

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Strahlentherapie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Komm. Direktorin: PD Dr. med. Gabriele Hänsgen



Untersuchungen zur prognostischen Bedeutung der Vascular Endothelial Growth Factor- und Von-Hippel-Lindau-Protein-Expression in Biopsiematerial fortgeschrittener Zervixkarzinome

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Esther Zorn
geboren am 08.11.1968 in Douala

Betreuer: PD Dr. med. Gabriele Hänsgen

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. J. Dunst in Lübeck
2. Prof. Dr. med. H. Taubert in Halle

Datum der Verteidigung: 06.03.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000013921

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013921>]

Kurzreferat

53 fortgeschrittene, primär mit kurativer Zielsetzung bestrahlte, Plattenepithelkarzinome der Zervix uteri wurden in dieser Arbeit retrospektiv untersucht. Histologische Tumorcharakteristika (Stadium, Differenzierungsgrad, Metastasierung), immunhistochemische tumorbiologische Marker (Gefäßdichte (CD31), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), von Hippel-Lindau- (VHL) und P53-Protein), Tumorphoxie und klinische Faktoren (Alter, Anämie) wurden erfasst und in ihren Interaktionen sowie in ihrem Einfluss auf die 5-Jahresüberlebensrate geprüft.

Alter ($p=0,05$), Anämie ($p=0,0001$) und Metastasierung ($p < 0,0001$) erwiesen sich ebenso als unabhängige Prognosefaktoren wie die biologischen Marker VHL ($p=0,041$) und P53 ($p=0,0005$). Weder CD31 ($p=0,67$) noch VEGF ($p=0,546$) hatten allein einen signifikanten Einfluss auf die 5-Jahresüberlebenszeit. Erst in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse gewannen beide Marker eine prognostische Bedeutung. Adjustiert nach Metastasierung, war das Risiko, am Tumor zu versterben 4,8fach höher bei niedriger VEGF-Expression ($p=0,002$) und 4,6fach bei niedriger Gefäßdichte ($p=0,001$). VEGF und VHL korrelierten miteinander ($p=0,045$) und zeigten auch eine Altersabhängigkeit ($p=0,02$; $p=0,013$). Unter Hypoxie neigten die Tumoren dazu, mehr Gefäße zu bilden ($p=0,08$), mehr VEGF ($p=0,15$), mehr VHL ($p=0,48$) und mehr P53 ($p=0,77$) zu exprimieren. Zwischen Gefäßdichte und Stadium oder Grading, zwischen VEGF und Stadium, Grading oder Metastasierung sowie zwischen VHL und P53, CD31, Stadium, Grading oder Metastasierung gab es keine signifikanten Korrelationen. P53 korrelierte lediglich mit dem Tumorstadium ($p=0,017$).

Sowohl klinische Faktoren als auch histologische und biologische Tumormarker wurden in der vorgelegten Arbeit identifiziert, die zur Prognoseschätzung der Überlebenszeit bei strahlentherapierten Zervixkarzinomen eingesetzt werden können und neue Therapieperspektiven eröffnen; wichtiger bleiben allerdings die klinischen Faktoren.

Zorn, Esther: Untersuchungen zur prognostischen Bedeutung der Vascular Endothelial Growth Factor- und Von-Hippel-Lindau-Protein-Expression in Biopsiematerial fortgeschrittener Zervixkarzinomen. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 56 Seiten, 2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Zervixkarzinom	5
1.2	Hypoxie und Tumorverhalten	6
1.3	CD31 und Angiogenese	6
1.4	Das VEGF-Mitogen	7
1.5	Das VHL-Protein	8
1.6	Das Tumorsuppressorgen <i>P53</i>	8
1.7	Fragestellung	9
2	Material und Methode	10
2.1	Patientengut	10
2.2	Behandlung	10
2.3	Biopsie-Entnahme und -Aufarbeitung	10
2.4	Immunhistochemie	10
2.5	Die pO ₂ -Messung	12
2.6	Statistische Auswertung	12
3	Ergebnisse	13
3.1	Klinische Ergebnisse	13
3.1.1	Überlebenszeit und Metastasierung	13
3.1.2	Anämie verschlechtert die Prognose	14
3.1.3	Einfluss des Alters auf das Überleben	15
3.1.4	Einfluss von Stadium und Differenzierungsgrad auf das Überleben	16
3.1.5	Überlebenszeit nach Tumorverhalten	17
3.2	Immunhistochemische Resultate	18
3.2.1	CD31 – ein Angiogenesemarker	18
3.2.2	Gefäßdichte in Abhängigkeit von Differenzierungsgrad und Stadium	20
3.2.3	Gefäßdichte und Fernmetastasierung	21
3.2.4	Gefäßdichte und Alter der Patientinnen	21
3.2.5	Gefäßdichte und Tumorphypoxie	23
3.3	Vascular Endothelial Growth Factor	23
3.4	Das Von-Hippel-Lindau-Protein	27
3.5	Das P53-Protein	30
3.6	Mehrfaktorielle Analyse	36
4	Diskussion	37
4.1	Methode und Auswertbarkeit	37
4.2	Prognose und klinische Faktoren	37
4.3	Die Bedeutung der Gefäßdichte	39
4.4	VEGF als Prognosemarker	40
4.5	VHL in fortgeschrittenen Karzinomen	42
4.6	Das P53	42
5	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	44
6	Literaturverzeichnis	45
7	Thesen	52
	Anhang	54

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AK	Antikörper
CD31	Cluster of Differentiation
CIN	Cervicale Intraepitheliale Neoplasien
CTC	Common Toxicity Criteria
DAB	Diaminobenzidin
FIGO	Fédération International de Gynéologie et d' Obstetrique
Flt-1	fm-like tyrosine kinase-1
G2/G3	Differenzierungsgrad 2 und 3
HDR	High Dose Rate
HF5	Hypoxische Fraktion < 5 mmHg
HPV	Human Papilloma Virus
HSV	Herpes simplex Virus
IRS	Immuno-Reaktive-Score
KDa	Kilo Dalton
KDR	kinase domain-containing receptor
mRNA	messenger ribonucleic acid
aMVD	aktiviertes Micro Vessical Density
MVD	Micro Vessical Density
sMVD	standard Micro Vessical Density
PBS	Phosphate Buffered Saline
P53	Protein P53
P53 ^{+/-}	+ positiv = abnorm, - negativ = wildtyp
<i>P53</i>	P53-Gen
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
RB	Retinoblastom
RR	Relatives Risiko
Sp1	Thrombospondin
TBS	Tris Buffered Saline
UICC	Union International Contre le Cancer
ÜZ	Überlebenszeit
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	Von-Hippel-Lindau

1 Einleitung

1.1 Das Zervixkarzinom

Mit 40-50% aller Genitalmalignome stellt das Zervixkarzinom einen der häufigsten Genitaltumore der Frau dar. Daran erkranken pro Jahr in Deutschland ca. 15 von 100.000 Frauen. Der erste Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 40.-50., der zweite zwischen dem 65.-75. Lebensjahr, jedoch können auch schon Erkrankungen vom 20. Lebensjahr an auftreten. In den frühen Stadien haben die Patientinnen eine gute Prognose. Die Fünfjahresüberlebenszeit beträgt ca. 80% im Stadium I, 70% im Stadium II, 45% im Stadium III und 15% im Stadium IV. Dank der Fortschritte in der Früherkennung können viele Erkrankungsfälle zeitig entdeckt und bei rechtzeitigem Therapiebeginn mit kurativem Ziel behandelt werden, so dass Zervixkarzinome zu den Tumoren mit guten Heilungschancen gehören. In den frühen Stadien ist eine Operation, in den späten Stadien die Bestrahlung die Therapie der Wahl (24, 76).

Das Zervixkarzinom entsteht in der Übergangszone, wo sich die bipotenten Zellen ständig regenerieren und umbauen, besonders während der Pubertät, der Schwangerschaft, der Geburt und dem Beginn der sexuellen Aktivität. Aus den bipotenten Reservezellen kann Plattenepithel auf zwei verschiedenen Wegen entstehen: durch Regeneration der Basalzellen des Plattenepithels der Portio oder als Plattenepithelmetaplasie der Zervixschleimhaut infolge Proliferation der basalen Reservezellen. Beide Wege, besonders jedoch der zweite, können durch atypische Proliferation zu einem Karzinom führen. Die Zellen dieses anatomischen Bereiches sind daher sehr empfindlich gegenüber kanzerogenen Einflüssen. Familiäre Disposition, mechanische, chemische, physikalische, bakterielle/virale und chronisch-entzündliche Reize, Toxine von Mikroorganismen, Smegmabestandteile des Mannes, Multiparität und Promiskuität sind begünstigende Faktoren bei der Entstehung der Zervixkarzinome (66). Gehäufte Infektionen mit Herpes-Simplex-Viren und Humanen Papilloma Viren (HPV) spielen dabei eine wichtige Rolle. Von entscheidender Bedeutung scheint die Infektion mit HPV zu sein. Die HPV-Viren der Typen 6 und 11 sind in cervicalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) I und II, die Typen 16 und 18 in 90% der Fälle in CIN III und in Zervixkarzinomen gefunden worden (52, 65, 68). Auch Rauchen trägt zur Tumorentstehung bei, da Mutagene sich in der Zervixschleimhaut anreichern können (64).

Die Tumoren werden nach den Regeln der Fédération International de Gynéologie et d' Obstetrique (FIGO) und der Union International Contre le Cancer (UICC) klassifiziert (7, 85). Das Tumorstadium bestimmt die Therapie: In den frühen Stadien werden eine Konisation, eine einfache Hysterektomie, eine Hysterektomie mit Lymphadenektomie oder eine Radikaloperation nach Wertheim-Meigs vorgenommen. Zur Senkung des Risikos eines lokalen Rezidivs erfolgt befundabhängig eine

adjuvante Bestrahlung. Ab Stadium IIb ist der Tumor meistens inoperabel und wird primär bestrahlt. Dabei wird die externe Strahlentherapie mit der intrakavitären Brachytherapie (Afterloading-Verfahren) kombiniert (39). Seit 1999 ist eine simultane Radiochemotherapie Standardtherapie der fortgeschrittenen Zervixkarzinome (54, 62).

Verschiedene Faktoren beeinflussen die Ansprechbarkeit des Tumors auf die Therapie. Dabei ist von besonderer Bedeutung die Tumorphypoxie.

1.2 Hypoxie und Tumorverhalten

In zahlreichen Untersuchungen wurde gezeigt, dass eine Beziehung zwischen Hypoxie und Angiogenese existiert. Unter Hypoxie kommt es vermehrt zur Bildung von Angiogenesefaktoren wie VEGF und Angiogenin (63). Laderoute et al. (46) demonstrierten, dass die Hypoxie die Expression von Angiogeneseinhibitoren wie Thrombospondin unterdrückt und die Expression von VEGF unabhängig von der P53-Zellregulation stimuliert. Hänsgen et al. (27) fanden einen Zusammenhang zwischen hoher Gefäßproliferation und niedrigem Sauerstoffpartialdruck. Somit kann andauernde Hypoxie zur Tumorprogression beitragen (81). West et al. (84) dagegen fanden keine Korrelation zwischen Hypoxie und VEGF-Expression. Die Angiogenese wiederum führt zum Tumorprogress. Yamakawa et al. (86) zeigten, dass der Angiogenesefaktor Angiopoetin 4 zwar auch in euoxischen tumorösen, vor allem aber in hypoxischen gesunden epithelialen renalen Zellen hoch exprimiert wird. Weiterhin bewirkt die Hypoxie eine maligne Transformation und erzeugt Gewebe mit malignem Phänotyp (5, 80, 82). Hoeckel et al. (32) bewiesen die schlechte Prognose hypoxischer Zervixkarzinome. Sie fanden, dass Tumoren mit moderatem Sauerstoffpartialdruck im Vergleich zu gut oxygenierten Tumoren expansiv in Parametrien wuchsen und sowohl hämatogen als auch lymphogen häufiger metastasierten. Weiterhin kann Tumorphypoxie den Chemo- und Radiotherapieeffekt beeinflussen (80, 81). Gut oxygenierte Tumoren sprechen gut auf Radiotherapie an (17, 29). Als Schlussfolgerung kann gelten, dass die Tumorphypoxie ein wichtiger Prognosefaktor bei Zervixkarzinomen ist.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob weitere klinische und molekularbiologische Faktoren wie z. B. das CD31, der VEGF, das P53- und das Von-Hippel-Lindau-Protein als Prognosefaktoren gelten können.

1.3 CD31 und Angiogenese

Angiogenese ist kein primäres Zeichen der Malignität (69); auch viele gutartige Tumoren, z. B. Nebennierenrindenadenome, sind hoch vaskularisiert. In der Prävasikularisationsphase sind Tumoren klein und haben eine limitierte Zellpopulation. Folkman charakterisierte 1990 als Erster das maligne

Tumorwachstum als angiogeneseabhängig. Nur in vitalem Tumorgewebe regenerieren sich Endothelzellen schnell und bilden neue Kapillarsprossen, nicht aber in nekrotischen Zonen. Das legt nahe, dass die Tumorzellen selbst die Endothelzellen aktivieren – welche wiederum das Tumorwachstum limitieren, weil sie langsamer wachsen als Tumorzellen. Verfügen Tumoren nicht über eigene Gefäße, wachsen sie ab einer Größe von 2 mm kaum noch (20, 21). Die höchste Vaskularisationszone ist im Tumorstroma (59) zu finden. Mammakarzinome mit Fern- oder Lymphknotenmetastasen waren in der Untersuchung von Weidner et al. (83) gefäßreicher als solche ohne Metastasen. Dank deren Kollagenasen und Plasminogenaktivatoren gelangen Tumorzellen in den Kreislauf und in Zielorgane und initiieren dort wiederum eine Angiogenese (55). Patientinnen mit lymphknotenmetastasiertem, aber moderat vaskularisiertem Tumor hatten eine bessere Prognose als jene mit metastasenfreiem, aber hochvaskularisiertem Tumor. Wie bei anderen Tumoren korreliert die Gefäßdichte auch bei Zervixkarzinomen mit Stadium und Größe, mit der Tiefe der Stromainvasion und dem Lymphknotenbefall (11). Hoch vaskularisierte Tumoren sind radio- (75) und chemotherapiesensibel (43).

1.4 Das VEGF-Mitogen

VEGF ist ein 34-42 KDa schweres heparinbindendes dimerisches Glykoprotein mit Disulfid-Brücken und hat eine einzige NH₂-terminale Aminosäuresequenz. Es ist schon gezeigt worden, dass VEGF ein wichtiger Mediator von Angiogenese in pathologischen, aber auch normalen Prozessen ist. VEGF wird z. B. bei Überempfindlichkeitsreaktionen und Wundheilungsprozessen überexprimiert (6, 16). Er bindet an spezifische Rezeptoren (flt-1 und KDR) und öffnet Kalziumkanäle, wodurch die Gefäßpermeabilität zunimmt. Die Sekretion des multifunktionellen Zytokins VEGF bewirkt die Migration von Endothelzellen (48). Patienten mit VEGF-reichen Tumoren haben eine erhöhte Gefäßdichte und eine schlechte Prognose (59).

Solide Tumoren brauchen die Angiogenese für Wachstum und Metastasierung. Kodama et al. (41) untersuchten die Expression von VEGF-mRNA und fanden die höchste Rate in frühinvasiven Zervixkarzinomen. Allerdings war die Expression im Stadium IVB höher als in den Stadien III und IVA. In verschiedenen Histologien und Lokalisationen, in verschiedenen Tiefen der Stromainvasion, der Infiltration von Parametrien und Vagina fanden sich keine Unterschiede in der VEGF-mRNA Expression. Im Vergleich zu mäßig bis gut differenzierten Karzinomen hatten schlecht differenzierte eine höhere VEGF-mRNA Expression. Tumoren mit Fernmetastasen zeigten eine erhöhte VEGF-mRNA. Asano et al. (2) hemmten mit der Injektion von monoklonalen VEGF-Antikörpern das Wachstum von Fibrosarkomen und Metastasen in Mäusen. Diese Ergebnisse könnten eine Basis für neue Therapiemöglichkeiten sein.

1.5 Das VHL-Protein

Das VHL-Gen-Produkt ist in seiner Wildtypform ein aus 214 Aminosäuren bestehendes, 24 kDa schweres Protein. Es kontrolliert das Zellwachstum in verschiedenen Geweben, z. B. in Nierengewebe. Das VHL-Protein spielt eine wichtige Rolle in der ``down-regulation`` u. a. der VEGF-Expression. Es inhibiert die Transkription von VEGF in Nierenzellkarzinomen. Tumoren mit VHL-Genmutation haben deswegen eine hohe VEGF-Expression und sind hochvaskularisiert (61). Das VHL-Protein ist ein multifaktorielles Protein, welches die Invasion von Metastasen in Gewebe verhindert. Die Zellmotilität wird durch die Stabilisierung von Actin an Vinculin gehemmt (27). Damit sollen Tumoren mit hoher „Wildtyp-VHL-Expression“ eine gute Prognose haben.

1.6 Das Tumorsuppressorgen *P53*

Das *P53*¹ Gen ist im kurzen Arm des Chromosoms 17 lokalisiert. Es reguliert den Zellzyklus. In seiner Wildtypform ist es ein rezessives Tumorsuppressorgen und nimmt über eine Zellzyklusregulation Einfluss auf die genomische Stabilität. Liegt ein Zellschaden vor, leitet Wildtyp-*P53* die Reparatur der geschädigten DNA ein oder stoppt, falls diese nicht möglich ist, den Zellzyklus in der G1-Phase und führt die Zelle in die Apoptose (31). In seiner mutierten Form wirkt *P53* dominant und onkogen (49). Die Alteration dieses Gens erscheint als häufigste Veränderung in den meisten Neoplasien. Das Genprodukt, das P53-Protein, fehlt oder ist abnorm exprimiert. Alteriertes P53-Protein hat eine Progression der Zervix-Neoplasien zur Folge (33, 58). Diese Alteration des Gens kann Folge seiner eigenen somatischen Mutation oder seiner Interaktion mit E6-Protein von onkogenen Human Papilloma Viren Typ 16 sein. HPV 18 kodiert das onkogene Protein E7, welche das Retinoblastomgen RB, auch ein Tumorsuppressor, bindet. Es entsteht ein falsches RB-Protein, welches den Zellzyklus nicht mehr regulieren kann. So kann es zu einer ungehemmten Zellvermehrung kommen. Der Typ 16 ist häufiger und aggressiver als der Typ 18 (40). Das normale P53 ist ein Phosphoprotein, welches nur moderat in allen Zellkernen vorkommt. Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit ist seine immunhistochemische Anfärbung zur Quantifizierung der Überexpression nicht hilfreich. Transformiertes P53 dagegen hat eine längere Halbwertszeit, kann Proteine binden und somit immunhistochemisch gefärbt werden (33, 53).

¹ Die Schreibweise für Tumorgene und kodierte Proteine folgt den Empfehlungen des „Genetic Nomenclature Guide“, zit. in: Christoph Wagener. Molekulare Onkologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1999

Hypoxie induziert die Sekretion von Nitritoxid (NO). Eine sehr hohe Konzentration von NO bewirkt die Akkumulation vom P53-Protein, was zum Zelluntergang führen kann. Eine niedrige Konzentration dagegen schützt vor Apoptose. Tumore, die NO produzieren und ein normales *P53* Gen haben, wachsen moderat. Bei Mutation von *P53* induziert NO ein schnelles Wachstum von Kolonkarzinomen (1).

1.7 Fragestellung

In der vorgelegten Arbeit wurde die CD31-, VEGF-, VHL- und P53-Protein-Expression als Tumor- und Angiogenesemarker immunhistochemisch untersucht. Weiter wurde statistisch untersucht, ob es Zusammenhänge zwischen den einzelnen Markern, zwischen den Markern und Hypoxie oder anderen Faktoren wie Anämie, Tumorstadium, Differenzierungsgrad, Alter, Tumorprogress oder Fernmetastasierung gibt. Von weiterem Interesse war die Frage, ob die Expression dieser Marker einen Hinweis auf das Therapieansprechen und damit auf das Überleben der Patientinnen hat. Die prognostische Bedeutung einzelner Marker wurde mittels Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier-Methode und Cox-Regression bestimmt. Zusammengefasst sollte diese Untersuchung dazu dienen, molekularbiologische Tumor- und Angiogenesemarker zu identifizieren, welche als Prognosemarker für Therapieentscheide genutzt werden und eventuell eine Begründung für neue Therapieansätze liefern könnten.

2 Material und Methode

2.1 Patientengut

Das Untersuchungsmaterial stammte von 53 Patientinnen mit fortgeschrittenem Plattenepithelkarzinom der Zervix uteri. Alle untersuchten Parameter wurden zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erhoben. 13 Patientinnen hatten einen Tumor im Stadium IIB entsprechend der FIGO-Klassifikation, 34 im Stadium IIIB und 6 im Stadium IVA. 27 Tumoren waren mäßig (G2) und 26 schlecht (G3) differenziert. Das Alter lag zum Zeitpunkt der Diagnose zwischen 35 und 78 Jahren. Alle Patientinnen wurden zwischen 1995 und 1999 unter kurativer Zielstellung primär bestrahlt.

2.2 Behandlung

Die Behandlungen, Verlaufsbeobachtungen und die Nachsorgeuntersuchungen aller Patientinnen erfolgten in der Universitätsklinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Die Therapie entsprach internationalen Konzepten für fortgeschrittene Stadien mit einer definitiven Radiotherapie. Behandelt wurden alle Patientinnen mit einer kombinierten Strahlentherapie, bestehend aus einer Hochvolttherapie mit 15 MeV-Photonenstrahlung über zwei individuell angepasste Beckenstehfelder und einer HDR-Kontakttherapie. Die Einzeldosen für die Hochvolttherapie betragen dabei 1,8 Gy bis zu einer Gesamtdosis von 45 Gy an der Beckenwand. Die Kontakttherapie mit Iridium-192 als HDR-Afterloading-Therapie wurde in fünf Fraktionen mit 7 Gy Einzeldosis appliziert. Die eingestrahlte Gesamtdosis im Bereich der Lymphabflusswege lag bei 50-52 Gy, im Referenzpunkt A 70 Gy, die Blasen- und Rektumbelastung sollte dabei 60 Gy nicht überschreiten. Die Gesamtbehandlungszeit betrug 45 Tage.

2.3 Biopsie-Entnahme und -Aufarbeitung

Biopsien wurden aus nicht-nekrotischen und nicht massiv blutenden, makroskopisch sichtbaren Tumorarealen vor Therapiebeginn entnommen. Dort wurde auch der Sauerstoffpartialdruck im Gewebe gemessen. Die Gewebeentnahme erfolgte ohne Narkose. Die entnommenen Proben wurden kurz in physiologischer Kochsalzlösung gespült und in Formalinpuffer für die Histologie fixiert.

2.4 Immunhistochemie

Immunhistochemisch wurde die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex) benutzt. Die in Paraffin eingebetteten 4 µm großen dünn geschnittenen Blöcke wurden auf unbeschichtete Objektträger aufgebracht. Diese Schnitte wurden bei 60°C für mindestens eine Stunde in den Brutschrank eingestellt. Die Entparaffinierung erfolgte durch je fünfminütige Behandlung mit Xylol

in absteigender (2*100%, 2*96%, 1*70%, 1*50%) Alkoholreihe. Zur Blockierung endogener Peroxidase wurden die Schnitte 30 Minuten in Methanol-Gemisch eingestellt (200 ml Methanol + 6 ml H₂O₂). Danach wurden sie mit Aqua destillatae gespült, mit Citratpuffer versetzt und bei 600 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Die verschiedenen Proteine wurden unterschiedlich erhitzt: VEGF 5*5, p53 4*5, VHL 3*5, CD31 3*5 Minuten. Nach jeder Phase wurden die Schnitte gegen Austrocknung mit dem Puffer aufgefüllt. Am Ende der Hitzebehandlung, nach 20minütigem Abkühlen wurden die Schnitte mit Tris-Buffer-Saline (TBS) gespült. Bei VHL und P53 wurde keine Trypsinandaung durchgeführt. VEGF brauchte eine 0,0005%, CD31 eine 0,001% Trypsinlösung (1 ml 0,1% Trypsinlösung in 100 ml 0,05 mol Tris-HCl, pH 7,8). Die Lösung wurde bei 37 °C vorgewärmt. Die Schnitte wurden 15 Minuten damit bearbeitet, erst mit Leitungswasser, dann mit TBS gespült. TBS fördert die oberflächliche Annahme des Antikörpers. Um eine unspezifische Bindung des Sekundär-Antikörpers zu vermeiden, wurden die Schnitte 15 Minuten lang bei Raumtemperatur (RT) in mit Phosphat Buffer Saline (PBS) verdünntem, normalem Anti-Maus-Serum inkubiert. Der Primär-Antikörper wurde mit PBS verdünnt (VEGF 1:25, P53 1:200, VHL 1:50, CD31 1:20). Die Schnitte mit VEGF-Antikörper wurden bei 4 °C über Nacht, die anderen 1 Stunde im Brutschrank inkubiert, dann mit PBS gespült. In PBS verdünntem (1:100) biotyniliertem Antikörper (Sekundär-Antikörper) wurden die Schnitte 30 Minuten bei RT inkubiert und nachher mit PBS gespült. 0,1 g Diaminobenzidin (DAB) wurde auf 100 ml Tris-HCl verdünnt, filtriert und mit 100 µl H₂O₂ gemischt. Damit wurden die Schnitte 5-7 Minuten bearbeitet, anschließend gründlich mit Leitungswasser gespült und dann in Aqua destillatae eingestellt. Danach wurden die Schnitte 5-10 Sekunden in mit Aqua destillatae 1:4 verdünntem Hämalaun getaucht, noch einmal in Aqua destillatae und in aufsteigender Alkoholreihe gespült, und abschließend mit wasserunlöslichem Entellan eingedeckt.

Tabelle 1: Antikörperspezifität

	Antikörper	Hersteller
CD31	Monoclonal mouse AK	DAKO
VHL	Monoclonal anti-human mouse AK	Pharmingen International
P53	Monoclonal anti-human mouse AK	DAKO
VEGF	Polyclonal rabbit AK	CALBIOCHEM

Die VEGF- und VHL-Expression wurden nach den Prinzipien des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele ausgewertet. Der IRS ist das Produkt aus Anfärbungsintensität (staining intensity, SI) und Prozent der positiven Zellen (PP). Dabei ist die Färbereaktion wie folgt bewertet: 0 für keine, 1 für schwache, 2 für mäßige, 3 für starke Reaktion. Bei den Prozent der positiven Zellen steht 0 für 0%, 1 für 10%, 2 für 11-50%, 3 für 51-80% und 4 für mehr als 80% positive Zellen. Der IRS variierte von 0 bis 12. Reine Prozentangaben waren für p53 geeignet. Dafür wurden die stark angefärbten Zonen gesucht. Die positiven (mit angefärbten Zellkernen) und die negativen Zellen wurden mit der

Zählkammer ermittelt und daraus der Prozentwert errechnet. Zur Bestimmung der Gefäßdichte wurde die Methode nach Weidner benutzt. Es wurden nur die eigentlichen Gefäße mit Lumen gezählt, nicht die angefärbten Endothelzellen. Die Untersuchungsfelder, die sog. ``hot spots`` waren intensiv gefärbt und ohne Nekrose, Blutungen, Zysten und Degenerationszonen. Die Felder wurden erst in geringerer Vergrößerung durchgemustert, die Auszählung erfolgte dann in 400facher Vergrößerung (Mikroskop: Olympus BX40 F4 mit hochauflösendem Gesichtsfeld) in zehn nicht überlappenden Gesichtsfeldern.

2.5 Die pO₂-Messung

Die Messung der Tumoroxygenierung erfolgte polarographisch. Eine sauerstoffsensitive Nadelelektrode wurde in vier Messtracks jeweils 22 mm tief in den Tumor geführt. Entlang dieser Strecke wurde an jeweils 32 Messpunkten der Sauerstoffpartialdruck mit einem pO₂-Histographen (Fa. Eppendorf, Hamburg) ermittelt. Die so erhaltenen mindestens 100 Messwerte vermitteln einen Eindruck von der räumlichen Verteilung der Gewebeexygenierung. Zur Bestimmung der Oxygenierung wurde der Median aller Messwerte verwendet; für die Hypoxie der prozentuale Anteil der Messwerte unter 2,5 und 5 mmHg.

2.6 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden statistisch mit dem Programm SPSS 11.0 für Windows ausgewertet. Die Verteilung der Messwerte wurde durch den Mittelwert mit Standardfehler oder durch Prozentsatz angegeben. Um einen statistischen Trend zu erkennen, wurden Merkmale in Stufen oder in Untergruppen in Abhängigkeit vom Median gruppiert. Die Untersuchung eines Zusammenhanges zwischen zwei kategorialen Merkmalen erfolgte mittels Kreuztabellen, die statistische Signifikanz dafür mittels Chi-Quadrat-Test. Bei zwei metrischen Merkmalen erfolgte die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson. Die Assoziation zwischen einem metrischen und einem kategorialen Merkmal wurde durch Mittelwertvergleich ermittelt und in Fehlerbalken dargestellt. Der statistische Test des Mittelwertvergleichs erfolgte mittels ANOVA-Mittelwertanalyse und t-Test für unabhängige Stichproben. Die Überlebensanalyse wurde mittels Kaplan-Meier-Methode und Cox-Regression berechnet. Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Ergebnisse

Die Analyse erfolgte nach den klinischen Behandlungsergebnissen. Eine Patientin verstarb am Herzinfarkt. Abbildung 1 zeigt das tumorspezifische Gesamtüberleben. Die mittlere Überlebenszeit aller Patientinnen in einer Beobachtungszeit von maximal 60 Monaten betrug $43,91 \pm 2,99$ Monate (MW \pm SE), $CI_{95\%} = (38,05; 49,78)$.

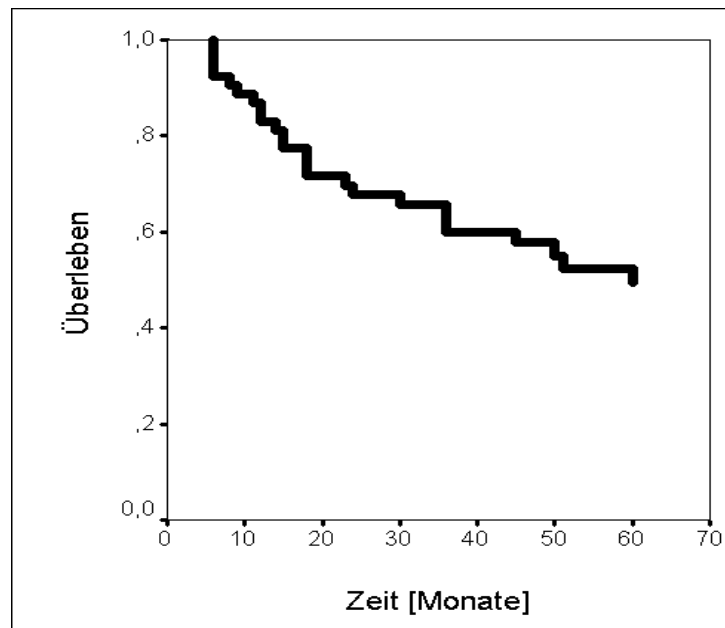


Abbildung 1: Gesamtüberleben aller untersuchten Patientinnen

3.1.1 Überlebenszeit und Metastasierung

In der Abbildung 2 sind deutliche Überlebensunterschiede zwischen metastasierenden und nicht metastasierenden Karzinomen dargestellt. Die Patientinnen mit Metastasen hatten eine signifikant schlechtere Prognose, $p < 0,0001$. Die Tabelle 2 zeigt diese Unterschiede.

Tabelle 2: Überlebenszeit in Abhängigkeit von Fernmetastasierung

Fernmetastasierung	N	ÜZ \pm SE
ja	12	$26,75 \pm 5,06$
nein	41	$46,71 \pm 3,23$

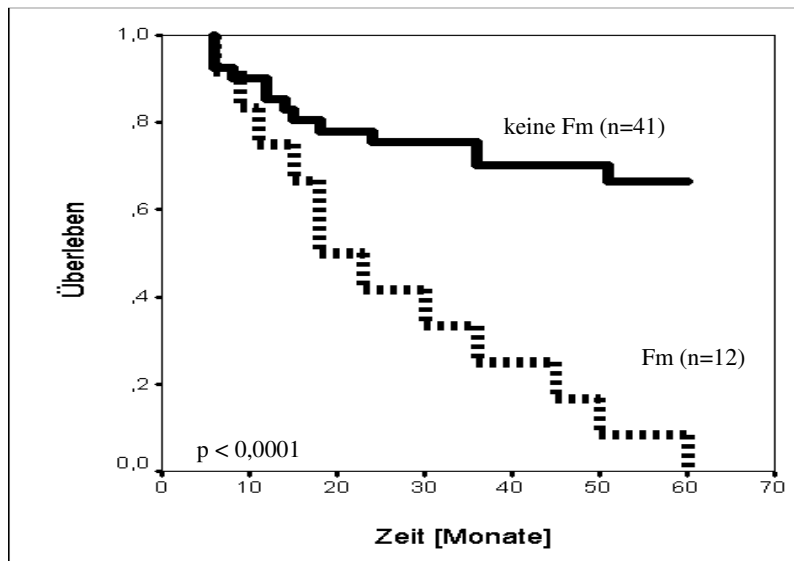


Abbildung 2: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Metastasierung

3.1.2 Anämie verschlechtert die Prognose

Als Anämie wurden prätherapeutische Hämoglobinwerte unter 7 mmol/l bezeichnet (nach Kriterien des CTC). Die Abbildung 3 zeigt die schlechte Prognose anämischer Patientinnen

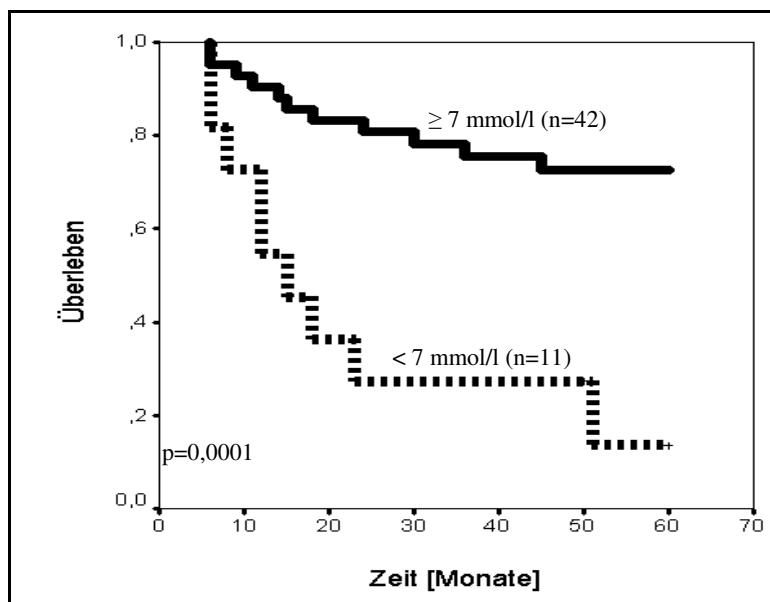


Abbildung 3: Überlebenszeit in Abhängigkeit von einer Anämie

Die Tabelle 3 zeigt, dass nichtanämische Patientinnen durchschnittlich 25 Monate länger lebten als anämische ($p=0,0001$).

Tabelle 3: ÜZ in Abhängigkeit von der Hb-Konzentration

Hämoglobin (mmol/l)	N	MW \pm SE
< 7	11	24,23 \pm 6,01
\geq 7	42	49,13 \pm 2,95

3.1.3 Einfluss des Alters auf das Überleben

Die Aufteilung des Alters in fünf Gruppen zu je 10 Jahren (analog Tabelle 10) ließ keinen statistischen Trend hinsichtlich des altersbezogenen Überlebens erkennen; nur die Altersgrenze von 60 Jahren ergab eine bessere Prognose für die älteren Patientinnen im Vergleich zu den unter 60-jährigen; $p=0,053$.

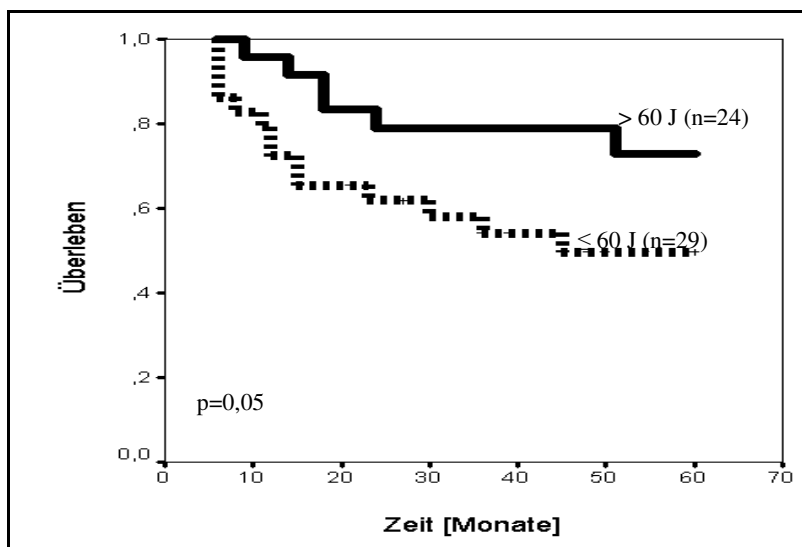


Abbildung 4: Überlebenszeit: in Abhängigkeit vom Alter

Tabelle 4: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Alter, $p=0,05$

Altersstufen	N	MW \pm SE	95 %-CI
\leq 60 Jahre	29	38,54 \pm 4,33	30,06-47,9
> 60 Jahre	24	50,33 \pm 3,63	43,21-57,45

3.1.4 Die Einflüsse von Stadium und Differenzierungsgrad auf das Überleben

Je fortgeschrittener das Tumorstadium war, desto schlechter war das Überleben, $p=0,14$. Das trifft auch für den Differenzierungsgrad des Tumors zu, $p=0,06$ (Abb. 5, 6 sowie Tab. 5, 6).

Tabelle 5: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Stadium, $p=0,14$

Stadium	N	MW \pm SE
IIB	13	46,72 \pm 5,72
IIIB	34	43,11 \pm 3,52
IVA	6	25,33 \pm 10,04

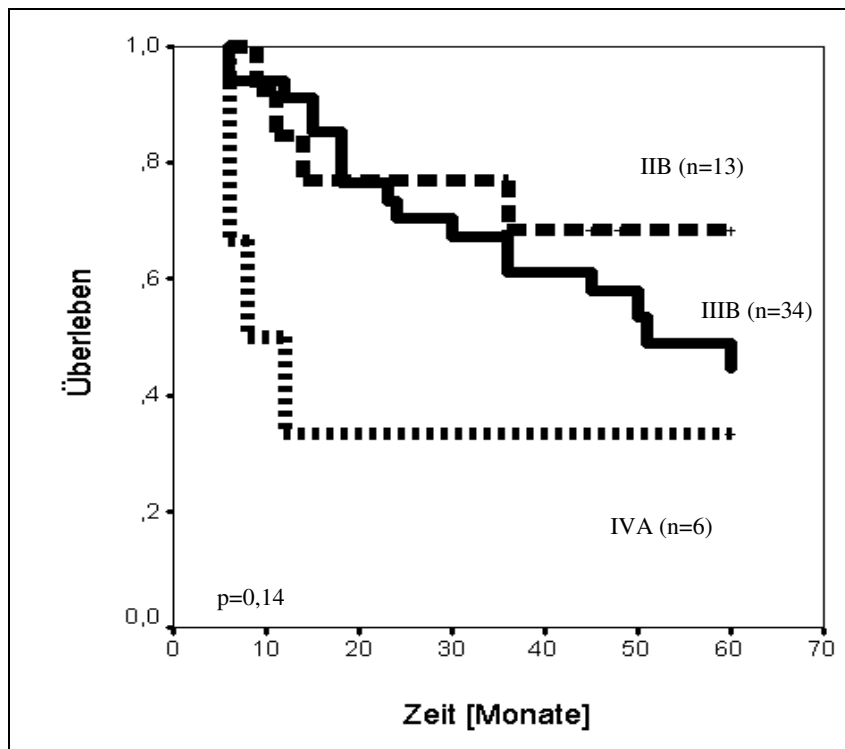


Abbildung 5: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Stadium

Obwohl sich diese Tendenz erkennen lässt, war der statistische Test in beiden Fällen ohne Signifikanz.

Tabelle 6: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Grading, $p=0,06$

Grading	N	MW \pm SE
2	27	47,91 \pm 3,84
3	26	35,66 \pm 4,40

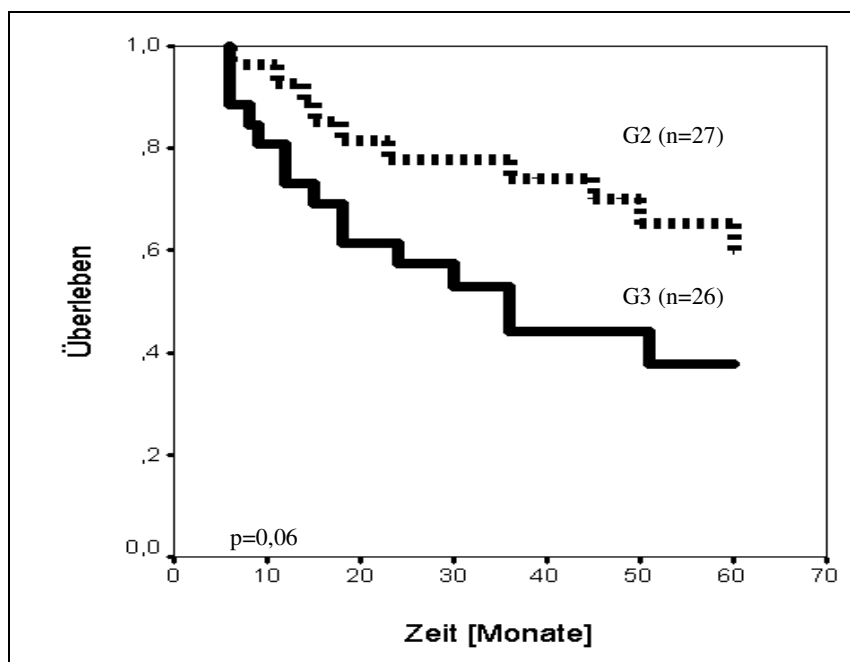


Abbildung 6: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Grading

3.1.5 Überlebenszeit nach Tumorverhalten

Die Analyse der Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Tumorverhalten ergab, wie in der Abbildung 7 dargestellt, folgende Ergebnisse: Die Patientinnen mit Karzinomen in lokal kompletter Remission nach der Primärtherapie hatten die beste Prognose. Die Überlebenskurven von Patientinnen mit metastasierten sowie mit lokal progressiven Karzinomen verlaufen parallel. Der Tabelle 7 ist zu entnehmen, dass Patientinnen in kompletter Remission durchschnittlich 31 Monate länger als solche mit Fernmetastasierung lebten, und diese wiederum 7 Monate länger als jene mit Tumor in lokalem Progress, $p < 0,0001$.

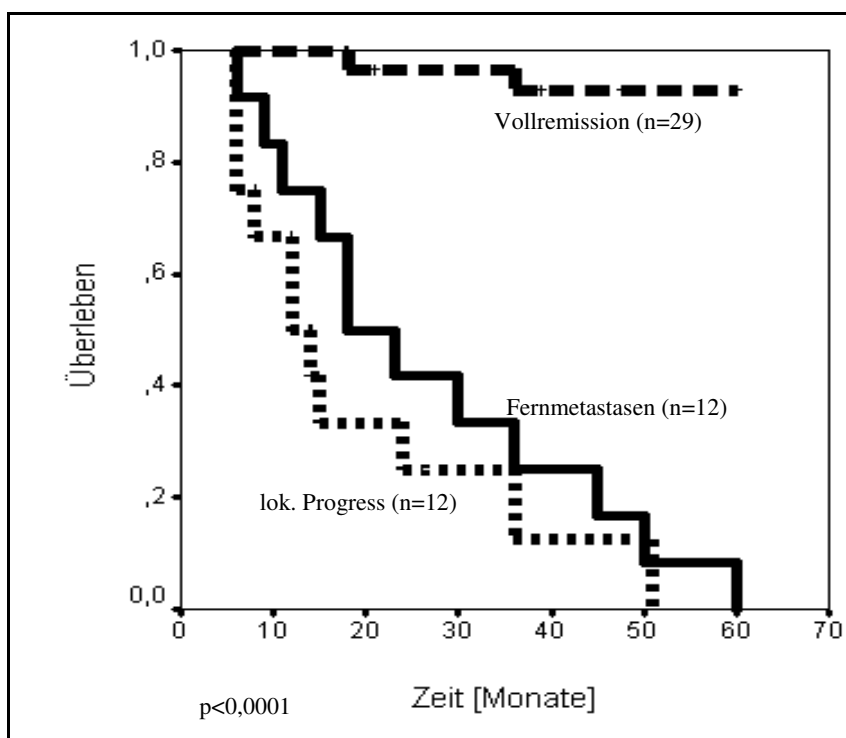


Abbildung 7: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Tumorstatus

Tabelle 7: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Tumorstatus, $p < 0,0001$

Tumorstatus	N	MW \pm SE
Lok. Progress	12	19,46 \pm 4,66
Fernmetastasen	12	26,46 \pm 5,06
Vollremission	29	57,69 \pm 1,63

3.2 Immunhistochemische Resultate

3.2.1 CD31, ein Angiogenesemarker

Zur Untersuchung der Gefäßdichte im Tumor wurden 53 der entnommenen Gewebeproben immunhistochemisch mit dem monoklonalen CD31-Antikörper bearbeitet. Zur Bestimmung der Gefäßdichte wurde die Methode nach Weidner benutzt. Es wurde nur die eigentlichen Gefäße mit Gefäßlumen gezählt. Die Untersuchungsfelder, die sog. "hot spots" waren intensiv verfärbt und ohne Nekrose, Blutungen, Zysten oder Degenerationszonen. Die Felder waren erst in geringerer Vergrößerung durchgemustert. Die Auszählung erfolgte in 400facher Vergrößerung in zehn nicht überlappenden Gesichtfeldern.

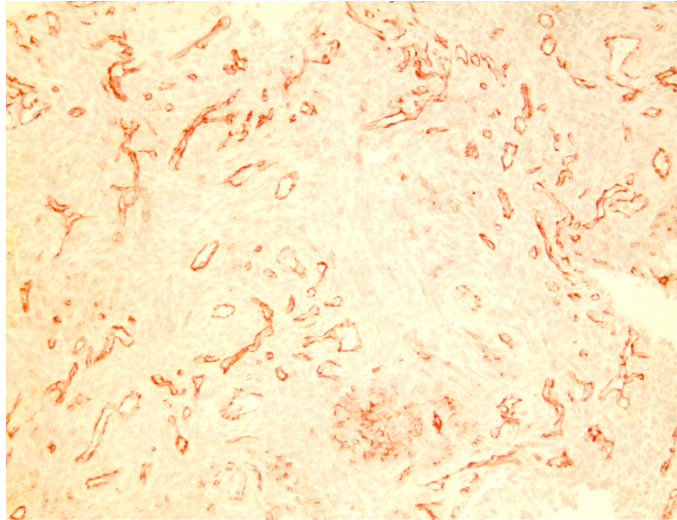


Abbildung 8: Immunhistochemie eines gefäßreichen Tumors,
100-fache Vergrößerung

Die mittlere Gefäßdichte des gesamten Patientenguts lag bei $136,43 \pm 11,30$ (MW \pm SE), der Median der Gefäßdichte bei 121. Die Überlebensanalyse erfolgte nach Unterteilung der Werte in zwei Gruppen: oberhalb und unterhalb des Medians.

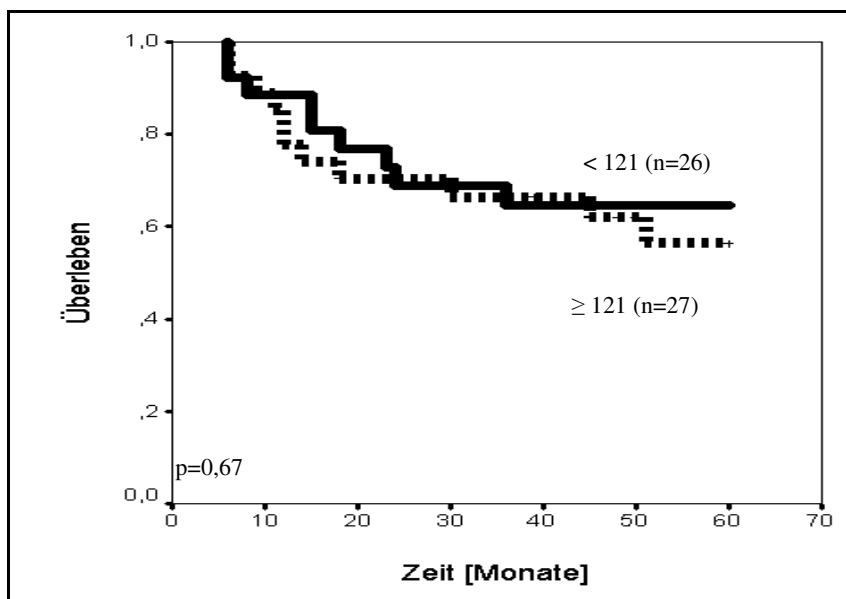


Abbildung 9: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Median der Gefäßdichte

Beide Kurven verlaufen fast parallel, erst ab ca. 45 Monaten nach Therapiebeginn ist ein kleiner Unterschied zu beobachten: Die mittlere Überlebenszeit bei Patientinnen mit Gefäßdichte unter dem Median lag bei $44,78 \pm 4,21$ Monaten.

Patientinnen mit Werten über dem Median hingegen überlebten $43,14 \pm 4,24$ Monate; insgesamt nur 1,5 Monate weniger. Allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant ($p=0,67$), was an den geringen Fallzahl liegen mag. Trotzdem ist eine starke Tumervaskularisation als ungünstiger Prognosefaktor anzusehen. Wie weit die Angiogenese mit den anderen untersuchten Parametern korrelierte, wird im Folgenden gezeigt:

3.2.2 Gefäßdichte in Abhängigkeit von Differenzierungsgrad und Stadium

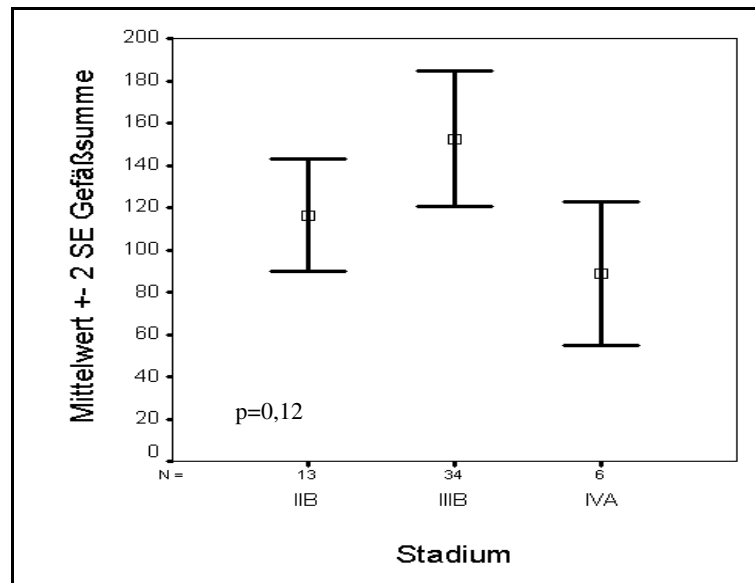


Abbildung 10: Gefäßdichte und Tumorstadien

Der Mittelwert der Gefäßdichte war in Stadium IVA ($88,83 \pm 16,98$) tendenziell kleiner als in den Stadien IIIB ($152,53 \pm 16,03$) und IIB ($116,31 \pm 13,30$), $p=0,12$. Das Tumorstadium beeinflusst die Angiogenese nicht signifikant (Abbildung 10).

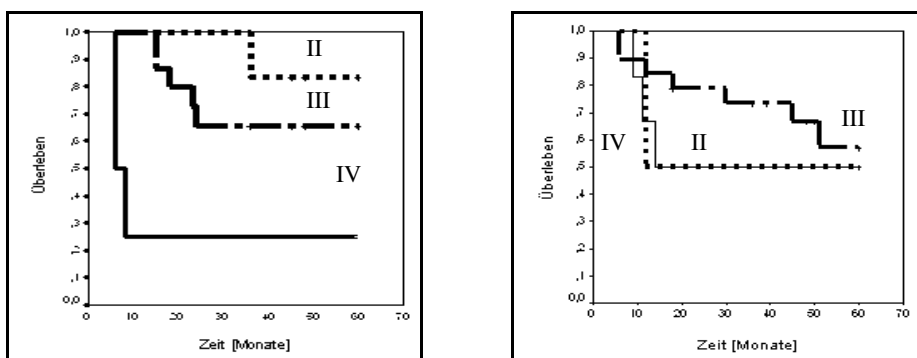


Abb. 11: Überlebenszeit nach Tumorstadium bei Gefäßdichte < 121 (links) und ≥ 121 (rechts), $p=0,09$

Die Überlebenszeit wurde in Abhängigkeit von Tumorstadium, adjustiert nach Gefäßdichte, analysiert. Unabhängig von Gefäßrarität oder -reichtum hatte das Stadium IVA die schlechteste Prognose: Es ergab sich eine schlechtere Lebenserwartung bei Patientinnen mit gefäßreichem Tumor, $p=0,09$. Lag die Gefäßdichte unter dem Median, korrelierte die Prognose mit dem Stadium. Bei einer Gefäßdichte über dem Median überlebten Patientinnen mit Stadium II ebenso schlecht wie im Stadium IV (Abbildungen 11).

Tabelle 8: Mittelwertvergleich, Gefäßdichte bezogen auf Stadium und Grading

Tumorcharakteristika	N	MVD		
		MW	SE	p
Stadium IIB	13	116,3	13,2	0,12
IIIB	34	152,5	16	
IVA	6	88,8	16,9	
Grading 2	27	132,7	13,4	0,74
3	26	147	18,6	

Tabelle 8 zeigt, dass das Tumorstadium die Gefäßneubildung, wenn auch nicht signifikant ($p=0,12$), beeinflusste. Der Differenzierungsgrad hatte keinen Einfluss ($p=0,74$).

3.2.3 Gefäßdichte und Fernmetastasierung

Der Gefäßmittelwert von metastasierten Tumoren lag weit oberhalb von dem der nicht metastasierten ($174,5 \pm 27,46$ vs. $125,2 \pm 11,84$; Tabelle 9). Das heißt, gefäßreiche Tumoren metastasierten häufiger. Bei Gruppierung der Gefäßdichte in Werte über und unter dem Median wurde diese Tendenz deutlicher.

Tabelle 9: Metastasierung und Gefäßdichte, Mittelwertvergleich, $p=0,06$

	N	MW	S-Fehler	Median	95%-CI für MW
keine Fm	41	125,2	11,84	112	101,3-149,2
Fernmetastasen	12	174,5	27,46	178	114,1-235,0
gesamt	53	136,4	11,30	121	113,7-159,1

3.2.4 Gefäßdichte und Alter der Patientinnen

Die Angiogenese scheint, wie in der Abbildung 12 dargestellt, unabhängig vom Alter gleichmäßig zu sein, $p=0,38$. Die Frage, ob es durch die geringe Patientinnenzahl zu erklären ist, bedarf einer umfangreicheren Untersuchung.

Die Tabelle 10 zeigt die Überlebenszeit in Abhängigkeit von Alterstufen, adjustiert nach dem Median der Gefäßdicke. Die schlechteste Prognose hatten jüngere Patientinnen mit einer Gefäßdicke unter dem Median; die beste dagegen jüngere Patientinnen mit einer Gefäßdicke über dem Median ($p=0,03$).

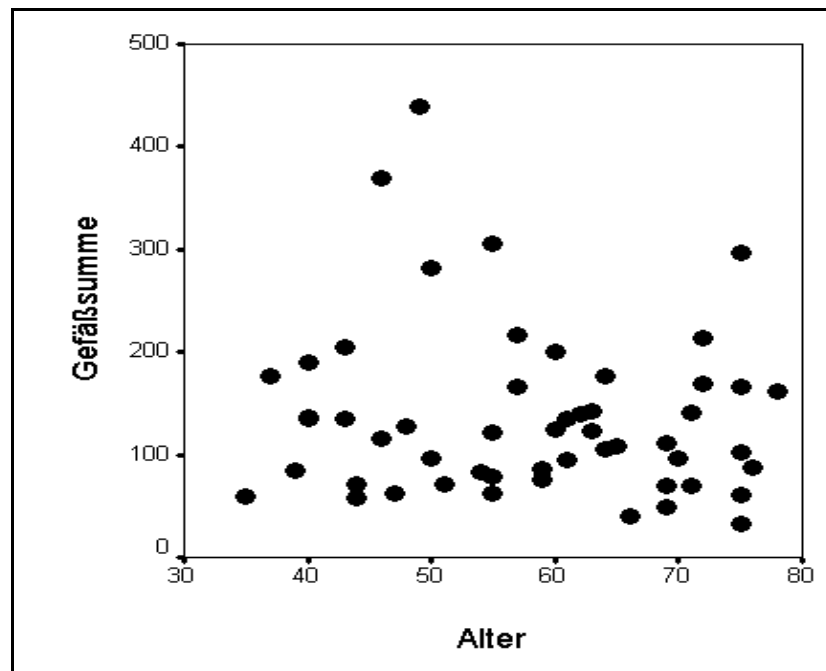


Abbildung 12: Gefäßdicke und Alter, $p=0,38$

Tabelle 10: Überlebenszeit in Abhängigkeit von Altersstufen, $p=0,03$

Altersstufen	MVD < 121	N	ÜZ ± SE
	MVD ≥ 121		
31-40	<	2	22 ± 14
	≥	4	48 ± 12
41-50	<	5	22,6 ± 7
	≥	6	47,33 ± 8,56
51-60	<	6	31,57 ± 8,08
	≥	6	23,83 ± 6,68
61-70	<	8	52,5 ± 4,5
	≥	5	41,8 ± 7,94
> 70	<	5	48,6 ± 8,18
	≥	6	37,5 ± 10,15

3.2.5 Gefäßdichte und Tumorhypoxie

Obwohl die Wahrscheinlichkeit $p=0,08$ nur eine Tendenz zeigte, ist eine gewisse Korrelation zwischen der Gefäßdichte und der Tumorhypoxie festzustellen (Abbildung 13). Je hypoxischer der Tumor, desto mehr Gefäße werden gebildet; Korrelationskoeffizient 0,19.

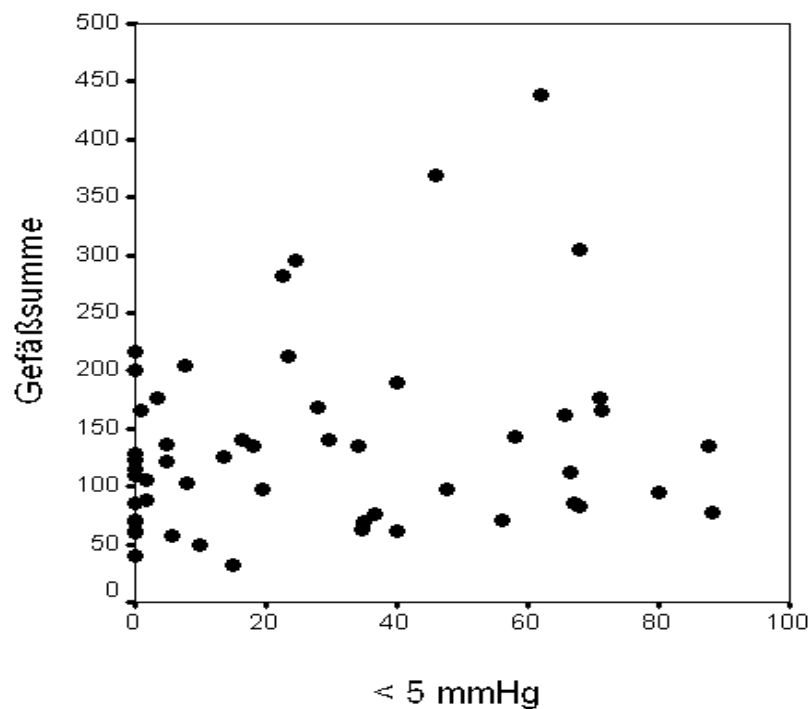


Abbildung 13: Gefäßdichte und Tumorhypoxie, $p=0,08$

3.3 Vascular Endothelial Growth Factor

Der Vascular Endothelial Growth Factor ist ein Zytokin, welches die Einwanderung von Endothelzellen in entzündliches aber auch in tumoröses Gewebe bewirkt und somit die Angiogenese fördert. Die Auswertung erfolgte nach den Prinzipien des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele. Der IRS ist das Produkt aus Anfärbungsintensität (staining intensity, SI) und Prozent der positiven Zellen (PP). Der Mittelwert der VEGF-Expression aller Patientinnen betrug $8,32 \pm 0,44$, der Median 8,00. 6 Biopsien zeigten eine schwache (IRS 0-4), 30 eine mäßige (IRS 6-9) und 17 eine starke (IRS 12) Reaktion.

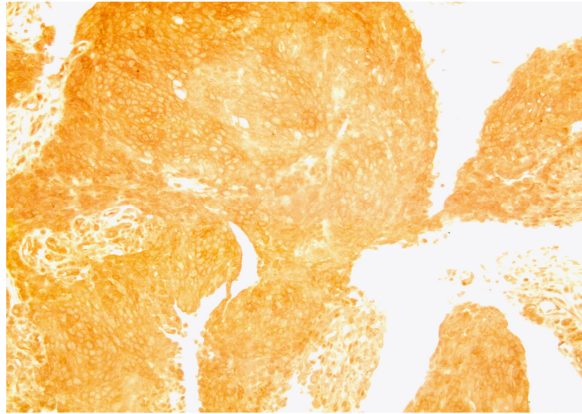


Abbildung 14: VEGF-Expression, starke Färbung, 100-fache Vergrößerung

Aus Grafik 15 und Tabelle 11 ist zu entnehmen, dass Patientinnen mit niedriger VEGF-Expression die schlechteste Prognose hatten, allerdings ohne Signifikanz $p=0,546$. Deren mittlere Überlebenszeit lag ca. 12 Monate unter der von Patientinnen mit der höchsten VEGF-Expression.

Tabelle 11: ÜZ in Abhängigkeit von VEGF-Expression, $p=0,546$

VEGF-Stufen	N	ÜZ \pm SE
IRS 0-4	6	33,33 \pm 10,89
IRS 6-9	30	41,87 \pm 4,02
IRS 12	17	45,68 \pm 4,60

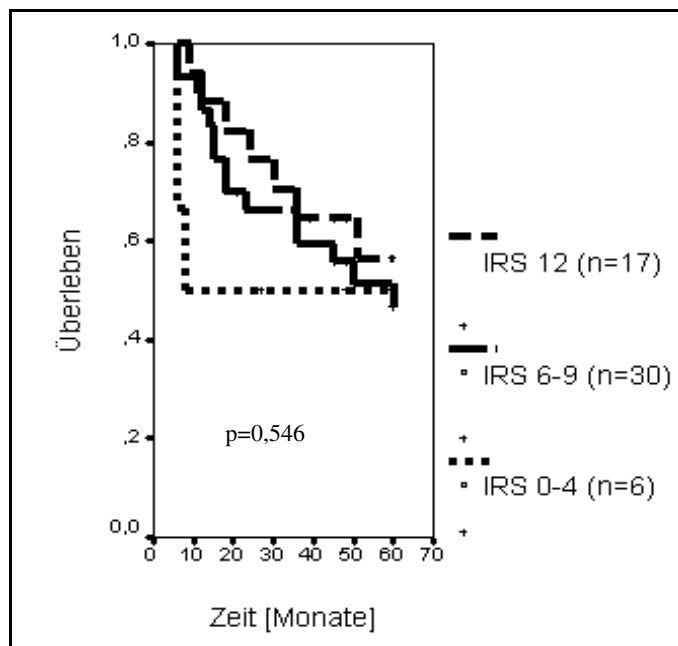


Abbildung 15: Überlebenszeit in Abhängigkeit von VEGF-Expression

Tabelle 12: VEGF-Expression in Abhängigkeit einiger klinischer Faktoren

Tumorcharakteristika	N	VEGF-Expression		
		MW	SE	p
Stadium IIB	13	9	0,8	0,32
IIIB	34	8,2	0,5	
IVA	6	7,3	1,9	
Grading 2	27	8,7	0,4	0,22
3	26	7,8	0,7	
Metastasierung Fm	12	8,6	0,5	0,33
keine Fm	41	8,3	0,4	

Der Tabelle 12 ist zu entnehmen, dass die höchste VEGF-Expression in Stadium IIB vorkam. Der Mittelwert war hier größer als der im Stadium IIIB; und in IIIB wiederum größer als in IVA. Je fortgeschrittener der Tumor, desto weniger neigte er dazu, VEGF zu exprimieren. Mäßig differenzierte Tumoren neigten dazu, VEGF höher zu exprimieren als schlecht differenzierte, $p=0,22$. Metastasierende Tumoren zeigten bezüglich der VEGF-Expression kaum Unterschiede gegenüber nicht metastasierenden, $p=0,33$. Zusammengefasst hatten Stadium, Differenzierungsgrad und Metastasierung keinen Einfluss auf die VEGF-Expression.

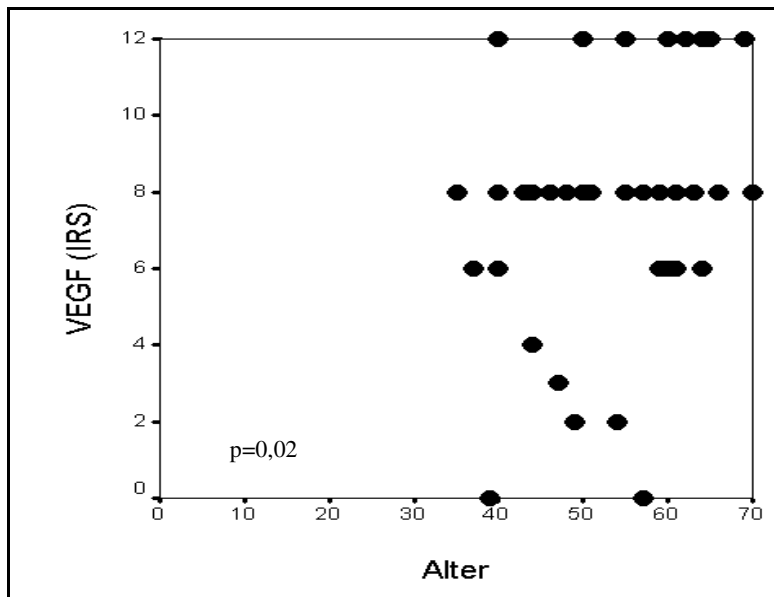


Abbildung 16: VEGF und Alter

In der Abbildung 16 ist eine altersabhängige Korrelation mit der VEGF-Expression zu erkennen; der Korrelationskoeffizient betrug 0,42; $p=0,02$.

Tabelle 13: VEGF und Hypoxie

VEGF-Stufen	HF 5 bei 0 Gy		Gesamt
	keine Werte	messbare Werte	
IRS 0-4	3	3	6
%	50	50	100
IRS 6-9	7	23	30
%	23,3	76,7	100
IRS 12	2	15	17
%	11,8	88,2	100

Unter Hypoxie nahm auch die VEGF-Expression zu (Tabelle 13). Im Bereich niedrigen IRS waren 50% der Tumoren hypoxisch und 50% euoxisch; bei mittlerem IRS 76,7% hypoxisch und 23,3% euoxisch; bei starkem IRS 88,2% hypoxisch und 11,8% euoxisch, allerdings $p=0,15$.

Zwischen VEGF und VHL-Expression zeigte sich eine gewisse Korrelation (Siehe Abbildung 17). Der Korrelationskoeffizient betrug 0,27; $p=0,045$.

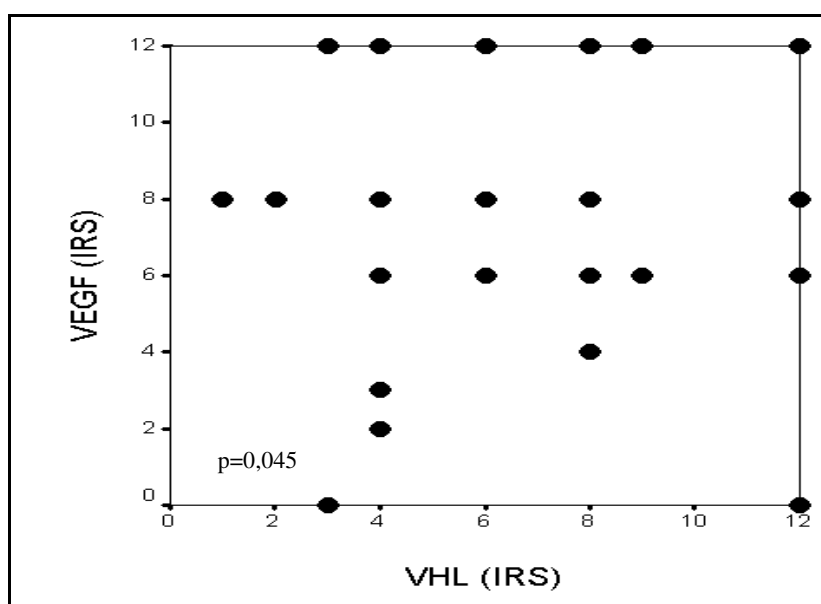


Abbildung 17: VEGF und VHL

Die Gefäßrarität neigte dazu, die VEGF-Expression zu stimulieren; der höchste VEGF-IRS lag im Bereich weniger Gefäße (Abbildung 18). Korrelationskoeffizient -0,061; $p=0,333$.

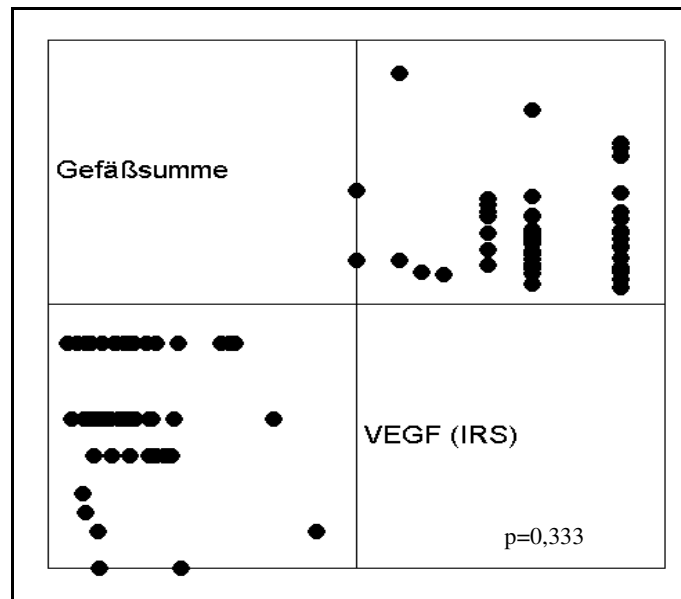


Abbildung 18: VEGF und Gefäßdichte

3.4 Das Von-Hippel-Lindau-Protein

Das Von-Hippel-Lindau-Protein kommt besonders in hochvaskularisierten Tumoren vor. Die 53 Biopsien wurden immunhistochemisch mit einem monoklonalen VHL-Antikörper bearbeitet. Die mikroskopische Auswertung der Schnitte wurde wie in 2.4. beschrieben durchgeführt. Der IRS-Mittelwert betrug $8,43 \pm 0,47$; der IRS-Median 8,00. In 22,65% der Fälle wurde eine schwache (IRS 0-4), in 37,73% eine mäßige (IRS 6-9) und in 39,62% eine starke (IRS 12) Färbereaktion beobachtet.

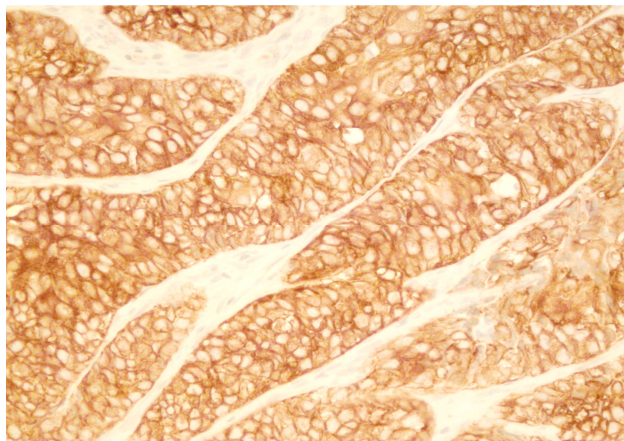


Abbildung 19: VHL-Expression, starke Färbung, 200-fache Vergrößerung

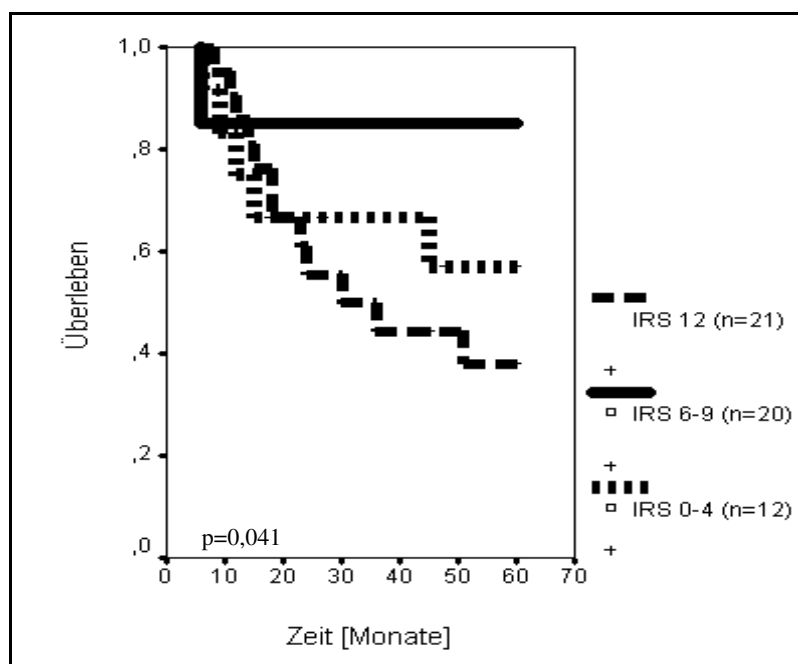


Abbildung 20: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der VHL-Expression

Tabelle 14: ÜZ in Abhängigkeit von der VHL-Expression, $p=0,041$

VHL-Stufen	N	Überlebenszeit MW \pm SE
I (0-4)	12	42,07 \pm 6,60
II (6-9)	20	51,90 \pm 4,31
III (12)	21	36,94 \pm 4,61

Die kürzeste Überlebenszeit hatten die Patientinnen mit der höchsten VHL-Expression, die längste Zeit aber nicht die Patientinnen mit der niedrigsten, sondern jene mit mittlerer Expression, $p=0,041$ (Tabelle 14, Abbildung 20).

Zur Untersuchung, ob prognostische Zusammenhänge zwischen VHL-Expression und anderen Parametern bestanden, wurden, wie unten dargestellt, die VHL-Expression in Abhängigkeit von Alter, Tumorstadium, Grading, Metastasierung und Hypoxie analysiert.

Tabelle 15: VHL in Abhängigkeit von Tumorstadium, Mittelwertvergleich

Stadium	N	MW	SE	CI-95% für MW	Median
IIB	13	8,77	0,89	6,82-10,71	9
IIIB	34	8,65	0,59	7,44-9,85	8
IVA	6	6,50	1,54	2,53-10,47	7

Tabelle 15 hält fest, dass die höchsten Mittelwerte und Mediane der VHL-Expression im Stadium IIB vorkamen. Auch die Ausdehnungen der Konfidenzintervalle aller 3 Stadien unterschieden sich nicht signifikant, $p=0,34$.

Tabelle 16: VHL in Bezug auf Metastasierung

Fernmetastasen	N	Mittelwert \pm SE
keine Fm	41	8,41 \pm 0,51
Fm	12	8,50 \pm 1,15
gesamt	53	8,43 \pm 0,47

Betrachtete man die VHL-Expression in Abhängigkeit von der Metastasierung, so sah man keine bedeutsamen Mittelwertunterschiede zwischen metastasierenden und nicht metastasierenden Tumoren (Tabelle 16), $p=0,94$.

Tabelle 17: VHL und Grading

Grading	N	Mittelwert \pm SE
2	27	8,44 \pm 0,61
3	26	8,42 \pm 0,73
Gesamt	53	8,43 \pm 0,47

Die Patientinnen mit schlecht differenziertem Tumor hatten im Vergleich zu denen mit mäßig differenziertem keine höhere VHL-Expression, $p=0,98$. Die Mittelwerte beider Gruppen waren fast identisch und unterschieden sich nicht von dem des Gesamtkollektivs (Tabelle 17).

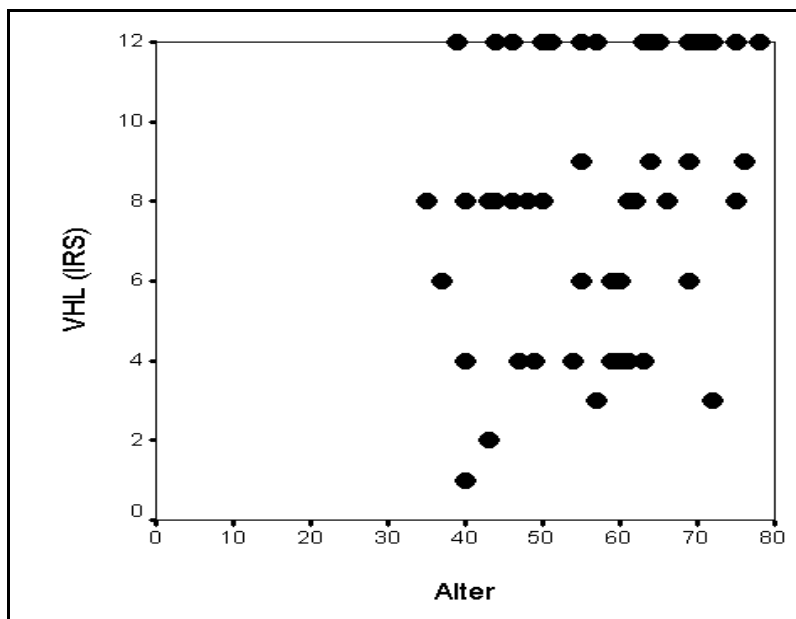


Abbildung 21: VHL und Alter

Insgesamt hatte das Merkmal Alter eine prognostische Bedeutung. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p=0,013$ konnte man vorhersagen, dass mit zunehmendem Alter die VHL-Expression zunimmt. Die Abbildung 21 zeigt diese Ergebnisse.

Tabelle 18: VHL und Hypoxie

VHL-Stufen	HF 5 bei 0 GY	
	keine Werte	messbare Werte
IRS 0-4	4	8
IRS 6-9	3	17
IRS 12	5	16

Hypoxie führt zu höherer VHL-Expression (Tabelle 18). Bei schwacher VHL-Expression waren 66,7% der Tumoren hypoxisch und 33,3% euoxisch; bei IRS 6-9 waren 85% hypoxisch und 15% euoxisch; sowie bei starker Expression 76,2% hypoxisch und 23,8% euoxisch ($p=0,48$).

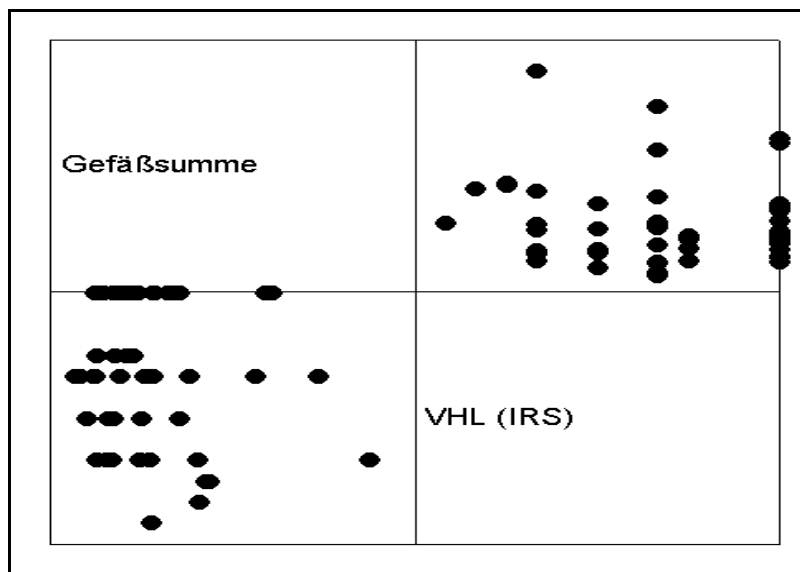


Abbildung 22: VHL und Gefäßdichte, $p=0,337$

Wie bei der VEGF-Expression erkennt man in der Abbildung 22 den Trend zu höherer VHL-Expression im Bereich niedrigerer Gefäßdichte, $p=0,337$; Korrelationskoeffizient $-0,135$.

3.5 Das P53-Protein

Das *P53* ist in seiner Wildtypform ein Tumorsuppressorgen, welches das Zellwachstum und die Apoptose reguliert. Nach einer Mutation kann das *P53* eine Gewebeproliferation bewirken. Aus den Gewebeproben wurden Schnitte mit dem kommerziell erhältlichen monoklonalen P53-Antikörper immunhistochemisch angefertigt. Reine Prozentangaben waren für P53 geeignet. Dafür wurden die

stark angefärbten Zonen gesucht. Mittels Zählkammer wurden die positiven (mit angefärbten Zellkernen) und die negativen Zellen gezählt und daraus einen Prozentwert errechnet. 52 Tumoren exprimierten das P53-Protein, 1 Tumor zeigte keine Expression. Der Mittelwert lag bei $25,37 \pm 3,46$; der Median bei 16.

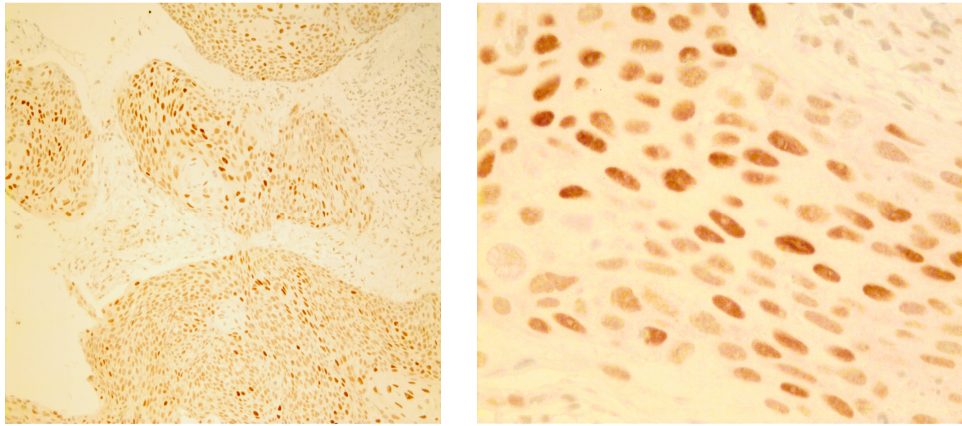


Abbildung 23: P53, starke Verfärbung, 100- und 400-fache Vergrößerung

Zur Analyse der Überlebenszeit in Abhängigkeit der P53-Protein-Expression wurden die Subgruppen in nachweisbare oder nicht nachweisbare Expression unterteilt. Die mittlere Überlebenszeit von Patientinnen, die P53-Protein exprimierten, betrug $44,64 \pm 2,96$ Monate im Vergleich zu 6 Monaten für die eine Patientin ohne P53-Nachweis (Abbildung 24). Diese Ergebnisse könnten aber auch an der ungleichmäßigen Tumorverteilung in beiden Gruppen liegen.

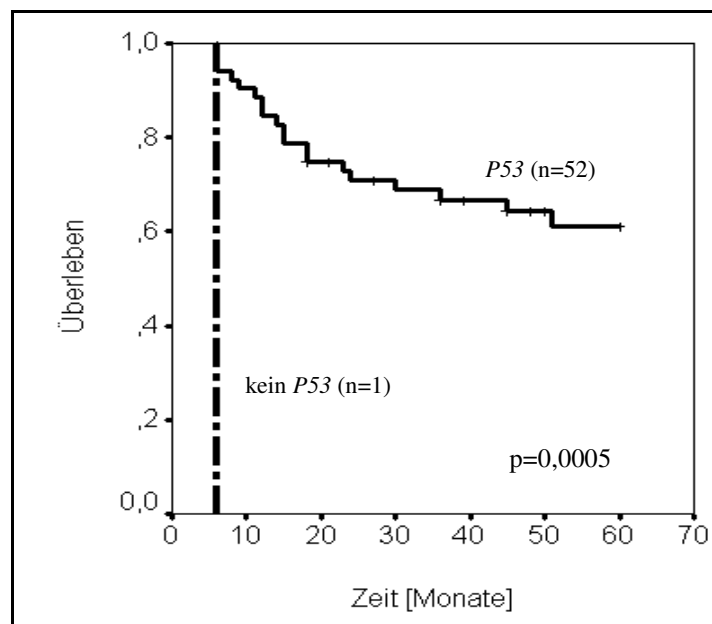


Abbildung 24: Überleben in Abhängigkeit von P53-Expression

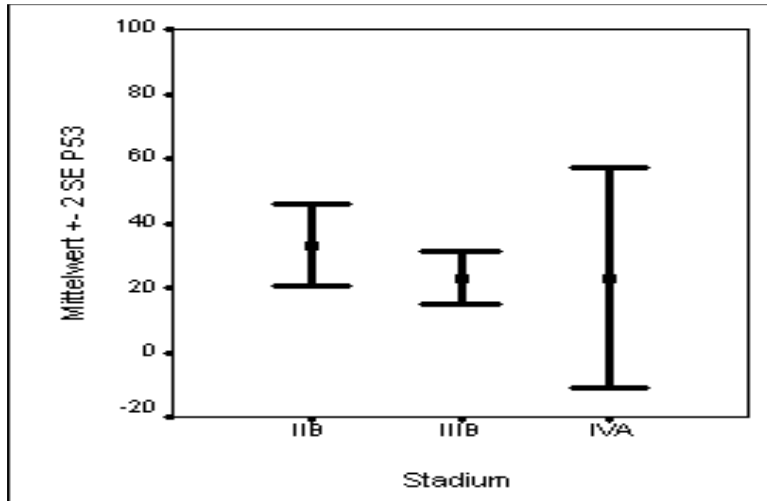


Abbildung 25: P53 und Tumorstadium

In der Abbildung 25 sieht man eine höhere P53-Expression in Stadium IIB. Der Mittelwert im Stadium IIB ($33,18 \pm 6,23$) war größer als in den Stadien IIIB ($23,06 \pm 4,02$) und IVA ($23 \pm 17,12$), $p=0,017$.

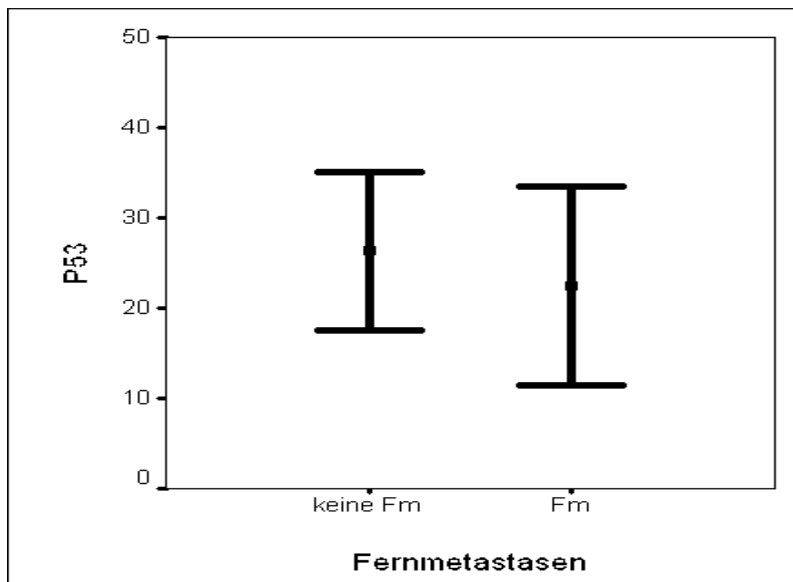


Abbildung 26: P53 und Fernmetastasierung

Obwohl der Mittelwert der P53-Expression von metastasierenden Tumoren $22,50 \pm 5,02$ und von nicht metastasierenden Tumoren $26,33 \pm 4,32$ betrug, bestand für die P53-Expression kein Bezug zur Metastasierung, $p=0,59$.

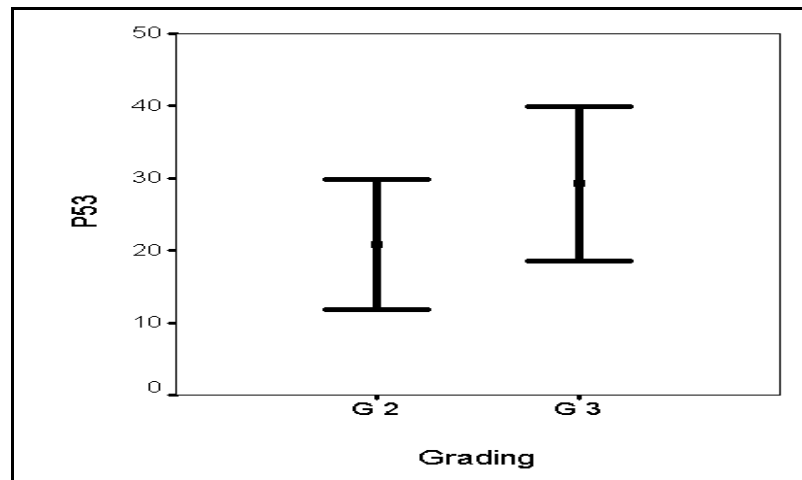


Abbildung 27: P53 und Grading

Der Mittelwert der P53-Expression schlecht differenzierter Tumoren lag bei $29,26 \pm 5,19$ und mäßig differenzierter bei $20,77 \pm 4,32$. Trotzdem hatte der Differenzierungsgrad keinen Einfluss auf P53-Expression, $p=0,31$.

Es schien eine gewisse Korrelation zwischen der P53-Expression und dem Alter zu geben (Abbildung 28). Mit zunehmendem Alter wurde tendenziell mehr P53 gebildet. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,25; $p=0,075$.

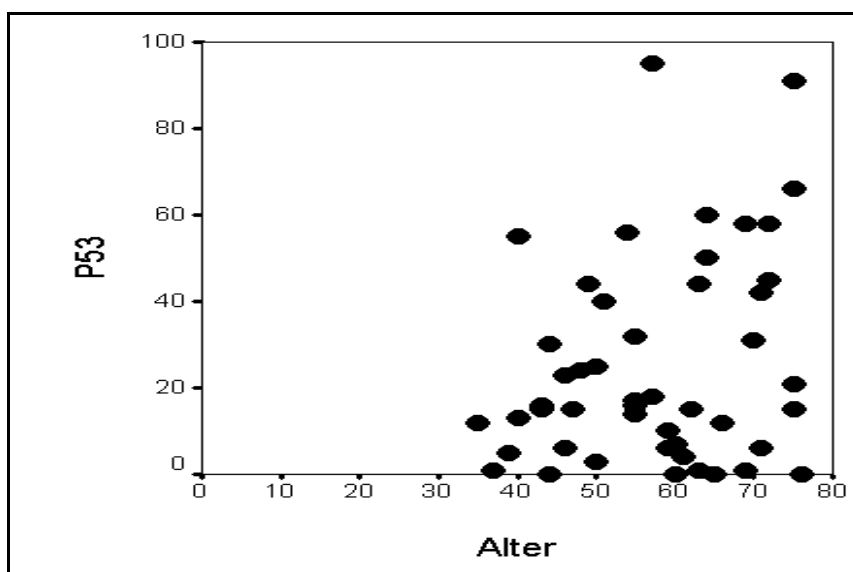


Abbildung 28: P53 und Alter

Tabelle 19: P53-Expression in Abhängigkeit von Hypoxie

	HF 5 bei 0 Gy	
Expression nachweisbar	keine Werte	messbare Werte
ja	12	40
nein	0	1

Der Tabelle 19 ist zu entnehmen, dass tendenziell hypoxische Tumoren mit 76,9% der Fälle am meisten P53 exprimieren als solchen ohne Hypoxie (23,1%), $p=0,77$.

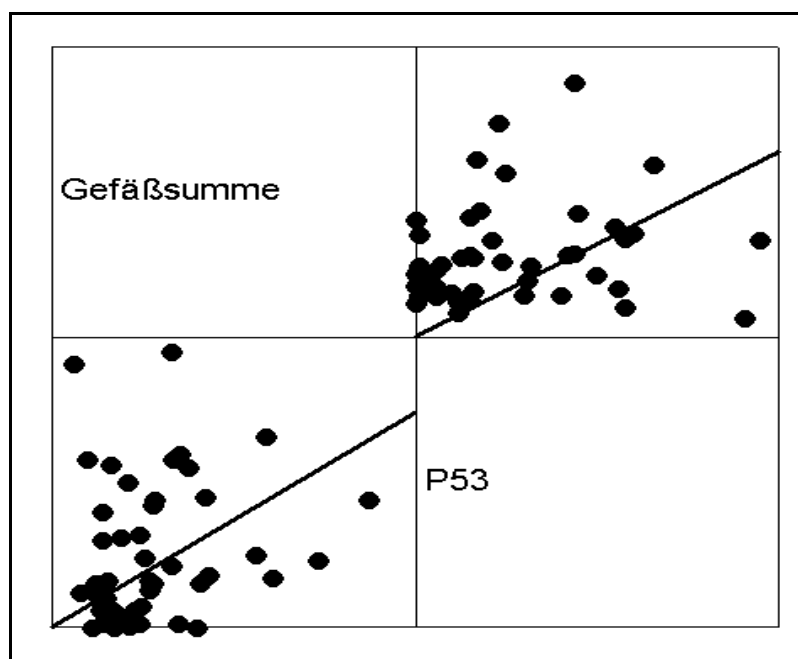


Abbildung 29: P53 und Gefäßdichte

Es bestand eine zweiseitige Korrelation zwischen P53 und Gefäßdichte (Abbildung 29). Mit Zunahme der Gefäßdichte stieg die P53-Expression und umgekehrt, allerdings betrug $p=0,209$.

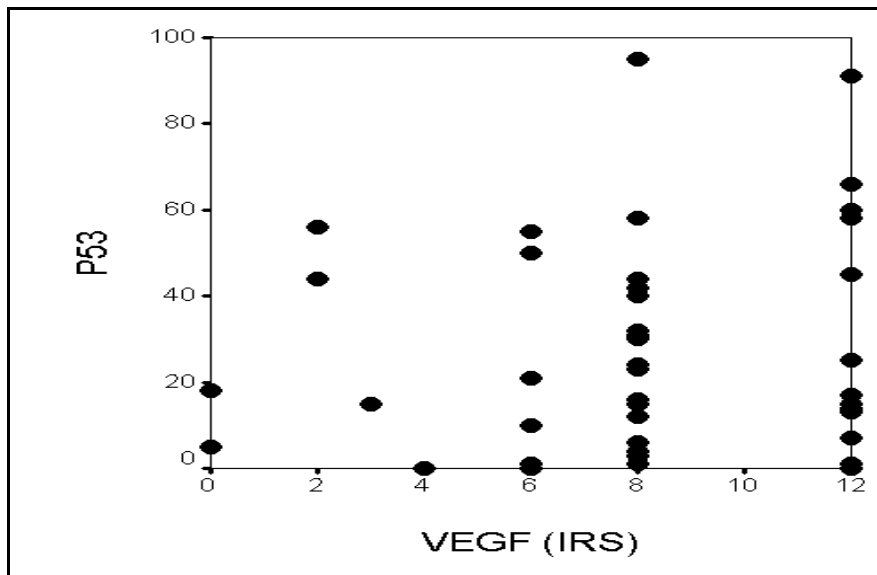


Abbildung 30: P53 und VEGF

Zwischen P53- und VEGF-Expression ließ sich keine Korrelation eruieren (Abbildung 30). Der Korrelationskoeffizient betrug 0,08; $p=0,58$.

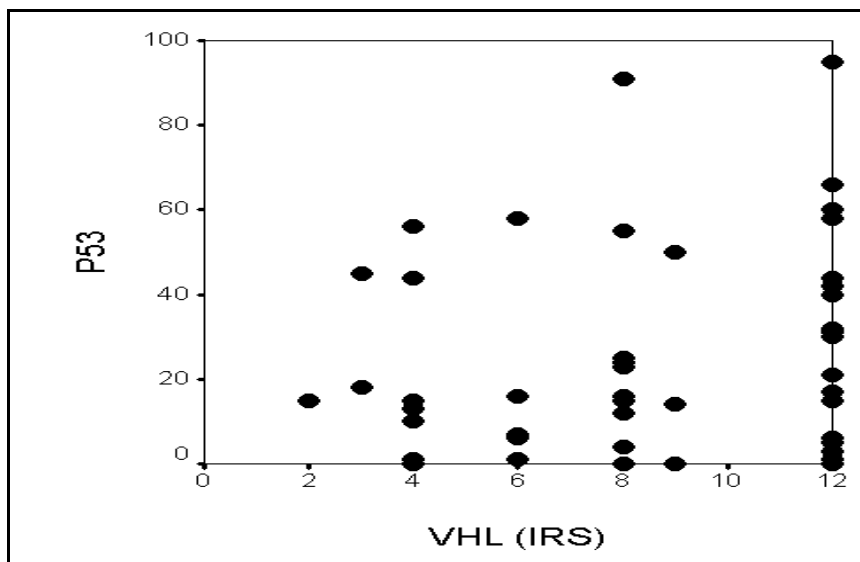


Abbildung 31: P53 und VHL

Die Abbildung 31 stellt die Korrelationsanalyse zwischen P53- und VHL-Expression dar. Je höher die VHL-Expression, desto höher war P53, $p=0,28$.

3.6 Mehrfaktorielle Analyse

Zum Erkennen von Gruppen mit besonderem Risiko erfolgte die multivariate Cox-Regressions-Analyse.

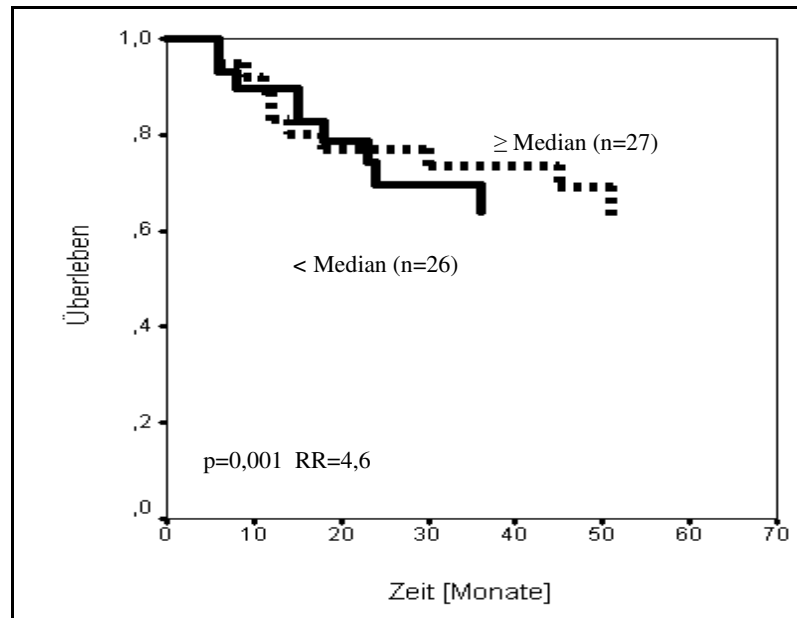


Abbildung 32: Cox-Regression für Gefäßdichte adjustiert nach Metastasierung

Die Adjustierung der Gefäßdichte nach Metastasierung erbrachte ein 4,6fach erhöhtes Risiko ($p=0,001$) an Tumor zu versterben, wenn die Gefäßdichte unter dem Median lag (Abbildung 32).

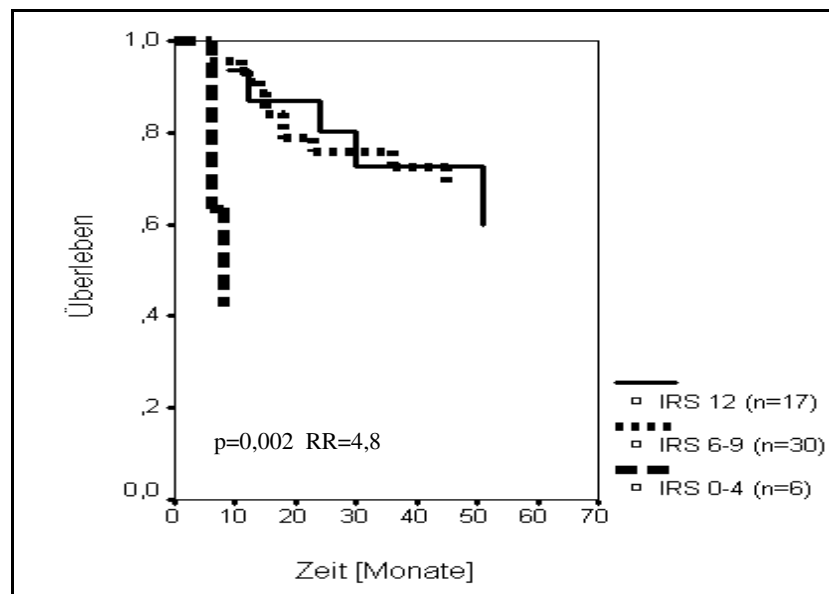


Abbildung 43: Cox-Regression für VEGF adjustiert nach Metastasierung

Die Adjustierung der VEGF-Expression nach Metastasierung zeigte, wie in der Abbildung 33 dargestellt, die schlechte Prognose wenig VEGF-exprimierender Tumoren ($p=0,002$; $RR=4,8$). Das Risiko an Tumor zu versterben war um 4,8fach höher bei niedriger VEGF-Expression.

4 Diskussion

4.1 Methode und Auswertbarkeit

Die Material-Präparierung, die Wahrnehmung der Anfärbeintensität von VHL und VEGF ist sehr subjektiv. Die Auszählung positiver Zellen bei P53 ist trotz Zählkammer schwierig und kann bei fehlerhafter Auszählung die Ergebnisse beeinflussen. Die Bearbeitung von Biopsien in Paraffinblöcken kann u. a. den Vaskularisationsgrad des Tumor ändern (70). Die Messung der Tumoroxygenierung mit dem Eppendorf Histographen stellt den Goldstandard dar, bleibt aber eine invasive und aufwändige Methode, die für bestimmte Tumoren schwer einsetzbar ist. Außerdem sind während der Messung nekrotische Areale nicht von vitalem Gewebe zu unterscheiden. Aus diesen Gründen sollte die Anwendung biologischer Hypoxiemarker intensiver erforscht und sogar bevorzugt werden (30, 82).

4.2 Prognose und klinische Faktoren

Bekannt ist, dass Patientinnen mit schlecht differenzierten, fortgeschrittenen und metastasierenden Tumoren eine schlechte Prognose haben. Chung et al. (13) haben bewiesen, dass Patientinnen mit nicht bzw. schlecht differenziertem Plattenepithelkarzinom des Zervix uteri eine höhere Inzidenz an Tumorrezidiven und eine nur geringe Zwei-Jahres-Überlebensrate haben im Gegensatz zu denen mit gut oder mäßig differenziertem Tumor. Auch Kouvaris et al. (45) untersuchten Prognosefaktoren in Plattenepithelkarzinom der Vulva und fanden eine schlechte Prognose bei fortgeschrittenen und schlecht differenzierten Tumoren. Zugleich fanden Crissman et al. (15) keinen prädiktiven Charakter an dem Differenzierungsgrad des Tumors; lediglich das Tumorstadium korrelierte mit der Prognose. Die Fünf-Jahres-Überlebenszeit war in seiner Untersuchung mit 60% in Stadium II besser als 32% in Stadium III. In der vorliegenden Untersuchung erwies sich tendenziell schlechter Differenzierungsgrad ($p=0,06$) als ungünstiger Prognosefaktor. Die mittlere Überlebenszeit war $46,72 \pm 5,72$ Monate in Stadium IIB; $43,11 \pm 3,52$ in Stadium IIIB und $25,33 \pm 10,04$ in Stadium IVA. Allerdings war keine Signifikanz nachzuweisen, $p=0,14$, daher hatte das Stadium keinen Einfluss auf das Überleben. Patientinnen mit Fernmetastasen oder lokalem Tumorprogress hatten in der vorgelegten Untersuchung eine signifikant schlechtere Prognose im Gegenteil zu metastasenfrien oder voll kontrollierten Patientinnen, $p<0,0001$.

Eine weitere Beobachtung dieser Arbeit war, wie auch bereits 2002 von Hänsgen (29) festgestellt, dass Anämie bei an Zervixkarzinome erkrankten Patientinnen ein unabhängiger und ungünstiger Prognosefaktor ist. In der vorgelegten Untersuchung hatten Patientinnen mit Hämoglobin < 7 mmol/l ein schlechte Prognose ($p=0,0001$). Weiterhin zeigten Dunst et al. (18), dass sich Anämie während der Radiotherapie hinsichtlich der lokalen Rezidive und des Überlebens negativ auswirkt. Schreiner et al. (72) untersuchten 1975 den Zusammenhang zwischen Hämoglobinspiegel und Überlebenszeit bzw. Remissionsrate und berichteten über die negative Auswirkung der Anämie auf die Effektivität der Radiotherapie. Dies könnte an Gewebshypoxie bei mangelnden Sauerstofftransportern liegen. Auch Grogan et al. (25) bestätigen den Effekt von Hämoglobinspiegel auf das Überleben an Zervixkarzinom: 5-Jahresüberlebenszeit 74% bei $Hb \geq 120$ g/l, 52% bei $Hb = 110-119$ g/l, 45% bei $Hb < 110$ g/l, $p<0,0001$. Weiterhin beobachteten sie den positiven Effekt einer Bluttransfusion während der Radiotherapie, welche die Prognose zu verbessern schien. Bei Patientinnen mit Hämoglobinwerten von 120 g/l und mehr beobachtete Thomas (77) ein besseres Radiotherapieansprechen und ein längeres erkrankungsfreies Überleben im Vergleich zu denen mit niedrigen Hämoglobinwerten, und zwar unabhängig davon, ob diese Patientinnen auftransfundiert wurden oder nicht. Obralic et al. (60) dagegen fanden keine signifikanten Unterschiede des erkrankungsfreien Überlebens in Abhängigkeit vom Hämoglobinwert.

Ferner wurde in unserer Untersuchung beobachtet, dass die Überlebenszeit mit dem Alter korrelierte: Patientinnen älter als 60 Jahre zeigten mit einer mittleren Überlebenszeit von über 50 Monaten eine deutlich bessere Prognose als jüngere Patientinnen, die im Schnitt nur 38 Monate überlebten ($p=0,05$). 1991 zeigten Kodama et al. (42) bei Patientinnen mit Plattenepithelkarzinom des Zervix uteri die Korrelation vom Alter mit prognostischen Faktoren wie Lymphknotenmetastasen, Stroma- und Gefäßinvasion sowie Tumorhistologie. Patientinnen im Alter von 60-69 Jahren hatten im Vergleich zu jüngeren (30-39/40-49/50-59 J) weniger Metastasen, auch war ihre 5-Jahresüberlebensrate höher. Robertson et al. (67) fanden bei an dieser Krankheit leidenden Patientinnen mit Alter unter 35 Jahren, verglichen mit 55-jährigen und älteren, eine schlechte Prognose bezüglich Rezidivfreiheit und erkrankungsfreiem Überleben. Serur et al. (73) untersuchten die Überlebensrate von solchen Patientinnen in Abhängigkeit des Alters, kombiniert mit den Faktoren Stadium, Symptomfreiheit, Alkohol- und Nikotinabusus. Sie schlussfolgerten, dass in frühen Stadien keine Altersabhängigkeit vorlag. In fortgeschrittenen Stadien hingegen hatten ältere Patientinnen ab 70 Jahre eine schlechtere Prognose als jüngere. Waren jüngere Patientinnen (unter 50 Jahren) mit fortgeschrittenem Tumor aber symptomatisch, wiesen sie eine schlechtere Prognose als die älteren auf. Für Chapman (8) ist fortgeschrittenes Alter ein ungünstiger prognostischer Faktor. Meanwell et al. (51) untersuchten den Einfluss vom Alter auf das Überleben an Zervixkarzinom. Die 5-Jahresüberlebenszeit war mit 69% für Patientinnen < 40 J deutlich höher als 45% für solche ≥ 40 J ($p<0,0001$).

Auch in der multivariaten Analyse nach Stadium, Tumorgröße, Lymphknotenstatus und Differenzierungsgrad ließ sich dieser altersabhängige Unterschied bestätigen. Trotzdem wollten sie das Alter allein nicht als Prognosefaktor betrachten.

4.3 Die Bedeutung der Gefäßdichte

Die Angiogeneseabhängigkeit von Tumoren wurde bereits in zahlreichen Untersuchungen demonstriert. Bei an Zervixkarzinom erkrankten, radiotherapeutisch behandelten Patientinnen, die länger als 5 Jahre überlebten, fanden Siracka et al. (75) ein gefäßreicheres Tumorstroma verglichen mit denen, die kürzer überlebten. Die Gefäßdichte eines Tumors reflektiert dessen Oxygenierung und kann nach Siracka et al. (74) zur Schätzung des Effekts der Radiotherapie verwendet werden. Gut vaskularisierte, also gut oxygenierte Tumoren sind radiotherapiesensibel (siehe 1.2. und 1.3.). Auch Gasinska et al. (22) fanden Gefäßdichte (> 190 Gefäße/mm²; $p=0,0503$), Hämoglobin (> 116 g/l; $p=0,0213$) und Alter (> 50 J; $p=0,0079$) als günstige Prognosefaktoren bei primär bestrahlten Zervixkarzinomen. In unserer Untersuchung wurde der Einfluss der Gefäßdichte in Abhängigkeit vom Median beurteilt. Lagen ihre Werte unterhalb des Medians, hatten die Patientinnen im Mittel nur eine um 1,5 Monate längere Überlebenszeit ($p=0,67$). Diese Ergebnisse hatten keine Signifikanz. Lediglich in der multivariaten Cox-Regressions-Analyse von Gefäßdichte und Metastasierung konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit gefäßarmen Tumoren (Gefäßdichte unter dem Median) das 4,6fach erhöhte Risiko an Tumor zu versterben ($p=0,001$) als die mit gefäßreichem Tumor. Ferner zeigte sich, dass gefäßreiche Tumoren häufiger als gefäßarme zu Metastasierung neigen ($p=0,06$). Kombinierten wir die Gefäßdichte mit dem Stadium, so tendierte die Prognose auch im Stadium IIB zu einem ungünstigeren Überleben analog zum Stadium IVA ($p=0,09$).

Unser weiteres Interesse galt dem Zusammenhang von Hypoxie und Angiogenese. Es zeigte sich eine Tendenz vermehrter Gefäßbildung in hypoxischen Tumoren verglichen mit euoxischen Tumoren ($p=0,08$; Korrelationskoeffizient 0,19). Die Bedeutung sowohl der Gefäßdichte als auch der interkapillaren Distanz bei der lokalen Tumorkontrolle wurde von West et al. belegt (84). Patientinnen mit gefäßarmen Tumoren und langer interkapillärer Distanz hatten eine schlechte lokale Kontrolle ($p=0,042$), wohingegen solche mit moderater Gefäßdichte eine gute Tumorkontrolle hatten. Die Autoren fanden eine signifikante Korrelation zwischen Hypoxie und interkapillärer Distanz ($p<0,005$), aber keine Korrelation zwischen Hypoxie und Gefäßdichte ($p=0,41$) oder mit Expression der Angiogenesefaktoren wie z. B. VEGF. Deren Meinung nach kann von der VEGF-Expression nicht auf den Hypoxiegrad des Tumors geschlossen werden.

In der vorgelegten Untersuchung hatten weder Tumorstadium ($p=0,12$) noch Differenzierungsgrad ($p=0,74$) einen Einfluss auf die Gefäßdichte. Ähnliche Ergebnisse hatten Chhieng et al. (12).

In deren Untersuchung korrelierten weder die Gefäßdichte noch VEGF mit Tumorgröße, Stadium, Lymphknotenbefall, Lokalrezidiv oder Überleben/Tod an Mammacarcinom.

Einen Zusammenhang zwischen Gefäßdichte und Alter wurde nicht gefunden. In Kombination miteinander, gewannen beide Faktoren eine prognostische Bedeutung. Die schlechteste Prognose hatten jüngeren Patientinnen mit gefäßarmen Tumoren (Tabelle 10), $p=0,03$.

4.4 VEGF als Prognosemarker

Die VEGF-vermittelte Angiogenese wird in verschiedenen Tumoren unterschiedlich reguliert. VEGF wird vermehrt unter Hypoxie gebildet: Ziemer et al. (89) detektierten das maximale VEGF-mRNA-Signal in der Region mit maximalem Nachweis des Hypoxiemarkers. Der Hypoxiemarker und VEGF waren in den Regionen am stärksten nachweisbar, die an eine Gewebnekrose angrenzten. In moderat hypoxischen Regionen hingegen war VEGF-mRNA nur wenig oder gar nicht nachweisbar. In unserer Arbeit gab es nur einen tendenziellen Zusammenhang zwischen Hypoxie und VEGF-Expression ($p=0,15$). 88,2% von Tumoren mit starker VEGF-Expression waren hypoxisch, nur 11,8% euoxisch; bei mäßiger VEGF-Expression 76,7% hypoxisch und 23,3% euoxisch; bei schwacher Expression 50% zu 50%.

Wenn man davon ausgeht, dass hohe VEGF-Expression zu hoher Gefäßdichte führt (VEGF als Angiogenese-Stimulator) und dieses wiederum zu einer Sensibilität des Tumors auf die Radiotherapie führt, so erwartet man bessere Überlebenschance bei Patientinnen mit hoher VEGF-Expression. In unserer Untersuchung war die beste Prognose von Patientinnen mit höchster VEGF-Expression ohne Signifikanz ($p=0,546$). Erst nach Adjustierung der VEGF-Expression mit der Metastasierung verstärkte sich dieser Effekt mit um 4,8fach erhöhtem Risiko, an Tumor zu versterben bei Biopsien mit niedriger VEGF-Expression, $p=0,002$. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten von Cheng et al. (10) - die Überexpression von VEGF ist ein unabhängiger prognostischer Factor für erkrankungsfreie Überleben – überein, $p<0,001$. Loncaster et al. (50) dagegen berichteten über die starke Korrelation – mit entsprechend schlechter Prognose – von hoher VEGF-Expression mit der Überlebensrate ($p=0,0008$) und metastasenfreiem Überleben ($p=0,062$). Zwischen VEGF-Expression und lokaler Tumorkontrolle ($p=0,23$), Tumorstadium, -grading, -größe und -radiosensitivität sowie Alter der Patientinnen fanden sie keine Korrelation. In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse war VEGF der stärkste Prognosefaktor ($p=0,001$). Sie halten die VEGF-Bestimmung für eine einfache und schnelle Methode, Patientinnen mit hohem Risiko zu identifizieren. Kang et al. (38) waren der gleichen Meinung. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit war mit 89% für VEGF-positive Patientinnen höher als 47% für VEGF-negative Gruppe ($p=0,02$). Allerdings hatten sie andere Kriterien der VEGF-Bestimmung: Sie definierten die Anfärbung als positiv, wenn mehr als 10% von 500 Zellen angefärbt waren.

Eine Korrelation von VEGF-Expression mit Stadium, Lymphknotenstatus, Alter und Invasion von Parametrien fanden sie nicht. Tjalma et al. (78) dagegen fanden keinen Zusammenhang von VEGF-Expression mit der Überlebenszeit, wohl aber mit der Gefäßdichte: in VEGF-armen Tumoren war diese stark ($p=0,055$). Für sie hatte VEGF keinen prognostischen Charakter (im Unterschied zu MVD) in invasiven Zervixkarzinomen. Für Baillie et al. (4) hatten Tumoren mit hoher VEGF-Expression eine schlechte Prognose nur wenn diese hochvaskularisiert waren. Diese Ergebnisunterschiede könnten an Tumorheterogenität oder an den unterschiedlichen Untersuchungsmethoden (unterschiedliche Antikörper, Bestimmung von VEGF im Serum) liegen (70). Auch Koukourakis et al. (44) berichteten über die schlechte Prognose von Patientinnen mit aktiviertem VEGF (an seinem Rezeptor –KDR-gebundenes VEGF), welche stärker in tumorösen Lungengewebe vorkam. Sie beobachteten eine hohe Gefäßdichte (sMVD = standard MVD) in normalem Lungengewebe ($p<0,0002$), aber eine hohe aktivierte Gefäßdichte (aMVD) im Tumor ($p<0,0001$). Insgesamt war eine höhere Gefäßaktivität im Tumor (36-58%) als im normalen Gewebe (9%), $p<0,0001$. Sie behandelten die Gewebeproben mit zwei Antikörpern - 11B5 für aMVD und JC70 anti-CD31 für sMVD-, fanden heraus, dass eine spezifische Antiangiogenesetherapie mit Antikörpern gegen VEGF/KDR hilfreich für Tumorbehandlung sein kann und regten zur weiteren Untersuchung diesbezüglich an.

Gunningham et al. (26) untersuchten den Zusammenhang zwischen VEGF-B, ein an Tyrosinkinase Rezeptor flt-1 bindender Angiogenesefaktor, mit Lymphknotenmetastasen und der Angiogenese. Sie fanden eine höhere flt-1-Expression in Mammakarzinomen verglichen mit normalem Mammagewebe ($p=0,02$), aber keine Unterschiede in der VEGF-Expression ($p=0,3$). Sie wiesen die Korrelation von VEGF-B mit Lymphknotenstatus ($p=0,02$) und der Zahl befallener Lymphknoten ($p=0,01$) nach. Eine Korrelation mit Alter ($p=0,7$), Tumorgröße ($p=0,6$), Grading ($p=0,5$), Östrogenrezeptor ($p=0,2$) sowie Tumorvaskularisation ($p=0,16$) konnten sie nicht erkennen. Sie vermuteten, dass VEGF-B nicht über Angiogenese sondern über einen anderen Mechanismus am Tumorprogress teilnimmt, möglicherweise über die Aktivierung von Plasminogenaktivatoren und daraus folgender Metastasierung. Ein anderer VEGF-Subtyp, VEGF-C, welcher an den flt-4-Rezeptor der lymphatischen Endothelialzellen bindet, wird in normalem aber auch Tumorstroma der Magenschleimhaut gebildet. Yonemura et al. (88) berichteten über die stärkere Aktivität dieses Rezeptors in Tumorstroma, auch wenn die flt-4-Expression nicht in allen Magenkarzinomen vorkam. Sie zeigten wie auch Tsurusaki et al. (79) die starke Korrelation der VEGF-C-Expression mit dem Lymphknotenbefall. VEGF-C-bildende Tumorzellen induzieren die Proliferation und Dilatation von stromalen Lymphgefäßen. Weiterhin produzieren sie digestive Enzyme und Zerstreuungsfaktoren, welche die Tumordinvasion in Lymphgefäßen ermöglicht (87).

In unserer Untersuchung war der Einfluss von Stadium ($p=0,32$), Differenzierungsgrad ($p=0,22$) und Metastasierung ($p=0,33$) auf die VEGF-Expression nicht signifikant. Je älter die Patientinnen waren,

desto stärker war die VEGF-Expression ($p=0,02$). Für Artese et al. (3) gab nur ein Trend stärker VEGF zu exprimieren mit schlechter werdendem Differenzierungsgrad ($p=0,289$); es bestand keine Korrelation zum Lymphknotenstatus ($p=0,196$).

Giatromanolaki et. Al (23) untersuchten den Zusammenhang zwischen VEGF-Expression, Vaskularisationsgrad des Tumors und P53. Sie beobachteten eine positive Korrelation zwischen VEGF-Expression und hoher Vaskularisation, eine negative Korrelation zwischen VEGF-Expression und P53, keine Korrelation zwischen P53 und Gefäßdichte. Es bestand eine positive Korrelation von VEGF mit einer schlechten Prognose ($p=0,04$). Sie kamen wie Mukhopadhyay et al. (56) zum Schluss, dass das VEGF-Gen von Wildtyp-P53 unterdrückt wird. In Unserer Untersuchung gab es keine Korrelation zwischen Gefäßdichte und VEGF-Expression ($p=0,333$). Zwischen VEGF und VHL ließ sich in der vorgelegten Untersuchung eine positive Korrelation eruieren, $p=0,045$.

4.5 VHL in fortgeschrittenen Karzinomen

VHL ist in seiner Wildtypform ein Tumorsuppressorgen. Er bindet Sp1 und inhibiert damit dessen Aktivität. Die Alteration von VHL erhöht die Aktivität von Sp1, welche die VEGF-Expression stimuliert (57). Weiterhin regt Sp1 Zelldifferenzierung, -transformation und -wachstum an. Nach Hunt et al. (37) korreliert VHL in seiner mutierten Form stark mit dem Tod an Schilddrüsentumor, jedoch nicht mit dem Alter, der Tumorgroße, Lymphknotenmetastasen oder extrathyreoidaler Extension. Schraml et al. (71) demonstrierten die schlechte Prognose von Patienten mit alteriertem VHL. Eine Korrelation mit Grading, Stadium, Gefäßdichte oder Zellproliferation fanden sie hingegen nicht und vermuteten – wie Clifford et al. (14) –, dass Angiogenese und Zellproliferation in Nierentumoren nicht durch mutiertes sondern durch methyliertes VHL reguliert werden. Auch in unserer Untersuchung wurde die schlechte Prognose von Patientinnen mit der höchsten VHL-Expression belegt ($p=0,04$). Ebenfalls korrelierte VHL mit dem Alter ($p=0,013$), aber nicht mit der Metastasierung ($p=0,94$), Stadium ($p=0,34$) oder Differenzierungsgrad ($p=0,98$). Die Hypoxie ($p=0,48$) und P53-Expression ($p=0,337$) ließen zwar eine Tendenz zu hoher VHL-Expression erkennen, was aber nicht signifikant war. Auch die Gefäßdichte korrelierte nicht mit der VHL-Expression ($p=0,28$).

4.6 P53

Die häufigste in Tumoren zu findende Läsion ist die genetische Mutation von P53 (siehe 1.6.). Daher akkumuliert sich ein abnormes funktionell inaktives P53-Protein in kanzerösen Bereichen im Gegenteil zu normalem Gewebe. Allerdings hatten nur 5% der von Horn et al. (34) untersuchten Patientinnen mit Zervixkarzinom und mit P53-Immunreaktivität eine Degradation des P53-Gens. In unserer Untersuchung exprimierten 52 von 53 Tumoren das P53-Protein. Ein einziger Tumor exprimierte Wildtyp P53. Die Patientinnen mit Nachweis von P53-Protein hatten die beste Prognose,

$p=0,0005$. Dieses Ergebnis könnte an der ungleichmäßigen Verteilung P53-Protein-exprimierender und -nichtexprimierender Tumoren liegen. Karzinome in früheren Stadien bildeten mehr P53-Protein ($p=0,017$). Differenzierungsgrad ($p=0,31$), Metastasierung ($p=0,59$) und Hypoxie ($p=0,77$) korrelierten nicht mit P53-Expression. Patientinnen im höherem Lebensalter ($p=0,075$) neigten dazu, P53 hoch zu exprimieren. Chen et al. (9) bewiesen die schlechte Prognose bei Überexpression von P53 bei Patientinnen mit Plattenepithelkarzinom des Zervix uteri im Stadium IB1 ($p=0,0315$). Andere Autoren fanden dagegen keinen Einfluss von P53-Expression auf das Überleben (19, 28). Auch Stadium und Anämie allein hatten keinen Einfluss auf P53-Expression. 27% hypoxische vs. 13% nicht hypoxische Tumoren exprimierten P53 ($p=0,011$). Nach Adjustierung von P53-Expression mit Stadium, prätherapeutischer Anämie sowie Hypoxie hatten P53-negative Tumoren die beste, P53-positive Tumoren unter Hypoxie die schlechteste Prognose ($p=0,05$). Ebenfalls fanden Hunt et al. (35) keine Korrelation zwischen P53-Überexpression und histologischen Subtypen, Lymphknotenstatus oder Überleben. Auch Horn et al. (34) fanden keine Unterschiede der P53-Reaktivität in Abhängigkeit von Lymphknotenmetastasen, Differenzierungsgrad, Tumorrezidiv und rezidivfreiem Überleben, nur eine starke Korrelation mit lokalem Tumorprogress. Laut Lee et al. (47) reguliert und stärkt P53 die VEGF-Expression ($p<0,01$); VEGF korreliert mit MVD ($p<0,01$). In unserer Untersuchung gab es weder eine Korrelation zwischen P53- und VEGF-Expression ($p=0,58$) noch zwischen P53-Expression mit Gefäßdichte ($p=0,209$).

5 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Trotz Fortschritten in der Früherkennung, Diagnostik und Therapie von Zervixkarzinomen ist die Aussagekraft zahlreicher Tumorcharakteristika noch begrenzt. Ziel dieser Arbeit war es, prognostische tumorbiologische Marker und klinische Prognosefaktoren für fortgeschrittene, primär strahlentherapeutisch behandelte Zervixkarzinome zu identifizieren, die neue Therapiemöglichkeiten eröffnen könnten. 53 Patientinnen mit fortgeschrittenem Zervixkarzinom und kurativer Bestrahlung (Kontakt- und Hochvolttherapie) wurden prätherapeutisch Biopsien zur Histologie und immunhistochemischen Bestimmung von CD31, VEGF, VHL und P53 entnommen, um statistische Zusammenhänge zwischen den Markern und klinischen Faktoren, zwischen den Markern und Hypoxie oder unter den Markern selbst zu finden. Die Anämie erwies sich als starker unabhängiger Prognosefaktor. Auch das Alter ließ sich als Prognosefaktor identifizieren, ebenso die Metastasierung.

Wir fanden keinen bedeutsamen Unterschied in der Überlebenszeit zwischen gefäßreichen und gefäßarmen Tumoren. Erst nach Adjustierung mit der Metastasierung gewann die Gefäßdichte einen prognostischen Charakter. Die Gefäßdichte korrelierte weder mit dem Stadium noch dem Differenzierungsgrad. Die Hypoxie neigte dazu, Angiogenese zu initiieren. Gefäßreiche Tumoren tendierten häufiger zur Metastasierung als gefäßarme.

Die schlechteste Prognose hatten Patientinnen mit niedriger VEGF-Expression, dies war jedoch erst nach Adjustierung mit der Metastasierung signifikant. VEGF korrelierte signifikant mit dem Alter und der VHL- Expression. Unter hypoxischen Bedingungen gab es nur eine Tendenz, mehr VEGF zu exprimieren. Metastasierung, Differenzierungsgrad und Stadium hatten keinen signifikanten Einfluss auf die VEGF-Expression.

Auch VHL ließ sich als Prognosefaktor klassifizieren. Die schlechteste Prognose hatten Patientinnen mit höchster VHL-Expression. Ebenfalls korrelierte das Alter mit der VHL-Expression. Kein Bezug bestand zur Expression von P53, CD31, Metastasierung, Differenzierungsgrad und Stadium. Die hohe VHL-Expression unter Hypoxie ließ sich statistisch nicht betätigen.

Patientinnen mit hoher P53-Protein-Expression hatten die beste Prognose. Diese Ergebnisse könnten an der ungleichmäßigen Verteilung von P53⁺- und P53⁻-Fällen liegen. Auch hier exprimierten signifikant die Tumoren in frühen Stadien P53 am höchsten. Schlechte Differenzierung, Alter, Hypoxie, Metastasenfreiheit und VHL-Expression beeinflussten nur tendenziell die P53-Expression. Eine Korrelation mit der VEGF-Expression wurde nicht gefunden.

Anämie, Alter, VHL- und P53-Expression können jeweils allein als Prognosefaktoren dienen, Gefäßdichte und VEGF-Expression hingegen nur in Kombination mit anderen Parametern.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Ambs S, Merriam WG, Ogunfusika MO, Bennett WP, Ishibe N, Perwez Hussain S, Tseng EE, Geller DA, Billiar TR, Harris CC: p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2-expressing human carcinoma cells. *Nature Medicine* 4 (1998) 1371-1376
- 2 Asano M, Yukita A, Matsumoto T: Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralising monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor. *Cancer Res* 55 (1995) 5296-5301
- 3 Artese L, Rubini C, Ferrero G, Fioroni M, Santinelli A, Piattelli A: Micro vessel density (MVD) and vascular endothelial growth factor expression (VEGF) in human oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 21 (2001) 689-695
- 4 Baillie R, Carlile J, Pendleton N, Schor AM: Prognostic value of vascularity and vascular endothelial growth factor expression in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 54 (2001) 116-120
- 5 Becker A, Stadler P, Langer T, Dunst J: Sauerstoffmangel in malignen Tumoren-pathophysiologischer Effekte und therapeutische Konsequenzen. *Die Medizinische Welt* 49 (1998) 560-565
- 6 Boussat S, Eddahibi s, Fataccioli V, Gouge M, Housset B: Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in human pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279 (2000) 371-378
- 7 Böcker W, Denk H, Heitz PhU: *Pathologie*. 3.Aufl. Urban Fischer bei Elsevier, München, 2004
- 8 Chapman GW: Survival of advanced age females with cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 46 (1992) 287-291
- 9 Chen HY, Hsu CT, Lin WC, Tsai HD, Chang WC: Prognostic value of p53 expression in stage IB1 cervical carcinoma. *Gynecol Obstet Invest* 49 (2000) 266-271
- 10 Cheng WF, Chen CA, Lee CN, Wei LH, Hsieh FJ, Hsieh CY: Vascular endothelial growth factor and prognosis of cervical carcinoma. *Obstet Gynecol* 96 (2000) 721-726
- 11 Cheng WF, Lee CN, Chu JS, Chen CA, Chen TM, Shau WY, Hsieh CY, Hsieh FJ: Vascularity index as a novel parameter for the in vivo assessment of angiogenesis in patients with cervical carcinoma. *Cancer* 85 (1999) 651-657
- 12 Chhieng DC, Tabbara SO, Marley EF, Talley LI, Frost AR: Micro vessel density and vascular endothelial growth factor expression in infiltrating lobular mammary carcinoma. *Breast J* 9 (2003) 200-207
- 13 Chung CK, Stryker JA, Ward SP, Nahhas WA, Mortel R: Histologic grade and prognosis of carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol* 57 (1981) 636-642

- 14 Clifford SC, Prowse AH, Affara NA, Buys CHCM, Maher ER: Inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene and allelic losses at chromosome arm 3p in primary renal cell carcinoma: Evidence for a VHL-independent pathway in clear cell renal tumorigenesis. *Genes, Chrom Cancer* 22 (1998) 200-209
- 15 Crissman JD, Budhraj M, Aron BS, Cummings G: Histopathologic prognostic factors in stage II and III squamous cell carcinoma of the uterine cervix. An evaluation of 91 patients treated primarily with radiation therapy. *Int J Gynecol Pathol* 6 (1987) 97-103
- 16 De Silva D, Dagher H, Ghildyal R, Lindsay M, Li X, Freezer NJ, Wilson JW, Bardin PG: Vascular endothelial growth factor induction by rhinovirus infection. *J Med Virol* 78 (2006) 666-672
- 17 Dunst J, Haensgen G, Lautenschläger C, Fuchsel G, Becker A: Oxygenation of cervical cancers during radiotherapy and radiotherapy + cis-retinoic acid/interferon. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43 (1999) 367-373
- 18 Dunst J, Kuhnt T, Strauss HG, Krause U, Pelz T, Koelbl H, Haensgen G: Anemia in cervical cancers: Impact on survival, patterns of relapse, and association with hypoxia and angiogenesis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 56 (2003) 778-787
- 19 Ebara T, Mitsuhashi N, Saito Y, Sakurai H, Hasegawa M, Takahashi M, Takahashi T, Hayakawa K, Niibe H: Prognostic significance of immunohistochemically detected p53 protein expression in stage IIIb squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation therapy alone. *Gynecol Oncol* 63 (1996) 216-218
- 20 Folkman J: Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* 285 (1971) 1182-1187
- 21 Folkman J: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82 (1990) 4-6
- 22 Gasinska A, Urbanski K, Adamezyk A, Pudelek J, Lind BK, Brahme A: Prognostic significance of intratumour micro vessel density and haemoglobin level in carcinoma of the uterine cervix. *Acta oncol* 41 (2002) 437-443
- 23 Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Kakolyris S, Turley H, O'Byrne K, Scott PA, Pezella f, Georgulias V, Harris AL, Gatter KC: Vascular endothelial growth factor, wild-type p53, and angiogenesis in early operable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 4 (1998) 3017-3024
- 24 Goerke K, Valet A: *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 3.Aufl. Gustav Fischer, Stuttgart, 1998
- 25 Grogan M, Thomas GM, Melamed I, Wong FL, Percy RG, Joseph PK, Portelance L, Crook J, Jones KD: The importance of hemoglobin levels during radiotherapy for carcinoma of the cervix. *Cancer* 86 (1999) 1528-1536

- 26 Gunningham SP, Currie MJ, Han C, Robinson BA, Scott PA, Harris AL, Fox SB: VEGF-B-Expression in human primary breast cancers is associated with lymph node metastasis but not angiogenesis. *J Pathol* 193 (2001) 325-332
- 27 Haensgen G, Hintner I, Krause U, Wohlrab W, Dunst J: Intratumoral pO₂, S-Phase-Anteil und p53-Status bei Zervixkarzinomen. *Strahlenther Onkol* 173 (1997) 385-387
- 28 Haensgen G, Krause U, Becker A, Stadler P, Lautenschlaeger C, Wohlrab W, Rath FW, Molls M, Dunst J: Tumor hypoxia, p53, and prognosis in cervical cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50 (2001) 865-872
- 29 Haensgen GG: Tumorbiologische Prognosefaktoren beim fortgeschrittenen, primär strahlentherapeutisch behandelten Uteruszervixkarzinomen. 2002
- 30 Haugland HK, Vukovic V, Pintilie M, Fyles AW, Milosevic M, Hill RP, Hedley DW: Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in cervical carcinomas: correlation with tumor oxygenation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 53 (2002) 854-861
- 31 Hinds PW, Weinberg RA: Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 4 (1994) 135-141
- 32 Hoeckel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schäffer U, Vaupel P: Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 56 (1996) 4509-4515
- 33 Holm R, Skomedal H, Helland A, Kristensen G, Borrensen AL, Nesland JM: Immunohistochemical analysis of p53 protein overexpression in normal, premalignant, and malignant tissues of the cervix uteri. *J Pathol* 169 (1993) 21-26
- 34 Horn LC, Fischer U, Hanel C, Kuhn H, Raptis G, Bilek K: P53 in surgically treated and pathologically staged cervical cancer: correlation with local tumor progression, but not with lymphatic spread. *Pathol Res Pract* 197 (2001) 605-609
- 35 Hunt CR, Hale RJ, Buckley CH, Hunt J: p53 expression in carcinoma of the cervix. *J Clin Pathol* 49 (1996) 971-974
- 36 Hunt JL, Yim JH, Tometsko M, Finkelstein SD, Swalsky P, Carty SE: Loss of heterozygosity of the VHL gene identifies malignancy and predicts death in follicular thyroid tumors. *Surgery* 134 (2003) 1043-1048
- 37 Kamada M, Suzuki K, Kato Y, Okuda H, Shuin T: Von Hippel-Lindau protein promotes the assembly of actin and vinculin and inhibits cell motility. *Cancer Res* 61 (2001) 4184-4189
- 38 Kang JO, Hong SE: The prognostic effect of VEGF expression in squamous cell carcinoma of the cervix treated with radiation therapy alone. *J Korean Med Sci* 19 (2000) 693-697
- 39 Kaufmann GW, Moser E, Sauer R: Radiologie. Urban Schwarzenberg, 1996
- 40 Kim JW, Cho YH, Lee CG, Kim JH, Kim HK, Kim EJ, Han KT, Namkoong SE: Human papillomavirus infection and tp53 gene mutation in primary cervical carcinoma. *Acta Oncol* 36 (1997) 295-300

- 41 Kodama J, Seki N, Tokumo K, Hongo A, Miyagi Y, Yoshinouchi M, Okuda H, Kudo T: Vascular endothelial growth factor is implicated in early invasion in cervical cancer. *Eur J Cancer* 35 (1999) 485-489
- 42 Kodama S, Kanazawa K, Honma S, Tanaka K : Age as a prognostic factor in patients with squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Cancer* 68 (1991) 2481-2485
- 43 Kohno Y, Iwanari O, Kitao M: Prognostic importance of histologic vascular density in cervical cancer treated with hypertensive intraarterial chemotherapy. *Cancer* 72 (1993) 2394-2400
- 44 Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Thorpe PE, Brekken RA, Sivridis E, Kakolyris S, Georgoulis V, Gatter KC, Harris AL: Vascular endothelial growth factor/KDR activated microvessel density versus CD31 standard microvessel density in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 60 (2000) 3088-3095
- 45 Kouvaris J, Kouloulis V, Loghis C, Sykiotis C, Balafouta M, Vlahos L: Prognostic factors for survival in invasive squamous cell vulvar carcinoma: a univariate analysis. *Gynecol Obstet Invest* 51 (2001) 262-265
- 46 Laderoute KR, Alarcon RM, Brody MD, Calaoagan JM, Chen EY, Knapp M, Yun Z, Denko NC, Giaccia AJ: Opposing effects of hypoxia on expression of the angiogenic inhibitor thrombospondin 1 and the angiogenic inducer vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 6 (2000) 2941-2950
- 47 Lee JS, Kim HS, Park JT, Lee MC, Park CS: Expression of vascular endothelial growth factor in the progression of cervical neoplasia and its relation to angiogenesis and p53 status. *Anal Quant Cytol Histol* 25 (2003) 303-311
- 48 Leug DW, Cachianes G, Kuang W-J, Goeddel DV, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246 (1989) 1306-1309
- 49 Levine AJ, Momand J, Finlay CA: The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 351 (1991) 453-456
- 50 Loncaster JA, Cooper RA, Logue JP, Davidson SE, Hunter RD, West CM: Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is a prognostic factor for radiotherapy outcome in advanced carcinoma of the cervix. *Br J Cancer* 83 (2000) 620-625
- 51 Meanwell CA, Kelly KA, Wilson S, Roginski C, Woodman C, Griffiths R, Blackledge G: Young age as a prognostic factor in cervical cancer: analysis of population based data from 10,022 cases. *Br Med J* 296 (1988) 6619; 386-391
- 52 Miksits K, Hahn H: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer, Berlin, Heidelberg 1999
- 53 Mirhashemi R, Ganjei-Azar P, Nadji M, Lambrou N, Atamdede F, Averette HE: Papillary squamous cell carcinoma of the uterine cervix: An immunophenotypic appraisal of 12 cases. *Gynecol Oncol* 90 (2003) 657-661

- 54 Morris M, Eifel PJ, Lu J, Grigsby PW, Levenback C, Stevens RE, Rotman M, Gershenson DM, Mutch DG: Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med* 340 (1999) 1137-1143
- 55 Moscatelli DA, Presta M, Mignatti P, Mullins DE, Crowe RM, Rifkin DB: Purification and biological activities of an angiogenesis factor from human placenta. *Anticancer Res* 6 (1986) 861-863
- 56 Mukhopadhyay D, Datta K: Multiple regulatory pathway of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in tumors. *Cancer Biol* 14 (2004) 123-130
- 57 Mukhopadhyay D, Knebelmann B, Cohen HT, Ananth S, Sukhatme VP: The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product interacts with Sp1 to repress vascular endothelial growth factor promoter activity. *Mol Cell Biol* 17 (1997) 5629-5639
- 58 Munirajan AK, Kannan K, Bhuvaramurthy V, Ishida I, Fujinaga K, Tsuchida N, Shanmugam G: The status of human papillomavirus and tumor suppressor genes p53 and p16 in carcinoma of uterine cervix form India. *Gynecol Oncol* 69 (1998) 205-209
- 59 Obermair A, Kohlberger P, Bancher-Todesca D, Tempfer C, Sliutz G, Leodolter S, Reinthaller A, Kainz C, Breitenecker G, Gitsch G: Influence of microvessel density and vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor expression on prognosis in vulvar cancer. *Gynecol Oncol* 63 (1996) 204-209
- 60 Obralic N, Bilenjki D, Bilbija Z: Prognostic importance of anemia related parameters in patients with carcinoma of the cervix uteri. *Acta Oncol* 29 (1990) 199-201
- 61 Pal S, Claffey KP, Dvorak HF, Mukhopadhyay D: The von Hippel-Lindau gene product inhibits vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression in renal cell carcinoma by blocking protein kinase C pathway. *The J Biol Chem* 272 (1997) 27509-27512
- 62 Peters WA, Liu PY, Barrett RJ, Stock RJ, Monk BJ, Berek JS, Souhami L, Grigsby P, Gordon W Jr, Alberts DS: Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. *J Clin Oncol* 18 (2000) 1606-1613
- 63 Pilch H, Schlenger K, Steiner E, Brockerhoff P, Knapstein P, Vaupel P: Hypoxia-stimulated expression of angiogenic growth factors in cervical cancer cells and cervical cancer-derived fibroblasts. *Int J Gynecol Cancer* 11 (2001) 137-142
- 64 Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D, Waggoner SE: Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and non-smokers. *J Natl Cancer Inst* 89 (1997) 868-873
- 65 Pschyrembel W, Strauss G, Petri E: *Praktische Gynäkologie*. 5.Aufl. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1991

- 66 Remmele W: Pathologie. Band 4. 2.Aufl. Springer, Heidelberg, 1997
- 67 Robertson D, Ferdorkow DM, Stuart GC, McGregor SE, Duggan MA, Nation G: Age is prognostic variable in cervical squamous cell carcinoma. *Eur J Gynecol Oncol* 14 (1993) 283-291
- 68 Schmidt-Matthiesen H, Hepp H: Gynäkologie und Geburtshilfe. 9.Aufl. Schattauer, Stuttgart, New York, 1998
- 69 Schor AM, Pazouki S, Morris J: Heterogeneity in microvascular density in lung tumours: comparison with normal bronchus. *Br J Cancer* 77 (1998)946-951
- 70 Schor AM, Pendleton N, Pazouki Z: Assesment of vascularity in histological sections. Effects of methology and value as an index of angiogenesis in breast tumours. *Histochem J* 30 (1998) 849-856
- 71 Schraml P, Struckmann K, Hatz F, Sonnet S, Kully C, Gasser T, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H: VHL mutation and their correlation with tumor cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol* 196 (2002) 186-193
- 72 Schreiner P, Siracka E, Siracky J, Manka I: The effect of anemia on the radiotherapy results of the uterine cervix cancer. *Neoplasma* 22 (1975) 655-660
- 73 Serur E, Fruchter RG, Maiman M, Mc Guire J, Arrastia CD, Gibbon D: Age, Substance abuse, and survival of patient with cervical carcinoma. *Cancer* 75 (1995) 2530-2538
- 74 Siracka E, Revesz L, Kovac R, Siracky J: Vascular density in carcinoma of the uterine cervix and its predictive value for the radiotherapy. *Int J Cancer* 41 (1988) 6; 819-822
- 75 Siracka E, Siracky J, Pappova N, Revesz, L: Vascularization and radiocurability in cancer of the uterine cervix. A retrospective study. *Neoplasma* 29 (1982) 183-188
- 76 Stauber M, Weyerstahl T: Gynäkologie und Geburtshilfe. Georg-Thieme, Stuttgart, New York, 2001
- 77 Thomas G: The effect of hemoglobin level on radiotherapy outcome: The Canadian experience. *Semin Oncol* 28 (2001) 60-65
- 78 Tjalma W, Weyler J, Weyn B, Van Marck E, Van Daele A, Van Dam P, Goovaerts G, Buytaert P: The association between vascular endothelial growth factor, microvessel density and clinicopathological features in invasive cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 92 (2000) 251-257
- 79 Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, Kanetake H, Saito Y, Alitalo K, Koji T: Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Br J Cancer* 80 (1999) 309-313
- 80 Vaupel P, Hoekel M: Hypoxie beim Zervixkarzinom: Pathogenese, Charakterisierung und biologische/klinische Konsequenzen. *Zentralbl-Gynakol* 123(2001) 192-197
- 81 Vaupel P, Thews O, Kelleher DK, Hoekel M: Oxygenation of human tumors. The Mainz experience. *Strahlenther Onkol* 174 (1998) 6-12

- 82 Vordermark D, Brown JM: Endogenous markers of tumor hypoxia predictors of clinical radiation resistance? *Strahlenther Onkol* 179 (2003) 801-811
- 83 Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J: Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324 (1991) 1-8
- 84 West CM, Cooper RA, Loncaster JA, Wilks DP, Bromley M: Tumor vascularity a histological measure of angiogenesis and hypoxia. *Cancer Res* 61 (2001) 2907-2910
- 85 Wittekind C, Meyer Hj, Bootz F: UICC. TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 6.Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2002
- 86 Yamakawa M, Liu LX, Belanger AJ, Date T, Kuriyama T, Goldberg MA, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C: Expression of angiopoetins in renal epithelial and clear cell carcinoma cells: regulation by hypoxia and participation in angiogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol* 287 (2004) 649-657
- 87 Yonemura Y, Fushida S, Bando E, Kinoshita K, Miwa K, Endo Y, Sugiyama K, Partanen T, Yamamoto H, Sasaki T: Lymphangiogenesis and the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 in gastric cancer. *Eur J Cancer* 37 (2001) 918-923
- 88 Yonemura Y, Yoshio E, Hideto F, Sachio F, Itasu N, Etsuro B, Keizou T, Kouichi M, Sigekazu O, Kazuo S, Takuma S: Role of Vascular Endothelial Growth Factor C Expression in the Development of Lymph Node Metastasis in Gastric Cancer. *Clin Cancer Res* 5 (1999) 1823-1829
- 89 Ziemer LS, Koch CJ, Maity A, Magarelli DP, Haran AM, Evans SM: Hypoxia and VEGF mRNA expression in human tumors. *Neoplasia* 3 (2001) 500-508

7 Thesen

1. Zervixkarzinome ist mit 40-50% eines der häufigsten Genitaltumoren der Frau. Rechtzeitige Erkennung führt zu erfolgversprechenden kurativen Behandlungen. Jedoch ist die prognostische Aussagekraft biologischer Tumormarker nur eingeschränkt, besonders für sich allein betrachtet.
2. Die eigenen Untersuchungen sollten Zusammenhänge zwischen klinischen Faktoren, Tumorcharakteristika und Tumormarkern aufzeigen. Weiter war zu klären, ob diese Merkmale das Überleben der Patientinnen beeinflussen.
3. 53 Plattenepithelkarzinome der Zervix uteri von primär kurativ bestrahlten Patientinnen im Alter von 35-78 Jahren wurden untersucht, davon 13 Karzinome im Stadium IIB, 34 im Stadium IIIB und 6 im Stadium IVA der FIGO-Klassifikation. 27 Tumoren waren mäßig, 26 schlecht differenziert.
4. Die Anämie erwies sich als starker unabhängiger Prognosefaktor für das Überleben von Patientinnen mit fortgeschrittenen Zervixkarzinomen. Anämische Patientinnen lebten durchschnittlich 25 Monate kürzer als nicht anämische.
5. In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen wurde der Einfluss des Alters auf das Überleben an Zervixkarzinom beobachtet. Patientinnen älter als 60 Jahre zeigten mit einer mittleren Überlebenszeit von über 50 Monaten eine tendenziell bessere Prognose als jüngere Patientinnen, die im Schnitt nur 38 Monate überlebten.
6. Die Metastasierung wurde als Prognosefaktor bestätigt. Patientinnen mit Fernmetastasen lebten durchschnittlich 20 Monate kürzer als die ohne Fernmetastasen.
7. Je fortgeschrittener Stadium und Grading waren, desto schlechter war tendenziell die Prognose.
8. CD31 ist ein Angiogenesemarker, welche nicht allein als Prognosefaktor eingesetzt werden kann. Erst nach Adjustierung mit der Metastasierung wurde die Gefäßdichte prognostisch bedeutend.
9. Die VEGF-Expression kann als Prognosefaktor bei Zervixkarzinomen eingestuft werden, vor allem in Kombination mit der Metastasierung. Mit dem Alter und der VHL-Expression ließ sich eine starke Korrelation eruieren.
10. Die VHL-Expression ist ein guter biologischer Marker zur Prognoseschätzung bei Zervixkarzinomen. Eine starke VHL-Expression korreliert mit schlechter Prognose. Von allen Faktoren hatte nur das Alter einen Einfluss auf die VHL-Expression.

11. P53⁺-Patientinnen hatten die beste Prognose. Das könnte an der ungleichmäßigen Verteilung von P53⁻- und P53⁺-Fällen. P53-Protein korreliert nicht mit der VEGF-Expression. Die höchste P53-Expression trat im frühesten Stadium auf. Differenzierungsgrad, Alter, Metastatenfreiheit und VHL-Expression beeinflussten nur tendenziell die P53-Expression.
12. Unter Hypoxie zeigte sich nur tendenziell eine Stimulation zur Angiogenese, zur VEGF-, VHL- und P53-Expression.

Anhang

Lebenslauf

Persönliche Daten Esther Zorn, geb. Ngo Ngan
geboren am 8.11.1968 in Douala
1988 Geburt des Sohnes Armand Menye Kongo
verheiratet mit Holger Zorn, Kardiotechniker

Schulbildung

1975-1977 Ecole catholique de Japoma, Douala, Kamerun
1977-1982 Ecole publique mixte de Bassa Ndogbè
1982-1988 Lycée Polyvalent de Bonabéri
Juli 1991 Certificat de Probation
1991-1992 Lycée Bilingue de Yaounde
August 1992 Abitur

Studium

1992-1993 Faculté des Sciences Naturelles, Université de Yaoundé, Kamerun
1993-1994 Sprachkurs Russisch, Podgatovitelnij Fakultät
Novomoskovskaja Universität, Russland
1994-1997 Medizin; Staatliche Medizinische Akademie, Ivanovo, Russland
August 1997 Anerkennung der Ärztlichen Vorprüfung, Landesprüfungsamt NRW
1997-1998 Sprachkurs Deutsch; Studienkolleg der MLU, Halle
1998-2002 Humanmedizin; Medizinische Fakultät der MLU, Halle
August 1999 Erstes Staatsexamen; MLU, Halle
August 2001 Zweites Staatsexamen; MLU, Halle
27.11.2002 Drittes Staatsexamen; MLU, Halle
10/01-09/02 Praktisches Jahr; Uni-Kliniken, MLU, Halle

Sprachkenntnisse Französisch, Deutsch, Russisch, Englisch

Berufstätigkeit

09.12.02- 08.06.04 Ärztin im Praktikum, Klinik für Innere Medizin III, MLU, Halle
09.06.04- 31.03.07 Assistenzärztin in Facharztausbildung, Innere Medizin III, MLU, Halle
seit 04.2007 Assistenzärztin in Facharztausbildung, Innere Medizin, Bitterfeld

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbst verfasst und mich nur der angegebenen Quellen bedient habe.

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich den Antrag auf Eröffnung des Promotionsverfahren erstmalig an die Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg stelle.

Weiterhin erkläre ich, diesen Antrag an keiner anderen Universität oder Hochschule gestellt zu haben.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Privatdozentin Dr. med. G. Hänsgen, kommissarische Direktorin an der Universitätsklinik und Poliklinik für Strahlentherapie der MLU, Halle sowie Herrn Dr. med. U. Krause, aktuell Arzt an dem Institut für Pathologie des Kreiskrankenhauses Dessau für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung meiner wissenschaftlichen Arbeit. Weiterhin möchte ich mich bei ihnen für die hervorragende Betreuung bedanken. Frau PD Dr. med. Hänsgen hatte immer Geduld und jederzeit ein offenes Ohr für mich. Ihr möchte ich ganz besonders danken für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterial und Ergebnissen der Messung der Tumorphypoxie.

Herrn Dr. med. U. Krause danke ich für die Bereitstellung der Histologie-Ergebnisse.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Hauptmann möchte ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Pathologie der MLU bedanken.

Besonderer Dank gilt auch Frau G. Bauer, Institut für Pathologie der MLU, für die große Hilfe bei der immunhistochemischen Untersuchung.

Frau Dr. C. Lautenschläger, Institut für medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik sowie Frau I. Haufe, Rechenzentrum der MLU Halle, danke ich für die Betreuung und Beratung bei der Erstellung der statistischen Analyse.

Meinem Ehemann und meinem Kind danke ich für die sprach- und computertechnische Unterstützung. Bei allen Patientinnen, die sich für die Materialgewinnung bereitgestellt haben, möchte ich mich ganz herzlich bedanken.