interest

None.

Acknowledgements

We thank Brigitte Spath (Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg, Germany) and Julie Pepe (Florida Hospital, Orlando, FL, USA) for excellent assistance in laboratory and statistical analyses, respectively.

References

- [1] F. Langer, C. Bokemeyer, Crosstalk between cancer and haemostasis. Implications for cancer biology and cancer-associated thrombosis with focus on tissue factor, *Hamostaseologie* 32 (2012) 95–104.
- [2] A. Gadducci, U. Baicchi, R. Marrai, M. Ferdeghini, R. Bianchi, V. Facchini, Preoperative evaluation of D-dimer and CA 125 levels in differentiating benign from malignant ovarian masses, *Gynecol. Oncol.* 60 (1996) 197–202.

- [3] S.C. Koh, K.F. Tham, K. Razvi, P.L. Oei, F.K. Lim, A.C. Roy, R.N. Prasad, Hemostatic and fibrinolytic status in patients with ovarian cancer and benign ovarian cysts: could D-dimer and antithrombin III levels be included as prognostic markers for survival outcome? *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 7 (2001) 141–148.
- [4] F. Tas, L. Kilic, E. Bilgin, S. Keskin, F. Sen, R. Ciftci, I. Yildiz, V. Yasasever, Clinical and prognostic significance of coagulation assays in advanced epithelial ovarian cancer, *Int. J. Gynecol. Cancer* 23 (2013) 276–281.
- [5] M. Sakurai, T. Satoh, K. Matsumoto, H. Michikami, Y. Nakamura, S. Nakao, H. Ochi, M. Onuki, T. Minaguchi, H. Yoshikawa, High pretreatment plasma D-dimer levels are associated with poor prognosis in patients with ovarian cancer independently of venous thromboembolism and tumor extension, *Int. J. Gynecol. Cancer* 25 (2015) 593–598.
- [6] Y.N. Man, Y.N. Wang, J. Hao, X. Liu, C. Liu, C. Zhu, X.Z. Wu, Pretreatment plasma D-dimer, fibrinogen, and platelet levels significantly impact prognosis in patients with epithelial ovarian cancer independently of venous thromboembolism, *Int. J. Gynecol. Cancer* 25 (2015) 24–32.
- [7] A. Amirkhosravi, G. Bigsby 4th, H. Desai, M. Rivera-Amaya, E. Coll, L. Robles-Carrillo, P. Faust, A. Waters, T. Meyer, E. Reyes, F. Langer, J.L. Francis, Blood clotting activation analysis for preoperative differentiation of benign versus malignant ovarian masses, *Blood Coagul. Fibrinolysis* 24 (2013) 510–517.
- [8] P. Worasethsin, A. Narkwichan, D-dimer as a tumor marker in pre-operative assessment of adnexal masses, *J. Med. Assoc. Thai.* 96 (2013) 1395–1400.
- [9] J. Rak, J.L. Yu, J. Luyendyk, N. Mackman, Oncogenes, trousseau syndrome, and cancer-related changes in the coagulome of mice and humans, *Cancer Res.* 66 (2006) 10643–10646.
- [10] L.Y. Han, C.N. Landen Jr., A.A. Kamat, A. Lopez, D.P. Bender, P. Mueller, R. Schmandt, D.M. Gershenson, A.K. Sood, Preoperative serum tissue factor levels are an independent prognostic factor in patients with ovarian carcinoma, *J. Clin. Oncol.* 24 (2006) 755–761.
- [11] K. Uno, S. Homma, T. Satoh, K. Nakanishi, D. Abe, K. Matsumoto, A. Oki, H. Tsunoda, I. Yamaguchi, T. Nagasawa, H. Yoshikawa, K. Aonuma, Tissue factor expression as a possible determinant of thromboembolism in ovarian cancer, *Br. J. Cancer* 96 (2007) 290–295.
- [12] N. Yokota, S. Koizume, E. Miyagi, F. Hirahara, Y. Nakamura, K. Kikuchi, W. Ruf, Y. Sakuma, E. Tsuchiya, Y. Miyagi, Self-production of tissue factor-coagulation factor VII complex by ovarian cancer cells, *Br. J. Cancer* 101 (2009) 2023–2029.
- [13] K. Chinen, T. Fujino, A. Horita, A. Sakamoto, Y. Fujioka, Pulmonary tumor thrombotic microangiopathy caused by an ovarian cancer expressing tissue factor and vascular endothelial growth factor, *Pathol. Res. Pract.* 205 (2009) 63–68.
- [14] E. Cocco, J. Varughese, N. Buza, S. Bellone, K.Y. Lin, M. Bellone, P. Todeschini, D.A. Silasi, M. Azodi, P.E. Schwartz, T.J. Rutherford, L. Carrara, R. Tassi, S. Pecorelli, C.J. Lockwood, A.D. Santin, Tissue factor expression in ovarian cancer: implications for immunotherapy with hI-con1, a factor VII-IgGF(c) chimeric protein targeting tissue factor, *Clin. Exp. Metastasis* 28 (2011) 689–700.
- [15] F. Abu Saadeh, L. Norris, S. O'Toole, B.M. Mohamed, R. Langhe, J. O'Leary, N. Gleeson, Tumour expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in ovarian cancer—relationship with venous thrombosis risk, *Thromb. Res.* 132 (2013) 627–634.
- [16] J.E. Geddings, N. Mackman, Tumor-derived tissue factor-positive microparticles and venous thrombosis in cancer patients, *Blood* 122 (2013) 1873–1880.
- [17] V.Y. Bogdanov, H.H. Versteeg, “Soluble tissue factor” in the 21st century: definitions, biochemistry, and pathophysiological role in thrombus formation, *Semin. Thromb. Hemost.* 41 (2015) 700–707.
- [18] J.G. Wang, J.E. Geddings, M.M. Aleman, J.C. Cardenas, P. Chantrathammachart, J.C. Williams, D. Kirchhofer, V.Y. Bogdanov, R.R. Bach, J. Rak, F.C. Church, A.S. Wolberg, R. Pawlinski, N.S. Key, J.J. Yeh, N. Mackman, Tumor-derived tissue factor activates coagulation and enhances thrombosis in a mouse xenograft model of human pancreatic cancer, *Blood* 119 (2012) 5543–5552.
- [19] F. Langer, B. Spath, K. Haubold, K. Holstein, G. Marx, J. Wierecky, T.H. Brümmendorf, J. Dierlamm, C. Bokemeyer, B. Eifrig, Tissue factor procoagulant activity of plasma microparticles in patients with cancer-associated disseminated intravascular coagulation, *Ann. Hematol.* 87 (2008) 451–457.
- [20] R.D. Lee, D.A. Barcel, J.C. Williams, J.G. Wang, J.C. Boles, D.A. Manly, N.S. Key, N. Mackman, Pre-analytical and analytical variables affecting the measurement of plasma-derived microparticle tissue factor activity, *Thromb. Res.* 129 (2012) 80–85.
- [21] J.A. Hanley, B.J. McNeil, A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases, *Radiology* 148 (1983) 839–843.
- [22] G. Morgante, A. la Marca, A. Ditto, V. De Leo, Comparison of two malignancy risk indices based on serum CA125, ultrasound score and menopausal status in the diagnosis of ovarian masses, *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 106 (1999) 524–527.
- [23] A.A. Khorana, N.M. Kuderer, E. Culakova, G.H. Lyman, C.W. Francis, Development and validation of a predictive model for chemotherapy-associated thrombosis, *Blood* 111 (2008) 4902–4907.
- [24] R. Seitz, N. Rappe, M. Kraus, A. Immel, M. Wolf, M. Maasberg, R. Egbring, R. Pfaf, K. Havemann, Activation of coagulation and fibrinolysis in patients with lung cancer: relation to tumour stage and prognosis, *Blood Coagul. Fibrinolysis* 4 (1993) 249–254.
- [25] M. Oya, Y. Akiyama, T. Okuyama, H. Ishikawa, High preoperative plasma D-dimer level is associated with advanced tumor stage and short survival after curative resection in patients with colorectal cancer, *Jpn. J. Clin. Oncol.* 31 (2001) 388–394.
- [26] L.Y. Dirix, R. Salgado, R. Weytjens, C. Colpaert, I. Benoy, P. Huget, P. van Dam, A. Prove, J. Lemmens, P. Vermeulen, Plasma fibrin D-dimer levels correlate with tumor volume, progression rate and survival in patients with metastatic breast cancer, *Br. J. Cancer* 86 (2002) 389–395.
- [27] G. Buccheri, P. Torchio, D. Ferrigno, Plasma levels of D-dimer in lung carcinoma: clinical and prognostic significance, *Cancer* 97 (2003) 3044–3052.
- [28] C. Ay, D. Dunkler, R. Pirker, J. Thaler, P. Quehenberger, O. Wagner, C. Zielinski, I. Pabinger, High D-dimer levels are associated with poor prognosis in cancer patients, *Haematologica* 97 (2012) 1158–1164.
- [29] R.C. Bast Jr., D. Badgwell, Z. Lu, R. Marquez, D. Rosen, J. Liu, K.A. Baggerly, E.N. Atkinson, S. Skates, Z. Zhang, A. Lokshin, U. Menon, I. Jacobs, K. Lu, New tumor markers: CA125 and beyond, *Int. J. Gynecol. Cancer* 15 (Suppl. 3) (2005) 274–281.
- [30] S. Koizume, S. Ito, Y. Yoshioka, T. Kanayama, Y. Nakamura, M. Yoshihara, R. Yamada, T. Ochiya, W. Ruf, E. Miyagi, F. Hirahara, Y. Miyagi, High-level secretion of tissue factor-rich extracellular vesicles from ovarian cancer cells mediated by filamin-A and protease-activated receptors, *Thromb. Haemost.* (2015) (in press).
- [31] J. Thaler, C. Ay, N. Mackman, R.M. Bertina, A. Kaider, C. Marosi, N.S. Key, D.A. Barcel, W. Scheithauer, G. Kornek, C. Zielinski, I. Pabinger, Microparticle-associated tissue factor activity, venous thromboembolism and mortality in pancreatic, gastric, colorectal and brain cancer patients, *J. Thromb. Haemost.* 10 (2012) 1363–1370.
- [32] A. Varki, Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms, *Blood* 110 (2007) 1723–1729.
- [33] K.F. Nickel, G. Ronquist, F. Langer, L. Labberton, T.A. Fuchs, C. Bokemeyer, G. Sauter, M. Graefen, N. Mackman, E.X. Stavrou, G. Ronquist, T. Renné, The polyphosphate-factor XII pathway drives coagulation in prostate cancer-associated thrombosis, *Blood* 126 (2015) 1379–1389.
- [34] A. Rank, S. Liebhardt, J. Zwirner, A. Burges, R. Nieuwland, B. Toth, Circulating microparticles in patients with benign and malignant ovarian tumors, *Anticancer Res.* 32 (2012) 2009–2014.
- [35] B. Parhami-Seren, S. Butenas, J. Krudysz-Amblo, K.G. Mann, Immunologic quantitation of tissue factors, *J. Thromb. Haemost.* 4 (2006) 1747–1755.
- [36] Y. Hisada, J.E. Geddings, C. Ay, N. Mackman, Venous thrombosis and cancer: from mouse models to clinical trials, *J. Thromb. Haemost.* 13 (2015) 1372–1382.
- [37] A.A. Khorana, C.W. Francis, K.E. Menzies, J.G. Wang, O. Hyrien, J. Hathcock, N. Mackman, M.B. Taubman, Plasma tissue factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer, *J. Thromb. Haemost.* 6 (2008) 1983–1985.
- [38] J.L. Zwicker, H.A. Liebman, D. Neuberg, R. Lacroix, K.A. Bauer, B.C. Furie, B. Furie, Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy, *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 6830–6840.
- [39] A. Bharthuar, A.A. Khorana, A. Hutson, J.G. Wang, N.S. Key, N. Mackman, R.V. Iyer, Circulating microparticle tissue factor, thromboembolism and survival in pancreaticobiliary cancers, *Thromb. Res.* 132 (2013) 180–184.
- [40] C. Hernández, J. Orbe, C. Roncal, M. Alvarez-Hernandez, S. Martinez de Lizarrondo, M.T. Alves, J. García Mata, J.A. Páramo, Tissue factor expressed by microparticles is associated with mortality but not with thrombosis in cancer patients, *Thromb. Haemost.* 110 (2013) 598–608.
- [41] T. Satoh, A. Oki, K. Uno, M. Sakurai, H. Ochi, S. Okada, R. Minami, K. Matsumoto, Y.O. Tanaka, H. Tsunoda, S. Homma, H. Yoshikawa, High incidence of silent venous thromboembolism before treatment in ovarian cancer, *Br. J. Cancer* 97 (2007) 1053–1057.
- [42] S.R. Nalluri, D. Chu, R. Keresztes, X. Zhu, S. Wu, Risk of venous thromboembolism with the angiogenesis inhibitor bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis, *JAMA* 300 (2008) 2277–2285.

II. Darstellung der Publikation

1. Einleitung

Bei der vorliegenden Arbeit zum Thema *"Microvesicle-associated tissue factor procoagulant activity for the preoperative diagnosis of ovarian cancer"* handelt es sich um eine prospektive Pilotstudie zur Analyse präoperativer Hämostaseparameter bei Frauen mit vermutetem Ovarialkarzinom.

Das Ovarialkarzinom ist ein Tumor, der aufgrund fehlender charakteristischer Früherkennungszeichen und ungenügend sensitiver Screening-Methoden in der Mehrheit der Fälle erst im fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert wird.¹

Daher hat diese Arbeit das Ziel, eine präoperative Blutanalyse durchzuführen und etablierte Marker wie CA-125 und D-Dimere mit weniger gut erforschten Parametern wie mit Mikrovesikeln assoziiertem Tissue-Faktor (MV TF PCA) und löslichem P-Selektin (sCD62P) zu vergleichen und auf diese Weise das Ausmaß der Hämostaseaktivierung bei den Karzinompatientinnen näher zu charakterisieren.

Dass eine Tumorerkrankung zur erhöhten Gerinnungsneigung führt, ist nicht zuletzt seit den Beobachtungen des französischen Arztes Armand Trousseau aus dem Jahr 1865 bekannt.² Da bei Ovarialkarzinompatientinnen zudem gehäuft Thrombosen beobachtet werden,³ wollten wir zusätzlich das Auftreten perioperativer venöser Thromboembolien erfassen.

Das Ovarialkarzinom umfasst etwa 3% der Tumorerkrankungen bei Frauen.⁴ Ein im klinischen Alltag weiterhin häufig angeforderter Tumormarker ist das CA-125, welches jedoch aufgrund ungenügender Sensitivität und Spezifität nicht als verlässlicher Screening-Parameter eingesetzt werden kann. Bei 50% der im Frühstadium diagnostizierten Ovarialkarzinome ist das CA-125 sogar negativ.⁵ Zudem sind Serumspiegel von CA-125 auch bei einigen gutartigen Erkrankungen erhöht, z. B. bei Leberzirrhose, Ovarialzysten, Endometriose oder Peritonitis. Dagegen finden sich bei 20% der Ovarialkarzinome keine erhöhten CA-125-Serumspiegel.^{6,7}

Folglich wird versucht, neue diagnostische Marker zu etablieren. Die Rolle von Tissue-Faktor (TF), dem Initiator der extrinsischen Gerinnungskaskade, beim Ovarialkarzinom ist bislang unzureichend erforscht. Einerseits wurde bereits eine Verbindung zwischen hoher TF-Expression in ovariellen Tumorgeweben und thromboembolischen Ereignissen festgestellt.⁸ Andererseits zeigte eine Studie von

Han und Mitarbeitern (2006), dass erhöhte TF-Konzentrationen im Serum mit einer schlechteren Überlebensrate von Frauen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom assoziiert sind.⁹ Andere Studien legen nahe, dass TF bei der Tumorangiogenese, der Metastasierung und bei der Entstehung von paraneoplastischen Thrombosen eine wichtige Rolle spielt.^{8,10–12}

2. Material und Methoden

In die Studie wurden insgesamt 89 Patientinnen eingeschlossen. Insgesamt 40 Patientinnen hatten maligne und 15 gutartige Raumforderungen des Ovars. Eine gesunde Kontrollkohorte bestand aus 34 Frauen. Das Ovarialkarzinom wird nach der Einteilung der *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO) klassifiziert. Von den 40 Patientinnen mit Ovarialkarzinom hatten 22,5% ein früheres Stadium (FIGO I/II) und 77,5% ein fortgeschrittenes Tumorstadium (FIGO III/IV). So wird bereits in dieser Kohorte deutlich, dass maligne Ovarialtumore in der Regel erst im fortgeschrittenen Stadium erkannt und therapiert werden. Histologisch imponierte bei den malignen Tumoren mit einer Häufigkeit von 80% das serös-papilläre Adenokarzinom.

Präoperativ wurden, um plättchenarmes Plasma (PPP) zu erhalten, venöse Blutproben in 3,2% Natriumcitrat-Röhrchen entnommen und innerhalb von zwei Stunden bei 4.000 Umdrehungen pro Minute für 18 Minuten zentrifugiert. Bis zur Analyse wurde das PPP bei -80°C eingefroren.

TF wird von vielen Tumorzellen konstitutiv exprimiert und kann zudem auf der Oberfläche von Leukozyten oder subzellulären Membranvesikeln (MVs) in das Blut freigesetzt werden. Zudem zirkuliert TF als lösliche Variante (*alternatively spliced* TF, asTF) oder – zumindest theoretisch – als proteolytisch degradiertes Molekül im Plasma.

Aufgrund dieser unterschiedlichen Varianten von zirkulierendem TF wurden in der Arbeit verschiedene Messverfahren durchgeführt und miteinander verglichen.

Ein Einstufengerinnungstest wurde für die Messung der MV-assoziierten TF-spezifischen prokoagulatorischen Aktivität (MV TF PCA) verwendet, der bereits in einer Vorarbeit beschrieben wurde.¹³

In unserem Labor wurden die MVs durch Hochgeschwindigkeitszentrifugation aus dem kryokonservierten Plasma isoliert. Anschließend erfolgte mit Hilfe des Einstufengerinnungstests, der gegen lipidierten rekombinanten humanen TF kalibriert

wurde, die Messung der MV TF PCA. Hierbei handelt es sich um ein semiquantitatives Verfahren. In einer Subgruppe von zehn Patientinnen wurde zusätzlich der Thrombingenerierungstest (*thrombin generation assay*, TGA), der in der Studie von Amirkhosravi und Mitarbeitern¹⁴ verwendet wurde, durchgeführt.

In der Studie von Amirkhosravi und Mitarbeitern¹⁴ wurden die MVs durch Ultrazentrifugation aus plättchenfreiem Plasma (PFP) isoliert. Diese MV-Suspension wurde nach der Methode von Hemker und Mitarbeitern¹⁵ aufbereitet und die Fluoreszenz für 90 Minuten gemessen. Die Proben wurden dann entweder als negativ oder positiv bezüglich der TF-Aktivität bewertet.

In zusätzlichen Versuchen wurde vor der MV-Isolierung Citrat-antikoaguliertes Vollblut von 5 gesunden Probanden mit 10 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS) für fünf Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Konzentration des TF-Antigens im Plasma wurde mit Hilfe eines kommerziellen Enzymimmunoassays (ELISA) der Firma R&D-Systems (Quantikine®) bestimmt. TF-Antigen-Spiegel wurden im PPP und im Plasmaüberstand nach Zentrifugation des PPP für 90 Minuten bei 100,000 x g bei 10°C gemessen.

Des Weiteren wurde eine Analyse der D-Dimere und des sCD62P-Antigens im Plasma durchgeführt. Die D-Dimere wurden mit Hilfe des Innovance® D-Dimer-Tests an einem BCS® Coagulation Analyzer (Siemens Healthcare) gemessen, während für die Quantifizierung des sCD62P-Antigens ein ebenfalls kommerziell erhältlicher ELISA (Quantikine®; R&D Systems) verwendet wurde.

Bei normalverteilten Daten wurden diese als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) präsentiert. Bei nicht-normalverteilten Daten wurde der Median angegeben.

Für unabhängige Variablen wurde der Mann-Whitney-U-Test, für abhängige der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet. Der Rangkorrelationskoeffizient (*r*) wurde nach Spearman bestimmt. Für die Bestimmung der Cut-Off-Werte von MV TF PCA und sCD62P wurden *Receiver-Operating-Characteristic*-Kurven (ROC-Kurven) erstellt. Mit Hilfe der Fläche unter den ROC-Kurven (*area under the curve*, AUC) wurden die einzelnen Variablen bezüglich der Vorhersagewahrscheinlichkeit eines Karzinoms verglichen.

Mit dem exakten Test nach Fisher wurde die Assoziation zwischen dichotomen Variablen und dem Vorliegen einer malignen Erkrankung gemessen.

Statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert < 0,05 angenommen.

Die statistischen Analysen wurden mit IBM SPSS Version 21, 22 und 23 oder GraphPad Prism® durchgeführt

Für die detaillierte Methodik und statistische Auswertung verweise ich auf die Originalarbeit.¹⁶

3. Ergebnisse

Es ist bereits bekannt, dass bei Frauen mit Ovarialkarzinom die Werte für CA-125 im Serum und für D-Dimere im Plasma mit dem klinischen Tumorstadium korrelieren.¹⁷

Die statistische Analyse der von uns erhobenen Daten konnte diesen Zusammenhang bestätigen und zeigen, dass CA-125 ($p < 0,001$) und D-Dimere ($p = 0,001$) im fortgeschrittenen Tumorstadium (FIGO III/IV) signifikant höher waren als im lokalisierten Tumorstadium (FIGO I/II), während dieses für sCD62P und MV TF PCA nicht der Fall war. Jedoch fand sich eine Tendenz zu höheren sCD62P-Konzentrationen bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Tumorstadium ($p = 0,080$).

Im Vergleich zu den Frauen mit gutartigen Tumoren und zu den gesunden Kontrollprobandinnen waren die Werte für D-Dimere ($p < 0,001$), sCD62P ($p < 0,001$) und MV TF PCA-Spiegel ($p < 0,001$) in der Gruppe von Frauen mit Ovarialkarzinom signifikant erhöht. Bezüglich sCD62P und MV TF PCA wurde zwischen den beiden Kontrollgruppen kein signifikanter Unterschied gefunden. Jedoch waren die D-Dimere in der Gruppe der Frauen mit gutartigen Tumoren signifikant höher als in der Gruppe von gesunden Frauen ($p = 0,003$).

Die Serumspiegel für CA-125 waren zwischen der Gruppe mit gutartigen und der Gruppe mit bösartigen Ovarialtumoren nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,227$), auch wenn für diese Analyse nur von 53% und 83% der Patientinnen entsprechende Daten zur Verfügung standen.

Zudem wurden in einer Subgruppe von zehn Frauen die beiden verschiedenen Methoden zur Bestimmung der TF-Aktivität (Einstufengerinnungstest und TGA) miteinander verglichen.

Bei drei Patientinnen, die im Einstufengerinnungstest eine niedrige MV TF PCA aufwiesen, war auch das Ergebnis des TGA negativ. Bei einer Patientin mit hoher MV TF PCA zeigte der TGA ebenfalls ein positives Ergebnis. Dagegen wurde bei zwei von sechs Studienteilnehmerinnen mit moderater bis hoher MV TF PCA keine TF-spezifische Aktivität im TGA gefunden.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass der qualitative TGA, der in der vorherigen Studie verwendet wurde,¹⁴ im Vergleich zum semiquantitativen Einstufengerinnungstest mit "falsch-negativen" Ergebnissen assoziiert sein kann.

In der Subgruppe der Ovarialkarzinompatientinnen ($n = 40$) korrelierten die D-Dimere nicht mit der MV TF PCA ($r = 0,24$; $p = 0,129$). Dagegen wurde eine signifikante Korrelation zwischen den D-Dimeren und sCD62P ($r = 0,40$; $p = 0,011$) sowie CA-125 ($r = 0,52$; $p = 0,002$) gefunden. Um ein frühes Krankheitsstadium mit einem fortgeschrittenen zu vergleichen, wurden wegen der geringen Anzahl an Patientinnen mit frühem Tumorstadium die FIGO-Stadien I/II zusammengefasst ($n = 9$) und mit den FIGO-Stadien III ($n=24$) und IV ($n=7$) verglichen.

Um den diagnostischen Wert für die präoperative Diagnose des Ovarialkarzinoms abzuschätzen, mussten Grenzwerte für sCD62P und MV TF PCA definiert werden. Diese wurden aus einer ROC-Kurvenanalyse abgeleitet, da für diese Parameter noch keine entsprechenden Grenzwerte existierten. Für D-Dimere und CA-125 wurden die im klinischen Alltag üblicherweise verwendeten *Cut-off*-Werte verwendet: 0,5 mg/l für D-Dimere und 35 U/ml für CA-125. Die höchste Spezifität und der höchste positive prädiktive Wert (PPV) wurden durch eine MV TF PCA über 182 U/ml und einen pathologischen Wert für CA-125 erreicht. Pathologisch erhöhte D-Dimer-Spiegel waren mit der höchsten Sensitivität und dem höchsten negativen prädiktiven Wert (NPV) assoziiert. Außerdem konnten die *Cut-off*-Werte für D-Dimere, sCD62P und MV TF PCA signifikant zwischen dem Status "gesund/benigner Tumor" und dem Status "maligner Tumor" unterscheiden. Mit dem Tumormarker CA-125 war diese Differenzierung nicht möglich. Des Weiteren wurden die Biomarker kombiniert miteinander verglichen. Vor allem wenn der Tumormarker CA-125 mit einem der anderen Biomarker kombiniert wurde und beide Marker über dem jeweiligen *Cut-off*-Wert lagen, fand sich eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Diagnose eines Karzinoms mit positiven prädiktiven Werten von $> 90\%$. Wenn D-Dimere und MV TF PCA zusammen untersucht wurden, ließ sich ein statistisch signifikanter Zusatznutzen für die präoperative Diagnose des Ovarialkarzinoms nachweisen ($p = 0,019$). Vermutlich liefern diese beiden Biomarker unterschiedliche Informationen über die Hämostaseaktivierung beim Ovarialkarzinom, denn D-Dimere korrelierten mit dem FIGO-Stadium, während dieses für MV TF PCA nicht der Fall war.

Schlussendlich wurde als etablierter Marker der *Risk of Malignancy Index* (RMI) hinzugezogen und mit den Biomarkern verglichen. Der RMI beinhaltet den Menopausenstatus, den Tumormarker CA-125 und den Sonographiebefund. Der modifizierte RMI 2 gewichtet den Sonographiebefund und den Menopausenstatus stärker, sodass er sich als zuverlässiger in der Diskriminierung zwischen benignen und malignen Adnexbefunden erwiesen hat.¹⁸ Der RMI 2 allein ($p = 0,092$) konnte ebenso wie CA-125 ($p = 0,120$) gutartige nicht statistisch signifikant von bösartigen Befunden unterscheiden. Die Kombination von RMI 2 mit D-Dimeren ($p = 0,080$), sCD62P ($p = 0,137$) oder MV TF PCA ($p = 0,055$) verbesserte jedoch das Testergebnis mit einem Trend zur statistischen Signifikanz.

In dieser prospektiven Studie wurde zusätzlich eine Nachbeobachtung (*Follow-up*) der Frauen mit Ovarialkarzinom über sechs Wochen nach der OP durchgeführt. Für 38 Patientinnen war ein vollständiges *Follow-up* verfügbar. Sechs Patientinnen erlitten eine perioperative venöse Thromboembolie (VTE): Eine isolierte tiefe Beinvenenthrombose und fünf Lungenarterienembolien. Die Beinvenenthrombose und eine Lungenarterienembolie traten präoperativ auf. Die anderen Ereignisse wurden in den sechs Wochen nach dem operativen Eingriff diagnostiziert. Das Auftreten eines thromboembolischen Ereignisses korrelierte weder mit dem Tumormarker CA-125 noch mit den anderen Biomarkern. Alle Patientinnen mit VTE hatten jedoch ein fortgeschrittenes Tumorstadium (FIGO III/IV). Es wurde zudem keine Assoziation zwischen dem Auftreten einer VTE und den Entzündungsmarkern Fibrinogen und C-reaktives Protein (CRP) oder einem erhöhten Khorana-Score¹⁹ gefunden.

In einer vorherigen Studie wurde für die Bestimmung des TF-Antigens im Plasma der IMUBIND® TF ELISA (Sekisui Diagnostics) verwendet. In dieser Studie konnte bezüglich des TF-Antigens kein Unterschied zwischen den Patientinnen mit Ovarialkarzinom und denen mit gutartigen Adnextumoren oder den gesunden Kontrollprobanden gefunden werden.¹⁴ Es ist jedoch anzumerken, dass in dieser Studie die Messung des TF-Antigens im plättchenarmen Plasma (PPP) erfolgte, das sowohl MV-assoziierten als auch löslichen TF beinhaltet. In der aktuellen Studie sollte lediglich löslicher TF berücksichtigt werden. Aus diesem Grund wurden die Plasmaproben durch Ultrazentrifugation (90 Minuten bei $100,000 \times g$) von endogenen Phospholipiden befreit. Auch in diesen Proben wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der Karzinomgruppe und der Gruppe mit gutartigen Tumoren

($p = 0,238$) oder der gesunden Kontrollkohorte ($p = 0,199$) gefunden. Ebenfalls wurde untersucht, ob die Ultrazentrifugation zu einem signifikanten Verlust von TF-Antigen im Plasma führte. Das TF-Antigen wurde hierfür in einer Subgruppe von 17 Karzinompatientinnen vor und nach der Ultrazentrifugation im Plasma gemessen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Messreihen ($p = 0,238$), was die Schlussfolgerung nahelegt, dass MV-assoziiertes TF von dem kommerziellen Quantikine® TF ELISA (R&D Systems) nicht erfasst wird. Dass zwischen TF-Antigen und MV TF PCA keine Korrelation gefunden wurde, stützt diese Vermutung.

Um dieser Frage weiter nachzugehen, wurde ein vorbeschriebenes Ex-vivo-Modell der LPS-induzierten TF-Produktion verwendet.²⁰ Hierzu verweise ich im Detail auf die Publikation.¹⁶

4. Diskussion

Unsere Studie bestätigt die Ergebnisse von vorherigen Untersuchungen, nach denen die Werte für CA-125 und D-Dimere beim Ovarialkarzinom signifikant mit dem klinischen Stadium, d. h. der Tumormasse, korrelieren.²¹ Je fortgeschrittener das FIGO-Stadium ist, desto höher liegen die Werte für CA-125 und D-Dimere. Allerdings kann der Tumormarker CA-125 in frühen Tumorstadien negativ oder bei nicht-malignen Erkrankungen erhöht sein.²²

Das wichtigste Ergebnis der Studie ist jedoch, dass MV TF PCA bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom erhöht ist und, dass die kombinierte Analyse von MV TF PCA und D-Dimeren zusätzliche Informationen für die präoperative Diagnose des Ovarialkarzinoms liefert. Obwohl MV TF PCA bei den Karzinompatientinnen erhöht war, fand sich kein signifikanter Zusammenhang mit dem Tumorstadium. Dieses könnte darauf hinweisen, dass die Freisetzung von TF-tragenden MVs durch andere noch unbekannte Tumorcharakteristika gesteuert wird und nicht direkt mit der Tumormasse zusammenhängt. Spezifische Onkogene und Tumorsuppressorgene wurden bereits mit der Freisetzung TF-tragender MVs in Verbindung gebracht.²³ Erhöhte sCD62P-Werte, die bei den Patientinnen mit Ovarialkarzinom gefunden wurden, sprechen hingegen für eine systemische Gerinnungsaktivierung und Inflammation. Diesbezüglich zeigten unsere Ergebnisse einen Trend zu höheren Werten bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Tumorstadium, was als Bestätigung dieser Hypothese gewertet werden kann.

In einer früheren Studie korrelierte bei Patienten mit Pankreaskarzinom die MV-assoziierte TF-Aktivität mit der Plasmakonzentration der D-Dimere. Dieser Zusammenhang wurde jedoch bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen, Magentumoren oder Hirntumoren nicht gefunden.²⁴ Auch in unserer Untersuchung korrelierte MV TF PCA bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom ($n = 40$) nicht signifikant mit den D-Dimeren ($r = 0,24$). In der gesamten Studienkohorte ($n = 89$) fand sich jedoch eine entsprechende Korrelation ($r = 0,53$). Diese Beobachtung legt nahe, dass in einigen Tumorentitäten die TF-Expression im Primärtumor oder in den Metastasen zur systemischen Gerinnungsaktivierung beiträgt und das Ausmaß der Thrombingenerierung und Fibrinbildung durch andere, TF-unabhängige Faktoren wie z. B. die Freisetzung von Karzinommuzinen oder Kontaktaktivatoren (Polyphosphate, Nukleinsäuren) beeinflusst wird.

Auf der Basis unserer Ergebnisse kann für zukünftige Studien die Überprüfung einer Zweistufendiagnostik vorgeschlagen werden. Bei Frauen mit Ovarialtumoren unklarer Dignität sind niedrige D-Dimere mit einem hohen negativen prädiktiven Wert (NPV) verbunden. Es ist folglich unwahrscheinlich, dass im Rahmen der weiteren Untersuchungen ein Ovarialkarzinom diagnostiziert wird. Diese Patientinnen könnten engmaschig beobachtet werden (*watch-and-wait strategy*) oder sich ggf. einer Laparoskopie in einem nichtspezialisierten Zentrum unterziehen. Bei Frauen mit pathologisch erhöhten D-Dimeren könnte eine weitere Bestimmung von MV TF PCA und CA-125 dagegen helfen, Patientinnen mit einem signifikant erhöhten Risiko für das Vorliegen eines Ovarialkarzinoms zu identifizieren. Diese Patientinnen würden dann von der Überweisung an ein gynäkologisch-onkologisches Zentrum zur operativen Therapie profitieren. Eine Studie von Worasethsin und Narkwichean²⁵ an 200 Frauen mit unklaren Adnexbefunden berechnete für D-Dimere Werte für Sensitivität, Spezifität, NPV und PPV bezüglich der präoperativen Diagnose des Ovarialkarzinoms, die mit den Werten unserer Studie vergleichbar sind. Dabei wurde ein identischer Referenzwert für die D-Dimere von 0,5 mg/l verwendet.

Mehrere experimentelle und klinische Studien haben gezeigt, dass TF eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie paraneoplastischer Thromboembolien spielt.^{26,27} In einigen Untersuchungen zeigte eine erhöhte MV TF PCA ein gesteigertes Risiko für das Auftreten thromboembolischer Ereignisse an.^{28,29} In anderen Studien konnte dieser Zusammenhang nicht bestätigt werden.^{24,30} Auch in unserer Studie ließ sich kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen den untersuchten Hämostasemarkern

und dem Auftreten einer VTE feststellen. Diesbezüglich muss allerdings einschränkend auf die geringe Fallzahl hingewiesen werden. Zudem traten zwei der vier postoperativen thromboembolischen Ereignisse unter Chemotherapie mit Carboplatin, Paclitaxel und Bevacizumab auf. Bevacizumab ist ein humaner monoklonaler Antikörper gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), der bekanntermaßen mit einem erhöhten Thromboserisiko einhergeht.³¹ Zudem wurden die Patientinnen in unserer Studie nicht systematisch auf das Vorliegen asymptomatischer Thrombosen untersucht, welche präoperativ bei bis zu 25% der Frauen mit Ovarialkarzinom gefunden werden können.³ Es wird angenommen, dass postoperative Thromboembolien als Folge eines multifaktoriellen Zusammenspiels von maligner Grunderkrankung, Inflammation und systemischer Hämostaseaktivierung entstehen.

Ein wichtiger Teil dieser Arbeit ist die Methodik. Das Messverfahren zur Bestimmung der MV TF PCA ist technisch aufwändig und noch nicht ausreichend standardisiert. Verschiedene Methoden werden zur Messung der MV TF PCA verwendet. In einer vorherigen Studie von Amirkhosravi und Mitarbeitern¹⁴ wurde ein qualitativer Thrombingenerierungstest (TGA) verwendet. Mit dieser Methode, die ein negatives oder positives Testergebnis liefert, konnte zwischen den verschiedenen Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Nachweises TF-spezifischer Aktivität auf den isolierten MVs gefunden werden. Vermutlich ist dieses Verfahren im Vergleich zum Einstufengerinnungstest nicht sensitiv genug, um die insgesamt geringen Konzentrationen von aktivem TF auf zirkulierenden MVs nachzuweisen. Unsere Ergebnisse in einer Subgruppe von 10 Frauen, bei denen beide Testsysteme vergleichend zum Einsatz gekommen sind, unterstützten diese Vermutung. Zudem wurde in unserer Studie plättchenarmes (PPP) und nicht plättchenfreies Plasma (PFP) verwendet. Die Herstellung von PFP führt vermutlich zu einem signifikanten Verlust von MV TF PCA²⁰ und kann somit zusätzlich zur verminderten Sensitivität des TGA beigetragen haben. Des Weiteren könnte auch die Studienpopulation die Ergebnisse beeinflusst haben. In der vorherigen Studie von Amirkhosravi und Mitarbeitern¹⁴ hatten nur 16% der Patientinnen ein Ovarialkarzinom, verglichen mit 45% in unserer Studie.

Eine weitere Methode zur Messung von TF im Plasma ist der Enzymimmunoassay (ELISA). In unserer Studie verwendeten wir den Quantikine® TF ELISA und kamen zu dem Ergebnis, dass sich die im Plasma gemessenen Konzentrationen von TF-

Antigen zwischen den verschiedenen Studiengruppen nicht unterschieden. Vermutlich detektiert der Quantikine® TF ELISA keinen MV-assoziierten TF. Selbst nach Stimulation einer Vollblutprobe mit Endotoxin (LPS) wurde mit Hilfe des Quantikine® TF ELISA im Plasma trotz effizienter Ausschüttung von TF-tragenden MVs kein Anstieg des TF-Antigens gemessen. Darüber hinaus zeigten die Basiswerte in den Kontrollplasmen erhebliche Schwankungen, was auf ein unspezifisches Signal hinweisen kann. Zusammenfassend fand sich in unserer Studie keine Korrelation zwischen der MV TF PCA im Einstufengerinnungstest und der Konzentration von TF-Antigen im Quantikine® ELISA.

Erhöhte Konzentrationen von TF-Antigen im Serum wurden bei Frauen mit Ovarialkarzinom mit einer ungünstigeren Gesamtprognose in Verbindung gebracht. Eine Studie von Han und Mitarbeitern⁹ zeigte, dass Werte für das TF-Antigen von ≥ 190 pg/ml mit einer signifikant reduzierten Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen assoziiert sind. In unserer Studie hatte die Patientin mit der höchsten Konzentration von TF-Antigen im Plasma (149 pg/ml) eine präoperative Lungenarterienembolie erlitten; bei den drei Patientinnen mit Werten > 65 pg/ml lag ein fortgeschrittenes FIGO-Stadium (III oder IV) vor.

Diese Ergebnisse können tatsächlich auf eine prognostische Relevanz des TF-Antigens im Plasma hinweisen, bedürfen jedoch einer weiteren Untersuchung in deutlich größeren Patientenkollektiven.

5. Zusammenfassung

Die Ergebnisse unserer Studie legen nahe, dass die Bestimmung von MV TF PCA sinnvolle Zusatzinformationen in der präoperativen Diagnostik des Ovarialkarzinoms liefern kann. Weitere Untersuchungen sind jedoch nötig, um zu klären, ob sich das Management von Frauen mit suspekten ovariellen Raumforderungen durch die kombinierte Messung von CA-125, D-Dimeren und MV TF PCA tatsächlich verbessern lässt. Zudem zeigt unsere Studie, dass die zeitaufwändige Messung von MV TF PCA nicht durch die Quantifizierung von TF-Antigen im Plasma mit Hilfe eines kommerziellen ELISA ersetzt werden kann. Auch diesbezüglich sind weitere Untersuchungen nötig, um eine ausreichende Standardisierung der Verfahren zu erreichen.

Conclusion

While D-dimer and CA-125, by reflecting the overall impact of the cancer on the hemostatic system, is correlated with tumor burden, shedding of MV TF PCA may provide complementary information relevant to malignant transformation and cancer biology. Furthermore the time-consuming measurement of MV TF PCA can't be replaced by the quantification of TF-Antigen in plasma with the commercial ELISA. Combined analysis of D-dimer, CA-125 and MV TF PCA could thus be useful in the diagnostic work-up and management of women with ovarian masses.

6. Abkürzungsverzeichnis

MV TF PCA = Mikrovesikel assoziierter Tissue-Faktor

TF = Tissue-Faktor

sCD62P = lösliches P-Selektin

FIGO = International Federation of Gynecology and Obstetrics

PPP = plättchenarmes Plasma

PFP = plättchenfreies Plasma

VEGF = vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

MVs = Membranvesikel

TGA = Thrombingenerierungstest, thrombin generation assay

VTE = venöse Thromboembolie

RMI = Risk of Malignancy Index

NPV = negativ prädiktiver Wert

PPV = positiv prädiktiver Wert

7. Literaturverzeichnis

1. Jacobs IJ, Menon U. Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3:355-366. doi:10.1074/mcp.R400006-MCP200.
2. A T. Plegmasia alba dolens. *Clin Med Deliv Hotel Paris*. 1865;5:281-332.
3. Satoh T, Oki A, Uno K, et al. High incidence of silent venous thromboembolism before treatment in ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2007;97(8):1053-1057.

doi:10.1038/sj.bjc.6603989.

4. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2013*. Vol 2010.; 2013.
5. Tuxen MK, Soletormos G, Dombernowsky P. Tumor markers in the management of patients with ovarian cancer. *Cancer Treat Rev*. 1995;21(3):215-245. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7656266>.
6. Sarojini S, Tamir A, Lim H, et al. Early detection biomarkers for ovarian cancer. *J Oncol*. 2012;2012:709049. doi:10.1155/2012/709049.
7. Rosen DG, Wang L, Atkinson JN, et al. Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2005;99:267-277. doi:10.1016/j.ygyno.2005.06.040.
8. Uno K, Homma S, Satoh T, et al. Tissue factor expression as a possible determinant of thromboembolism in ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2007;96(2):290-295. doi:10.1038/sj.bjc.6603552.
9. Han LY, Landen CN, Kamat A a, et al. Preoperative serum tissue factor levels are an independent prognostic factor in patients with ovarian carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(5):755-761. doi:10.1200/JCO.2005.02.9181.
10. Wang J-G, Geddings JE, Aleman MM, et al. Tumor-derived tissue factor activates coagulation and enhances thrombosis in a mouse xenograft model of human pancreatic cancer. *Blood*. 2012;119:5543-5552. doi:10.1182/blood-2012-01-402156.
11. Belting M, Ahamed J, Ruf W. Signaling of the tissue factor coagulation pathway in angiogenesis and cancer. *Arter Thromb Vasc Biol*. 2005;25(8):1545-1550. doi:10.1161/01.ATV.0000171155.05809.bf.
12. Schaffner F, Yokota N, Ruf W. Tissue factor proangiogenic signaling in cancer progression. *Thromb Res*. 2012;129 Suppl:S127-31. doi:10.1016/S0049-3848(12)70032-4.
13. Langer F, Spath B, Haubold K, et al. Tissue factor procoagulant activity of plasma microparticles in patients with cancer-associated disseminated intravascular coagulation. *Ann Hematol*. 2008;87(6):451-457. doi:10.1007/s00277-008-0446-3.
14. Amirkhosravi A, Bigsby G th, Desai H, et al. Blood clotting activation analysis for preoperative differentiation of benign versus malignant ovarian masses. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2013. doi:10.1097/MBC.0b013e32835e63b7.
15. Hemker HC, Giesen PL, Ramjee M, Wagenvoord R, Béguin S. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost*. 2000;83(4):589-591. doi:00040589 [pii].
16. Claussen C, Rausch A-V, Lezius S, et al. Microvesicle-associated tissue factor procoagulant activity for the preoperative diagnosis of ovarian cancer. *Thromb Res*. 2016;141:39-48. doi:10.1016/j.thromres.2016.03.002.
17. Rella C, Coviello M, De Frenza N, et al. Plasma D-dimer measurement as a marker of gynecologic tumors: Comparison with Ca 125. *Tumori*. 1993;79:347-

18. Morgante G, la Marca A, Ditto A, De Leo V. Comparison of two malignancy risk indices based on serum CA125, ultrasound score and menopausal status in the diagnosis of ovarian masses. *Br J Obstet Gynaecol*. 1999;106(6):524-527. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10426607>.
19. Khorana AA, Kuderer NM, Culakova E, Lyman GH, Francis CW. Development and validation of a predictive model for chemotherapy-associated thrombosis. *Blood*. 2008;111:4902-4907. doi:10.1182/blood-2007-10-116327.
20. Lee RD, Barcel DA, Williams JC, et al. Pre-analytical and analytical variables affecting the measurement of plasma-derived microparticle tissue factor activity. *Thromb Res*. 2012;129(1):80-85. doi:10.1016/j.thromres.2011.06.004.
21. Gadducci A, Baicchi U, Marrai R, Ferdeghini M, Bianchi R, Facchini V. Preoperative evaluation of D-dimer and CA 125 levels in differentiating benign from malignant ovarian masses. *Gynecol Oncol*. 1996;60(2):197-202. doi:10.1006/gyno.1996.0025.
22. Badgwell D, Bast Jr. RC. Early Detection of Ovarian Cancer. *Dis Markers*. 2007;23:397-410. doi:10.1155/2007/309382.
23. Rak J, Yu JL, Luyendyk J, Mackman N. Oncogenes, trousseau syndrome, and cancer-related changes in the coagulome of mice and humans. *Cancer Res*. 2006;66(22):10643-10646. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2350.
24. Thaler J, Ay C, Mackman N, et al. Microparticle-associated tissue factor activity, venous thromboembolism and mortality in pancreatic, gastric, colorectal and brain cancer patients. *J Thromb Haemost*. 2012;10(7):1363-1370. doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04754.x.
25. Worasethsin P NA. D-Dimer as a Tumor Marker in Pre-Operative Assessment of Adnexal Masses. 2013;96(11):1395-1400. doi:96(11):1395-400.
26. Langer F, Bokemeyer C. Crosstalk between cancer and haemostasis. Implications for cancer biology and cancer-associated thrombosis with focus on tissue factor. *Hamostaseologie*. 2012;32(2):95-104. doi:10.5482/ha-1160.
27. Hisada Y, Geddings JE, Ay C, Mackman N. Venous thrombosis and cancer: From mouse models to clinical trials. *J Thromb Haemost*. 2015;13(8):1372-1382. doi:10.1111/jth.13009.
28. Zwicker JI, Liebman H a, Neuberg D, et al. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res*. 2009;15(22):6830-6840. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0371.
29. KHORANA AA, FRANCIS CW, MENZIES KE, et al. Plasma tissue factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer. *J Thromb Haemost*. 2008;6(11):1983-1985. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03156.x.
30. Hernández C, Orbe J, Roncal C, et al. Tissue factor expressed by microparticles is associated with mortality but not with thrombosis in cancer patients. *Thromb Haemost*. 2013;110(3):598-608. doi:10.1160/TH13-02-0122.

31. Nalluri SR, Chu D, Keresztes R, Zhu X, Wu S. Risk of venous thromboembolism with the angiogenesis inhibitor bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis. *Jama*. 2008;300(19):2277-2285. doi:10.1001/jama.2008.656r300/19/2277 [pii].

III. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. med. Florian Langer für die Ermöglichung sowie die Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit. Ebenfalls möchte ich mich für die hilfreichen Anregungen und die investierte Zeit bedanken.

Zudem danke ich Frau Brigitte Spath für die hervorragende Assistenz im Labor und Frau Susanne Lezius für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Großer Dank geht an das Team der internistischen und allgemeinärztlichen Praxis Eimsbütteler Chaussee: Herrn Dr. med. Christoph Müller-Schwefe, Frau Jutta Rienow, Frau Dr. med. Barbara Schnee und Herrn Dr. med. Lothar Walther für die Unterstützung bei der Akquirierung eines gesunden Kontrollkollektivs.

Ich danke Sophie Weihe für die Vermittlung des Kontakts zur hausärztlichen Praxis und Philipp Koch für die persönliche Unterstützung.

Weiterführend möchte ich dem weiblichen Anteil meiner Familie und den Freundinnen danken, die sich bereitwillig als gesunde Probandinnen zur Verfügung gestellt haben und meinen Eltern, die mich kontinuierlich im Medizinstudium unterstützt haben. Vor allem danke ich meinen Großeltern, die mich fortwährend motiviert haben, eine Promotion zu verfassen.

IV. Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

Die Rekrutierung der Patientinnen wurde von mir ab September 2012 in der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf vorgenommen. Ich führte Studienaufklärung, Blutabnahme und die erste Datenerfassung in Form eines von mir entwickelten Fragebogens bei den Patientinnen durch. Alle weiteren Daten wurden durch mich aus den Patientenakten extrahiert und in eine Excel-Tabelle übertagen.

Die Aufbereitung, Konservierung und Analyse des Probenmaterials erfolgten entweder durch mich selbst oder unter meiner direkten Aufsicht durch Frau Brigitte Spath. Ein Teil der Analysen wurde in kooperierenden Laboren in den USA durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig in SPSS. Bezüglich der Wahl der statistischen Verfahren wurde ich durch Frau Susanne Lezius beraten. Die Quellenrecherche wurde eigenständig durchgeführt.

Das Manuskript inklusive Erstellung der Grafiken wurde persönlich verfasst und von Herrn PD Dr. med. Florian Langer anschließend ergänzt und korrigiert.

V. Lebenslauf – tabellarisch

Persönliche Daten

Name:	Antonia Carlota Claussen
Adresse:	Beetsweg 21, 22765 Hamburg
Telefon:	0176-66685021
Email :	carlotaclaussen@gmail.com
Nationalität:	deutsch
Geburtsdatum:	02.04.1989
Geburtsort :	Bad Oldesloe
Familienstand:	ledig
Konfession:	evangelisch

Beruflicher Werdegang

Seit 04/2016	Assistenzärztin in der Frauenklinik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
03/2015-04/2016	Assistenzärztin in der Gynäkologie und Geburtshilfe, Ev. Amalie Sieveking-Krankenhaus, Hamburg

Publikation:

Claussen C, Rausch A-V, Lezius S, et al. Microvesicle-associated tissue factor procoagulant activity for the preoperative diagnosis of ovarian cancer. Thromb Res.2016;141:3948.doi:10.1016/j.thromres.2016.03.002.

Schulische und universitäre Ausbildung

11/2014	Approbation als Ärztin
11/2014	Bestehen des zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung mit der Note –gut-
10/2010	Bestehen des ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung mit der Note –gut-
10/2008-11/2015	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
2008	Abitur am Johanneum zu Lübeck, Note 1,4
09-12/2006	Trimester am „Internat privé collège et lycée Saint Denis“, Loches, Frankreich
1999-2008	Johanneum zu Lübeck

Praktisches Jahr

03-07/2014	3.Tertial Gynäkologie und Geburtshilfe: Katholisches Marienkrankenhaus, Hamburg
12/2013-03/2014	2.Tertial Innere Medizin: AK St. Georg, Hamburg, ZNA, Kardiologie, allgemeine Innere Medizin
08-12/2013	1.Tertial Chirurgie: Tygerberg Hospital, Stellenbosch University, Südafrika, Traumatologie und Abdominalchirurgie

Famulaturen

08-09/2012	Famulatur in der internistischen Notaufnahme, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
07-08/2012	Famulatur im Victoria Hospital, Republik Seychellen, Ophthalmologie
07-08/2011	Famulatur in der Klinik für HNO,

11/2010 01/2006	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Famulatur in der Unfallchirurgie, Asklepios Klinik Altona zweiwöchiges Praktikum im Universitätsklinikum zu Lübeck, Sektion Plastische Chirurgie, Schwerbrandverletzte und Handchirurgie
--------------------	---

Zusätzliche Sprachaufenthalte

09-11/2010	Sprachaufenthalt in Lille, Frankreich
------------	---------------------------------------

Sprachkenntnisse

Muttersprache:	Deutsch
Andere Sprachen:	Englisch, fließend, IELTS-Test (7,5P.) Französisch, fließend, Apollinaire-Preis für außergewöhnliche Schulleistungen, BULATS-Niveau B2 Mittleres Latein

Nebentätigkeiten und soziales Engagement

11/2015	Aufenthalt als Ärztin im „Hôpital général de Kikwit“ für das Hammer-Forum e.V., D.R. Kongo
2011-2012	Studentische Aushilfe in der kardiologischen Praxis Prof. Dr. med. Markworth, Schäferkampsallee, Hamburg
2012	Tutorenstelle am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf für das Fach Problemorientiertes Lernen, Betreuung des ersten Semesters

VI. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: