

## **1. Einleitung**

### **1.1. Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms**

Das kolorektale Karzinom ist weltweit die dritthäufigste Ursache einer Krebserkrankung, wobei die Inzidenzraten international erheblich variieren. In Europa und den USA treten jährlich ca. 300 000 neue Erkrankungsfälle auf, und ca. 200 000 Menschen sterben an dieser Krebskrankung bzw. ihren Folgen (1). Im allgemeinen tritt diese Krebsform häufiger in wirtschaftlich hoch entwickelten Bevölkerungen mit einer westlichen Lebensweise auf, die sich durch Zufuhr von viel Fett und wenig Ballaststoffen in der Nahrung und überwiegend sitzenden Tätigkeiten auszeichnet. Nach Emigration verändert sich die Inzidenz dramatisch, was den Einfluß der Umgebungsfaktoren, insbesondere der Lebensweise, unterstreicht. Das Risiko für das Auftreten kolorektaler Karzinome erreicht bei Immigranten nach 20 Jahren Aufenthalt in den USA dasselbe Niveau der dort geborenen Weißen (2).

Die höchsten Inzidenzraten findet man in Nordamerika, Australien und Neuseeland, gefolgt vom westlichen Europa und schließlich den osteuropäischen Ländern. Die niedrigsten Erkrankungsraten werden in Afrika, Asien und Lateinamerika festgestellt (3). Die Männer sind mit 7:5 gegenüber Frauen sowohl in der weißen wie auch mit 6:5 in der schwarzen Bevölkerung häufiger betroffen. Unter den EU- Ländern liegt die höchste Inzidenz für Männer in Irland und Österreich, für Frauen in Dänemark und den Niederlanden. Verhältnismäßig niedrige Erkrankungsraten finden sich in Griechenland, Finnland, Spanien und Italien. Die Inzidenz in Deutschland liegt im oberen Drittel.

In Deutschland stand das kolorektale Karzinom 1997 bei Frauen an zweiter und bei Männern an dritter Stelle aller onkologischen Neuerkrankungen. Von den geschätzten 173 400 malignen Neubildungen bei Frauen entfielen 27 600 (das sind 15,9%) auf Dick- und Mastdarm. Von den 164 900 Neubildungen bei Männern waren es 24100 Fälle oder 14,6%. Die Rate der Neuerkrankungen in Deutschland verzeichnet seit Mitte der 80er Jahre keinen weiteren Anstieg mehr. Männer erkranken in Deutschland im Mittel im Alter von 68,1, Frauen hingegen mit 72,3 Jahren. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt in Deutschland für Männer

48% und für Frauen 51%. Dies führt bei Männern zu einem Verlust von 165 000 und bei Frauen von 184 000 Lebensjahren. Der Verlust an Lebenserwartung ist für Männer und Frauen gleich hoch und beträgt 6 Jahre (4).

Die Lokalisation des Karzinoms in den einzelnen Teilabschnitten des Dickdarms hat sich im Laufe der Zeit verändert. In den letzten vier Jahrzehnten wird eine Verlagerung auf die rechte Seite („*shift to the right*“) beobachtet. Der Anteil der im Rektum lokalisierten Karzinome beträgt heute immerhin 15-35%. Die stärkste Zunahme wurde im Coecum und im Kolon ascendens beobachtet. Die rechtsseitigen Tumore machen heute ca. ein Viertel aller kolorektaler Karzinome aus (3).

Das Alter der Erkrankung scheint weltweit gesehen in den letzten Jahrzehnten zuzunehmen. Während 1922 noch der Zeitraum zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr als häufigstes Alter der Erkrankung angegeben wurde, sind es bei neueren Arbeiten Werte zwischen 70 und 80 (5). Nur 5,4% der kolorektalen Karzinome treten vor dem 40. Lebensjahr auf (4).

## **1.2. Ätiologie des kolorektalen Karzinoms**

Für die überwiegende Anzahl der kolorektalen Karzinome ist das Zusammenspiel von Umwelteinflüssen, hierdurch verursachte Veränderungen auf genetischer Ebene und einem individuellen Risiko aufgrund einer genetischen Prädisposition von Bedeutung. 80% der kolorektalen Karzinome treten sporadisch auf. Für etwa 20% der Fälle ist eine familiäre Häufung beim Auftreten des Tumors nachzuweisen. Diese läßt entweder auf eine genetische Ursache oder eine gemeinsame Exposition der Familienangehörigen bezüglich externer Risikofaktoren oder auf eine Kombination von beiden schließen (6, 7). Ein Anteil von nur 5-6% der kolorektalen Karzinome weist eine rein genetische Ursache im Sinne einer exakt definierbaren hereditären Erkrankung auf. Zwischen den ersten Veränderungen der Schleimhaut infolge schädigender Einflußfaktoren und dem Auftreten der ersten Krebszelle liegt ein Zeitraum von 10-20 Jahren. Weitere 10-20 Jahre vergehen bis zur Manifestation eines Karzinoms (8). Daraus ergibt sich, daß bei der Analyse der Ätiologie des

kolorektalen Karzinoms diejenige Lebenssituation berücksichtigt werden muß, die 20 bis 40 Jahre zurückliegt.

### 1.2.1. Risikofaktoren

Tabelle 1-1: Risiko- und protektive Faktoren des kolorektalen Karzinoms.

Einflußgröße	Kategorie	Faktor	Literatur - hinweis
Ernährung	Risikofaktor	fettrreiche Nahrung (tierische Fette)	(9)
		hohe Kalorienaufnahme	(10)
		N-Nitrosamine (Proteinabbauprodukte)	(11)
		geringer Faser- und Ballaststoffanteil	(9)
	protektiv	Vitamine (A,C,E),	(12)
		Selen	(12)
Calcium		(13)	
entzündl. Darm-erkrankungen	Risikofaktor	Colitis ulcerosa	(19)
		Morbus Crohn	(20)
Vor-erkrankungen	Risikofaktor	Kolorektales Karzinom	(21)
		Brustkrebs	(22)
		Ovariakarzinom	(23)
		Uteruskarzinom	(23)
		Radiatio	(24)
		Cholezystektomie	(25)
		Uretersigmoidostomie	(16)
genetische Faktoren	Risikofaktor	Verwandte 1. Grades mit kolorektalem Karzinom	(7)
		<i>Syndrome mit präexistierender Polyposis</i>	
		Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP),	(26)
		Turcot-Syndrom	(27)
		<i>Syndrome mit hamartomatösen Polypen</i>	
		Peutz-Jeghers-Syndrom	(28)
		Juvenile Polyposis	
		<i>Syndrome ohne präexistierende Polyposis</i>	
		HNPCC I (Lynch-Typ I, Lynch-Typ I)	(29)
Hereditäres flaches Adenom-Syndrom	(30)		
sonstige	Risikofaktor	Alter	(14)
		Rauchen	(15)
		hoher Alkoholkonsum	(16)
		Hypergastrinämie	(16)
	protektiv	nicht-steroidale Antiphlogistika	(17)
		körperliche Aktivität	(18)

In **Tab. 1-1** sind sowohl jene Faktoren aufgelistet, die die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines kolorektalen Karzinoms erhöhen als auch solche, die das Risiko vermindern. Hierbei ist nicht berücksichtigt, daß jeder einzelne Faktor einen spezifischen Einfluß auf das Auftreten des kolorektalen Karzinoms hat und daß die Sicherheit unterschiedlich ist, mit der auf der Grundlage von klinischen Studien vom Risikofaktor auf das Entstehen des Tumors geschlossen werden kann.

### **1.2.2. Adenom-Karzinom-Sequenz**

Kolorektale Tumore umfassen ein breites Spektrum von gutartigen Neoplasien bis zu invasiven malignen Tumoren. Die auftretenden Veränderungen unterteilt man in nicht- neoplastische Polypen (hierzu zählen hyperplastische, juvenile, entzündliche und lymphoide Polypen), in neoplastische Polypen (kolorektale Adenome) und in Karzinome. Über 95% der kolorektalen Krebsformen sind Karzinome, von denen 95% Adenokarzinome darstellen. Das Vorkommen von kolorektalen Adenomen erhöht das Risiko des Auftretens eines kolorektalen Karzinoms (15), was mit einer erhöhten Tendenz des Kolons verbunden ist, Tumore zu bilden. Kolorektalen Adenome stellen die präkanzeröse Läsion des kolorektalen Karzinoms dar. Das kumulative Risiko, daß an der Stelle eines Adenoms ein Karzinom entstehen kann, beträgt nach einem Beobachtungszeitraum von 5 Jahren 2,5%, nach 10 Jahren 7,5% und nach 20 Jahren 25% (28).

Adenomatöse Polypen werden histologisch nach ihrem Malignitätspotential in tubuläre, tubulovillöse und villöse Adenome eingeteilt. Ein erhöhtes Risiko einer Entwicklung zum Karzinom ist außer vom histologischen Typus auch von Größe und Grad der Dysplasie innerhalb des Adenoms abhängig (31).

### **1.2.3. Genetisches Modell der Karzinogenese**

Die Umformung des normalen Darmepithels über das Adenom zu einem Karzinom ist mit Veränderungen auf der molekularen Ebene verbunden (32). Damit aus einem

Tabelle 1-2: Genetisches Modell für die kolorektale Tumorgenese (34).

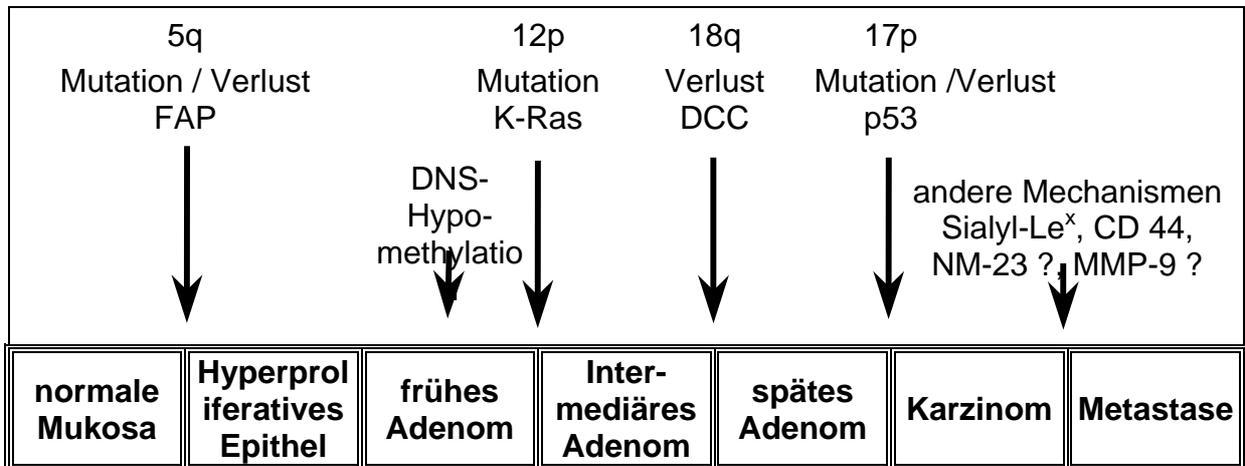


Tabelle 1-3: Genetische Veränderungen beim sporadischen kolorektalen Karzinom (35).

Genetische Veränderung	Position	Häufigkeit	molekulare Funktion	vermutetes Stadium innerhalb Adenom-Karzinom-Sequenz
<b>Onkogene</b>				
K-Ras	Chromosom 12	40%	Zellproliferation und Adhäsionsverlust	intermediäres Adenom
Myc	unbekannt	niedrig	Induktion der Zellproliferation	unbekannt
<b>Tumor-Suppressor-Gene</b>				
APC	Chromosom 5	>60%	Adhäsionsverlust, Transformation	frühe Adenombildung
MCC	Chromosom 5	60%	unbekannt	unbekannt
p53	Chromosom 17	75%	verhindert Apoptose und G1-Phase	spätes Adenom-Karzinom Stadium
DCC	Chromosom 18	30%	Adhäsionsverlust	intermediäres Adenom, spätes Adenom/ Karzinom
NFI GAP	Chromosom 17	14%	Anstieg des aktiven GTP-gebundenen ras-p21	intermediäres Adenom
<b>Metastasierungsgene</b>				
NM23		niedrig	unbekannt	spätes Stadium, Metastasenbildung
<b>Hypomethylation</b>				
	gesamtes Genom	unbekannt	erlaubt Überexpression von Onkogenen	frühes Adenom

normalen Epithel sich ein Karzinom entwickeln kann, sind mindestens 5 –7 molekulare Veränderungen notwendig. Die wichtigsten bisher bekannten

Veränderungen und deren Bedeutung sowie Stellung innerhalb der Karzinogenese sind den **Tab. 1-2** und **1-3** zu entnehmen. Nicht jede Tumorzelle muß jede der aufgeführten Mutationen aufweisen, und die Mutationen müssen auch nicht in einer vorgeschriebenen Reihenfolge ablaufen. Die Art der Mutationen beeinflusst Rate und Art der pathologischen Veränderungen im Tumorgewebe (33).

### **1.3. Pathologie des kolorektalen Karzinoms**

#### **Makroskopische Tumorformen**

Makroskopisch lassen sich vier Formen der kolorektalen Karzinome unterscheiden: ulzeratives (malignes Ulkus), polypoides, ringförmiges oder stenosierendes und diffus infiltrierendes Karzinom. Pathogenetische Bedeutung besitzen außerdem die tumorassoziierten Veränderungen des Kolons. Diese sind: chronischer Ileus mit diffuser Wandverdickung, akute Obstruktion mit dilatativen dünnwandigen Veränderungen, Sterkoralzera sowie gedeckte oder freie Perforation.

#### **Histologische Differenzierung**

Die kolorektalen Karzinome werden mikroskopisch nach dem Differenzierungsgrad in drei Graduierungen eingeteilt: undifferenziert, mäßig und gut differenziert.

#### **Tumorlokalisation**

Die Tumore verteilen sich auf das Sigmoideum (35%), Coecum (22%), Kolon ascendens (12%), Kolon transversum (10%) und Kolon descendens (7%). Von den Karzinomen entfallen 69% auf das Kolon und 31% auf das Rektum (36). Innerhalb der letzten 50 Jahre wurde eine Veränderung der Verteilung zugunsten proximaler Lokalisationen beobachtet (37).

#### **1.3.4. Tumorausbreitung**

1. Direkte Tumorausbreitung: longitudinal, distal, radial-transversal und transmural
2. Lymphatische Tumorausbreitung:

**Kolonkarzinom:** Die Tumorzellen breiten sich von Lymphknotenstationen niedriger Ordnung zu Stationen höherer Ordnung kontinuierlich aus. Die parakolischen Lymphknoten stellen die erste Lymphknotenstation dar, von denen sich die Tumorzellen weiter über die trunkulären Lymphknoten bis zur dritten Lymphknotenstation, den paraaortalen bzw. iliakalen Lymphknoten, ausbreiten. Ein Überspringen einer Lymphknotenstation kommt in bis zu 35% der Fälle vor (38).

**Rektumkarzinom:** Die lymphatische Ausbreitung erfolgt in drei Richtungen:

- kranial: Lymphbahnen entlang der Arteria rectalis superior und Arteria mesenteria inferior , Mesorektum, Basis Mesokolon sigmoideum
- kaudal: Musculus sphincter ani, perianale Haut, ischiorektales Fett
- lateral: A. iliaca interna.

### 3. Hämatogene Metastasierung

**Kolonkarzinom:** über Pfortader.

**Rektumkarzinom:** hochsitzende Karzinome: über Plexus rectalis superior in die Pfortader ; tiefsitzende Karzinome: über Plexus rectalis inferior in die Vena cava.

### 4. Metastasierung per implantationem:

Beim Transport von Karzinomzellen durch den subperitonealen Lymphweg kann es zu Implantationsmetastasen kommen.

### 5. Direkte Metastasierung ins Peritoneum mit der Folge einer Peritonealkarzinose.

## Tumorstadien

Die Einteilung der Tumore in Tumorstadien erfolgt in dieser Arbeit nach der pathologischen TNM-Klassifikation für kolorektale Karzinome der „*International Union against Cancer*“ (39) und der darauf beruhenden *American Joint Committee Classification* des „*American Joint Committee on Cancer*“ (40). Beide Klassifikationssysteme sind in **Abb. 1-1** einander gegenübergestellt.

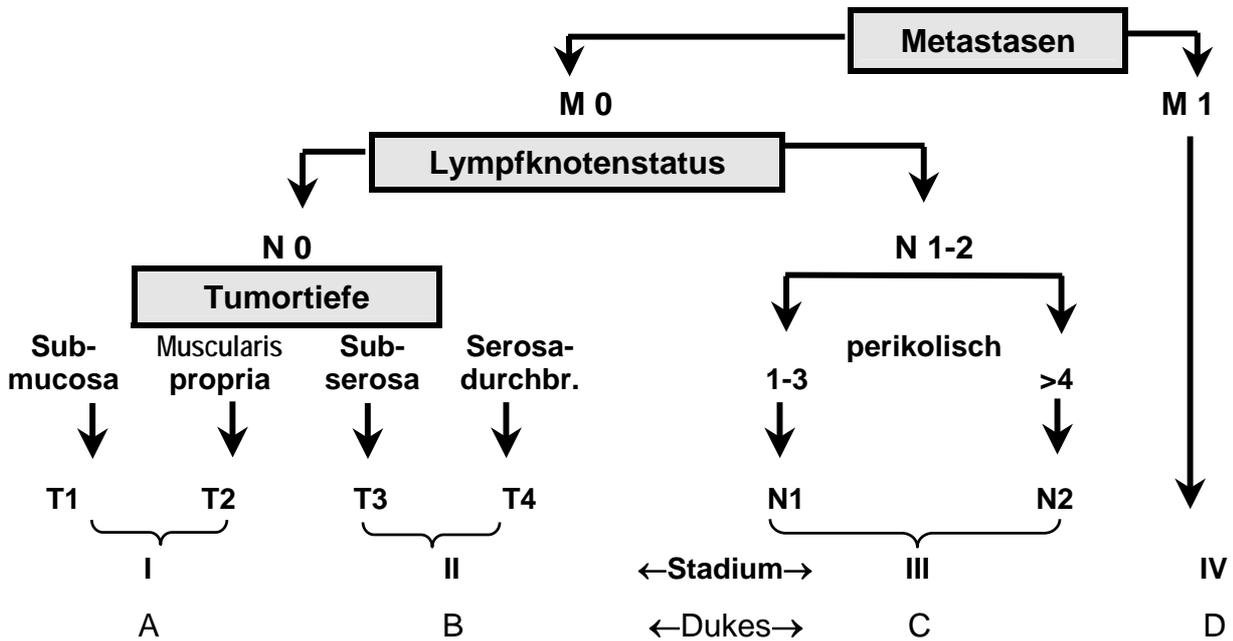


Abbildung 1-1: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

### 1.3.6. Metastasierungsmuster

Wie auch aus **Tab. 1-4** zu entnehmen ist, treten beim Kolonkarzinom Rezidive und Fernmetastasen am häufigsten in der Leber auf. Nach primär kurativer Resektion ist das Lokalrezidiv die häufigste Lokalisation einer Tumormanifestation beim Rektumkarzinom. Lungenmetastasen treten häufiger beim Rektumkarzinom als beim Kolonkarzinom auf.

Tabelle 1-4: Häufigkeit von Lokalisation der Rezidive und Fernmetastasen beim kolorektalen Karzinom (41).

	Kolonkarzinom	Rektumkarzinom
Leber	36%	29%
Lunge	19%	28%
lokoregionär	15%	35%
peritoneal	16%	17%
retroperitoneal	13%	4%
periphere Lymphknoten	2%	7%

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sind ca. 40% der kolorektalen Karzinome noch auf die Darmwand beschränkt und haben noch nicht metastasiert. Metastasen in den

Lymphknoten liegen bei ungefähr einem Drittel aller Fälle vor. Fernmetastasierung tritt in 20% der Rektumkarzinome und in und 30% der Kolonkarzinome zu diesem Zeitpunkt auf (42).

#### 1.4. Prognosefaktoren des kolorektalen Karzinoms

Prognostische Faktoren sind Variablen, die unabhängig von anderen Faktoren den Krankheitsverlauf beeinflussen. Die anatomische Ausbreitung stellt für das kolorektale Karzinom den wichtigsten prognostischen Faktor dar. Die Ausbreitung des Tumors vor der Primärtherapie (TNM-Klassifikation) ist von derjenigen nach der Primärtherapie (Residualtumor- (R-) Klassifikation) zu unterscheiden, da der weitere Krankheitsverlauf entscheidend davon abhängt, ob nach der Operation ein Residualtumor zurückbleibt (R1,2) oder nicht mehr nachweisbar ist (R0).

Die Prognose für Patienten mit R1- oder R2-Tumoren ist wesentlich schlechter als für Patienten ohne Nachweis eines Residualtumors und hängt in erster Linie von der Existenz von Fernmetastasen und der Lokalisation des Residualtumors ab. Darüber hinaus unterscheiden sich die in Frage kommenden Prognosefaktoren nach der R-Klassifikation (43).

Die Prognosefaktoren lassen sich in tumor-, patienten- und behandlungsassoziierte Variablen einteilen. Weiter unterscheidet man, wie aus **Tab. 1-5** ersichtlich ist, zwischen gesicherten, wahrscheinlichen und möglichen Prognosefaktoren (42 - 48). Entscheidend für die Prognose nach R0-Resektion ist die Tumorausbreitung nach dem pTNM-System (Abb. 1-1). Die Prognose verschlechtert sich mit höherem Tumorstadium. Innerhalb des Stadiums III haben pN1-Tumore eine bessere Prognose als pN2 Tumore. Nach den Ergebnissen der Studiengruppe "Kolektorales Karzinom" liegt das 95%-Konfidenzintervall der 5-Jahres-Überlebensrate im Stadium I bei  $76 \pm 4\%$ , im Stadium II bei  $65 \pm 4\%$ , im Stadium III bei  $42 \pm 4\%$  und im Stadium IV bei  $16 \pm 4\%$ . Im Stadium III liegt die Überlebensrate für pN1 bei  $49 \pm 6\%$  im Vergleich zu  $34 \pm 8\%$  bzw.  $34 \pm 7\%$  für pN2 bzw. für pN3 (43). Der Einfluß des Chirurgen auf die postoperative Morbidität und Letalität (49) und auch auf die 5-Jahres-Überlebensrate (46) konnte beim Kolon- und Rektumkarzinom nachgewiesen werden.

Tabelle 1-5: Gesicherte, wahrscheinliche und mögliche unabhängige Prognosefaktoren für kolorektale Karzinome nach R0-Resektion (ungünstige Ausprägung in Klammern).

Unabhängigkeit	assoziiert mit	Prognosefaktor
gesichert	Tumor	• anatomische Ausbreitung: pTNM und UICC-Stadium (höherer Kategorie)
		• histologischer Differenzierungsgrad ( <i>high-grade</i> )
		• Veneneinbrüche (vorhanden)
	Behandlung	• Chirurg
wahrscheinlich	Tumor	• Lokalisation des Primärtumors (tiefes Rektum)
		• Tumorperforation/Obstruktion (vorhanden)
		• Lymphgefäß- und Perineuralscheideninvasion (vorhanden)
		• Histologische Beschaffenheit des Tumorrandes (infiltrativ)
	Patient	• Peritumoröse lymphozytäre Infiltration/ Lymphozytenaggregate (ausgeprägt/vorhanden)
		• CEA-Serum-Spiegel (erhöht)
	Behandlung	• Geschlecht (männlich)
• Technik der Tumormobilisation (andere als <i>no-touch</i> ) • örtliche Tumorzell dissemination (iatrogene Perforation, Schnitt in oder durch Tumor)		
möglich	Onkogen	• Ras (Nachweis)
		• TGF $\alpha$ (niedrige Expression), TGF $\beta$ -1 (Nachweis)
		• c-erbB2 (Über- und Unterexpression)
		• EGFR (höhere Expression)
		• c-myc (Nachweis)
	Tumorsuppressor-Gen	• p53 (Überexpression)
		• DCC (Nachweis)
		• p27 (fehlender Nachweis)
		• Allelverlust (5q, 17p, 1p) (Nachweis)
	Zellproliferation	• PCNA (niedrige Expression)
	Angiogenese/ Metastasierung/ Invasion	• Thymidinphosphorylase (Nachweis)
		• Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Nachweis)
		• Matrix Metalloproteinasen + Inhibitoren (Nachweis v. MMP-1)
		• Urokinase Plasminogen-Aktivator (höhere Expression)
	• CD44 (Nachweis)	
intrazell. Zielstruktur der Chemotherapie	• Thymidylate synthase (TS) (höhere Expression)	
allgemeine Tumormarker	• Sialyl Lewis <sup>x</sup> antigen (Nachweis)	

Innerhalb der von der Studiengruppe "Kolorektorales Karzinom" untersuchten sieben Kliniken variierte die 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 64% und 77% für das Kolonkarzinom und zwischen 45% und 69% für das Rektumkarzinom. Innerhalb der Operateure schwankte die 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 50% und 90% (46).

Eine Vielzahl von wahrscheinlichen patienten- und tumorassoziierten Prognosefaktoren für das kolorektalen Karzinoms wurden bisher untersucht (Tab. 1-5). Bis auf den präoperativen CEA- Serumspiegel ist eine unabhängige prognostische Bedeutung aber bisher für keinen dieser Faktoren ausreichend belegt und wurde daher auch nicht in die Empfehlungen der UICC aufgenommen (44).

In den meisten Studien, die Prognosefaktoren untersuchende sind die Patientenzahlen zu gering und die biometrischen Analysen unzureichend. Die UICC<sup>1</sup> fordert in diesem Zusammenhang den Nachweis der prognostischen Bedeutung durch entsprechende multivariante Methoden an mindestens zwei voneinander unabhängigen Datensätzen. Voraussetzung ist darüber hinaus eine ausreichende Standardisierung der Methode (43).

## **1.5. Angiogenese**

### **1.5.1. Tumorwachstum und Angiogenese**

Im Rahmen der Embryogenese entstehen Blutgefäße entweder durch den Vorgang der Vaskulogenese, bei der sich Endothelzellen aus Vorläuferzellen entwickeln oder durch den Prozeß der Angiogenese, bei der neue Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßen sprießen. Beim Erwachsenen werden neue Blutgefäße nur auf dem Wege der Angiogenese gebildet. Die Endothelzellen gehören mit einer Lebenszeit von über 1 000 Tagen zu den am längsten lebenden Zellen im Körper außerhalb des ZNS (50). Das Gefäßsystem verändert sich unter physiologischen Bedingungen nicht. Eine Ausnahme bildet der weibliche Reproduktionszyklus (51). Das Gefäßsystem besitzt die Eigenschaft, in pathologischen Situationen durch entsprechende Stimulation neue Kapillaren zu bilden. Beispiele hierfür sind die Wundheilung, angio-

---

<sup>1</sup> Union Internationale Contre le Cancer

proliferative Retinopathie, Pannusbildung bei der rheumatoiden Arthritis, Psoriasis, Gefäßneubildung in arteriosklerotischer Plaques und das später im Detail dargestellte Tumorwachstum (52). Der Vorgang der Angiogenese wird durch den Abbau der die Endothelzellen umgebenden Basalmembran eingeleitet. Die Endothelzellen verändern ihre Form und beginnen, in das umgebende Stroma einzuwandern. Die Invasion der Endothelzellen in die Umgebung wird von der Proliferation der Endothelzellen an der Invasionsfront begleitet. Die hinter der Invasionsfront gelegenen Endothelzellen differenzieren sich und bilden das Lumen einer neuen Kapillare. Mehrere Kapillaraussprossungen vereinigen sich zu Gefäßschleifen, in denen das Blut in die neu vaskularisierte Region zirkuliert (51).

Die Hypothese, daß das Tumorwachstum von der Angiogenese abhängt, läßt sich wie folgt begründen:

- Tumore können nur bis zu einer Größe von 1-2 mm<sup>3</sup> wachsen, wenn keine neuen Gefäße gebildet werden, die den Tumor ver- und entsorgen (52).
- Die Wachstumsrate von Tumoren, die subkutan in eine transparente Kammer implantiert werden, ist vor der Vaskularisation niedrig und linear, nach Einsetzen der Gefäßneubildung jedoch hoch und nahezu exponentiell (53).
- Tumore, die in isolierten perfundierten Organen wachsen, in denen die Blutgefäße nicht proliferieren, sind auf eine Größe von 1-2 mm<sup>3</sup> begrenzt. Transplantiert man diese in Mäuse, dehnen sie sich aber nach Einsetzen der Vaskularisation auf eine Größe von 1-2 cm<sup>3</sup> aus (53).
- Das Tumorwachstum in der avaskulären Kornea ist langsam und zeitlich linear, nach Einsetzen der Vaskularisation jedoch exponentiell (53).
- Inhibitoren der Angiogenese, die in vitro keine zytostatische Eigenschaften besitzen, hemmen das Tumorwachstum in vivo (54, 55).
- Die Zellproliferation ist von der intratumoralen Gefäßdichte abhängig (56- 58).
- Für einer Reihe von Tumoren konnte in retrospektiven Studien ein Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte des Primärtumors und der Prognose der Erkrankung nachgewiesen werden (59).

## 1.5.2. Molekularer Mechanismus der Angiogenese

### *angiogenic switch*

Die Induktion der Angiogenese stellt einen entscheidenden Schritt der Tumorentwicklung dar. Es handelt sich hierbei nicht um die zwangsläufige Folge einer Entwicklung proliferierender Tumorzellen, sondern um eine bestimmte Eigenschaft, die die Zellen erwerben müssen. Dies findet häufig schon in einem präneoplastischen Stadium statt (51). Der Übergang vom avaskulären zum neovaskulären Zustand des Tumors wird auch als „*angiogenic switch*“ bezeichnet.

### Angiogenesefaktoren

Die Suche nach löslichen Angiogenesefaktoren, die ein ruhendes Gefäßsystem zur Aussprossung von Kapillaren in den Tumor stimulieren können, basiert auf der Beobachtung, daß in avaskulärem Gewebe, wie z.B. in der Cornea, implantierte Tumore zu einem Einwachsen von neuen Blutgefäßen führen. Mittlerweile kennt man eine ganze Reihe unterschiedlicher Angiogenesefaktoren. Die wichtigsten Vertreter sind in **Tab. 1-6** aufgeführt.

Tabelle 1-6: Angiogenese-Faktoren.

• Vascular endothelial growth factors	• Interleukin 8
• Fibroblast growth factors	• Hepatocyte growth factor
• Plateled derived growth factor (PDGF)	• Transforming growth factor- $\alpha$
• Plateled-activating factor	• Granulocyte colony-stimulating factor
• Substance P	• Angiogenin
• MMP-2, MMP-9	• Proliferin
• Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) (konzentrationsabhängig)	
• Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )	
• Plateled derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF)	

Eine herausragende Rolle spielen die Angiogenesefaktoren *basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)* und *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)*, die in einer Vielzahl

von Tumoren exprimiert werden. Sie zeigen synergetische Wirkungen (60). bFGF gehört zu der Familie der *Fibroblast Growth Factors*, die sich durch eine hohe Affinität zu Heparin auszeichnen (Kapitel 1.7.). Sowohl VEGF, welches auch als VPF (*Vascular Permeability Factor*) bezeichnet wird und die Permeabilität der Gefäße beeinflusst (61), als auch die Familie der FGFs sind in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, was für deren Funktion im Rahmen der Gewebhomeostase spricht, da die Gefäßneubildung ein äußerst seltenes Ereignis ist. Beide Gruppen von Angiogenesefaktoren binden an Rezeptoren auf Endothelzellen, bei denen es sich um transmembranäre Tyrosinkinase handelt (51). Den die Angiogenese induzierenden Faktoren stehen eine Reihe von Angiogenese- Inhibitoren gegenüber. Die wichtigsten Vertreter lassen sich **Tab. 1-7** entnehmen.

Das Zusammenspiel von Induktoren und Inhibitoren, die auf die Endothelzellen auf parakrinem Weg oder über den Blutkreislauf einwirken, entscheidet darüber, ob die Neovaskularisation induziert wird. Die resultierende Bilanz wird durch

- die Aktivität der Tumor-, Bindegewebs- und Entzündungszellen,
- die extrazelluläre Matrix ,
- die Aktivitätszustände der Endothelzellen und
- Zustrom von zirkulierenden Angiogenesefaktoren

bestimmt (62). Damit reflektiert die Angiogenese auch die Eigenschaften der Gewebe, was z.B. durch ein langsames Tumorstadium in älteren Mäusen demonstriert werden konnte (63).

Tabelle 1-7: Angiogenese- Inhibitoren

- |  |  |
|--|--|
| • Angiostatin  | • Endostatin                                 |
| • Interferon $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$                 | • Interferon- $\gamma$ -inducible protein 10 |
| • Interleukin 1, 12  | • Platelet factor 4                          |
| • Proliferin related protein                               | • 16 K prolactin fragment                    |
| • Thrombospondin 1   | • 2-Methoxyoestradiol                        |
| • Tissue inhibitor of metalloproteinase                    | • Retinoic acid                              |
| • Tumor necrosis factor- $\alpha$ (konzentrationsabhängig) |  |

Angiogenesefaktoren können in der extrazellulären Matrix verschiedener Zellarten, darunter auch Endothelzellen, gespeichert und proteolytisch freigesetzt werden (64). Als Bestandteile größerer Moleküle, die selbst keine Aktivität bezüglich der Neovaskularisation besitzen müssen, können Angiogeneseinhibitoren innerhalb kurzer Zeit zur Verfügung stehen. Beispiele hierfür sind ein 23 - kDa -Fragment von Fibronectin (65), ein 16 - kDa- Fragment von Prolaktin (66), Angiostatin, ein Bestandteil von Plasminogen (54), und Endostatin, ein Teil des Kollagen XVIII-Moleküls (55). Die Umwandlung im Körperkreislauf vorhandener Komponenten wie Fibronectin oder Plasminogen in potente Angiogenesehemmer, bedeutet eine neue Art der Regulation einer angiogenetischen Reaktion, wie z.B. im Rahmen einer zeitlich begrenzten Wundheilung. Hierbei spielen die Proteasen und deren weithin unbekannte Regulation, die spezifisch die Inhibitoren aus den Vorläufermolekülen freisetzen, eine entscheidende Rolle. Für die Regulation der Neovaskularisation ist - wie oben erwähnt - das Gleichgewicht von positiven und negativen Faktoren ausschlaggebend. Für die Induktion der Angiogenese ergeben sich daher zwei Möglichkeiten: (1) Reduzierung der lokal vorhandenen oder über den Kreislauf auf die Endothelzellen einwirkenden Inhibitoren oder (2) erhöhte Synthese und Freisetzung von positiven Angiogenesefaktoren (51).

### **Tumorsuppressorgene**

Wird in Tumorzellen die gestörte Funktion des Tumorsuppressorgens p53 wiederhergestellt, so folgt eine Hochregulation des Angiogeneseinhibitors TSP-1, welcher wiederum die Wirkung des von den untersuchten Zellen selbst synthetisierten bzw. dem Medium zugegebenen bFGF aufhebt. Dies führt zu einer Blockierung der Angiogenese (67). Mutationen des TP53 - Tumor -Suppressor - Gens oder des RAS - Onkogens führen also nicht nur zu einer Erhöhung der Tumorzellproliferation, sondern sind auch bei der Regulation der Angiogeneseinhibitoren wie z.B. Thrombospondin (67) und VEGF (68, 69) beteiligt. Bei einer Funktionsstörung des Tumorsuppressorgens kann es zu einem unphysiologischen Ungleichgewicht zwischen Induktoren und Inhibitoren mit der Folge einer Gefäßneubildung kommen (70, 71). Auf diese Weise erfüllt das Tumorsuppressorgen eine ihm definitionsgemäß zugewiesene Aufgabe.

## **Interaktionen zwischen Tumor- und Endothelzellen**

Ein Kubikzentimeter eines Tumors enthält ca.  $10^8$ - $10^9$  Tumorzellen und ca.  $20 \times 10^6$  Endothelzellen, d.h.: auf eine Endothelzelle kommen ca. 100 Tumorzellen. In den meisten Tumoren sind die Tumorzellen in Form von perivaskulären Manschetten angeordnet. Diese Anordnung ist bei allen Tumoren ähnlich, unabhängig davon, ob sie stark oder wenig stark vaskularisiert sind. Die enge Anordnung von Tumorzellen und Endothelzellen im Tumor ermöglicht eine parakrine Kommunikation zwischen diesen beiden Zellarten. Tumorzellen setzen endotheliale Mitogene wie z.B. bFGF und VEGF frei. Endothelzelle produzieren wiederum Proteine, die als Wachstums- und Überlebensfaktoren auf die Tumorzellen wirken. Dazu gehören Platelet Derived Growth Factor (PDGF), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), Interleukin 6, Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor (GM-CSF) und Heparin-Binding Epithelial Growth Factor (HB-EGF) (72).

## **Apoptose**

Die Hemmung der Angiogenese beim Tumor führt über einem Anstieg der Apoptoserate der Tumorzellen zu einer Hemmung des Tumorwachstums. Dabei bleibt die Proliferationsrate der Tumorzellen unverändert hoch (54, 73). Damit führt die Hemmung der Gefäßversorgung nicht nur zum nekrotischen Zelltod, sondern auch zu einer erhöhten Apoptoserate der Tumorzellen. Die Vaskularisation kann auf diese Weise das Tumorwachstum steuern.

### **1.5.3. Metastasierung und Angiogenese**

Die Metastasierung eines Tumors besteht aus einer komplexen Kaskade von aufeinanderfolgenden Ereignissen. Zu Beginn steht die Invasion der Tumorzellen, die mit einer Veränderung der Zelladhäsion, Proteaseproduktion und Beweglichkeit der Zellen einhergeht. Die Tumorzellen müssen dann in ein Blutgefäß eindringen und am Ort der Metastasierung wieder aus dem Gefäß austreten. Es schließt sich die Ansiedlung und Proliferation im Fremdorgan an. Ein erfolgreiches Wachstum der Metastase ist nur möglich, wenn es den Tumorzellen gelingt, in der neuen

Umgebung die Metastase versorgenden Blutgefäße zu bilden. Während des ganzen Prozesses müssen dabei die metastasierenden Zellen der Kontrolle durch das Immunsystem entgehen (74).

Ein Zusammenhang besteht zwischen der intratumoralen Gefäßdichte, der Zahl intravaskulärer Tumorzellen und dem Auftreten von Metastasen (75). Die Vaskularisation des Primärtumors beeinflusst die Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung von Tumorzellen. Darüber hinaus bestehen Wechselwirkungen des Primärtumors mit dem von ihm gebildeten Metastasen. Ein Primärtumor kann das Wachstum seiner Metastasen unterdrücken. Dieser Vorgang wird durch endogene Inhibitoren der Angiogenese vermittelt, was zum ersten Mal für Angiostatin nachgewiesen wurde (54). Angostatin ist ein 38-kD -Protein welches spezifisch die Endothelzell- Proliferation hemmt. Der Primärtumor kann auf diese Weise das Wachstum der Metastasen beeinflussen, ohne direkt mit den Tumorzellen zu kommunizieren. Während der Unterdrückung der Angiogenese in nicht wachsenden Metastasen bleibt die Proliferationsrate der Tumorzellen genauso hoch wie in wachsenden ungehemmten Metastasen. Im Unterschied zu ihnen liegt die Apoptoserate aber wesentlich höher bei Unterdrückung der Angiogenese (73). Die Hemmung der Angiogenese führt durch Erhöhung der Apoptoserate der Tumorzellen zur Unterdrückung des Metastasenwachstums.

### **1.6. Gefäßdichte im Tumor**

In (76) konnte nachgewiesen werden, daß stark vaskularisierte Tumore in größerem Maße Tumorzellen in den Kreislauf abgeben als schwach vaskularisierte. Bei schnell wachsenden Tumoren wurde eine höhere Gefäßdichte festgestellt (77). Ein Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und dem Auftreten von Metastasen bzw. den Überlebenszeiten konnten für eine Reihe von Tumoren nachgewiesen werden, so bei Brusttumoren (78), Plattenepithelkarzinomen (79), Lungentumoren (80), Melanomen (81), Ovarialkarzinomen (82), Cervixkarzinomen (83) und bei Blasentumoren (84).

Die Quantifizierung der Gefäßdichte erfolgt durch Auszählung der Gefäße in ausgewählten Bereichen überdurchschnittlich hoher Vaskularisierung, die in der englischsprachigen Fachliteratur als „*hotspots*“ bezeichnet werden. Die „*hotspots*“ stellen Bereiche des Tumors dar, in denen die Wechselwirkungen zwischen den Endothel- und Tumorzellen überdurchschnittlich intensiv sind, was sich in der resultierenden Gefäßneubildung in diesen Gebieten zeigt. Diese parakrinen Wechselwirkungen sind eine entscheidende Voraussetzung für das Wachstum und damit für die Aggressivität des Tumors. Je höher die Gefäßdichte, desto größer ist diese gegenseitige parakrine Wechselwirkung (59). Entstehen diese „*hotspots*“ aufgrund der Existenz von angiogenetischen Tumorzellklonen, dann ist in diesen Regionen die Wahrscheinlichkeit innerhalb des Tumors am höchsten, daß dort solche Tumorzellen vorhanden sind, welche zu metastasieren in der Lage sind. Die Fähigkeit der Tumorzellen, die Bildung neuer Gefäße zu induzieren, ist nicht nur für die Versorgung des Primärtumors von Bedeutung, sondern stellt eine Voraussetzung zur Ansiedlung und Stimulation der Angiogenese am Ort der Metastasierung dar. Ein erfolgreiches Metastasenwachstum erfolgt nur dann, wenn es den metastasierten Tumorzellen gelingt, im Fremdgewebe eine Versorgung über neu gebildete Blutgefäße zu implementieren. Die erhöhte Gefäßdichte und die spezielle „durchlässigere“ Struktur von Tumorgefäßen an sich, erhöht die Wahrscheinlichkeit einer vom „*hotspot*“ ausgehenden hämatogenen Metastasierung, da die Eintrittsfläche für maligne Zellen in den Blutkreislauf vergrößert ist. Die „*hotspots*“ können somit als repräsentative Gebiete für die maximale angiogenetische Potenz des Tumors angesehen werden. Aufgrund der Untersuchungsergebnisse vorangegangener Arbeiten und auch aus den geschilderten pathophysiologischen Gründen ist die Bestimmung des angiogenetischen Potentials eines Tumors mit Hilfe der Messung der Gefäßdichte in den „*hotspots*“ zu rechtfertigen.

### **1.7. Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)**

Die Fibroblast-Wachstumsfaktoren (FGFs) gehören zu einer Familie von neun heparinbindenden Wachstumsfaktoren (85). Sie sind strukturell verwandte Proteine mit einem Gewicht zwischen 20 und 30 kD . FGF-1 (*acidic Fibroblast Growth Factor*, aFGF) und FGF-2 (*basic Fibroblast Growth Factor*, bFGF) sind die beiden am besten

charakterisierten Isoformen (86). Jeder besteht aus einem Polypeptid mit 154 Aminosäuren. Die Signaltransduktion erfolgt über Membranrezeptoren sowie eine direkte Wirkung im Zellkern. Es existieren zwei Klassen von FGF-Rezeptoren, eine mit hoher Affinität, welche mit einer intrazellulären Tyrosinkinase gekoppelt ist und eine mit niedriger (87). FGF reichert sich im Zellkern von Endothelzellen unabhängig von der Membranrezeptorbindung an (88). Auf diesem Weg scheint es die Transkription von ribosomalen Genen während des Übergangs von der  $G_0$  - zur  $G_1$  - Phase des Zellzyklus zu stimulieren (89). Dieser Schritt ist eng mit der Zellproliferation verbunden.

bFGF ist eines der wichtigsten Cytokine, die eine Rolle bei der Induktion der Angiogenese spielen. Es stimuliert die Proliferation und Migration von kultivierten Endothelzellen (90). *Basic Fibroblast Growth Factor* verursacht eine schnelle Neovaskularisation in der Cornea und der Haut sowie eine Fibroplasie in der Dermis, was für seine Bedeutung bei der Gefäßneubildung und Wundheilung spricht (91). Neben seiner parakrinen Wirkung ist bFGF auch Teil einer autokrinen Stimulationschleife von Endothelzellen (90) und möglicherweise von Tumorzellen (92).

Immunhistochemisch wurde bFGF in Endothelzellen, Makrophagen, in Keratinozyten, bei akuten Entzündungsreaktionen, Karzinomzellen ektodermalen Ursprungs, neuroektodermale Zellen, Gliomzellen, sowie im Extrazellularraum nachgewiesen (93). Der Nachweis von FGF-1 und FGF-2 im Medium von Tumorzelllinien spricht für ihre mögliche Beteiligung bei der autokrinen Wachstumsstimulation (94). Eine Überexpression von FGF-2 wurde im Glioblastoma multiforme (95) im Adenokarzinom des Pankreas (96) im Endometriumkarzinom (97), im Nierenzellkarzinom (98) im Magenkarzinom (99) und im Kolonkarzinom (100) festgestellt. Im Urin von Patienten mit unterschiedlichen Tumoren konnten erhöhte bFGF-Spiegel gemessen werden (101), darunter auch bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom (102). Der Nachweis von bFGF im Liquor von Kindern mit Gehirntumoren hat eine prognostische Bedeutung hinsichtlich der Entwicklung eines Tumorrezidivs und ist positiv mit der intratumoralen Gefäßdichte korreliert (103).