

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

DISSERTATION

*Der Effekt einer dosisintensivierten, adjuvanten Chemotherapie  
auf im Blut zirkulierende Angiogenesefaktoren  
VEGF und VEGF-D bei Patientinnen mit Brustkrebs  
und 1-3 positiven Lymphknoten*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
**Nadine Pohl**  
aus Jena

Gutachter:       1. Priv.-Doz. Dr. med. S. Kümmel  
                      2. Prof. Dr. med. C. Denkert  
                      3. Prof. Dr. med. Dr. h. c. S.-D. Costa

Datum der Promotion: 19.11.2010

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	<b>Epidemiologie</b> .....	<b>1</b>
1.2	<b>Ätiologie</b> .....	<b>1</b>
1.3	<b>Tumorangiogenese</b> .....	<b>2</b>
1.3.1	Pro- und antiangiogene Faktoren .....	2
1.4	<b>Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)</b> .....	<b>3</b>
1.4.1	Die Rolle des VEGF in der pathologischen Angiogenese .....	4
1.4.2	Sekretion und Regulation von VEGF .....	5
1.4.3	Molekulare Eigenschaften von VEGF und seinen Isoformen .....	7
1.4.4	Die VEGF-Rezeptoren.....	7
1.4.5	VEGF-D .....	11
1.5	<b>Adjuvante Chemotherapie</b> .....	<b>12</b>
1.6	<b>Prognostische Faktoren</b> .....	<b>13</b>
1.6.1	TumorgroÙe .....	13
1.6.2	Lymphknotenstatus.....	13
1.6.3	Histologisches Grading (Differenzierungsgrad).....	14
1.6.4	Hormonrezeptorstatus .....	15
1.6.5	HER2/neu (c-erbB2) .....	15
1.6.6	Alter der Patientin .....	15
1.7	<b>Paclitaxel (Taxol®) in der Behandlung des Mammakarzinoms</b> .....	<b>16</b>
1.8	<b>Dosisintensivierung der Therapie</b> .....	<b>17</b>
1.9	<b>Sequenzierung der Therapie</b> .....	<b>20</b>
1.10	<b>Schematische Darstellung des Studiendesigns</b> .....	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
2.1	<b>Studiendesign</b> .....	<b>23</b>
2.2	<b>Patientencharakteristika</b> .....	<b>23</b>
2.3	<b>Einschlusskriterien</b> .....	<b>24</b>
2.4	<b>Ausschlusskriterien</b> .....	<b>25</b>
2.5	<b>Blutproben</b> .....	<b>26</b>
2.6	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>26</b>
2.7	<b>Immunoassay</b> .....	<b>27</b>
2.8	<b>Durchföhrung der Bestimmungen</b> .....	<b>29</b>

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Gesamtanalyse der Veränderungen von VEGF und VEGF-D</b>	<b>33</b>
3.1.1	VEGF-Einzelwerte vor Therapie bezogen auf Behandlungsmodus	33
3.1.2	VEGF-D Einzelwerte vor Therapie bezogen auf Behandlungsmodus	35
3.1.3	VEGF-Einzelwerte nach Therapie bezogen auf Behandlungsmodus	36
3.1.4	VEGF-D Einzelwerte nach Therapie bezogen auf Therapiemodus	37
<b>3.2</b>	<b>Baseline-Werte von VEGF und VEGF-D vor Therapiebeginn in</b>	
	<b>Abhängigkeit der Tumorcharakteristika</b>	<b>38</b>
3.2.1	Therapiearme	38
3.2.2	Tumorgrading	39
3.2.3	Tumorgröße	41
3.2.4	Hormonrezeptorstatus	43
3.2.5	Menopausenstatus	45
3.2.6	c-erbB2-Status	46
<b>3.3</b>	<b>Änderungen VEGF und VEGF-D (&gt; 10%) bezogen auf Gesamtmenge</b>	<b>48</b>
3.3.1	Änderungen von VEGF und VEGF-D in Abhängigkeit der Therapiearme	50
3.3.2	Änderungen von VEGF und VEGF-D in Abhängigkeit der	
	Tumorcharakteristika	52
3.3.2.1	Tumorgrading	52
3.3.2.2	Tumorgröße	54
3.3.2.3	Hormonrezeptorstatus	56
3.3.2.4	Menopausenstatus	58
3.3.2.5	c-erbB2-Status	59
<b>3.4</b>	<b>Änderungen von VEGF und VEGF-D (Baseline-Werte oberhalb der</b>	
	<b>Normgrenze)</b>	<b>61</b>
3.4.1	Änderungen von VEGF und VEGF-D (Baseline-Werte oberhalb der Norm)	
	in Abhängigkeit der Therapiearme	65
3.4.2	Änderungen von VEGF und VEGF-D (Baseline-Werte oberhalb der Norm)	
	in Abhängigkeit der Tumorcharakteristika	66
3.4.2.1	Tumorgrading	66
3.4.2.2	Tumorgröße	67
3.4.2.3	Hormonrezeptorstatus	69
3.4.2.4	Menopausenstatus	70
3.4.2.5	c-erbB-2 Status	71
<b>3.5</b>	<b>Vergleich zwischen ansteigenden und abfallenden Werten von</b>	
	<b>VEGF und VEGF-D</b>	<b>72</b>

---

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>73</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>92</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>97</b>
<b>11</b>	<b>Selbständigkeitserklärung .....</b>	<b>99</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>100</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist der häufigste maligne Tumor der Frau in der Welt mit über einer Million Neuerkrankungen pro Jahr. Etwa jede zehnte Frau wird im Laufe ihres Lebens mit der Diagnose Mammakarzinom konfrontiert. In Deutschland wird die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen auf etwa 57.000 geschätzt, davon sind etwa 24.000 Frauen jünger als 60 Jahre. Die Erkrankung ist für etwa 28 % aller Krebsneuerkrankungsfälle bei Frauen verantwortlich, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei ca. 63 Jahren liegt.

Auch bezüglich der Mortalität ist das Mammakarzinom in Deutschland die häufigste Krebstodesursache. Für das Jahr 2007 berichtet das Statistische Bundesamt Deutschland von 17.029 Sterbefällen aufgrund eines Mammakarzinoms, davon 98,5 % Frauen. Der Anteil an der gesamten tumorbedingten Mortalität beträgt ca. 17 %.

[1, 2, 3]

## 1.2 Ätiologie

Es gibt keine einheitliche Hypothese, die das Entstehen von Mammakarzinom umfassend erklären kann. In analytischen epidemiologischen Studien konnte eine Reihe von Risikofaktoren bestimmt werden, wie z.B. positive Familienanamnese, frühes Einsetzen der Menarche (< 12. Lebensjahr), später Eintritt in das Klimakterium (> 52. Lebensjahr), späte Erstgebärende (> 35. Lebensjahr), Nulligravidität, Nulliparität, Exposition gegenüber ionisierender Strahlung und Karzinogenen. Nach neuesten Daten erhöht eine exogene Hormonsubstitution ebenfalls das Risiko einer Brustkrebserkrankung. [4] Auch der Einfluss von Ernährungsgewohnheiten wurde in verschiedenen Studien untersucht.

Heute geht man davon aus, dass die Mehrzahl aller Mammakarzinome (90-95 %) sporadisch auftritt und dass etwa fünf bis zehn Prozent auf eine erbliche Ursache zurückzuführen sind. Für die genetisch prädisponierten Mammakarzinome sind hauptsächlich Mutationen der Tumorsuppressorgene BRCA1 (Breast Cancer Gene 1)

---

und BRCA2 (Breast Cancer Gene 2) verantwortlich. Die Inaktivierung der Tumorsuppression führt zur ungebremsten Zellproliferation und markiert ein Risiko für eine Frau mit einer BRCA1-Mutation von 80-85 % an Mammakarzinom und von 45-60 % an Ovarialkarzinom zu erkranken. Insgesamt sind für etwa die Hälfte aller erblichen Brustkrebsfälle die beiden Gene BRCA1 und BRCA2 verantwortlich. [5]

Die Entstehung einer Krebskrankheit beruht jedoch nicht auf einer einzigen Ursache, sondern auf einem Geflecht verschiedener Faktoren. [6, 7, 8]

### **1.3 Tumorangiogenese**

Unter Angiogenese versteht man die Aussprossung neuer Kapillaren aus bereits vorhandenen Blutgefäßen. Diese Gefäßneubildung ist ein notwendiger Prozess bei der Heilung von Gewebsverletzungen, bei embryonaler Einpflanzung oder beim weiblichen Reproduktionszyklus des adulten Organismus.

Angiogenese spielt jedoch auch eine wichtige Rolle bei der Vaskularisation maligner Tumoren, deren Wachstum und bei der Metastasenbildung. Tumoren sind als Gewebeneubildner primär nicht in das vorhandene Gefäßsystem integriert. Es besteht jedoch für das fortschreitende Wachstum ein großer Bedarf an Nährstoffen und Sauerstoff, der allein durch Diffusion aus dem umliegenden Gewebe nicht gedeckt werden kann. Nach einem initialen Wachstum des Tumorknotens auf circa 1-2 mm tritt ein Wachstumsstillstand ein. Der Tumor muss durch Angiogenese eine Verbindung zum Gefäßsystem schaffen, damit er die für sein weiteres Wachstum benötigten Nährstoffe erhält. Eine weitere Größenzunahme wäre sonst nicht mehr möglich und der Tumor würde „verhungern“. In diesem avaskulären Ruhezustand kann der Tumor Monate bis Jahre verharren, bis er irgendwann beginnt, Wachstumsfaktoren zu bilden und auszuschütten. Das Umschalten auf die Angiogenese wird als „angiogenetischer Switch“ bezeichnet. [9]

#### **1.3.1 Pro- und antiangiogene Faktoren**

Die Angiogenese läuft unter sehr kontrollierten Bedingungen ab. Reguliert wird sie von endogenen Angiogenesestimulatoren und Angiogeneseinhibitoren, die eine Balance aufrechterhalten. Als positive Regulatoren wurden Wachstumsfaktoren wie Fibroblast Growth Factor 1 und 2 (FGF-1, FGF-2), Transforming Growth Factor  $\alpha$  und  $\beta$

(TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ), Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ), Epidermal Growth Factor (EGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Hepatocyte Growth Factor (HGF), Interleukin 8 (IL-8) und Placenta Growth Factor (PIGF) beschrieben. Neben den erwähnten stimulierenden Mitogenen gibt es auch endogen vorkommende Inhibitoren der Angiogenese wie z.B. Angiostatin, Endostatin, Vasostatin, Interferon-alpha und -beta. Dies sind überwiegend proteolytische Spaltprodukte größerer Proteine, die selbst nicht antiangiogenetisch wirken. Viele dieser Vorläuferproteine sind Bestandteile der extrazellulären Matrix oder gehören zum Gerinnungssystem. [10, 11] Wird das Gleichgewicht in Richtung Angiogenesestimulation verschoben, bewirken die Mitogene die Bildung eines neuen Gefäßsystems.

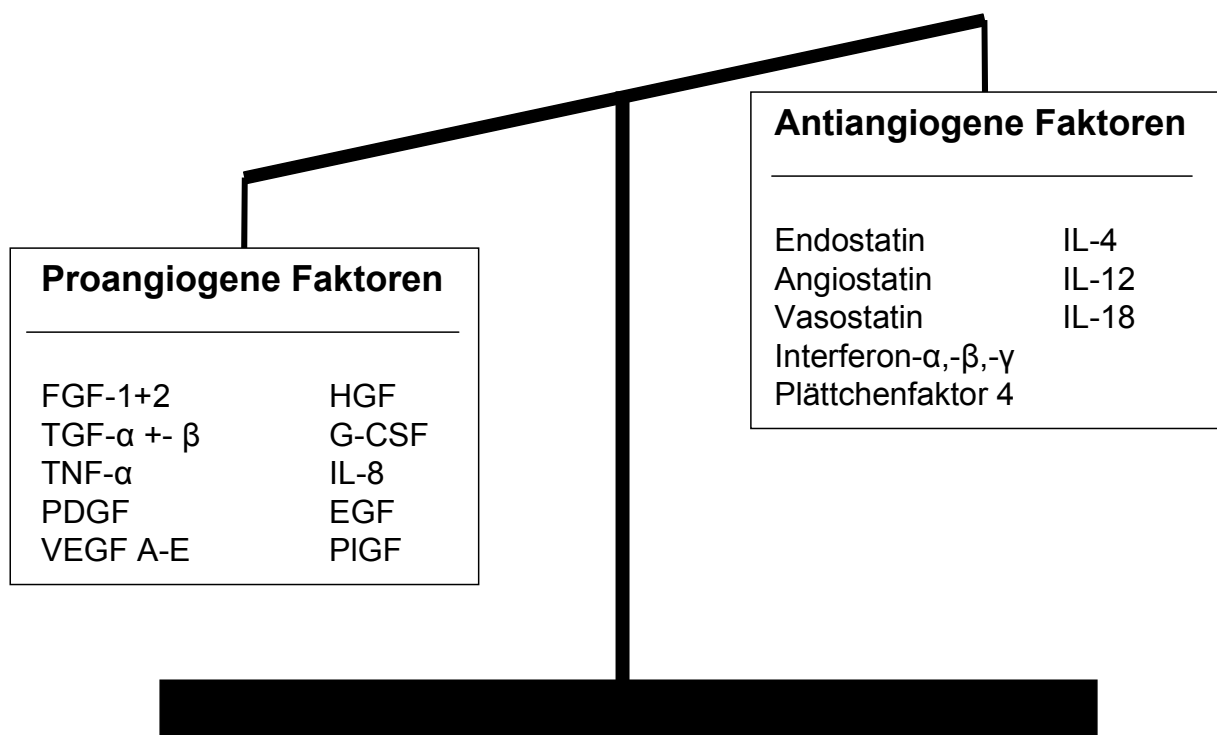


Abbildung 1: Schematische Gegenüberstellung von proangiogenen und antiangiogenen Faktoren

#### 1.4 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor wurde wegen seiner Fähigkeit die Permeabilität von Tumorgefäßen zu steigern anfangs Vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF) genannt. [12] VEGF, auch als VEGF-A bezeichnet, gehört zur Supergenfamilie



---

der Wachstumsfaktoren. Andere Mitglieder sind auch VEGF-B, -C, -D und -E sowie der Placenta Growth Factor (PlGF-1 + -2), die alle eine gewisse Homologie in der Aminosäuresequenz zu VEGF aufweisen [11]. So ist z.B. die Aminosäuresequenz von VEGF-B zu 43 % identisch mit der von VEGF-A, VEGF-C besitzt nur 30 % Homologie und PlGF ist mit dem humanen VEGF zu 46 % identisch. [13]

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor; VEGF-A) ist ein Protein, welches von vielen, verschiedenen Tumorzellen gebildet und sezerniert wird, wie z.B. von Karzinomen der Leber, des Gastrointestinaltraktes, der Lunge, der Nieren, der Ovarien, der Zervix, der Mamma und von kolorektalen Karzinomen. [11] Er ist einer der bedeutendsten Regulatoren der physiologischen als auch der pathologischen Angiogenese. VEGF spielt eine Schlüsselrolle bei der normalen Entwicklung von embryonalen Gefäßstrukturen, beim zyklischen Gefäßwachstum des weiblichen Reproduktionszyklus sowie bei der Kapillarbildung während Wundheilungsvorgängen. Aber auch bei der Entstehung von Krankheiten, die durch eine pathophysiologische Angiogenese charakterisiert sind, ist VEGF erheblich beteiligt, wie z.B. bei proliferativer Retinopathie, rheumatoider Arthritis und Psoriasis. [14] VEGF ist in der Lage, die Permeabilität spezifisch für Gefäßendothelzellen zu erhöhen, weshalb er auch den Namen VPF (Vaskulärer Permeabilitätsfaktor) trägt. [15] Eine weitere angiogenetische Eigenschaft besteht in seiner chemotaktischen Wirkung auf Endothelzellen, zirkulierende Monozyten und Leukozyten. Des Weiteren wird VEGF als „Überlebensfaktor“ für Endothelzellen betitelt, da er eine antiapoptotische Wirkung besitzt. [11]

#### **1.4.1 Die Rolle des VEGF in der pathologischen Angiogenese**

Aufgrund des proangiogenen Stimulus des VEGF nach Rezeptorbindung (siehe 1. in Abbildung 2 [16]) werden Endothelzellen bereits vorhandener Blutgefäße, die sich in der näheren Umgebung der Geschwulst befinden, aktiviert. Dies führt zu einer Erhöhung der Permeabilität der Kapillaren und damit zum Austreten von Plasmaeiweißen. Die Endothelzellen beginnen sich zu teilen und produzieren proteolytische Enzyme, so genannte Matrixmetalloproteasen (MMP), wodurch die extrazelluläre Matrix und die vaskuläre Basalmembran aufgeweicht wird (Abb. 2-2.). Im nächsten Schritt beginnt die Migration der Endothelzellen und deren Ausrichtung zum Tumor (Abb. 2-3.). Die Endothelzellen proliferieren und bilden gefäßähnliche

Röhrenstrukturen, die so lange wachsen bis sie in die bislang meist harmlose und noch winzige Geschwulst eindringen (Abb. 2-4.). Der Tumormasse können nun Sauerstoff und Nährstoffe zugeführt werden, wodurch sie rasch wachsen kann. Des Weiteren ist eine ausreichende Vaskularisierung die Voraussetzung dafür, dass entartete Zellen über die Blutbahn in andere Organe geschwemmt werden. Dort beginnt der Prozess der Tumorangiogenese von vorn. Es bilden sich Metastasen des Primärtumors.

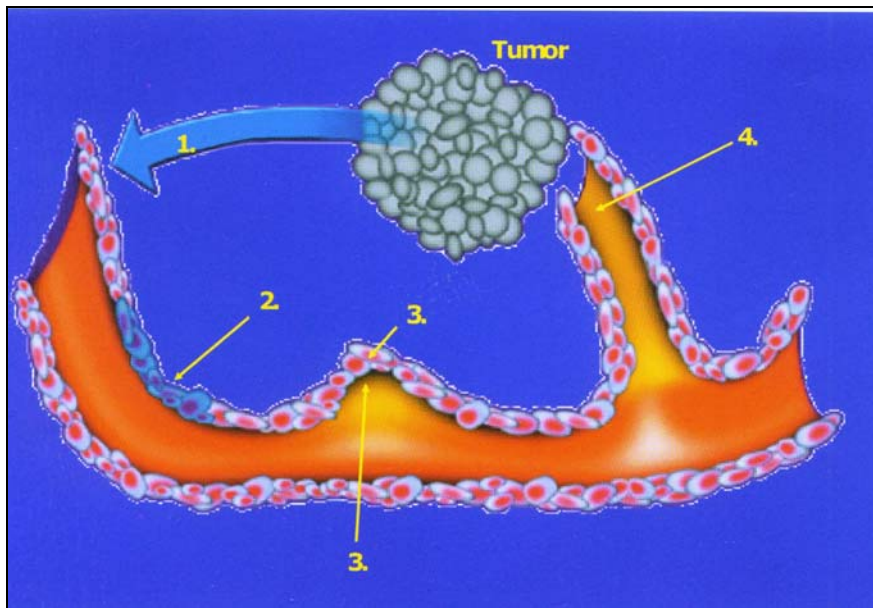


Abbildung 2: VEGF in der Angiogenese; Quelle: Unger, C.: Neuentwicklungen in der Brustkrebstherapie, K-Krebs-Journal, S. 8; iSSS 1610-2657; 2/04

#### 1.4.2 Sekretion und Regulation von VEGF

Sezerniert wird VEGF unter anderem von Thrombozyten, T-Lymphozyten, Megakaryozyten, Makrophagen, Leukozyten und Tumorzellen, wobei potenziell jedes Gewebe in der Lage ist, diesen Wachstumsfaktor zu produzieren. Die Synthese wird vor allem durch einen Abfall des lokalen Sauerstoff- und Glucosegehaltes stimuliert. [14] Starke VEGF-Expression wurde in hypoxischen Regionen gefunden, die sich meist in der Nähe von nekrotischen Arealen inmitten des Tumors befinden. [17]

Dabei wirkt der so genannte Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktor HIF-1 als Übermittler, in dem er an eine Hypoxie-sensible Untereinheit des VEGF-Gens bindet. [14] In vielen Tumorarten konnte jedoch erhöhte VEGF-Produktion auch in Zellen festgestellt werden, die in der Peripherie eines Tumors lokalisiert waren und die sich daher nicht in hypoxischen Zuständen befanden. Diese Hypoxie-unabhängige

---

VEGF-Produktion von Tumorzellen lässt sich auf die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie p53 oder auf exogen zugeführte Hormone oder Wachstumsfaktoren zurückführen. [17]

Aber auch bei Entzündungen sowie im Rahmen der Wundheilung wird die VEGF-Produktion und -Ausschüttung induziert. Weitere Stimuli für die Hochregulierung der VEGF-Expression sind Östrogen, Stickstoffoxid (NO) aber auch aktivierte Onkogene und ausgefallene Suppressorgene, wie z.B. p53. [11]

Weiterhin spielt der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER-2/neu oder auch c-erbB2) eine große Rolle. Seine Aktivierung und Überexpression in Tumorzellen (z.B. bei 20-25 % aller Mammakarzinome) korreliert mit Tumorprogression und Metastasierung durch stärkere Angiogenese. Eine wichtige Konsequenz von HER-2/neu-Signalen besteht in der Hochregulierung der VEGF-Expression. Diese positive Korrelation konnten Konecny et al. in ihrer klinischen Studie mit Brustkrebspatientinnen belegen. [18, 19]

Da bei vielen Tumoren die Expression von VEGF hochreguliert ist, kann der Gehalt an VEGF als negativer prognostischer Marker sowohl bezüglich des rezidivfreien Intervalls als auch des Gesamtüberlebens herangezogen werden. So korrelierten auch in der von Linderholm et al. durchgeführten Mammakarzinomstudie hohe VEGF-Werte mit einer signifikant kürzeren Überlebenszeit. [20]

Es besteht eine hohe Korrelation zwischen VEGF-Konzentrationen und Thrombozytenmenge, allerdings sind VEGF-Plasmawerte signifikant kleiner als Serumwerte. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Thrombozyten durch den Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) eine erhöhte VEGF-Freisetzung bewirkt und dass VEGF-Serumwerte somit „Thrombozyten-VEGF“ reflektieren und nicht aus der Tumorproduktion resultieren. Aus diesem Grund halten Verheul et al. es sinnvoller VEGF im Plasma zu bestimmen. Dieses wurde in der vorliegenden Studie getan. [21]

Die Induktion von VEGF kann auf zwei verschiedene Arten reguliert werden. Die Tumorzelle ist in der Lage, ihre eigenen Wachstumsfaktoren zu produzieren, die anschließend an die Rezeptoren der eigenen Zelle binden und sie somit stimulieren. Dieser Mechanismus der Wachstumsstimulation wird als „autokrin“ (Wirkung auf die eigene Zelle) bezeichnet. Als „parakrinen“ Weg versteht man die Synthese von VEGF und die Aktivierung der VEGF-Rezeptoren VEGF-R1 und -R2, die hauptsächlich auf

---

Endothelzellen exprimiert werden, die sich neben dem Tumor befinden (Wirkung auf benachbarte Zellen).

### 1.4.3 Molekulare Eigenschaften von VEGF und seinen Isoformen

Aus der mRNA des nativen VEGF-A Proteins entstehen durch alternative Splicevorgänge verschiedene Isoformen: VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>148</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub>, wobei sie nach resultierender Aminosäurenlänge bezeichnet werden. Von Lange et al. wurde eine weitere Splicevariante identifiziert: VEGF<sub>162</sub>. [22] Diese Isoformen unterscheiden sich außer in ihrer Molekularmasse auch in ihren biologischen Eigenschaften, so z.B. in ihrer Fähigkeit, Heparin- und Heparan-Sulfate zu binden. [17]

Die VEGF-Variationen 162, 165, 189 und 206 besitzen eine heparinbindende Domäne, die ihnen dabei hilft, sich an Zelloberflächen und an Heparan-Sulfat Proteoglykane der extrazellulären Matrix zu verankern. Außerdem spielen sie bei der Präsentation für VEGF-Rezeptoren eine große Rolle. VEGF<sub>165</sub>, die dominante Isoform, ist ein heterodimeres, basisches Glykoprotein mit einer molekularen Masse von 45 kDa. Es wird sezerniert, aber eine signifikante Menge bleibt an der Zelloberfläche und an der extrazellulären Matrix gebunden. VEGF<sub>121</sub> ist ein frei lösliches, nicht-heparinbindendes Protein. Im Vergleich zu VEGF<sub>165</sub> besitzt diese Isoform eine 50fach geringere mitogene Aktivität für vaskuläre Endothelzellen, was auf ihrer nicht vorhandenen heparinbindenden Fähigkeit beruht. Die anderen Isoformen erreichen die Zirkulation nicht in größeren Mengen, da sie wie VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub> an die extrazelluläre Matrix gebunden sind oder nur sehr spärlich sezerniert werden (VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>206</sub>). [14, 15]

### 1.4.4 Die VEGF-Rezeptoren

Für die biologische Wirkung des VEGF spielen die spezifischen Rezeptoren eine entscheidende Rolle, da diese das Signal in die Zellen vermitteln. VEGF bindet mit hoher Affinität an bislang zwei bekannte Tyrosin-Kinase-Rezeptoren: VEGF-R1 (Flt-1; fms-like-tyrosine kinase) [23] und VEGF-R2 (KDR; kinase insert domain-containing-receptor). [24]

Ein weiteres Mitglied der Rezeptorfamilie, VEGF-R3 (Flt-4), bindet nicht an VEGF, sondern an die Liganden VEGF-C und VEGF-D und wird vor allem von Lymphgefäßen exprimiert. [15]

---

VEGF-R1 und VEGF-R2 werden hauptsächlich von Endothelzellen gebildet, aber auch ein paar andere Zellarten produzieren einen oder beide dieser Rezeptoren. So wird der VEGF-1 Rezeptor auch von Trophoblasten, Monozyten und renalen Mesangiumzellen sezerniert. VEGF-R2 hingegen wird unter anderem von hämatopoetischen Stammzellen, Megakaryozyten und renalen Progenitorzellen exprimiert. Alle drei Rezeptoren sind durch sieben Immunglobulin(Ig)-ähnliche Domänen in ihrem extrazellulären Bereich, eine membrandurchspannende Region und durch eine regulierbare Tyrosinkinase-Domäne in ihrem intrazellulären Teil charakterisiert (siehe Abbildung 3). Sie werden deshalb als neue Untergruppe der Tyrosin-Kinase-Rezeptor Familie angesehen. [17]

Als Ko-Rezeptoren wurden Neuropilin-1 (NP-1) und Neuropilin-2 (NP-2) aus der Collapsin/Semaphorin Familie bezeichnet, da sie zum einen an die VEGF-Rezeptoren binden und zum anderen sich an die Heparin-Bindungsstellen der entsprechenden VEGF-A Isoformen heften (siehe Abbildung 3). VEGF<sub>165</sub> kann im Gegensatz zu VEGF<sub>121</sub> an Neuropilin-Rezeptoren binden, was womöglich die Tatsache erklärt, dass diese Isoform ein potenteres Mitogen als VEGF<sub>121</sub> darstellt. Die Neuropiline besitzen nur eine kurze intrazelluläre Domäne und sind daher unfähig als unabhängiger Rezeptor zu agieren. Es wurde beobachtet, dass die Neuropilin-VEGF-Bindung ohne die Anwesenheit der Tyrosin-Kinase Rezeptoren keine Transduktion von biologischen Signalen induzieren kann. Erst wenn diese Verbindung einen Komplex mit dem VEGF-Rezeptor eingeht, wird die Wirkung des heparinbindenden VEGF-A auf die Zielzelle vermittelt. [14, 17, 25]

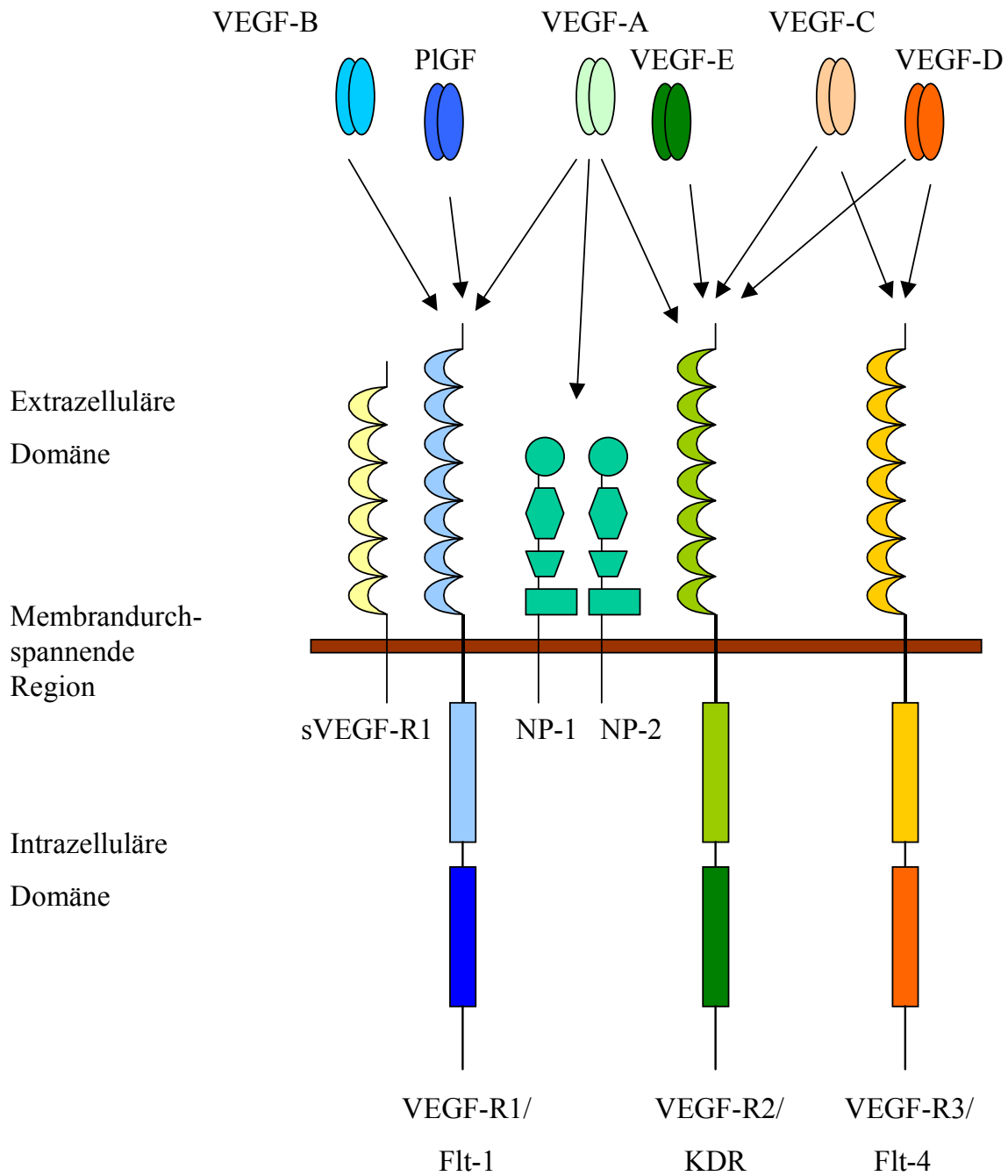


Abbildung 3: Schematische Darstellung der VEGF-Rezeptoren, ihrer Liganden und der Neuropiline

---

Durch die Bindung des Liganden VEGF wird eine Homo- oder Heterodimerisierung der Rezeptoren induziert. Die dabei ablaufende Konformationsänderung führt über eine Autophosphorylierung der inneren Domäne des Rezeptors zur Aktivierung der Tyrosinkinase. Anschließend binden Adapterproteine (second-messenger-Proteine), wie z.B. die phosphorylierte Form der Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ), die Proteinkinase C (PKC), die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und die Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) an den phosphorylierten Wachstumsfaktorrezeptor. Die Aufgabe der second-messenger-Proteine besteht in der Weiterleitung der biologischen Wirkungen über die intrazellulären Signalkaskaden. [26, 27 ]

Marmé entdeckte, dass insbesondere die Rezeptoren VEGF-R1 und VEGF-R2 erst nach ihrer Aktivierung durch VEGF in großen Mengen auf der Endotheloberfläche erscheinen. Unter physiologischen Umständen besitzen Endothelzellen der Gefäße nur wenige VEGF-Rezeptoren. Diese geringe Anzahl ist jedoch ausreichend, um das vom Tumor ausgeschüttete VEGF zu binden. In der Folge werden weitere Rezeptoren exprimiert. [28] Auch wurde beobachtet, dass die Expression von VEGF-R1 und VEGF-R2 bei Hypoxie hochreguliert wird, wenn auch in einem geringeren Ausmaß als die des VEGF. [17]

Die Signaltransduktionskaskade, die durch VEGF-R1 und VEGF-R2 verursacht wird, unterscheidet sich in geringem Maße. Die Aktivierung des VEGF-R2 Rezeptors (KDR) durch VEGF führt zur mitogenen Antwort, zur Zellmigration und -proliferation und fördert das Überleben von Endothelzellen. Die Aktivierung des VEGF-R1 führt ebenfalls zur Zellmigration, scheint aber keine Zellproliferation zu induzieren, wie es bei der VEGF-R2 Aktivierung der Fall ist. [17]

Vom VEGF-R1 Rezeptor gibt es zwei durch alternatives Splicen der mRNA entstehende Formen. Der membrangebundene Flt-1 mit der Fähigkeit der Signaltransduktion und ein natürlich vorkommender, löslicher sFlt-1, der aus sechs der sieben extrazellulären Ig-ähnlichen Schleifen des VEGF-R1 aufgebaut ist (siehe Abbildung 3). Dieses endogene Rezeptorfragment weist eine hohe Affinität zu allen VEGF-Isoformen auf und ist in der Lage die Signaltransduktion durch Ligandenbindung fast vollständig (82 %) zu verhindern. Somit ist an löslichem sFlt-1 gebundenes VEGF kaum mehr biologisch aktiv und sFlt-1 stellt einen perfekten Antagonisten für die Bioverfügbarkeit des VEGF dar.

---

Auch vom VEGF-R2 Rezeptor existiert eine lösliche Variante (sKDR), die jedoch kaum biologisch wirksam ist und nur teilweise die Zellmigration verhindern kann. Die Bindung von VEGF an die lösliche sKDR Form, nicht jedoch an sFlt-1, geschieht heparinabhängig. [29, 30]

Die drei Rezeptoren zeigen unterschiedliches Bindungsverhalten zu den Liganden:

- VEGF-R1 bindet VEGF-A, -B und PlGF.
- VEGF-R2 bindet VEGF-A, -C, -D und -E.
- VEGF-R3 ist dafür verantwortlich, die Effekte von VEGF-C und VEGF-D auf die lymphatischen Endothelzellen zu vermitteln. [31]

#### **1.4.5 VEGF-D**

Erstmals identifiziert und charakterisiert wurde VEGF-D von Yamada et al. 1997. [32] VEGF-D spielt eine Rolle bei der embryonalen Entwicklung, jedoch ist er auch in der Tumorangio- und Lymphangiogenese involviert. Er spielt eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Lymphgefäßen und bei der Verbreitung von lymphogenen Metastasen. [33] White et al. entdeckten hochgradige VEGF-D Expression bei kolorektalen Karzinomen und zeigten, dass VEGF-D einen unabhängigen prognostischen Marker bezogen auf das rezidivfreie und das Gesamtüberleben darstellt. [34] Yang et al. konnten höhere VEGF-D Werte bei Mammakarzinompatientinnen verglichen mit nichtmalignen Brustgewebeproben finden. Auch zeigte sich eine positive Korrelation zwischen VEGF-D und c-ErbB2 Expression. [35]

Ebenfalls zeigten Nakamura et al. in ihrer Mammakarzinom-Studie, dass hohe VEGF-D Werte signifikant mit Lymphknotenmetastasierung und hoher c-erbB2 Expression korrelieren. Allerdings erkannte man keine Beziehung zwischen VEGF-D und Hormonstatus, so dass diese Arbeitsgruppe annimmt, dass VEGF-D nicht durch Östrogen oder Progesteron reguliert wird. Des Weiteren waren hohe VEGF-D Werte mit einem kürzeren rezidivfreien Intervall sowie mit geringerem Gesamtüberleben assoziiert. VEGF-D könnte somit einen neuen prognostischen Biomarker bei Brustkrebspatientinnen darstellen. [33]



VEGF-D weist strukturelle als auch funktionelle Ähnlichkeiten zu VEGF-C auf (48 % identische Aminosäuresequenz) und beide Wachstumsfaktoren stellen einen Liganden für VEGF-R2 und VEGF-R3 dar. [13, 26]

VEGF-D, welches anfangs aus Fibroblasten gesunder Mäuse isoliert wurde, trug zuerst den Namen c-fos-induzierender Wachstumsfaktor wurde aber später in VEGF-D umbenannt. Das initial synthetisierte VEGF-D besteht aus einem N- und C-terminalen Propeptid, die eine zentrale rezeptorbindende, VEGF homologe Domäne (VHD) umgeben. Diese ungespaltene Form bindet vorzugsweise an den Rezeptor VEGF-R3 (Flt-4) und besitzt nur geringe Affinität zu KDR. Nach proteolytischer Abspaltung der N- und C-terminalen Enden bindet das nun freie VHD an VEGF-R3 und mit wachsender Affinität auch an VEGF-R2 (KDR). [26, 33]

Achen et al. bewiesen in unterschiedlichen Studien, dass VEGF-D zwar einen aktivierenden Liganden für VEGF-R2 und VEGF-R3 darstellt, jedoch nicht an den Rezeptor R1 bindet und dass VEGF-D in parakriner Weise von Tumorzellen sezerniert wird. [13, 36]

## **1.5 Adjuvante Chemotherapie**

Der Terminus *adjuvans* leitet sich aus dem lateinischen Wort *adjuvare* ab und bedeutet „helfen“ oder „unterstützen“. Ein Adjuvans ist demnach ein die Wirkung einer Arznei oder einer Therapie verstärkender bzw. unterstützender Zusatz.

Unter adjuvanter Chemotherapie versteht man die zytostatische Behandlung nach vorhergehender operativer Entfernung des primären Mammatumors und der axillären Lymphknoten. Zwar besteht laut Definition Tumorfreiheit, doch muss man davon ausgehen, dass sich zum Zeitpunkt der Operation bereits okkulte lymphogene und hämatogene Mikrometastasen im Organismus befinden können, die durch klinische, technische oder histopathologische Untersuchungen nicht nachzuweisen sind. Ziel der adjuvanten Chemotherapie ist die Eradikation dieser vermuteten Mikrometastasierung. [8, 37]

---

Aufgrund der metaanalytischen Daten der „Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (EBCTCG)“, die 133 randomisierte Studien mit insgesamt 75.000 Frauen auswertete, gilt als gesichert, dass eine adjuvante Chemotherapie sowohl die Rückfallrate als auch die Mortalitätsrate hoch signifikant zu senken vermag. Auch zeigten diese Ergebnisse die Überlegenheit einer Polychemotherapie gegenüber einer Monochemotherapie. [38]

## **1.6 Prognostische Faktoren**

### **1.6.1 Tumorgröße**

Um den Verlauf einer Krankheit sicher und zuverlässig vorhersagen oder zumindest abschätzen zu können, versucht man prognostische Faktoren zu bestimmen, die von therapieentscheidender Bedeutung sind. Zu den wichtigsten „klassischen“ Parametern zählt erwiesenermaßen die Größe des Primärtumors. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten den Zusammenhang zwischen Tumorgröße, Rezidivwahrscheinlichkeit und Überlebensrate. Je geringer die primäre Tumorausdehnung ist, desto kleiner ist die Rezidivwahrscheinlichkeit und umso besser sind die Heilungschancen. [6] Die Arbeitsgruppe von Quiet et al. untersuchte 826 Patientinnen mit nodalnegativem Mammakarzinom. Anhand ihrer Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass 79 % der Frauen mit Tumoren kleiner 2 cm ein krankheitsfreies 20-Jahre-Intervall aufwiesen. Die mediane Zeit bis zum Rezidiv beläuft sich bei dieser Tumorgröße auf 48 Monate. Bei Tumoren größer 2 cm hingegen haben lediglich 64 % der Patientinnen ein krankheitsfreies 20-Jahre-Intervall und durchschnittlich nur 37 Monate bis zu einem Rezidiv. [39]

### **1.6.2 Lymphknotenstatus**

Besondere Bedeutung hinsichtlich der prognostischen Signifikanz bei Patientinnen mit Mammakarzinom hat das Fehlen oder Vorhandensein axillärer Lymphknotenmetastasen wie Abbildung 4 zeigt. Zur exakten Erfassung des Lymphknotenstatus müssen mindestens 10 axilläre Lymphknoten (LK) untersucht werden. Viele Arbeitsgruppen wie z. B. Fisher et al. bewiesen mit ihren Studienergebnissen die umgekehrte Proportionalität zwischen Ausmaß des Lymphknotenbefalls und

Überlebenszeit der Patientinnen. Dabei werden Mammakarzinompatientinnen in vier Subgruppen unterteilt: nodalnegativ, 1-3 befallene LK, 4-9 befallene LK und > 9 befallene LK.

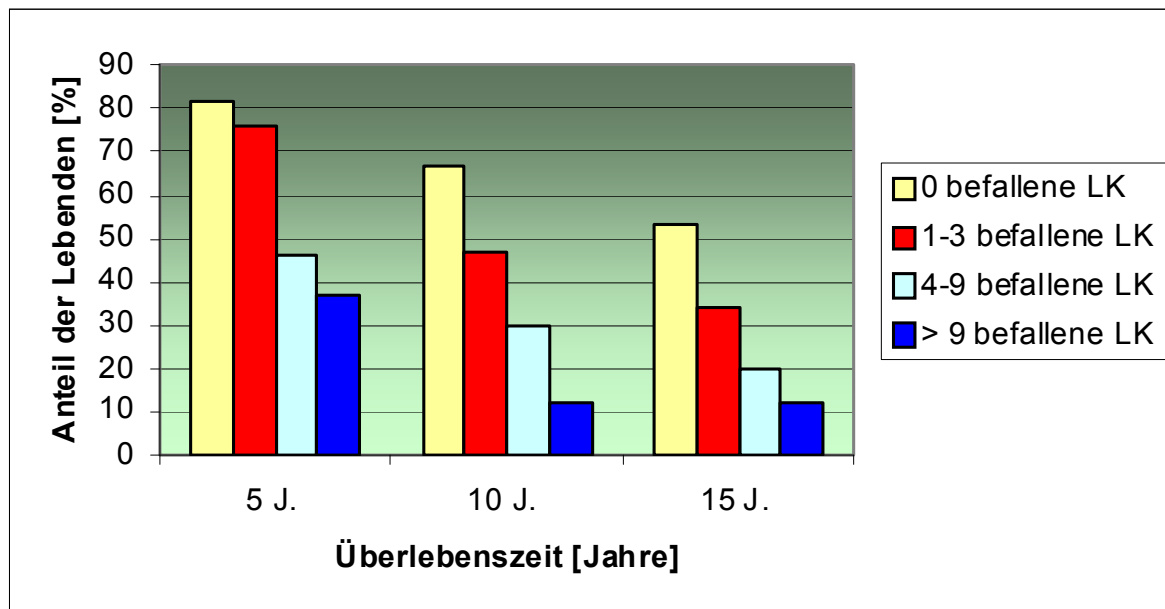


Abbildung 4: Überleben nach 5, 10 und 15 Jahren in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall

Außer der Anzahl der karzinomatös infiltrierten Lymphknoten ist auch deren Bezug zu ihrer Umgebung von prognostischer Bedeutung. So stellt z.B. auch ein bereits vorhandener Kapseldurchbruch eine verschlechternde Prognose dar.

### 1.6.3 Histologisches Grading (Differenzierungsgrad)

Des Weiteren spielt auch das histologische Grading des Primärtumors eine wichtige Rolle. Das sich bewährende Grading-Verfahren nach Bloom und Richardson betrachtet invasive Karzinome nach histopathologischen Kriterien wie z.B. Mitoserate und Kernpleomorphie und klassifiziert diese in

- Grad 1 = gut/hoch differenziert
- Grad 2 = mäßig differenziert
- Grad 3 = schlecht differenziert.

#### **1.6.4 Hormonrezeptorstatus**

Auch gehört der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus (ER, PR) zu den wesentlichen Prognoseparametern. Die Bedeutung besteht in der in mehreren Untersuchungen nachgewiesenen längeren Gesamtüberlebenszeit der Frauen mit hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen. [6] Studienergebnisse von Osborne et al. zeigten, dass der Grund hierfür in der besseren Ansprechrate und Wirksamkeit auf endokrine Therapieformen nach Auftreten einer Metastasierung zu finden ist. Des Weiteren stellt die Abwesenheit von Östrogenrezeptoren beim Mammakarzinom sowohl einen wichtigen prognostischen Indikator für eine hohe Rezidivrate als auch für eine kürzere Überlebenszeit dar. [40]

#### **1.6.5 HER2/neu (c-erbB2)**

HER2/neu gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren. Es handelt sich um einen transmembranären Rezeptor vom Tyrosinkinase-Typ an Tumorzellen. Bei etwa 25-30 % der invasiven Mammakarzinome ist dieser Rezeptor überexprimiert, was mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf und einer schlechten Überlebensprognose assoziiert ist. Gleichzeitig stellt eine HER2/neu-Überexpression auch ein therapeutisches Zielprotein dar, da Patientinnen mit HER2/neu-positiven Tumoren von einer Behandlung mit dem humanisierten Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) profitieren. [5]

#### **1.6.6 Alter der Patientin**

Einen relativ neuen wenn auch sehr wichtigen prädiktiven Parameter stellt das Alter der Patientin bei Diagnosestellung dar. Verschiedene Arbeitsgruppen, wie z.B. die von Walker et al. beschrieben eine höhere Aggressivität von Mammakarzinomen bei Frauen, die jünger als 35 Jahre alt sind verglichen mit der Kontrollgruppe (50-67 Jahre alt). Auch seien Tumoren von jungen Patientinnen schlechter differenziert, zeigen höhere Proliferationsraten und weisen eine niedrigere Inzidenz von Östrogen- und Progesteronrezeptor-Positivität auf. [41]

Auch Goldhirsch et al. schlossen auf ein aggressiveres, biologisches Tumorverhalten mit kürzerer Überlebensdauer bei Mammakarzinomfällen in jungem Alter (< 35 Jahre) aufgrund einer stärkeren Gefäßinvasion und einer verminderten Hormonrezeptorexpression. Analysen der International Breast Cancer Study Group (IBCSG) zeigten,

dass junge Frauen mit ER-positiven Tumoren eine signifikant schlechtere Prognose als Patientinnen mit ER-negativen Tumoren haben. Ein möglicher Grund hierfür liegt darin, dass antiöstrogene Therapie bei jungen Patientinnen nur einen sehr moderaten Effekt zeigt. Bei älteren Frauen hingegen waren die Prognosen in beiden Subgruppen ähnlich. [42]

Zusammenfassend kann man anhand dieser Prognosefaktoren Mammakarzinompatientinnen, wie in Tabelle 1 ersichtlich, in drei verschiedene Risikogruppen einteilen. Gemäß den St.-Gallen-Empfehlungen von 2007 existiert eine Einteilung in eine low-risk-Gruppe, intermediate-risk- und in high-risk-Gruppe. [43]

Prognosefaktoren	Niedriges Risiko	Mittleres Risiko		Hohes Risiko
Nodalstatus	nodalnegativ <i>und</i>	nodalnegativ <i>und</i>	nodalpositiv <i>und</i>	nodalpositiv <i>und</i>
Tumorgröße	pT ≤ 2,0 cm <i>und</i>	pT > 2,0 cm <i>oder</i>		
Grading	G1 <i>und</i>	G 2-3 <i>oder</i>		
Hormonrezeptoren	ER u./o. PR pos. <i>und</i>	ER u. PR neg. <i>oder</i>	ER u./o. PR pos. <i>und</i>	ER u. PR neg. <i>oder</i>
Her2/neu	negativ <i>und</i>	positiv <i>oder</i>	negativ	positiv
Alter	≥ 35 Jahre	< 35 Jahre		

Tabelle 1: Einteilung des Mammakarzinoms in Risikogruppen nach St. Gallen 2007

## 1.7 Paclitaxel (Taxol®) in der Behandlung des Mammakarzinoms

Durch die antitumorale Wirkung der Taxane erfährt die Therapie des Mammakarzinoms bezüglich der Verlängerung des Überlebens und Verbesserung der Lebensqualität der Patientinnen enorme Fortschritte. Henderson et al. wertete Ergebnisse der CALGB-344-Studie aus, in der insgesamt 3.170 Frauen mit nodalpositivem Mammakarzinom eingeschlossen waren. Auswertungen bestätigten die signifikante Verbesserung des krankheitsfreien Überlebens sowie des Gesamtüberlebens bei

---

zusätzlicher Behandlung mit Paclitaxel nach Anthrazyklin-basierter Chemotherapie verglichen zur alleinigen AC-Gabe. [44]

Die Forschungsgruppe von Hayes et al. bewies anhand ihrer Daten von 3.121 nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen die Überlegenheit der Behandlung mit Paclitaxel zusätzlich zur Chemotherapie mit Doxorubicin und Cyclophosphamid. Bezogen auf krankheitsfreies Überleben und Gesamtüberleben profitierten diejenigen Frauen vom paclitaxelhaltigen Regime die an einem HER2-positiven und östrogenrezeptornegativen Tumor erkrankt waren. [45]

## **1.8 Dosisintensivierung der Therapie**

Dosisintensivierung kann man zum einen durch eine Steigerung der Einzeldosis und zum anderen durch eine Verkürzung des Therapieintervalls (Dosisverdichtung) erreichen. Begründet wird dieses Konzept auf der Norton-Simon-Hypothese (siehe Abbildung 5), die von einem Wachstumsverhalten ausgeht, welches sich mit der Tumorgroße ändert. So zeigen kleine Tumore eine schnelle Zellwachstumsrate, während größere Tumore in der Therapiepause nur langsam proliferieren. Da Mammakarzinome aus vielen heterogenen Zellgruppen mit verschiedenen Sensitivitäten bezüglich Chemotherapie bestehen, sind selbst sehr effektive Behandlungen nicht in der Lage, alle Tumorzellen zu eliminieren, da einige dieser Zellklone aufgrund der Gompertzianischen Kinetik sehr schnell nachwachsen. Aufgrund dieses Modells ist man der Auffassung, dass man durch Intervallverkürzung eine größere Effektivität der Chemotherapie erreicht, da so das Regenerationsintervall für die malignen Zellen zwischen den Behandlungszyklen so gering wie möglich gehalten werden kann. [46]

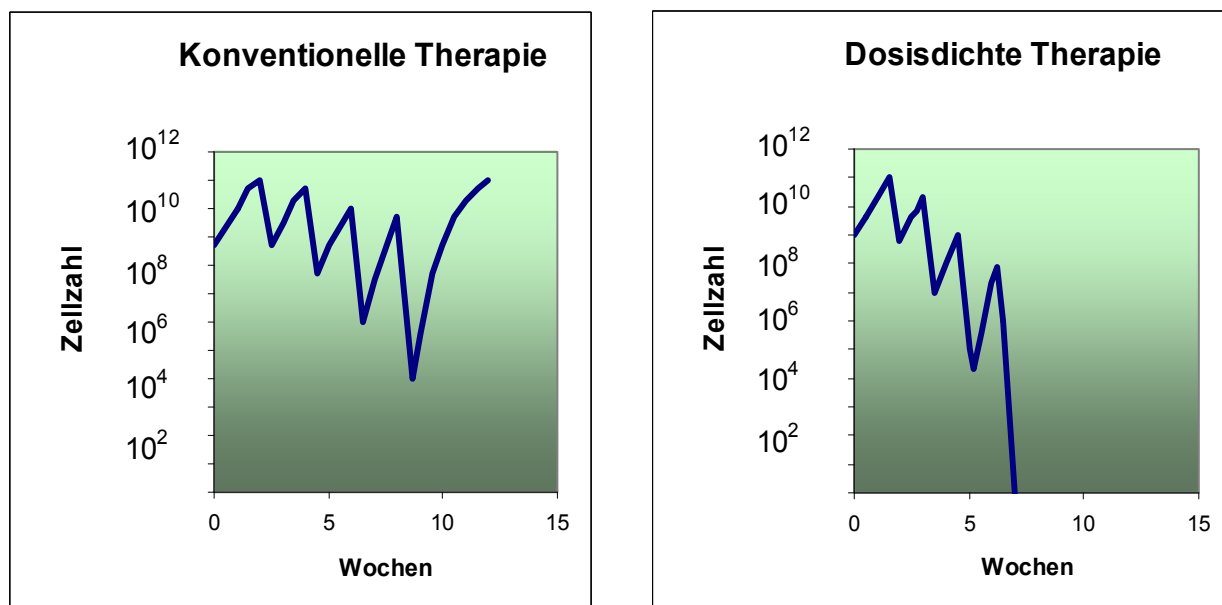


Abbildung 5: Modell von Norton und Simon

Verschiedene Forschungsgruppen konnten auch den Benefit der Dosissteigerung anhand ihrer Studienergebnisse belegen. So profitierten beispielsweise bereits bei Budmann et al. die chemotherapeutisch mit höheren Dosen behandelten Mammakarzinompatientinnen sowohl hinsichtlich des Gesamtüberlebens als auch eines längeren krankheitsfreien Überlebens (66 % vs. 56 % in der niedrig dosiert behandelten Gruppe). [47]

In der Studie der „Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie (AGO)“, die Möbus et al. auswertete, wurden deutschlandweit insgesamt 1.284 Mammakarzinompatientinnen mit mindestens vier befallenen Lymphknoten eingeschlossen. Sie wurden entweder dosisintensiviert oder konventionell chemotherapeutisch behandelt. Im experimentellen Arm erhielten die Frauen drei Zyklen Epirubicin, Paclitaxel und Cyclophosphamid im zweiwöchentlichen Intervall (ETC q14), im Standardarm wurden die Frauen mit vier Zyklen Epirubicin/Cyclophosphamid gefolgt von vier Zyklen Paclitaxel (EC→T q21) behandelt. Nach fünf Jahren zeigte sich ein signifikanter Unterschied von 8 % im rezidivfreien Überleben (70 % versus 62 %;  $p = 0,0016$ ) und von 5 % im Gesamtüberleben (82 % vs. 77 %;  $p = 0,029$ ). [48]

Auch von Citron et al. liegen interessante Untersuchungsergebnisse der CALGB-9741-Studie vor, in der insgesamt 2.005 Patientinnen mit durchschnittlich drei befallenen Lymphknoten eingeschlossen wurden. Davon wurden 1.973 Frauen (> 98 %) postoperativ in vier verschiedenen Armen behandelt und erhielten dosisintensivierte oder sequentielle Kombinationen einer Chemotherapie (A→C→T alle 3 Wochen, A→C→T alle 2 Wochen, AC→T alle 3 Wochen, AC→T alle 2 Wochen). Nach einer maximalen Nachbeobachtungszeit von fünf Jahren zeigte sich für die dosisintensiviert behandelten Frauen (2-Wochen-Intervall) sowohl ein statistisch signifikant besseres rezidivfreies Überleben als auch ein Benefit bezüglich des Gesamtüberlebens verglichen mit den anderen Frauen (.4-Jahres-rezidivfreies-Intervall: 82 % versus 75 %, 3-Jahres-Gesamtüberleben: 92 % versus 90 %,  $p = 0,013$ ). Dieser Vorteil der Dosisintensität wurde nicht von einer höheren Toxizitätsrate begleitet. Ein p-Wert von 0,004 (0,3 % versus 1,5 %) zeigt sogar, dass dosisintensivierte Chemotherapie das Risiko eines kontralateralen Mammakarzinoms signifikant zu reduzieren vermag. [49]

Neueste Daten von Untch et al. liefern Ergebnisse von insgesamt 668 Brustkrebspatientinnen mit Tumoren größer 3 cm ( $n = 567$ ) oder inflammatorischen Karzinomen ( $n = 101$ ). Verglichen wurde in dieser Hochrisikogruppe eine präoperative Chemotherapie mit Epirubicin und Paclitaxel alle drei Wochen mit einer dosisintensivierten, zweiwöchentlichen Gabe. Alle Patienten erhielten postoperativ drei Zyklen Cyclophosphamid, Methotrexat und Fluorouracil.

Zusammenfassend profitierten bezüglich pathologischer Komplettremission ( $p = 0,008$ ), krankheitsfreiem Überleben ( $p = 0,011$ ) und Gesamtüberleben ( $p = 0,041$ ) vor allem Frauen mit nicht-inflammatorischem Karzinom vom dosisintensivierten Regime.

Allerdings war dieser therapeutische Benefit mit einer signifikant höheren Rate an Toxizitäten wie Anämie, Thrombozytopenie oder Infektionen assoziiert. [50]

Aufgrund der Daten von Möbus et al., Citron et al. und Untch et al. scheint die dosisintensivierte Chemotherapie, in Anlehnung an das mathematische Modell von Norton-Simon, einen Vorteil für die Patientinnen bezüglich des rezidivfreien als auch des Gesamtüberlebens darzustellen.



## 1.9 Sequenzierung der Therapie

Auch durch Sequenzierung (Abfolge) der Zytostatikagabe kann der Therapieerfolg positiv beeinflusst werden. Das dazu bestehende theoretische Modell von Norton wurde in verschiedenen klinischen Studien aufgegriffen und angewendet. Das National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) konnte bei 2.305 untersuchten nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen keine signifikante Verbesserung der Behandlungsergebnisse hinsichtlich rezidivfreiem und Gesamtüberleben bei sequentieller Therapie aufzeigen. [51]

Auch bei den von Citron et al. beschriebenen Studienergebnissen von insgesamt 1.973 chemotherapeutisch behandelten nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen konnte keine Überlegenheit einer sequentiellen gegenüber einer gleichzeitig verabreichten Chemotherapie festgestellt werden. [49]

## 1.10 Schematische Darstellung des Studiendesigns

In der Therapieoptimierungsstudie (siehe Abbildung 6) wird geprüft, ob eine dosisintensivierte Therapie mit den wirksamsten Monosubstanzen in der Therapie des Mammakarzinoms - Anthrazyklin (hier: Farmorubicin) und Paclitaxel (Taxol®) - die Überlebensrate weiter verlängern kann. Es wurden dazu Patientinnen mit ein bis drei befallenen Lymphknoten in die adjuvante Therapiesituation eingeschlossen.

Aufgrund von Ergebnissen von Henderson et al. fungiert als Standard- bzw. Vergleichsarm (Arm A) das Therapieschema Anthrazyklin (hier: Farmorubicin) plus Cyclophosphamid gefolgt von Paclitaxel jeweils im Abstand von 21 Tagen.

Im experimentellen, dosisintensivierten Arm B wird den Patientinnen Farmorubicin gefolgt von Paclitaxel im Abstand von 14 Tagen verabreicht. Zusätzlich erhalten die in diesen Arm eingeteilten Frauen einen Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF). Durch den Einsatz von G-CSF (Figrastim, Neupogen®) kann die Rate von febrilen Neutropenien, die aufgrund der immunsuppressiven Wirkung einer Chemotherapie resultieren, erheblich gesenkt werden. Durch die in kürzerer Zeit wieder

hergestellte Immunkompetenz profitieren die Patientinnen bei verkürztem Zeitintervall der Chemotherapie beispielsweise bezüglich verbesserter Lebensqualität und kürzerer Hospitalisierung.

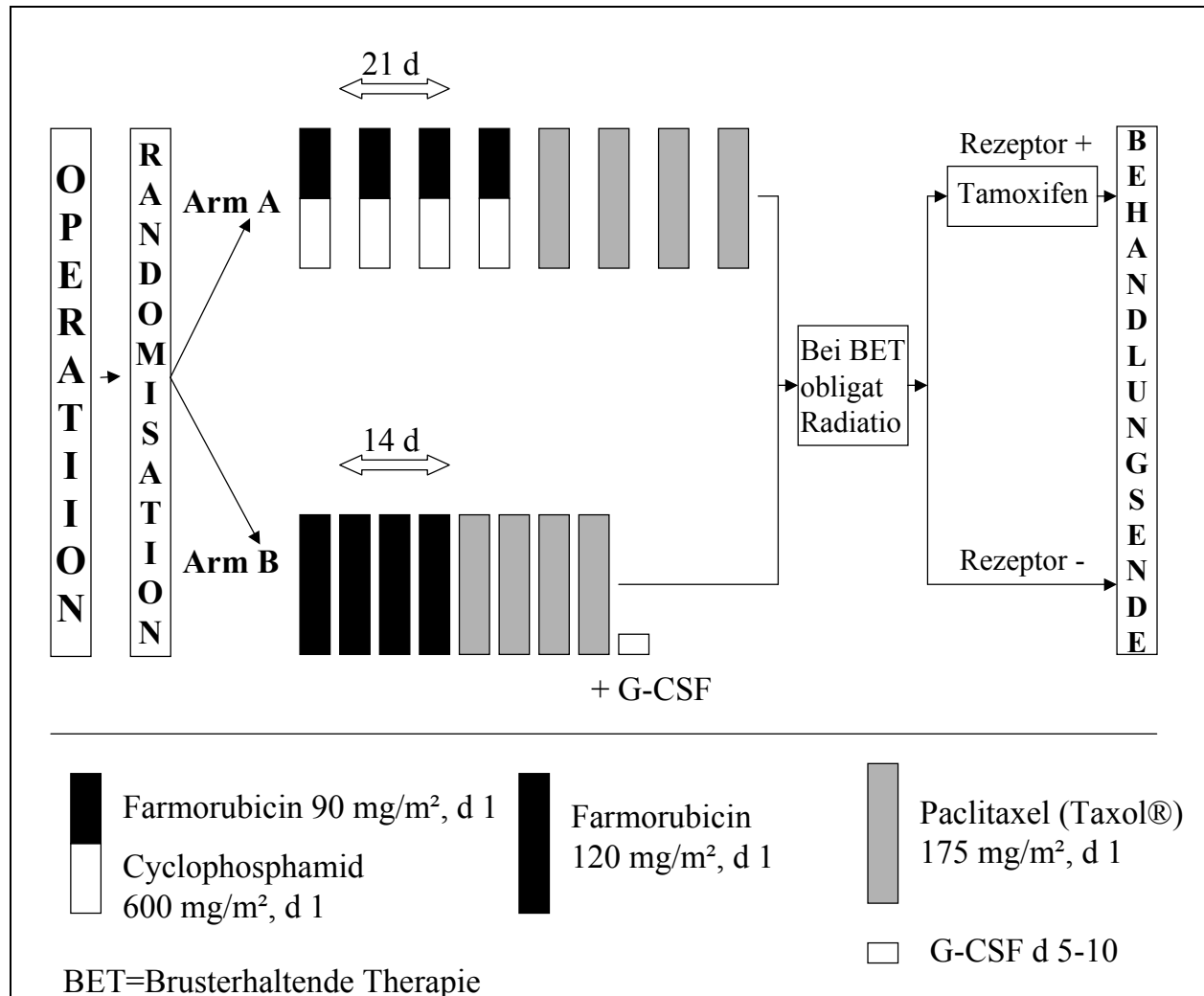


Abbildung 6: Schematische Darstellung der ASG-Studie (1-3 positive Lymphknoten)

Da VEGF und VEGF-D als essentiell für das Tumorwachstum betrachtet werden, gelten diese beiden im Blut zirkulierenden Angio- und Lymphangiogenesefaktoren als zu untersuchende Laborparameter in der vorliegenden Studie. Sie werden im Plasma von Patientinnen in beiden Armen jeweils vor und nach Beendigung der Chemotherapie gemessen. Es stellt sich die Frage, ob die Höhe der Werte dieser beiden Wachstumsfaktoren nach Behandlung einen Rückschluss auf die Effektivität der beiden verschiedenen Chemotherapien erlaubt.

Das Ziel der Studie bestand darin, die prognostische Rolle von VEGF und VEGF-D hinsichtlich der klinischen Entwicklung zu evaluieren und eine mögliche Korrelation mit anderen klinisch-pathologischen Variablen wie Tumorgröße, Grading, Hormonrezeptor-, Menopausen- und c-erbB2-Status zu beleuchten.

Des Weiteren überprüfte die Arbeitsgruppe, ob der Verlauf der VEGF- und VEGF-D Werte die angenommene Überlegenheit der dosisintensivierten Chemotherapie gegenüber einer konventionellen Behandlung widerspiegelt.

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

In den Jahren 2000 bis 2003 wurden insgesamt 142 Patientinnen mit Mammakarzinom und ein bis drei befallenen Lymphknoten der Stadien IIa und IIIa im Rahmen eines wissenschaftlichen Begleitprogramms einer prospektiv randomisierten Phase III Studie (NOGGO-Trial: Nordostdeutsche Gesellschaft für Gynäkologische Onkologie) untersucht.

Die 142 Patientinnen wurden entsprechend der zweiarzig konzipierten Studie in Arm A (Standardtherapie) und dosisintensiviert in Arm B aufgeteilt und therapiert:

- 73 Patientinnen in Arm A: 4 Zyklen Farmorubicin und Cyclophosphamid (90/600 mg/m<sup>2</sup>, d1, q21) gefolgt von 4 Zyklen Paclitaxel (175 mg/m<sup>2</sup>, d1, q21)
- 69 Patientinnen in Arm B: 4 Zyklen Farmorubicin (120 mg/m<sup>2</sup>, d1, q14) gefolgt von 4 Zyklen Paclitaxel (175 mg/m<sup>2</sup>, d1, q14) unter obligatem CSF-Support

### 2.2 Patientencharakteristika

Das mediane Alter der Patientinnen beträgt 54 Jahre (Spanne: 25-72 Jahre). Zum Zeitpunkt der Randomisierung waren von den 142 in die Studie eingeschlossenen Frauen 59 prä- und 81 Patientinnen postmenopausal.

Hinsichtlich des Hormonrezeptorstatus wurden 109 Frauen als östrogen- und progesteronrezeptorpositiv gewertet, 32 Patientinnen dagegen waren hormonrezeptor-negativ. Fehlende und inkorrekte Daten gingen nicht in die statistische Auswertung mit ein.

## 2.3 Einschlusskriterien

- Frauen mit einem histologisch gesicherten Mammakarzinom (pT1/pT2/pT3, pN1, M0).
- Komplette Resektion des Mammatumors mit Entfernung der axillären Lymphknoten. Es müssen mindestens 10 Lymphknoten entfernt und histologisch aufgearbeitet worden sein.
- Vorliegen eines Tumorbefalls in 1 bis 3 der untersuchten axillären Lymphknoten.
- Prämenopausale Patientinnen mit ER +/- und PR +/- und postmenopausale (> 52 Jahre) Patientinnen mit ER +/- und PR +/-
- Alter  $\geq 18$  Jahre und  $\leq 75$  Jahre
- ECOG performance status  $\leq 1$
- Beginn der adjuvanten Chemotherapie spätestens 4 Wochen nach der Operation
- Patientinnen mit Ausgangsblutparametern wie folgt:
  - Thrombozyten  $\geq 100 \times 10^9/l$
  - Absolute Neutrophilenzahl (ANZ)  $\geq 2 \times 10^9/l$   
(ANZ = Segment und stabkernige neutrophile Zellen)
- Normale Leberfunktion:
  - Bilirubin  $\leq 1,5 \times N^*$
  - S-GOT/S-GTP  $\leq 1,25 \times N^*$ ;  $N^*$  = höchster Normalwert
- Normale Nierenfunktion:
  - Kreatinin  $\leq 1,5 \times N^*$   $N^*$  = höchster Normalwert
- Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) muss gemäß des jeweiligen Klinikstandards im Normalbereich liegen
- Kontrazeption:

Bei prämenopausalen Patientinnen muss innerhalb von 72 Stunden vor Beginn der Chemotherapie ein negativer Schwangerschaftstest vorliegen. Eine geeignete Kontrazeption ist erforderlich und muss vor Studienbeginn mit dem jeweiligen Therapeuten festgelegt werden.
- Vorliegen einer schriftlichen Einverständniserklärung

---

## 2.4 Ausschlusskriterien

- Vorherige Bestrahlung, Chemotherapie, Hormontherapie (für die Tumorerkrankung) und Immuntherapie
- Alter  $\leq 18$  Jahre und  $\geq 75$  Jahre
- Patientinnen mit mehr als drei befallenen axillären Lymphknoten
- Lymphknotenbefall auf der kontralateralen Seite und/oder Befall supraclavikulärer oder infraclavikulärer Lymphknoten
- Bilaterales Mammakarzinom oder Zweitkarzinom der Mamma
- Vorliegen eines inflammatorischen Mammakarzinoms und/oder eines Mammakarzinoms mit Fernmetastasen
- Bereits existierende klinisch relevante periphere Neuropathie
- Herzinfarkt innerhalb der letzten sechs Monate und nicht therapeutisch kompensierte Herzinsuffizienz oder andere schwere kardiovaskuläre Beschwerden, Überleitungsstörungen Grad II oder III oder Herzrhythmusstörungen  $\geq$  LOWN II
- Patientinnen mit einer nicht kontrollierten Infektion und/oder nicht kontrollierten Hyperkalzämie
- Patientinnen mit einer bekannten Hypersensitivität gegenüber den eingesetzten Medikamenten und/oder deren Inhaltsstoffen
- Patientinnen, die gesundheitlich nicht stabil sind (z.B.: nicht eingestellter Diabetes mellitus, unkontrollierte arterielle Hypertonie, akute respiratorische Erkrankung, florides Leber- oder Nierenleiden)
- Patientinnen mit anderen malignen Erkrankungen, ausgenommen kurativ behandeltes Basalzellkarzinom der Haut oder Zervixkarzinom in situ)
- Schwangere oder stillende Frauen sowie gebärfähige Frauen, die keine angemessenen Kontrazeptiva benutzen
- Psychologische, familiäre, soziologische oder geographische Bedingungen, die keine medizinische Nachbehandlung und Compliance der Therapieoptimierung zulassen
- Psychische Erkrankungen, Suchtformen oder sonstige Erkrankungen, welche die Fähigkeit der Patientin zur Einverständniserklärung oder zur Teilnahme an der Studie einschränken

## 2.5 Blutproben

Vor Beginn sowie nach Beendigung der adjuvanten Chemotherapie wurden den Probandinnen Blutproben entnommen und nachfolgend das abzentrifugierte EDTA-Plasma portionsweise bei  $-85^{\circ}\text{C}$  in Kryoröhrchen gelagert. Wir bestimmten VEGF im Plasma. Es hat sich als ungeeignet herausgestellt, dieses im Serum zu messen, da beim Gerinnungsprozess und bei der Verarbeitung VEGF aus Thrombozyten und Leukozyten freigesetzt wird und somit höhere Werte im Serum resultieren. [12]

Ein positives Votum der Ethikkommission der Charité lag für diese zusätzlichen Untersuchungen im Rahmen der o.g. Studie vor. Alle Daten sowie die Blutentnahmen wurden im Einverständnis mit den befragten Frauen erfasst.

## 2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Kurt Ulm von der Technischen Universität München.

Um den Einfluss der Chemotherapie auf eine eventuelle Änderung von VEGF und VEGF-D in den Subgruppen hinsichtlich der konventionellen, klassischen Prognosefaktoren evaluieren zu können, wurde der Wilcoxon-Test (nonparametrischer Test für zwei verbundene Stichproben) verwendet. Zur Darstellung klassifizierter Veränderungen (Gruppe der abfallenden Werte gegenüber der Gruppe der ansteigenden Werte) wurden Kreuztabellen erstellt und anhand des asymptotischen chi-quadrat-Test nach Pearson sowie des exakten chi-quadrat-Test nach Fisher mögliche Unterschiede überprüft.

Anwendung fand der nonparametrische Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben, um die prognostische Aussagekraft der klassischen Einflussgrößen hinsichtlich der Werte vor bzw. nach Chemotherapie bewerten zu können.

Um eine eventuelle Korrelation zwischen VEGF und VEGF-D aufzuzeigen, kam der Spearmans-Test zum Einsatz.

Alle Erhebungen wurden unter Einbeziehung eines veranschlagten Interassays von 10 % (unveränderte Werte:  $\pm 10\%$  des Ausgangswertes nach Chemotherapie) der verwendeten ELISA-Kits ermittelt. Als statistisch signifikant wird ein p-Wert kleiner 0,05 betrachtet.

## 2.7 Immunoassay

Ein Immunoassay ist eine Technik, bei der mittels einer immunologischen Reaktion, der qualitative und quantitative Nachweis einer Substanz geführt wird. Er basiert auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion, d.h. auf der Fähigkeit der Antikörper spezifisch Antigene zu erkennen und mit ihnen eine Bindung nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip einzugehen. Die gebräuchlichsten Abkürzungen sind ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) und EIA (Enzyme Immuno Assay). Beide Begriffe werden synonym verwendet.

Bei dem „Sandwich-Immunoassay-Verfahren“ werden spezifische monoklonale Antikörper (Beschichtungsantikörper oder auch Fänger-Antikörper) bis zur Sättigung fest an die 96 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gebunden. Anschließend wird die Probe mit dem zu messenden Analyten (Antigen) in die Vertiefungen pipettiert. Ausreichend lange Inkubationszeiten sind nötig, damit sich ein Reaktionsgleichgewicht herstellen kann. Währenddessen bindet alles korrespondierende Antigen (AG) der Probe an den immobilisierten Antikörper (AK) der Mikrotiterplatte und bildet einen AK-AG-Komplex (siehe Nr. 1 in Abbildung 7).

Nach der Immunreaktion wird das ungebundene Material durch Waschen entfernt und anschließend ein mit einem Markerenzym (z.B. Meerrettichperoxidase (HRP)) gekoppelter Antikörper (Detektions-Antikörper) zugegeben (siehe Nr. 2 in Abbildung 7). Eine Markierung kann ebenso durch radioaktive oder fluoreszierende Substanzen erfolgen. Der Antikörper bindet an die noch freien Epitope des gebundenen Analyten. Es entsteht nun ein AK-AG-AK-Komplex („Sandwich-Komplex“). Nach wiederholtem Waschen zeigt das Hinzufügen einer chromogenen Lösung (z.B. Tetramethylbenzidin) eine Farbreaktion in den jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte die Anwesenheit und Menge des zu messenden Analyten an, da nur dort gebundene „AK-AG-AK-Enzym-Komplexe“ mit der Substratlösung in Kontakt kamen und ein farbiges Reaktionsprodukt entstehen lassen (siehe Nr. 3 in Abbildung 7). Die Farbentwicklung wird durch Hinzugabe einer Säuren- oder Laugenlösung gestoppt. Die Farbintensität bzw. die Aktivität des gebundenen Enzyms, die als optische Dichte mittels eines



Mikrotiterplattenphotometers bestimmt wird, ist proportional zur Menge der zu untersuchenden Substanz. Durch Zuhilfenahme der anfangs erstellten Eichkurve lässt sich die Menge anschließend quantitativ bestimmen.

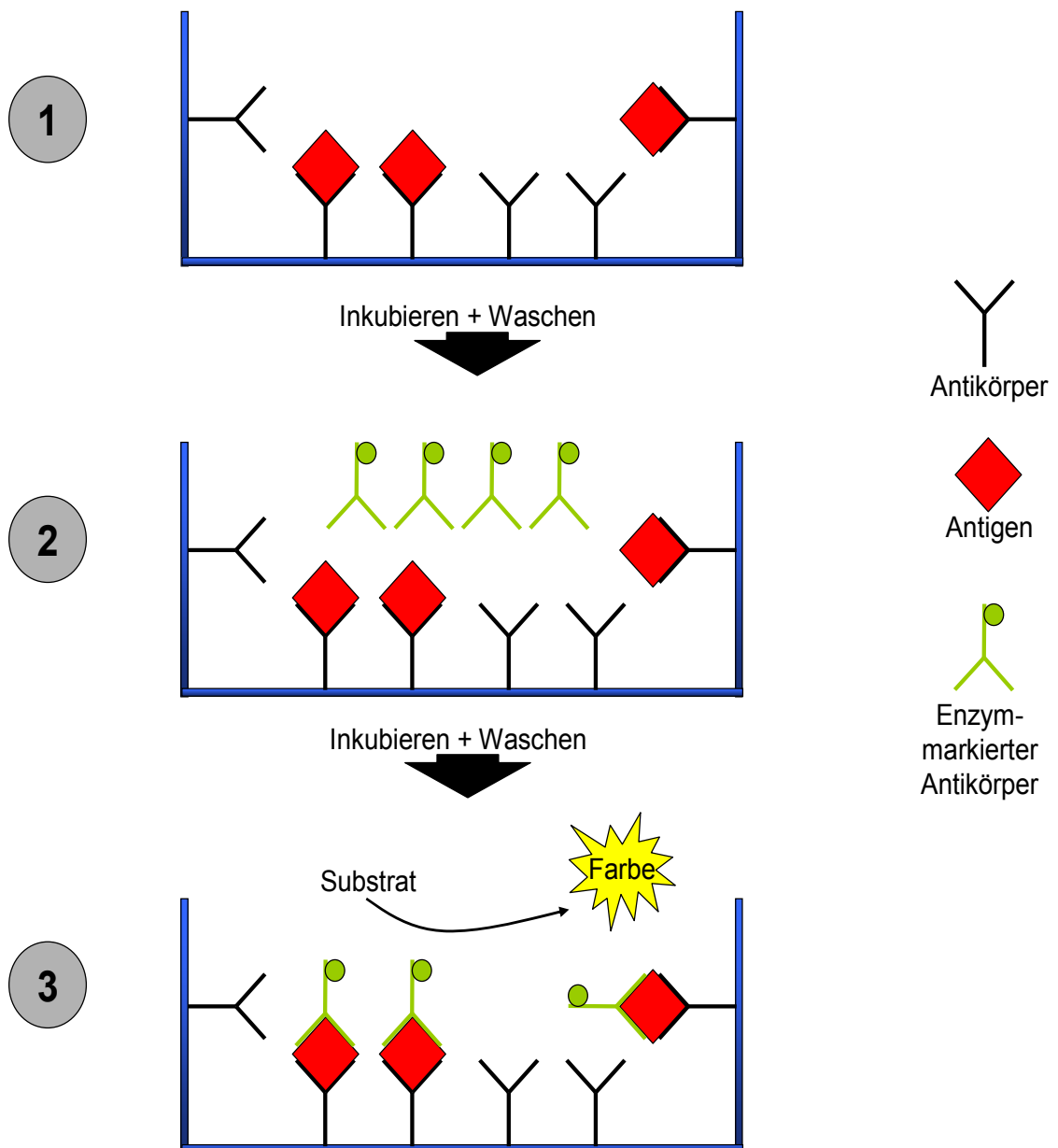


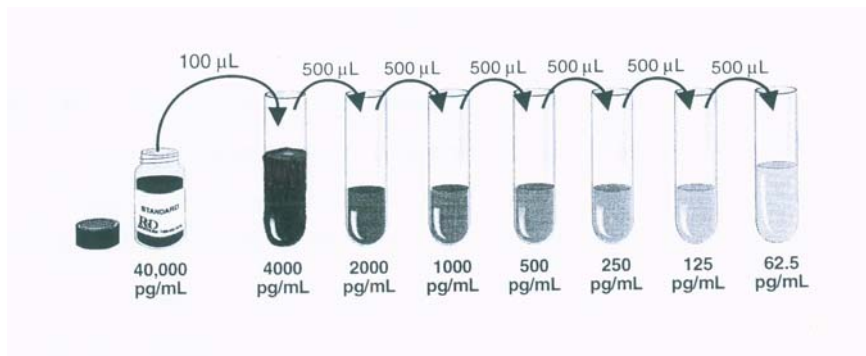
Abbildung 7: Schematische Darstellung eines ELISA

## 2.8 Durchführung der Bestimmungen

Zur Bestimmung der Parameter VEGF<sub>165</sub> und VEGF-D wurden Human Quantikine ELISA Kits der Firma R&D Systems, Wiesbaden verwendet. Die 96 Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind bereits mit monoklonalen Antikörpern gegen die jeweils zu bestimmende Substanz beschichtet. Bei allen Proben, Kontrollen sowie Standards werden Doppelbestimmungen durchgeführt, um anschließend aus beiden Werten den Mittelwert gewinnen zu berechnen.

### 1. Herstellen einer Verdünnungsreihe für die Eichkurve:

In sechs Polypropylen-Röhrchen werden jeweils 500 µl der Verdünnungslösung pipettiert. In das erste Röhrchen werden 500 µl des Standards (2000 pg/ml) hinzugefügt und vorsichtig vermischt. Aus diesem ersten Röhrchen werden anschließend 500 µl der Mischung in das zweite Röhrchen pipettiert. Dieses Verdünnungsverfahren wird fortgesetzt: 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml.



### 2. 100 µl Assay Diluent in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettieren.

**VEGF**

**VEGF-D**

3. Hinzugabe von 100 µl Standard, Kontrolle oder Probenmaterial.

Hinzugabe von 50 µl Standard, Kontrolle oder Probenmaterial.

4. Abdecken und inkubieren bei Raumtemperatur für 2 Stunden.

**VEGF**

**VEGF-D**

5. 3 mal Waschen

4 mal Waschen

Jede Vertiefung absaugen und mit jeweils 400 µl Waschpuffer vollständig auswaschen. Anschließend wird die Mikrotiterplatte auf Papiertüchern ausgeklopft.

↓

6. 200 µl VEGF-Konjugat (polyklonaler VEGF-Antikörper gebunden an Meerrettichperoxidase) in jede Vertiefung pipettieren.

↓

7. Abdecken und inkubieren bei Raumtemperatur für 2 Stunden.

↓

8. Wiederholen des Waschvorganges wie in Punkt 5 beschrieben.

↓

9. 200 µl chromogene Substratlösung in jede Vertiefung pipettieren.

↓

10. Abdecken und vor Licht schützen.

↙

**VEGF**

25 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

↘

**VEGF-D**

30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

↓

Es bildet sich ein gelber Farbstoff.

↓

11. Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 50 µl 2N Schwefelsäure in jede Vertiefung.

↓

12. Messung der optischen Dichte bei 450 nm mittels Mikrotiterplattenphotometers 400 SF der Firma SLT innerhalb von 30 Minuten.

↓

13. Messung des Plattenlehrwertes bei 550 nm.

↓

14. Auswertung und Berechnung der Probenkonzentrationen mittels Softwareprogramm Synelisa 3.2 der Firma ELIAS Medizintechnik, Freiburg und der anfangs erstellten Eichkurve.

**Intra-Assay Präzision:**

Drei Proben bekannter Konzentration wurden 20 mal auf einer Mikrotiterplatte getestet.

**Inter-Assay Präzision:**

Drei Proben bekannter Konzentration wurden auf 40 verschiedenen Assays getestet.

**VEGF :**

Intra-Assay Präzision				Inter-Assay Präzision		
Probe	1	2	3	1	2	3
Anzahl n	20	20	20	40	40	40
Mittelwert (pg/ml)	53,7	235	910	64,5	250	1003
Standardab- weichung	3,6	10,6	46,2	5,7	17,4	61,7
Variations- koeffizient (%)	6,7	4,5	5,1	8,8	7,0	6,2

Tabelle 2: VEGF: Intra- und Inter-Assay Präzision; Quelle: R&D Systems, Durchführungsvorschrift

**Sensitivität:**

Sie wird vom Hersteller mit 9,0 pg/ml angegeben. Diese Nachweisgrenze wird durch Addition von zwei Standardabweichungen (2s) zum durchschnittlichen Wert der optischen Dichte von 20 Nullstandards bestimmt.

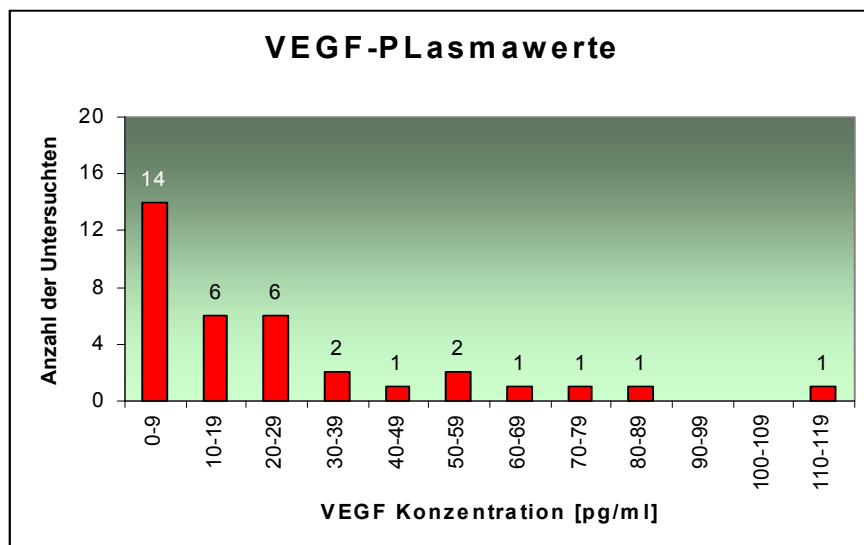


Abbildung 8: VEGF-Plasmawerte; Quelle: R&D Systems, Durchführungsvorschrift

**Normalwert:**

Probenart	Anzahl (n)	Mittelwert (pg/ml)	Spannweite (pg/ml)
EDTA-Plasma	37	61	nicht messbar-115

Tabelle 3: Normalwert VEGF; Quelle: R&amp;D Systems, Durchführungsvorschrift

**VEGF-D:**

Intra-Assay Präzision				Inter-Assay Präzision		
Probe	1	2	3	1	2	3
Anzahl n	20	20	20	40	40	40
Mittelwert (pg/ml)	448	970	2081	474	956	2013
Standardabweichung	27,8	40,9	49,3	38,0	68,5	145
Variationskoeffizient (%)	6,2	4,2	2,4	8,0	7,2	7,2

Tabelle 4: VEGF-D: Intra- und Inter-Assay Präzision; Quelle: R&amp;D Systems, Durchführungsvorschrift

**Sensitivität:**

Durch die Auswertung von 34 Assays wurde festgelegt, dass die Nachweisgrenzen zwischen 4,7 pg/ml und 31,3 pg/ml schwanken, wobei der Durchschnitt bei 11,4 pg/ml liegt.

**Normalwert:**

Probenart	Anzahl (n)	Mittelwert (pg/ml)	Streubreite (pg/ml)
EDTA-Plasma	35	208	91-437

Tabelle 5: Normalwert VEGF-D; Quelle: R&amp;D Systems, Durchführungsvorschrift

---

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Gesamtanalyse der Veränderungen von VEGF und VEGF-D

Vor Beginn der Chemotherapie betrug der mediane Werte von VEGF aus den 142 Plasmaproben 409 pg/ml und für VEGF-D 616 pg/ml, wobei die Spannweite der Einzelwerte von VEGF 9-2590 pg/ml und bei VEGF-D von 60-2168 pg/ml reicht (VEGF-Normalwert: bis 115 pg/ml, VEGF-D-Normalwert: bis 437 pg/ml). Die Medianwerte nach adjuvanter Chemotherapie betragen für VEGF 402 pg/ml und für VEGF-D 447 pg/ml (VEGF-Spannweite: 9-2194 pg/ml, VEGF-D-Spannweite: 42-2550 pg/ml).

Für alle Patientinnen gesamtanalytisch betrachtet war der VEGF-Wert vor und nach Chemotherapie nahezu identisch. Die Werte von VEGF-D hingegen sanken nach Chemotherapie von 616 pg/ml auf 447 pg/ml. Dieser deutliche Abfall der Werte von VEGF-D spiegelt sich gleichermaßen im p-Wert wider, welcher mit 0,067 die statistische Signifikanz nur knapp verfehlt (Wilcoxon matched-pairs test).

#### 3.1.1 VEGF-Einzelwerte vor Therapie bezogen auf Behandlungsmodus

Die nachfolgenden Grafiken wurden aus Daten von 142 Patientinnen mit Mammakarzinom und ein bis drei tumorbehafteten axillären Lymphknoten erstellt. Sie zeigen die Verteilung der VEGF-Einzelwerte in der Spanne zwischen 0 und 2600 pg/ml vor Behandlungsbeginn. Wie in Abbildung 9 ersichtlich erkennt man in Therapiearm A eine zweigipflige Verteilung, d.h. eine große Gruppe an Frauen wies einen VEGF-Wert zwischen 101 und 200 pg/ml auf und eine zweite Häufung zeigt sich mit VEGF-Werten zwischen 401 und 500 pg/ml.

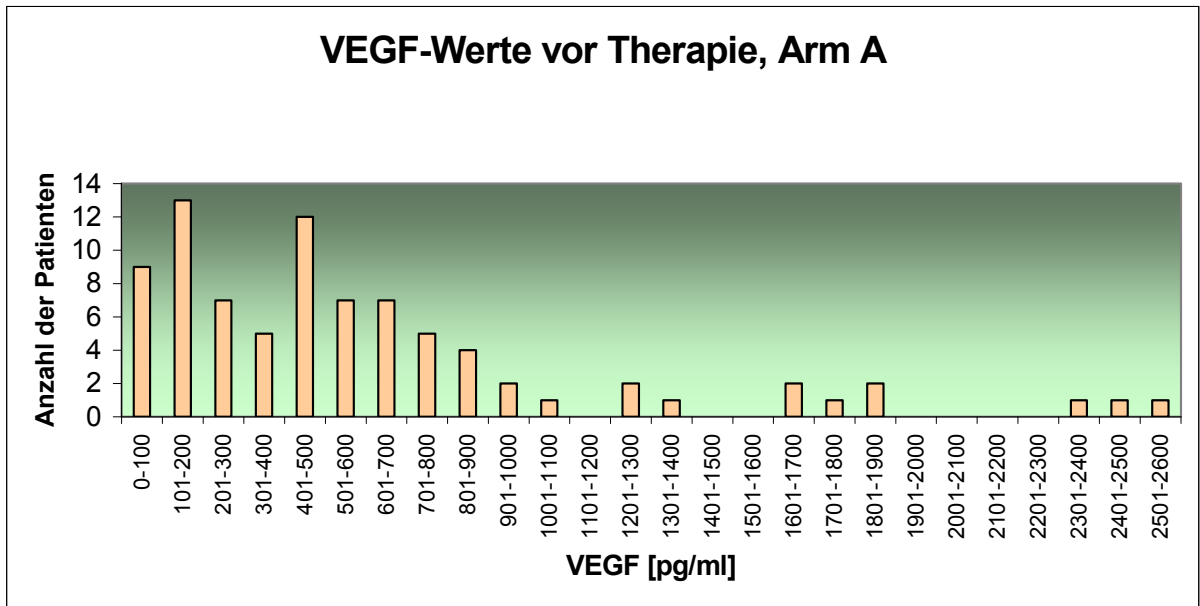


Abbildung 9: VEGF-Werte vor Therapie, Arm A

Betrachtet man die Patientinnen, die im Arm B dosisintensiviert chemotherapeutisch behandelt wurden, so zeigt sich in Abbildung 10, dass bei der Mehrheit der Frauen ein VEGF-Wert zwischen 101 und 200 pg/ml vor der Therapie gemessen wurde. Der höchste Wert lag in dieser Gruppe zwischen 1901 und 2000 pg/ml, die Spannweite ist somit insgesamt mit 0-2000 pg/ml kleiner als in Arm A, da dort der höchste Wert zwischen 2501 und 2600 pg/ml gemessen wurde.

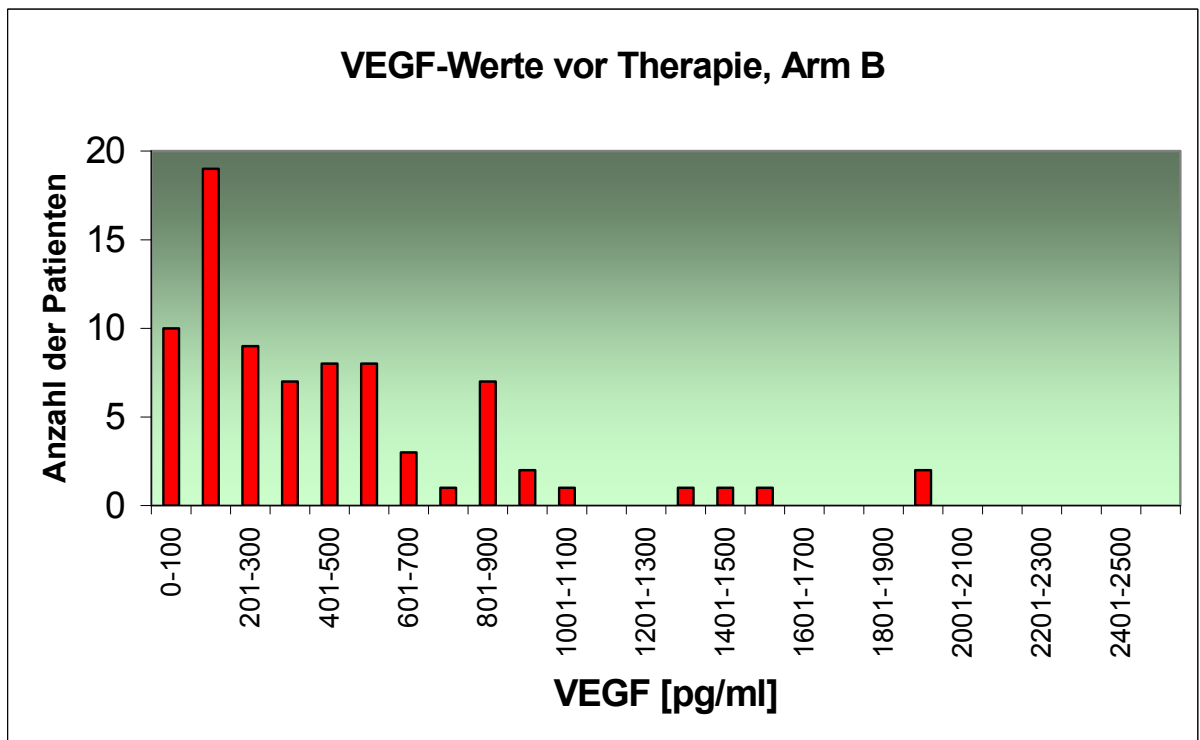


Abbildung 10: VEGF-Werte vor Therapie, Arm B

### 3.1.2 VEGF-D Einzelwerte vor Therapie bezogen auf Behandlungsmodus

Bezogen auf die VEGF-D Werte erkannte man sowohl in Arm A als auch in Arm B eine Häufung von Patientinnen, deren Werte zwischen 201 und 300 pg/ml lagen (siehe Abbildung 11 und Abbildung 12).

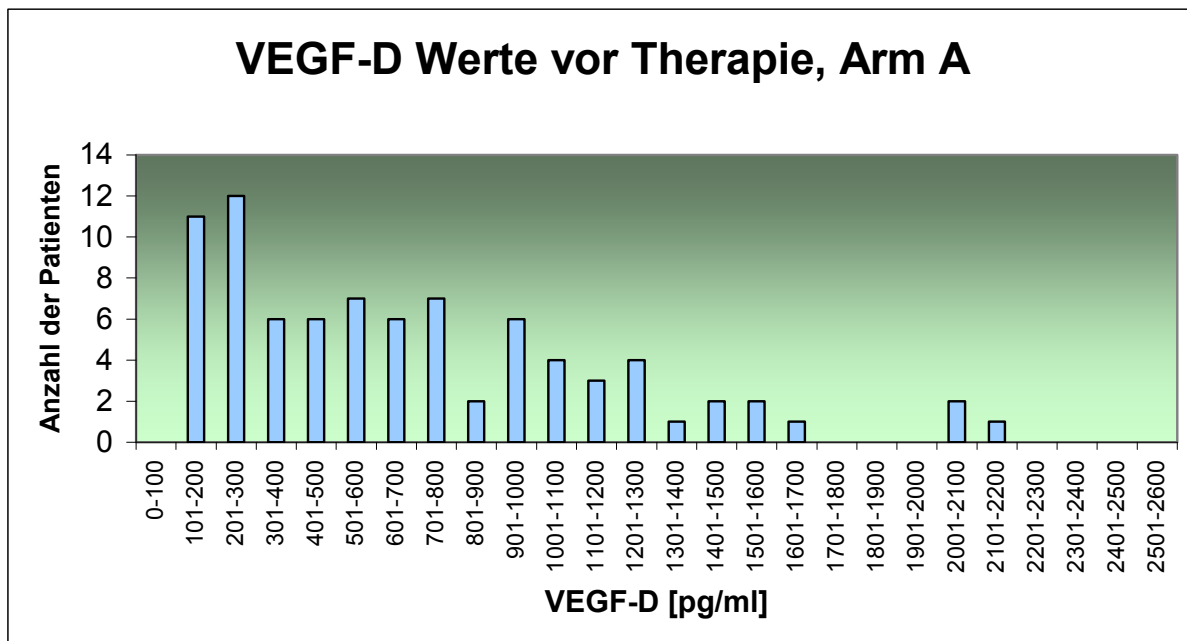


Abbildung 11: VEGF-D Werte vor Therapie, Arm A

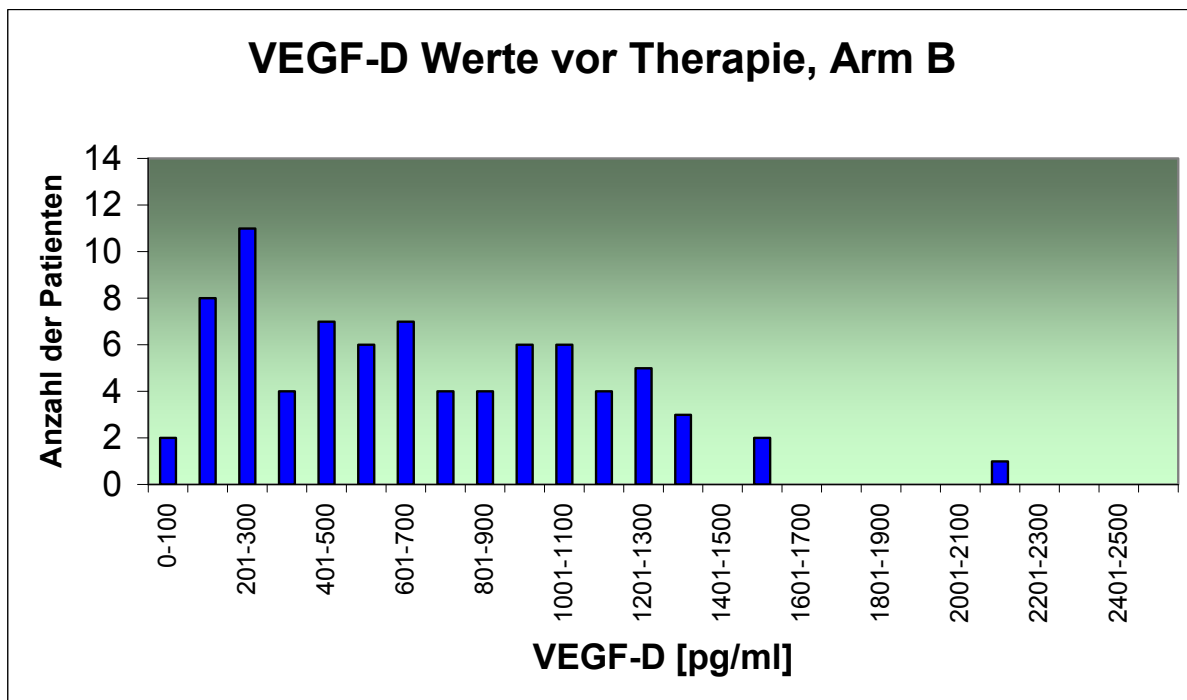


Abbildung 12: VEGF-D Werte vor Therapie, Arm B



### 3.1.3 VEGF-Einzelwerte nach Therapie bezogen auf Behandlungsmodus

In der Gruppe, die mit einer Standardchemotherapie in Arm A behandelt wurden, konnte bei den meisten Frauen ein VEGF-Wert zwischen 0 und 200 pg/ml nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13).

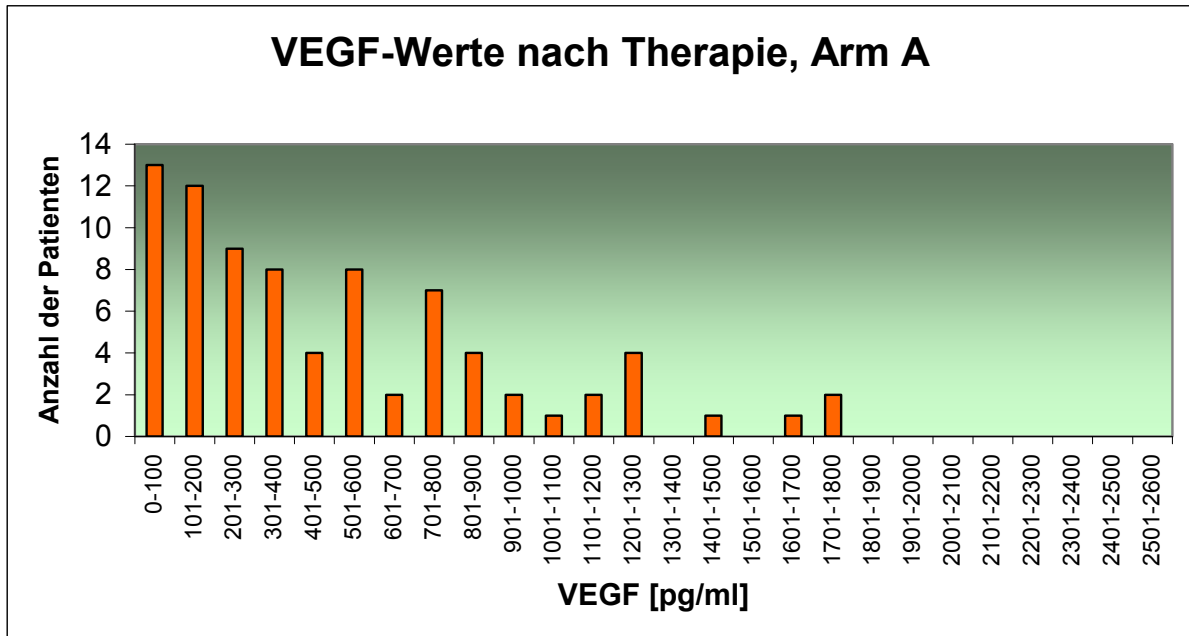


Abbildung 13: VEGF-Werte nach Therapie, Arm A

Der Abbildung 14 ist zu entnehmen, dass im dosisintensivierten Arm B nach Behandlung bei den meisten Frauen ein VEGF-Wert gemessen wurde, der zwischen 301 und 400 pg/ml lag.

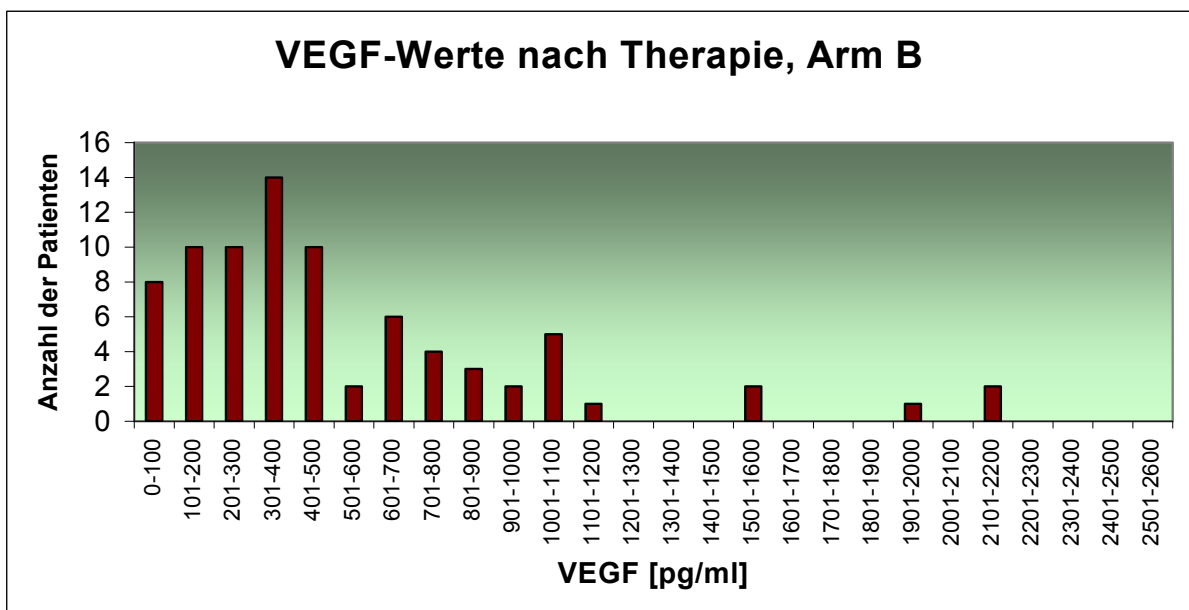


Abbildung 14: VEGF-Werte nach Therapie, Arm B

### 3.1.4 VEGF-D Einzelwerte nach Therapie bezogen auf Therapiemodus

In Abbildung 15 ist ersichtlich, dass sich in Arm A eine Häufung an Patientinnen erkennen lässt, deren VEGF-D Werte nach Chemotherapie zwischen 101 und 400 pg/ml lagen. Als Ausreißer kann man den höchsten Einzelwert in der Spanne von 2501-2600 pg/ml betrachten.

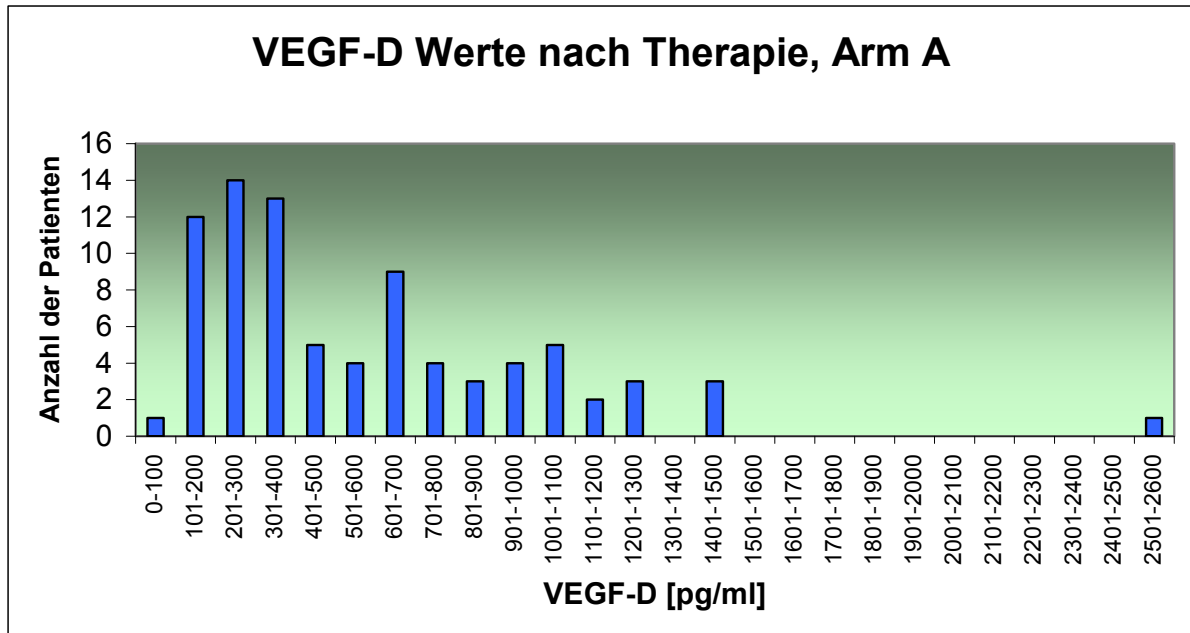


Abbildung 15: VEGF-D Werte nach Therapie, Arm A

Auch im dosisintensivierten Arm B zeigte die Mehrheit der Patientinnen einen VEGF-D Wert zwischen 101 und 300 pg/ml (siehe Abbildung 16).

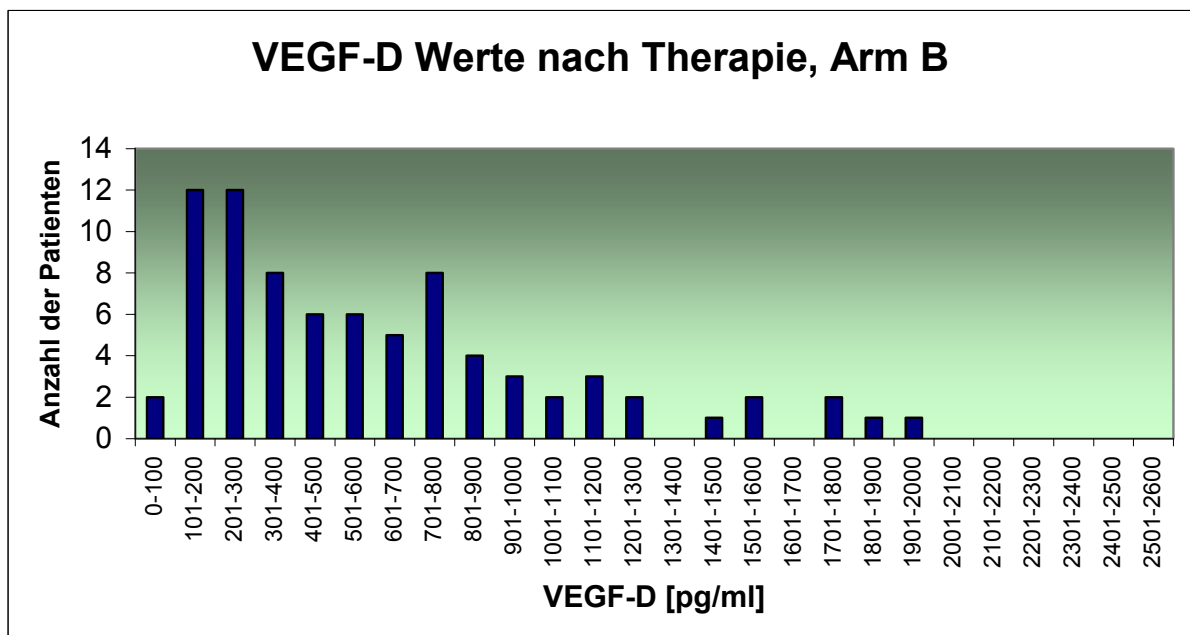


Abbildung 16: VEGF-D Werte nach Therapie, Arm B

## 3.2 Baseline-Werte von VEGF und VEGF-D vor Therapiebeginn in Abhängigkeit der Tumorcharakteristika

### 3.2.1 Therapiearme

Hinsichtlich der beiden Therapiearme erkennt man in Abbildung 17 und Abbildung 18, dass sich die Baseline-Werte von VEGF und VEGF-D nur geringfügig unterschieden, wobei jedoch alle Werte oberhalb der jeweiligen Normgrenzen lagen. Patientinnen, die mit einer Standardchemotherapie im Arm A behandelt wurden, zeigten vor Beginn höhere VEGF-Spiegel, als Frauen, die im dosisintensivierten Arm B eingeschlossen wurden (446 pg/ml versus 362 pg/ml).

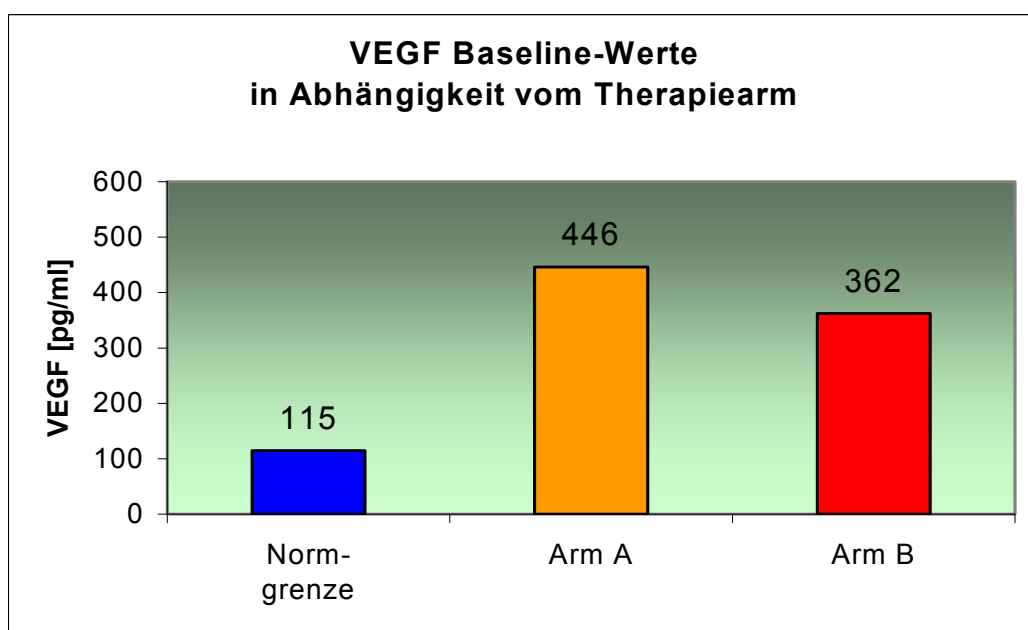


Abbildung 17: VEGF Baseline-Werte in Abhängigkeit vom Therapiearm

Im Gegensatz dazu waren die VEGF-D Baseline-Werte bei denjenigen Patientinnen höher, die im dosisintensivierten Arm B chemotherapeutisch behandelt wurden.

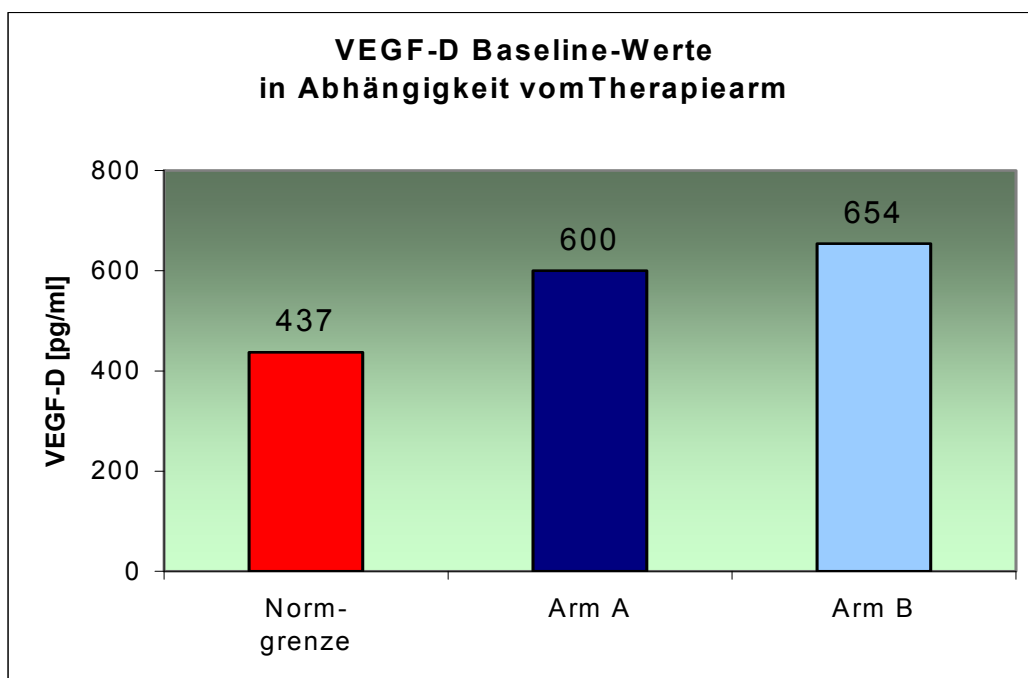


Abbildung 18: VEGF-D Baseline-Werte in Abhängigkeit vom Therapiearm

### 3.2.2 Tumorgrading

Die Abbildung 19 verdeutlicht, dass bei allen drei Subgruppen G1, G2 und G3 sowohl die Baseline-Werte von VEGF als auch die von VEGF-D vor Chemotherapie über der jeweiligen oberen Normgrenze von 115 pg/ml bzw. 437 pg/ml lagen. Interessanterweise korrelierten Tumoren mit niedrigem Grading nicht mit einem niedrigem VEGF- bzw. VEGF-D Wert. So hatten Patientinnen mit mäßig differenzierten Primärtumoren (G2) die höchsten VEGF-Werte (435 pg/ml), Frauen mit hoch differenzierten Tumoren (G1) wiesen einen VEGF-Wert von 325 pg/ml auf und G3-Tumoren korrelierten mit einem VEGF-Medianwert von 287 pg/ml.

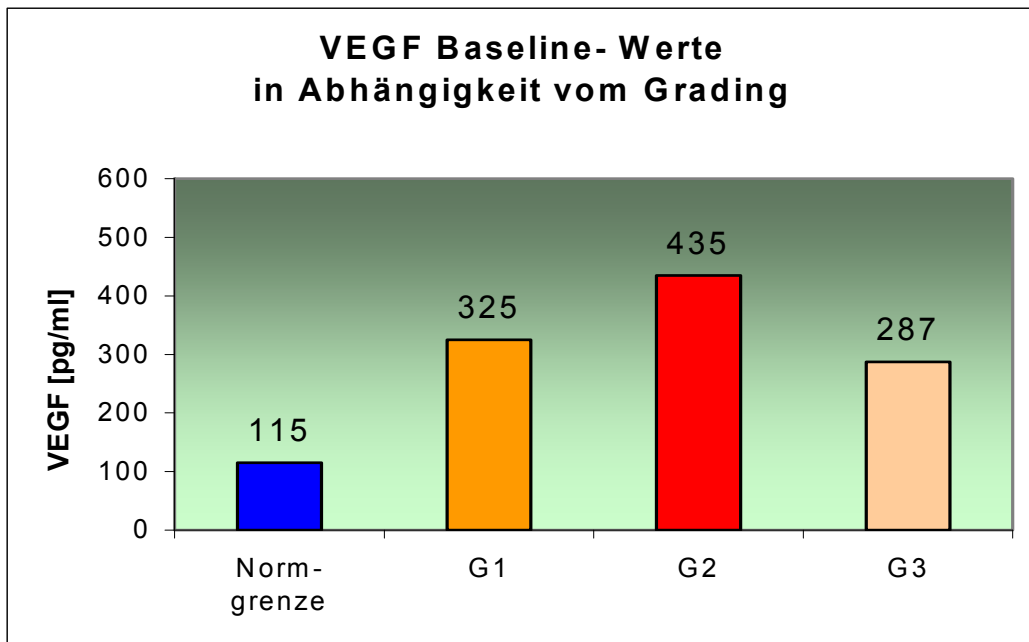


Abbildung 19: VEGF-Baseline-Werte in Abhängigkeit vom Grading

Die VEGF-D Baseline-Werte waren innerhalb der Grading-Subgruppen am höchsten bei Frauen, deren Primärtumoren als G1 eingestuft wurden (siehe Abbildung 20). Mit einem Medianwert von 638 pg/ml korrelierten G3-Tumoren von Mammakarzinompatientinnen und Frauen mit G2-Tumoren wiesen einen medianen VEGF-D Wert von 584 pg/ml auf.

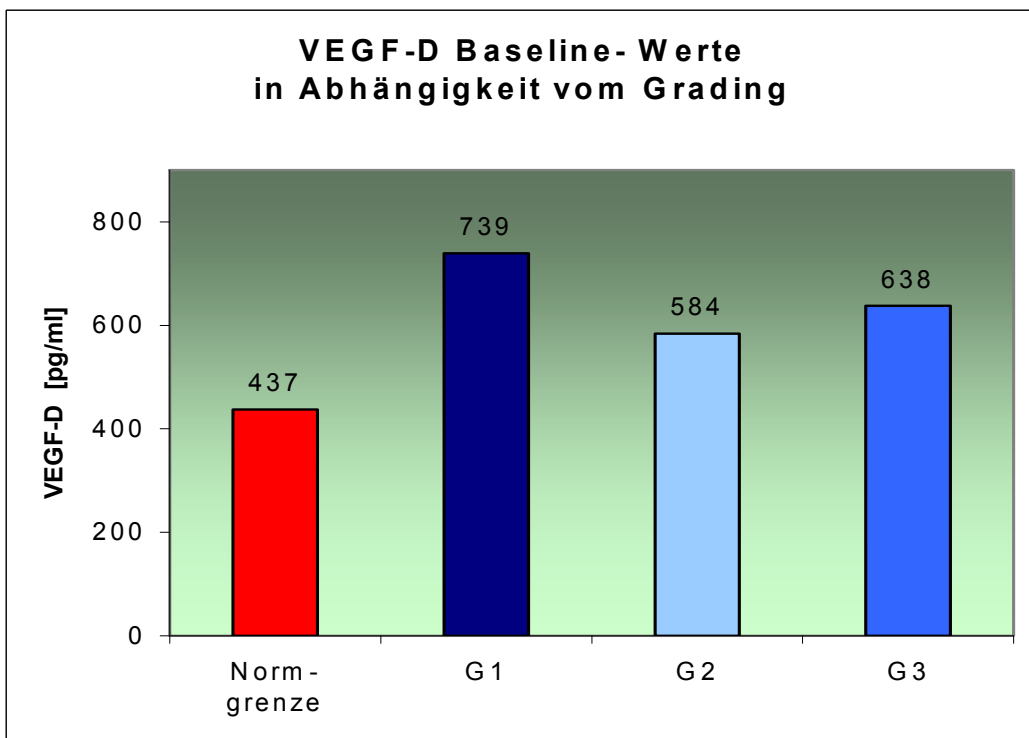


Abbildung 20: VEGF-D Baseline-Werte in Abhängigkeit vom Grading

### 3.2.3 TumorgroÙe

Betrachtet man vor Beginn der Therapie die Baseline-Werte von VEGF (Abbildung 21), so erkennt man bezüglich der GrÙe des Primärtumors deutlich über der Normgrenze von 115 pg/ml liegende VEGF-Werte bei allen drei Untergruppen pT1, pT2 und pT3 (Kruskal Wallis Test  $p = 0,039$ ). Der höchste Wert war bei Tumoren  $\geq 5$  cm zu verzeichnen, der mit 917 pg/ml fast das 8-fache des Normwertes betrug. Bei pT1-Tumoren ( $\geq 2$  cm) lag der Baseline-Wert bei 403 pg/ml und bei pT2-Tumoren (2-5 cm) bei 394 pg/ml ( $pT3 > pT1 > pT2$ ).

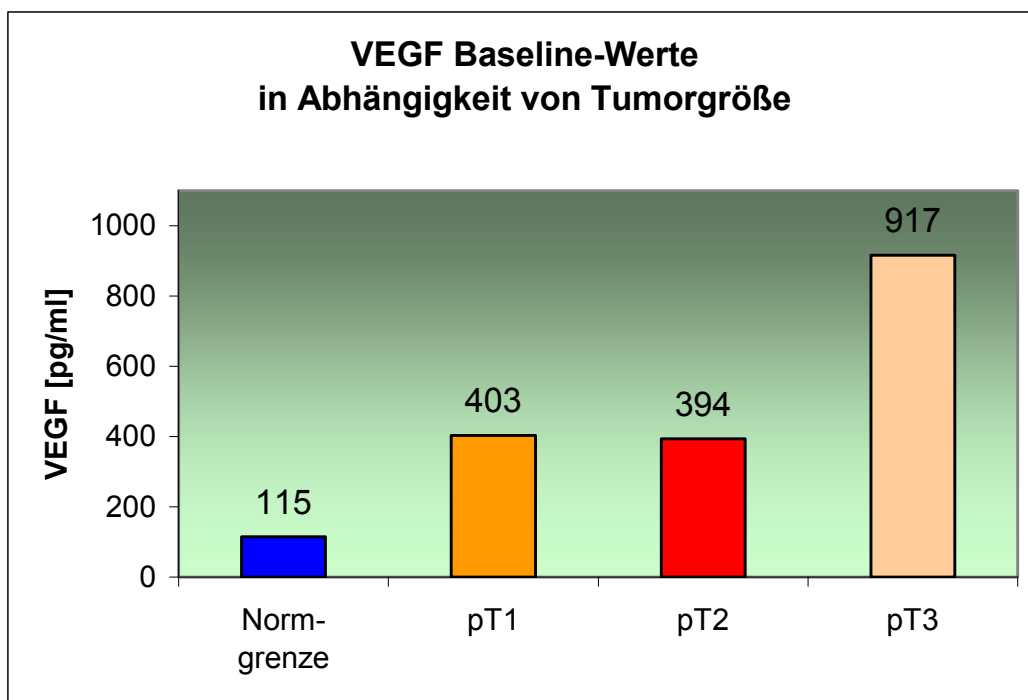


Abbildung 21: VEGF Baseline-Werte in Abhängigkeit von TumorgroÙe

Auch die VEGF-D Baseline-Werte lagen bezogen auf die Tumorgröße wie in Abbildung 22 ersichtlich bei allen drei Subgruppen oberhalb der Normgrenze von 437 pg/ml. Hier hatten Patientinnen mit Primärtumoren  $\geq 5$  cm die höchsten VEGF-D Werte mit einem Median von 1365 pg/ml. Allerdings hatten Frauen mit Primärtumoren  $\leq 2$  cm (pT1) auch die niedrigsten Baseline-VEGF-D Werte von 586 pg/ml. Tumoren mit einer Größe zwischen 2 und 5 cm (pT2) korrelierten mit einem Medianwert von 694 pg/ml (pT3 > pT2 > pT1).

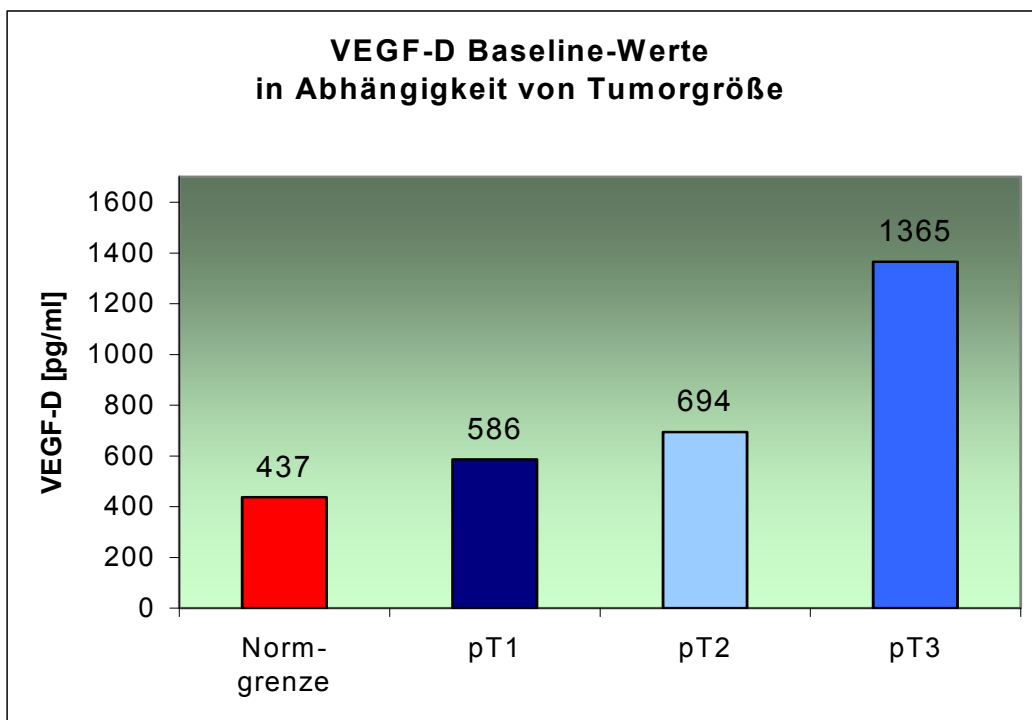


Abbildung 22: VEGF-D Baseline-Werte in Abhängigkeit von Tumorgröße

### 3.2.4 Hormonrezeptorstatus

Die VEGF Baseline-Werte unterschieden sich bezüglich des Hormonrezeptorstatus nur geringfügig, wobei höhere Werte bei Frauen mit hormonrezeptornegativen Tumoren gemessen wurden. Zu beachten ist jedoch, dass in beiden Subgruppen die Baseline-Werte sehr deutlich über der Normgrenze von VEGF liegen (siehe Abbildung 23).

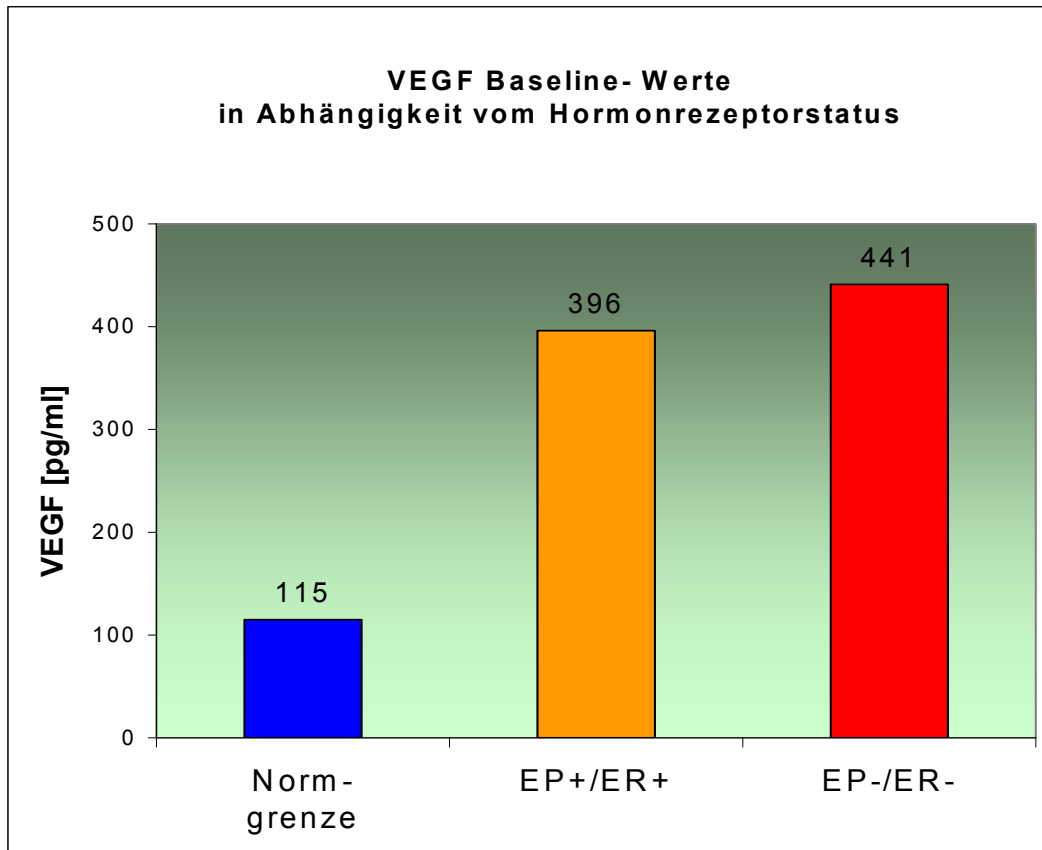


Abbildung 23: VEGF Baseline-Werte in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus



Der Abbildung 24 ist zu entnehmen, dass deutlich höhere VEGF-D Baseline-Werte vor Therapiebeginn bei Patientinnen mit hormonrezeptorpositiven Primärtumoren gegenüber Frauen mit hormonrezeptornegativen Tumoren zu verzeichnen waren (657 pg/ml versus 456 pg/ml). Mit einem p-Wert von 0,026 ist dieser Unterschied als statistisch signifikant zu betrachten.

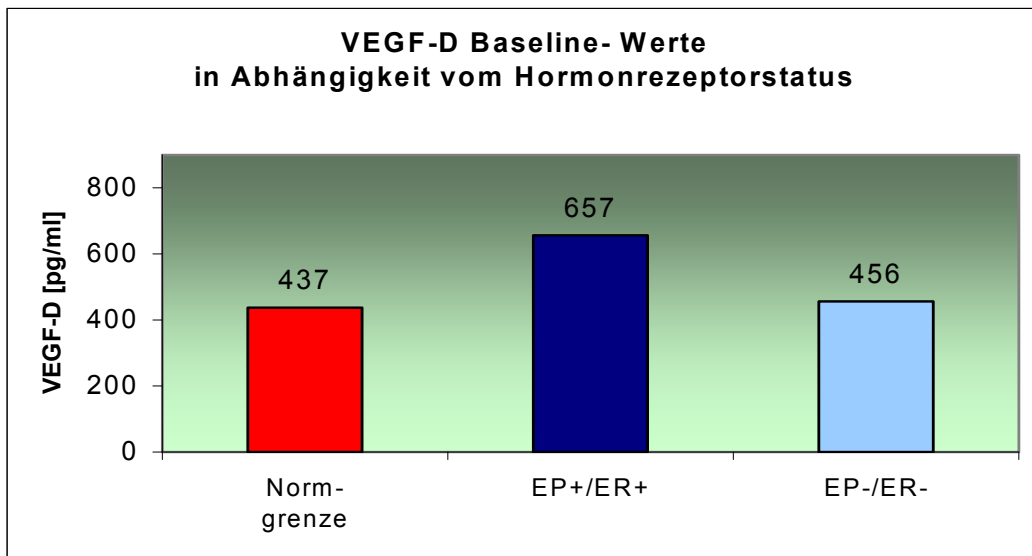


Abbildung 24: VEGF-D Baseline-Werte in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus

### 3.2.5 Menopausenstatus

Bezogen auf den Menopausenstatus hatten alle Patientinnen deutlich über der Norm von 115 pg/ml liegende VEGF Baseline-Werte (siehe Abbildung 25), jedoch liegen die Werte der postmenopausalen Patientinnen verglichen zu den Werten der prämenopausalen Frauen nur geringfügig höher (416 pg/ml versus 362 pg/ml).

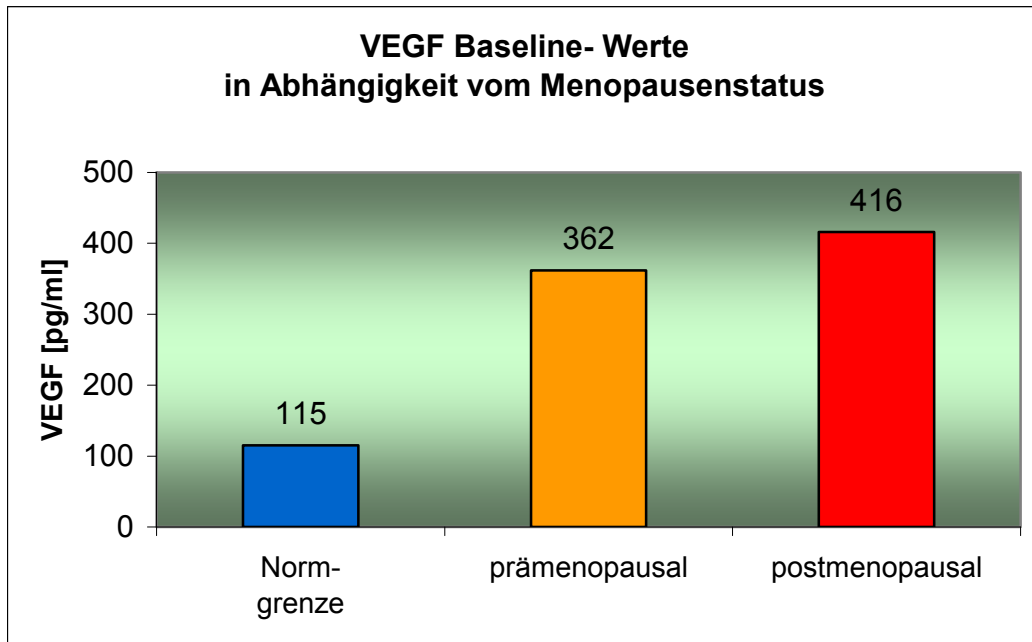


Abbildung 25: VEGF Baseline -Werte in Abhängigkeit vom Menopausenstatus

Höhere Baseline-Werte von VEGF-D konnten, wie der Abbildung 26 zu entnehmen, bei prämenopausalen verglichen zu postmenopausalen Mammakarzinompatientinnen verzeichnet werden (632 pg/ml versus 587 pg/ml).

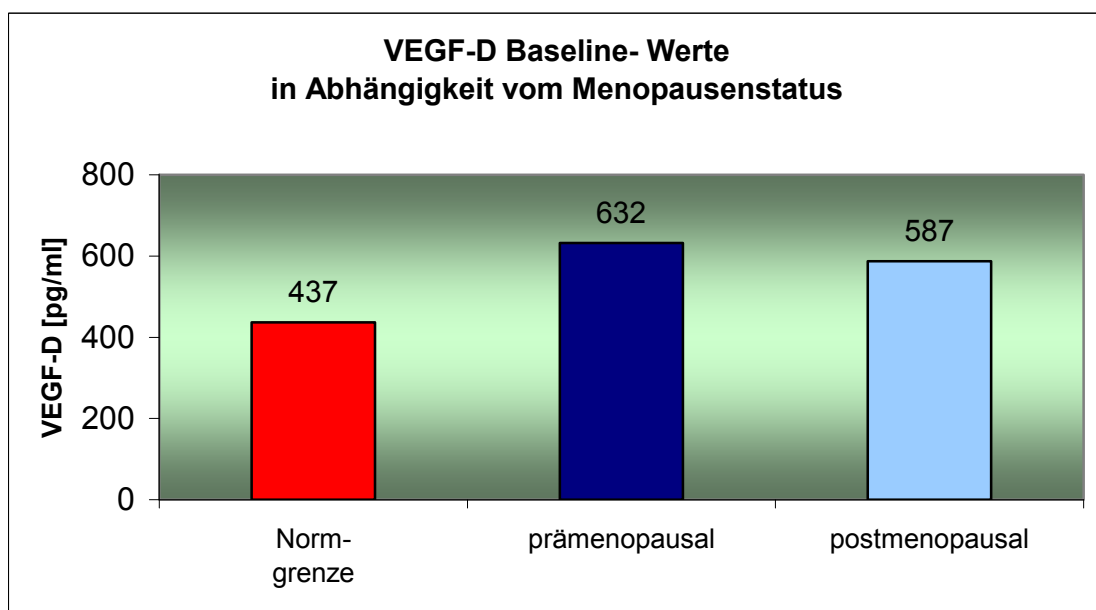


Abbildung 26: VEGF-D Baseline-Werte in Abhängigkeit vom Menopausenstatus

### 3.2.6 c-erbB2-Status

Wie aus Abbildung 27 ersichtlich, hatten Mammakarzinompatientinnen mit geringfügiger Überexpression von c-erbB2 (Dako-Score +1) die niedrigsten VEGF Baseline-Werte (362 pg/ml), der jedoch, wie bei allen anderen Frauen auch, über der oberen Normgrenze von 115 pg/ml liegt. Auch Patientinnen ohne c-erbB2 Expression wiesen einen VEGF-Wert von 396 pg/ml auf. Der höchste VEGF-Medianwert konnte bei Frauen mit starker c-erbB2 Überexpression (Dako-Score +3) gemessen werden.

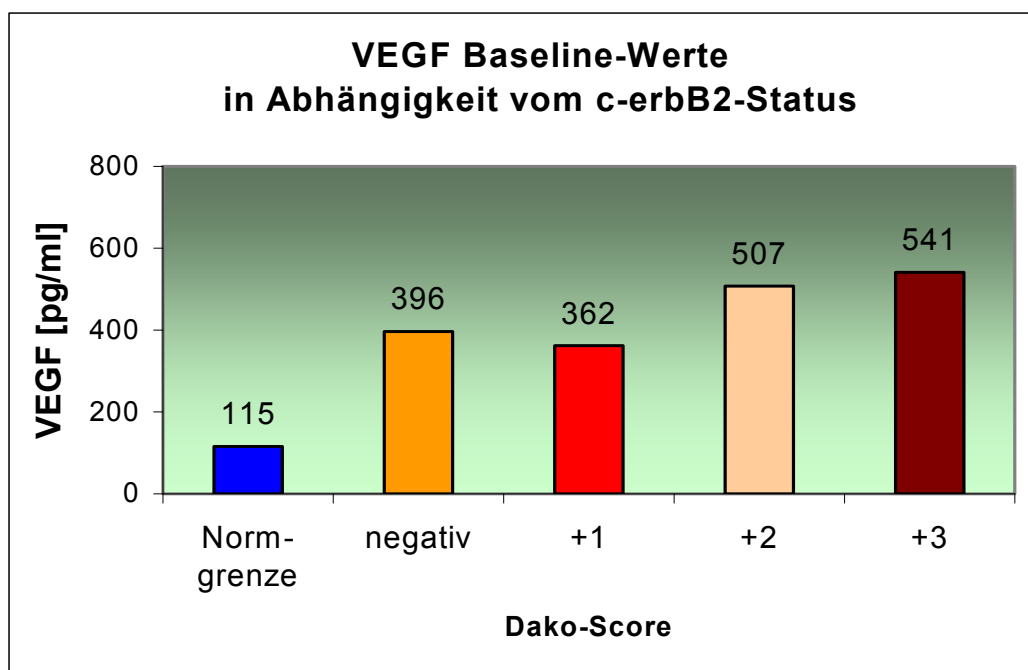


Abbildung 27: VEGF Baseline-Werte in Abhängigkeit vom c-erbB2-Status

Der niedrigste VEGF-D Baseline-Wert (518 pg/ml) konnte bei Patientinnen nachgewiesen werden, deren Primärtumoren keine Expression von c-erbB2 zeigten (siehe Abbildung 28). Bei Frauen mit einem Dako-Score +2 konnte der höchste mediane VEGF-D Wert von 720 pg/ml gemessen werden.

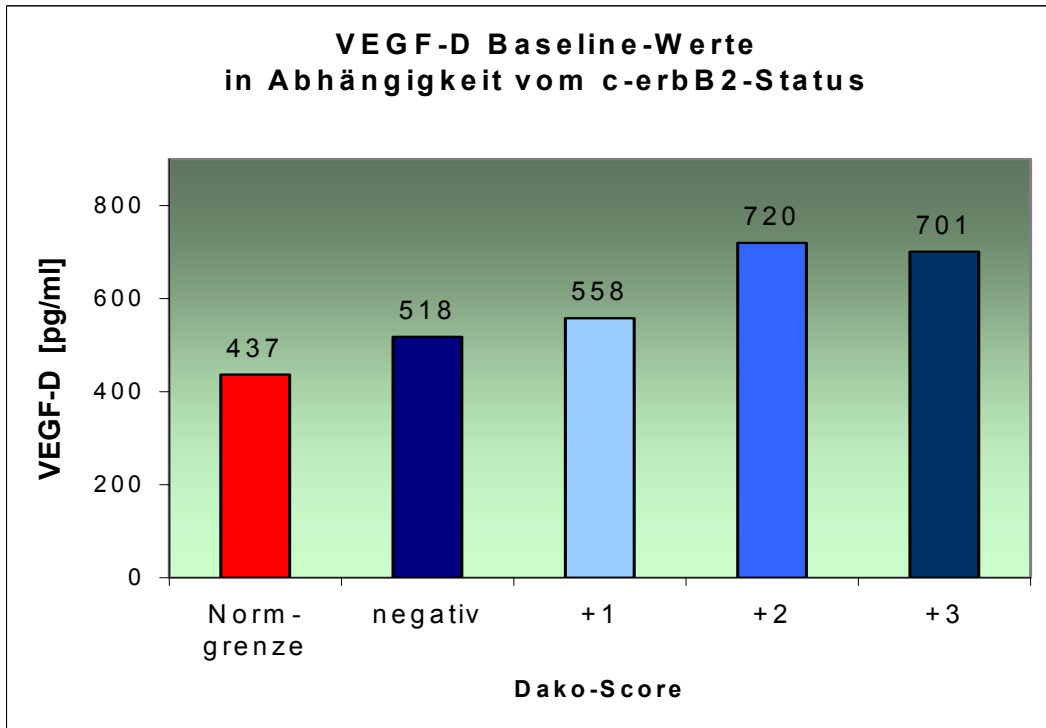


Abbildung 28: VEGF-D Baseline-Werte in Abhängigkeit vom c-erbB2-Status

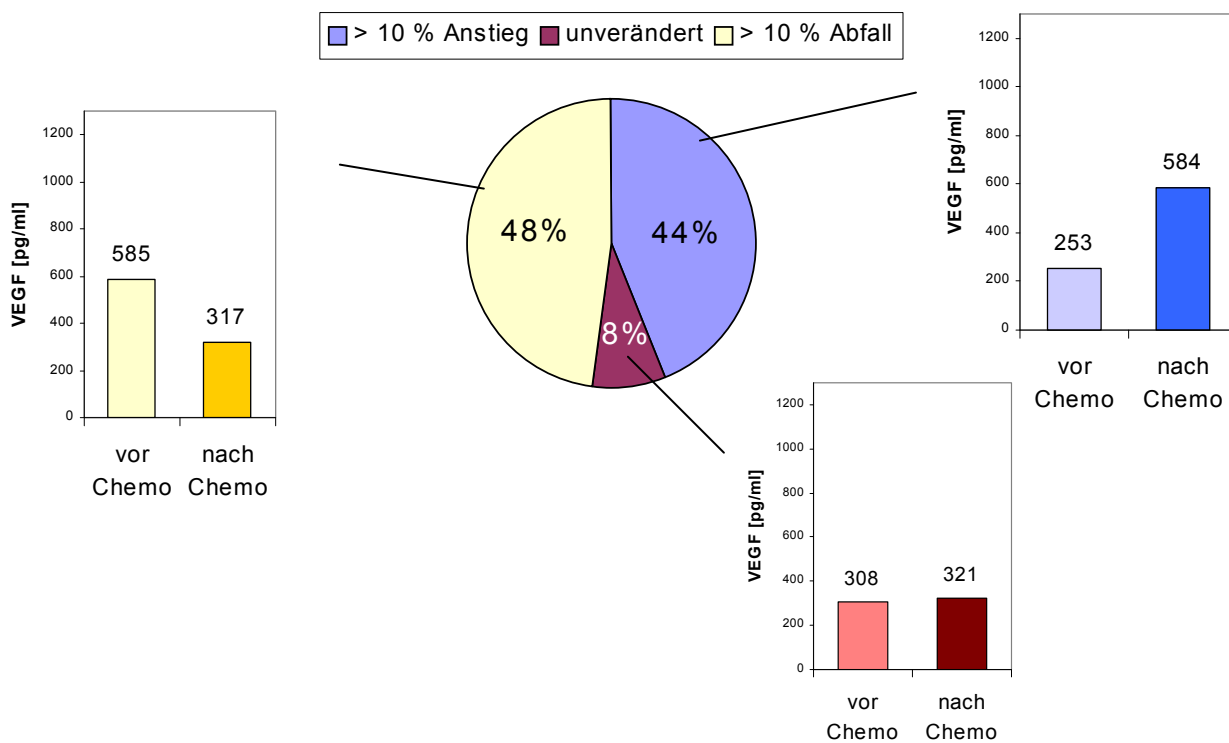
---

### **3.3 Änderungen VEGF und VEGF-D (>10%) bezogen auf Gesamtmenge**

Bezüglich der VEGF-Plasmawerte zeigten 130 (92 %) der insgesamt 142 im Rahmen der Studie untersuchten Patientinnen eine Änderung nach der Chemotherapie von mehr als 10 % des Ausgangswertes, unabhängig davon, welchen Therapiemodus sie erhielten. Die Patientenzahl innerhalb der Subgruppen, in denen die Werte nach chemotherapeutischer Behandlung entweder gestiegen oder gesunken waren, ist in beiden nahezu identisch. So stiegen bei 62 Frauen (44 % bezogen auf die Gesamtmenge) die VEGF-Level im Median von 253 pg/ml auf 584 pg/ml nach Chemotherapie an, in 68 Fällen (48 % bezogen auf die Gesamtmenge) konnte ein Abfall von mehr als 10 % (585 pg/ml auf 317 pg/ml) aufgezeigt werden. Hinsichtlich einer Änderung von mehr als 10 % blieben bei 12 Patientinnen (8 % bezogen auf die Gesamtmenge) die Werte unverändert.

Innerhalb der VEGF-D Gruppe ließ sich in 122 Fällen (86 %) eine Änderung der Werte um mindestens 10 % nach Chemotherapie erkennen. Hier sanken bei 70 Frauen (49 % bezogen auf Gesamtmenge) die Medianwerte von 1165 pg/ml auf 492 pg/ml, in 52 Fällen (37 %) stiegen die Medianwerte von 664 pg/ml auf 1166 pg/ml und bei 20 Patientinnen (14 %) konnte keine Änderung von mehr als 10 % gesehen werden (siehe Abbildung 29).

### Änderungen VEGF



### Änderungen VEGF-D

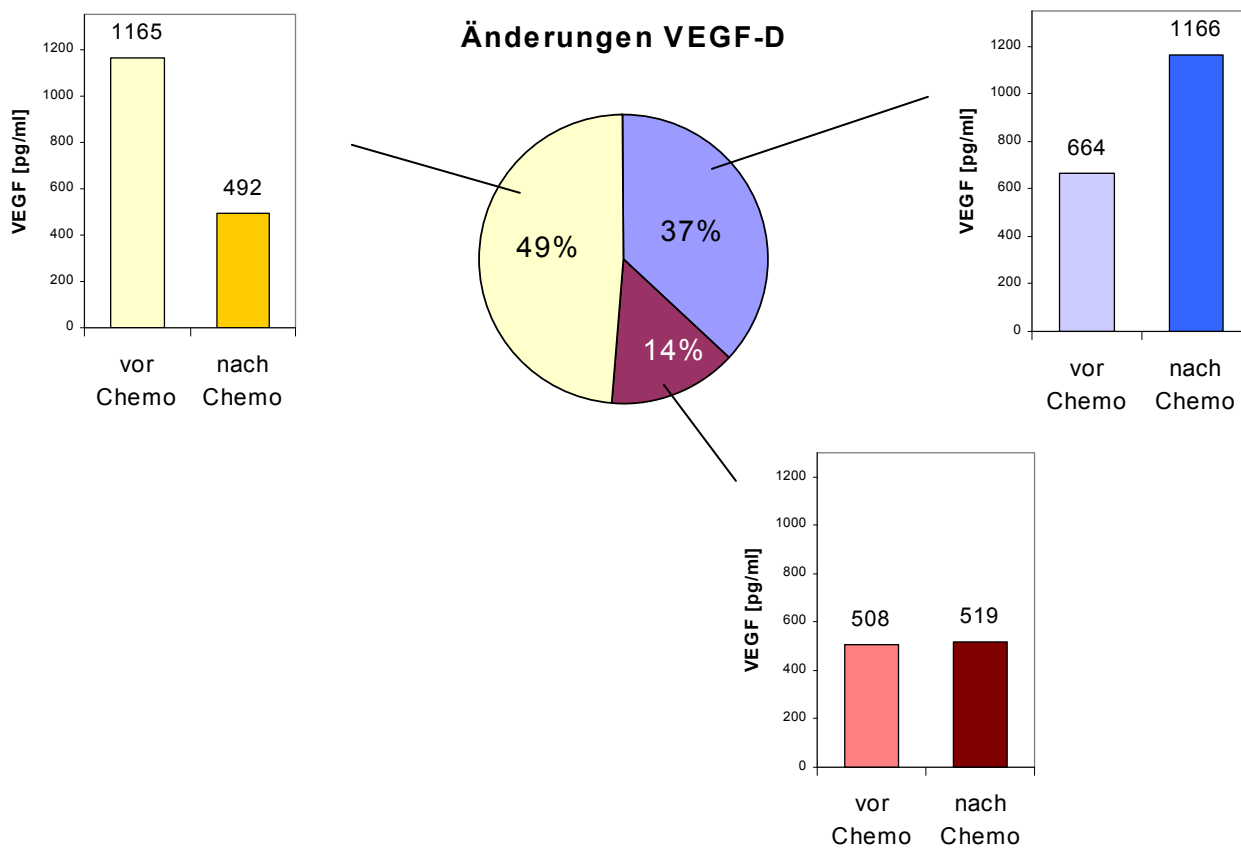


Abbildung 29: Änderungen von VEGF und VEGF-D (> 10 %)

### 3.3.1 Änderungen von VEGF und VEGF-D in Abhängigkeit der Therapiearme

Untersucht man die Auswirkungen der beiden unterschiedlichen Behandlungsmethoden auf die VEGF-Werte, so erkennt man in Abbildung 30 bei den 73 Patientinnen nach der Behandlung mit der Standardchemotherapie (Arm A) abfallende Medianwerte, wo hingegen bei den 69 Frauen, die eine dosisintensivierte Chemotherapie (Arm B) erhielten, die Werte nach dieser Behandlung sogar geringfügig anstiegen. In beiden Therapiearmen weist der Unterschied der VEGF-Werte keine statistische Signifikanz auf.

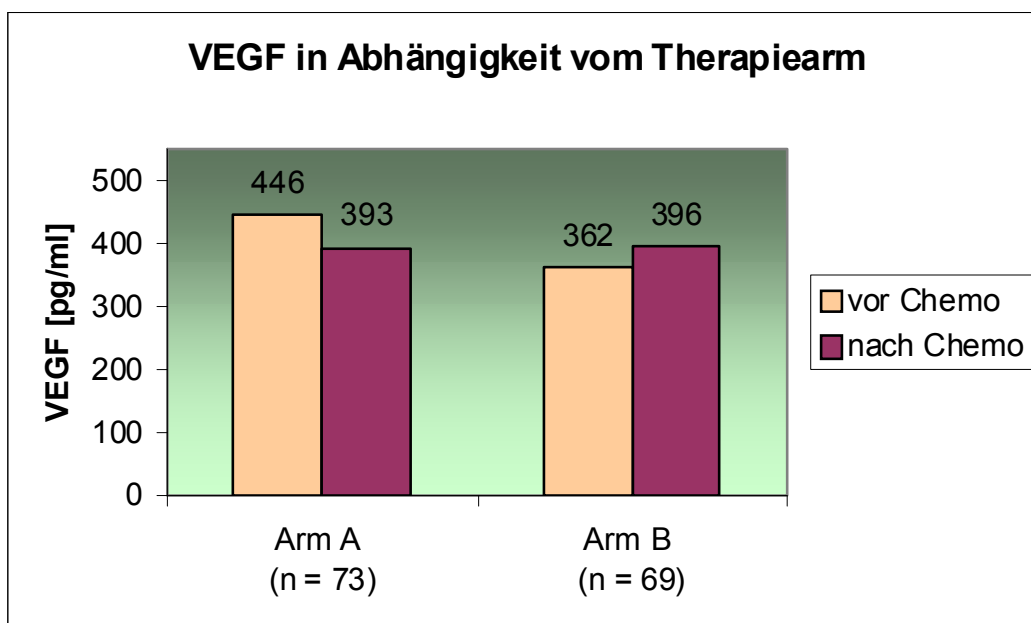


Abbildung 30: VEGF in Abhängigkeit vom Therapiearm

Wie der Abbildung 31 zu entnehmen ließ sich im Gegensatz zu VEGF ein Abfall des VEGF-D Medianwertes nachweisen sowohl bei Patientinnen, die im Arm A die Standardchemotherapie erhielten, als auch bei Frauen, die im Arm B dosisintensiviert chemotherapeutisch behandelt wurden.

Allerdings zeigen die p-Werte (Arm A: p-Wert = 0,308; Arm B: p-Wert = 0,103), dass keine statistische Signifikanzen erreicht werden.

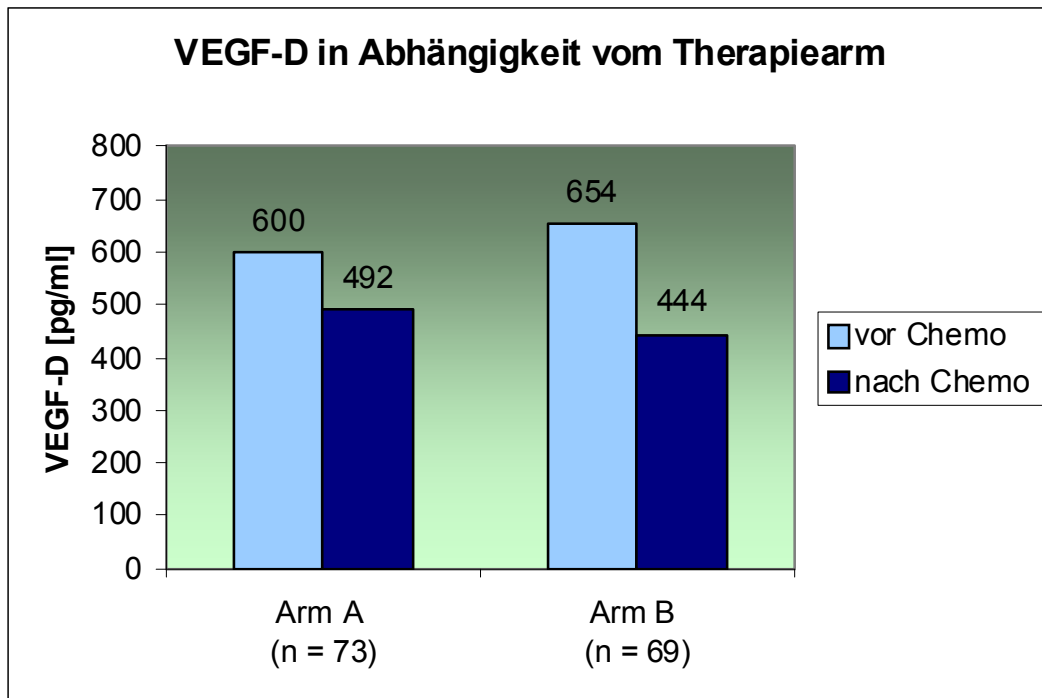


Abbildung 31: VEGF-D in Abhängigkeit vom Therapiearm



### 3.3.2 Änderungen von VEGF und VEGF-D in Abhängigkeit der Tumorcharakteristika

#### 3.3.2.1 Tumorgrading

Hinsichtlich des Tumorgradings waren innerhalb der verschiedenen Subgruppen (G1, G2, G3) keine statistisch signifikanten Änderungen der Plasmawerte von VEGF nach der Chemotherapie zu verzeichnen. Bei 42 Patientinnen, deren Tumor als wenig differenziert (G3) eingestuft wurde, beobachtete man nach der chemotherapeutischen Behandlung einen geringfügigen Anstieg der VEGF-Plasmawerte. Im Gegensatz dazu erkannte man bei 12 Frauen mit G1-Tumoren einen Abfall der VEGF-Werte nach der Chemotherapie, der jedoch keine statistische Signifikanz erreicht. Die VEGF-Werte von Frauen mit G2-Tumoren waren vor und nach der Therapie nahezu identisch (siehe Abbildung 32).

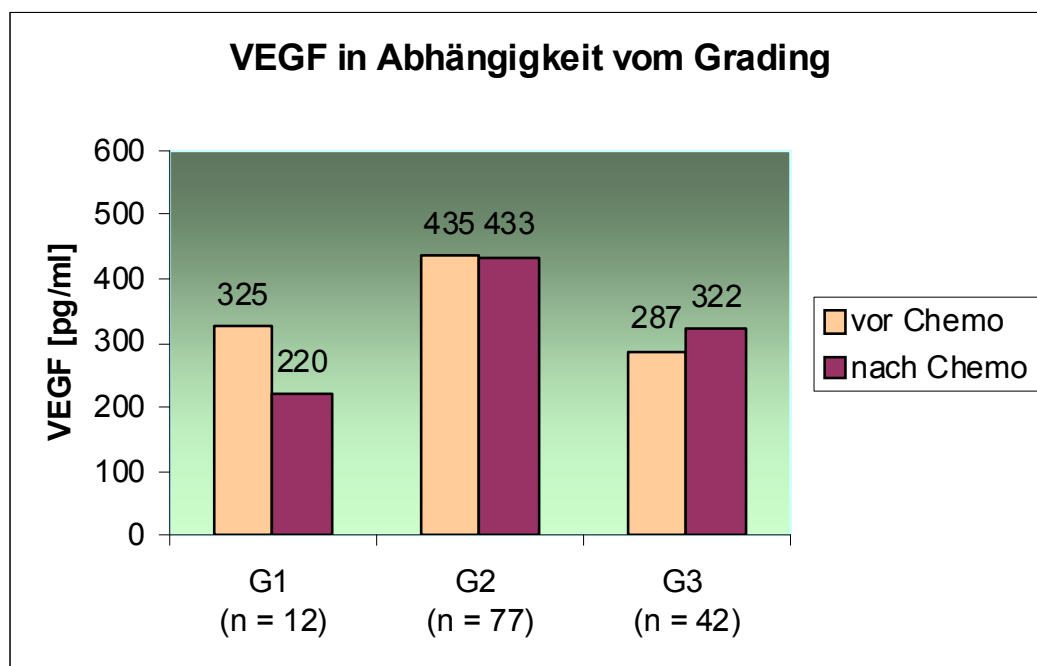


Abbildung 32: VEGF in Abhängigkeit vom Grading

Bei der Betrachtung der Werte von VEGF-D hinsichtlich der Unterteilung in verschiedene Tumordifferenzierungsgrade (siehe Abbildung 33) fällt bei allen Subgruppen ein niedrigerer Wert nach der Behandlung auf im Vergleich zu VEGF-D Werten vor der Chemotherapie.

Bei Patientinnen mit G1- und G3-Tumoren ist der Abfall am deutlichsten, jedoch zeigen die jeweiligen p-Werte an, dass keine statistische Signifikanz erreicht wird (G1: p-Wert = 0,117; G3: p-Wert = 0,076).

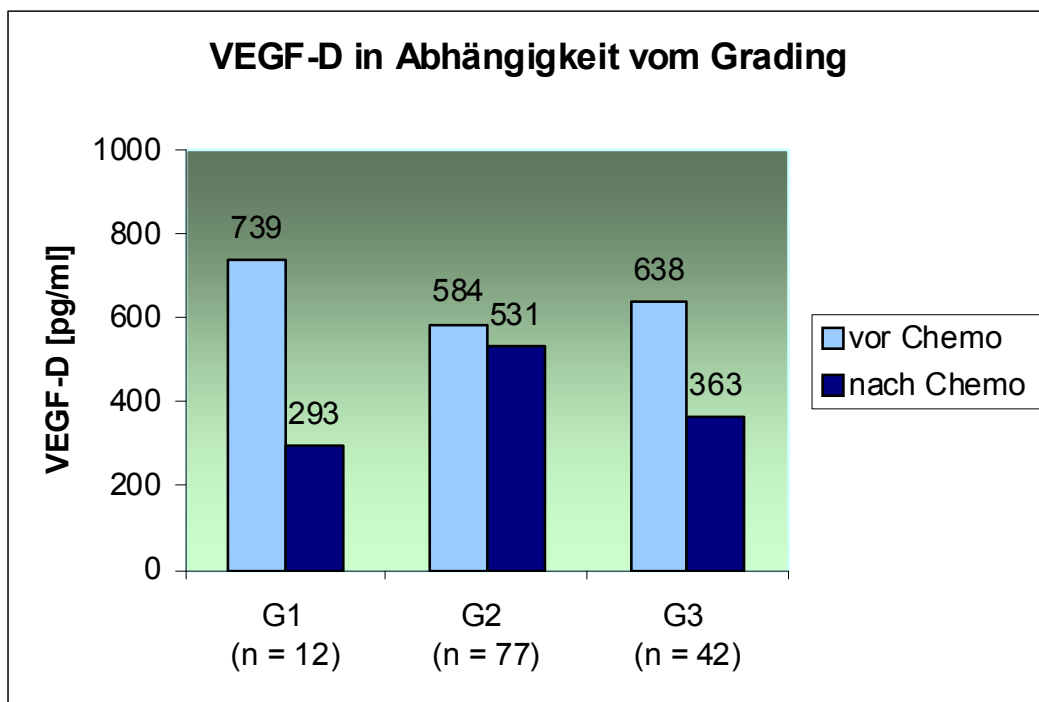


Abbildung 33: VEGF-D in Abhängigkeit vom Grading

### 3.3.2.2 Tumorgröße

Anhand der Abbildung 34 erkennt man, dass in Bezug auf die Größe des Primärtumors die VEGF-Werte nach der Chemotherapie vor allem bei den Patientinnen sanken, deren karzinomatöse Geschwulst größer als fünf Zentimeter (pT3) oder kleiner als zwei Zentimeter (pT1) betrug. Bei Frauen mit großen Primärtumoren (pT3) erreichte der VEGF-Abfall nach Behandlung mit einem p-Wert von 0,043 das statistische Signifikanzniveau. Auch wurde in dieser Subgruppe initial der höchste Ausgangswert von VEGF gemessen, jedoch hatten nur wenige Frauen einen pT3-Tumor.

Bei Frauen mit Tumoren zwischen zwei und fünf Zentimetern (pT2) war der gemessene VEGF-Wert nach Chemotherapie etwas höher als zu Beginn.

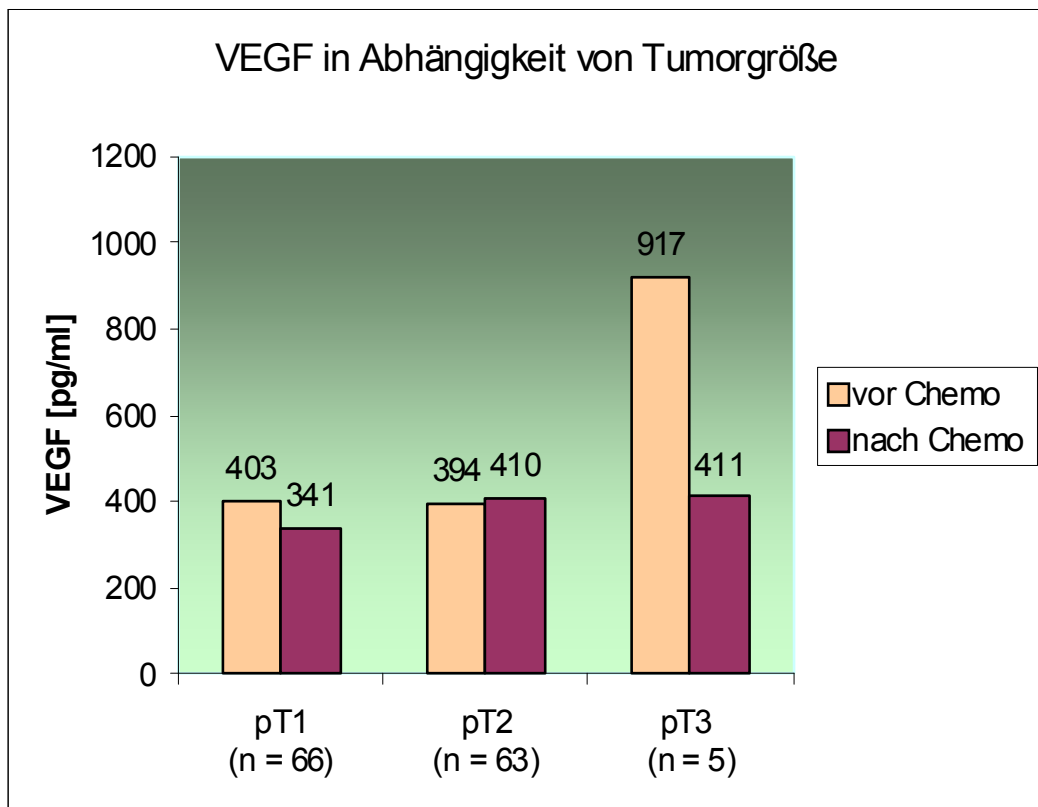


Abbildung 34: VEGF in Abhängigkeit von Tumorgröße

Die Abbildung 35 lässt erkennen, dass bezogen auf die Ausdehnung des Primärtumors bei allen drei Subgruppen der Angiogenesefaktors VEGF-D nach Chemotherapie sank. Jedoch lässt sich anhand der p-Werte keine signifikante Verringerung darstellen.

Vergleichbar zu VEGF hat die Subgruppe der Patientinnen mit dem größten Primärtumor (pT3) auch den initial höchsten Wert von VEGF-D.

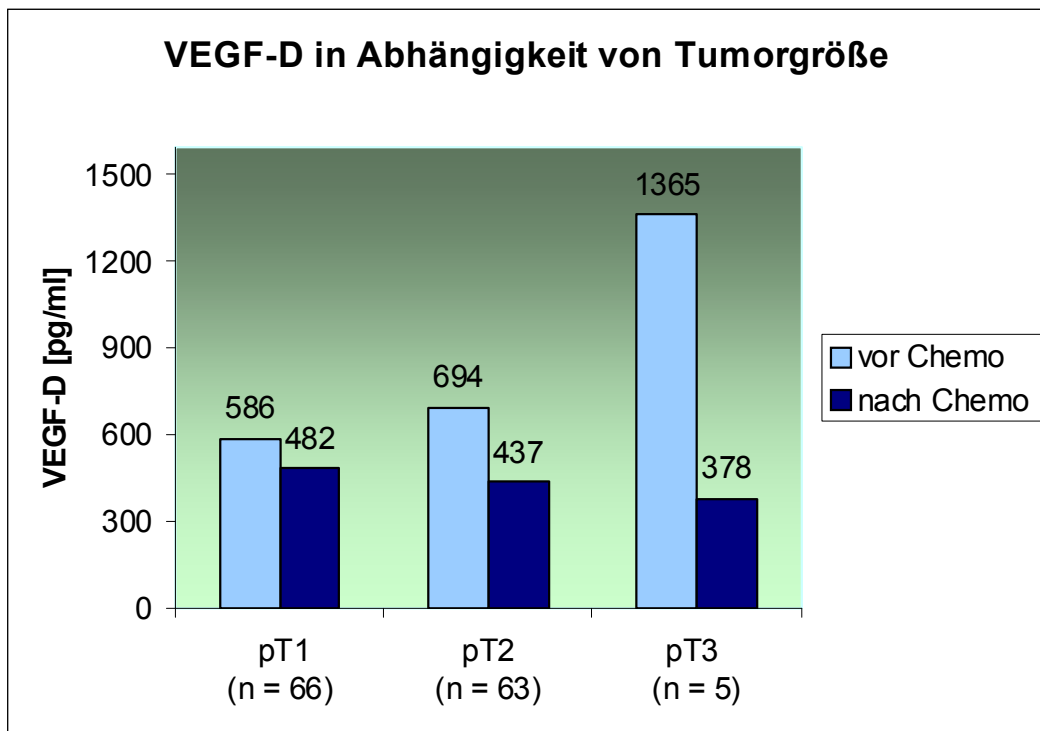


Abbildung 35: VEGF-D in Abhängigkeit von Tumorgröße

### 3.3.2.3 Hormonrezeptorstatus

Bezüglich des Angiogenesefaktors VEGF waren lediglich bei den 32 Patientinnen mit hormonrezeptornegativem Mammakarzinom leicht fallende Plasmawerte nach der Chemotherapie zu messen. Der Unterschied weist jedoch keine statistische Relevanz auf. Bei den 109 Frauen mit hormonabhängigen Tumoren stieg VEGF nach der Therapie etwas an (siehe Abbildung 36).

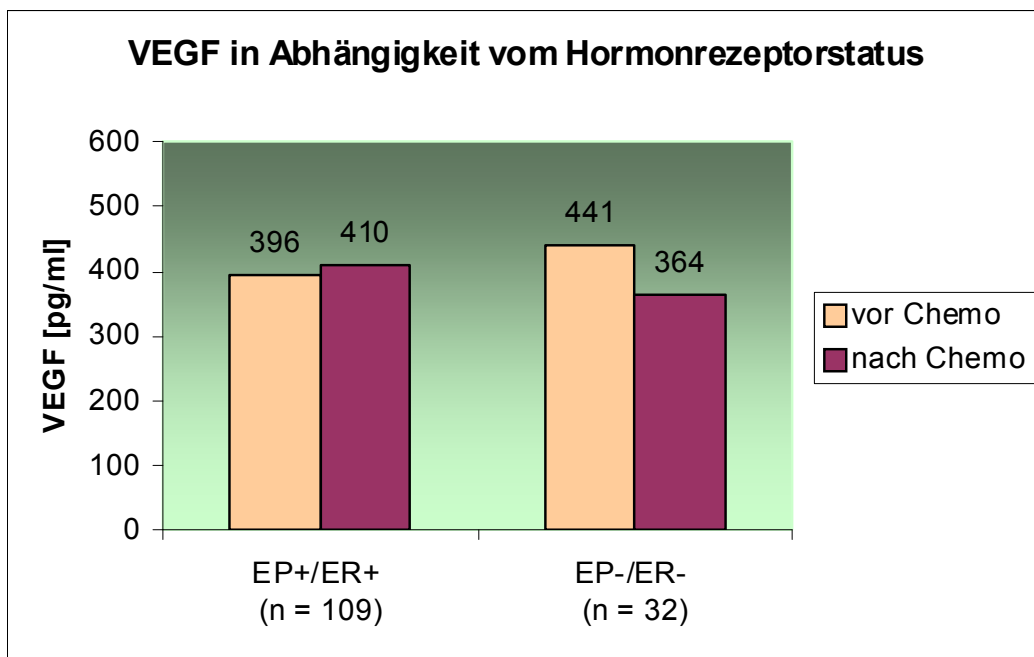


Abbildung 36: VEGF in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus

Vergleicht man die VEGF-D Werte vor und nach der Chemotherapie (siehe Abbildung 37), so findet man bei 109 Patientinnen, deren Tumor zum Zeitpunkt der Randomisierung als östrogen- und progesteronrezeptorpositiv bewertet wurden, statistisch signifikant abfallende Plasmawerte nach Behandlung (p-Wert = 0,040). Bei den 32 Patientinnen mit negativem Hormonrezeptorstatus verringerten sich die VEGF-D Werte im Median von 456 pg/ml vor der Chemotherapie auf 304 pg/ml nach Therapie. Interessanterweise lag der Medianwert von VEGF-D bei Frauen mit hormonrezeptor-negativem Mammakarzinom deutlich niedriger verglichen mit dem von Patientinnen mit positivem Rezeptorstatus.

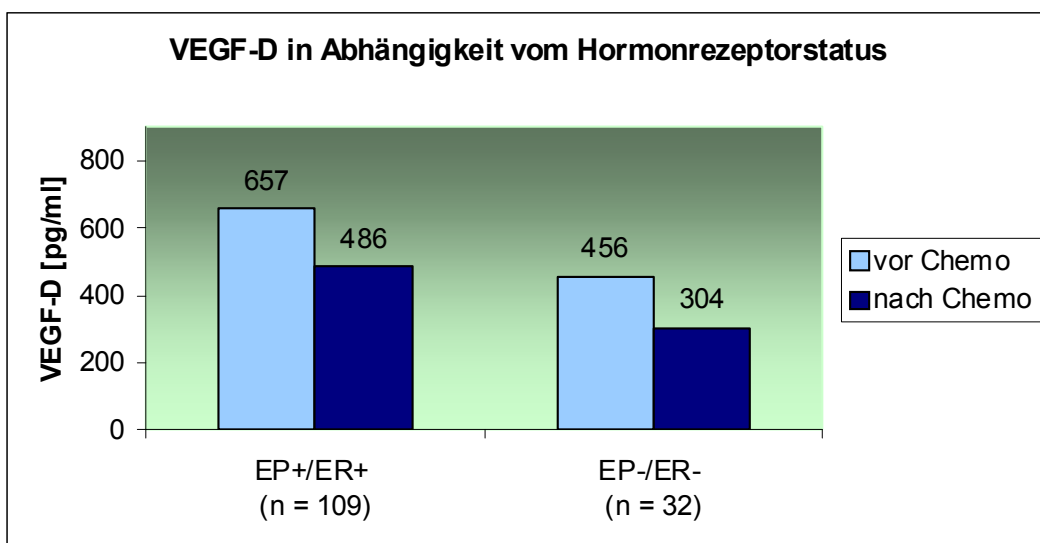


Abbildung 37: VEGF-D in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus

### 3.3.2.4 Menopausenstatus

Hinsichtlich des Menopausenstatus konnte, wie in Abbildung 38 ersichtlich, keine statistisch signifikante Verringerung der Werte von VEGF nach Behandlung gezeigt werden. Beim postmenopausalen Kollektiv stiegen die Medianwerte nach Chemotherapie etwas an.

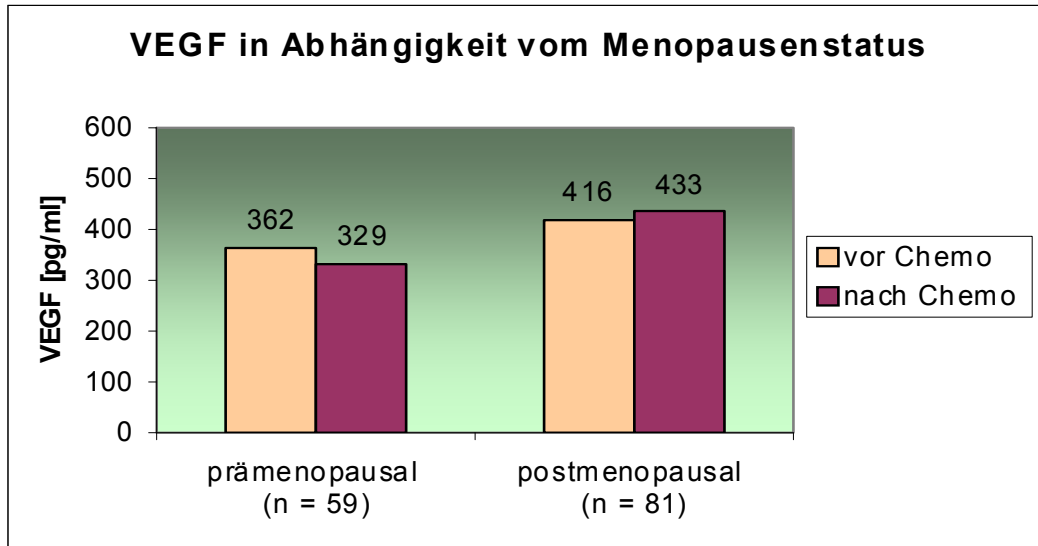


Abbildung 38: VEGF in Abhängigkeit vom Menopausenstatus

Die Abbildung 39 macht deutlich, dass ein deutlich geringerer Medianwert von VEGF-D bei 81 postmenopausalen Frauen gemessen wurde, nachdem sie chemotherapiert waren. Dieser Abfall von anfangs 587 pg/ml auf spätere 368 pg/ml verfehlte mit einem p-Wert von 0,054 nur knapp die statistische Signifikanz.

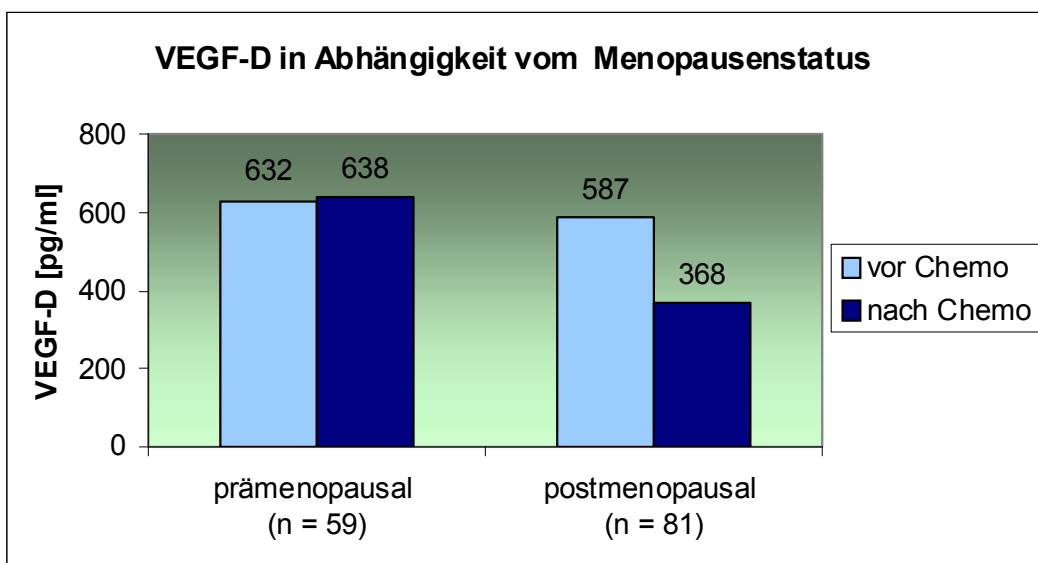


Abbildung 39: VEGF-D in Abhängigkeit vom Menopausenstatus

### 3.3.2.5 c-erbB2-Status

Bei der Betrachtung der VEGF-Werte bei Karzinompatientinnen mit unterschiedlich starker Überexpression von c-erbB2 ist in allen drei Subgruppen nach der Chemotherapie ein Abfall der Plasmawerte zu verzeichnen. Bei den 29 Frauen mit einem Dako-Score 3+ war diese Verringerung mit einem entsprechenden p-Wert von  $p = 0,052$  am deutlichsten. Im Gegensatz dazu war bei Frauen, deren Tumoren keine Expression von c-erbB2 aufwiesen, nach der Behandlung ein geringer Anstieg der VEGF-Werte zu verzeichnen (siehe Abbildung 40).

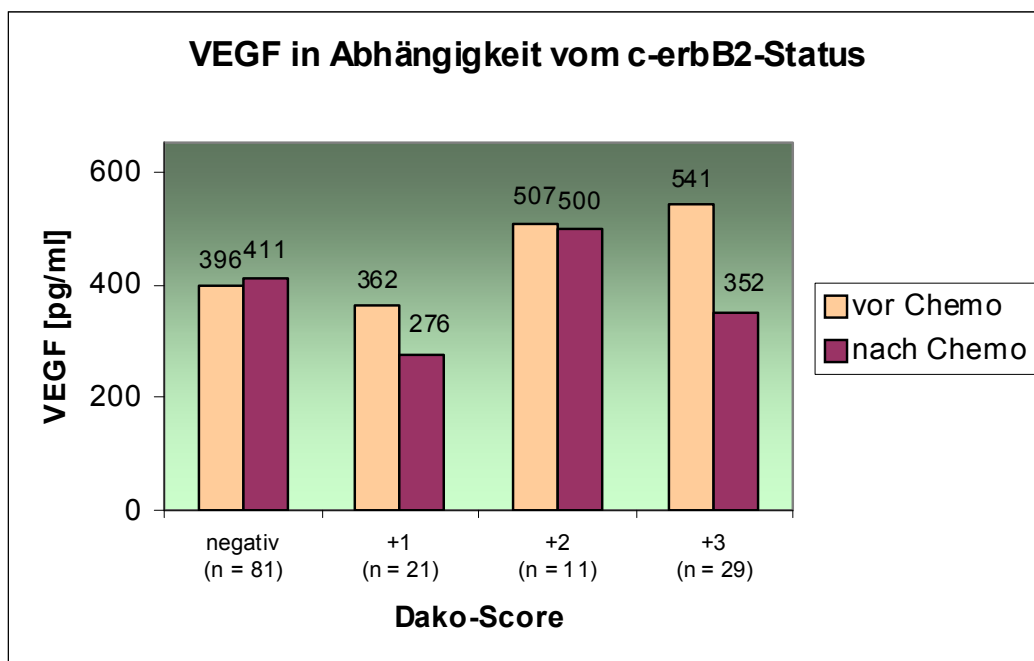


Abbildung 40: VEGF in Abhängigkeit vom c-erbB2-Status



Hinsichtlich des Angiogenesefaktors VEGF-D in Abhängigkeit von c-erbB2-Status zeigt Abbildung 41, dass man bei Messungen nach der Chemotherapie im gesamten Patientenkollektiv niedrigere Werte verglichen zu den Messungen vor der Behandlung erhielt, unabhängig davon, ob der Dako-Score als negativ oder positiv festgelegt wurde. Einzig in der Subgruppe mit 21 Patientinnen, deren Tumorzellen nur eine geringfügige c-erbB2 Expression (Dako-Score +1) aufwiesen, erreicht die Verringerung der VEGF-D Werte mit einem p-Wert von 0,05 statistische Signifikanz.

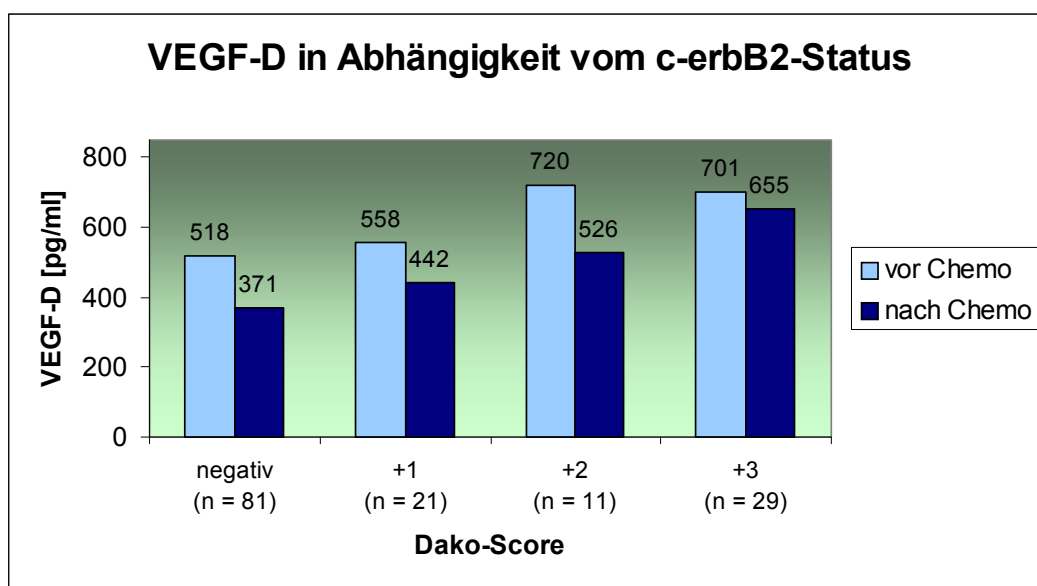


Abbildung 41: VEGF-D in Abhängigkeit vom c-erbB2-Status

### 3.4 Änderungen von VEGF und VEGF-D

#### (Baseline-Werte oberhalb der Normgrenze)

Von den insgesamt 142 in die Studie eingeschlossenen und behandelten Patientinnen waren bei 121 Frauen (85 %) die VEGF Baseline-Werte vor der Chemotherapie oberhalb der Normgrenze von 115 pg/ml erhöht. Hinsichtlich der VEGF-D Bestimmung zeigte sich bei 94 Patientinnen (66 %) vor der Therapie ein über der Normgrenze von 437 pg/ml liegender Baseline-Wert (siehe Abbildung 42).

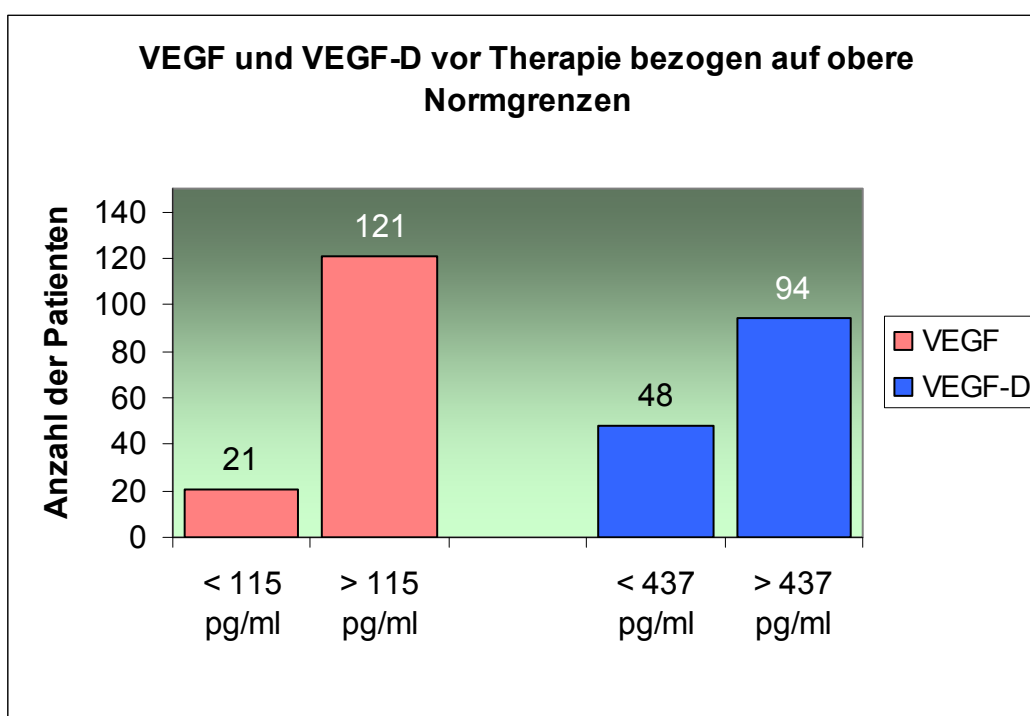


Abbildung 42: VEGF und VEGF-D vor Therapie bezogen auf obere Normgrenzen

Die Abbildung 43 lässt erkennen, dass nach Beendigung der Chemotherapie 62 Frauen in Arm A einen VEGF-Wert oberhalb der Normgrenze von 115 pg/ml liegend zeigten und 49 Frauen einen VEGF-D Wert, der ebenfalls größer als die obere Normgrenze von 437 pg/ml war. Im dosisintensivierten Arm B konnte nach chemotherapeutischer Behandlung bei 58 Patientinnen ein VEGF-Wert größer als 115 pg/ml nachgewiesen werden und bei 61 Patientinnen lag der gemessene VEGF-D Wert über 437 pg/ml.

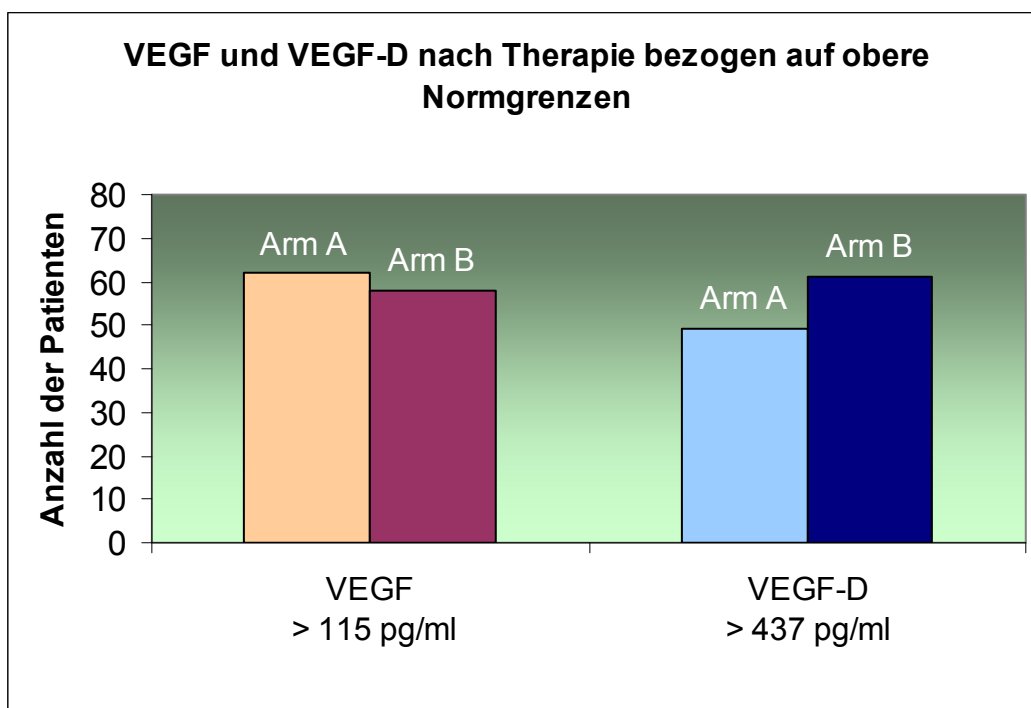


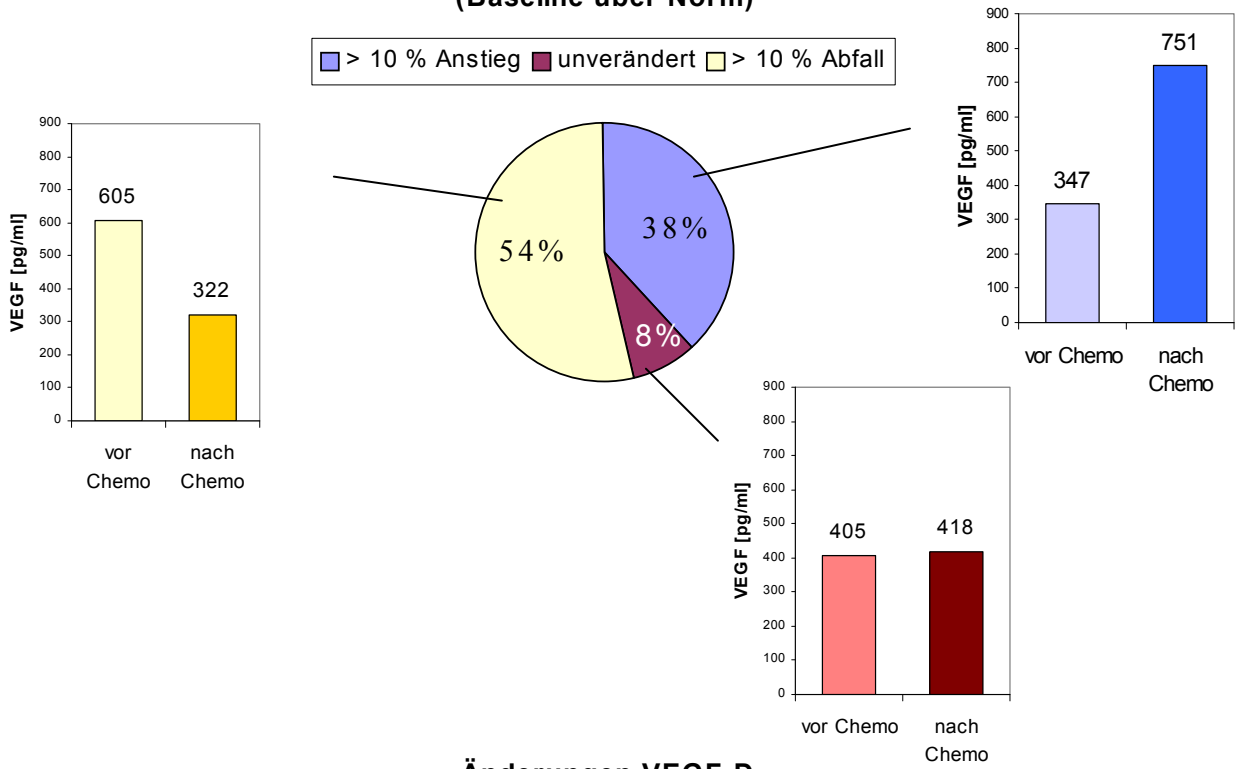
Abbildung 43: VEGF- und VEGF-D nach Therapie bezogen auf obere Normgrenzen

---

Der Medianwert von VEGF betrug 470 pg/ml vor Beginn und 452 pg/ml nach Beendigung der Chemotherapie. Auch hier überprüften wir eventuelle Änderungen der Werte, die sich auf mehr als 10 % des Ausgangswertes beliefen. Wie Abbildung 44 zu entnehmen ist, konnten bei 65 Patientinnen (54 % bezogen auf 121 Frauen mit VEGF Baseline-Werten oberhalb der Normgrenze von 115 pg/ml) abfallende VEGF-Werte nach Chemotherapie gezeigt werden ( $p = 0,001$ ), bei 46 Patientinnen hingegen (38 %) stiegen die VEGF-Level ( $p = 0,001$ ) und in 10 Fällen (8 %) waren die Werte vor und nach Chemotherapie nahezu identisch.

Bezogen auf die VEGF-D Bestimmung lag der mediane Baseline-Wert bei 810 pg/ml. Nach Beendigung der chemotherapeutischen Behandlung sank dieser im Median auf 523 pg/ml, was mit einem p-Wert von  $< 0,001$  als statistisch signifikant angesehen werden kann. Mehr als 10 % Anstieg der VEGF-D Level nach Chemotherapie erkannte man bei 23 Frauen (24 % bezogen auf 94 Frauen mit VEGF-D Baseline-Werten oberhalb der Normgrenze von 437 pg/ml;  $p < 0,001$ ), bei 60 Patientinnen hingegen (64 %) sanken die Medianwerte von 880 pg/ml auf 346 pg/ml ( $p$ -Wert  $< 0,001$ ) und in 11 Fällen (12 %) änderten sich die Werte vor und nach Therapie nicht um mindestens 10 %.

### Änderungen VEGF (Baseline über Norm)



### Änderungen VEGF-D (Baseline über Norm)

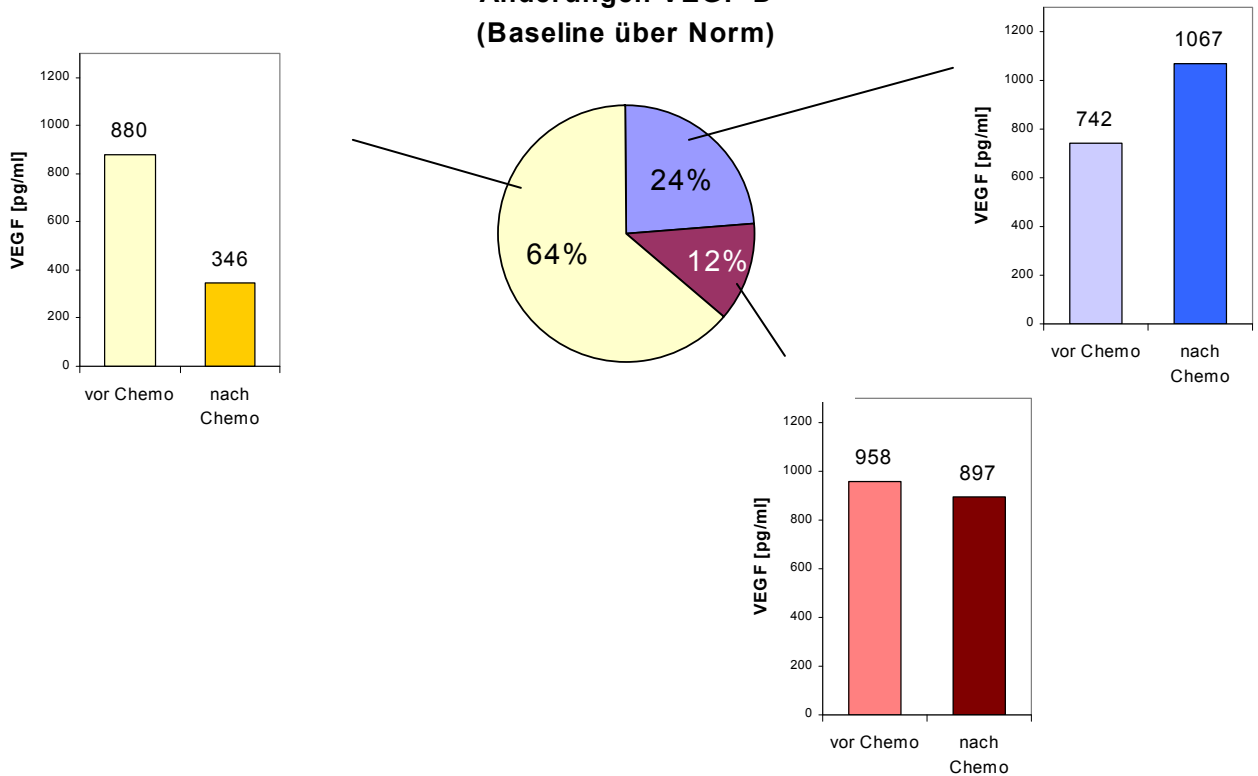


Abbildung 44: Änderungen von VEGF und VEGF-D  
(Baseline-Werte oberhalb der Normgrenze)

### 3.4.1 Änderungen von VEGF und VEGF-D

#### (Baseline-Werte oberhalb der Norm) in Abhängigkeit der Therapiearme

Die Analyse der beiden verschiedenen Behandlungsmöglichkeiten innerhalb der Subgruppe mit VEGF-D Baseline-Werten oberhalb des Normbereiches ergab, dass bei allen Patientinnen nach Chemotherapie deutlich geringere Medianwerte gemessen wurden.

Sowohl für Patientinnen, die in Arm A die Standardchemotherapie erhielten, als auch für die Gruppe, die in Arm B dosisintensiviert behandelt wurden, zeigen die jeweiligen p-Werte (Arm A:  $p = 0,005$ ; Arm B:  $p = 0,004$ ), dass das statistische Signifikanzniveau erreicht wurde (siehe Abbildung 45).

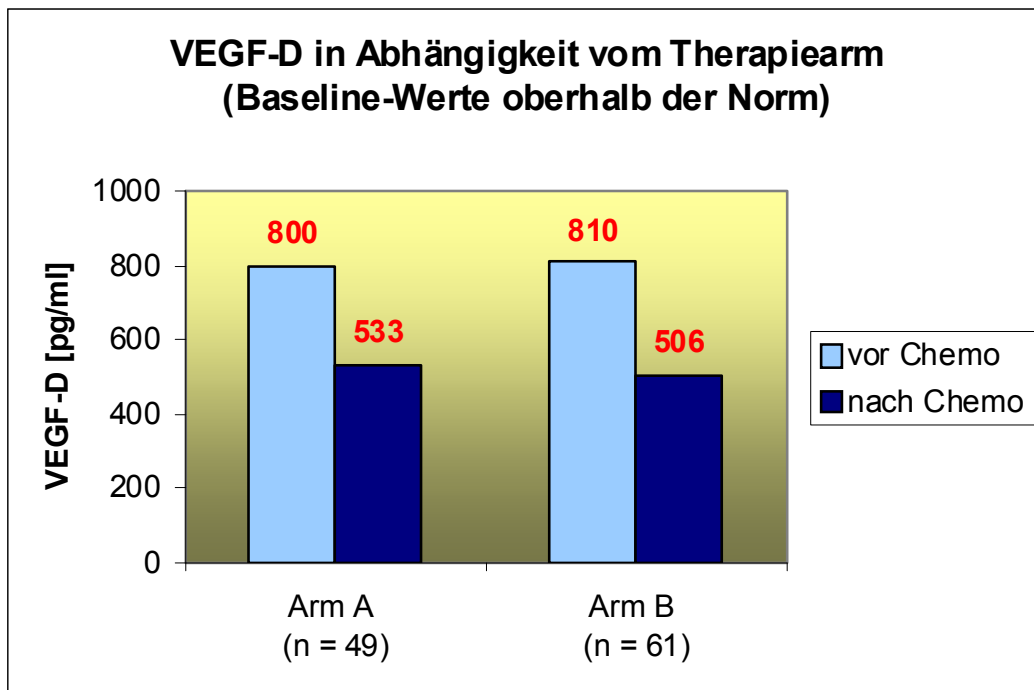


Abbildung 45: VEGF-D in Abhängigkeit vom Therapiearm  
(Baseline-Werte oberhalb der Norm)

### 3.4.2 Änderungen von VEGF und VEGF-D (Baseline-Werte oberhalb der Norm) in Abhängigkeit der Tumorcharakteristika

#### 3.4.2.1 Tumorigradung

Hinsichtlich des Tumorigradings gab es eine statistisch signifikante Verringerung des Angiogenesehemmers VEGF-D bei den 29 Patientinnen mit G3-Tumoren von 951 pg/ml vor Therapie auf 492 pg/ml nach Behandlung ( $p = 0,004$ ). Auch bei den G1-Tumoren erreichte der VEGF-D Abfall von initialen 853 pg/ml auf späteren 293 pg/ml mit einem entsprechenden  $p = 0,036$  das statistische Signifikanzniveau (siehe Abbildung 46).

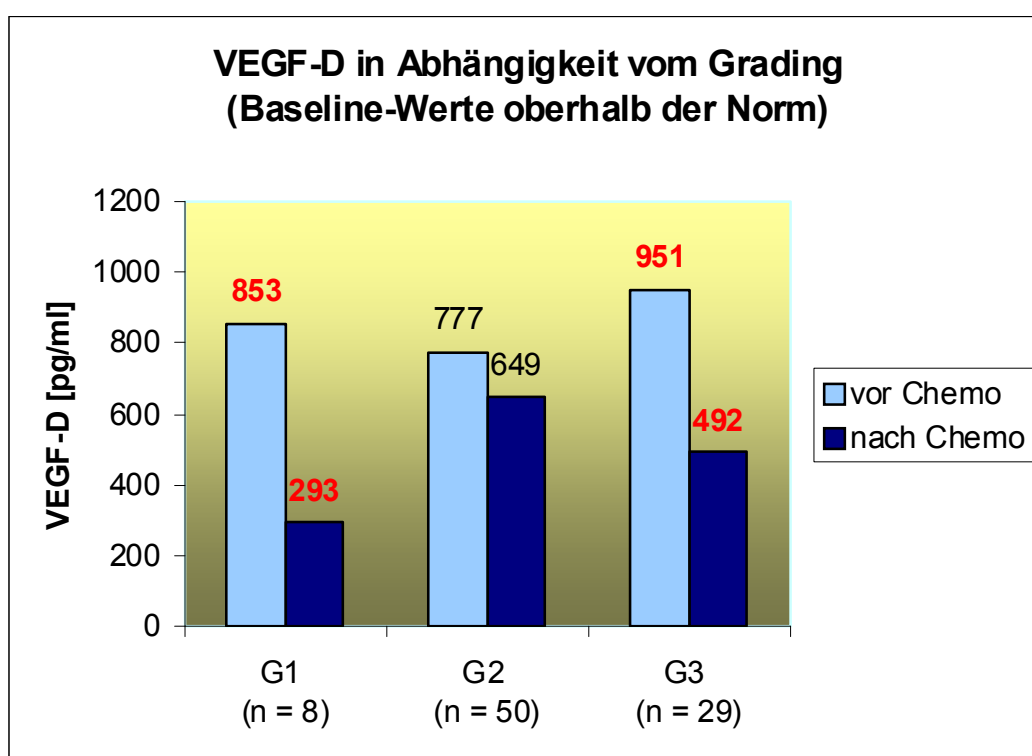


Abbildung 46: VEGF-D in Abhängigkeit vom Grading  
(Baseline-Werte oberhalb der Norm)

### 3.4.2.2 Tumorgröße

Die Abbildung 47 zeigt, dass in der Analyse der drei verschiedenen Einteilungen der Tumorgröße man bei den wenigen Patientinnen ( $n = 5$ ) mit pT3-Tumoren ( $> 50$  mm) eine statistische Reduktion von VEGF-Werten von 917 pg/ml auf 411 pg/ml nach Chemotherapie ( $p = 0,043$ ) fand.

Bei 54 Frauen mit Tumoren  $\leq 20$  mm (pT1-Tumoren) verfehlte der Abfall von VEGF durch Chemotherapie mit  $p = 0,053$  nur knapp das statistische Signifikanzniveau.

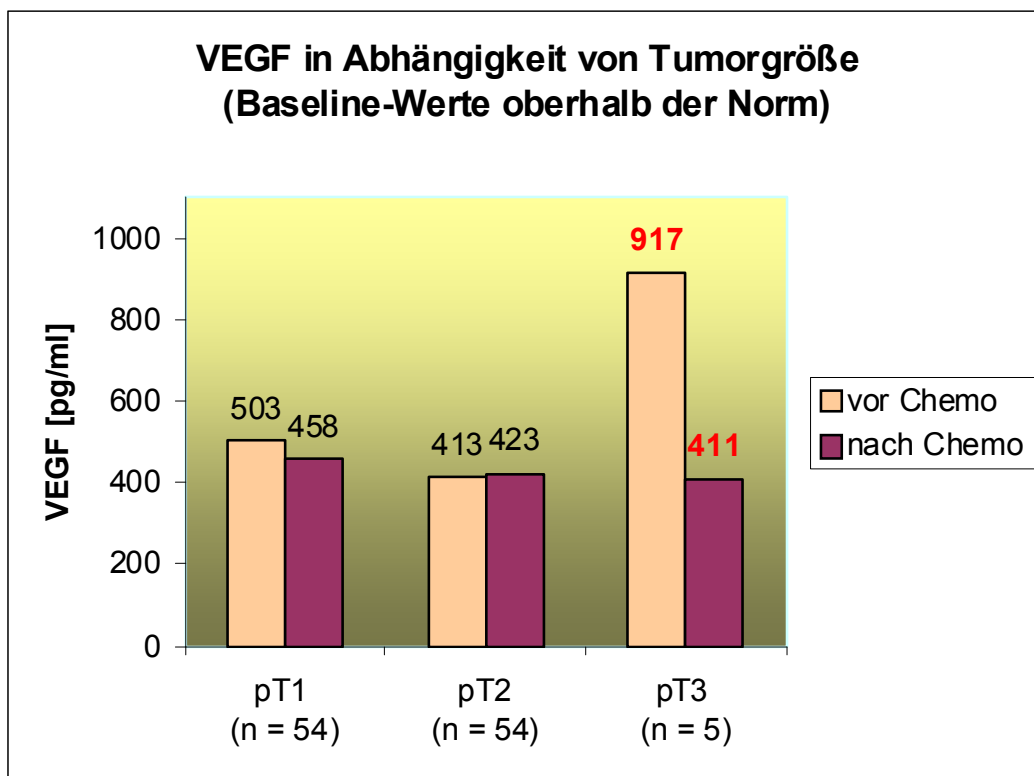


Abbildung 47: VEGF in Abhängigkeit von Tumorgröße  
(Baseline-Werte oberhalb der Norm)



Hinsichtlich der Abhängigkeit von VEGF-D (Baseline-Werte oberhalb der Norm) von der Tumorgröße konnte man, wie in Abbildung 48 ersichtlich, bei allen drei Subgruppen eine Verringerung nach Chemotherapie beobachten, allerdings war diese lediglich bei pT1- ( $n = 44$ ;  $p = 0,040$ ) und pT2-Tumoren ( $n = 44$ ;  $p = 0,017$ ) von statistischer Signifikanz.

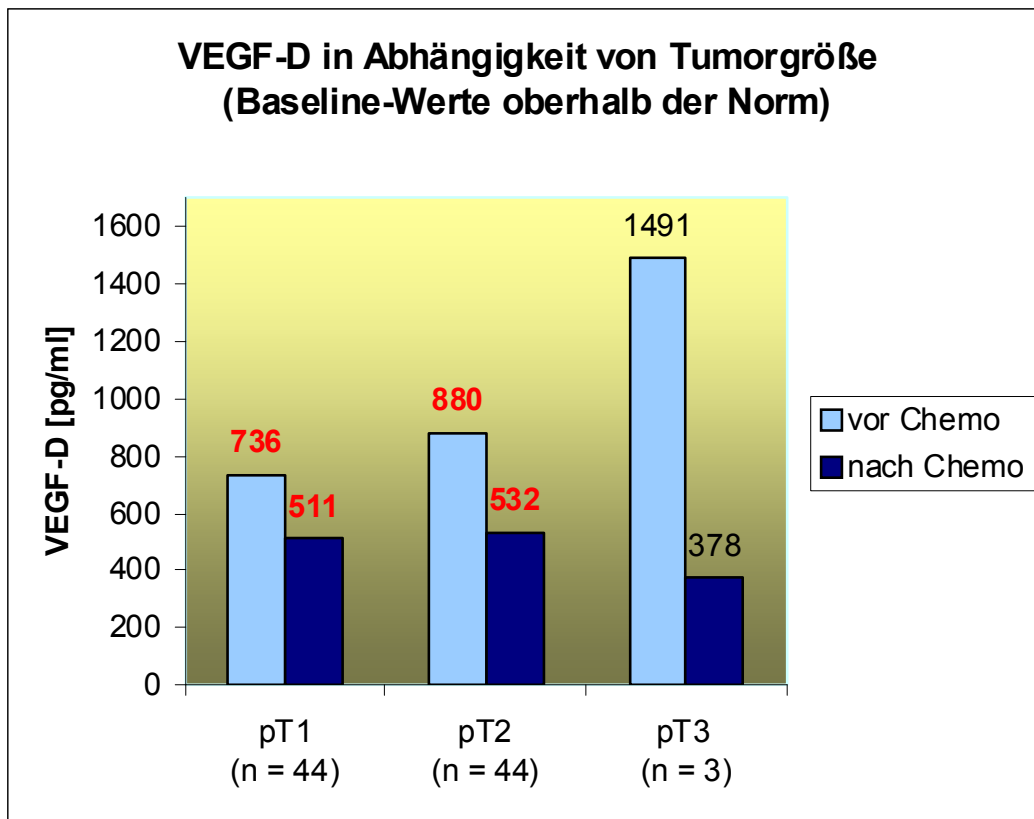


Abbildung 48: VEGF-D in Abhängigkeit von Tumorgröße  
(Baseline-Werte oberhalb der Norm)

### 3.4.2.3 Hormonrezeptorstatus

Der Abbildung 49 ist zu entnehmen, dass im Subkollektiv der Patientinnen mit VEGF-D Baseline-Werten oberhalb der Norm liegend (VEGF-D > 437 pg/ml) bei den 76 Frauen mit hormonrezeptorpositivem Mammakarzinom eine statistisch signifikante Reduktion der Medianwerte nach zytostatischer Behandlung zu verzeichnen ( $p < 0,001$ ) ist.

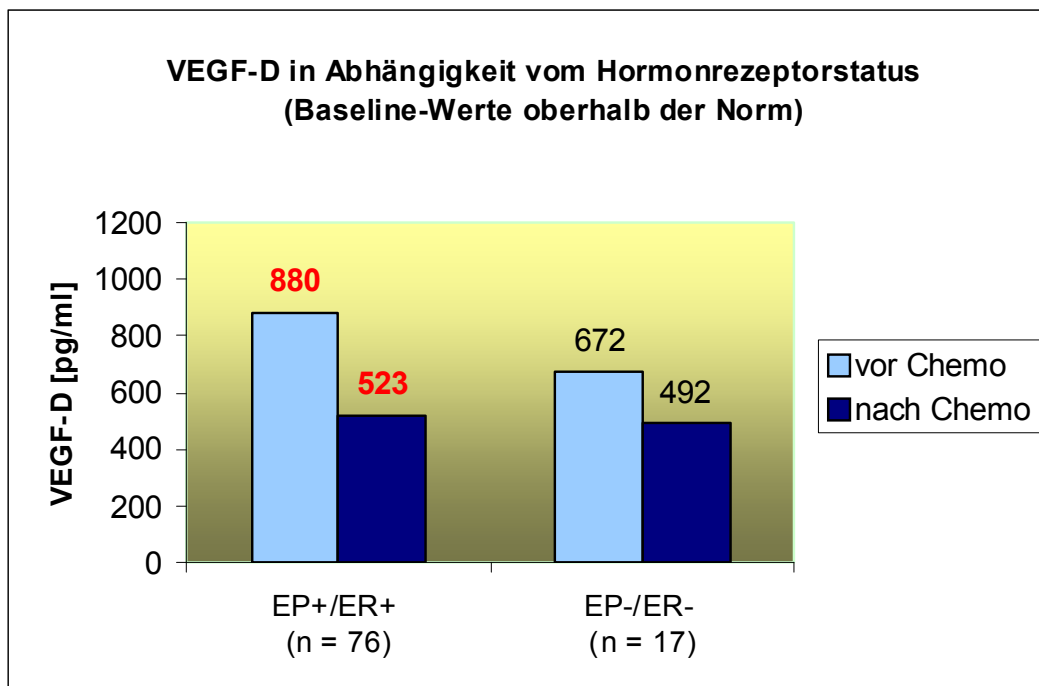


Abbildung 49: VEGF-D in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus  
(Baseline-Werte oberhalb der Norm)

### 3.4.2.4 Menopausenstatus

Untersucht man den Einfluss der Prädiktoren auf mögliche Änderungen in den Patientensubgruppen mit abfallenden oder ansteigenden VEGF- und VEGF-D Plasmawerten (Baseline-Werte über Norm), so erkennt man anhand Abbildung 50 bei postmenopausalen Frauen (n = 50; 54 %) eine signifikante Reduktion der VEGF-D Werte von 810 pg/ml auf 408 pg/ml ( $p < 0,001$ ) nach Chemotherapie.

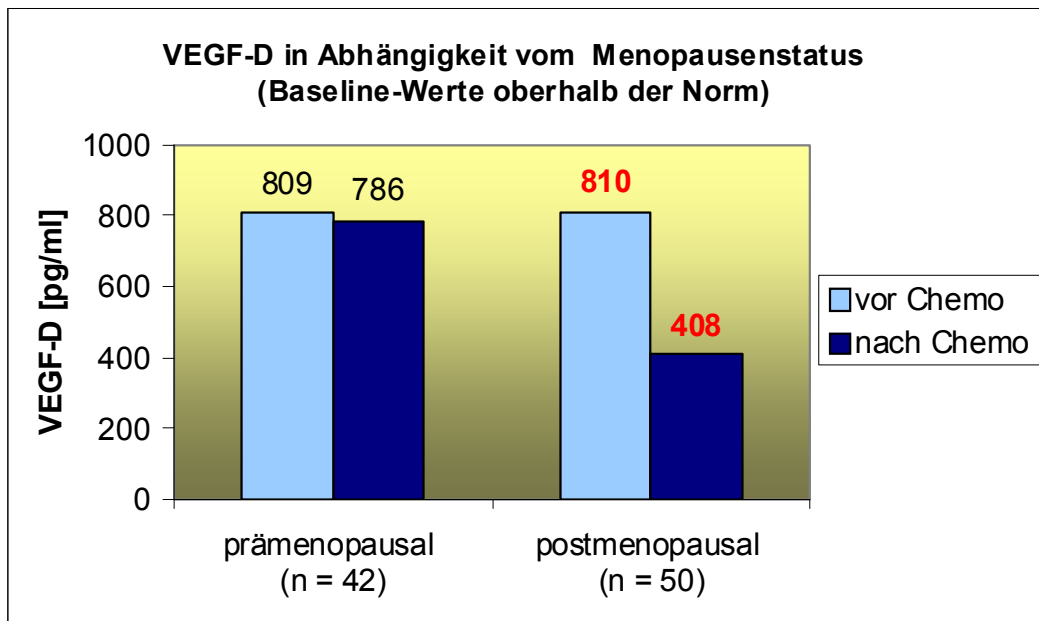


Abbildung 50: VEGF-D in Abhängigkeit vom Menopausenstatus (Baseline-Werte oberhalb der Norm)

### 3.4.2.5 c-erbB-2 Status

Bei Patientinnen, deren Tumor keine Expression von c-erbB-2 aufwies, verringerte sich der VEGF-D Medianwert signifikant nach Beendigung der Chemotherapie ( $p = 0,005$ ). Ein p-Wert von 0,026 zeigt, dass ebenfalls bei Frauen mit geringgradiger Überexpression von c-erbB-2 (Dako-Score 1+) eine wesentliche Reduktion der Plasmawerte von VEGF-D nach Behandlung erreicht wurde (siehe Abbildung 51).

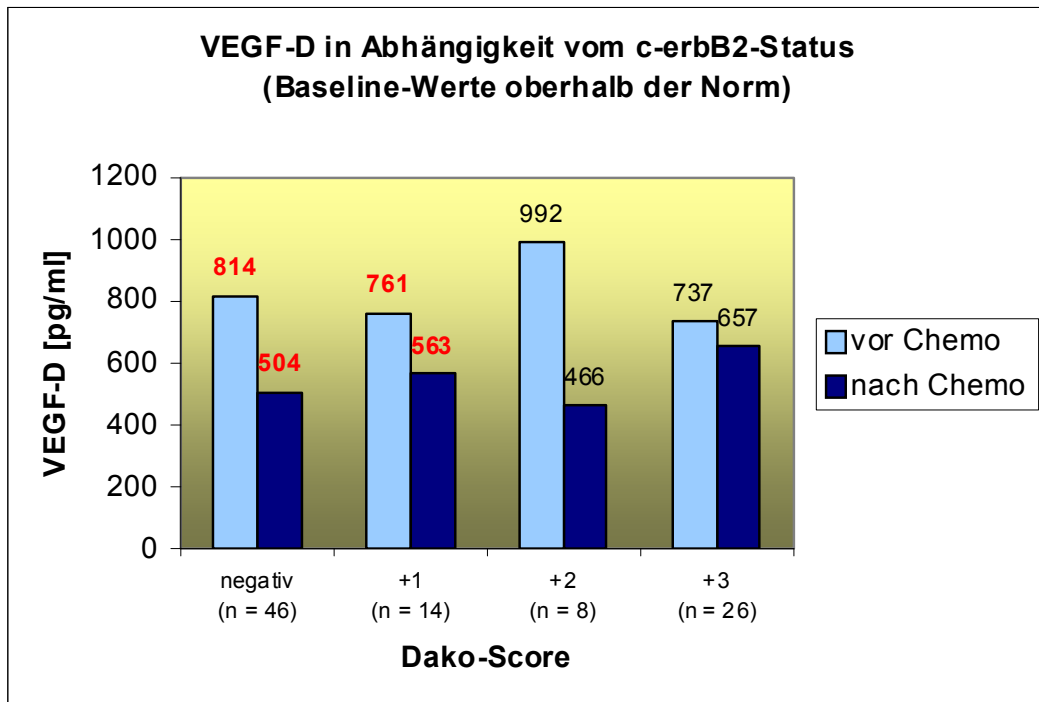


Abbildung 51: VEGF-D in Abhängigkeit vom c-erbB2-Status  
(Baseline-Werte oberhalb der Norm)

### 3.5 Vergleich zwischen ansteigenden und abfallenden Werten von VEGF und VEGF-D

Untersucht man mittels chi-quadrat-Test den Einfluss der Prädiktoren auf mögliche Änderungen in den Patientensubgruppen mit abfallenden oder ansteigenden VEGF- und VEGF-D Plasmawerten, so erkennt man lediglich bezüglich des Menopausenstatus statistische Signifikanz. So zeigt die Abbildung 52, dass bei Patientinnen mit einem Baseline-Wert von VEGF-D oberhalb der Normgrenze von 437 pg/ml liegend (n = 92) signifikant mehr postmenopausale Frauen (n = 39 / 78 %) einen Abfall der Werte nach Chemotherapie zeigten als prämenopausale Frauen (n = 19 / 45 %). Einen Anstieg der Plasmawerte nach chemotherapeutischer Behandlung konnte man bei 16 prämenopausalen gegenüber 7 postmenopausalen Frauen verzeichnen.

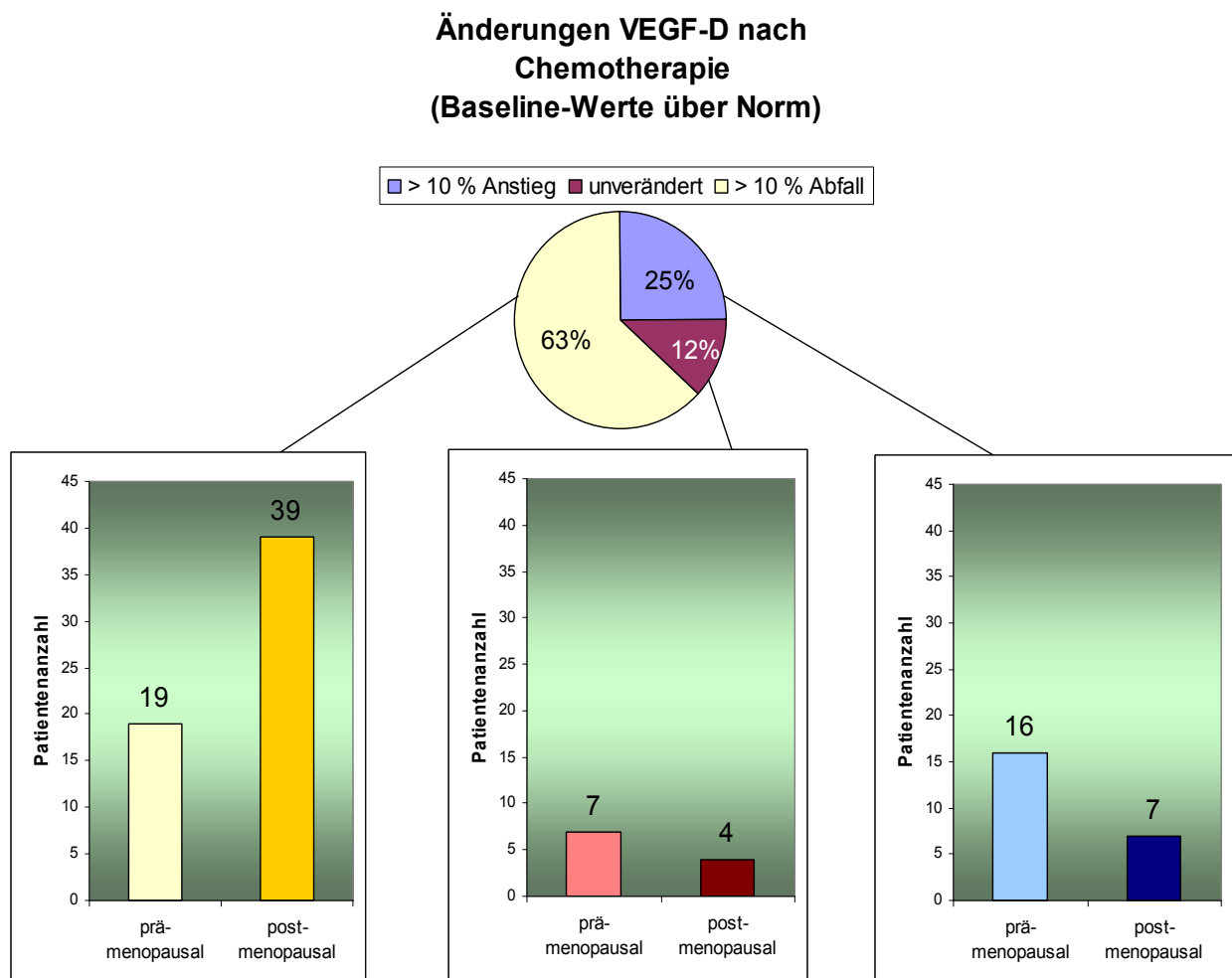


Abbildung 52: Änderungen VEGF-D nach Chemotherapie (Baseline-Werte oberhalb der Norm)

## 4 Diskussion

Angiogenese ist ein komplexer Prozess, der notwendig für das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren ist. Einen der relevantesten Stimulatoren der Angiogenese stellt der Vaskuläre Epidermale Wachstumsfaktor (VEGF) dar. In vielen klinischen Studien mit nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen lag das Hauptziel darin, den prognostischen Wert von VEGF und VEGF-D bezüglich des Überlebens der Frauen nach adjuvanter chemotherapeutischer Behandlung zu evaluieren.

So stellten beispielsweise Foekens et al. aufgrund ihrer Ergebnisse von insgesamt 845 Frauen VEGF als einen unabhängigen prädiktiven Faktor für eine schlechtere Effektivität einer Zytostatika-Therapie bei Mammakarzinom dar, da die Ansprechrate hinsichtlich einer Chemotherapie mit steigenden VEGF-Plasmawerten abnahm. Bestimmt wurden die VEGF-Werte mittels ELISA-Technik im Zytosol der Tumorzellen. [52]

Auch die Forschungsgruppe von Linderholm et al. demonstrierte anhand ihrer ausgewerteten Daten von 112 nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen, die chemotherapeutisch behandelt wurden, die negative Korrelation zwischen VEGF und Gesamtüberleben ( $p = 0,0235$ ). Interessante Beziehungen ergaben sich hinsichtlich der Höhe der VEGF-Werte und des Metastasierungsortes. So ließ sich bei Patientinnen, bei denen keine Metastasierung nachweisbar war, ein deutlich geringerer VEGF-Medianwert messen ( $2,04 \text{ pg}/\mu\text{g DNA}$ ), als bei Frauen, die viszerale ( $4,41 \text{ pg}/\mu\text{g DNA}$ ) oder zerebrale Metastasen ( $8,29 \text{ pg}/\mu\text{g DNA}$ ) entwickelten. Somit bestätigte diese Gruppe die schlechteren Behandlungsergebnisse bei Frauen mit hohen VEGF-Tumorwerten. Auch hier bestimmte man VEGF mittels Enzymimmunoassay im Tumorzytosol. [53]

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Mohammed et al. als sie das Gewebe von 177 invasiven Mammaneoplasien in Hinsicht auf die prognostische Bedeutung von VEGF-A, -C und -D untersuchten. Tumoren mit hohen Konzentrationen von VEGF-D wiesen höhere Raten von Lymphknotenmetastasen, Lokalrezidiven und Fernmetastasen auf, jedoch konnte anhand der ausgewerteten Daten keine statistische Signifikanz zwischen hohen Konzentrationen von VEGF-D und ungünstiger

---

Krankheitsprognose gesehen werden. Bezogen auf das Gesamtkollektiv hatten 29 % (n = 52) der in die Studie eingeschlossenen Frauen zum Diagnosezeitpunkt befallene Lymphknoten, das mediane Alter betrug 57 Jahre und als Untersuchungsmaterial dienten in Paraffin eingebettete Gewebeproben. [54]

Auch die Forschungsgruppe von Gu et al. demonstrierte mittels ihrer Ergebnisse von 61 chinesischen Frauen mit Mammakarzinom, dass hohe Konzentrationen von VEGF-D sowohl signifikant mit schlechterem krankheitsfreiem Überleben als auch mit Gesamtüberleben korrelieren. Bei 43 Karzinompatientinnen (72 %) fand man hohe VEGF-D Werte. Verglichen mit benignen Mammaläsionen wurden signifikant höhere Konzentrationen in Brustkrebsgewebe gemessen. Des Weiteren beobachteten die Forscher eine enge Beziehung zwischen VEGF-D Expression und Lymphknotenmetastasen (32 Patientinnen waren nodalpositiv). Alle 61 Frauen, im Median 58 Jahre alt, wurden postoperativ adjuvant chemotherapeutisch und ggf. antihormonell behandelt. In Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden die VEGF-D Konzentrationen bestimmt. Dabei dienten zusätzliche zehn benigne Gewebeproben als Vergleichsmaterial. [55]

In einer veröffentlichten Studie von Manders et al. wurde anhand von insgesamt 1127 Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom die Beziehung zwischen VEGF-Tumorwerten und der Wirksamkeit einer adjuvanten endokrinen Therapie und/oder Chemotherapie untersucht. In diesem Kollektiv waren 528 Frauen nodalpositiv und erhielten eine alleinige adjuvante Chemotherapie.

Vor Therapiebeginn wurden hohe VEGF-Werte bei jüngeren Krebspatientinnen, postmenopausalen Frauen und sowohl bei hormonrezeptornegativen als auch in großen Karzinomen gemessen. Eine positive Korrelation konnte ebenfalls zwischen VEGF-Werten und histologischem Grading dargestellt werden: schlechter differenzierte Tumoren exprimierten mehr VEGF. Allerdings konnte die Forschungsgruppe keine signifikante Interaktion zwischen VEGF und adjuvanter endokriner und/oder Chemotherapie aufzeigen. Aufgrund dieser Ergebnisse vermutete man, dass die Höhe des Angiogenesefaktors VEGF keine Voraussagen bezüglich der Wirksamkeit einer systemischen adjuvanten Behandlung erlaubt. [56]

Die Forschungsgruppe von Wu et al. konnte anhand der Ergebnisse ihrer Studie, in der sie 125 Frauen mit Mammakarzinom adjuvant chemotherapeutisch behandelten, VEGF als potenten prognostischen Tumormarker für Brustkrebsprogression, -wiederauftreten ( $p = 0,04$ ) und -überleben ( $p = 0,02$ ) deklarieren. Von den insgesamt 125 Patientinnen wurden 79 Frauen (63 %) als Lymphknoten-positiv eingestuft. Diese Gruppe zeigte auch in der Auswertung signifikant höhere VEGF-Werte verglichen mit Patientinnen, die keinen tumorösen Befall der Lymphknoten aufwiesen ( $p = 0,03$ ). Die Vergleichsgruppe bestand aus 20 gesunden, im Median etwa gleich alten Frauen und mit derselben ethnischen Herkunft wie die zu untersuchenden, erkrankten Frauen. Die Auswertung der Forschungsergebnisse ergab, dass das hormonrezeptorpositive Kollektiv signifikant höhere VEGF-Werte als die hormonrezeptornegative Vergleichsgruppe aufwies. Es wurde daraus geschlossen, dass ein positiver Hormonstatus bei nodalpositiven Brustkrebspatientinnen das Risiko einer VEGF-Expression zu erhöhen vermag. Gemessen wurde VEGF im Plasma mittels Sandwich Enzym Immunoassay. [57]

Die japanische Forschungsgruppe Okada et al. analysierte die Expression von VEGF-D im Gewebe von 36 invasiv-duktalem Mammakarzinomen, 20 duktalem Carcinoma in situ, 12 Fibroadenomen und von 10 gesunden Frauen. In den 36 Fällen mit Brustkrebs war der Tumor kleiner als 5 cm und keine der Patientinnen erhielt präoperativ eine Chemo- und/oder Hormontherapie. Alle erkrankten Frauen unterzogen sich einer axillären Lymphonodektomie, wobei 17 Patientinnen Lymphknotenmetastasen aufwiesen.

Die Studiauswertung ergab, dass in der nodalpositiven Subgruppe fast 88 % der Karzinomproben eine VEGF-D Expression zeigten, verglichen zu 43 % immunoreaktive Zellen im nodalnegativen Kollektiv. Hinsichtlich des Hormonrezeptorstatus beobachtete man eine positive Assoziation zwischen VEGF-D und der Ausbildung von Östrogenrezeptoren. Aus diesen Ergebnissen schlussfolgerte die Forschungsgruppe, dass ein positiver Östrogenrezeptorstatus die Transkription von VEGF-D direkt hoch regulieren kann und somit auch die Lymphangiogenese und das mögliche Auftreten von Lymphknotenmetastasen bei Brustkrebs begünstigen kann. [58]

Ludovini et al. konnten anhand ihrer Studienergebnisse und nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 96 Monaten VEGF nicht als prognostischen Faktor weder hinsichtlich rezidivfreien Überlebens noch bezüglich Gesamtüberlebens deklarieren.



---

Von den 228 Patientenproben, die die Gruppe zur VEGF-Bestimmung auswertete, wurden lediglich 64 (28 %) positiv auf VEGF getestet. Vergleicht man die Patienten mit positiven VEGF-Werten mit denen, die negativ auf VEGF getestet wurden, so ergibt sich bezüglich des rezidivfreien Überlebens ein p-Wert von 0,208 und hinsichtlich des Gesamtüberlebens ein p-Wert von 0,178. Damit stimmt diese Gruppe nicht überein mit den bisher erwähnten Ergebnissen anderer Forscher. [59]

Dennoch überwiegt und überzeugt die Mehrheit der Studien, in denen die Korrelation zwischen hohen VEGF-Tumorwerten und der damit verbundenen schlechteren Prognose bezogen auf Ansprechrate, Gesamtüberleben und rezidivfreiem Überleben der Patientinnen eindrucksvoll demonstriert wurde. Daher wurden auch in der vorliegenden Studie VEGF und VEGF-D im Blut der behandelten Frauen bestimmt, um den Einfluss einer Chemotherapie auf diese Angio- und Lymphangiogenesefaktoren evaluieren zu können.

Positiv an unserer Arbeit hervorzuheben ist die relativ hohe Fallzahl der untersuchten Probandinnen sowie das Vorhandensein von Daten jeweils vor und nach Chemotherapie in Anhängigkeit der verschiedenen Prognosefaktoren, wobei eine homogene Verteilung der Patientinnen in beide Therapiearme erreicht wurde. Unsere Arbeit erlaubt uns ebenfalls Rückschlüsse über den Einfluss einer dosisintensivierten Chemotherapie auf die Höhe der im Blut gemessenen Wachstumsfaktoren.

Das Konzept der Dosisintensivierung innerhalb der Behandlung des Mammakarzinoms kam in verschiedenen klinischen Studien zur Anwendung.

Das theoretische Modell von Norton und Simon wurde unter anderem von Citron et al. aufgegriffen und kam in einer klinischen Studie zur Anwendung. Nach den 2003 veröffentlichten Daten zeigt eine dosisintensivierte, adjuvante Chemotherapie verglichen mit einer konventionellen Therapieweise bei 1.973 behandelten nodal-positiven Brustkrebspatientinnen ein signifikant besseres Behandlungsergebnis hinsichtlich krankheitsfreiem als auch Gesamtüberleben. [49]

Auch die Forschungsgruppe von Möbus et al. untermauert anhand ihrer publizierten Daten ihrer Studie über die dosisintensivierte chemotherapeutische Behandlung nodal-positiver Mammakarzinompatientinnen die Ergebnisse von Citron et al. Nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 28 Monaten traten im dosisintensivierten

---

Behandlungsarm verglichen zum Standardarm signifikant weniger Rezidive (94 versus 127,  $p = 0,0009$ ) und Todesfälle (43 versus 60,  $p = 0,03$ ) auf. Diese Studie weist dadurch die Durchführbarkeit und höhere Effektivität dieser Therapieform nach und gibt womöglich den klinischen Beweis für die theoretische Überlegenheit einer dosisdichten Chemotherapie. [60]

In der vorliegenden randomisierten Phase-III-Studie wurden insgesamt 142 Frauen mit Mammakarzinom und ein bis drei befallenen axillären Lymphknoten eingeschlossen. Das mediane Alter der Patientinnen betrug 54 Jahre (25 bis 72 Jahre). Von den 142 untersuchten Frauen waren zum Zeitpunkt der Randomisierung 59 prä- und 81 postmenopausal. Hinsichtlich des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus konnten 109 Frauen als rezeptorpositiv und 32 Patientinnen als rezeptornegativ eingeteilt werden.

Insgesamt waren bei 85 % der Patientinnen ( $n = 121$ ) die gemessenen VEGF-Werte und bei 66 % ( $n = 94$ ) die VEGF-D Werte vor Beginn der jeweiligen Chemotherapie erhöht, wobei die obere Normgrenze für VEGF bei 115 pg/ml und für VEGF-D bei 437 pg/ml liegt.

Diese Erhöhung von VEGF in Korrelation zu einem positiven Lymphknotenstatus konnte Wu et al. ebenfalls in einer Studie mit 125 eingeschlossenen Mammakarzinompatientinnen nachweisen. Aus dem Vergleich von 79 nodalpositiven Patientinnen (63 %) mit 46 Frauen (37 %), die keinen Befall der axillären Lymphknoten aufwiesen, ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied der VEGF-Werte ( $p = 0.03$ ) mit höheren Werten in der Gruppe mit Lymphknotenbefall. Zu bedenken sollte allerdings geben, dass in dieser Forschungsgruppe VEGF deutlich niedrigere Plasmawerte annimmt, als es in unserer Gruppe der Fall ist. So wird von Wu et al. für die 125 kranken Frauen ein medianer VEGF-Wert von 39 pg/ml angegeben, der bei den 142 Patientinnen von uns gemessene VEGF-Medianwert liegt bei 409 pg/ml, also etwa um das Zehnfache höher.

Sowohl Wu et al. als auch unsere Forschungsgruppe bestimmte VEGF im Blutplasma mittels Sandwich Enzym Immunoassay (ELISA). Da Wu et al. jedoch keinen Hersteller der verwendeten Kits angibt, könnte die mögliche verschiedene Herkunft und die

daraus resultierende verschiedene Herstellungs- und Vorgehensweise eine Erklärung für diesen Sachverhalt liefern.

Weiterhin sollte ein Augenmerk auf die unterschiedlichen Patientenpopulationen geworfen werden. So kamen die in unserer Studie eingeschlossenen Frauen aus Mitteleuropa, wo hingegen die Frauen in der Studie von Wu et al. ausschließlich afroamerikanischen (45,6 %) und lateinamerikanischen (54,4 %) Ursprungs waren. Da bereits zwischen diesen beiden ethnischen Gruppen ein Unterschied bezüglich des gemessenen VEGF-Wertes zu verzeichnen ist (39,8 pg/ml in der afroamerikanischen Gruppe versus 45,6 pg/ml bei Frauen lateinamerikanischen Ursprungs), liegt die Vermutung nahe, dass die ethnische Zugehörigkeit der Frauen einen Einfluss auf die Höhe von VEGF nimmt. In zukünftigen Studien sollte aufgrund dieser Überlegung das Patientenkollektiv aus ähnlichen ethnischen Gruppen aufgebaut sein.

Weiterhin stellt eine Vergleichsgruppe bestehend aus 20 gesunden Frauen in Bezug auf die Größe keine ausreichend repräsentative Stichprobe dar. Bestünde diese Gruppe aus mehreren Individuen, so würde sich die Aussagekraft der Daten erhöhen.

Bezüglich verschiedener Patienten- und Tumorcharakteristika können in den beiden an dieser Stelle betrachteten Studien Unterschiede aufgezeigt werden. Die Patienten in der Studie von Wu et al. waren im Median sechs Jahre jünger als die Frauen in unserer Studie (48 versus 54 Jahre), auch waren nur 63 % (n = 79) der bei Wu et al. behandelten Frauen Lymphknoten-positiv verglichen zu allen 142 in der vorliegenden Studie eingeschlossenen Patientinnen.

Hinsichtlich des Hormonrezeptorstatus konnte Wu et al. in der Gruppe der nodal-positiven Mammakarzinompatientinnen signifikant höhere VEGF-Werte bei rezeptor-positiven Frauen messen verglichen mit rezeptornegativen Patientinnen.

In unserer vorliegenden Studie konnte diesbezüglich ein gegenteiliger Trend gezeigt werden, da die VEGF-Werte bei rezeptornegativen Frauen höher lagen als in der Gruppe mit positivem Rezeptorstatus (jedoch nicht statistisch signifikant).

Bezüglich der in unserer Studie gemessenen VEGF-D Werte hatten hingegen die Patientinnen mit rezeptorpositiven Tumoren signifikant höhere VEGF-D Baseline-Werte (p-Wert von 0,026).

Unsere Forschungsgruppe konnte die Ergebnisse von Wu et al. bezüglich der höheren VEGF-Werte bei postmenopausalen Frauen verglichen zu prämenopausalen Frauen

bestätigen, auch wenn dieser Unterschied bei uns nicht das statistische Signifikanzniveau erreichte. Im Gegensatz dazu maßen wir höhere VEGF-D Werte bei prämenopausalen Frauen, jedoch verzeichnete man hier ebenfalls keinen statistischen Unterschied. [57]

Die Forschungsgruppe von Nakamura et al. berechnete anhand ihrer Studiendaten, dass Patientinnen mit VEGF-D positiven Tumoren ein vier Mal höheres Rezidivrisiko besitzen, als Frauen, die negativ auf VEGF-D getestet wurden. Auch ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich des krankheitsfreien Überlebens als auch des Gesamtüberlebens mit schlechteren Prognosen für Patientinnen mit VEGF-D exprimierenden Tumoren. Weiterhin zeigte die Gruppe eine positive Korrelation sowohl zwischen VEGF-D Expression und Lymphknotenmetastasierung ( $p = 0.0238$ ) als auch zwischen VEGF-D und *cerbB-2* Überexpression. [33]

Anhand der Ergebnisse unserer ASG-Studie hatte die Chemotherapie, unabhängig vom Therapiearm, einen stärkeren Einfluss auf die Verringerung von VEGF-D im Plasma verglichen mit VEGF. Der entsprechende p-Wert von 0.067 zeigt jedoch, dass diese Verringerung als statistisch nicht signifikant angesehen werden kann. Betrachtet man allerdings die Subgruppe der Patienten, die bereits vor Beginn der Chemotherapie erhöhte Plasmaspiegel von VEGF-D aufwiesen ( $> 437$  pg/ml), so sind die gemessenen Werte nach Beendigung der Therapie deutlich niedriger als zuvor und mit einem p-Wert von  $< 0.001$  ist dieser Unterschied auch als statistisch signifikant zu betrachten (vor Therapie: 810 pg/ml, nach Therapie: 523 pg/ml).

Von den 142 Frauen, die in unserer Studie eingeschlossen waren, wurden 73 Patientinnen konventionell in Arm A und 69 Frauen chemotherapeutisch dosisintensiviert im experimentellen Arm B behandelt. Bei Patientinnen, die in Arm A eingeteilt waren, wurde vor Beginn der Standardchemotherapie ein medianer VEGF-Wert von 446 pg/ml gemessen. Frauen in Arm B wiesen im Median einen vor der dosisintensivierten Chemotherapie gemessenen VEGF-Wert von 362 pg/ml auf.

In der Gesamtanalyse war die Verringerung von VEGF durch die Chemotherapie sehr deutlich bei Patientinnen, die eine starke Überexpression von *c-erbB2* (Dako-Score +3) aufwiesen. Der Abfall der Plasmawerte von VEGF bei diesen

29 Frauen verfehlt mit einem p-Wert von 0.052 nur knapp das statistische Signifikanzniveau. Eine noch deutlichere Verringerung der VEGF-Werte nach Chemotherapie war bei Frauen zu verzeichnen, deren Primärtumore größer als 5 cm waren ( $p = 0,043$ ). Da dies jedoch nur bei einer geringen Patientenzahl ( $n = 5$ ) nachgewiesen werden konnte, sollte man vorsichtig sein, ausgehend von dieser kleinen Menge Schlussfolgerungen für größere Populationen zu ziehen.

Vergleicht man die VEGF-D Werte vor Chemotherapie mit denen nach Beendigung der Therapie, so erkennt man deutliche Verringerungen bei hormonrezeptorpositiven Patientinnen. Im Median sanken die Werte von 657 pg/ml vor Therapie auf 486 pg/ml nach Abschluss der Behandlung und der entsprechende p-Wert von 0,040 kennzeichnet diesen Unterschied als statistisch signifikant. Auch in der Subgruppe der 81 postmenopausalen Frauen ließen sich nach Abschluss der Zytostatika-Behandlung deutlich geringere VEGF-D Werte messen. Ein p-Wert von 0,054 zeigt jedoch, dass dieser Abfall das statistische Signifikanzniveau knapp verfehlt. Weiterhin erwähnenswert sind die durch die Chemotherapie gesunkenen VEGF-D Werte bei 21 Patientinnen, die c-erbB2 nur geringfügig exprimierten (Dako-Score: +1). Im Median wurde vor Therapie ein VEGF-D Baseline-Wert von 616 pg/ml gemessen, der nach Behandlung auf einen Medianwert von 447 pg/ml abfiel ( $p = 0,067$ ).

Linderholm et al. konnten aufgrund ihrer Studienergebnisse von nodalnegativen Mammakarzinompatientinnen einen positiven Zusammenhang sowohl zwischen VEGF-Expression und Tumorgröße als auch zum histologischen Grading darlegen. [53]

Wu et al. zeigten ebenfalls mittels ihrer Brustkrebsstudie, dass wachsende Tumorgröße mit höheren VEGF-Plasmaspiegeln korreliert. Des Weiteren wurden bei Patientinnen mit gut differenzierten Tumoren niedrigere VEGF-Werte gemessen verglichen zu schlecht differenzierten Karzinomen. [53]

Auch die Ergebnisse von Mohammed et al. bestätigen eine statistisch signifikante Korrelation von hohen VEGF-Konzentrationen sowohl mit wachsender Tumorgröße ( $p = 0,038$ ) als auch mit G3-Tumoren ( $p < 0,001$ ). Keine signifikante Assoziation gab es zwischen der Expression von VEGF-D und klinisch-pathologischen Kriterien. [54]

Auch in der vorliegenden ASG-Studie konnten deutlich höhere Werte von VEGF und VEGF-D bei größeren Tumoren ( $> 5$  cm, pT3) gemessen werden verglichen zu Tumoren  $< 2$  cm (pT1). Allerdings konnte in der ASG-Studie keine derartige Korrelation

zwischen VEGF/VEGF-D und Tumorgrading gezeigt werden (höchster VEGF-Wert bei G2-Tumoren, höchster VEGF-D Wert bei G1-Tumoren).

Da jedoch Linderholm et al. ihre Studie mit nodalnegativen Mammakarzinompatientinnen durchführten im Gegensatz zu den nodalpositiven Patientinnen der ASG-Studie, sollte man vorsichtig sein, die Ergebnisse dieser beiden Forschungsgruppen miteinander zu vergleichen.

Viele Forschungsgruppen wie z.B. die von Yang, Foekens und Ludovini konnten anhand ihrer Studienergebnisse keine signifikante Korrelation zwischen VEGF-Expression und klinisch-pathologischen Parametern wie Tumorgröße, histologischem Grading und Alter der Patientin feststellen. [35, 52, 59]

Betrachtet man die Daten der 121 Patientinnen unserer Studie, die bereits vor Beginn der Chemotherapie erhöhte Ausgangswerte von VEGF aufwiesen ( $> 115$  pg/ml), so bestätigen sich die Veränderungen der Gesamtanalyse.

Erkennbar war eine Minderung der VEGF-Werte nach Chemotherapie bei:

- 26 Patientinnen mit starker c-erbB2 Überexpression (Dako-Score +3),  $p = 0,055$
- 5 Patientinnen mit Primärtumoren  $\geq 5$  cm (pT3),  $p = 0,043$
- 54 Patientinnen mit Primärtumoren  $\leq 2$  cm (pT1),  $p = 0,053$ .

Von den 94 Frauen, bei denen die gemessenen VEGF-D Baseline-Werte bereits vor der chemotherapeutischen Behandlung über der oberen Normgrenze von 437 pg/ml lagen, zeigten sich wie in der Gesamtanalyse deutliche Verringerungen von VEGF-D durch die Therapie bei 50 postmenopausalen Frauen ( $p$ -Wert  $< 0,001$ ), bei 76 hormonrezeptorpositiven Frauen ( $p$ -Wert  $< 0,001$ ) und bei 14 Patientinnen, die c-erbB2 nur mit einem Dako-Score +1 überexprimierten. Zusätzlich wies man signifikant kleinere VEGF-D Werte nach Chemotherapie bei Frauen nach, deren Primärtumore histologisch als G1 ( $p = 0,036$ ) und G3 ( $p = 0,004$ ) eingestuft wurden und deren Tumorgrößen  $\leq 2$ cm (pT1;  $p = 0,04$ ) und 2-5 cm (pT2;  $p = 0,017$ ) betragen. Weiterhin war in der Patientengruppe bestehend aus 46 Frauen, bei denen keine Überexpression von c-erbB2 gemessen wurde, eine signifikante Verringerung von VEGF-D zu verzeichnen ( $p = 0,005$ ).

Yang et al. demonstrieren mittels ihrer Studie, in der von den insgesamt 107 eingeschlossenen Mammakarzinompatientinnen 66 Frauen (62 %) Lymphknoten-positiv waren, den Zusammenhang zwischen c-erbB2 Überexpression und den Wachstumsfaktoren VEGF-A, -C und -D. Die Ergebnisse zeigten signifikant höhere Expression von allen drei Mitgliedern der VEGF-Familie bei Tumoren, die c-erbB2 überexprimieren verglichen mit solchen, die keine Überexpression von c-erbB2 aufweisen ( $p < 0,01$ ). [35]

Auch Linderholm et al. bestätigten die Korrelation zwischen Überexpression von c-erbB2 und hoher VEGF-Expression anhand 656 Patientinnen mit Mammakarzinom, von denen 273 Frauen (42 %) einen Befall der axillären Lymphknoten aufwiesen. Der c-erbB2-Gehalt wurde mittels ELISA im Tumorzytosol quantitativ bestimmt und auch mittels des Dako-Scores in 0, +1, +2 und +3 eingeteilt. Jedoch betrachtete diese Forschungsgruppe lediglich die 15 % der Proben mit einem Dako-Score +3 als c-erbB2-positiv, während 85 % der Patienten mit niedrigen Werten als c-erbB2-negativ klassifiziert wurden. [53]

Auch Yang et al. unterteilten die Patientinnen nur in zwei Gruppen hinsichtlich des c-erbB2-Status: Patientinnen mit Überexpression und Frauen, die keine Überexpression von c-erbB2 aufwiesen. [35]

Die Forschungsgruppe von Konecny et al. demonstrierte anhand ihrer Studienergebnisse von insgesamt 611 Frauen eine statistisch signifikante Korrelation zwischen HER-2/neu- und VEGF-Expression bei Mammakarzinompatientinnen. Jedoch wurden vom Gesamtkollektiv lediglich 114 Individuen (18,7 %) als HER-2/neu-positiv eingestuft. Es gab keine weitere Unterscheidung bezüglich des Ausmaßes der Überexpression in weitere Subgruppen. [61]

Ebenfalls zeigte die Forschungsgruppe von Xu et al. anhand ihrer Studienergebnisse von 88 ausgewerteten Mammakarzinompatientinnen, dass in der c-erbB2-positiven Subgruppe signifikant höhere VEGF-Konzentrationen im Vergleich zum c-erbB2-negativen Kollektiv gemessen wurden. [62]

In der vorliegenden ASG-Studie hingegen wurden die 142 Patientinnen entweder als c-erbB2-negativ ( $n = 81$ ) eingeteilt oder sie erhielten je nach Ausmaß der Überexpression einen Dako-Score von +1 ( $n = 21$ ), +2 ( $n = 11$ ) oder +3 ( $n = 29$ ). Die Betrachtung unserer Ergebnisse lässt eine Erhöhung der Werte von VEGF und

VEGF-D mit steigender Expression von c-erbB2 erkennen, allerdings weist diese nur bei VEGF-D statistische Signifikanz auf ( $p = 0,015$ ).

	<b>VEGF</b> [pg/ml]	<b>VEGF-D</b> [pg/ml]
Dako-Score negativ	396	518
Dako-Score +1	362	558
Dako-Score +2	507	720
Dako-Score +3	541	701

Tabelle 6: Einteilung bezüglich c-erbB2-Status

Verschiedene Studien zeigten anhand ihrer Ergebnisse hohe VEGF-Werte bei Patientinnen mit negativem Hormonrezeptorstatus. [54, 56, 61]

Bei der Auswertung unserer Studiendaten waren bei den 32 hormonrezeptornegativen Patientinnen die VEGF-Werte vor Chemotherapie zwar geringfügig höher als in der Vergleichsgruppe der 109 hormonrezeptorpositiven Frauen, jedoch änderte sich dieses Verhältnis nach Abschluss nach Therapie, so dass höhere VEGF-Werte bei Frauen mit positivem Rezeptortstatus gemessen wurden.

Bei der Betrachtung von VEGF-D fanden wir signifikant höhere Baseline-Werte im hormonrezeptorpositiven Subkollektiv ( $p = 0,026$ ).

Auch die Forschungsgruppe von Okada et al. konnte anhand ihrer Ergebnisse signifikant höhere VEGF-D Werte in Brustkrebszellen finden, die Östrogenrezeptoren exprimierten. [58]

Die Studienergebnisse der Forschungsgruppen von Nakamura und Mohammed konnten jedoch keine Korrelation zwischen VEGF-D- und Hormonrezeptor-Expression bestätigen. [33, 54]

Coradini et al. zeigte mittels seiner Auswertung von postmenopausalen, nodalpositiven Brustkrebspatientinnen, dass diejenigen Frauen mit negativem Östrogenrezeptorstatus und gleichzeitig hohen intratumoralen VEGF-Werten ein signifikant erhöhtes Rezidivrisiko haben. Im Gegensatz dazu konnte der VEGF-Wert keinen prognostischen Effekt im Kollektiv mit positivem Hormonrezeptorstatus darstellen. [63]

In den Untersuchungen von Manders et al. hatten Patientinnen mit hormonrezeptorpositiven Tumoren und hohen VEGF-Werten schlechtere



---

Ansprechraten von 37 % auf eine endokrine Therapie verglichen zu 71 % bei Frauen mit niedrigen VEGF-Werten. [56]

Vergleichbare Daten lieferten Rydén et al. von 124 postmenopausalen Mammakarzinompatientinnen, die adjuvant Tamoxifen erhielten. Das wesentliche und signifikante Ergebnis dieser Studie war ein Anstieg der rezidivfreien Überlebensrate bei Patientinnen mit niedriger VEGF-Expression. Dagegen hatte die Tamoxifentherapie keinen Effekt bei Patienten mit hohen Werten des Angiogenesefaktors. Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass bei hormonrezeptorpositiven Brustkrebspatientinnen mit hohen VEGF-Werten die Tamoxifenbehandlung weniger wirksam ist. [64]

Colleoni et al. untersuchten an insgesamt 63 Frauen mit metastasiertem Mammakarzinom die Auswirkungen einer Chemotherapie auf die Höhe der VEGF-Blutwerte. Von 48 Patientinnen wurden die Serumwerte von VEGF mittels ELISA jeweils vor Beginn der Therapie und anschließend nach zwei Monaten bestimmt. Erkennbar war ein Abfall der VEGF-Serumwerte durch die chemotherapeutische Behandlung von anfangs medianen 314,5 pg/ml auf 248,5 pg/ml nach zwei Monaten Chemotherapie. Bei 29 Patientinnen wurde VEGF sowohl im Serum als auch im Plasma gemessen. Allerdings war statt einer Verringerung sogar ein minimaler Anstieg der Plasmawerte nach zweimonatiger Behandlung festzustellen (Baseline-Wert: 29,2 pg/ml, nach zwei Monaten: 34,8 pg/ml). Obwohl sowohl diese Forschungsgruppe von Colleoni als auch die ASG-Gruppe die Plasmawerte von VEGF mittels ELISA-Kits der Firma R&D Systems bestimmten, ist es erstaunlich, dass die VEGF-Werte hinsichtlich ihrer Höhe nicht übereinstimmen (Baseline-Werte: 29,2 pg/ml versus 409 pg/ml). Des Weiteren umfassen die behandelten Patientengruppen in den beiden betrachteten Studien unterschiedlich viele Individuen. [65]

Lissoni et al. zeigte anhand eines kleinen Patientenkollektivs von 14 Frauen mit metastasiertem Mammakarzinom, dass durch eine chemotherapeutische Behandlung mit Taxol die Serumwerte von VEGF signifikant kleiner waren als vor Beginn der Therapie. Zwar wurden anfangs bei mehr als 50 % der Frauen ein abnormal hoher VEGF-Wert gemessen, wie es auch in der ASG-Studie der Fall war, jedoch ist eine Gruppe bestehend aus nur 14 Patienten, nicht groß genug, um einen statistisch

---

signifikanten Stichprobenumfang zu gewährleisten. Von dieser Beobachtung ausgenommen waren allerdings fünf Patientinnen, die sich in einem progressiven Stadium der Tumorerkrankung befanden. [66]

Um zukünftige Studien besser vergleichen zu können, sollten die zu bewertenden Gruppen eine ausreichende große Patientenzahl beinhalten. Außerdem sollte man auf eine gleichmäßige Verteilung bezüglich der verschiedenen Tumor- und Patientencharakteristika wie Alter, Tumorgröße, Grading, Menopausen- und Hormonrezeptorstatus achten. Oft wurden in bisherigen Studien die erworbenen Daten brustkrebserkrankter Frauen nicht mit Werten gesunder, unbehandelter Frauen verglichen. Fraglich ist, wie trotz dieser Tatsache eine sichere Evaluierung der erhobenen Daten möglich ist. Eine Vergleichspopulation sollte ebenfalls eine ausreichende Individuenanzahl beinhalten, die der Größe der experimentellen Gruppe ähnelt. Weiterhin sollten sich hinsichtlich der Patientencharakteristika beide Gruppen nicht wesentlich unterscheiden.

Eine mögliche Erklärung der Ergebnisbreite in den oben erwähnten Studien sind die jeweils verwendeten Probenmaterialien (Gewebe, Serum, Plasma) und den damit verbundenen unterschiedlichen Bestimmungsmethoden. Ein diskutabler Grund für die Diskrepanz könnte auch die Verwendung verschiedenartige Antikörper sein, die sich möglicherweise gegen einen oder mehrere der bekannten VEGF-Isoformen richten. Die Firma R&D Systems gibt für ihre ELISA-Kits Normwerte für VEGF und VEGF-D an, doch wurden diese anhand einer kleinen Anzahl an gesunden Mitarbeitern erstellt und sind, da alters- und geschlechtsunspezifisch, sehr ungenau. Es ist nicht mit Sicherheit zu beantworten, ob diese Normwerte auch für Studien gelten können, bei denen das Patientenkollektiv ausnahmslos aus an Mammakarzinom erkrankten Frauen gebildet wird.

Um die geeignetste Technik identifizieren zu können, werden weitere vergleichende Studien in standardisierten Laboren vonnöten sein. In den verschiedenen Studien wird eine deutliche Variabilität bezüglich der Nachbeobachtungszeit der Patientinnen wahrgenommen. So beträgt diese Zeit z.B. bei Linderholm et al. 56 Monate, hingegen bei Wu et al. 114 Monate. Auch auf die Standardisierung dieses Parameters sollte in kommenden Studien nicht verzichtet werden. Da auch die in den Studien verabreichten Chemotherapien sowohl hinsichtlich der verwendeten Wirkstoffe, der Dosis als auch der

---

Länge und Abstände zwischen den Behandlungszyklen deutlich variieren, sollte ein Vergleich der Behandlungserfolge mit Vorsicht betrachtet werden.

Die vorliegende ASG-Studie liefert erste Daten über den Einfluss einer adjuvanten dosisintensivierten Chemotherapie verglichen mit einer konventionellen Zytostatika-Behandlung auf die Plasmaspiegel von VEGF und VEGF-D.

Diese beiden Angiogenese- bzw. Lymphangiogenesefaktoren wurden in Korrelation zu den Prognosefaktoren Tumorgröße, Grading, Hormonrezeptor-, Menopausen- und c-erbB2-Status gemessen und ausgewertet.

Es konnte gezeigt werden, dass sich VEGF und VEGF-D unter der Chemotherapie verringern. Signifikant war diese Beobachtung jedoch nur in Bezug auf den Menopausenstatus, die Tumorgröße, den Hormonrezeptorstatus sowie hinsichtlich des Ausmaßes der c-erbB2 Expression. Allerdings fand man keine statistisch relevante Verringerung der Plasmawerte nach Beendigung der dosisintensivierten Chemotherapie. Bei den Patientinnen, die in Arm B behandelt wurden, stiegen die VEGF-Werte nach intensiverer Therapie sogar etwas an.

Foekens et al. demonstrierten anhand ihrer Studienergebnisse bereits, dass Patientinnen mit niedrigen VEGF-Werten eine deutlich bessere Ansprechrate bezüglich der Chemotherapie aufwiesen im Vergleich zu den Patientinnen, bei denen hohe VEGF-Spiegel gemessen wurden (hohe VEGF-Werte: 35 % Ansprechen, niedrige VEGF-Werte: 64 % Ansprechen).

Abzuwarten bleibt nun, ob die Patientinnen der ASG-Studie, deren Werte durch die Chemotherapie um mehr als 10 % gesunken waren, mehr von der Therapie profitieren, als die Patientinnen, deren Plasmawerte von VEGF und VEGF-D geringfügiger absanken, unverändert blieben oder sogar unter der Chemotherapie anstiegen.

---

## 5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Studie bestand darin, Konzentrationsveränderungen der Angiogenese- und Lymphangiogenesefaktoren VEGF und VEGF-D bei Mammakarzinompatientinnen unter adjuvanter Chemotherapie aufzuzeigen.

Des Weiteren überprüfte die Arbeitsgruppe, ob der Verlauf der beiden Wachstumsfaktoren die angenommene Überlegenheit einer dosisintensivierten Chemotherapie gegenüber einer konventionellen Zytostatika-Behandlung widerspiegelt. Ein weiterer Fokus der Studie bestand darin, Änderungen von VEGF und VEGF-D unter der Chemotherapie zu evaluieren und eine mögliche Korrelation mit anderen klinisch-pathologischen Variablen wie Tumorgröße, Grading, Hormonrezeptor-, Menopausen-, und c-erbB2-Status zu beleuchten.

Dazu wurden von den insgesamt 142 Patientinnen mit Brustkrebs und ein bis drei befallenen axillären Lymphknoten 73 Patientinnen in Arm A mit vier Zyklen Farmorubicin ( $90 \text{ mg/m}^2$ ) und Cyclophosphamid ( $600 \text{ mg/m}^2$ ) gefolgt von 4 Zyklen Paclitaxel ( $175 \text{ mg/m}^2$ ) jeweils im Abstand von 21 Tagen therapiert. Im experimentellen, dosisintensivierten Arm B wurde 69 Patientinnen Farmorubicin ( $120 \text{ mg/m}^2$ ) gefolgt von Paclitaxel ( $175 \text{ mg/m}^2$ ) unter obligatem CSF-Support im Abstand von 14 Tagen verabreicht.

Vor Beginn sowie nach Beendigung der adjuvanten Chemotherapie wurde bei den Probandinnen (medianes Alter: 54 Jahre) VEGF und VEGF-D jeweils im Blutplasma mittels quantitativem Sandwich-Enzym-Immunoassay bestimmt.

Zusammenfassend konnte eine signifikante Verringerung von VEGF nach chemotherapeutischer Behandlung nur bei Patientinnen mit großen Primärtumoren (pT3) gemessen werden ( $p = 0,043$ ). Ebenfalls ein deutlicher, wenn auch nicht signifikanter Abfall der VEGF-Konzentration nach Chemotherapie war bei den Probandinnen zu verzeichnen, deren Tumoren eine Expression von c-erbB2 mit einem Dako-Score 3+ aufwiesen ( $p = 0,052$ ).

Signifikant geringere Konzentrationen von VEGF-D nach Beendigung der Chemotherapie wurden sowohl bei denjenigen Patientinnen gemessen, deren Tumor zum Zeitpunkt der Randomisierung als östrogen- und progesteronrezeptorpositiv bewertet wurden (p-Wert = 0,040) als auch bei Patientinnen, deren Tumorzellen nur eine geringfügige c-erbB2 Expression (Dako-Score +1) aufwiesen (p-Wert = 0,050).

Ein statistisch signifikanter Effekt beider Chemotherapien auf den Lymphangiogenesefaktor VEGF-D konnte in der Subgruppe der Patientinnen festgestellt werden, deren Baseline-Werte vor Beginn der Therapie bereits oberhalb des Normwertes lagen. Bei den Probandinnen, die dosisintensivert im Arm B therapiert wurden, sanken die Konzentrationen von VEGF-D deutlicher ( $p = 0,004$ ) verglichen zu den Patientinnen, die im Arm A die Standardchemotherapie erhielten ( $p = 0,005$ ).

Die vorliegende Studie liefert erste Daten über den Einfluss einer adjuvanten dosisintensivierten Zytostatika-Therapie verglichen mit einer konventionellen chemotherapeutischen Behandlung auf die Plasmaspiegel von VEGF und VEGF-D in Korrelation zu den bisher gültigen Prognosefaktoren.

Es wurde gezeigt, dass sich VEGF und VEGF-D unter der Chemotherapie verringern. Allerdings konnte kein bedeutender Effekt der dosisintensivierten Chemotherapie auf die Konzentrationen der Angiogenesefaktoren hinsichtlich einer statistisch signifikanten Verringerung der Plasmawerte dargelegt werden.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Gegenüberstellung von proangiogenen und antiangiogenen Faktoren .....	3
Abbildung 2: VEGF in der Angiogenese; Quelle: Unger, C.: Neuentwicklungen in der Brustkrebstherapie, K-Krebs-Journal, S. 8; iSSS 1610-2657; 2/04.....	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der VEGF-Rezeptoren, ihrer Liganden und der Neuropiline.....	9
Abbildung 4: Überleben nach 5, 10 und 15 Jahren in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall.....	14
Abbildung 5: Modell von Norton und Simon.....	18
Abbildung 6: Schematische Darstellung der ASG-Studie (1-3 positive Lymphknoten).....	21
Abbildung 7: Schematische Darstellung eines ELISA.....	28
Abbildung 8: VEGF-Plasmawerte; Quelle: R&D Systems, Durchführungsvorschrift .....	31
Abbildung 9: VEGF-Werte vor Therapie, Arm A.....	34
Abbildung 10: VEGF-Werte vor Therapie, Arm B .....	34
Abbildung 11: VEGF-D Werte vor Therapie, Arm A.....	35
Abbildung 12: VEGF-D Werte vor Therapie, Arm B.....	35
Abbildung 13: VEGF-Werte nach Therapie, Arm A .....	36
Abbildung 14: VEGF-Werte nach Therapie, Arm B.....	36
Abbildung 15: VEGF-D Werte nach Therapie, Arm A .....	37
Abbildung 16: VEGF-D Werte nach Therapie, Arm B .....	37
Abbildung 17: VEGF Baseline-Werte in Abhängigkeit vom Therapiearm.....	38
Abbildung 18: VEGF-D Baseline-Werte in Abhängigkeit vom Therapiearm .....	39
Abbildung 19: VEGF-Baseline-Werte in Abhängigkeit vom Grading .....	40
Abbildung 20: VEGF-D Baseline-Werte in Abhängigkeit vom Grading.....	40
Abbildung 21: VEGF Baseline-Werte in Abhängigkeit von TumorgroÙe .....	41
Abbildung 22: VEGF-D Baseline-Werte in Abhängigkeit von TumorgroÙe.....	42
Abbildung 23: VEGF Baseline-Werte in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus.....	43
Abbildung 24: VEGF-D Baseline-Werte in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus.....	44
Abbildung 25: VEGF Baseline -Werte in Abhängigkeit vom Menopausenstatus.....	45
Abbildung 26: VEGF-D Baseline-Werte in Abhängigkeit vom Menopausenstatus .....	45
Abbildung 27: VEGF Baseline-Werte in Abhängigkeit vom c-erbB2-Status .....	46
Abbildung 28: VEGF-D Baseline-Werte in Abhängigkeit vom c-erbB2-Status .....	47
Abbildung 29: Änderungen von VEGF und VEGF-D (> 10 %).....	49
Abbildung 30: VEGF in Abhängigkeit vom Therapiearm.....	50
Abbildung 31: VEGF-D in Abhängigkeit vom Therapiearm.....	51
Abbildung 32: VEGF in Abhängigkeit vom Grading .....	52
Abbildung 33: VEGF-D in Abhängigkeit vom Grading .....	53
Abbildung 34: VEGF in Abhängigkeit von TumorgroÙe .....	54
Abbildung 35: VEGF-D in Abhängigkeit von TumorgroÙe .....	55
Abbildung 36: VEGF in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus .....	56
Abbildung 37: VEGF-D in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus .....	57

Abbildung 38: VEGF in Abhängigkeit vom Menopausenstatus.....	58
Abbildung 39: VEGF-D in Abhängigkeit vom Menopausenstatus.....	58
Abbildung 40: VEGF in Abhängigkeit vom c-erbB2-Status .....	59
Abbildung 41: VEGF-D in Abhängigkeit vom c-erbB2-Status .....	60
Abbildung 42: VEGF und VEGF-D vor Therapie bezogen auf obere Normgrenzen.....	61
Abbildung 43: VEGF- und VEGF-D nach Therapie bezogen auf obere Normgrenzen .....	62
Abbildung 44: Änderungen von VEGF und VEGF-D .....	64
Abbildung 45: VEGF-D in Abhängigkeit vom Therapiearm.....	65
Abbildung 46: VEGF-D in Abhängigkeit vom Grading .....	66
Abbildung 47: VEGF in Abhängigkeit von TumorgroÙe .....	67
Abbildung 48: VEGF-D in Abhängigkeit von TumorgroÙe .....	68
Abbildung 49: VEGF-D in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus .....	69
Abbildung 50: VEGF-D in Abhängigkeit vom Menopausenstatus.....	70
Abbildung 51: VEGF-D in Abhängigkeit vom c-erbB2-Status .....	71
Abbildung 52: Änderungen VEGF-D nach Chemotherapie (Baseline-Werte oberhalb der Norm) .....	72

## 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung des Mammakarzinoms in Risikogruppen nach St. Gallen 2007.....	16
Tabelle 2: VEGF: Intra- und Inter-Assay Präzision; Quelle: R&D Systems, Durchführungsvorschrift.....	31
Tabelle 3: Normalwert VEGF; Quelle: R&D Systems, Durchführungsvorschrift .....	32
Tabelle 4: VEGF-D: Intra- und Inter-Assay Präzision; Quelle: R&D Systems, Durchführungsvorschrift...	32
Tabelle 5: Normalwert VEGF-D; Quelle: R&D Systems, Durchführungsvorschrift .....	32
Tabelle 6:Einteilung bezüglich c-erbB2-Status.....	83

## 8 Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
AGO	Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie
AK	Antikörper
ASG	Adjuvans-Studiengruppe
BET	Brusterhaltende Therapie
BRCA	breast cancer gene
c-erbB2	cellular avian erythroblastosis homologue B2
EBCTCG	early breast cancer trialists collaborative group
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ER	Östrogenrezeptor
FGF	fibroblast growth factor
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HER-2/neu	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
HGF	hepatocyte growth factor
IBCSG	international breast cancer study group
IL	Interleukin
KDR	kinase insert domain-containing-receptor
LK	Lymphknoten
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MMP	Matrixmetalloprotease
NOGGO	Nordostdeutsche Gesellschaft für Gynäkologische Onkologie
NP	Neuropilin
NSABP	national surgical adjuvant breast and bowel project
PDGF	platelet derived growth factor
PIGF	placenta growth factor
PR	Progesteronrezeptor
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGF-R	vascular endothelial growth factor receptor



## 9 Literaturverzeichnis

---

- [1] Robert-Koch-Institut (RKI): Gesundheitsberichterstattung und Epidemiologie (2008) Dachdokumentation Krebs: Interaktive Datenbankabfragen. <http://www.rki.de/>
- [2] Statistisches Bundesamt (2008) Todesursachen in Deutschland 2007 (Fachserie 12 (Gesundheitswesen), Reihe 4).<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/>
- [3] Engel, D., Hölzel, D., Kerr, J., Schubert-Fritschle, G.: Manual Mammakarzinome, Epidemiologie; Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag, München, 2003
- [4] ESHRE Capri Workshop Group: Hormones and breast cancer. Hum Reprod Update.;10(4): 281-93, 2004
- [5] Jonat, W., Strauss, A., Maass, N. et al: Mammakarzinom – Aktuelle Diagnostik und Therapie. 3. Auflage UNI-MED, 2008
- [6] Kreienberg, R., Möbus, V.: Management des Mammakarzinoms. Springer, Berlin, 2002
- [7] Braendle, W.; Schulz, K.-D.: Hormone und Mammakarzinom, in: Aktuelle Onkologie, Vol. 100; Zuckschwerdt Verlag, München, 1998
- [8] Zielinski, C., Jakesz, R.: Mammacarcinom, in: Onkologie heute.Springer, Wien, 1999
- [9] Folkman, J.: The role of angiogenesis in tumor growth. Semin Cancer Biol.; 3(2):65-71, 1992
- [10] Dt Ärztebl 2001; 98:A 1392-1394 [Heft 21]
- [11] Ferrara, N.: Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. Oncologist 9 Suppl 1:2-10, 2004
- [12] Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M. et al.: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science; 219:983-5, 1983
- [13] Achen, M.G., Jeltsch, M., Kukk, E. et al.: Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). Proc Natl Acad Sci.; 95:548-553, 1998
- [14] Jelkmann,W.: Measurement of circulating VEGF. Clinical Chemistry 47:4; 617-623, 2001
- [15] Ferrara, N., Davis-Smyth, T.: The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev.; 18(1): 4-25, 1997
- [16] Unger, C.: Neuentwicklungen in der Brustkrebstherapie, K–Krebs-Journal, S. 8; ISSN 1610-2657; 2/04
- [17] Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. et al.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J. 13: 9-22, 1999
- [18] Konecny, G., Meng, Y.G., Untch, M. et al.: Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients. Clin Cancer Res. Vol.10, 1706-1716, 2004

- 
- [19] Kumar, R., Yarmand-Bagheri, R.: The role of HER2 in angiogenesis. *Semin Oncol.*;28 (5 Suppl 16):27-32, 2001
- [20] Linderholm, B., Tavelin, B., Grankvist, K. et al.: Vascular endothelial growth factor is a high prognostic value in node-negative breast carcinoma. *Clin Oncol.*; 16(9): 3121-8, 1998
- [21] Verheul, H. M. W., Hoekman, K. et al.: Platelet transporter of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res.* Vol.3, 2187-2190, 1997
- [22] Lange, T., Guttman-Ravis, N., Baruch, L. et al.: VEGF162, a new heparin-binding vascular endothelial growth factor splice form that is expressed in transformed human cells. *J Biol Chem.*, 9;278(19):17164-9, 2003
- [23] Shibuya, M., Seetharam, L., Ishii, Y. et al.: Possible involvement of VEGF-Flt tyrosine kinase receptor system in normal and tumor angiogenesis. *Princess Takamatsu Symp.*;24:162-70, 1994
- [24] Terman, B.I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M.E. et al.: Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Commun.*; 187(3):1579-1586, 1992
- [25] Neufeld, G., Kessler, O., Herzog, Y.: The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Adv Exp Med Biol.*, 515:81-90, 2002
- [26] Schmid, L.; Hiddemann, W.: *Praktische Onkologie XIII*, in *Aktuelle Onkologie*, Vol. 120; Zuckschwerdt Verlag, München, 2003
- [27] Haiyan, J., Bhagerzadeh, A., Bicknell, R. et al.: VEGF-D and VEGF-A, differentially regulate KDR- mediated signalling and biological function in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* in press. Published on June 23, 2004 as Manuscript M401538200
- [28] Marmé, D.: Tumoriangiogenese - Neue Ansätze zur Krebstherapie. *Onkologie*; 24(suppl 1): 1-5, 2001
- [29] Roeckl, W., Hecht, D., Sztajer, H. et al.: Differential binding characteristics and cellular inhibition by soluble VEGF receptors 1 and 2. *Exp Cell Res.*; 241(1): 161-70, 1998
- [30] Ogawa, S., Oku, A., Sawano, A. et al.: A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic Activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem*; 273(47): 31273-82, 1998
- [31] Hornig, C., Weich, H.A.: Soluble VEGF receptors. *Angiogenesis* 3: 33-39, 1999
- [32] Yamada, Y., Nezu, J., Shimane, M. et al.: Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. *Genomics*; 42(3): 483-8, 1997
- [33] Nakamura, Y., Yasuoka, H., Tsujimoto, M. et al.: Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in breast carcinoma with long-term follow-up. *Clin Cancer Res.* Vol.9, 716-721, 2003
- [34] White, J.D., Hewett, P.W., Kosuge, D. et al.: Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res.* Vol.62, 1669-1675, 2002

- 
- [35] Yang, W., Klos, K., Yang, Y. et al.: ErbB2 overexpression correlates with increased expression of vascular endothelial growth factors A, C and D in human breast carcinoma. *Cancer*; 94(11): 2855-2861, 2002
- [36] Achen, M.G., Williams, R.A., Baldwin, M.E. et al.: The angiogenic and lymphangiogenic factor vascular endothelial growth factor-D exhibits a paracrine mode of action in cancer. *Growth Factors*; 20(2): 99-107, 2002
- [37] Jonat, W., Holweg, M. et al.: *Mammakarzinom-aktuelle Diagnostik und Therapie.*: UNI- MED, Bremen, 2001
- [38] Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group: Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. *Lancet*; 339(8784): 1-15, 1992
- [39] Quiet, C.A., Ferguson, D.J., Weichselbaum, R.R. et al.: Natural history of node-negative breast cancer: a study of 826 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol.*; 13(5): 1144-51, 1995
- [40] Osborn, C.K., Yochmowitz, M.G., Knight, W.A. 3rd et al.: The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer*; 46 (12 Suppl): 2884-8, 1980
- [41] Walker, R.A., Lees, E., Webb, M.B. et al.: Breast carcinomas occurring in young women (<35 years) are different. *Br J Cancer*; 74(11): 1796-800, 1996
- [42] Goldhirsch, A., Gelber, R.D., Yothers, G. et al.: Adjuvant therapy for very young women with breast cancer: need for tailored treatments. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, No.30, 44-51, 2001
- [43] Goldhirsch, A., Wood, W.C., Gelber, R.D.: Highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *Annals of Oncology* 18: 1133–1144, 2007
- [44] Henderson, C., Berry, D.A., Demetri, G.D. et al.: Improved outcomes from adding sequential paclitaxel but not from escalating doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node positive primary breast cancer. *J Clin Oncol.*; 21(6): 976-83, 2003
- [45] Hayes, D.F., Thor, A.D., Dressler, L.G. et al.: HER2 and response to paclitaxel in node-positive breast cancer. *N Engl J Med.*; 357(15): 1496-506, 2007
- [46] Norton, L.: Theoretical concepts and the emerging role of taxanes in adjuvant therapy. *Oncologist*, Vol. 6, Suppl 3, 30-35, 2001
- [47] Budmann, D.R., Berry, D.A., Cirincione, C.T. et al.: Dose and dose intensity as determinants of outcome in the adjuvant treatment of breast cancer. *The Cancer and Leukemia Group B. J Natl Cancer Inst.*; 90(16): 1205-11, 1998
- [48] Möbus, V.J., Lueck, H.J., Thomssen C et al: Dose-dense sequential chemotherapy with epirubicin (E); paclitaxel (T) and cyclophosphamide (C) (ETC) in comparison to conventional dosed chemotherapy in high-risk breast cancer patients ( $\geq 4+LN$ ). Mature results of an AGO-trial. *SABCS abstr* 43; 2006

- 
- [49] Citron, M.L., Berry, D.A., Cirincione, C. et al.; Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. *J Clin Oncol.*; 21(8): 1431-1439, 2003
- [50] Untch, M., Möbus, V., Kuhn, W. et al.: Intensive dose-dense compared with conventionally scheduled preoperative chemotherapy for high-risk primary breast cancer. *J Clin Oncol.*; 27(18):2938-45, 2009
- [51] Fisher, B., Anderson, S., Wickerham, D.L. et al.: Increased intensification and total dose of cyclophosphamide in a doxorubicin-cyclophosphamide regimen for the treatment of primary breast cancer: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-22. *J Clin Oncol.*; 15(5):1858-69, 1997
- [52] Foekens, J.A., Peters, H.A., Grebenchtchikov, N. et al.: High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer Res.*; 61(14):5407-5414, 2001
- [53] Linderholm, B., Grankvist, K., Wilking, N. et al.: Correlation of vascular endothelial growth factor content with recurrences, survival, and first relapse site in primary node-positive breast carcinoma after adjuvant treatment. *J Clin Oncol.*;18(7):1423-1431, 2000
- [54] Mohammed, R.A.A., Green, A., El-Shikh, S. et al.: Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors-A, -C and -D in breast cancer and their relationship with angiogenesis and lymphangiogenesis. *Br J Cancer* 96:1092-1100, 2007
- [55] Gu, Y., Qi, X., Guo, S.: Lymphangiogenesis induced by VEGF-C and VEGF-D promotes metastasis and a poor outcome in breast carcinoma: a retrospective study of 61 cases. *Clin Exp Metastasis*;25(7):717-725, 2008
- [56] Manders, P., Beex, L.V., Tjan-Heijnen, V.C. et al.: Vascular endothelial growth factor levels do not predict efficacy of systemic adjuvant treatment as assessed in 1127 breast cancer patients. *Int J Oncol* 25(2):511-517, 2004
- [57] Wu, Y., Saldana, L., Chillar, R. et al.: Plasma vascular endothelial growth factor is useful in assessing progression of breast cancer post surgery and during adjuvant treatment. *Int J Oncol* 20(3):509-516, 2002
- [58] Okada, K., Osaki, M., Araki, K. et al.: Expression of hypoxia-inducible factor (HIF-1 $\alpha$ ), VEGF-C and VEGF-D in non-invasive and invasive breast ductal carcinomas. *Anticancer Res.*; 25(4):3003-9, 2005
- [59] Ludovini, V.; Sidoni, A.; Pistola, L. et al.: Evaluation of the prognostic role of vascular endothelial growth factor and microvessel density in stages I and II breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*;81(2):159-168, 2003
- [60] Möbus, V.J., Untch, M., Du Bois, A. et al. : Dose-dense sequential chemotherapy with epirubicin (E), paclitaxel (T) and cyclophosphamide (C) (ETC) is superior to conventional dosed chemotherapy in high-risk breast cancer patients ( $\geq 4$  +LN). First results of an AGO-trial. *J Clin Oncol.*, ASCO Annual Meeting Proc;Vol.22(14):513, 2004

- 
- [61] Konecny, G., Meng, G., Untch, M., Gutierrez, J. et al.: Association between HER-2/neu and Vascular Endothelial Growth Factor Expression Predicts Clinical Outcome in Primary Breast Cancer Patients. *Cancer Res.*;10,1706-1716, 2004
- [62] Xu, W.; Wang, G.; Zou, Y. et al.: Vascular endothelial growth factor expression in invasive ductal carcinoma of breast. *Chinese Journal of Cancer Research* 19(1):56-59, 2007
- [63] Coradini, D., Biganzoli, E., Pellizzaro, C. et al.: Vascular endothelial growth factor in node-positive breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen. *Br J Cancer* 89(2):268-270, 2003
- [64] Rydén, L., Stendhl, M., Jonsson, H., Emdin, S., Bengtsson, N.O., Landberg, G.: Tumor-specific VEGF-A and VEGFR2 in postmenopausal breast cancer patients with long-term follow-up. Implication of a link between VEGF pathway and tamoxifen response. *Breast Cancer Res. Treat.* 89(2):135-143, 2005
- [65] Colleoni, M., Rocca, A., Sandri, M. T. et al.: Low-dose oral methotrexate and cyclophosphamide in metastatic breast cancer: antitumor activity and correlation with vascular endothelial growth factor levels. *Annals of Oncology*;13(1):73-80, 2002
- [66] Lissoni, P., Fugamalli, E., Malugani, F. et al.: Chemotherapy and angiogenesis in advanced cancer: vascular endothelial growth factor (VEGF) decline as predictor of disease control during taxol therapy in metastatic breast cancer. *Int J Biol Markers*;15(4):308-11, 2000

## **10 Lebenslauf**

**Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.**

**Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.**

## 11 Erklärung

„Ich, Nadine Pohl, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Der Effekt einer dosisintensivierten, adjuvanten Chemotherapie auf im Blut zirkulierende Angiogenesefaktoren VEGF und VEGF-D bei Patientinnen mit Brustkrebs und 1-3 positiven Lymphknoten“

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.“



## 12 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinem Betreuer der Arbeit, Priv.-Doz. Dr. med. Sherko Kümmel. Für die Bereitstellung aller zur Durchführung meiner Promotion erforderlichen Daten und für die stete und nie abbreißende Unterstützung danke ich ihm sehr.

Ein dickes Dankeschön geht an Susanne Korlach, die von der Einführung in die Laborwelt bis zu wertvollen Verbesserungsvorschlägen beim Korrekturlesen stets eine liebenswerte Hilfe darstellte.

Ich danke meinen Eltern. Ich kann mich nicht genug für ihre fortwährende Liebe und Unterstützung bedanken. Sie sind immer für mich da.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Ehemann Niklas für seine ausdauernde und unglaublich vielseitige Hilfe. Er stand mir in allen Phasen mit Rat und Tat zur Seite, half mir bei unzähligen Fragen und Problemen, unterstützte mich moralisch und rettete mich vor allem in meinem Kampf mit dem Computer. Ohne ihn wäre diese Promotion nicht in dieser Form zustande gekommen.

Diese Arbeit ist ihm gewidmet!