

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

In vitro Angiogenese-Testung von Zervixkarzinompatientinnen:
Prognostische und therapeutische Bedeutung des
Angiogenese-Scores in der individuellen Tumorthherapie.

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Cora Reuter

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. J.-U. Blohmer
2. Prof. Dr. med. W. Lichtenegger
3. Prof. Dr. med. U. Köhler

Datum der Promotion: 19. September 2008

Inhaltsverzeichnis

<u>Abbildungsverzeichnis.....</u>	<u>5</u>
<u>Tabellenverzeichnis.....</u>	<u>6</u>
<u>Abkürzungsverzeichnis.....</u>	<u>7</u>
<u>1. Einleitung.....</u>	<u>8</u>
1.2 Angiogenese.....	8
1.2.1 Ablauf der Angiogenese.....	9
1.2.2 Regulation der Angiogenese und Tumorangiogenese.....	10
1.2.2.1 Die wichtigsten Angiogenesestimulatoren.....	11
1.2.2.2 Die wichtigsten Angiogeneseinhibitoren.....	12
1.2.3 Klinische Bedeutung der Angiogenese.....	13
1.2.4 Antiangiogenese als therapeutisches Angriffsziel.....	13
1.3 Zervixkarzinom.....	15
1.3.1 Epidemiologie des Zervixkarzinoms.....	15
1.3.2 Ätiologie des Zervixkarzinoms.....	15
1.3.3 Stadieneinteilung des Zervixkarzinoms.....	16
1.3.4 Histologische Einteilung des Zervixkarzinoms.....	17
1.3.5 Therapie des Zervixkarzinoms.....	17
<u>2. Zielsetzung und Fragestellung.....</u>	<u>19</u>
<u>3. Material und Methoden.....</u>	<u>20</u>
3.1 Materialien.....	20
3.1.1 Patientinnenkollektiv.....	20
3.1.1.1 Tumorstadien.....	20
3.1.1.2 Alter der Patientinnen.....	21
3.1.1.3 Menopausenstatus der Patientinnen.....	21
3.1.1.4 Bestimmte ELISA-Werte.....	21
3.1.1.5 Histologie der Zervixkarzinome.....	21
3.1.1.6 Prognoseparameter der Patientinnen.....	22
3.1.1.7 Einverständniserklärung.....	22
3.1.2 Verwendete Substanzen.....	23
3.1.3 Behältnisse und Zubehör.....	24
3.1.4 Geräte.....	24
3.2 Methoden.....	25
3.2.1 Präparation von HUVEC.....	25
3.2.2 Isolierung von HUVEC.....	25
3.2.3 Kultivierung von HUVEC.....	26
3.2.4 Endothelzellproliferations-Assay.....	26
3.2.4.1 Vorbereitung der Endothelzellen.....	26
3.2.4.2 Quantifizierung von Endothelzellen.....	27
3.2.4.4 Bestimmung des Angiogenese-Scores durch ATP-Messung.....	28
3.2.5 Tube Formation.....	30
3.2.5.1 Vorbereitung des Mediums.....	30
3.2.5.2 Quantifizierungen von Endothelzellen.....	30
3.2.5.3 Aussaat der Endothelzellen.....	30
3.2.5.4 Bestimmung der Tubelänge.....	31

3.3 Statistische Auswertung.....	31
3.3.1 Korrelationskoeffizient nach Spearman	31
3.3.2 Mann-Whitney-U-Test	31
3.3.3 Kruskal-Wallis-Test.....	32
3.3.4 Wilcoxon-Test	32
4. Ergebnisse.....	33
4.1 Tumorstadium und Angiogenese-Score	35
4.1.1 Rezidiv	36
4.2 Tube Formation	38
4.2.1 Tube Formation und Angiogenese-Score.....	43
4.3 Angiogenesefaktoren und Angiogenese-Score.....	44
4.3.1 Tumorstadium und VEGF-Konzentration.....	46
4.3.2 Tumorstadium und bFGF-Konzentration	47
4.3.3 Tumorstadium und Endostatinkonzentration.....	47
4.3.4 Tumorstadium und VEGFR-1-Konzentration	48
4.4 Tumorhistologie und Angiogenese-Score	49
4.5 Alter bei Erstdiagnose, Angiogenese-Score und Angiogenesefaktoren..	49
4.6 Angiogenese-Score und Menopausenstatus	50
4.7 Angiogenesefaktoren und Menopausenstatus	51
4.7.1 VEGF und Menopausenstatus	51
4.7.2 bFGF und Menopausenstatus.....	51
4.7.3 Endostatin und Menopausenstatus	52
4.7.4 VEGFR-1 und Menopausenstatus	52
4.8 Prognosefaktoren und Angiogenese-Score.....	53
5. Diskussion.....	54
5.1 Ermittlung des Angiogenese-Scores.....	55
5.1.1 Tumorstadium und Angiogenese-Score	56
5.2 Rezidiv.....	57
5.3 Tube Formation	58
5.3.1 Angiogenese-Score und Tube Formation.....	59
5.4 Angiogenese-Score und Angiogenesefaktoren.....	60
5.4.1 Krankheitsstadium, Angiogenese-Score und VEGF	60
5.4.2 Krankheitsstadium, Angiogenese-Score und bFGF	61
5.4.3 Krankheitsstadium, Angiogenese-Score und Endostatin	62
5.4.4 Angiogenese-Score, Krankheitsstadium und VEGFR-1	62
5.5 Angiogenese-Score und Tumorhistologie	63
5.6 Angiogenese-Score und Alter bei Erstdiagnose	64
5.7 Menopausenstatus und Angiogenese-Score	65
5.7.1 Menopausenstatus und Angiogenesefaktoren	66
5.8 Prognosefaktoren und Angiogenese-Score.....	67
6. Zusammenfassung	68
7. Literaturverzeichnis	70
Lebenslauf	80
Danksagung	81
Erklärung	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tumorangiogenese	10
Abbildung 2: Standardkurve Endothelzellen	29
Abbildung 3: Angiogenese-Score in % in Abhängigkeit vom Tumorstadium.....	35
Abbildung 4: Verteilung des Angiogenese-Scores auf die Krankheitsstadien der Patienten.....	37
Abbildung 5: Tube Formation: Positivkontrolle	40
Abbildung 6: Tube Formation: Negativkontrolle	41
Abbildung 7: Tube Formation: Patientenserum.....	42
Abbildung 8: Tumorstadium und VEGF-Konzentration	46
Abbildung 9: Tumorstadium und Endostatinkonzentration	48
Abbildung 10: Angiogenese-Score und Menopausenstatus.....	50
Abbildung 11: VEGF-Konzentration und Menopausenstatus	51
Abbildung 12: Endostatinkonzentration und Menopausenstatus.....	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Funktion ausgewählter Angiogenesestimulatoren	11
Tabelle 2: Funktion ausgewählter Angiogeneseinhibitoren.....	12
Tabelle 3: FIGO-Stadieneinteilung des Zervixkarzinoms	16
Tabelle 4: 5-Jahres-Überlebensrate für Patientinnen mit Zervixkarzinom.....	18
Tabelle 5: Verwendete Substanzen	23
Tabelle 6: Behältnisse und Zubehör	24
Tabelle 7: Geräte	24
Tabelle 8: Tumorstadium und Angiogenese-Score	34
Tabelle 9: Tubellänge mit und ohne Bevacizumab	39
Tabelle 10: Tubellänge und Angiogenese-Score	43
Tabelle 11: Mittelwerte der Angiogenesefaktoren und des Angiogenese-Scores von Zervixkarzinompatientinnen (n=81).....	44
Tabelle 12: Alter bei Erstdiagnose und Angiogenesefaktoren.....	50

Abkürzungsverzeichnis

AMP: Adenosinmonophosphat

ATP: Adenosintriphosphat

b FGF: basic Fibroblast Growth Factor

CIN: Cervikale intraepitheliale Neoplasie

EBM-2: Endothelcell Basal Medium-2

EGM-2: Endothelcell Growth Medium-2

FCS: Fetal Calf Serum

FIGO: Fédération Internationale Gynécologie et d' Obstétrique

HPV: Humane papiloma Viren

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cell

MVD: Mircovesseldensity

PBS: Phosphate Buffer Solution

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VEGFR-1: Vascular endothelial growth factor receptor-1

1. Einleitung

1.2 Angiogenese

Angiogenese bedeutet das Auswachsen von Kapillaren aus einem bestehenden Kapillarsystem. Davon abzugrenzen ist die Vaskulogenese, sie beschreibt eine Neubildung von Gefäßen.

Das Blutgefäßsystem mit einer Gesamtoberfläche von mehr als 1000 m² wird als eines der größten menschlichen Organe angesehen (Griffioen and Molema 2000). Zu seinen Aufgaben gehört die Versorgung aller Organe mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie die Regulation des Wärme- und Wasserhaushaltes.

Die Neubildung von Gefäßen findet beim Menschen physiologisch in der Embryonal- und Fetalperiode statt. Beim Erwachsenen kommt es zur Aussprossung von Gefäßen im Rahmen einer Wundheilung. Bei Frauen werden im Laufe des Menstruationszyklus sowie beim Heranreifen des Gelbkörpers, der Plazenta und der Milchdrüsen Gefäßaussprossungen beobachtet (Berdel 2005, Djonov et al 2001, Hovey et al 2001, Modlich et al 1996, Risau 1997).

Die Angiogenese ist nicht nur für die physiologischen Abläufe essentiell, sondern auch für das Wachstum von Tumoren und deren Metastasen. Wenn nicht mehr ausreichend Nährstoffe zur Verfügung stehen, wachsen neu entstandene Tumore nicht weiter. Basierend auf dieser Abhängigkeit postulierte Judah Folkman von der Harvard Medical School in Boston, Massachusetts, bereits vor mehr als 30 Jahren, dass eine Antiangiogenesetherapie eine neue Option in der Behandlung maligner Tumoren darstellen könnte (Folkman 1995).

1.2.1 Ablauf der Angiogenese

Die Angiogenese umfasst eine Reihe komplexer Abläufe. Die Endothelzellen nehmen dabei eine besondere Rolle ein. Sie gehören zu den sich selten teilenden, hoch spezialisierten Zellen des menschlichen Körpers (Denekamp 1993).

Als einschichtige Zellschicht kleiden sie luminal das gesamte Blutgefäßsystem innen aus und sind Grundbausteine aller Gefäße. Kapillaren bestehen ausschließlich aus Endothelzellen und werden nur von einer Basalmembran umgeben (Hormia and Virtanen 1998).

Die Endothelzellen stehen unter ständiger Kontrolle von endogenen Angiogenese-stimulatoren, z.B. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) und Angiogeneseinhibitoren, z. B. Endostatin und VEGFR-1 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1).

Unter physiologischen Bedingungen befinden sich diese Faktoren in einem Gleichgewicht. Im Rahmen dieses Gleichgewichtes findet nur ein zum Erhalt der funktionellen Gefäßwand notwendiger Endothelzellumsatz statt. Es kommt zu keinem quantitativen Zuwachs an Endothelzellen (Denekamp 1993).

Überschreitet wachsendes Gewebe, wie zum Beispiel Tumorgewebe, eine kritische Größe (diese liegt bei ca. $0,5 \text{ cm}^3$), benötigt es zur weiteren Ausbreitung ein eigenes Blut- und Lymphgefäßsystem.

Auf Grund des wachstumsbedingten Mehrbedarfes kommt es in schnell wachsenden Tumoren zu einer relativen Unterversorgung an Sauerstoff. Diese Mangelversorgung induziert die Bildung des HIF (Hypoxie-induzierten Faktors). Dieser wiederum setzt eine Kaskade in Gang, die das Gleichgewicht der Angiogenesestimulatoren und der Angiogeneseinhibitoren verändert: Es kommt zu einer Verschiebung zugunsten der proangiogenen Faktoren. Hierdurch wiederum wird die Angiogenese induziert (Pilch 2001, Pugh 2003, Berdel 2005). Die Angiogenese beginnt mit dem Abbau der Basalmembran eines in der Nähe vorbeiziehenden Gefäßes. Die nach Auflösung der Basalmembran nun frei liegenden Endothelzellen bewegen sich in Richtung der, zum Beispiel vom Tumor, ausgehenden angiogenetischen Reize (siehe Abbildung 1) (Stetler-Stevenson 1999).

Im Rahmen dieses Vorgangs proliferieren die Endothelzellen und bilden ein Gefäßlumen. Dieser Prozess führt zu der Heranreifung eines neuen Blutgefäßes.

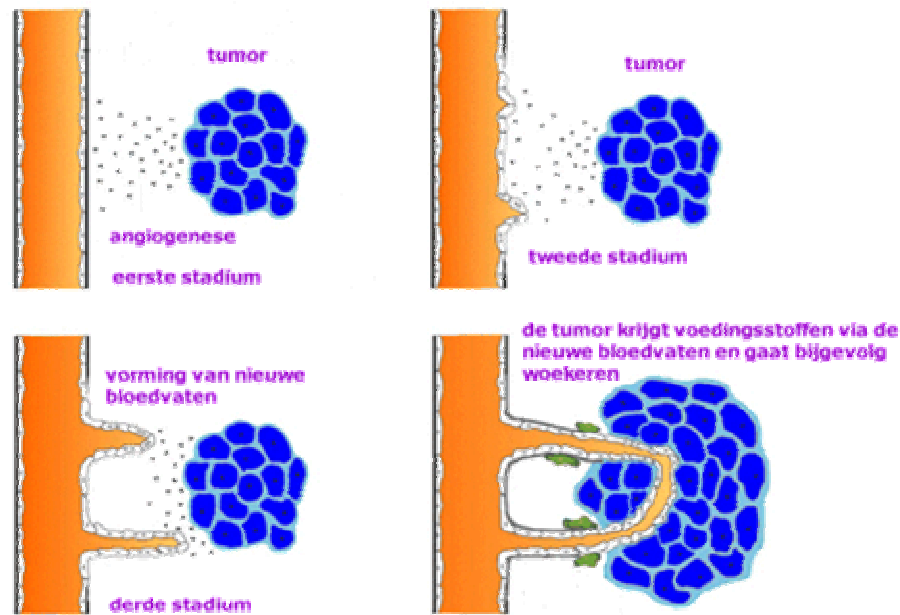


Abbildung 1: Tumorangiose

Die Vermittlung der Angiogenese wird durch vom Tumor sezernierte proangiogene Faktoren induziert. (Quelle: www.users.skynet.be/.../nl-thalidomide-nieuw.htm)

1.2.2 Regulation der Angiogenese und Tumorangiose

Angiogene Wachstumsfaktoren entstammen sowohl infiltrierenden Zellen wie Fibroblasten und Makrophagen als auch Tumorzellen (Takahashi 1996).

Im Falle eines Tumors wird die Bildung von Wachstumsfaktoren in Verbindung gebracht mit einer Mutation des p53. Aufgrund dieser Mutation kann der Tumor Botenstoffe wie die VEGF, bFGF u. a. sezernieren, die die Aussprossung von Blutgefäßen zum Tumor bewirken (Carmeliet 2003, Dameron 1994). Neben Mutation gibt es weitere Bedingungen, die zur Induktion von Endothelzellproliferation führen können: Auch durch den Abfall des Sauerstoffpartialdrucks und des pH-Wertes, durch proteolytische Degeneration von Gewebe und andere Mechanismen werden Angiogenesefaktoren aus verschiedenen Zellen freigesetzt (Folkman 1988, Baird 1987).

1.2.2.1 Die wichtigsten Angiogenesestimulatoren

Angiogenesestimulatoren lassen sich in drei verschiedene Klassen unterteilen (Distler 2003). Die erste Klasse, bestehend aus Proteinen, wirkt fast ausschließlich auf Endothelzellen; hierzu zählt in erster Linie der VEGF.

In einer zweiten Klasse werden Angiogenesestimulatoren subsumiert, die auch auf andere Zellen stimulatorisch wirken. Der Prototyp dieser Gruppe ist der bFGF, außerdem zählen zu dieser Gruppe einige Chemokine, Zytokine und Enzyme.

In der dritten Klasse werden Proteine zusammengefasst, die Endothel- und Tumorzellen, Makrophagen und Granulozyten zur Freisetzung direkt wirkender Faktoren anregen. Die wichtigsten Vertreter sind TGF-beta und TNF-alpha (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Funktion ausgewählter Angiogenesestimulatoren

Die Tabelle wurde nach Angaben von J.W. Distler modifiziert (Distler et al 2003).

Faktor	Biologische Funktion
VEGF-Familie	<i>Stimuliert:</i> Permeabilität, Plasminogenaktivatoren, Kollagenasen, Endothelzellproliferation und -migration, proangiogen in vivo <i>Inhibiert:</i> Apoptose der Endothelzellen
FGF-Familie	<i>Stimuliert:</i> Plasminogenaktivatoren, Adhäsionsmoleküle, Endothelzellproliferation und -migration, proangiogen in vivo
TNF-alpha	<i>Stimuliert:</i> Endothelzellmigration, Röhrenbildung in vitro, proangiogen in vivo

1.2.2.2 Die wichtigsten Angiogeneseinhibitoren

Nicht nur stimulatorische Prozesse werden auf verschiedene Weise in Gang gesetzt, auch inhibitorische Effekte kommen auf unterschiedlichen Wegen zur Ausprägung. So haben u. a. die Hemmung der Migration, Proliferation und Proteaseaktivität von Endothelzellen sowie die Induktion ihrer Apoptose antiangiogenetische Folgen (Cao 2001).

Die bekanntesten Inhibitoren der Angiogenese sind Endostatin, Thrombospondin-1, Angiostatin sowie Interferon-Alpha, verschiedene Metalloproteasen und Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (Folkman 2006, Good et al 1990, Mac Donald et al 2001, Tjin 2006).

Der VEGFR-1 nimmt eine Zwischenstellung ein. Gebunden an Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen und haematopoetischen Stammzellen vermittelt er die Wirkung von VEGF und wirkt somit pro-angiogen. In seiner löslichen Form im Serum wird jedoch eine antiangiogene Wirkung vermutet, da er VEGF bindet und somit eine Ankopplung an zellständige Rezeptoren verhindert (siehe Tabelle 2) (Kowanetz et Ferrara 2006, Veikkola et al 2000).

Tabelle 2: Funktion ausgewählter Angiogeneseinhibitoren

Die Tabelle wurde nach Angaben von J.W. Distler modifiziert (Distler et al 2003).

Faktor	Biologische Funktion
Endostatin	<i>Inhibiert:</i> Endothelzellproliferation und -migration, Matrixmetalloproteasen; antiangiogen in vivo <i>Stimuliert:</i> Apoptose
Thrombospondin-1	<i>Inhibiert:</i> Endothelzellmigration; antiangiogen in vivo <i>Stimuliert:</i> Apoptose
VEGFR-1 (löslich)	bindet VEGF und inaktiviert diesen

1.2.3 Klinische Bedeutung der Angiogenese

Nach der Entartung einer Körperzelle entsteht ein maligner Zellklon, der zunächst unabhängig von der Bildung neuer Blutgefäße wächst. In dieser avaskulären Phase ernährt sich der Tumor ausschließlich durch Diffusion. Überschreitet der Tumor eine bestimmte Größe, beginnt er auf verschiedenen Wegen die Angiogenese zu induzieren. Dies kann eine weitere Größenzunahme des Tumors begünstigen. Zudem wächst die Gefahr der Metastasierung.

Im Rahmen des Ungleichgewichtes der Angiogenesefaktoren können maligne Zellklone den so genannten „angiogenen Switch“ durchlaufen. Dieser befähigt die Tumorzellen nun selbst, die Angiogenese zu stimulieren und auf diese Weise Tumorwachstum und Metastasierung zu beschleunigen (Bergers and Benjamin 2003, Hanahan and Folkman 1996). Auch bei zahlreichen weiteren Erkrankungen spielen pathologische Gefäßneubildungen eine wichtige Rolle.

Bekannt ist dieses Phänomen bei der rheumatoiden Arthritis, der Psoriasis, der Makuladegeneration, der pulmonalen Hypertonie, der zerebralen Ischämie etc. (Carmeliet 2003, Detmar et al 1994, Folkman 1995, Koch et al 1994, Kremer et al 1997).

1.2.4 Antiangiogenese als therapeutisches Angriffsziel

Aufgrund der beschriebenen Zusammenhänge wird der Erkundung der Angiogenese sowie der Antiangiogenese in der gegenwärtigen Krebsforschung große Bedeutung beigemessen. Besonders die Antiangiogenese ist ein Therapieansatz in der Tumorbehandlung (Folkman 2006).

Bisher sind einige Verfahren bekannt, mit denen die MVD (Micro vessel density) von Zervixkarzinompatientinnen anhand von Operationspräparaten und deren Markierung mit speziellen Antikörpern, u. a. Anti-CD 34, festgestellt werden konnte. In diesen Studien wurde eine Korrelation zwischen der MVD und der Prognose festgestellt. Es zeigte sich bei Karzinomen mit einer hohen MVD eine schlechtere Prognose. Dies bekräftigt den beschriebenen Therapieansatz, die Angiogenese und somit die Erhöhung der Gefäßdichte zu hemmen (Lee et al 2002, Vieira et al 2004, Viera et al 2005).

In einem weiteren Studienansatz wurden in vivo Testverfahren angewandt, welche mittels Dopplersonographie die Angiogeneseaktivität von Karzinomen bestimmten. Ergebnisse dieser Studie zeigten eine Korrelation zwischen der Bestimmung der MVD durch Dopplersonographie und der MVD, welche aus vergleichbaren histologischen Präparaten von Patientinnen bestimmt wurde (Cheng et al 1999).

Um medikamentös die Tumorangiogenese unterdrücken zu können, muss die komplexe Gefäßphysiologie bekannt sein (Denekamp1993).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Hemmung des VEGF zu einer Reduzierung der Gefäßdichte von soliden Tumoren und damit zu ihrer Verkleinerung führte (Red-Horse 2006).

Der 2005 zugelassene VEGF Antikörper Bevacizumab (Avastin®) zeigte bereits für verschiedene Karzinome eine Erfolg versprechende Therapiemöglichkeit. Zugelassen ist er bisher nur für das Kolonkarzinom sowie beim metastasierten Mammakarzinom; zahlreiche Studien untersuchen derzeit seine Wirkung auf weitere Karzinome.

1.3 Zervixkarzinom

1.3.1 Epidemiologie des Zervixkarzinoms

Das Zervixkarzinom stellt trotz intensiver Vorsorgeuntersuchungen global immer noch das zweithäufigste Karzinom der Frau dar (Löning 2006, Trunk 2005).

Weltweit findet sich in Spanien die niedrigste und in Kolumbien die höchste Rate (Wolf 2001). Bedingungen wie, schlechte Ernährung, Multiparität und genitale Infektion, wie sie vor allem in Ländern der dritten Welt herrschen, sowie Immunschwäche erhöhen die Inzidenz dieses Krebses.

1.3.2 Ätiologie des Zervixkarzinoms

Die Pathogenese des Zervixkarzinoms ist weitestgehend aufgeklärt und als multifaktoriell zu betrachten.

Das Zervixkarzinom entwickelt sich meist aus einer gut definierten Vorstufe der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN I – CIN III) und verändert sich zu einem manifesten Karzinom. Unbehandelte CIN I und II entarten bei 10% zu einem manifesten Karzinom. Ein unbehandeltes Carcinoma in situ (CIN III) progrediert bei etwa 15-33% der Patientinnen zum Karzinom, wenn keine adäquate Nachbehandlung stattfindet. Die Infektion mit den weit verbreiteten Humanen Papilloma Viren (HPV) gilt heute als entscheidende Disposition zum Auftreten der Erkrankung. Entsprechend gelten frühe Kohabitarche, bestimmte Sexualverhalten, Nikotinkonsum, niedriger sozioökonomischer Status, Immunsuppression und HIV Infektion als begünstigende und unterstützende Faktoren. Insbesondere den HPV Typen 16 und 18 kommt, wie beschrieben, eine besondere Bedeutung zu. Die HPV interagieren mit dem Zellzyklus und regulieren wichtige Proteine wie p53 und RB (Retinoblastom). Dies führt zu einem instabilen Genom, welches eine Voraussetzung für viele Karzinome darstellt (Cogliano 2005, Park 1995).

1.3.3 Stadieneinteilung des Zervixkarzinoms

Die klinische Stadieneinteilung des Zervixkarzinoms erfolgt nach der FIGO (Fédération Internationale Gynécologie et d' Obstétrique) -Klassifikation (siehe Tabelle 3).

Sie beruht auf klinischen Befunden, wie der gynäkologischen Untersuchung einschließlich Narkoseuntersuchung, Zysto- und Rektoskopie, i.v. -Pyelogramm, Röntgenaufnahmen und postoperativ gewonnener Histologie.

Tabelle 3: FIGO-Stadieneinteilung des Zervixkarzinoms

Modifiziert nach Keys et al 1999.

FIGO	
0	Carcinoma in situ
I	Karzinom ist streng auf die Cervix uteri begrenzt (die Ausdehnung auf das Corpus uteri bleibt unberücksichtigt).
IA	Invasives Karzinom, das lediglich mikroskopisch identifiziert wird. Alle makroskopisch erkennbaren Läsionen - sogar mit oberflächlicher Invasion - werden dem Stadium IB zugerechnet. Die Invasion ist begrenzt auf eine gemessene Stroma-Invasion mit einer maximalen Tiefe von 5 mm und einer Oberflächenausdehnung von nicht mehr als 7 mm.
IA1	Gemessene Stroma-Invasion von nicht mehr als 3 mm in der Tiefe und einer Oberflächenausdehnung von nicht mehr als 7 mm.
IA2	Gemessene Stroma-Invasionstiefe von mehr als 3 mm und nicht mehr als 5 mm bei einer Oberflächenausdehnung von nicht mehr als 7 mm.
IB	Klinisch erkennbare Läsionen, begrenzt auf die Cervix uteri oder subklinische Läsionen mit größeren Maßen als Stadium IA.
IB1	Klinisch erkennbare Läsionen, nicht größer als 4 cm.
IB2	Klinisch erkennbare Läsionen, größer als 4 cm.
II	Zervixkarzinom infiltriert jenseits des Uterus, aber nicht bis zur Beckenwand und nicht bis zum unteren Drittel der Vagina.
IIA	Ohne Infiltration des Parametriums. Infiltration der oberen 2/3 der Vagina.
IIB	Mit Infiltration des Parametriums, aber keine Ausbreitung zur Beckenwand.

III	Zervixkarzinom breitet sich bis zur Beckenwand aus und befällt das untere Drittel der Vagina und verursacht Hydronephrose oder stumme Niere.
IIIA	Tumor befällt unteres Drittel der Vagina, keine Ausbreitung zur Beckenwand.
IIIB	Tumor breitet sich bis zur Beckenwand aus oder verursacht Hydronephrose oder stumme Niere.
IV	Tumor infiltriert Schleimhaut von Blase oder Rektum und/oder überschreitet die Grenzen des kleinen Beckens.
IVA	Ausbreitung auf angrenzende Organe des Beckens.
IVB	Ausbreitung auf entfernte Organe (Fernmetastasen).

1.3.4 Histologische Einteilung des Zervixkarzinoms

Beim Zervixkarzinom lassen sich mehrere histologische Gruppen abgrenzen:

Am häufigsten kommt das Plattenepithelkarzinom vor, seltener das Adenokarzinom.

Das adenosquamöse Karzinom und unspezifizierte epitheliale Tumoren machen den kleineren Teil aus (Brinton1993).

1.3.5 Therapie des Zervixkarzinoms

Zur Behandlung von Vor- und Frühstadien (Carcinoma in situ) kommen in erster Linie operative Maßnahmen in Frage, bei denen die Veränderungen in toto entfernt werden (Messerkonisation, Laserkonisation, Loop excision). Auch destruierende Verfahren (Elektrokoagulation, Kryokoagulation, CO²- Vaporisation) sind bekannt. Voraussetzung für diese operative Vorgehensweise ist der Ausschluss eines invasiven Wachstums.

Wurde ein invasives Karzinom durch Probeexzision nachgewiesen, so kommen je nach Stadium eine einfache Hysterektomie (bei Mikroinvasion), radikale Hysterektomie nach Wertheim/Meigs oder die primäre Radiochemotherapie oder eine Kombination aus beiden Verfahren in Betracht (Baltzer 1999, Baltzer 2001). In Ausnahmefällen kann bei einem frühen Zervixkarzinom und bestehendem Kinderwunsch die radikale Trachelektomie nach Dargent durchgeführt werden. Bei dieser Operation bleiben das Corpus uteri und der innere Muttermund erhalten (Schneider 2001).

1.3.5 Prognose des Zervixkarzinoms

Im Allgemeinen ist die Prognose des Zervixkarzinoms abhängig von Differenzierungsgrad und Stadium, von der Neigung des Tumors zur Lymphknotenmetastasierung, vom Tumolvolumen sowie vom Alter der Patientin (Kiechle 2000, Pfeleiderer 2000).

Um die Metastasierungsneigung eines Tumors vorherzusagen, ist es mittlerweile möglich, die Tumor-Neoangiogenese zu bestimmen (siehe 1.2.4). Hieraus kann sich ein zusätzlicher viel versprechender Prognosefaktor ergeben.

Die Anzahl sowie anatomische und funktionelle Insuffizienz der Gefäße wachsen mit steigender Aggressivität des Tumors. Damit erhöht sich die Gefahr des Einbruchs der Tumorzellpopulation in den allgemeinen Blutkreislauf (Lee 2002, Vieira 2004, Vieira 2005).

Die Heilungschancen des Zervixkarzinoms hängen davon ab, in welchem FIGO-Stadium die Erkrankung entdeckt wird. Die 5-Jahres-Überlebensrate des Zervixkarzinoms wird in Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4: 5-Jahres-Überlebensrate für Patientinnen mit Zervixkarzinom

FIGO-Stadium	5-Jahres-Überlebensrate
0	100%
I	80-85%
II	65-85%
III	20-30%
IV	7-12%

2. Zielsetzung und Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und klinische Validierung eines patientenindividuellen Vorhersagetestsystems bezüglich Tumorprognose und potentiell wirksamer antiangiogener Therapie.

Es wurden vier Angiogenesefaktoren untersucht. Die Konzentration dieser Faktoren wurde aus der Zervixkarzinom-Datenbank der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Charité Berlin Mitte übernommen. In dem hier verwendeten Testverfahren wirkten alle im Serum enthaltenen Angiogenesefaktoren auf humane Endothelzellen.

Es wurden folgende Fragestellungen formuliert:

1. Besteht ein Zusammenhang zwischen Tumorstadium und dem Angiogenese-Score?
2. Kann die Wirkung von Bevacizumab individuell getestet werden?
3. Besteht eine Korrelation zwischen Angiogenesefaktoren und Angiogenese-Score?
4. Wie verändert sich die Konzentration der Angiogenesefaktoren in Abhängigkeit vom Tumorstadium?
5. Inwieweit ist der Angiogenese-Score von der Tumorphistologie abhängig?
6. Hat das Alter bei Erstdiagnose Auswirkungen auf den Angiogenese-Score?
7. Wie verhält sich der Angiogenese-Score in der Prä- und Postmenopause?
8. Gibt es einen Zusammenhang zwischen Prognosefaktoren und Angiogenese-Score?

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Patientinnenkollektiv

Das Patientinnenkollektiv dieser Arbeit stellt eine Stichprobe aus der Zervixkarzinom-Datenbank der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Charité Berlin Campus Mitte dar. Diese Datenbank umfasst Patientinnen mit einem Zervixkarzinom und jene mit dessen Vorstufen.

Für die vorliegende Studie wurde das Serum dieser Patientinnen verwendet.

Die Blutentnahmen dieser Frauen fanden zwischen Oktober 2002 und Juni 2005 statt.

Serum und Plasma wurden unmittelbar nach der Blutentnahme isoliert und bei - 80 °C aufbewahrt. In die Studie wurden 81 Patientinnen mit einem Zervixkarzinom und dessen Vorstufen aufgenommen.

Im April 2005 wurde bei Patientinnen mit Rezidiv die Tube Formation bestimmt.

Mit allen 81 Proben wurde im November/ Dezember 2005 ein Endothelzellproliferations-Assay durchgeführt.

3.1.1.1 Tumorstadien

Bei 15 Patientinnen war eine CIN festgestellt worden. Nach der üblichen Einteilung kam es zu folgender Verteilung: CIN I n=1, CIN II n=4, CIN III n=10.

Unter einem manifesten Zervixkarzinom litten 51 Patientinnen. Die Stadieneinteilung erfolgte nach FIGO. FIGO I n=22, FIGO II n=13, FIGO III n=13, FIGO IV n=3.

Im Rezidiv eines Zervixkarzinoms befanden sich 15 Patientinnen.

3.1.1.2 Alter der Patientinnen

Das durchschnittliche Lebensalter der Patientinnen betrug 46,9 Jahre. Patientinnen mit einer CIN waren im Durchschnitt 36 Jahre, Patientinnen mit einem manifesten Karzinom 48,6 Jahre und solche im Rezidiv 46,3 Jahre. Das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose „Karzinom“ betrug 46,1 Jahre.

3.1.1.3 Menopausenstatus der Patientinnen

52 Patientinnen waren prämenopausal, 2 Frauen perimenopausal und 27 befanden sich in der Postmenopause.

3.1.1.4 Bestimmte ELISA-Werte

In der Zervixkarzinom-Datenbank der Frauenklinik Charité Berlin Campus Mitte waren bereits ELISA-Werte von bestimmten Angiogenesefaktoren enthalten. Diese wurden im Juli 2005 im Labor der Frauenklinik Charité Berlin Campus Mitte gemessen.

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns auf die ELISA-Werte des VEGF und bFGF sowie Endostatin und den VEGFR-1 des unter 3.1.1 beschriebenen Patientinnenkollektives beschränkt.

3.1.1.5 Histologie der Zervixkarzinome

Insgesamt waren 76,9% der Patientinnen von einem Plattenepithelkarzinom betroffen, 12,3% von einem Adenokarzinom, 6,1% von einem adenosquamösen Karzinom und bei 4,6% konnte keine Klassifikation des Zervixkarzinoms stattfinden.

3.1.1.6 Prognoseparameter der Patientinnen

Für Patientinnen mit manifestem Karzinom sowie für Patientinnen im Rezidiv wurden folgenden Prognoseparameter dokumentiert:

Lymphknotenmetastasen (n= 26), Invasion von Lymphgefäßen (n= 22), Invasion des venösen Systems (n= 6) sowie der Grad der Differenzierung des Tumors.

3.1.1.7 Einverständniserklärung

Eine Einverständniserklärung zur Aufnahme in die Datenbank wurde von jeder Patientin unterschrieben.

3.1.2 Verwendete Substanzen

Tabelle 5: Verwendete Substanzen

PBS, Dulbeccos W/O CA, MG	Firma Invitrogen Lot. Nr.3074640
Trypsin / EDTA	Invitrogen, 9101A
RPMI 1640	Invitrogen, Lot. Nr.1546
EGM-2	Cambrex, Lot. Nr.01112919
EBM-2	Cambrex, Lot. Nr.05863844
Fetales Kälberserum FCS	BioWest Lot. Nr.50505751810
Gentamycin	Invitrogen, Lot. Nr.3104688
Trypanblau	Biochrom, Lot. Nr.0533K
ATP-Lite-M	Firma Perkin Elmer Lot. Nr.69-070101
Matrigel	BD Lot.: 14212
Bevacizumab	Avastin ®
Humane Nabelschnüre	DRK Krankenhaus Luckenwalde, Abteilung für Geburtshilfe
Kollagenase Typ 4	

3.1.3 Behältnisse und Zubehör

Tabelle 6: Behältnisse und Zubehör

50 ml Cent Tube PP	Firma Nunc Lot. Nr. 050990
15 ml Cent Tube PP	Firma Sarstedt Lot. Nr. 62.554.502
Luminizenzplatte	Firma Nunc 96 Well Lot. Nr. 238108
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Firma Eppendorf Lot.Nr. 304921
Zellkulturflaschen 75 cm ² easy flask	Firma Nunc Lot. Nr. 065573
96-Well-Platte	Firma Costar Lot. Nr. 31702010
48-well-microtiterplates	Costar Lot. Nr. 3436
Pipette 100-1000 µl Research Eppendorf	Nr.: 323741
Pipette 10-100 µl Research Eppendorf	Nr.: 311799
Pipettenspitzen	Firma Eppendorf Lot. Nr. 11024
Pipettenspitzen	Firma Sarstedt Lot. Nr. 70.760.002/70.762

3.1.4 Geräte

Tabelle 7: Geräte

Multifunktionsreader Spectrafluor plus Tecan SLT	Nr.: 94606
Zentrifuge Megafuge Kendro	Nr.: 291679
Mikroskop Axiovert 25C Zeiss	Nr.: 6655556
Neubauerzählkammer	441/81
Orbitalshaker	Firma IKA ®
Brutschrank „Heracell“	Firma Kendro Serien Nr. 414438

3.2 Methoden

Der Endothelzellproliferations-Assay sowie die Tube Formation wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Heidecke in den Laboren der Firma Cell Trend GmbH durchgeführt.

3.2.1 Präparation von HUVEC

Zur Gewinnung von Endothelzellen wurden frische Nabelschnüre verwendet. Bis zur Verarbeitung innerhalb von 48 Stunden post partum wurden die Nabelschnüre in PBS (Phosphate Buffer Solution) und 1% Penicillin und Streptomycin bei 4 °C aufbewahrt.

Die humanen Nabelschnurendothelzellen (Human Umbilical Vein Endothel Cell) wurden aus der Nabelschnurvene präpariert. Dabei wurde eine Vene von beiden Seiten mit einer Knopfkanüle punktiert. Nach Fixierung der Kanülen mit Arterienklemmen wurde die Vene so lange mit PBS gespült, bis keine Blutreste mehr ausgespült wurden.

Im Anschluss wurde die Vene mit Kollagenase Typ 4 gefüllt, bis ein Austritt der Kollagenase aus der zweiten Knopfkanüle zu sehen war. Diese wurde mit einer zweiten Spritze verschlossen und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Kollagenase löst die Endothelzellen von der Gefäßwand und ermöglicht ihre Isolierung.

3.2.2 Isolierung von HUVEC

Über die Knopfkanülen wurde die Nabelschnurvene mit 30 ml PBS ausgespült. Das erhaltene Zellsediment wurde in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1400 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abpipettiert.

3.2.3 Kultivierung von HUVEC

Um eine größere Anzahl an Endothelzellen zu erhalten, wurden die isolierten Endothelzellen in eine Zellkulturflasche (25 cm²) überführt. Als Medium wurde 12 ml EGM-2 (Endothelcell Growth Medium-2) in die Zellkulturflasche gegeben. Um bakterielle Infektionen zu vermeiden, wurde das Nährmedium mit Gentamycin versetzt. Die Zellen wurden so bei 37°C und 5% CO² im Brutschrank inkubiert, bis der Boden der Zellkulturflasche über 80% mit Endothelzellen bedeckt war.

3.2.4 Endothelzellproliferations-Assay

3.2.4.1 Vorbereitung der Endothelzellen

Für den Endothelzellproliferations-Assay wurden Endothelzellen aus der 3. Passage genommen.

Die Anzahl der Passagen beschreibt, wie häufig Zellen nach ihrer Proliferation in neue Nährmedien transformiert und dabei in Ihrer Anzahl geteilt wurden, um erneut zu proliferieren. Primärkulturen bzw. Kulturen aus den ersten Passagen haben den Vorteil, dass sie noch ihre wesentlichen Wachstumseigenschaften besitzen.

Um die Endothelzellen von dem Boden der Zellkulturflasche zu lösen, wurden 3000 µl Trypsin in die Zellkulturflasche pipettiert. Sobald sich die Zellen vom Boden lösten, wurden, um den Lyseprozess aufzuhalten, 3000 µl fetales Kälberserum (FCS) in die Zellkulturflasche pipettiert. Um die Zellen vom Trypsin und vom FCS zu befreien, wurden sie bei 1400 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Abpipettieren des Überstandes wurden die Zellen mit PBS verdünnt.

3.2.4.2 Quantifizierung von Endothelzellen

Zur Ermittlung der genauen Zellzahl wurde die Zellsuspension mit 0,5 % Trypan-Blau-Lösung versetzt. Mit einer Pipette wurden 100µl der angefärbten Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit PBS verdünnt. In der Neubauerzählkammer wurden unter einem Mikroskop die Anzahl der vitalen Zellen in einem definierten Volumen bestimmt. Hierbei wurden nur die nicht gefärbten Zellen gezählt, bei vitalen Zellen kann Trypan-Blau nicht die Zellwand durchdringen, dies macht eine Differenzierung zu avitalen Zellen möglich. Im Anschluss wurde die Zellsuspension so weit mit PBS verdünnt, dass sich in 100µl Suspension 2000 Endothelzellen befanden.

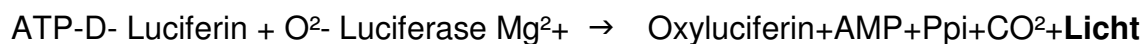
3.2.4.3 Aussaat der Endothelzellen

Es wurden 100µl der Zellsuspension auf einer 96 Well Platte ausgesät. Als Nährmedium wurden 80µl RPMI (Roswell Park Memorial Institute) hinzu gegeben. Zur funktionellen Bestimmung der Angiogeneseaktivität im Serum der Zervixkarzinompatientinnen wurden 20µl Patientenserum mit dem Nährmedium und Gentamycin auf die ausgesäten Zellen pipettiert. In der Positivkontrolle wurde anstatt des Patientinnen- Serums 10µl EGM-2 verwendet. In der Versuchsreihe der Negativkontrolle wurde als Nährmedium 80µl EBM -2 (Endothelcell Basal Medium-2) verwendet und 10µl FCS als Wachstumsfaktorenträger. Die Inkubation der Platten fand bei 37°C für 72 Stunden im Inkubator statt. Für jede Patientin wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

3.2.4.4 Bestimmung des Angiogenese-Scores durch ATP-Messung

Um den Angiogenese-Score (entspricht der Endothelzellproliferationsrate) zu bestimmen, wurde mit dem ATP-Lite-M-Kit die intrazelluläre ATP-Menge gemessen. Adenosin-Tri-Phosphat ist in allen vitalen Zellen vorhanden. Geht eine Zelle zu Grunde, so degradiert ATP sehr schnell und ist nicht mehr nachweisbar. Reagiert ATP mit Luciferase und D-Luciferin, so wird Licht produziert, das mit einem Luminometer gemessen werden kann und proportional der ATP Konzentration ist.

Der Reaktionsablauf kann wie folgt beschrieben werden:



Die Zellen wurden zunächst mit Mammalien Cell Lysin Solution (ATP-Lite-M-Kit) vermischt und für 5 Minuten auf den Orbitalshaker gestellt. In diesem Prozess wurde ihre Zellmembran zerstört und das ATP freigesetzt.

Im weiteren Schritt wurde dem Substrat lyophilized Substrate Solution (ATP-Lite-M-Kit) zugefügt und für 10 Minuten dunkel gestellt. Im Anschluss konnten unter dem Multifunktionsreader Spectraflour plus Tecan SLT die ATP-Werte gemessen werden. Als Messsignal wurden Chemilumineszenzunits erhalten. Diese konnten mittels einer Eichkurve in die Zahl viabler Zellen transformiert werden (siehe Abbildung 2). Zur Ermittlung der Proliferation der Testsubstanz wurde die unbehandelte Kontrolle als 100% definiert.

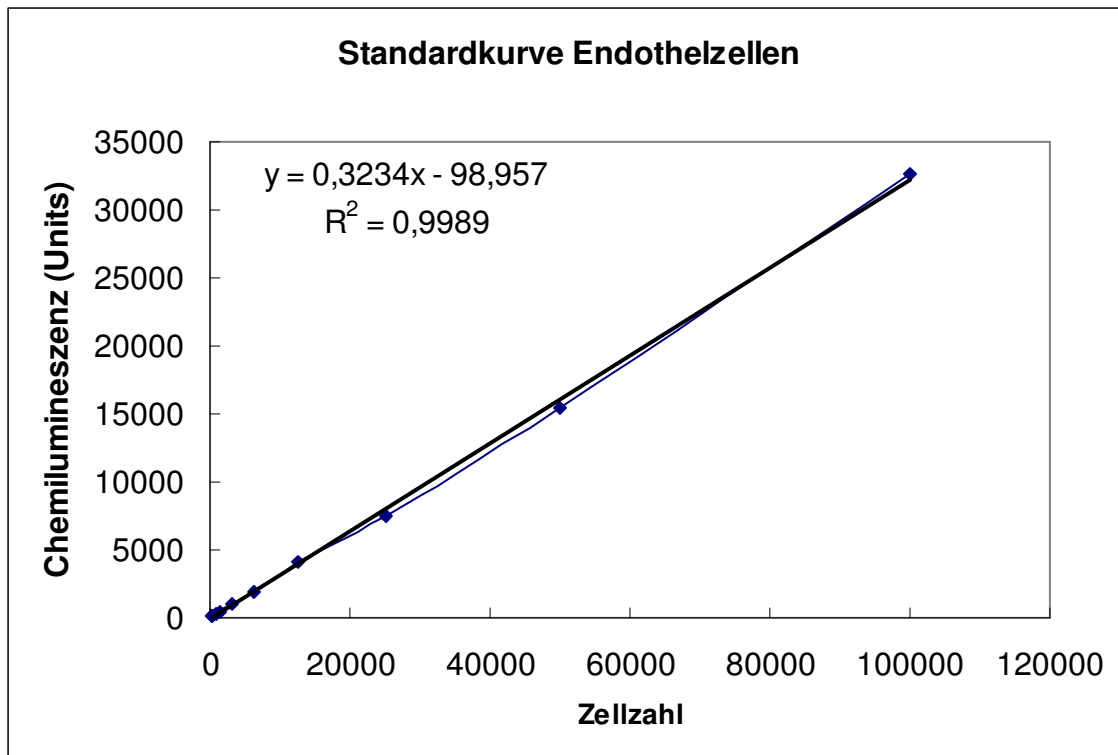


Abbildung 2: Standardkurve Endothelzellen

Die Abbildung zeigt die Linearität zwischen der Zahl der viablen Zellen und dem Chemilumineszenzsignal. Der Korrelationskoeffizient beträgt $r^2 = 0.9989$.

3.2.5 Tube Formation

3.2.5.1 Vorbereitung des Mediums

Zur Vorbereitung der mit Matrigel beschichteten 48-Well-Platte mussten die Platte, das Matrigel und die Pipettenspitze einen Tag vor Versuchsbeginn bei 4°C im Kühlschrank gekühlt werden. Matrigel ist nur bei 4°C flüssig und somit verarbeitbar. Das Matrigel wurde dann auf die 48-Well-Platte pipettiert und bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis es eine feste Konsistenz gebildet hatte.

3.2.5.2 Quantifizierungen von Endothelzellen

Analog zu dem unter 3.2.4.2. beschriebenen Vorgehen mit der Neubauerzählkammer wurden 30.000 Endothelzellen aus der ersten Passage bestimmt und auf 100µl mit PBS verdünnt.

3.2.5.3 Aussaat der Endothelzellen

Die Endothelzellen wurden mit 80µl EBM-2 und 20µl Patientenserum aus dem Kollektiv der Patientinnen im Rezidiv auf die 48-Well-Platte ausgesät. Zu den Zellen in der Positivkontrolle wurde 100µl EGM-2 zugefügt. Die Negativkontrolle erhielt als Nährmedium 80µl EBM-2 und 20 µl FCS. Dieser Test wurde doppelt angesetzt. In einer Versuchsreihe wurde in alle Platten Bevacizumab als Angiogeneseinhibitor hinzugefügt. Um bakterielle Infektionen zu vermeiden, wurden die verwendeten Nährmedien mit Gentamycin versetzt.

Die Platten wurden bei 37°C für 18 Stunden inkubiert.

3.2.5.4 Bestimmung der Tubelänge

Die Länge der neu gebildeten Tubes in der 48-Well-Mikrotiterplatte wurde mit Hilfe eines Mikroskops bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit einer Tube Formation-bestimmungs-Software.

3.3 Statistische Auswertung

3.3.1 Korrelationskoeffizient nach Spearman

Für nicht normal verteilte intervallskalierte Variablen wird der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Er stellt ein Maß für die Stärke eines monotonen Zusammenhanges dar.

Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten wurde für die Zusammenhänge zwischen dem Angiogenese-Score und ausgewählter Angiogenesefaktoren, für alle Krankheitsstadien sowie für das Alter bei Erstdiagnose berechnet. Des Weiteren erfolgte die Berechnung des Korrelationskoeffizienten für den Angiogenese-Score und die Tube Formation.

3.3.2 Mann-Whitney-U-Test

Der U-Test nach Mann und Whitney kann im Fall von zwei unabhängigen Stichproben verwendet werden. Der Test prüft Lageunterschiede zwischen den beiden Populationen und setzt allgemein ordinalskalierte Merkmale voraus.

Der Test wurde für den Vergleich zwischen je zwei Krankheitsstadien bezüglich des Angiogenese-Scores sowie der Angiogenesefaktoren angewendet.

Auch bei dem Vergleich der histologischen Differenzierungen kam der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz, ebenso bei der Untersuchung, ob ein Zusammenhang zwischen

dem Menopausenstatus und dem Angiogenese-Score beziehungsweise der Angiogenesefaktoren besteht.

Außerdem wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test geprüft, wie sich eine Infiltration von Lymphgefäßen, Lymphknoten und Venen sowie die Tumordifferenzierung (Grading) in Bezug auf die Endothelzellproliferation auswirkten.

3.3.3 Kruskal-Wallis-Test

Der Test nach Kruskal-Wallis ist eine Ausweitung des U-Tests von Mann und Whitney bei einem Vorliegen von mehr als zwei unabhängigen Stichproben. Er basiert auf einer gemeinsamen Rangreihe der Werte aller Stichproben.

Der Kruskal-Wallis-Test wurde für den Vergleich der drei Gruppen (CIN, FIGO, Rezidiv) bezüglich des Angiogenese-Scores sowie der ausgewählten Angiogenesefaktoren verwendet.

3.3.4 Wilcoxon-Test

Der Wilcoxon-Test ist ein gebräuchlicher Test zum nicht parametrischen Vergleich von zwei abhängigen Stichproben.

Der Test wurde in der vorliegenden Arbeit für den Vergleich der Tube Formation mit und ohne Bevacizumab eingesetzt.

4. Ergebnisse

Die zentrale Frage dieses Projektes war, wie sich isolierte Endothelzellen hinsichtlich ihrer Proliferation unter dem Serum von Patientinnen mit CIN, Karzinom und Rezidiv verhalten.

Um eine ausreichende Menge an Endothelzellen zu erhalten, mussten diese zunächst präpariert und kultiviert werden (siehe Methoden ab 3.2.2).

Im Endothelzellproliferations-Assay wurden zunächst in einer Positivkontrolle die Zellen auf ihre Proliferationsfähigkeit hin überprüft. Hierzu wurden sie mit EGM-2 versetzt. In der unbehandelten Kontrolle (Negativkontrolle) wurde anstatt von EGM-2 fetales Kälberserum verwendet.

Nach Bestätigung der proliferativen Fähigkeit konnte die Versuchsreihe mit dem Serum der Patientinnen durchgeführt werden.

In Tabelle 8 werden die Ergebnisse angegeben. Der Angiogenese-Score entspricht der Endothelzellproliferationsrate.

Die Positivkontrolle entspricht 100% Proliferation, die Negativkontrolle entspricht 0%.

Die Endothelzellproliferationsrate unter Einfluss der verschiedenen Patientenseren wird relativ dazu in %-Werten angegeben.

Tabelle 8: Tumorstadium und Angiogenese-Score

Tumor-Stadium	Anzahl der Patientinnen	Angiogenese-Score %
CIN I	1	24,0
CIN II	4	22,3
CIN III	10	34,4
FIGO I	22	17,0
FIGO II	13	14,2
FIGO III	13	16,6
FIGO IV	3	9,7
Rezidiv	15	33,3

In der Tabelle sind die Patientinnenkollektive, unterteilt nach ihren Tumorstadien, dargestellt. Dabei werden unter dem Angiogenese-Score die Werte des Endothelzellproliferations-Assays in % gezeigt.

4.1 Tumorstadium und Angiogenese-Score

Im ersten Schritt wurde nun geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen dem Stadium des Tumors und dem Angiogenese-Score besteht. Hierzu wurde zunächst unterschieden zwischen Präkanzerosen, manifestem Karzinom sowie bereits eingetretenem Rezidiv (siehe Abbildung 3). Um die drei unverbundenen Gruppen hinsichtlich signifikanter Unterschiede bezüglich des Angiogenese-Scores zu untersuchen, wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

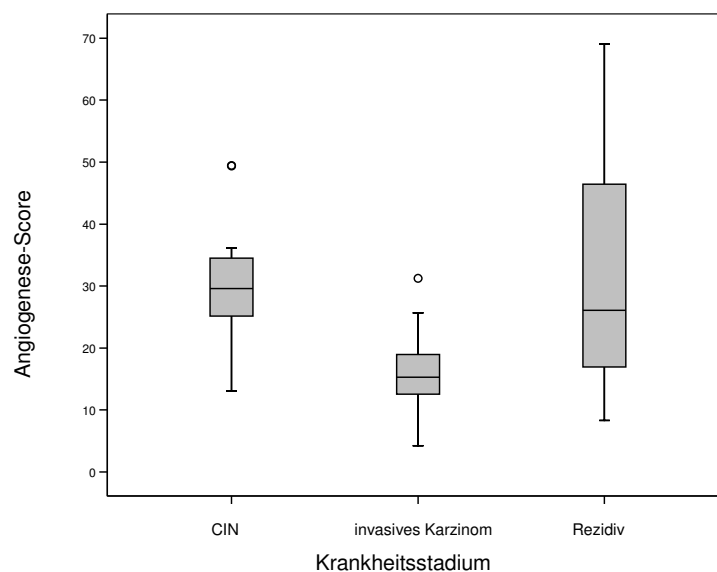


Abbildung 3: Angiogenese-Score in % in Abhängigkeit vom Tumorstadium.

In allen Vorstadien des Zervixkarzinoms (CIN I – CIN III) wurden hohe Werte des Angiogenese-Scores gemessen. In der Gruppe der Patientinnen mit manifestem Karzinom wurde eine relativ niedrige und konstante Vermehrung der Zellen gefunden. Dies betraf alle vier FIGO-Stadien des Zervixkarzinoms gleichermaßen.

Bei Patientinnen mit Rezidiv nach Zervixkarzinom konnte ein deutlicher Anstieg des Angiogenese-Scores festgestellt werden. Diese Werte lagen signifikant über den Werten der Patientinnen mit manifestem Karzinom. Der Kruskal-Wallis p-Wert lag bei $< 0,05$ für die Verbindung zwischen dem Angiogenese-Score und den drei Gruppen CIN, Karzinom,

Rezidiv. Somit konnten statistisch signifikante Unterschiede bezüglich des proliferativen Verhaltens nachgewiesen werden.

Die Boxplots in Abbildung 3 zeigen den signifikanten Unterschied bezüglich des Angiogenese-Scores für CIN, Karzinome und Rezidiv.

Im Weiteren wurde untersucht, ob sich die Proliferationsrate der Endothelzellen in den Krankheitsstadien unterscheidet. Präkanzerosen vermittelten ähnlich proliferative Signale wie rezidierte Karzinome. Im Endothelzellproliferations-Assay zeigten sie ein ähnliches Verhalten (p-Wert nach Man-Whitney-U-Test 0,683). So grenzten sich die Patientinnen mit Präkanzerose, bzw. mit Rezidiv, deutlich ab ($p < 0,05$) von Patientinnen mit manifestem Karzinom (FIGO I-IV).

Eine weitere Unterteilung der Krankheitsstadien in die FIGO Klassifikation zeigte bezüglich des Angiogenese-Scores im Mann-Whitney-U-Test keine signifikanten Unterschiede. Hierbei wurden die FIGO-Stadien FIGO III und FIGO IV aufgrund einer geringen Patientinnenzahl im Kollektiv FIGO IV ($n=3$) zu einer Gruppe zusammengefasst.

4.1.1 Rezidiv

Auffällig war ein deutlich erhöhter Angiogenese-Score bei Patientinnen mit einem Rezidiv im Vergleich zu Frauen mit einem manifesten Karzinom. So hatte das Patientinnenkollektiv mit der schlechtesten Prognose die höchste proliferative Endothelzell-Aktivität. Es bestand ein signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-U-Test zwischen Frauen mit Rezidiv und jenen mit einem nach FIGO I klassifizierten Tumor ($p=0,004$). Bei Frauen mit einem nach FIGO II klassifizierten Zervixkarzinom wurde ein noch größerer Unterschied ($p= 0,003$) gezeigt. FIGO III und FIGO IV hatten eine etwas schwächere Differenz des Angiogenese-Scores mit $p= 0,005$ gegenüber dem Rezidiv. Um den Angiogenese-Score bei Patientinnen im Rezidiv noch genauer zu betrachten, schien die Aufteilung nach Höhe des Angiogenese-Scores in zwei Gruppen trotz geringer Fallzahl möglich. So verhielt sich der eine Teil ($n=10$) bezüglich des Angiogenese-Scores ähnlich wie die Patientinnen der FIGO-Stadien. Der andere Teil ($n=5$) zeigte deutlich höhere Werte als alle anderen Krankheitsstadien (siehe Abbildung 4).

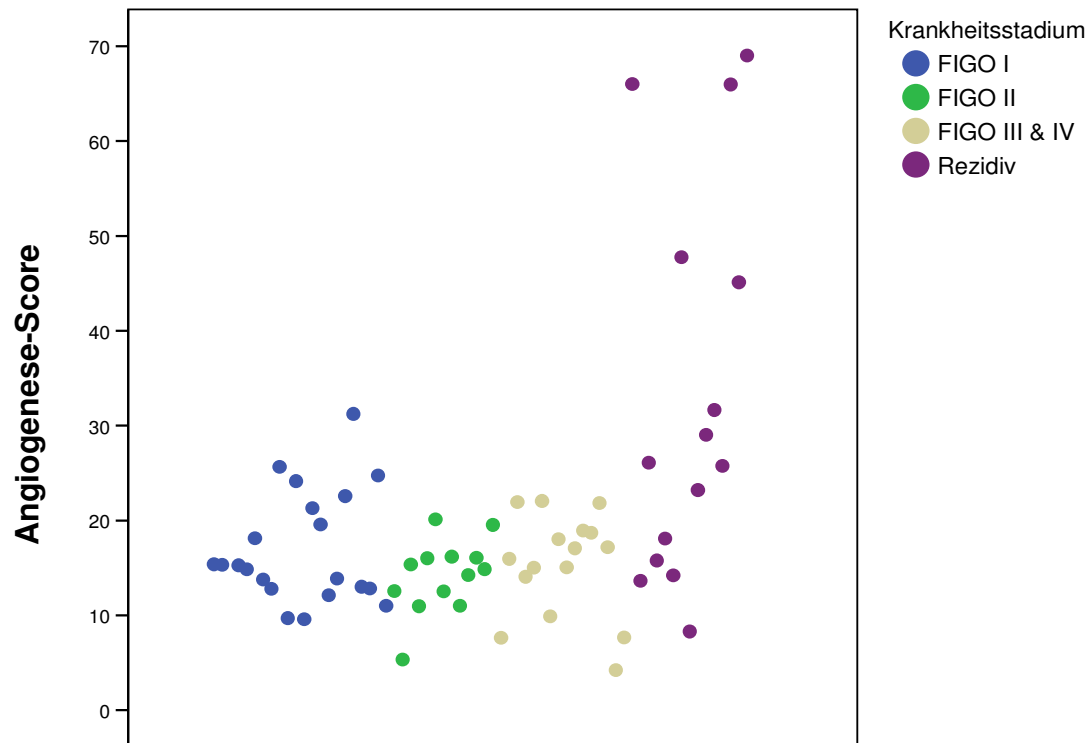


Abbildung 4: Verteilung des Angiogenese-Scores auf die Krankheitsstadien der Patienten

Die Abbildung zeigt die Verteilung der Patienten bezüglich ihres proliferativen Verhaltens. Anhand der farblichen Differenzierung ist eine Zuordnung zu den Krankheitsstadien möglich, wobei der einzelne Patient durch jeweils einen Punkt repräsentiert wird.

4.2 Tube Formation

Patientinnen im Rezidiv haben bekanntlich die schlechteste Prognose.

Um den zu erwartenden Krankheitsverlauf dieses Kollektivs genauer beschreiben zu können, sind weitere Informationen über Prognoseparameter wünschenswert. So auch das Wissen um ein mögliches Ansprechen auf eine antiangiogene Therapie.

Hierzu sollte der bestimmte funktionelle Angiogenese-Score mit einem differenzierteren bildlichen Verfahren untermauert werden. Für die Objektivierung der proangiogenetischen Aktivität des Serums von Rezidivpatientinnen wurde eine Tube Formation angesetzt. Insgesamt wurden zwei Versuchsreihen mit Endothelzellen aus der 1. Passage durchgeführt.

Die erste dieser Versuchsreihen wurde zusätzlich mit 10 % des VEGF-Antagonisten Bevacizumab versehen, die zweite wurde ohne einen weiteren Zusatz von Medikamenten durchgeführt.

In jeder Versuchsreihe wurde eine Negativkontrolle mit FCS und EBM-2 durchgeführt sowie eine Positivkontrolle mit EGM-2.

Nach 18 Stunden Inkubation hatten sich in der 48-Well-Platte die Endothelzellen organisiert und zu dem Ansatz eines Kapillargefäßbettssystems verbunden (Tube Formation). Die Länge der neu entstandenen Gefäßstrukturen konnte unter einem Mikroskop bestimmt und als relative Units (Pixel) berechnet werden.

Im Ergebnis wurden in der Versuchsreihe mit Bevacizumab mehr Tubes gebildet als in der Versuchsreihe ohne Bevacizumab.

Das Ergebnis der zwei Versuchsreihen der Tube Formation widersprach den Erwartungen.

Der Wilcoxon-Test konnte zwischen den beiden Versuchsreihen keinen signifikanten Unterschied zwischen der Testung mit Bevacizumab und der ohne Bevacizumab angeben ($p= 0,542$) (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Tubelänge mit und ohne Bevacizumab

Patientinnen im Rezidiv	Tubelänge in Units; ohne Bevacizumab	Tubelänge in Units; mit 10% Bevacizumab
1	19711	35346
2	31203	28603
3	45364	32528
4	31944	32108
5	40368	29642
6	34067	33644
7	23784	28167
8	32737	37180
9	45101	35372
10	28264	25742
11	22428	26035
12	25783	33837
13	22326	15530
14	41816	27029
Negativkontrolle mit 10% FCS	28236	14873
Positivkontrolle mit EGM-2	17709	11548

Die Tabelle zeigt die in der Tube Formation gemessenen Tubelängen in Units.

Die folgenden Abbildungen veranschaulichen die beschriebenen Ergebnisse. Sie zeigen die Tube Formation unter einem Mikroskop (Abbildung 5-7).

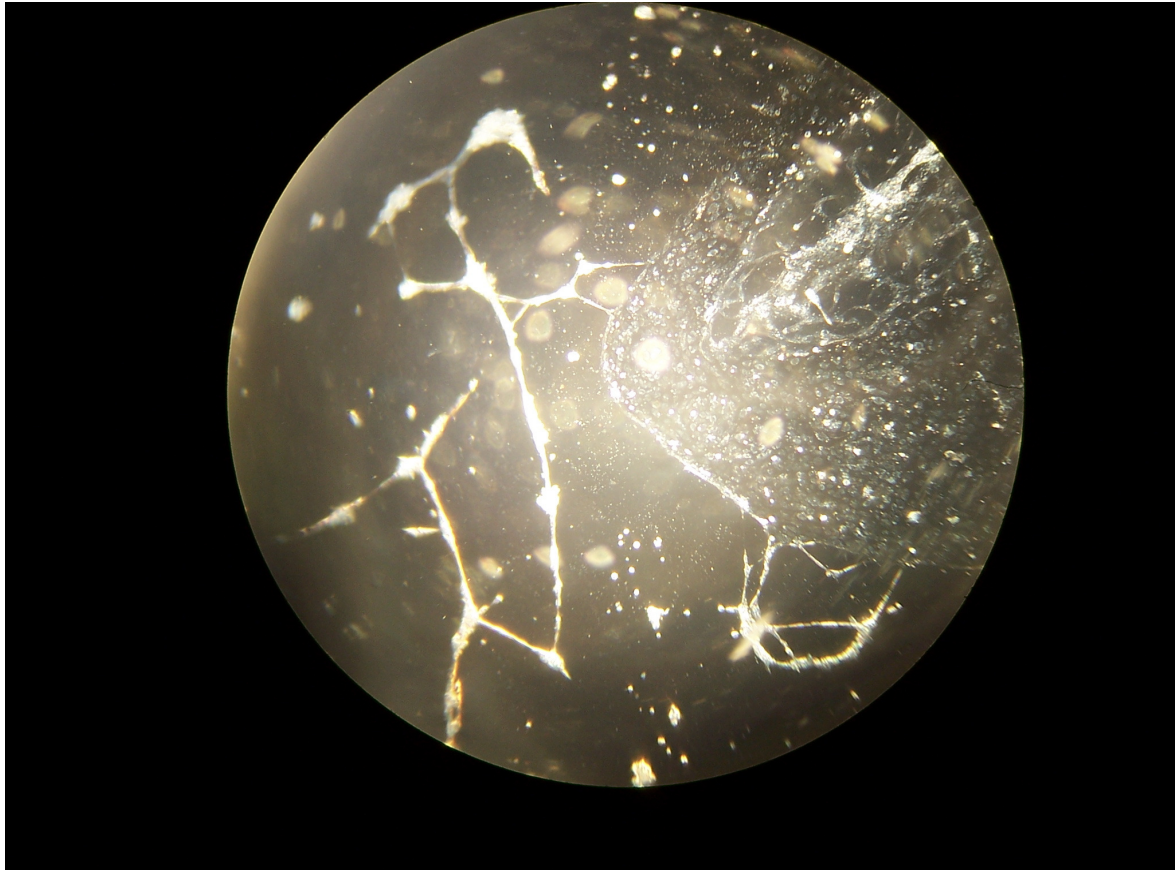


Abbildung 5: Tube Formation: Positivkontrolle

Die Abbildung zeigt die Positivkontrolle und ihre Organisation von Endothelzellen innerhalb von 18 Stunden mit EGM-2 bei 37 °C.

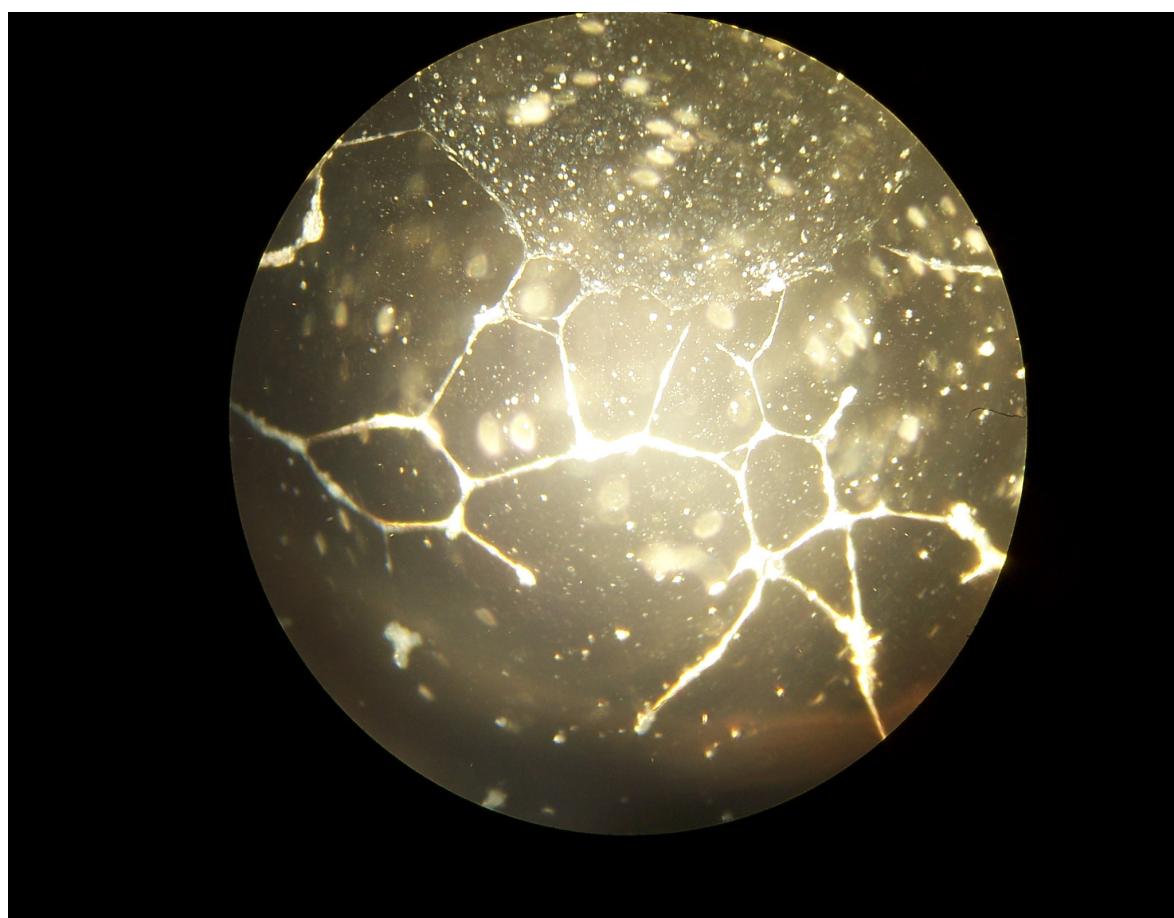


Abbildung 6: Tube Formation: Negativkontrolle

Die Abbildung zeigt die Organisation der Endothelzellen nach 18 Stunden des Assay Ansatzes. Die Negativkontrolle wurde mit EBM-2 und FCS angesetzt.

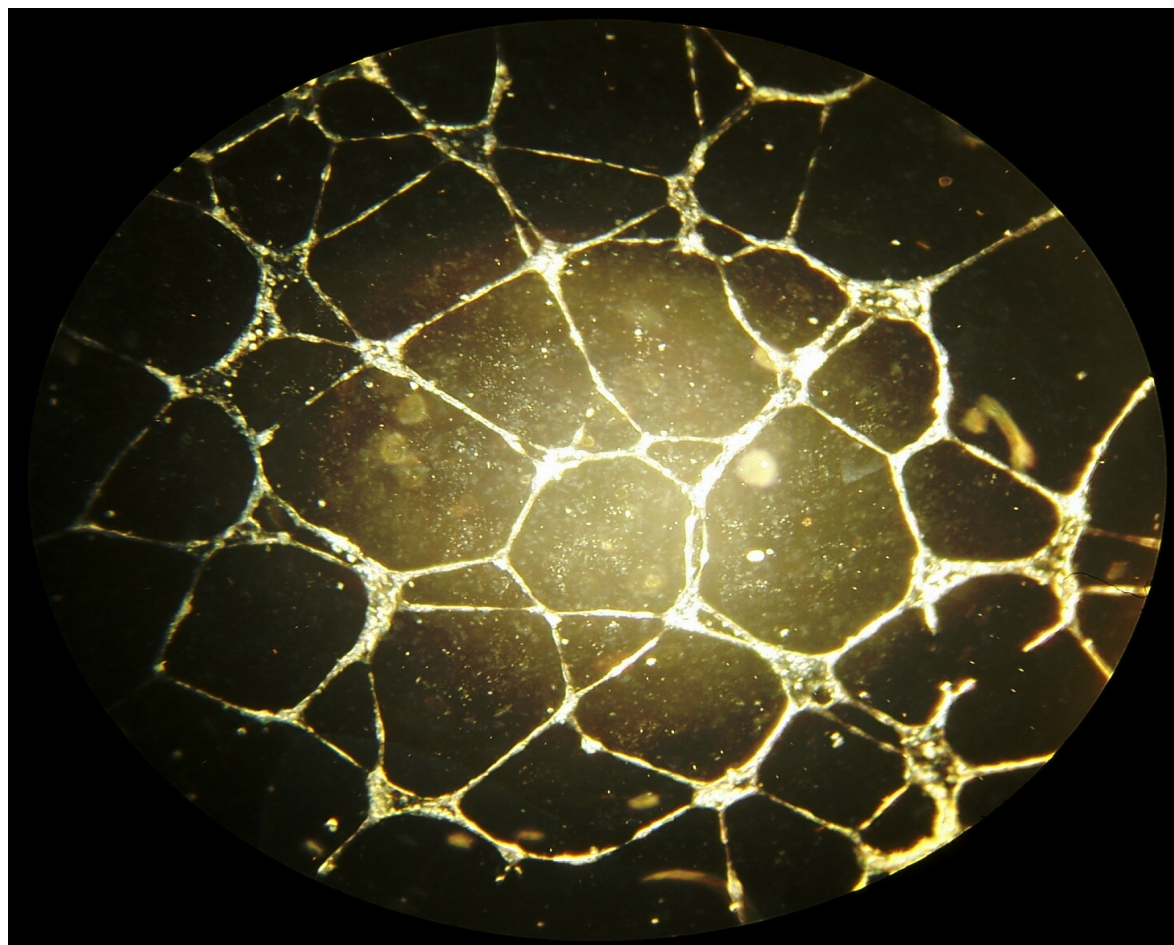


Abbildung 7: Tube Formation: Patientenserum

Die Abbildung zeigt die Organisation der Endothelzellen hin zu einem Gefäßnetz. Als Wachstumsfaktoren fungierten alle vorhandenen pro- und antiangiogenen Faktoren aus dem Serum einer Zervixkarzinompatientin mit Rezidiv.

4.2.1 Tube Formation und Angiogenese-Score

Im statistischen Vergleich zwischen den gemessenen Tubelängen von Patientinnen mit Rezidiv und dem Angiogenese-Score dieser Patientinnen konnte mit dem Korrelationskoeffizienten nach Spearman keine Wechselbeziehung gezeigt werden (siehe Tabelle 10).

Ein geringer statistisch unrelevanter Zusammenhang konnte lediglich zwischen dem Angiogenese-Score und der Testung mit 10% Bevacizumab ($r=0,490$) errechnet werden. Die Versuchsreihe, die unbeeinflusst von Medikamenten war, zeigte gar keinen Zusammenhang zum Angiogenese-Score ($r=0,235$).

Tabelle 10: Tubelänge und Angiogenese-Score

Patientinnen im Rezidiv	Tubelänge in Units ohne Bevacizumab	Tubelänge in Units; mit 10% Bevacizumab	Angiogenese-Score
1	19711	35346	13,6
2	31203	28603	26,1
3	45364	32528	15,8
4	31944	32108	18,1
5	40368	29642	14,2
6	34067	33644	8,3
7	23784	28167	29,0
8	32737	37180	31,6
9	45101	35372	25,8
10	28264	25742	47,7
11	22428	26035	66,0
12	25783	33837	66,0
13	22326	15530	45,1
14	41816	27029	69,0
Negativkontrolle mit 10% FCS	28236	14873	
Positivkontrolle mit EGM-2	17709	11548	

Die Tabelle zeigt die gemessenen Units der Tube Formation sowie den Angiogenese-Score der Patientinnen im Rezidiv.

4.3 Angiogenesefaktoren und Angiogenese-Score

In vivo besteht im gesunden Organismus ein ständiges Gleichgewicht zwischen den Pro- und Antiangiogenese-Faktoren. Sobald es zur Vergrößerung oder Neuentstehung von Gewebe kommt, führt dies zu einem Ungleichgewicht der Angiogenesefaktoren, es wirken alle vorhanden Faktoren auf die neu entstehenden Gefäße.

Um diese komplexe Auswirkung zu untersuchen, wurden die oben genannten Assays durchgeführt. Da diese mit hohem Aufwand und Kosten verbunden waren, war es interessant zu schauen, ob ein Zusammenhang mit bestimmten selektiv und quantitativ bestimmten Angiogenesefaktoren im Serum und Plasma bestand. Hierzu wurden aus der Zervixkarzinom-Datenbank der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Charité Berlin Campus Mitte die Mittelwerte der ELISA-Werte von ausgesuchten Angiogenesefaktoren, VEGF, bFGF, Endostatin und VEGF-R1 berechnet (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Mittelwerte der Angiogenesefaktoren und des Angiogenese-Scores von Zervixkarzinompatientinnen (n=81)

Krankheitsstadium	VEGF [pg/ml] (Plasma)	bFGF [pg/ml] (Serum)	Endostatin [ng/ml] (Serum)	VEGF-R1 [pg/ml] (Serum)	Angiogenese-Score [%]
CIN I & II	29,3	3,6	107,0	87,0	22,6
CIN III	32,7	4,9	97,6	81,7	34,4
FIGO I	86,2	3,9	98,9	88,3	17,0
FIGO II	142,3	6,9	108,3	79,1	14,2
FIGO III	129,5	6,8	116,5	87,0	16,6
FIGO IV	345,5	3,3	245,0	81,4	9,7
Rezidiv	210,9	12,4	167,6	73,5	33,3

Die Tabelle zeigt das Tumorstadium, in dem sich die Patientinnen zum Blutentnahmezeitpunkt befanden. Für die Proangiogenese-Faktoren (VEGF und bFGF) sowie für die Antiangiogenese-Faktoren (Endostatin und VEGF-R1) wurde der Median aus den jeweiligen Patientinnenkollektiven berechnet.

Um herauszufinden, ob ein objektiver Zusammenhang zwischen dem Angiogenese-Score und der Konzentration der Angiogenesefaktoren im Bezug auf die Krankheitsstadien bestand, wurde jeweils der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet.

Bei Patientinnen mit einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie konnte eine schwache Korrelation zwischen dem Angiogenese-Score und der Endostatinserumkonzentration mit einem Korrelationskoeffizient von $r=0.554$ berechnet werden. Es bestand auch ein schwacher Zusammenhang zwischen der bFGF-Serumkonzentration und dem Angiogenese-Score in dieser Gruppe mit einem Korrelationskoeffizient von $r=0.545$. Für alle anderen Krankheitsstadien gab es keine Korrelation zwischen den vier Angiogenesefaktoren und dem Angiogenese-Score.

4.3.1 Tumorstadium und VEGF-Konzentration

Es war zu beobachten, dass die VEGF-Plasmakonzentration mit zunehmendem Tumorstadium anstieg. Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Patientinnen mit Präkanzerose, jenen mit manifestem Karzinom und denen im Rezidiv bezüglich des VEGF ($p < 0,05$) gezeigt werden (siehe Abbildung 8).

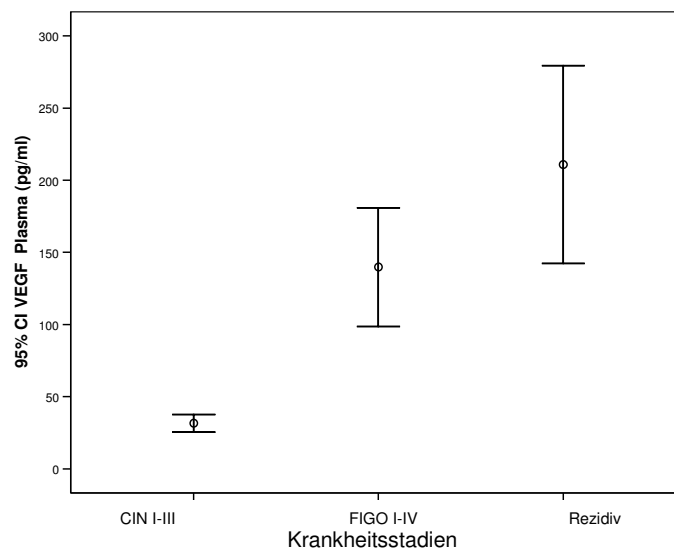


Abbildung 8: Tumorstadium und VEGF-Konzentration

Die Abbildung zeigt den Anstieg der VEGF-Plasmakonzentration von Patientinnen mit Präkanzerose, manifestem Karzinom und Rezidiv.

Um zu untersuchen, zwischen welchen Krankheitsstadien ein Unterschied auftrat, wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Er zeigte, dass die VEGF-Plasmakonzentration sich in allen drei Krankheitsstadien signifikant unterscheidet.

Die VEGF-Plasmakonzentration stieg ausgehend von den Werten bei Patientinnen mit Präkanzerose (Median 30,1 pg/ml) auf ein Vielfaches bei Patientinnen mit Rezidiv (Median 210,9 pg/ml).

4.3.2 Tumorstadium und bFGF-Konzentration

Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen CIN, FIGO und Rezidiv bzgl. der bFGF-Serumkonzentration (p-Wert des Kruskal-Wallis-Test 0.081). Der vergleichsweise hohe bFGF Mittelwert im Rezidiv (siehe Tabelle 11) kam durch einen Ausreißer zustande.

4.3.3 Tumorstadium und Endostatinkonzentration

Für die Werte der Serumkonzentration von Endostatin wurden die gleichen statistischen Tests verwendet wie für die VEGF-Plasmawerte.

Endostatin ist ein starker Angiogeneseinhibitor. Entsprechend war sein Konzentrationsverhalten im Serum der verschiedenen Tumorstadien von Interesse. Im Kruskal-Wallis-Test konnte ein signifikanter Anstieg der Serumkonzentration von Patientinnen mit Präkanzerose bis zum Rezidiv mit einem p-Wert $<0,05$ berechnet werden (siehe Abbildung 9).

Der Anstieg der Endostatinkonzentration zwischen CIN und invasivem Karzinom war nicht signifikant (p-Wert des Mann-Whitney-U-Tests 0,289). Patientinnen mit Rezidiv zeigten eine signifikante Zunahme der Endostatinserumkonzentration gegenüber CIN und invasivem Karzinom ($p < 0,05$).

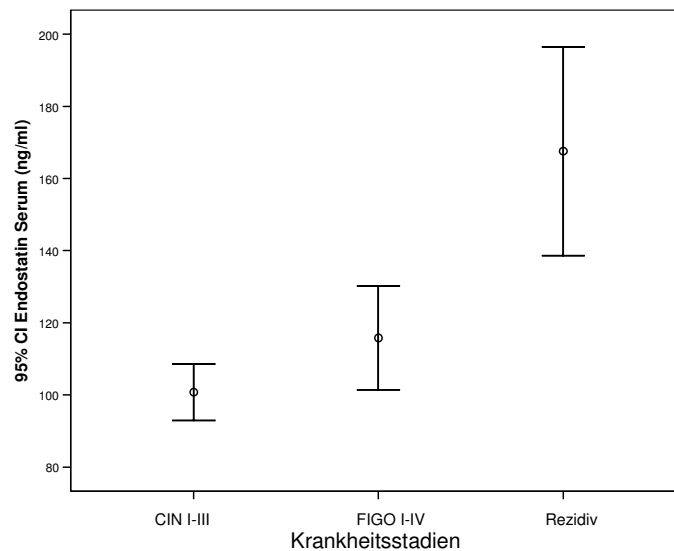


Abbildung 9: Tumorstadium und Endostatinkonzentration

Die Abbildung zeigt den Anstieg der Endostatinserumkonzentration von Patientinnen mit Präkanzerose, mit manifestem Karzinom und mit Rezidiv.

4.3.4 Tumorstadium und VEGFR-1-Konzentration

Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen CIN, FIGO und Rezidiv bzgl. VEGFR-1-Serumkonzentration (p-Wert des Kruskal-Wallis-Tests 0,152).

4.4 Tumorhistologie und Angiogenese-Score

Die untersuchten Zervixkarzinome konnten in vier histologisch verschiedene Gruppen unterteilt werden.

Plattenepithelkarzinome wiesen die größte Häufigkeit auf (n=50).

Die Werte des Angiogenese-Scores bei diesen Patientinnen wurde mit dem Angiogenese-Score von Patientinnen mit einem Adenokarzinom (n=8) verglichen. Im Mann-Whitney-U-Test konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,778$). Ebenfalls gab es auch keinen signifikanten Unterschied ($p=0,432$) zwischen dem Angiogenese-Score bei Patientinnen mit einem Plattenepithelkarzinom und denen mit einem adenosquamösen Karzinom (n=5).

Schließlich wurde noch der Angiogenese-Score des Adenokarzinoms dem des adenosquamösen Karzinoms gegenübergestellt. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Endothelzellproliferation gesehen werden ($p=0,524$).

4.5 Alter bei Erstdiagnose, Angiogenese-Score und Angiogenesefaktoren

Um beurteilen zu können, ob das Alter der Patientinnen im Zusammenhang mit der Prognose bzw. den Prognoseparametern stand, wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. So konnte gezeigt werden, dass zwischen dem Alter bei Erstdiagnose und dem Angiogenese-Score keine Korrelation bestand ($r=0,147$).

Auch zwischen dem Alter bei Erstdiagnose und der Konzentration der vier Angiogenesefaktoren bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Alter bei Erstdiagnose und Angiogenesefaktoren

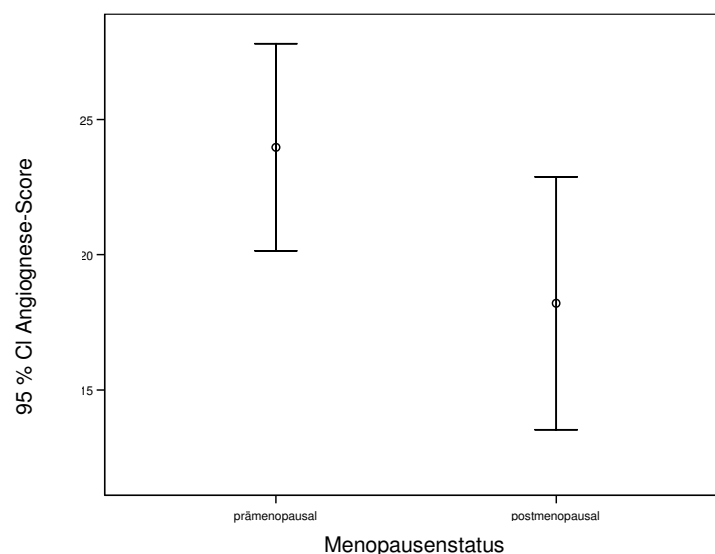
	VEGF Plasma [pg/ml]	bFGF Serum [pg/ml]	Endostatin Serum [ng/ml]	VEGFR-1 Serum [pg/ml]
Korrelationskoeffizient (Alter bei Erstdiagnose)	0,145	0,047	0,199	-0,173

Die Tabelle zeigt die Korrelationskoeffiziente nach Spearman zwischen dem Alter bei Erstdiagnose und der Konzentration der Angiogenesefaktoren.

4.6 Angiogenese-Score und Menopausenstatus

Es konnte ein Unterschied zwischen den prämenopausalen (n= 52), perimenopausalen und postmenopausalen (n=29) Patientinnen bezüglich des Angiogenese-Score gezeigt werden (siehe Abbildung 10).

Patientinnen vor der Menopause wiesen statistisch signifikant höhere Angiogenese-Scorewerte auf als postmenopausale Patientinnen (Mann-Whitney-U p-Wert 0,018).

**Abbildung 10:** Angiogenese-Score und Menopausenstatus

Die Abbildung zeigt einen deutlich höheren Angiogenese-Score bei prämenopausalen Frauen gegenüber den postmenopausalen Frauen.

4.7 Angiogenesefaktoren und Menopausenstatus

4.7.1 VEGF und Menopausenstatus

Für VEGF wurden bei prämenopausalen Patientinnen deutlich niedrigere Werte gemessen, als bei den peri- und postmenopausalen Frauen:

Der Unterschied erreichte eine Signifikanz von $p=0,039$ (siehe Abbildung 11).

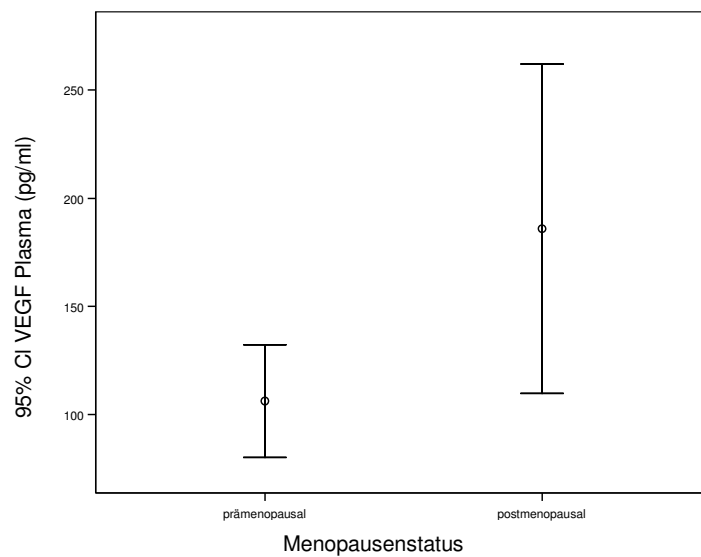


Abbildung 11: VEGF-Konzentration und Menopausenstatus

Die Abbildung zeigt die Beziehung zwischen der VEGF-Plasmakonzentration und dem Menopausenstatus.

4.7.2 bFGF und Menopausenstatus

Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den prämenopausalen und den postmenopausalen Patientinnen bezüglich des bFGF-Serumwertes (p-Wert des Mann-Whitney-U-Tests 0,515).

4.7.3 Endostatin und Menopausenstatus

Für Endostatin wurden bei den Patientinnen in der Prämenopause statistisch signifikant niedrigere Werte gemessen als bei peri- und postmenopausalen Frauen ($p=0,025$) (siehe Abbildung 12).

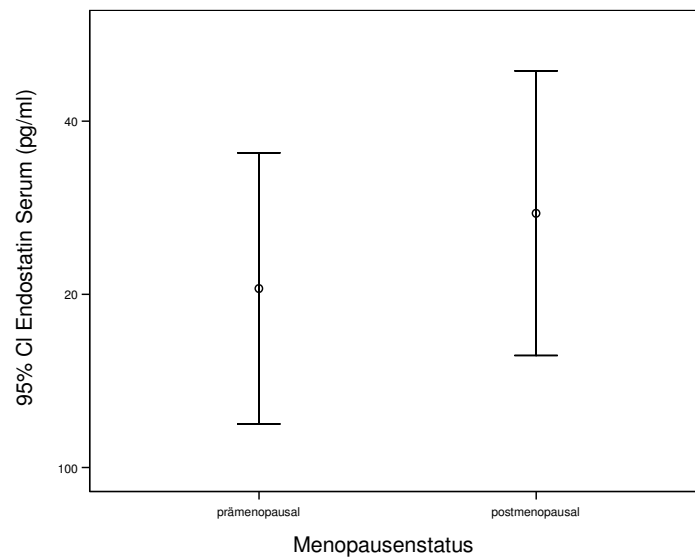


Abbildung 12: Endostatinkonzentration und Menopausenstatus

Die Abbildung zeigt den Anstieg von Endostatin bei postmenopausalen Frauen.

4.7.4 VEGFR-1 und Menopausenstatus

Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den prämenopausalen und den postmenopausalen Patientinnen bezüglich VEGFR-1 (p -Wert des Mann-Whitney-U-Tests 0,052).

4.8 Prognosefaktoren und Angiogenese-Score

Im Vergleich der beiden Gruppen – Patientinnen mit und ohne Lymphknotenmetastasen – konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des Angiogenese-Scores nachgewiesen werden (p-Wert des Mann-Whitney-U-Tests 0,644).

Ebenfalls ergab sich in den beiden Gruppen von Patientinnen mit und ohne Veneninvasion kein Unterschied bezüglich des Angiogenese-Scores (p= 0,3669).

Zwischen den beiden Patientinnenkollektiven mit und ohne Lymphgefäßinvasion mit Tumorzellen bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied bezüglich des Angiogenese-Scores (p= 0,988).

Der Kruskal-Wallis-Test zeigte keinen Unterschied zwischen dem Grad der Differenzierung des Tumors (G1, G2, G3) und dem Angiogenese-Score (p=0,807).

5. Diskussion

Das Zervixkarzinom stellt nach dem Mammakarzinom weltweit das zweithäufigste Malignom der Frau dar. In Entwicklungsländern ist das Zervixkarzinom aufgrund mangelhafter Vorsorge, schlechter hygienischer Bedingungen und fehlender Aufklärung das häufigste Malignom der Frau. Es kann davon ausgegangen werden, dass zurzeit weltweit 500.000 Frauen pro Jahr an einem Zervixkarzinom erkranken (Thomas 2005). Die Therapie der CIN sowie des manifesten Karzinoms steht auf zwei Säulen: der Operation und der Radiochemotherapie.

Trotz weiterer Entwicklung in der operativen Therapie und neuerer Verfahren der Radiochemotherapie konnten in den letzten Jahrzehnten keine größeren Fortschritte hinsichtlich therapeutischer Ergebnisse erreicht werden (Krauss et al 2001).

Eine neue Therapiemöglichkeit in der Behandlung von Malignomen stellt die Antiangiogenese dar. Seit der Zulassung des VEGF-Antikörpers Bevacizumab (Avastin®) zur Behandlung des Kolonkarzinoms (im Frühjahr 2005) werden viele wissenschaftliche Untersuchungen zur Wirkung des antiangiogenen Medikamentes bei anderen Karzinomen durchgeführt.

Ziel dieser Studie war es, anhand eines vorliegenden Patientinnenkollektives, bestehend aus Frauen aller Tumorstadien des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen, einen patientenindividuellen Angiogenese-Score zu bestimmen. Es wurde zudem der Frage nachgegangen, ob dieser fragliche Prognosemarker in Bezug auf den Nutzen einer antiangiogenetischen Therapie hilfreich sein könne.

5.1 Ermittlung des Angiogenese-Scores

Der komplexe Vorgang der Angiogenese sollte nach Ansicht vieler Autoren nicht isoliert betrachtet werden.

Bei Frauen läuft im Rahmen eines Menstruationszyklus eine kontrollierte Angiogenese ab. Diese Entwicklung neuer Gefäße wurde im Verlauf des Tumorwachstums bisher auf unterschiedliche Weise gemessen. Mit der Ermittlung der MVD konnte in unterschiedlichen Studien ein Zusammenhang zwischen der Tumorgefäßdichte und der Malignität des Zervixkarzinoms gezeigt werden.

Höckel et al stellte einen direkten Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und dem Malignitätsgrad her (Höckel et al 2001).

Zaghloul et al zeigte in einer Studie, in der 40 Patientinnen mit einem Plattenepithelkarzinom der Cervix uteri untersucht wurden, dass Frauen mit einer hohen MVD eine schlechtere Prognose aufweisen als jene mit einer im Verhältnis niedrigen MVD (Zaghloul et al 2000).

In den genannten Arbeiten wurde die Gefäßdichte anhand histologischer Präparate sowie mit Ultraschalluntersuchungen bestimmt (Cheng 1999).

Die Antiangiogenese als ergänzende Tumorthherapie machte eine funktionelle Messung der individuellen Angiogeneseaktivität wünschenswert.

Der praktische Denkansatz des Endothelzellproliferations-Assays beruhte auf der Überlegung, dass in vivo alle im Blut vorhandenen Bestandteile auf den wachsenden Tumor und seine Umgebung wirken. Um dies zu untersuchen wurde ein In-Vitro-Angiogenese-Testsystem etabliert und eingesetzt. In ihm sollte die Wirkung der Seren von Zervixkarzinompatientinnen auf ihre Angiogeneseaktivität hin bestimmt werden.

5.1.1 Tumorstadium und Angiogenese-Score

Mit Hilfe der Kruskal-Wallis-Tests konnte ein signifikanter Unterschied im proliferativen Verhalten der Endothelzellen zwischen Patientinnen mit einer Präkanzerose, einem manifesten Karzinom und jenen mit einem Rezidiv gezeigt werden.

Patientinnen mit einer CIN hatten ähnliche Ergebnisse wie Patientinnen mit einem rezidierten Tumor (siehe Abbildung 3).

Der Median des Angiogenese-Scores von Patientinnen mit Rezidiv grenzte sich deutlich ab von Frauen mit manifestem Karzinom. Dieses Ergebnis entspricht der Hypothese, dass der Angiogenese-Score in dem Kollektiv mit der schlechtesten Prognose mit am höchsten ausfällt. Analog dazu zeigte Zaghoul et al die schlechteste Prognose bei Zervixkarzinompatientinnen mit der höchsten MVD (Zaghoul et al 2000).

Der ähnlich hohe Angiogenese-Score bei Patientinnen mit einer Präkanzerose entsprach nicht den Erwartungen.

Entsprechend ihrer Definition liegt bei Präkanzerosen kein invasives Wachstum vor und es besteht noch keine eigene Gefäßversorgung. Um diese zu ermöglichen, werden Angiogenesefaktoren sezerniert. Vor diesem Hintergrund lässt sich der steigende Angiogenese-Score von CIN I zu CIN III erklären.

In einer Studie mit 474 Patientinnen zeigten Triatanachat et al einen signifikanten Anstieg der Gefäßdichte, im Gebiet der Präkanzerosen, von CIN I zu CIN III (Triatanachat et al 2006).

Das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv mit Präkanzerose bestand aus 15 Patientinnen und war damit genauso groß wie die Gruppe mit Rezidiv. Das größte Patientinnenkollektiv (n=51) bestand aus Frauen mit Karzinomen entsprechend der vier FIGO-Stadien. Hier wurde ein signifikant niedrigerer Angiogenese-Score ermittelt. Innerhalb der einzelnen FIGO-Stadien ergaben sich keine statistisch relevanten Unterschiede bezüglich des angiogenetischen Verhaltens.

5.2 Rezidiv

Nach der Primärbehandlung des Zervixkarzinoms ist die Rezidivrate relativ hoch. In Abhängigkeit des Tumorstadiums und der Zusammensetzung des Patientinnengutes werden Rezidivraten von 22% und 40% angegeben (Schmidt-Matthiesen 2002). Zur Therapie des Rezidivs werden operative Verfahren sowie die Strahlentherapie und mit Einschränkungen auch die Chemotherapie eingesetzt.

Der hohe Angiogenese-Score bei Rezidivpatientinnen war Anlass, diese Gruppe gesondert zu untersuchen. Der Median des Angiogenese-Scores lag signifikant über dem aller vier FIGO-Stadien. In Abbildung 3 wurde die Verteilung der Patientinnen bezüglich ihres proliferativen Verhaltens gezeigt.

In der Rezidiv-Gruppe grenzten sich einige Patientinnen (n=5) bezüglich ihres hohen Angiogenese-Scores von den übrigen (n=10) mit einem deutlich niedrigeren Angiogenese-Score ab. Auffällig war jedoch, dass die Letalität der Patienten aus der Gruppe mit deutlich erhöhtem Angiogenese-Score bei 100% lag. Demgegenüber lag die Letalität der zweiten Gruppe bei 40%. Die sich daraus ergebende Vermutung, Patientinnen mit einem aggressiven rezidivierenden Tumor könnten eine höhere angiogenetische Aktivität im Serum haben, konnte aufgrund der geringen Fallzahl statistisch nicht bestätigt werden. Dennoch stellte sich die Frage, ob Patientinnen mit einem erhöhten Angiogenese-Score entsprechend der hier beschriebenen zweiten Gruppe mehr Potential für eine antiangiogenetische Therapie besitzen. Diesbezüglich scheinen weitere Untersuchungen sinnvoll. Der vergleichsweise geringe Aufwand zur Bestimmung des Angiogenese-Scores könnte einen großen Nutzen für künftige Patientinnen zur Folge haben.

5.3 Tube Formation

Seit der Zulassung des VEGF Antikörpers Bevacizumab zur Behandlung des Kolonkarzinoms wurden zahlreiche wissenschaftliche Untersuchungen bezüglich seiner Wirkung bei anderen Malignomen durchgeführt (Hurwitz et al 2004).

So konnte Rini et al Erfolge mit Bevacizumab in der Therapie des renalen Karzinoms erreichen (Rini et al 2007). Willett et al veröffentlichte 2004 eine Studie zum Rektumkarzinom, in der er einen antivaskulären Effekt von Bevacizumab beschreibt. Dieser war durch eine deutliche Abnahme der Tumorgröße innerhalb von 3 Monaten zu sehen (Willett et al 2004).

Um die These, dass Patientinnen mit erhöhten Angiogenese-Scorewerten ein besseres Ansprechen auf antiangiogene Medikamente zeigen, zu bestätigen oder zu widerlegen, wurden Untersuchungen mit der Tube Formation durchgeführt.

Hierzu wurden aufgrund des aufwendigen und teuren Verfahrens nur 14 Patientinnen aus der Rezidiv-Gruppe untersucht.

Der Tube-Formation-Assay wurde im Rahmen dieser Arbeit zweimal durchgeführt:

Die erste Versuchsreihe wurde ohne Medikamente bei 37 °C 18 Stunden inkubiert, in der zweiten Versuchsreihe wurde jeweils 10% Bevacizumab hinzugegeben.

Die gewonnenen Ergebnisse entsprachen nicht den Erwartungen. Die Versuchsreihe mit 10% Bevacizumab zeigte eine größere Anzahl an gebildeten Tubes als die ohne Bevacizumab. Dies widersprach sowohl der These als auch der Wirkung des Medikamentes.

Generell sind bei in vitro Tests nie die gleichen Gegebenheiten wie in vivo gegeben (Mc Donald et al 2003). Es ist auch denkbar, dass Bevacizumab in seiner Pharmakokinetik bei in vitro Testen anders reagiert als unter in vivo Bedingungen.

Wright et al veröffentlichte 2006 eine Studie, in der vorbehandelte Frauen mit Zervixkarzinom eine Kombinationstherapie aus Bevacizumab und einer Chemotherapie erhielten. Es konnte mit diesem Therapieregime eine Verschiebung der Tumorprogression von 4,3 Monaten erreicht werden.

Nach dem bisherigen Wissenstand sollte eine antiangiogenetische Therapie in Kombination erfolgen. Bei der Auswahl geeigneter Kombinationspartner müsste jedoch bedacht werden, dass der Erfolg der Chemotherapie auf dem Vorhandensein von Gefäßen basiert. Nur bei ausreichender Gefäßversorgung kann im Tumorgebiet eine angemessene Wirkstoffkonzentration erreicht werden (Jain 2003).

Bei der Behandlung des Mammakarzinoms konnte Kümmel et al eine signifikante Verminderung von VEGF unter Chemotherapie nachweisen (Kümmel et al 2006). Nach seinen Untersuchungen ist davon auszugehen, dass sich die verschiedenen Therapieregime mit ihren unterschiedlichen Ansatzorten ergänzen.

5.3.1 Angiogenese-Score und Tube Formation

Nach den im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Ergebnissen korreliert der Angiogenese-Score nicht mit den Units der Tube Formation. Ein geringer und bisher statistisch unrelevanter Zusammenhang konnte zwischen dem Angiogenese-Score und der Tube Formation mit Bevacizumab gesehen werden. Dadurch wäre die Wirkung von Bevacizumab als Angiogeneseinhibitor nichtig. Diese Aussage widerspricht zahlreichen Studien für andere Malignome. So zeigte Hurwitz et al bei Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom ein besseres Outcome bei einer Kombinationstherapie von Bevacizumab und Chemotherapeutika (Hurwitz et al 2004). Wedam et al veröffentlichte erfolgsversprechende Daten zur Behandlung des inflammatorischen Mammakarzinoms mit Bevacizumab (Wedam et al 2006). In einer Studie zum Nierenzellkarzinom ergab sich eine positive Wirkung von Bevacizumab in Kombination mit Erlotinib bezüglich der Tumor-Progression (Hainsworth et al 2005).

In dieser Arbeit sind daher aufgrund der geringen Fallzahl weitere Untersuchungen notwendig.

5.4 Angiogenese-Score und Angiogenesefaktoren

Die Ergebnisse des Angiogenese-Scores und der Tube Formation bei Patientinnen mit Rezidiv ergaben die bereits diskutierten unterschiedlichen Werte bezüglich der angiogenetischen Aktivität. Zur Korrelation mit den Angiogenesefaktoren im Blut wurde auf bereits ermittelte ELISA-Werte aus der Zervixkarzinom-Datenbank der Frauenklinik Charité Berlin Mitte zurückgegriffen.

In der vorliegenden Arbeit hat man sich auf eine Auswahl von zwei pro- und zwei antiangiogenen Faktoren beschränkt (VEGF, bFGF und Endostatin, VEGF-R1).

5.4.1 Krankheitsstadium, Angiogenese-Score und VEGF

Für einen der stärksten proangiogenen Faktor, den VEGF, konnte ein signifikanter Anstieg bei Patientinnen mit Rezidiv gezeigt werden. Dies war aufgrund des bekannten angiogenetischen Ungleichgewichtes bei Karzinompatientinnen zu erwarten.

Mehrere Veröffentlichungen konnten die steigende VEGF-Konzentration mit zunehmendem Krankheitsstadium durch viele Studien belegen.

Soufla et al zeigte in einer Studie mit 44 Patientinnen eine signifikant erhöhte VEGF mRNA Synthese in Gewebe von Zervixkarzinompatientinnen gegenüber gesunden Frauen (Soufla et al 2005).

Lee et al zeigte in einer Studie, in der 117 Zervixkarzinompatientinnen eingeschlossen waren, einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der VEGF-Konzentration und der Prognose (Lee et al 2002).

Ein Anstieg des VEGF und seiner Subtypen wurde auch bei anderen Tumoren wie z.B. dem Mammakarzinom und dem Prostatakarzinom nachgewiesen. El-Gohary et al zeigte beim Prostatakarzinom ein deutlich kürzeres Gesamtüberleben bei hohen VEGF-Konzentrationen (El-Gohary 2007).

Die Bedeutung des VEGF-Wertes verdeutlichte sich in Studien, die bei Patientinnen mit einer hohen VEGF-Expression eine höhere Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika zeigten (Jain 2003, Kümmel et al 2006).

Die Untersuchung in dieser Arbeit bezüglich eines Zusammenhanges zwischen dem Angiogenese-Score und den VEGF-Werten konnte keinerlei Korrelation zeigen.

Dies entsprach nicht den Erwartungen an einen der wichtigsten Proangiogenese-Faktoren. Eine mögliche Fehlerquelle könnte sein, dass Untersuchungsmaterialien derselben Patientinnen für unterschiedliche Untersuchungen genutzt wurden. So wurde die VEGF-Konzentration aus dem Plasma bestimmt und der Endothelzellproliferations-Assay mit Serum durchgeführt. Zudem betrug der zeitliche Abstand zum Teil bis zu 68 Monaten zwischen der Blutentnahme und den Bestimmungen der VEGF-Plasmakonzentration bzw. dem Angiogenese-Score. Die Proben wurden jedoch standardgemäß konstant bei - 80 °C aufbewahrt, sodass von einem Lagerungsfehler nicht ausgegangen werden kann.

5.4.2 Krankheitsstadium, Angiogenese-Score und bFGF

Für den proangiogenen bFGF konnte in Studien ein Anstieg der Konzentration mit zunehmendem Tumorstadium der Cervix uteri gezeigt werden (Chopra 1998, Mitsuhashi 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls ein Anstieg der bFGF-Konzentration im Verlauf der Tumorprogression beobachtet. Jedoch verhielt sich dieser mit einem Kruskal-Wallis p-Wert von 0,081 nicht signifikant.

Bei Patientinnen mit einem Rezidiv konnte eine Verdreifachung des bFGF-Serum Wertes (Tabelle 11) gezeigt werden. Dieser Wert wurde jedoch durch einen Ausreißer verzerrt.

Im Rahmen der Untersuchung auf Zusammenhänge zwischen der bFGF-Konzentration und dem Angiogenese-Score wurde lediglich bei Patientinnen mit Präkanzerose eine Korrelation ($p = 0,035$) beobachtet.

5.4.3 Krankheitsstadium, Angiogenese-Score und Endostatin

Endostatin verhielt sich in seiner Serumkonzentration bei Frauen mit Präkanzerose ähnlich wie bei solchen mit manifestem Karzinom. Ein deutlicher Anstieg war bei denjenigen mit Rezidiv zu beobachten (siehe Abbildung 9).

Der Anstieg des Endostatin, als einer der wichtigsten Angiogeneseinhibitoren, kann als erfolgloser Regulationsversuch des Körpers gegen die Tumorerkrankung interpretiert werden (Höckel et al 2001).

Neben den erhöhten Endostatinwerten zeigten Patientinnen im Rezidiv auch den bereits beschriebenen hohen Angiogenese-Score. Eine Korrelation zwischen diesen beiden Ergebnissen konnte jedoch nicht ermittelt werden. Die erwartete Hemmung der Endothelzellproliferation durch Endostatin blieb demzufolge aus. Dies kann vermutlich auf das angiogene Ungleichgewicht, von dem auch in vivo ausgegangen wird, zurückgeführt werden.

5.4.4 Angiogenese-Score, Krankheitsstadium und VEGFR-1

Die Konzentration des VEGFR-1 behielt einen relativ konstanten Wert. Eine geringgradige Verminderung der Konzentration war bei Patientinnen im Rezidiv zu beobachten.

Der lösliche VEGFR-1 ist ein Gegenregulator des VEGF und sorgt im gesunden Organismus für ein physiologisches Gleichgewicht zwischen VEGF und anderen Angiogenesefaktoren (Michalski et al 2003, Ferrara 2003). Kommt es zu einem Ungleichgewicht, wie in dem betrachteten Tumorpatientinnenkollektiv, so wird die Angiogenese nicht nur durch den Anstieg der proangiogenetischen Faktoren, sondern auch durch das Sinken der antiangiogenetischen Faktoren begünstigt. Der leichte Abfall der VEGFR-1-Serumkonzentration ist jedoch eher als eine Tendenz zu bewerten, da keine Signifikanz bestand.

Der Angiogenese-Score stand in keinem Zusammenhang zur VEGFR-1-Serumkonzentration. Auch bezüglich der verschiedenen Tumorstadien unterschied sich die Konzentration kaum.

5.5 Angiogenese-Score und Tumorhistologie

Hinsichtlich des Zervixkarzinoms liegt der Anteil der Plattenepithelkarzinome zurzeit bei ca. 80%, knapp 20% machen die Adenokarzinome aus, Mischkarzinome nehmen den Restanteil ein (Beckmann et al 2005).

Auch in dem untersuchten Patientinnenkollektiv stellte das Plattenepithelkarzinom entsprechend des statistischen Auftretens die häufigste Karzinomform dar.

Ein Zusammenhang zwischen dieser Karzinomdifferenzierung und dem Angiogenese-Score war auf Grund von dessen Häufigkeit von besonderem Interesse. Es konnte jedoch kein Zusammenhang gezeigt werden.

Viele Untersuchungen beziehen sich auf das Adenokarzinom, welches in seiner Häufigkeit in den letzten 25 Jahren von 10% auf 20% angestiegen ist. Aus dieser ansteigenden Inzidenz ergeben sich viele Fragen (Beckmann et al 2005).

Nach den Untersuchungen dieser Arbeit ergab sich jedoch auch beim Adenokarzinom kein Zusammenhang zwischen dem histologischen Typ und dem proliferativen Verhalten der Endothelzellen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Tumorhistologie keinen direkten Einfluss auf die Angiogenese ausübt.

5.6 Angiogenese-Score und Alter bei Erstdiagnose

Das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose des Zervixkarzinoms liegt bei 52,2 Jahren und hat sich in letzter Zeit nach vorne verlagert. Es können zwei Erkrankungsgipfel beobachtet werden, einer zwischen dem 35. und 39. Lebensjahr und einer zwischen dem 60. und 64. Lebensjahr. Die Verringerung des durchschnittlichen Erkrankungsalters in den letzten 25 Jahren um 14 Jahre kann u. a. auf die vermehrte Inanspruchnahme der Vorsorgeuntersuchung zurückgeführt werden. Die verbesserte Vorsorge -Mentalität ermöglicht Diagnosen in früheren Tumorstadien und ist folglich mit besseren Prognosen verbunden (Beckmann et al 2005, AWMF – Leitlinien Stand September '06).

In der vorliegenden Studie betrug das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose des manifesten Karzinoms 47,3 Jahre, bei Frauen im Rezidiv wurde die Erstmanifestation des Tumors mit einem durchschnittlichen Alter von 44,9 Jahren diagnostiziert. Jüngere Patientinnen hatten nach den vorliegenden Ergebnissen die gleiche Prognose wie ältere. Somit scheint das proliferative Verhalten der Endothelzellen unabhängig vom Alter bei der Erstdiagnose des Tumors zu sein. Zu dem gleichen Ergebnis kam Zaghoul et al in einer 40 Zervixkarzinompatientinnen umfassenden Studie; auch er konnte keine Verbindung zwischen Alter bei Diagnosestellung und der Prognose erkennen (Zaghoul et al 2000).

5.7 Menopausenstatus und Angiogenese-Score

Die Angiogenese spielt in dem Menstruationszyklus der Frau eine physiologisch wichtige Rolle: Während der Zyklusphasen schwankt die Konzentration der Angiogenesefaktoren deutlich messbar (Saito et al 2007). Hieraus ergibt sich die Frage nach den Konzentrationen der Angiogenesefaktoren bei Frauen vor der Menopause. Nach den Untersuchungen dieser Arbeit konnte ein signifikant höherer Angiogenese-Score der prämenopausalen Patientinnen gegenüber den peri- und postmenopausalen Frauen gefunden werden (siehe Abbildung 10).

Auf die Verschiebung des Erkrankungsalters wurde bereits unter Kapitel 5.6 eingegangen. Da bei prämenopausalen Frauen zyklusabhängig eine erhöhte Konzentration an Angiogenesefaktoren, v. a. von VEGF in der periovulatorischen Phase, zu finden ist (Kemp et al 2001, Saito et al 2007), kann bei Patientinnen aus dieser Gruppe eine höhere Ansprechrate auf eine antiangiogenetische Therapie vermutet werden.

Hierzu sind weitere Untersuchungen notwendig. Auch die Nebenwirkungen bei der Therapie junger Patientinnen, Operation versus antiangiogenetische bzw. Radiatio und Chemotherapie sind abzuwägen und in die Relevanz dieser Untersuchungen einzubeziehen.

5.7.1 Menopausenstatus und Angiogenesefaktoren

Der beschriebene erhöhte Angiogenese-Score bei prämenopausalen Tumorpatientinnen ließ vermuten, dass auch die Plasma- und Serumkonzentration der Angiogenesefaktoren in dieser Zeit erhöht waren.

Mit Hilfe des Man-Whitney-U Tests wurde der Zusammenhang zwischen dem Menopausenstatus und den vier Angiogenesefaktoren berechnet. Es wurde ein signifikanter Anstieg der VEGF-Plasmakonzentration bei postmenopausalen Patientinnen gegenüber jenen in der Prämenopause gesehen (siehe Abbildung 11).

Moon et al berichtete ebenfalls von erhöhten VEGF- Serumwerten bei postmenopausalen Zervixkarzinompatientinnen (Moon et al 2000).

Weiterhin wurde ein signifikanter Anstieg der Endostatinserumkonzentration bei postmenopausalen Frauen beobachtet. Dieser Anstieg ist als eine antiangiogenetische Gegenregulation zur erhöhten VEGF-Konzentration zu werten. B-FGF und VEGFR-1 zeigten keine Änderung der Konzentration in Abhängigkeit vom Menopausenstatus. Das Konzentrationsverhalten der Angiogenesefaktoren widersprach den Angiogenese-Scorewerten der vorliegenden Studie.

5.8 Prognosefaktoren und Angiogenese-Score

Die Bedeutung von Prognosefaktoren wie Lymphknotenstatus, Venen- und Lymphgefäßinvasion und Grading des Tumors sind seit längerer Zeit bekannt. Frühere Studien berichteten von einer großen prognostischen Bedeutung der mit Tumorzellen befallenen Lymphknoten. Ein deutlich besserer prognostischer Verlauf wurde für Patientinnen mit nicht infiltrierten Lymphknoten nachgewiesen (Finan et al 1996, Takeda et al 2002).

Nach den verschiedenen Untersuchungen zum Angiogenese-Score ergab sich die Frage nach dessen potentieller prognostischer Bedeutung. Hierzu wurden bekannte Prognoseparameter mit dem Angiogenese-Score verglichen: In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen dem Lymphknotenstatus und dem Angiogenese-Score als fraglichen neuen Prognoseparameter gesehen werden. Dies entsprach nicht den Erwartungen.

Bezüglich einer Venen- und Lymphgefäßinvasion zeigten aktuelle Studien einen deutlich besseren Verlauf bei Patientinnen ohne Gefäßinfiltration (Chernofsky et al 2006, Suprasert et al 2006). Die Gefäßinfiltration als Prognoseparameter ist von dem Vorhandensein proangiogener Faktoren abhängig. Es war daher davon auszugehen, dass der Angiogenese-Score mit der Gefäßinvasion korreliert. Jedoch konnte hier keinerlei Zusammenhang hergestellt werden.

Zur Erklärung dieser Ergebnisse kann diskutiert werden, ob aufgrund der maximalen Konzentration der Angiogenesefaktoren im Gebiet des Karzinoms im Serum niedrigere Werte erreicht werden.

Aufgrund der Ergebnisse ist anzunehmen, dass Patientinnen im Serum bzw. Plasma keine so hohe Konzentration an Angiogenesefaktoren erreichten und daher ein Anstieg des Angiogenese-Scores ausblieb.

Der Differenzierungsgrad der Tumorzellen (Grading) ist als unabhängiger Prognosefaktor seit langem bekannt. Mit einer abnehmenden Differenzierung nimmt die Rezidivhäufigkeit zu (Fuller et al 1989). In der vorliegenden Arbeit konnte zwischen dem ermittelten Angiogenese-Score und dem Grading keine Korrelation nachgewiesen werden.

Die Aussicht, einen individuellen, einfach zu bestimmenden Prognosefaktor zu entwickeln, konnte sich im Vergleich mit bekannten Prognosefaktoren nicht als erfolgreich bestätigen.

6. Zusammenfassung

Angiogenese bedeutet Aussprossen von Kapillaren aus bestehenden Blutgefäßen. Sie ist die Voraussetzung für Wachstum und Differenzierung von Organen und Geweben. Zudem stellt sie einen wichtigen Bestandteil in vielen pathologischen Prozessen dar, wie zum Beispiel dem Wachstum und der Metastasierung von Tumoren.

Die vorliegende Arbeit bezieht sich auf Werte aus einer bestehenden Zervixkarzinom-Datenbank der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Berlin Charité Campus Mitte.

81 Patientinnen wurden untersucht: Bei 15 bestanden Präkanzerosen, 51 litten an Zervixkarzinom aller FIGO-Stadien, bei 15 bestanden Rezidive.

Das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose betrug 46,7 Jahre. 52 Patientinnen befanden sich in der Prämenopause, 2 waren perimenopausal und 27 postmenopausal.

In der Datenbank enthalten waren die ELISA-Werte von Angiogenesefaktoren wie VEGF, bFGF, Endostatin und VEGF-R1.

Am häufigsten vertreten waren Plattenepithelkarzinome (76,9%) gefolgt von Adenokarzinomen (12,3%) und adenosquamösen Karzinomen (6,1%). Bei 4,6% konnte keine Klassifizierung stattfinden. Ebenfalls in der Datenbank angegebene Prognosefaktoren wie Lymphknotenstatus, Gefäßinvasion und Differenzierungsgrad wurden in die vorliegende Arbeit einbezogen.

Bestimmt wurde für alle Patientinnen ein individueller Angiogenese-Score mit Hilfe eines Endothelzellproliferations-Assays.

Bei Patientinnen mit Rezidiv wurde zusätzlich eine Tube Formation durchgeführt. Einer Versuchsreihe wurde Bevacizumab zugesetzt, in einer zweiten wurden keine angiogenetisch wirksamen Medikamente verwendet.

Ziel des Projektes war herauszufinden, wie sich Endothelzellen unter dem Einfluss des Serums von Zervixkarzinompatientinnen verhalten. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob das Verhalten der Endothelzellen prognostische Aussagen ermöglicht.

Schließlich wurde der Frage der Vorhersagbarkeit des Ansprechens einer antiangiogenetischen Therapie nachgegangen.

Der Angiogenese-Score bei Patientinnen im Rezidiv lag z. T. deutlich höher als in den anderen Krankheitsstadien.

Mit der Tube Formation wurde das Ansprechen der Endothelzellen unter dem Einfluss des Serums von Rezidiv-Patientinnen auf Bevacizumab untersucht.

Die Ergebnisse der Tube Formation waren widersprüchlich. Unter der Wirkung des VEGF-Inhibitors zeigten sich mehr Tubes als ohne Medikamentenzugabe. Des Weiteren bestand keine Korrelation zwischen der Tubelänge und dem Angiogenese-Score.

Die bekannten ELISA-Werte aus der Datenbank der Charité zeigten nur bei Patientinnen mit einer CIN einen schwachen Zusammenhang mit dem Angiogenese-Score und auch hier nur für Endostatin und bFGF.

Für VEGF und Endostatin wurde ein Anstieg mit zunehmendem Tumorstadium beobachtet.

Es wurde untersucht, ob neben den bekannten Prognosefaktoren Tumorhistologie, Grading, Lymphknotenstatus und Gefäßinvasion auch der Angiogenese-Score eine prognostische Bedeutung haben könnte. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen nicht für eine Wertigkeit des Angiogenese-Scores als weiteren, neuen Prognosefaktor.

Bei Patientinnen in der Prämenopause wurde ein signifikant höherer Angiogenese-Score gemessen als bei postmenopausalen Patientinnen. Bei jenen war wiederum ein Anstieg von VEGF und Endostatin zu beobachten.

Schlussfolgerung der Ergebnisse:

- Die CIN sind durch eine Operation heilbar, eine antiangiogenetische Therapie kommt hier nicht primär in Betracht.
- Patientinnen mit manifestem Karzinom (ohne Rezidiv) scheinen von einer antiangiogenetischen Therapie nicht zu profitieren.
- Patientinnen im Rezidiv können aus einer antiangiogenetischen Therapie Nutzen ziehen.
- Der Angiogenese-Score eignet sich nicht als ein Prognoseparameter.
- Vor einer abschließenden Beurteilung sind weitere Untersuchungen notwendig.

7. Literaturverzeichnis

1. Baird A, Ling N. Fibroblast growth factors are present in the extracellular matrix produced by endothelial cells in vitro: implications for a role of heparinase-like enzymes in the neovascular response. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987 Jan 30; 142:428-435.
2. Baltzer J. Zervixkarzinom: Diagnostische Verfahren und Therapie der Vor- und Frühstadien. *Der Gynäkologe.* 1999; 32:261-272.
3. Baltzer J. Zervixkarzinom. *Der Onkologe.* 2001; 7:827-841.
4. Beckmann MW, Mehlhorn G, Thiel F, Breul C, Fasching PA, Ackermann S. Therapiefortschritte beim primären Zervixkarzinom. *Dt Ärztebl.* 2005; 979-86.
5. Berdel WE, Panse J. Stellenwert der Angiogenese-Inhibition bei Tumorerkrankungen-präklinische Daten. *Onkologie.* 2005; 28(suppl 4):25-28.
6. Bergers G and Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer.* 2003; 3:401-410.
7. Brinton LA, Herrero R, Reeves WC, de Brinton RC, Gaitan E, Tenorio F. Risk Factors for Cervical Cancer by Histology. *Gynecologic Oncology.* 1993; 51:301-306.
8. Cao Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001; 33(4),357-369.
9. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003; 9(6):653-60.
10. 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 assesment of angiogenesis in patients with cervical carcinoma. *Cancer.* 1999; 85(3):651-7.

11. Chernofsky MR, Felix JC, Muderspach LI, Morrow CP, Ye W, Groshen SG, Roman LD. Influence of quantity of lymph vascular space invasion on time to recurrence in women with early-stage squamous cancer of the cervix. *Gynecol Oncol.* 2006; 100(2):288-93.
12. Chopra V, Dinh TV, Hannigan EV. Circulation serum levels of cytokines and angiogenic factors in patients with cervical cancer. *Cancer Invest.* 1998; 16(3):152-9.
13. Cogliano V Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F; WHO International Agency for Research on Cancer. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol.* 2005 Apr; 6(4):204.
14. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science.* 1994 (9); 265(5178):1582-4.
15. Denekamp J. Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br J Radiol.* 1993; 66 (783),181-196.
16. Detmar M, Brown LF, Claffey KP, Yeo K-T, Kocher O, Jackman RW, Berse B, Dvorak HF. Overexpression of Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor and its Receptor in Psoriasis. *J Exp Med.* 1994; 180:1141-46.
17. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. Leitlinien, Empfehlungen, Stellungnahmen. September 2006; AWMF 032/033.
18. Distler J H, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q. J Nucl. Med.* 2003; 47(3):149-161.
19. Djonov V, Andreas AC and Ziemiecki A. Vascular remodelling during the normal and malignant life cycle of the mammary gland. *Microscopy Res Tech.* 2001; 52(2), 182-189.

20. El-Gohary YM, Silverman JF, Olson PR, Liu YL, Cohen JK, Miller R, Saad RS. Endoglin (CD 105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2007 Apr;127(4):572-9.
21. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003 Jun; 9(6):669-76.
22. Finan MA, DeCesare S, Fiorica JV, Chambers R, Hoffman MS, Kline RC, Roberts WS, Cavanagh D. Radical hysterectomy for stage IB1 vs IB2 carcinoma of the cervix: does the new staging system predict morbidity and survival? *Gynecol Oncol.* 1996; 62(2):139-47.
23. Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber D, Vlodavsky I. A heparin-binding angiogenic protein-basic fibroblast growth factor-is stored within basement membrane. *Am J Pathol.* 1988; 130(2):393-400.
24. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995 Jan; 1(1):27-31.
25. Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy-endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res.* 2006 10;312(5):594-607.
26. Fuller AF Jr, Elliott N, Kosloff C, Hoskins WJ, Lewis JL Jr. Determinants of increased risk for recurrence in patients undergoing radical hysterectomy for stage IB and IIA carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol.* 1989; 33(1):24-9.
27. Good DJ, Piverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NP. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87 (17):6624-28.
28. Griffioen AW and Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular disease and chronic inflammation. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(2), 237-268.

-
29. Hainsworth JD, Sosman JA, Spigel DR, Edwards DL, Baughman C, Greco A. Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma With a Combination of Bevacizumab and Erlotinib. *J Clin Oncol*. Nov. 2005; 23:7889-7896.
30. Hanahan D, Folkman J. Pattern and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996; 86:353-364.
31. Höckel S, Schlenger K, Vaupel P, Höckel M. Association between host tissue vascularity and the prognostically relevant tumor vascularity in human cervical cancer. *Int J Oncol*. Oct 2001; 19(4):827-32.
32. Hormia M and Virtanen I. Endothelium-an organized monolayer of highly specialized cells. *Med Biol*. 1998; 64: 247-266.
33. Hovey RC, Goldhar AS, Baffi J, Vonderhaar BK. Transcriptional Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Epithelial and Stromal Cells during Mouse Mammary Gland Development. *Molecular Endocrinology* 2001; 15 (5): 819-831.
34. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jun 3;350(23):2335-42.
35. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003 Jun; 9(6):685-93.
36. Kemp B, Classen-Linke I, Schlehe B, Beier HM, Rath W. Does Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Play a Role in Cyclic Changes of the Cervix? *Geburtshilfe Frauenheilkunde*. 2001; 61:671-675.
37. Keys HM, Bundy BN, Stehman FB, Muderspach LI, Chafe WE, Suggs Ch III, Walker JL, Gersell D. Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage Ib cervical carcinoma. *N Engl J Med*. 1999; 340:1154-1161.

-
38. Kiechle M. Gut- und Bösartige Neubildungen der Cervix uteri Gynäkologie und Geburtshilfe. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. (2000), 585-589.
39. Koch AE, Harlow LA, Haines GK, Amento EP, Unemori EN, Wong WL, Pope RM, Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor- A Cytokine Modulating Endothelial Function in Rheumatoid Arthritis. *Journal of Immunology*. 1994;152:4149-56.
40. Kowanzetz M, Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor Signaling Pathways: Therapeutic Perspective. *Cancer Res*. 2006; 12(17):5018-22.
41. Krauss T, Huschmand Nia A, Viereck V, Emos G. New Developments in the Treatments of Cervical Cancer *Onkologie*. 2001; 24:340-345.
42. Kremer C, Breier G, Risau W, Plate KH. Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system. *Cancer Res*. 1997; 57(17):3852-9.
43. Kümmel S, Eggemann H, Lüftner D, Thomas A, Jeschke S, Zerfel N, Heilmann V, Emons G, Zeiser T, Ulm K, Kobl M, Korlach S, Schmid P, Sehouli J, Elling D, Blohmer J-U. Changes in the circulation plasma levels of VEGF and VEGF-D after adjuvant chemotherapy in patients with breast cancer and 1 to 3 positive lymph nodes. *Anticancer Res*. 2006 Mar-Apr; 26(2C):1719-26.
44. Lee JS, Kim HS, Jung JJ, Lee MC, Park CS. Angiogenesis, cell proliferation and apoptosis in progression of cervical neoplasia. *Anal Quant Cytol Histol*. 2002; 24(2):103-13.
45. Lee IJ, Park KR, Lee KK, Song JS, Lee KG, Lee JY, Cha DS, Choi HI, Kim DH, Deung YK. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in Stage IB carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002 Nov 1;54(3):768-79.

46. Löning M, Bender H, Dürst M, Friese K, Gissmann L, Harlfinger W, Heininger U, Iftner T, von Knebel Döberitz M, Kreienberg R, Schneider A, Schneck U, Schulze K, Schwarz T, Steiner M, Dietrich K. Die HPV- Impfung. *Frauenarzt* 2006;47 (7):594-600.

47. Mc Donald NJ, Shivers WY, Narum DL, Plum SM, Wingard JN, Fuhrmann SR, Liang H, Holland-Linn J, Chen DH & Sim BK. Endostatin binds tropomyosin. A potential modulator of the antitumor activity of endostatin. *J. Biol. Chem.* 2001; 276,25190-25196.

48. Mc Donald DM, Choyke PL. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med.* 2003 Jun; 9(6):713-25.

49. Michalski B, Zielinski T, Fila A, Mazurek U, Poreba R, Wilczok T. Correlation between transcriptional activity of vascular endothelial growth factor (VEGF) and transcriptional activity of its receptors (FLT -1 and FLK -1) in low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) of uterine cervix. *Ginekol Pol.* 2003 Sep; 74(9):805-10.

50. Mitsuhashi A, Suzuka K, Yamazawa K, Matsui H, Seki K, Sekiya S. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C levels as tumor markers in patients with cervical carcinoma. *Cancer.* 2005 Feb 15; 103(4):724-30.

51. Modlich U, Kaup FJ and Augustin HG. Cyclic angiogenesis and blood vessel regression in the ovary: blood vessel regression during luteolysis involves endothelial cell detachment and vesselocclusion. *Lab Invest.* 1996; 7484: 771-780.

52. Moon HS, Kim SC, Ahn JJ, Woo BH. Concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor-beta (TGF-beta1) in serum of patients with cervical cancer: prediction of response. *Int J Gynecol Cancer.* 2000 Mar; 10(2):151-156.

53. Park TW, Fujiwara H, Wright TC. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer.* 1995, 15;76(10 Suppl):1902-13.

54. Pflaiderer A, Breckwoldt M, Martius G. Gynäkologie und Geburtshilfe 4. Auflage, Stuttgart (2000), 195-201.
55. 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. *Gynecol Cancer* 2001; 11:137-142.
56. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia:role of HIF system. *Nat Med.* 2003; 9(6):677-684.
57. Red-Horse K, Ferrara N. Imaging tumor angiogenesis. *J Clin Invest.* 2006; 116(10):2585-7.
58. Rini BI, Rathmell WK. Biological aspects and binding strategies of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007 Jan 15; 13(2 Pt 2):741s-746s.
59. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;17, 386(6626):671-4.
60. Saito M, Sato Y, Watanabe J, Kuramoto H, Kaba S, Fukuda T. Angiogenic factors in normal endometrium and endometrial adenocarcinoma. *Pathol Int.* 2007 Mar; 57(3):140-7.
61. Schmidt-Matthiesen H, Bastert G, Wallwiener D. Gynäkologie Onkologie. 6. Auflage, Schattauer-Verlag. (2002),23-52.
62. Schneider A, Possover M, Köhler C. Neue Konzepte für Staging und Therapie des Gebärmutterhalskrebses durch endoskopische Operationsverfahren. *Zentralbl. Gynokol.* 2001; 123:250-254.
63. Soufla G, Sifaki S, Baritaki S, Zafiropoulos A, Koumantakis E, Spandidos DA. VEGF, FGF2, TGFB1 and TGFBR1 mRNA expression levels correlate with the malignant transformation of the uterine cervix. *Cancer Lett.* 2005 Apr 18;221(1):105-18.

64. Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest.* 1999; 103 (9): 1237-1241.
65. Suprasert P, Srisomboon J, Siriaunkgul S, Khunamornpong S, Phongnarisorn C, Siriaree S, Charoenkwan K, Cheewakriangkrai C, Kietpeerakool C. Clinical outcomes and prognostic factors of node-negative cervical cancer patients with deep stromal invasion or lymphovascular space involvement following radical hysterectomy. *J Med Assoc Thai.* 2006; 89(9):1368-75.
66. Takahashi Y, Bucana CD, Liu W, Yoneda J, Kitadai Y, Cleary KR, Ellis LM. Platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon cancer angiogenesis: role of infiltration cells. *J Natl Cancer Inst.* 1996 Aug 21; 88(16):1146-51.
67. Takeda M, Sakuragi N, Okamoto K, Todo Y, Minobe S, Nomura E, Negishi H, Oikawa M, Yamamoto R, Fujimoto S. Preoperative serum SCC, CA 125 and CA 19-9 levels and lymph node status in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2002; 81(5):451-7.
68. Takeda N, Sakuragi N, Takeda M, Okamoto K, Kuwabara M, Negishi H, Oikawa M, Yamamoto R, Yamada H, Fujimoto S. Multivariate analysis of histopathologic prognostic factors for invasive cervical cancer treated with radical hysterectomy and systematic retroperitoneal lymphadenectomy. *Acta Obstet Scand.* 2002; 81(12):1144-51.
69. Tjin Tham Sjin RM, Naspinski J, Birsner AE, Li C, Chan R, Lo K-M, Gillies S, Zurakowski D, Folkman J, Samulski J, Javaherian K. Endostatin therapy reveals a U-shaped curve for antitumor activity. *Cancer Gene Therapy.* 2006:1-9.
70. Thomas A, Kümmel S, Sehouli J, Lichtenegger W. Aktuelle Diagnostik und Therapie des Zervixkarzinoms. *CME Praktische Fortbildung Gynäkologie, Geburtsmedizin und Gynäkologische Endokrinologie.* 2005 (3):54-62.

71. Triatanachat S, Niruthisard S, Trivijitsilp P, Tresukosol D, Jarurak N. Angiogenesis in cervical intraepithelial neoplasia and early-staged uterine cervical squamous cell carcinoma: clinical significance. *Int J Gynecol Cancer*. 2006 Mar-Apr;16(2):575-80.
72. Trunk MJ, Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Molekulare Pathogenese des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen. *Pathologe*. 2005; 26:283-290.
73. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of Angiogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cancer Res*. 2000; 60:203-212.
74. Vieira SC, Zeferino LC, Da Silva BB, Aparecida Pinto G, Vassallo J, Carasan GA, De Moraes NG. Quantification of angiogenesis in cervical cancer: a comparison among three endothelial cell markers. *Gynecol Oncol*. 2004; 93(1):121-4.
75. Vieira SC, Silva BB, Pinto GA, Vassallo J, Moraes NG, Santana JO, Santos LG, Carvasan GA, Zeferino LC. CD34 as a marker for evaluating angiogenesis in cervical cancer. *Pathol Res Pract*. 2005; 201(4):313-8.
76. Wedam SB, Low JA, Yang SX, Chow CK, Choyke P, Danforth D, Hewitt SM, Berman A, Steinberg SM, Liewehr DJ, Plehn J, Doshi A, Thomasson D, McCarthy N, Koeppen H, Sherman M, Zujewski J-A, Camphausen K, Chen H, Swain SM. Antiangiogenic and Antitumor Effects of Bevacizumab in Patients With Inflammatory and Locally Advanced Breast Cancer. *J Clin Oncol*. Feb. 2006; 24:769-777.
77. Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV, Mino M, Cohen KS, Scadden DT, Hartford AC, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Chen HX, Shellito PC, Lauwers GY, Jain RK. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med*. 2004 Feb;10(2):145-7.
78. Wolf JK, Ramirez PT. The molecular biology of cervical cancer. *Cancer Invest*. 2001; 19(6):621-9.

79. Wright JD, Viviano D, Powell MA, Gibb RK, Mutch DG, Grigsby PW, Rader JS. Bevacizumab combination therapy in heavily pretreated, recurrent cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2006 Nov; 103(2):489-93.
80. Yamamoto Y, Toi M, Kondo S, Matsumoto T, Suzuki H, Kitamura M, Tsuruta K, Tangiguchi T, Okamoto A, Mori T, Yoshida M, Ikeda T, Tominaga T. Concentration of vascular endothelial growth factor in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res.* 1996; 2(5):821-826.
81. Zaghloul MS, El Naggar M, El Deeb A, Khaled H, Mokhtar N. Prognostic implication of apoptosis and angiogenesis in cervical uteri cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000 Dec 1; 48(5):1409-15.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Jens-Uwe Blohmer, Leiter des Brustzentrums City der Abteilung für Frauenheilkunde und Geburtshilfe im Sankt Gertrauden Krankenhaus Berlin, für die Betreuung der Arbeit.

Für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die gute Betreuung danke ich besonders Herrn Dr. Sherko Kümmel, Oberarzt der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Essen.

Von ganzem Herzen danke ich Herrn Dr. Harald Heidecke der Firma Cell Trend GmbH, der mich während der ganzen Zeit mit allem erdenklichen Engagement betreut hat.

Des Weiteren bedanke ich mich bei der Frauenklinik der Charité Berlin Campus Mitte für die Überlassung der Zervixkarzinom-Datenbank.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dipl.-Stat. Monika Kriner aus dem Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie des Klinikums rechts der Isar in München.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, Freunden und meinem Freund Alexander Zimmerman bedanken, die mich mit ihrem Verständnis und ihrer Unterstützung bei der Erarbeitung der Dissertation begleitet haben.

Erklärung

„Ich, Cora Reuter, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: In vitro Angiogenese-Testung von Zervixkarzinompatientinnen: Prognostische und therapeutische Bedeutung des Angiogenese-Scores in der individuellen Tumorthherapie; selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift