

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

DISSERTATION

Angiogenin, Endoglin und Endostatin als prognostische
Faktoren beim Zervixkarzinom

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Konstanze Mordelt

aus Lutherstadt Wittenberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W. Lichtenegger
2. Prof. Dr. med. F. Jänicke
3. Prof. Dr. Dr. Dr. h. c. A. D. Ebert

Datum der Promotion: 18.09.2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Einführung	6
1.2. Aufgabenstellung	8
1.3. Das Zervixkarzinom	9
1.3.1. Epidemiologie und Ätiologie.....	9
1.3.2. Pathologische Anatomie und Tumorbilogie.....	10
1.3.3. Diagnostik.....	12
1.3.4. Therapie.....	12
1.3.4.1. Therapie der Präkanzerosen.....	12
1.3.4.2. Therapie der invasiven Karzinome.....	12
1.3.4.2.1. FIGO-Stadium I.....	12
1.3.4.2.2. FIGO-Stadium II bis IV.....	13
1.4. Angiogenese allgemein	15
1.5. Angiogenin	19
1.5.1. Aufbau und Vorkommen.....	19
1.5.2. Funktion und Wirkung.....	21
1.6. Endoglin	23
1.6.1. Aufbau und Vorkommen.....	23
1.6.2. Wirkungen des Endoglins.....	25
1.7. Endostatin	29
1.7.1. Aufbau.....	29
1.7.2. Wirkung.....	31

2. Material und Methodik

2.1. Patientinnen	33
2.2. Methodik	34
2.2.1. Probengewinnung.....	34
2.2.2. Theoretisches Prinzip des Sandwich-ELISA.....	34
2.2.3. Quantitative Bestimmung der Parameter.....	36
2.3. Statistik	38

3. Ergebnisse

3.1. <i>Gibt es signifikante Unterschiede zwischen den Krankheitsstadien beim Zervixkarzinom hinsichtlich der Konzentration der 3 Parameter Endoglin, Endostatin und Angiogenin?.....</i>	40
3.2. <i>Vergleich der 3 Tumormarker bei den verschiedenen histologischen Befunden.....</i>	43
3.3. <i>Vergleich der 3 Tumormarkerkonzentrationen bei unterschiedlichen Prognosefaktoren: N (Lymphknotenmetastasen), L (Invasion der Lymphgefäße mit Tumorzellen), V (Veneninvasion) und G (Grad der Tumordifferenzierung).....</i>	46
3.4. <i>Gibt es signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen FIGO-Stadien, also entsprechend der Ausprägung des Tumors?.....</i>	56
3.5. <i>Vergleich der Marker bei Patienten ohne oder mit einem Tumorrezidiv.....</i>	59
3.6. <i>Vergleich der Tumormarker bei Patientinnen mit CIN I+II versus CIN III.....</i>	60
3.7. <i>Korrelation von Alter und den Konzentrationswerten von Endoglin, Endostatin und Angiogenin bei Diagnosestellung.....</i>	62
3.8. <i>Bestehen Unterschiede prä-, peri- und postmenopausal?.....</i>	64
3.9. <i>Einfluss des Nikotinabusus.....</i>	65
3.10. <i>Vergleich der Tumormarker bei Patienten in Abhängigkeit der Fernmetastasierung.....</i>	67
3.11. <i>Vergleich von M0 mit M1 nur bei Patienten im Stadium FIGO IVB und Rezidiv (n=25).....</i>	69
3.12. <i>Vergleich von HPV-negativ (n=18) mit HPV-high-risk-positiv (n=20) bei CIN I-III.....</i>	71
3.13. <i>Gibt es signifikante Unterschiede zwischen CIN I+II sowie CIN III innerhalb der Gruppe mit HPV-high-risk positivem Befund?.....</i>	73
3.14. <i>Sensitivität und Spezifität der 3 Parameter.....</i>	74
3.15. <i>Sensitivität und Spezifität der Tumormarker in Kombination.....</i>	78
3.16. <i>Gesamtüberlebenszeit und Mortalität bei FIGO und Rezidiv.....</i>	80

3.17. <i>Mortalität und Überleben bei Lymphknotenmetastasen</i>	83
3.18. <i>Mortalität und Überleben in Abhängigkeit von Fernmetastasen</i>	84
3.19. <i>Survivalanalysen bei unterschiedlichen Tumorarten</i>	86
3.20. <i>Überlebenszeiten bei unterschiedlichen Konzentrationen der 3 Tumormarker</i>	86
3.21. <i>Überleben in Abhängigkeit vom Alter</i>	89
3.22. <i>Coxregression</i>	90

4. Diskussion	
4.1. <i>Angiogenesemessung an Tumoren</i>	91
4.2. <i>Bedeutung von Angiogenin</i>	92
4.3. <i>Forschungen zu Endoglin</i>	94
4.4. <i>Beobachtungen zum Endostatin</i>	96
4.5. <i>Fazit</i>	98

5. Zusammenfassung	99
---------------------------------	----

6. Literatur	102
---------------------------	-----

1. Einleitung

1.1. Einführung

Definitionsgemäß ist ein Tumor eine abnorme Gewebeneubildung, die überschießend und ohne Koordination mit dem normalen Gewebe wächst und auch dann weiter wächst, wenn der auslösende Faktor nicht mehr besteht.

Diese Definition beinhaltet eine Verselbstständigung des Wachstumsprozesses und auch des neu entstandenen Gewebes, daher der Begriff Neoplasma oder Neoplasie [Rössner 2004].

Die biologischen Eigenschaften, welche die Krebszellen als Voraussetzung für die Verselbstständigung ihres Wachstums akquiriert haben, sind in der folgenden Abbildung zusammengestellt.

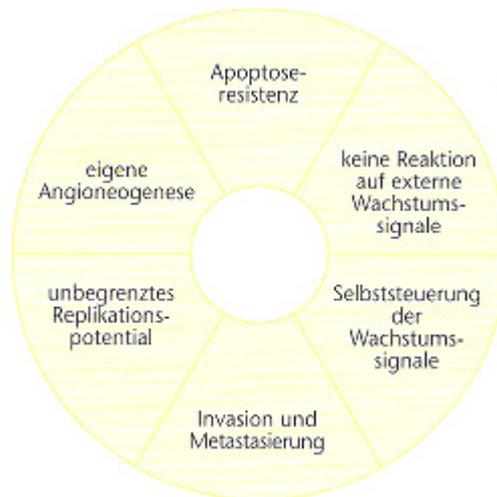


Abb. 1.1 Dargestellt sind die wichtigsten Eigenschaften von Krebszellen nach Hannahan und Weinberg 2000 [Rössner 2004]

Krebs ist im Wesentlichen eine genetische Erkrankung, die durch einen evolutionären Prozess genetischer Mutationen entsteht. Genetische Alterationen können durch spontane somatische Mutationen hervorgerufen werden, aber auch exogene kanzerogene Faktoren spielen eine zentrale Rolle. Hier sind zu nennen:

- chemische Substanzen
- Ultraviolettstrahlen sowie ionisierende Strahlen
- onkogene Viren, denen mehr und mehr großes Gewicht beigemessen wird.

Eine irreversible DNA-Schädigung in nur einer Zelle ist der erste Schritt der Tumorentstehung [Wulf 1991].

Aus zellkinetischen und klinischen Untersuchungen weiß man, dass die Proliferation der Malignome nicht gleichmäßig verläuft. Es gibt Zeiten raschen Geschwulstwachstums und Zeiten scheinbaren Wachstumsstillstandes.

Entscheidend für das Wachsen des Tumors ist seine Gefäßversorgung.

Ohne Neovaskularisierung können Tumore sich nicht über 2–3 mm im Durchmesser ausdehnen. Bis zu dieser Größe können Tumorzellen den notwendigen Sauerstoff und Nährstoffe über die einfache Diffusion erhalten. Dann wird das Wachstum eines Neoplasmas mit einer induzierten Angiogenese verbunden [Folkmann et al. 1971]. Frühe Untersuchungen von Folkmann et al. 1966 demonstrierten, dass die Bildung neuer Blutgefäße vom Tumor- oder Wirtsgewebe freigegebener löslicher Faktoren stimuliert werden kann und dass das Tempo des Tumorwachstums mit der Neovaskularisierung in Beziehung steht.

Angiogenese ist ein komplexer Multischrittprozess, der ein weitreichendes Zusammenspiel zwischen Zellen, löslichen Faktoren und extrazellulären Matrixbestandteilen einschließt.

Vier deutliche Schritte in der Angiogenese beinhalten:

- Durchlässigkeit der Basalmembran für Proteasen
- Wanderung von Endothelzellen in das Interstitium und Sprießen von Kapillarknospen
- Ausbreitung der Endothelzellen während der maximalen Migration
- Lumenformung, Erzeugung neuer Basalmembranen mit der Rekrutierung von Adventitiazellen, Formung von Anastomosen und endgültige Durchblutung

Autokrine und/oder parakrine angiogenetische Faktoren müssen anwesend sein, um Endothelzellenwanderung, -ausbreitung, -verlängerung und Differenzierung herbeizuführen [Gupta et al. 2003, Zatterstrom et al. 2000, O`Reilly et al. 1997].

Der angiogenetische Phänotyp ist das Ergebnis eines Gleichgewichtes zwischen positiven und negativen Reglern der Neovaskularisation. Angiogenesehemmstoffe sind u.a. Endostatin, Angiogenesestimulatoren u.a. Endoglin und Angiogenin.

Angiogenesefaktoren können im Blut quantitativ gemessen werden.

Damit die Messung eines Parameters routinemäßig eingeführt werden kann, muss gewährleistet sein, dass in klinischen Studien aussagekräftige Ergebnisse erreicht werden.

Um dies für Angiogenin, Endoglin und Endostatin zu prüfen, wurden für diese Untersuchung die Serumkonzentrationen von 125 erkrankten Patientinnen gemessen und auf Unterschiede innerhalb gebildeter Subgruppen kontrolliert.

Gesunde Probanden wurden in die Untersuchung nicht einbezogen.

1.2. Aufgabenstellung

Zwei Hauptfragestellungen standen im Mittelpunkt der Untersuchung:

1. Sind die Parameter Angiogenin, Endoglin und Endostatin als Screeningwerte anwendbar?
2. Handelt es sich bei Angiogenin, Endoglin und Endostatin um Marker, die den Verlauf beim Zervixkarzinom prognostizieren können?

Gepüft wurde das Verhalten der Serumwerte von Angiogenin, Endoglin und Endostatin bei folgenden Gruppen:

- Vergleich zwischen den Krankheitsstadien CIN, FIGO und Rezidiv
- hinsichtlich der histologischen Typen Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom und adenosquamöses Karzinom
- bei den Prognosefaktoren N (=Lymphknotenmetastasen), L (=Invasion der Lymphgefäße), V (=Veneninvasion) und G (Grad der Tumordifferenzierung)
- Unterschiede innerhalb der FIGO-Stadien I–IV
- Ergebnisse bei Frauen mit versus ohne Rezidiv
- Erkrankungen prä- und postmenopausaler Frauen
- hinsichtlich des Alters bei der Erstdiagnose
- Frauen mit und ohne Nikotinabusus
- Patientinnen mit und ohne Fernmetastasierung im FIGO-Stadium und bei Rezidiv
- Beziehung zum HPV-Status
- Überlebenszeiten in Abhängigkeit von der Konzentration der drei Tumormarker
- die Sensitivität und Spezifität der 3 Parameter – einzeln und in Kombination

Untersucht wurden die Serumwerte der Faktoren Angiogenin, Endoglin und Endostatin bei 125 Frauen. Davon waren 50 Frauen verteilt auf die 3 CIN-Stadien, 51 Patientinnen auf die FIGO I–IV Stadien und 24 Frauen mit einem Rezidiv des Zervixkarzinoms.

1.3. Das Zervixkarzinom

1.3.1. Epidemiologie und Ätiologie

Das Zervixkarzinom ist das zweithäufigste Genital-Malignom der Frau [Zeller et al. 1996].

Die Inzidenz ist weltweit regional unterschiedlich. In Israel erkrankten 5, in den USA 17 und in Kolumbien 62 von 100 000 Frauen pro Jahr. Im Saarland lag die Inzidenz 1994 bei 15/100 000 [Feige et al. 2001].

Die soziologischen Faktoren, welche die Inzidenz erhöhen, sind unter anderem eine frühe Kohabitarche und Promiskuität. Der Rückgang der Zervixkarzinom-Erkrankung in der westlichen Welt bezieht sich ausschließlich auf die invasiv wachsenden Tumoren, nicht auf die Präkanzerosen, die in einem zunehmend jüngeren Alter mit steigender Frequenz beobachtet werden. Hinsichtlich der Altersverteilung finden sich Präkanzerosen in besonderer Häufung zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, die frühen Stadien invasiver Karzinome zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr, während die fortgeschrittenen Karzinome hauptsächlich jenseits des 60. Lebensjahres zu finden sind.

Da Sexualverhalten und -hygiene ein bestimmender Faktor für die Entstehung des Kollumkarzinoms sind, suchte man schon frühzeitig nach sexuell übertragbaren Ursachen. Inzwischen ist mit hinreichender Sicherheit erwiesen, dass humane Papilloma-Viren (HPV) für die Entstehung des Zervixkarzinoms von entscheidender Bedeutung sind.

Bisher sind über 200 HPV-Typen beschrieben worden. Davon wurden 15 in Zervixkarzinomgewebe nachgewiesen und sind deshalb als „high-risk“-Viren deklariert. Zusätzlich sind 3 Typen als „probable high-risk“ und 12 Typen als „low-risk“ klassifiziert.

High-risk-Typen (HR-HPV) lassen sich in 99,7% aller Zervixkarzinome nachweisen. Die Formen HR-HPV 16 und 18 finden sich in über 70% aller Zervixkarzinome [Schmidt-Petruschkat 2007].

Zirka 70% aller sexuell aktiven Menschen machen im Laufe ihres Lebens eine Papillomavirusinfektion durch, aber in ca. 80% der Fälle kommt es nach ungefähr

18 Monaten zur Spontanremission. 20% der HPV-infizierten Frauen entwickeln eine Präkanzerose. Bei Persistenz über mehrere Jahre (8–30 Jahre) erhöht sich das Risiko für eine schwere Dysplasie (CIN III), 1–2% der HR-HPV-infizierten Frauen entwickeln ein Zervixkarzinom [Schmidt-Petruschkat 2007].

1.3.2. Pathologische Anatomie, Tumorbiologie und Nomenklatur

Typischer Entwicklungsort des Plattenepithelkarzinoms ist die Transformationszone im Übergangsbereich von Plattenepithel und Endozervixepithel. In einer präinvasiven Phase erfolgt ein Differenzierungsverlust der Zellen, gefolgt von einem Schichtungsverlust. Verschiedene Ausprägungen der Veränderungen werden als zervikale intraepitheliale Neoplasie = CIN klassifiziert.

Man unterscheidet nach der WHO Terminologie:

leichte Dysplasie	- CIN I
mäßige Dysplasie	- CIN II
schwere Dysplasie bzw. Carcinoma in situ	- CIN III.

Von der leichten Dysplasie wird angenommen, dass sie sich in bis zu 80% der Fälle rückbilden kann, jedoch ist im Einzelfall diese Rückbildungstendenz nicht erkennbar. Beim Carcinoma in situ ist nach einer unterschiedlichen Latenzzeit in 75% der Fälle ein Übergang in ein invasives Karzinom zu verzeichnen. Aber auch aus einer leichten Dysplasie, bei hohen zellulären Atypiegraden, kann direkt eine multizentrische Invasion hervorgehen. Mit der Invasion beginnt der Stromaeinbruch als destruierendes oder infiltratives Wachstum (stumme Invasion).

Koeffizient Progression/Remission	WHO-System		Bethesda-System
0,3	CIN I	leichte Dysplasie	low-grade SIL
0,8	CIN II	mäßige Dysplasie	high-grade SIL
7	CIN III	schwere Dysplasie Carcinoma in situ	high-grade SIL

Tab. 1.3.2.1 Nomenklatur und Verlauf der Zervixdysplasie (SIL=squamous intraepithelial lesion) [Feige et al. 2001]

In 85% handelt es sich um Plattenepithelkarzinome, in 15% findet man Adenokarzinome oder andere histologische Typen. Die Diskussion einer verbindlichen histologischen Einteilung ist nicht abgeschlossen.

Das Tumorwachstum mit zunehmender Invasion ist zunächst klinisch okkult. Man unterscheidet nach Definition der FIGO – Stadium IA1 und IA2 – Mikrokarzinome mit maximaler Invasion von 3–5 mm und maximaler Oberflächenausdehnung von 7 mm. Im weiteren Verlauf des makroskopisch erkennbaren Wachstums wird eine Gruppe der endophytisch und exophytisch wachsenden Tumoren unterschieden.

Das weitere Wachstum ist dann überwiegend diskontinuierlich lymphogen. Es ergibt sich nach der FIGO-Klassifikation die in der folgenden Abbildung wiedergegebene Stadieneinteilung des Zervixkarzinoms.

FIGO-Klassifikation	UICC-Klassifikation	Definition	Befund	häufige Begleitkomplikationen
0	Tis	Carcinoma in situ (schwere Dysplasie)		-
I	T1	Karzinom auf Zervix beschränkt		
IA	T1a	präklinisches, nur mikroskopisch nachweisbares Karzinom	klinisch uncharakteristisch	-
IA1		Invasionstiefe bis 3mm Oberflächenausdehnung ≤ 7 mm		
IA2		Invasionstiefe 3–5mm Oberflächenausdehnung ≤ 7 mm		
IB	T1b	klinisches Karzinom oder T1a2 IB1 ≤ 4 cm IB2 > 4 cm		-
II	T2	Ausbreitung über die Zervix hinaus, ohne die Beckenwand bzw. das untere Vaginadrittel zu erreichen		(eventuell Harnwegs- komplikationen)
IIA	T2a	Übergang auf die Vagina (maximal 2/3)		
IIB	T2b	Übergang auf Parametrium ohne Erreichen der Beckenwand		
III	T3	Karzinom erreicht die Beckenwand und/oder das untere Vaginadrittel		Harnwegsaffektion, Stauung, Gefäß- und Nervendruck, Neuralgien und Ödeme unterer Extremitäten
IIIA	T3a	Karzinom erreicht das untere Vaginadrittel		
IIIB	T3b	Karzinom erreicht die Beckenwand und/oder Hydronephrose bzw. stumme Niere		
IV (A)	T4	Übergang auf Blase oder Rektum (Mukosa) und/oder Ausbreitung außerhalb des Beckens		wie unter III, ferner direkte Organsymptome (Blase, Rektum)
IV (B)	M1	Fernmetastasen		

Tab. 1.3.2.2 FIGO-Klassifikation von 1997 des Zervixkarzinoms [Feige et al. 2001]

1.3.3. Diagnostik

Wesentlicher Bestandteil zur Früherkennung von Präkanzerosen und invasiven Frühformen des Kollumkarzinoms sind die kolposkopische Untersuchung und der sorgfältige zytologische Abstrich aus dem Zervixkanal und von der Portiooberfläche, um hier suspektere Areale zu erkennen.

Erste Symptome sind meist irreguläre vaginale Blutungen, Zwischenblutungen während der Geschlechtsreife, postmenopausale Blutungen nach der klimakterischen Umstellung, blutig tingierter Ausfluss sowie Kontaktblutungen. In der überwiegenden Zahl der Fälle sind Blutungsstörungen kein Frühsymptom mehr.

Schmerzzustände sind bereits Folge einer Tumorausbreitung. Defäkations- und Miktionsbeschwerden sind bei Einbruch in Blase und Rektum gegeben.

Über Schmerzen wird geklagt bei Tumorummauerung der großen Beckenwandgefäße, der Nerven, des Uterus und bei Begleitinfektionen. Folgen sind Harnstauung, Pyelonephritis, Nierenversagen, Stauung der unteren Gefäße, Thromboseneigung und Neuralgien.

1.3.4. Therapie

Im Vordergrund stehen Operation und Radiochemotherapie.

1.3.4.1. Therapie der Präkanzerosen

Bei Frauen jenseits des 40. Lebensjahres mit abgeschlossener Familienplanung wird man nach Diagnose einer Präkanzerose die Empfehlung zur Hysterektomie geben.

1.3.4.2. Therapie der invasiven Karzinome

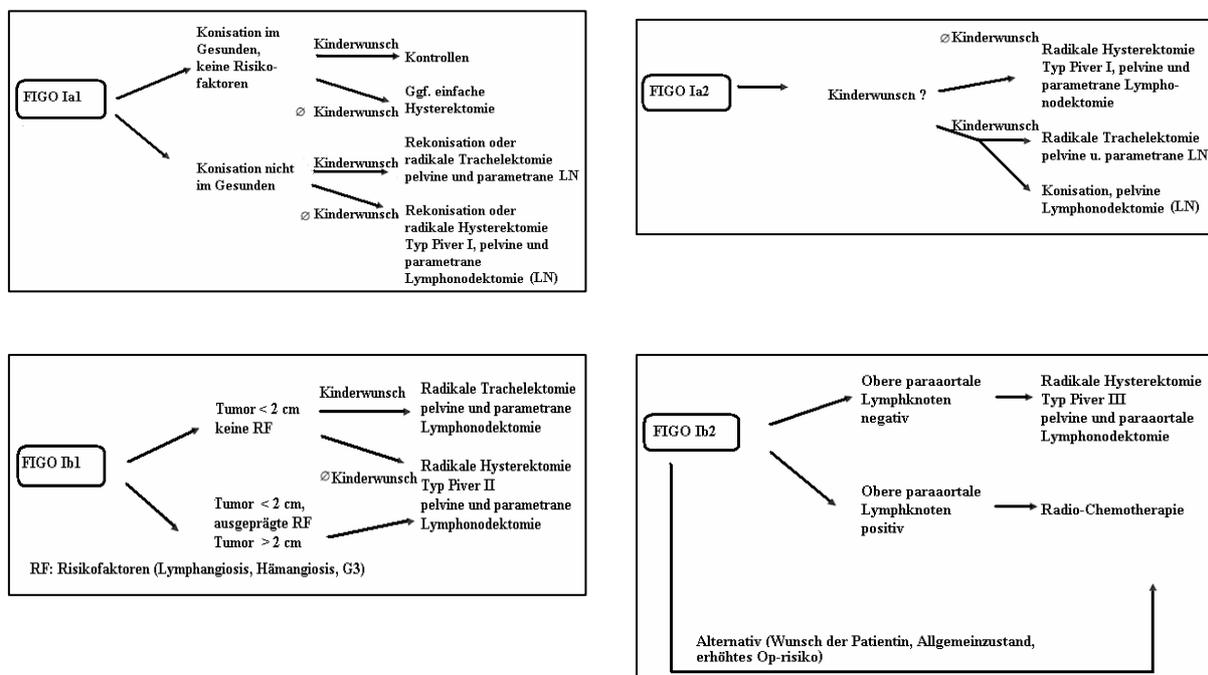
1.3.4.2.1. FIGO-Stadium I

Im Stadium der frühen Stromainvasion (FIGO Ia1) ist die Hysterektomie ausreichend.

Bei Kinderwunsch kann die operative Therapie auf die schon aus diagnostischen Gründen durchgeführte Konisation beschränkt bleiben.

Im Stadium des Mikrokarzinoms (FIGO Ia2) wird ein differenziertes operatives Vorgehen empfohlen. Bei einer Infiltrationstiefe bis zu 3 mm ist die Hysterektomie ausreichend. Wird diese überschritten oder finden sich Lymphgefäßeinbrüche, dann sollte die Radikaloperation nach Wertheim mit pelviner Lymphonodektomie erfolgen.

Im Stadium Ib ist die Radikaloperation angezeigt. Die pelvine Lymphonodektomie wird durch die paraaortale Lymphknotenentfernung ergänzt, falls befallene Lymphknoten gefunden werden. Die postoperative Radiochemotherapie bleibt in diesem Stadium nur noch Einzelfällen vorbehalten. Sie wird eingesetzt, wenn bei der pathohistologischen Beurteilung gewisse Kriterien zutreffen: ob zum Beispiel eine vollständige Tumorentfernung gelungen ist – metastatischer Befall regionärer Lymphknoten, parametane Infiltration, Lymphgefäßeinbrüche vorhanden sind.



Tab. 1.3.4.2.1.1 Therapieoptionen in den Stadien I des Zervixkarzinoms [DGKG 2008]

1.3.4.2.2. FIGO-Stadium II bis IV

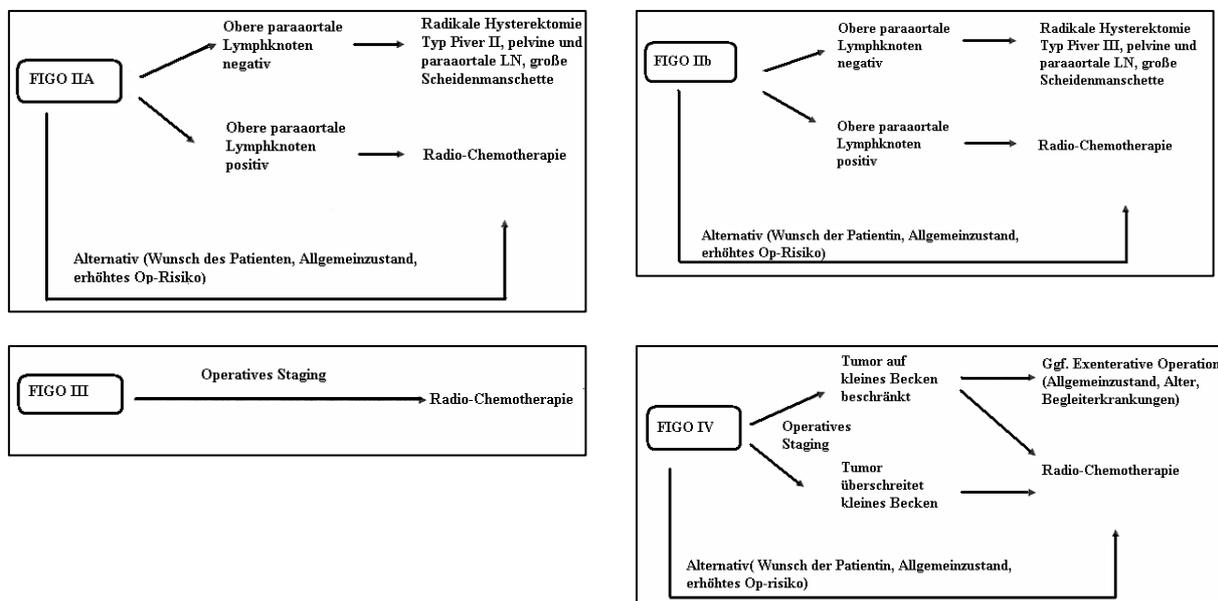
Im Stadium IIa ist die Operation die Methode der Wahl mit Lymphonodektomie, wobei der obere Scheidenanteil entfernt werden muss. Eine operative Strahlentherapie ist hier wegen fraglich kompletter Tumorentfernung erforderlich.

Im FIGO IIb ist die primäre kombinierte Radiochemotherapie neben einer operativen Intervention mit einer adjuvanten Radiochemotherapie die Therapie der Wahl.

In den Stadien III und IV wird die primäre kombinierte Radiochemotherapie favorisiert.

Indikationen zur adjuvanten Radiochemotherapie	
-	pN1
-	R1 (non-in-sano)
-	Parametrienbefall
-	pNo und zwei von drei Risikofaktoren
-	Tumormanifestation > 4 cm
-	Tiefe Stromainvasion
-	Befall des lymphovaskulären Raums

Tab. 1.3.4.2.2.1 Indikationen zur adjuvanten Radiochemotherapie [Boeing et al. 2007]



Tab. 1.3.4.2.2.2 Therapieoptionen in den Stadien IIa–IV des Zervixkarzinoms [DGGG 2008]

Die Entwicklung von Impfstoffen bedeutet einen Meilenstein in der Therapie von Krebserkrankungen. Trotzdem kann auf zusätzliche Vorsorgeuntersuchungen nicht verzichtet werden, da sich der Erfolg der Impfung mit einem deutlichen Rückgang der Zervixkarzinominzidenz voraussichtlich erst in 10 bis 20 Jahren einstellen wird.

Von der ständigen Impfkommission (STIKO) des Robert-Koch-Institutes in Berlin wird die HPV-Impfung seit März 2007 für alle Mädchen im Alter von 12 bis 17 Jahren offiziell empfohlen.

1.4. Angiogenese allgemein

Als Angiogenese bezeichnet man die Aussprossung von neuen Gefäßen.

Es handelt sich um einen sehr komplexen, aus mehreren Schritten bestehenden Prozess.

Als erwiesen gilt, dass Wachstum, Progression und Metastasierung maligner Tumore, aber auch physiologische Prozesse, von der Angiogenese abhängig sind.

Essentiell ist die physiologische Neubildung von Gefäßen für die Reproduktion, Embryonalentwicklung und im adulten Organismus für Muskelaufbau und Wundheilung. Im Gegensatz zur pathologischen Angiogenese ist die physiologische Gefäßneubildung reguliert und von begrenzter Dauer. Im Rahmen des Gleichgewichtes von angiogenetischen Stimulatoren (z.B. Angiogenin, Endoglin u.a.) und Inhibitoren (z.B. Angiostatin, Endostatin u.a.) findet ein notwendiger Zellumsatz zum Erhalt der funktionellen Gefäßwand, aber kein qualitativer Zuwachs statt.

Pathologische Angiogenese, wie sie beim Tumorwachstum auftritt, ist auch verantwortlich für die Zerstörung des Knorpels bei rheumatoider Arthritis, trägt zur Proliferation und Blutung atherosklerotischer Plaques in der Kardiologie bei, ermöglicht die Vergrößerung der Prostata bei benigner Prostatahyperplasie, führt zu intraperitonealen Blutungen bei der Endometriose, ist eine Ursache der Erblindung bei der Retinopathie und ist Grundlage für lebensbedrohliche Hämangiome im Kindesalter [Folkman aus Harrisons 2001].

Einbezogen in den Mechanismus der Neovaskulogenese ist ein ausgeprägtes Zwischenspiel von Zellen, löslichen Faktoren und Komponenten der extrazellulären Matrix.

Dabei sind vier Schritte in den Mechanismus der Angiogenese verwickelt [Gupta et al. 2003]:

1. Proteasen verursachen den Abbau der Basalmembran
2. Einwanderung und Aussprossung von Endothelzellen in den interstitiellen Raum
3. Proliferation endothelialer Zellen
4. Bildung von Gefäßlumen, Anastomosen und neuer Basalmembranen

Während der aktiven Angiogenese kommt es zur Reorganisation des Zytoskelettes endothelialer Zellen, es kommt zur Ausschüttung von Zelloberflächenadhäsionsmolekülen (z.B. Selektine und Integrine) und von proteolytischen Enzymen und folglich zur Umbildung der angrenzenden extrazellulären Matrix.

Ursache der Metastasierung ist die Angiogenese. Die Voraussetzung für die Metastasierung ist das Vorhandensein einer einzelnen Zelle oder Zellkolonie, die imstande ist, den Primärtumor durch die Basalmembran zu verlassen, Anschluss an die Zirkulation zu gewinnen und extern als sekundäre Zellgruppe zu proliferieren.

Tumorzellen überwinden die Basalmembran, dringen in den interstitiellen Raum ein und treten in Wechselwirkung mit den darin befindlichen Zellen.

Da in der Basalmembran, bestehend aus Glykoproteinen, Proteoglykanen und Kollagenen, nicht ausreichend große Poren für den passiven Zelltransport enthalten sind, erfolgt die Invasion der Tumorzellen aktiv. Die Bindung der Tumorzelle an die Oberfläche der Basalmembran erfolgt durch Tumorzelloberflächenrezeptoren der Integrin- und Nichtintegrin-Familien. Einige Stunden nach Bindung der Tumorzelle an die Basalmembran findet sich an dieser Stelle ein umschriebener Bereich der Auflösung. Ursache dafür sind die von Tumorzellen sezernierten oder von der Wirtszelle freigesetzten proteolytischen Enzyme (s. Abb. 1.4.1 aus Rössner).

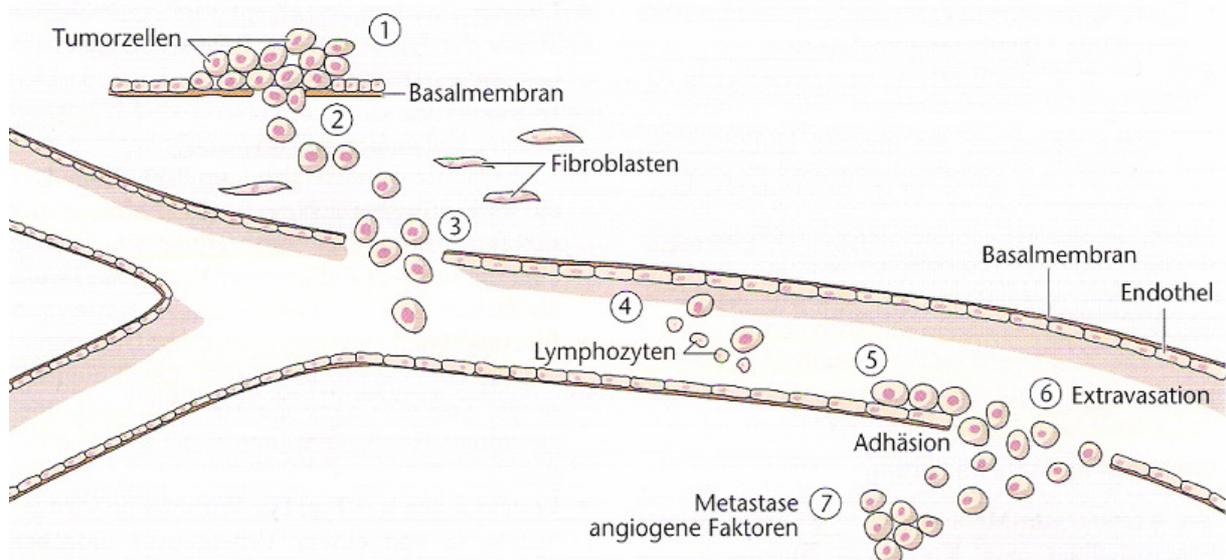


Abb. 1.4.1 Metastasierungskaskade

1 = Tumorzellen haben invasive Potenz akquiriert. 2 = Sie infiltrieren die Basalmembran und das angrenzende Bindegewebe. 3 = Invasion der Wand eines Blutgefäßes.

4 = Immunologische Überwachung durch unterschiedliche Immunzellen. 5 = Adhäsion an den Endothelzellen am Realisationsort. 6 = Extravasation mit Infiltration durch die Gefäßwand

7 = Metastasenbildung mit Angiogenese. [Rössner et al. 2004]

Proteasen sind die Peptidbindung spaltende Enzyme, welche sowohl intra- als auch extrazellulär vorkommen und für die Proteolyse verantwortlich zeichnen.

Nach dem Aufbau ihres aktiven Zentrums unterscheidet man u.a. Metallo-, Cystein- und Serinproteasen, die in der Angiogenese eine entscheidende Rolle spielen.

Erwähnenswert wären jeweils die wichtigsten Vertreter dieser Familien:

- Metalloproteasen: Matrixmetalloproteasen (MMP), Gelatinasen und Kollagenasen
- Cysteinproteasen: Kathepsin B, K und L (lysosomale Proteinasen)
- Serinproteasen: Elastase, Kathepsin G, Plasminogenaktivatoren wie die körpereigene Urokinase (u-PA) und der körpereigene Gewebsplasminogen-Aktivator (t-PA)

Für das Wachstum von soliden Tumoren benötigen diese eine eigene Gefäßversorgung.

Die Angiogenese wird durch ein Gleichgewicht von endogenen proangiogenetischen und antiangiogenetischen Faktoren reguliert. Eine Unterbrechung des Gleichgewichtes führt zu einer gesteigerten Vaskularisierung. Die Störung des Gleichgewichtes erfolgt entweder durch eine gesteigerte Sekretion von Angiogenesestimulatoren oder durch Hemmung der Freisetzung von Angiogeneseinhibitoren. Es kommt zum „angiogenic switch“.

Durch Anschluss an das Gefäßsystem geht der Tumor von einem avaskulären in ein vaskuläres System über. Größenzunahme und Metastasierung sind die Folgen. Über Penetration von Tumorzellen durch die durchlässige Basalmembran der neu gebildeten Kapillaren ist ein Fortschreiten des Tumorleidens gewährleistet (s. untere Abb. 1.4.2 und Metastasenkaskade 1.4.1).

Anreize einer gesteigerten Angiogenese sind die Wirkung der Wachstumsfaktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor) und FGF (fibroblastic growth factor) sowie hypoxische Bedingungen.

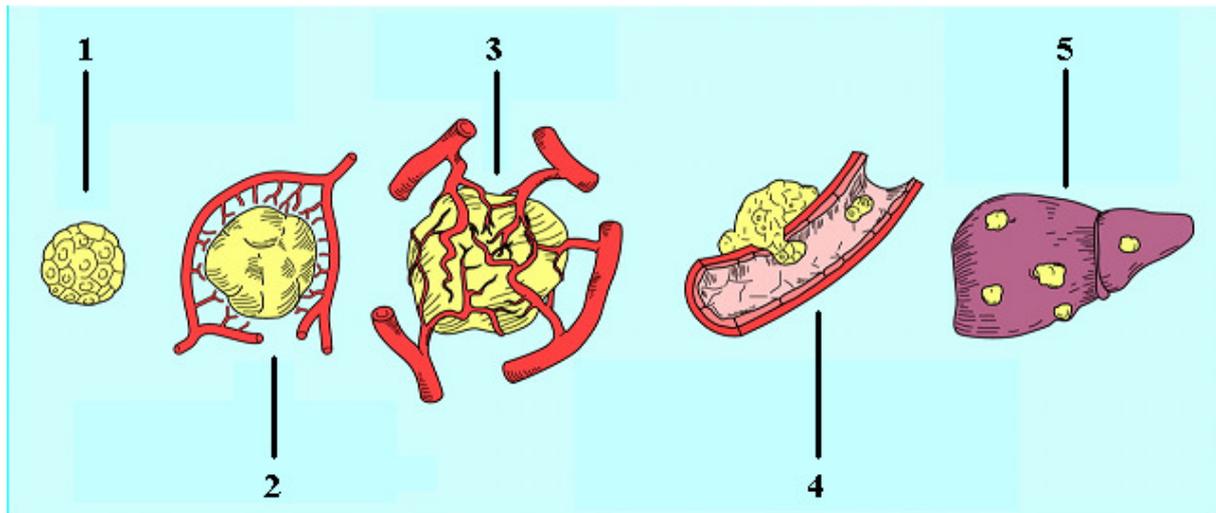


Abb. 1.4.2 Dargestellt ist die Rolle der Angiogenese während des Wachstums eines Tumors.

(1) Gezeigt wird ein kleiner Tumor, der keine Gefäßversorgung besitzt und via Diffusion ernährt wird. (2) Die Tumorgöße hat zugenommen und die Ernährung des Tumors über Diffusion ist nicht mehr ausreichend. Es kommt zur Produktion angiogenetischer Faktoren und zum Wachstum neuer Gefäße, worüber die Nutrition erfolgt. Zu diesem Zeitpunkt besteht noch die Balance zwischen angiogenetisch stimulatorischen und inhibitorischen Effekten.

(3) Kommt es jedoch zu einem Übergewicht der angiogenetischen Faktoren (angiogenic switch) dringen Gefäße in den Tumor ein. Die Stabilität dieser neu gebildeten Gefäße ist gering. (4) Folglich wandern Tumorzellen in das Gefäßlumen ein, bilden kleine Emboli, die sich dann in externen Geweben niederlassen. (5) Resultat ist letztlich die Fernmetastasierung in den Organen. [modifiziert nach Hayes et al. 1999]

1.5. Angiogenin

1.5.1. Aufbau und Vorkommen

Bei Angiogenin, auch bezeichnet als Ribonuklease 5, handelt es sich um ein 14 kDa großes lösliches Protein, welches erstmals in Kolonkarzinomzellen HT-29 isoliert wurde [Fett et al. 1985].

Die Aminosäuresequenz und die dazu korrespondierende Nukleotidsequenz des Angiogenins weisen eine zur pankreatischen Ribonuklease A 35%ige Sequenzähnlichkeit und eine 65%ige Homologie auf [Strydom et al. 1985].

Angiogenin ist eine aus 123 Aminosäuren bestehende Einzelkette. Es ist ein Bestandteil des menschlichen Plasmas und zirkuliert in einer Konzentration von 250–360 ng/ml im Gefäßsystem [Strydom et al. 1998].

Angiogenin wurde während der menschlichen Entwicklung in folgenden Organen entdeckt [Tello-Montoliu et al. 2006]:

- Herz (Fetus 19.Woche)
- Milz (Fetus 19.–20.Woche)
- Lunge (Fetus 20.Woche)
- Leber (Fetus 20.Woche)

Beim Erwachsenen konnte Angiogenin in der Lunge, Leber, im Kolon, in der Prostata, Brust, im Gehirn, in der Retina und in Melanozyten unter physiologischen Bedingungen gefunden werden.

Es konnte als eines der bisher 8 bekannten Komponenten der Ribonukleasesuperfamilie identifiziert werden.

Bereits Beintema et al. haben 1988 die Aminosäuresequenz von mehr als 40 verschiedenen RNasen untersucht und dabei lediglich eine Sequenzähnlichkeit zum Angiogenin von ca. 30–70% festgestellt. Keine dieser RNasen besaß eine angiogenetische Aktivität.

Kenntnisse über die Struktur von Angiogenin sind sowohl für seine ribonukleäre als auch für seine angiogenetische Aktivität von entscheidender Bedeutung. Derzeit sind die Sequenzen vom Angiogenin des Menschen, der Maus, des Rindes, des Hasen und des Schweins identifiziert.

Im Gegensatz zu allen Mitgliedern der RNase-Superfamilie ist die ribonukleäre Aktivität des Angiogenins am geringsten. Sie besitzt eine um das 100 000–1 000 000-fache geringere Aktivität als die Ribonuklease A [Shapiro et al. 1986].

Grund dieser minimalen ribonukleären Aktivität ist die partielle Blockierung der Pyrimidin-Base-bindenden Seite durch einen Glutaminrest in Position 117.

Der isoelektrische Punkt ist mit 9,5 aufgrund des hohen Anteils basischer Aminosäuren, wie Arginin (10,6%), sehr hoch.

Der Unterschied zu anderen Mitgliedern der RNase-Familie besteht in einer fehlenden vierten Disulfidbindung in der Position zwischen Cys 65 und Cys 75. Diese Region wird durch ein Peptid ersetzt.

Durch Einwirkung der BHK-Protease (Baby-Hamster-Kidney) kann das Derivat

Angiogenin E und durch die Endoprotease Lys-C das Derivat Angiogenin K erzeugt werden [Hallahan et al. 1991]. Beide dieser Abkömmlinge des Angiogenins besitzen ribonukleäre, jedoch keine angiogenetische Aktivität [Tello-Montoliu et al. 2006].

Die funktionelle Folge der fehlenden Disulfidbindung besteht in einer aktivierten Angiogenese mit Stimulierung von Endothelzellen.

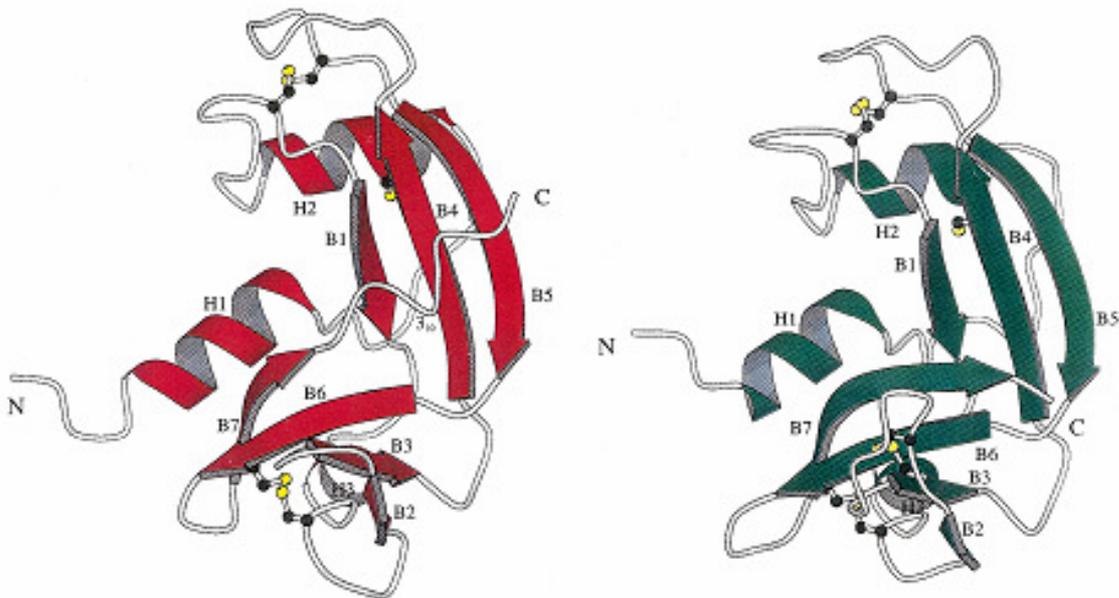


Abb. 1.5.1.1 Darstellung der Polypeptidstruktur von Angiogenin links und von Ribonuklease A rechts [Acharya et al. 1994]

1.5.2. Funktion und Wirkung

Die angiogenetische Aktivität konnte erstmals von Fett et al. 1985 beschrieben werden, nachdem Angiogenin auf Chorioallantoismembranen von Hühnereiern zu einer Neovaskularisation führte.

Weiterhin erfolgten Untersuchungen mit implantiertem Angiogenin in den Hornhäuten von Hasen. Auch hier kam es zu Gefäßneubildungen.

Die biologischen Funktionen des Angiogenins sind die im Rahmen der Angiogenese auftretende Bindung an Endothelzellen, die Stimulierung eines second Messengers, die Zelladhäsion und -migration sowie die Aktivierung von Proteasen.

Außerdem hemmt Angiogenin die Degranulation von polymorphkernigen Granulozyten (PMNL) und nimmt darüber Einfluss auf die unspezifische Immunabwehr [Matousek et al. 1995].

Bei peripheren Gefäßkrankheiten, Entzündungen, der rheumatoiden Arthritis, bei der proliferativen diabetischen Retinopathie und bei der Adipositas konnten deutlich höhere Angiogeninspiegel gefunden werden als bei Gesunden [Tello-Montoliu et al. 2006].

Erniedrigte Angiogeninspiegel zeigten sich bei Plazentainsuffizienz in der Schwangerschaft. Bei diesen Patientinnen wurden pathologische Dopplerwerte gemessen. Angiogenin könnte ein Marker für Plazentaerkrankungen sein [Kolben et al. 1997].

Angiogenin kann an einen Oberflächenrezeptor der endothelialen Zellen binden, was zu einer Konformitätsänderung führt. Dieser 170 kDa große endotheliale Oberflächenrezeptor wurde von Hu et al. 1997 beschrieben. Vor der Identifizierung des 170 kDa großen endothelialen Oberflächenrezeptors existierte bereits die Kenntnis über ein 42 kDa großes Protein, mit dem Angiogenin eine Verbindung herstellen kann. Dieses α -Aktin bildet nach Bindung mit Angiogenin einen extrazellulären Komplex, welcher die proteolytische Kaskade aktiviert.

Dieser gebildete Komplex ist in der Lage, das Plasminogen-Aktivator-System zu stimulieren. Der daraus resultierende Anstieg des Plasmins führt zum Abbau der Basalmembran, insbesondere der Bestandteile Laminin und Fibronectin [Hallahan et al. 1991].

Folglich kommt es zur Migration und die Zellen durchdringen die Basalmembran (s. Abb. 1.5.2.1).

Der spezifische Angiogeninrezeptor und Aktin können nicht gleichzeitig von Endothelzellen auf der Zelloberfläche präsent sein. Der spezifische Angiogeninrezeptor wird nur unter bestimmten Bedingungen von endothelialen Zellen ausgeschüttet.

Beispielsweise ist die Abnahme der lokalen Zelldichte der Auslöser für die Ausschüttung des 170 kDa großen Angiogeninrezeptors. Aber auch der Einfluss einer physikalischen Zerstörung oder eines anderen externen Stimulus, der die Zellen in einen nicht konfluierenden Status bringt, kann zur Aktivierung führen.

Folglich kommt es durch Angiogeninaktivierung zur Auffüllung des Raumes mit Zellen, der durch die wandernden Zellen entstanden ist. Aus dieser Füllung sowie der Dichtezunahme der Zellen resultiert wiederum eine reduzierte Expression des Rezeptors.

Die dichteabhängige Rezeptorausschüttung ist möglicherweise der Regulator des von Angiogenin induzierten Wachstums von Kapillaren [Hu et al. 1997].

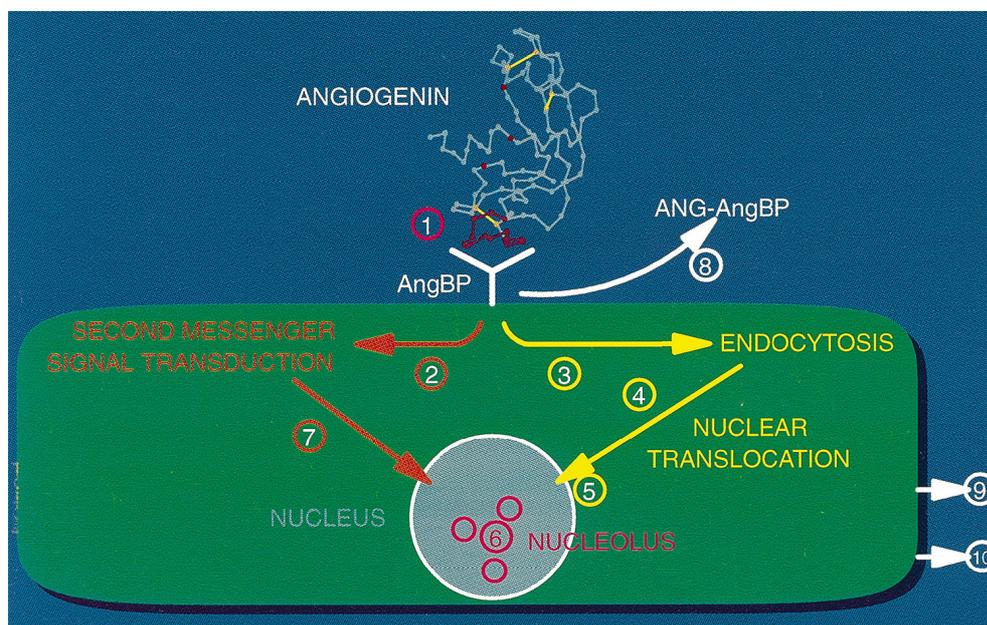


Abb. 1.5.2.1 Übersicht über den Aktivierungsmechanismus des Angiogenins

(1) Bindung des Angiogenins an einen zellulären Oberflächenrezeptor, hier bezeichnet als AngBP (Angiogenin bindendes Protein), (2) Aktivierung eines second Messengers mit resultierender Signaltransduktion, (3) Endozytose des Angiogenins in die Zelle, (4) Translokation an den Zellkern, (5) Aufnahme des Angiogenins in den Zellkern und (6) in das Kernkörperchen, wobei die Aufnahme in den Kern außerdem durch Aktivierung des second Messengers vermittelt werden kann (7). Beide Vorgänge ermöglichen letztlich die Proliferation endothelialer Zellen. Angiogenin kann auch zusammen mit einem Angiogenin bindenden Protein einen extrazellulären Komplex bilden (8), welcher die proteolytische Kaskade in Gang setzt. Extrazelluläres Angiogenin kann auch als Substrat die Zelladhäsion und -migration fördern (9). Alle aufgezählten Mechanismen resultieren in einem Endpunkt, nämlich der Angiogenese (10). [Riordan 1997]

1.6. Endoglin

1.6.1. Aufbau und Vorkommen

Bei Endoglin/CD 105 handelt es sich um ein 180 kDa großes homodimeres transmembranäres Glykoprotein, das überwiegend von der Oberfläche vaskulärer Endothel- und glatter Muskelzellen exprimiert wird.

Das menschliche Gen des Endoglins konnte mittels der Fluoreszenz in situ Hybridisierung auf dem langen Arm, Position 34, des Chromosoms 9 identifiziert werden.

Eine geringe Ausschüttung ist auch von anderen Zellen verschiedener Histologien zu verzeichnen [Fonsatti et al. 2004] (s. Tab. 1.6.1.1).

Tab. 1.6.1.1 In vivo Verteilung von CD-105 in anderen Zellen verschiedener Histologien

Fibroblasten	Aktivierte Monozyten
Differenzierte Makrophagen	Follikuläre dendritische Zellen
Mesenchymale Herzzellen	Melanozyten
Mesangiumzellen	Synzytiotrophoblasten
Frühe B-Zellen	Glatte Gefäßmuskelzellen
Vorstufen der Erythrozyten	

Zusätzlich zeigte sich eine erhöhte Endoglinexpression in Geweben mit aktiver Angiogenese, wie in entzündetem und regenerierendem Gewebe sowie in Tumoren.

Aufgebaut ist Endoglin aus 3 Teilen: einem extrazellulären Bereich, bestehend aus 561 Aminosäuren, einem hydrophoben transmembranären Bereich und aus einem aus 47 Aminosäuren bestehenden Teil im Zytosol [Gougos et al. 1990] (s. Abb. 1.6.1.1).

Die Aminosäurenkette aus dem extrazellulären Bereich beinhaltet ein Tripeptid, aufgebaut aus Arginin, Glycin und Aspartat. Die sogenannte RGD-Region ist bereits in mehreren Proteinen der extrazellulären Matrix wie im Fibronectin, Vitronectin, von Willebrandfaktor, im Kollagen I und im Fibrinogen als erkennende Struktur gefunden worden [Cheifetz et al. 1992].

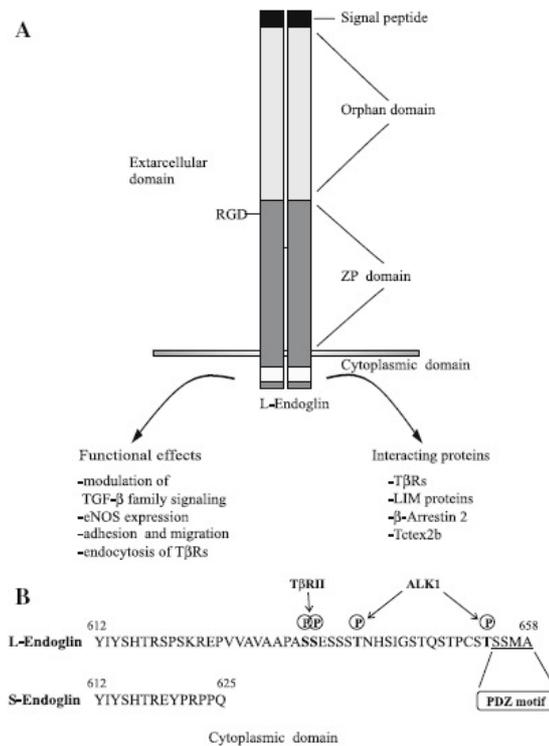


Abb. 1.6.1.1 Dargestellt ist schematisch die Struktur des Endoglins und die zytoplasmatischen Domänen der S- und L-Form des Endoglins [Ten Dijke et al. 2008]

Forschungen zum Endoglin haben bereits folgende Resultate ergeben:

1. Mutationen des Endoglins bewirken eine vaskuläre Dysplasie und sind Ursache der hereditären hämorrhagischen Teleangiektasie (HHT-1 und HHT-2) [McAllister et al. 1994]
2. murines Endoglin spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung glatter Gefäßmuskelzellen und bei dem angiogenetischen Prozess
3. gesteigerte Endoglinausschüttung
 - im Endothel gefäßneugebildeter Gewebe wie z.B. in Tumoren [Burrows et al. 1995]
 - bei Störungen des Schilddrüsenstoffwechsels, z.B. Hashimoto-Thyreoiditis [Marazuela et al. 1995]
 - bei der Sklerodermie [Leask et al. 2002]
 - bei ischämischen Infarkten [Kumar et al. 1996]
 - in der glatten Gefäßmuskulatur bei Vorhandensein arteriosklerotischer Plaques [Conley et al. 2000]
 - in glatten Muskelzellen, die bei Gefäßverletzung reagieren [Ma et al. 2000]
 - bei Gefäßverletzungen in Endothelzellen [Botella et al. 2002]

Mittels der RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion) konnte in endothelialen Zellen, in promonozytären Zelllinien HL-60 und U-937 sowie in der Plazenta die Existenz von 2 Formen des Endoglyns aufgefunden gemacht werden [Bellón et al. 1993].

Die S- (short) und L- (long) Form unterscheiden sich hinsichtlich ihres zytoplasmatischen Schwanzes in der Länge der Aminosäuresequenz.

Während die S-Form aus 600 Aminosäureresten mit einem zytoplasmatischen Ende von 14 AS besteht, besitzt die L-Form 633 Aminosäurereste mit 47 AS am zytoplasmatischen Schwanz.

Von Li et al. konnte 2000 gezeigt werden, dass die L-Form die vorherrschende ist.

Endoglin wurde neben Betaglykan als ein TGF- β -III-Rezeptor klassifiziert. Im Gegensatz zum Betaglykan benötigt dieser den TGF- β -II-Rezeptor, um wirksam zu werden [Meng et al. 2006]. Der intrazelluläre und der transmembranäre Bereich des Endoglyns besitzt eine 71%ige Sequenzähnlichkeit zum Betaglykan [Duff et al. 2003].

1.6.2. Wirkungen des Endoglyns

Der Tumor Growth Factor (TGF) gehört in die Gruppe der Zytokine, deren Signaltransduktion über Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen erfolgt. Die Familie der TGF- β lässt sich in drei Hauptgruppen klassifizieren:

1. TGF- β -Isoformen (TGF- β 1–TGF- β 5)
2. Aktivine
3. BMPs (bone morphogenetic proteins)

TGF- β ist sowohl als pro- als auch antiangiogenetische Komponente in die Gefäßentwicklung und Homöostase mit einbezogen [Lebrin et al. 2005].

CD 105 (Endoglin) bindet bevorzugt an TGF- β 1, TGF- β 3, BMP-2, BMP-7 und Aktivin. Da Endoglin als TGF- β -III-Rezeptor nicht allein an TGF- β 1, TGF- β 3, BMP-2, BMP-7 und Aktivin binden kann, benötigt es den TGF- β -II-Rezeptor. Der TGF- β -II-Rezeptor ist konstitutiv aktiv. Durch Assoziation mit dem TGF- β -I-Rezeptor wird dieser phosphoryliert.

Der aktivierte TGF- β -I-Rezeptor leitet daraufhin das Signal des Liganden an Smads (Smad 2 und 3) weiter.

Bei Smads handelt es sich um zytoplasmatische Effektorproteine, 3 Arten können unterschieden werden:

1. R-Smads (receptor activated Smad): Smad 2 und Smad 3 sind TGF- β und Activin spezifische R-Smads. Smad 1, Smad 5 und Smad 8 hingegen sind BMP spezifische R-Smads. Die Funktion von Smad 2 und 3 besteht darin, über ein membranverankertes Hilfsprotein SARA (Smad anchor for receptor activation) an den TGF- β -1-Rezeptor zu binden [Miyazono et al. 2000].
2. Co-Smads (common partner Smad): Nach Komplexbildung mit R-Smads ist eine Migration in den Zellkern, in Form eines Heterotrimers, und somit eine Regulation der Transkription von Zielzellen möglich. Smad 4 ist derzeit das einzige Co-Smad. Wobei man jedoch Smad 4 α und Smad 4 β unterscheiden muss, die in *Xenopus* identifiziert wurden.
3. I-Smads (inhibitory Smad): I-Smads sind für die Hemmung der Signaltransduktion verantwortlich, wobei Smad 6 die TGF- β -Signaltransduktion unterbricht, Smad 6 und Smad 7 die Signaltransduktion der BMPs.

Durch die Bindung von TGF- β -I-Rezeptor mit dem R-Smad werden Smad 2 und 3 über die Kinase Domäne des β 1-Rezeptors phosphoryliert, wodurch eine Assoziation mit Smad 4 möglich wird [Miyazono et al. 2000]. Das dabei entstandene Heterotrimer transloziert in den Zellkern und aktiviert so die Transkription von TGF- β -Zielgenen (s. Abb. 1.6.2.1).

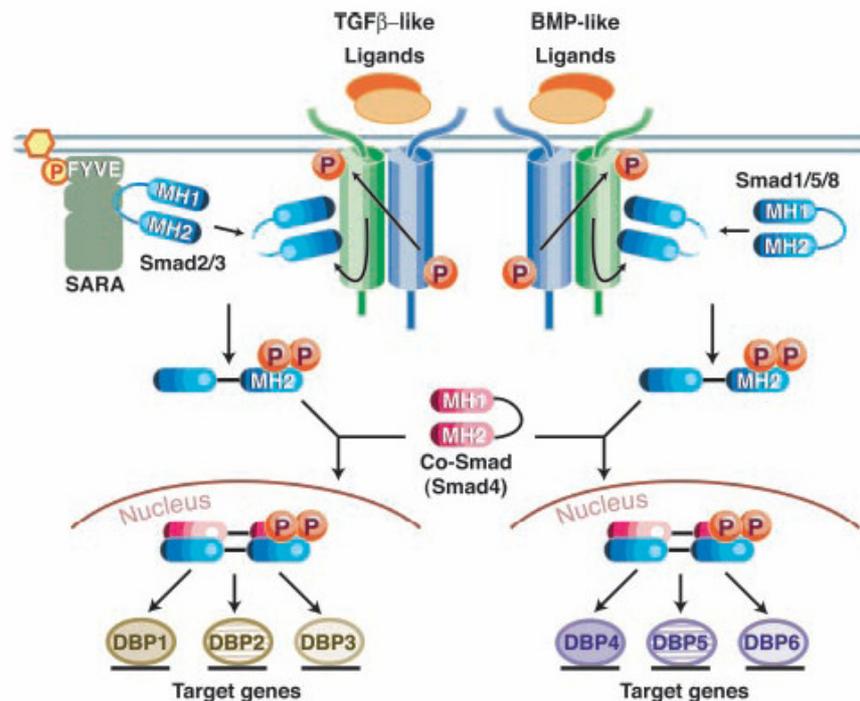


Abb. 1.6.2.1 Dargestellt ist die Signaltransduktion von TGF- β -ähnlichen und BMP-ähnlichen Liganden über die entsprechenden Rezeptoren und Smads. Durch Bindung des Liganden an den Rezeptor kommt es zur Phosphorylierung verschiedener Smads (R-Smads). R-Smads bilden im weiteren Verlauf mit dem Co-Smad einen heterotrimeren Komplex, welcher in den Kern transloziert. Die verschiedenen Smads werden von ihren spezifischen DNA-Bindungsproteinen (DBP) erkannt und regulieren darüber mehrere Zielgene.

Bei SARA (Smad anchor for receptor activation) handelt es sich um ein membranverankertes Hilfsprotein, über welches Smad 2 und Smad 3 an den TGF- β -I-Rezeptor rekrutiert werden [Attisano et al. 2002].

Alk1 und Alk5, beide sind TGF- β -1-Rezeptoren, vermitteln TGF- β -Signale mit gegenseitigen Effekten [Goumans et al. 2002].

Während Alk1-Signale, verbreitet über Smad 1 und 5, die Proliferation und Migration endothelialer Zellen fördern, supprimiert Alk5 die Proliferation der Endothelzellen und die Differenzierung von glatten Muskelzellen [Lebrin et al. 2004].

Die Angiogenese scheint durch eine Balance zwischen Alk1 und Alk5 reguliert zu sein, in der Endoglin eine entscheidende Funktion besitzt (s. Abb. 1.6.2.2).

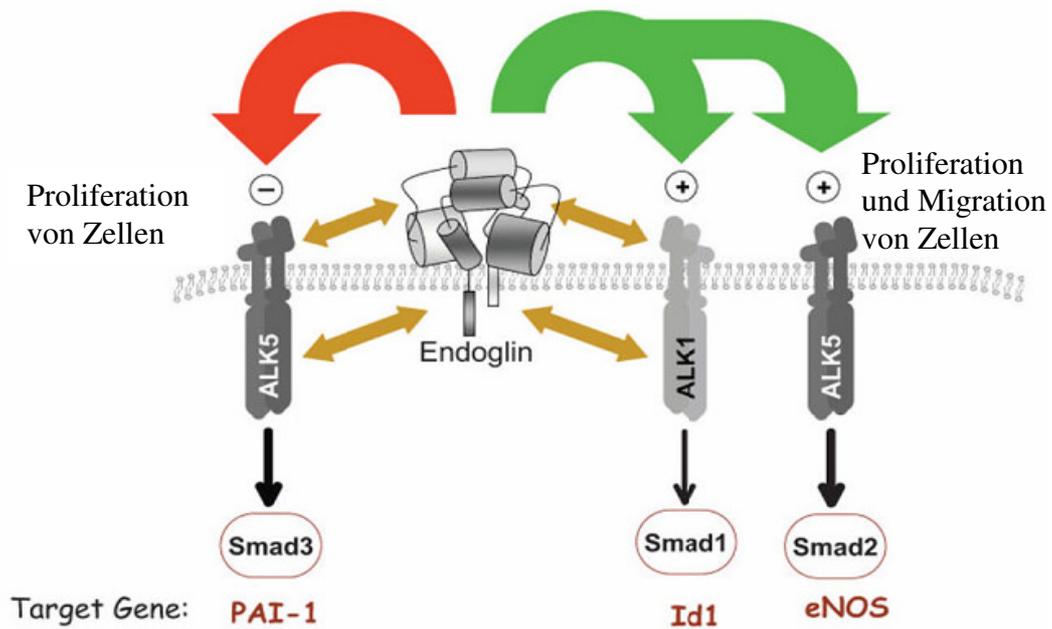


Abb. 1.6.2.2 Hypothetisches Modell für Endoglin in dem TGF- β /Alk1- und TGF- β /Alk5-Signalweg

Dargestellt ist die Interaktion der extrazellulären und der cytoplasmatischen Domäne des Endoglins mit Alk1 und Alk 5. Stimulatorische Effekte wurden mit grünen, inhibitorische Effekte des Endoglins mit roten Pfeilen markiert [Bernabeu et al. 2007].

1.7. Endostatin

1.7.1. Aufbau

Bei Endostatin handelt es sich um einen von O'Reilly 1997 erstmals entdeckten, aus murinen hämangioendothelialen Zellen identifizierten endogenen Faktor, der die Angiogenese hemmt. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass endogene Angiogeneseinhibitoren hauptsächlich proteolytische Spaltprodukte größerer Proteine sind, wie zum Beispiel das Angiostatin als Proteolyseprodukt des Plasminogens.

Endostatin ist ein 20 kDA großes Fragment aus der carboxyterminalen Region des Kollagens XVIII. Je nach Aufbau der Peptidketten existieren verschiedene Varianten des Kollagens.

Bei Kollagen XVIII handelt es sich um eine aus 10 bestehenden, sich wiederholenden Triplehelixes, die unterbrochen werden durch nicht triplehelikale Bereiche [Oh et al. 1994; Rehn et al. 1994]. Dieser Aufbau führte dazu, dass es neben Kollagen XV in die Subfamilie der Multiplexine (multiple triple helix domains and interruptions) eingruppiert wurde.

Kollagen XVIII wird überwiegend in der perivaskulären Basalmembranzzone aufgefunden.

Bestandteil des Kollagens XVIII ist ein aus rund 300 Aminosäuren großer nicht kollagener C-terminaler Bereich.

Diese 38 kDA große C-terminale NC1-Domäne (non-collagenous-domain) des Kollagens XVIII besteht aus 3 Subsegmenten: einer 5 kDa großen N-terminalen Trimerizations-Domäne, einer zentralen Protease-sensitiven Region und aus der 22 kDa großen C-terminalen Domäne Endostatin (s. Abb. 1.7.1.1 u. 1.7.1.2).

Bestehend aus einer zinkbindenden Seite und aus 11 alkalischen Argininresten konnte die Kristallstruktur des Endostatins identifiziert werden.

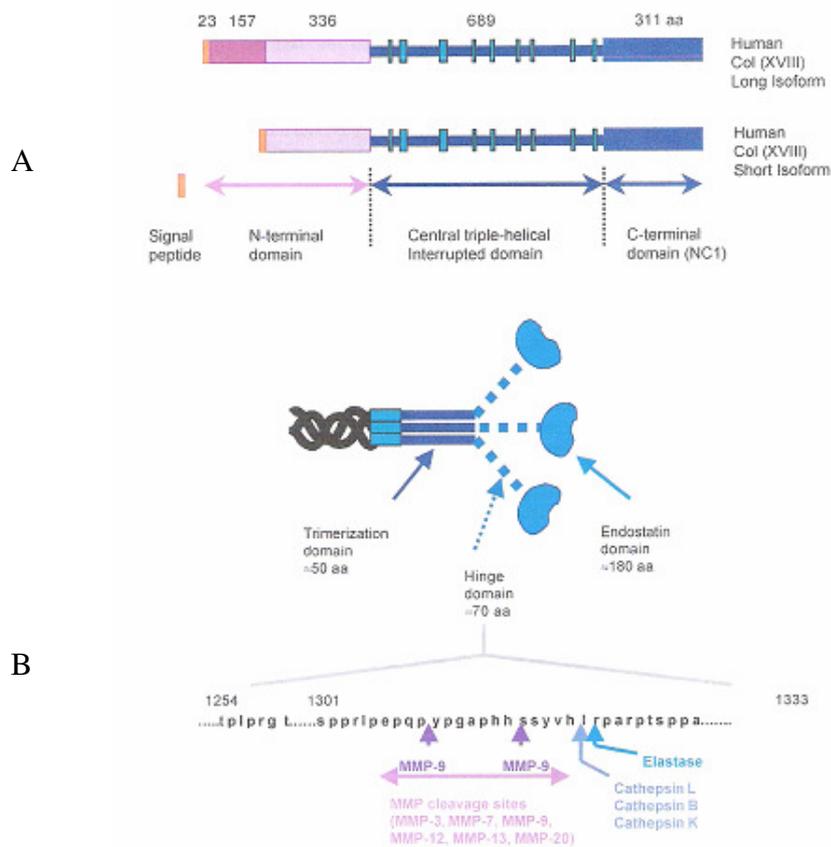


Abb. 1.7.1.1 A: Veranschaulichung der linearen Struktur der $\alpha 1$ -Ketten von Kollagen XV und XVIII mit einer zentralen Tripelhelix, die mehrfache Unterbrechungen aufweist. Aufgrund struktureller Homologie erfolgt die Klassifikation in die Subfamilie der Multiplexine (multiple triple helix domains and interruptions).

B: Darstellung der funktionellen NC-1-Subdomäne des Kollagens XVIII [Ortega et al. 2002]

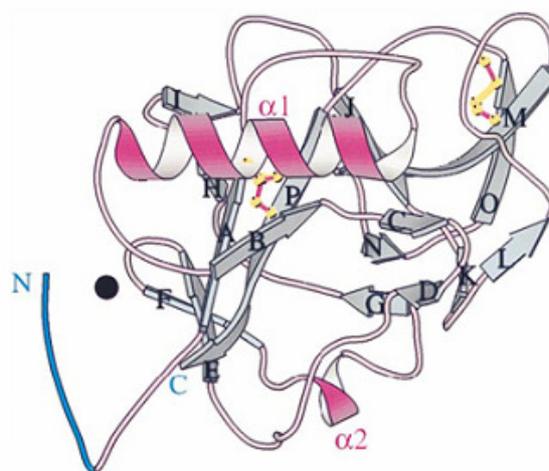


Abb. 1.7.1.2 Dargestellt ist die Struktur des Endostatins: schwarz = β -Stränge mit Bezeichnung von A-P, pink = α -Stränge, gelb = Disulfidbrücken, blau = endständige Stickstoffschleife, schwarzer Kreis = Zink [Ding et al. 1998]

1.7.2. Wirkung

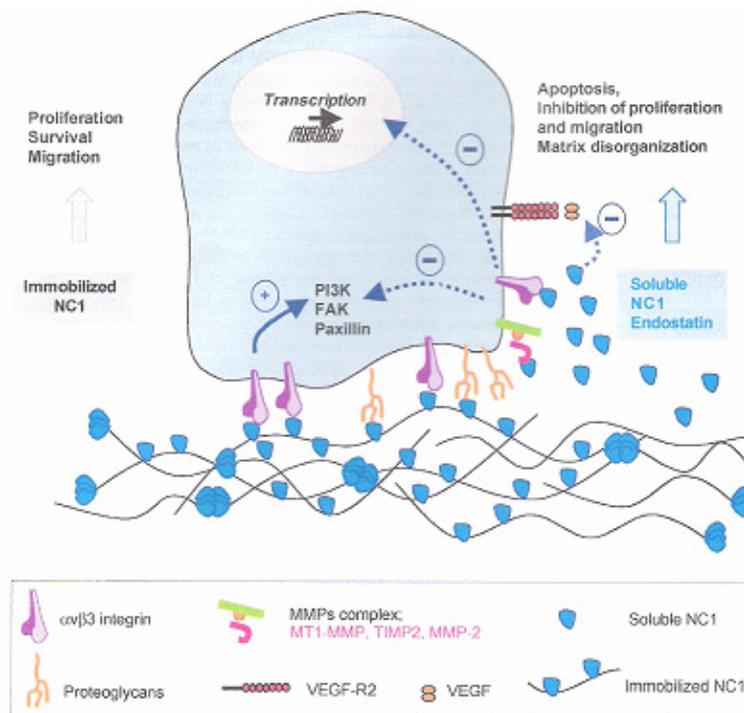


Abb. 1.7.2.1 Darstellung der biologischen Aktivitäten des immobilen und löslichen Endostatins [Ortega et al. 2002]

Es existieren bereits mehrere Mechanismen, über die Endostatin seine Wirkung als Angiogeneseinhibitor entfalten kann. Einige von diesen werden im Folgenden aufgeführt.

Während der Angiogenese werden von endothelialen Zellen proteolytische Enzyme wie Matrixmetalloproteasen (MMPs) und Kathepsin L freigesetzt, die innerhalb der Protease-sensitiven Region der NC1-Domäne des Kollagens XVIII die Peptidbindung spalten. Daraufhin kommt es zur Freisetzung von Endostatinfragmenten.

Ein Vergleich, dargestellt von Ortega et al. 2002, von gebundenen vs. löslichen Endostatinfragmenten zeigt unterschiedliche biologische Aktivitäten (s. Abb. 1.7.2.1). Lösliche Endostatinfragmente vermitteln ihre Wirkung über Bindung an einen Oberflächenrezeptor und verursachen eine verminderte Phosphorylierung von PI3K, FAK und Paxillin und führen somit zu einer Reduktion der Transkription verschiedener Gene. Darüber kommt es zu einer Hemmung der Proliferation und Migration von Zellen und zum programmierten Zelltod, der Apoptose.

Bekannt sind auch mehrere Mechanismen, in denen Endostatin die VEGF (vascular endothelial growth factor) induzierte Einwanderung und Vermehrung endothelialer Zellen hemmt [Kim et al. 2002]:

1. Hemmung der durch VEGF bewirkten Tyrosin-abhängigen Phosphorylierung von KDR/Flk-1 [(kinase insert domain-containing receptor/fetal liver kinase 1) KDR/Flk-1 = Tyrosinkinaserzeptoren, lokalisiert auf endothelialen Zellen, über die VEGF seine Effekte ausübt]
2. Blockierung der VEGF induzierten ERK (extracellular signal-regulated kinase) und p38MAPK (mitogen activated protein kinase) sowie p125FAK (p125-focal adhesion Kinase) Aktivierung
3. Hemmung der VEGF-Bindung an den Zellrezeptor und endotheliale Zellen
4. Direkte Besetzung des VEGF-2-Rezeptors KDR/Flk-1

Eine weitere Inhibition der durch den vaskulären Wachstumsfaktor vermittelten Zellmigration erfolgt durch Dephosphorylierung der endothelialen Stickoxidsynthase (eNOS).

2001 konnte Wickström in seinen Studien präsentieren, dass Endostatin das Urokinase-Plasminogen-Aktivator-System downreguliert. Folglich kommt es nicht zur Bildung des Plasmin und die dadurch verursachte Aktivierung der MMPs (Matrixmetalloproteasen) wird verhindert.

Endostatin kann aber auch direkt in das System der Metalloproteinasen eingreifen.

Hier kann es die proteolytische Aktivität der MMP-2 und die Aktivität des pro-MMP durch Hemmung der Membran-Typ-1-MMP reduzieren. Resultat ist die Blockade der Einwanderung endothelialer Zellen und Tumorzellen [Ortega et al. 2002].

Ein weiterer Mechanismus, die Wanderung endothelialer Zellen zu beeinflussen, ist die Einflussnahme des Angiogeneseinhibitors in das Integrinsystem.

Lösliche Endostatinfragmente hemmen über Bindung an Integrin $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha v\beta 1$ das integrinabhängige Überleben und Einwandern endothelialer Zellen. Immobile Endostatinfragmente fördern den Prozess des Überlebens und Einwanderns [Rehn et al. 2001].

2. Material und Methodik

2.1. Patientinnen

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kohorte von 125 Frauen mit einem Zervixkarzinom betrachtet.

Die Einteilung der Patienten erfolgte gemäß den aktuellen Richtlinien nach dem Grad der Erkrankung in Präkanzerosen CIN I–III, FIGO I–IV-Stadium und Rezidiv-Tumor.

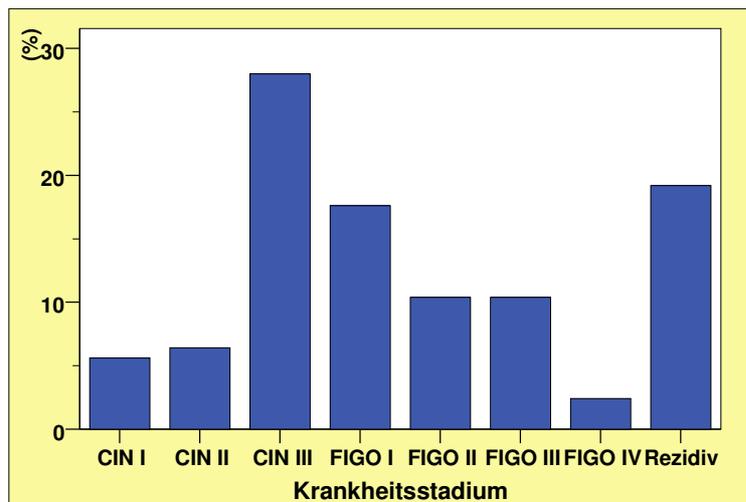


Abb. 2.1.1 Krankheitsstadium

In der Studie wurden im CIN-I-Stadium 7, in CIN-II 8, CIN-III 35, FIGO-I 22, FIGO-II 13, FIGO-III 13, FIGO-IV 3 und bei den Rezidiven 24 Patientinnen erfasst (s. Abb. 2.1.1).

Die Datenermittlung erfolgte überwiegend aus den Krankenakten der Patienten der Frauenklinik Charité, Campus Mitte.

Die Daten des Follow up's, welches in einer Zeitspanne von Juli 2005 bis Dezember 2005 durchgeführt wurde, konnten durch Exploration des Haus- oder behandelnden Facharztes für Gynäkologie per Studienfragebogen aufgenommen werden. Von insgesamt 75 durchgeführten Nachbeobachtungen standen jedoch nur 67 Personen zur Auswertung zur Verfügung.

2.2. Methodik

2.2.1. Probengewinnung

Die Blutentnahme erfolgte bei den Patientinnen jeweils am Tag der stationären Aufnahme per 10 ml Serummonovette.

Nach dem Zentrifugieren wurden die Serumproben in Kryoröhrchen verteilt und bei einer Temperatur von -86°C gelagert.

2.2.2. Theoretisches Prinzip des Sandwich-ELISA (enzyme-linked-immuno-sorbent-assay)

Für die Bestimmung der Konzentrationen von Angiogenin, Endoglin und Endostatin erfolgte die Anwendung des Sandwich-ELISA. Viele ELISAs sind als Sandwichassays konzipiert. Der ELISA ist eine der gebräuchlichsten Assayvarianten.

Die häufigste Anwendung von Immunoassays erfolgt in der Protein- und Hormonbestimmung.

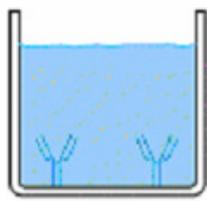
Die meisten Immunoassays sind heterogene Systeme, in denen die Trennung von Antikörper (AK) gebundenen und freien Antigenen erforderlich ist. Realisiert wird dies durch Verwendung von Mikrotiterplatten, die mit einem AK beschichtet sind.

Der Sandwichassay zeichnet sich durch ein Analytmolekül (z.B. Antigen) aus, welches von zwei anderen Bausteinen (z.B. Antikörpern) eingeschlossen wird. Einer dieser Antikörper wird in einer bestimmten Form markiert und der andere immobilisiert, meist in einer vorgefertigten Mikrotiterplatte.

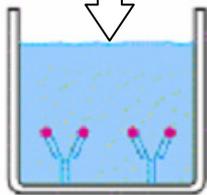
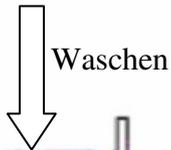
Als Markierungskomponente wird ein Enzym verwendet. Das Enzym ist als Marker an einen Antikörper gekoppelt, der das Antigen nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip bindet. Zuvor erfolgte jedoch die Bindung des Antigens mit dem immobilen, an die Festphase gebundenen Antikörper. Nach Zugabe eines chromogenen Substrates erfolgt eine konzentrationsabhängige Farbreaktion, welche photometrisch quantifiziert wird.

Durch mehrere Waschvorgänge werden lösliche Antigene sowie Antikörper entfernt.

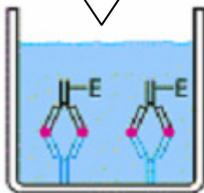
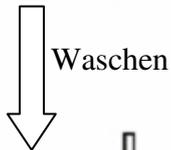
Die einzelnen Schritte werden in folgender Abbildung dargestellt [Berg et al. 2002]:



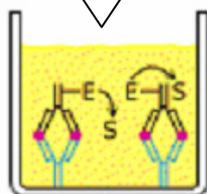
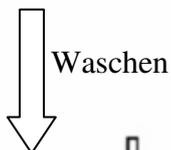
Antikörper sind an der Oberfläche des Reagenzgefäßes der Mikrotiterplatte fest gebunden.



Nach Zugabe des Antigens (das gewonnene Patientenmaterial = roter Punkt) kommt es zur Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes.



Erneute Zugabe eines mit einem Enzym markierten Antikörpers, der an den immobilisierten Antigen-Antikörper-Komplex bindet.



Durch Zugabe eines Substrates kommt es zu einem Farbumschlag. Eine quantitative Auswertung und eine gleichzeitige Aussage über die vorliegende Konzentration der Antigene im Serum werden ermöglicht.

2.2.3.. Quantitative Bestimmung der Parameter

Für die Bestimmungen wurden die Quantikine® Human Angiogenin, Endoglin und Endostatin der Firma R&D Systems mit Sitz in Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland, verwendet.

Folgende Normwerte gibt der Hersteller R&D Systems an:

	Anzahl der Tests	Mean	Range	Sensitivität
Angiogenin	40	360 ng/ml	196–437 ng/ml	0,01ng/ml
Endoglin	60	3,96 ng/ml	2,54–7,06 ng/ml	0,01ng/ml
Endostatin	60	122 ng/ml	58–232 ng/ml	0,02ng/ml

Um zufällige Fehler (Präzision) von Immunoassays zu bestimmen, bedient man sich der Intra- und Interassayvariationskoeffizienten (CV_{intra} und CV_{inter}). Bei zufälligen Fehlern handelt es sich um Abweichungen vom Erwartungswert, die durch Ungenauigkeit beim Pipettieren oder auch durch anderes Handling u.v.a.m. verursacht werden können.

Die Variationskoeffizienten sind Größen, welche die Höhe der relativen Standardabweichung von kalkulierten Analytkonzentrationen kennzeichnen. Diese Größenbestimmung erfolgt, wenn eine Probe mehrmals mit Hilfe **eines** Assays, also einer Kalibrierkurve (Standardkurve), bestimmt (CV_{intra}) oder eine Probe mittels mehrerer Kurven untersucht wird (CV_{inter}).

Unter dem Begriff des Intraassays versteht man also die ca. 20fache Testung von mehreren Proben bekannter, unterschiedlicher Konzentrationen auf **einer** Mikrotiterplatte mit Erstellung einer Kalibrierkurve.

Dahingegen werden bei dem Interassay die 3 Proben mit bekannter, unterschiedlicher Konzentration in ca. 40 getrennten Assays überprüft.

Die Ermittlung des Variationskoeffizienten ergibt sich aus dem Quotienten von Streuung und Mittelwert multipliziert mit 100.

Nachfolgend aufgeführte Werte, bezogen auf den Intra- und Interassay, wurden von der Firma R&D Systems für die Parameter angegeben.

	Intra-Assay			Inter-Assay		
		MW in pg/ml	CV in %		MW in pg/ml	CV in %
Angiogenin	n= 20	356	2,8	n= 20	664	7,1
		717	3,3		1911	8,7
		1739	2,9		3671	8,4
Endostatin	n=20	0,7	6,9	n= 40	0,76	7,9
		2,02	6		2,13	6,1
		4,14	3,6		4,21	5,7
Endoglin	n= 20	0,617	2,8	n= 40	0,659	6,7
		1,67	3,2		1,8	6,5
		3,14	3		3,47	6,3

Gemäß den vorgeschriebenen Durchführungsvorschriften der Firma R&D Systems wurden die Probenlösungen hergestellt.

Die mitgelieferten Mikrotiterplatten waren jeweils mit einem monoklonalen Antikörper der Maus, gegen den jeweiligen Parameter gerichtet, beschichtet.

Pro Patient wurden von Angiogenin 1x10 µl, von Endoglin 2x50 µl und von Endostatin 1x20 µl Serum verwendet. In einem Verhältnis von 1/200 beim Angiogenin und 1/50 beim Endostatin erfolgte die Herstellung einer Verdünnungslösung. Endoglin musste nicht verdünnt werden.

Nach mehreren Inkubations- und Waschschritten erfolgte letztlich die Messung der Absorption der Lösungen bei einer Wellenlänge von 450 nm am Mikrotiterplattenmessgerät 400SF der Firma SLT.

Die gemessene optische Dichte der Standardprobe der Firma R & D Systems wurde den bekannten Konzentrationen zugeordnet. Danach erfolgte die Bestimmung der Konzentration der jeweiligen Patientenprobe. Von allen Proben wurden Doppelbestimmungen erstellt.

Die Berechnung und Auswertung der entsprechenden Werte erfolgte mit dem Programm Synelisa Version 3.2 der Firma Elias aus Freiburg.

2.3. Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe von SPSS für Windows, Version 15.0 (SPSS Inc., U.S.A.) erstellt.

Dabei erfolgte die Darstellung der kontinuierlichen Variablen als Mittelwerte, während als Streumaße die Standardabweichungen gewählt wurden.

Zu Beginn erfolgte die Überprüfung der Verteilungsform von stetigen Zahlen einer Stichprobe, per sogenannte Normalverteilungstests. Der am häufigsten verwendete Normalverteilungstest war der Kolmogorov-Smirnov-Test.

Bestand jedoch nur eine Anzahl von unter 50 Probanden, wurde der Shapiro-Wilk-Test als Normalverteilungstest angewandt.

Eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung bestand bei einem $p < 0,05$. In diesem Fall kam es zur Anwendung von nicht parametrischen Tests für die betreffende Variable. Beispiele für nichtparametrische Tests wären der Mann-Whitney-U-Test bei ≤ 2 unabhängigen, nicht normalverteilten Stichproben und der Kruskal-Wallis-Test bei mehr als 2 unabhängigen, nicht normalverteilten Stichproben.

Bei Stichproben, bei denen eine Normalverteilung vorlag, ergo mit einem $p > 0,05$, wurden Tests wie der t-Test bei 2 unabhängigen oder die einfaktorielle ANOVA bei mehr als 2 unabhängigen Stichproben verwendet. Zur weiteren Differenzierung, welche Parameter der ANOVA sich unterscheiden, wurde bei signifikantem Ergebnis der ANOVA als post-hoc-Test der Bonferroni-Test und in Einzelfällen der LSD-Test (geringste signifikante Differenz) mit multipler t-Testung durchgeführt.

Für kategorisierte Daten kamen die Chi-Quadrat-Tests bzw. der exakte Test nach Fisher zur Anwendung. Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests wurden die erforderlichen Testvoraussetzungen erfüllt, sodass bei allen Tests weniger als 20% der erwarteten Häufigkeit kleiner 5 war. In Einzelfällen, in denen diese Testvoraussetzung nicht gegeben war, erfolgte die Erläuterung jeweils bei der Ergebnisdarstellung.

Die Korrelation zwischen 2 Parametern ergab sich durch Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson bzw. bei nicht normalverteilten Stichproben mittels des Spearman-Rho. Dabei wurden die Korrelationskoeffizienten nach folgender Einteilung bewertet:

$r < 0,2$	sehr geringe Korrelation
$r = 0,2-0,5$	geringe Korrelation
$r = 0,5-0,7$	mittlere Korrelation
$r = 0,7-0,9$	hohe Korrelation
$r = > 0,9$	sehr hohe Korrelation

Bei allen durchgeführten Tests erfolgte eine zweiseitige Signifikanzüberprüfung, wobei für alle statistischen Tests ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant angenommen wurde.

Die Überlebensstatistikdarstellungen erforderten Kaplan-Meier-Analysen. Dabei wurden kontinuierliche Daten durch den Mittelwert kategorisiert, sodass ein Vergleich der Mortalität in den beiden Gruppen erfolgen konnte. Als Testverfahren zum Vergleich der Sterberaten favorisierte sich Log Rank.

In der multivariaten Analyse wurden die Parameter hinsichtlich ihres unabhängigen Einflusses auf die Mortalität durch die Coxregression überprüft. Dabei kamen die Parameter in die Analyse, die sich in der Survivalanalyse als signifikant identifizieren ließen oder bei denen sich zumindest ein deutlicher Trend zeigte.

In den graphischen Darstellungen, ebenfalls per SPSS erstellt, wurden zur Veranschaulichung der Mittelwerte Fehlerbalken verwendet, wobei als Streumaß aufgrund der großen Streubreite die Standardfehler aufgeführt wurden. Die kategorisierten Daten kamen graphisch mit Hilfe von einfachen und gruppierten Balkendiagrammen zur Darstellung. Zur Veranschaulichung des Einflusses der Sensitivität und Spezifität dienten ROC-Kurven.

3. Ergebnisse

3.1. Gibt es signifikante Unterschiede zwischen den Krankheitsstadien beim Zervixkarzinom hinsichtlich der Konzentration der 3 Parameter Endoglin, Endostatin und Angiogenin?

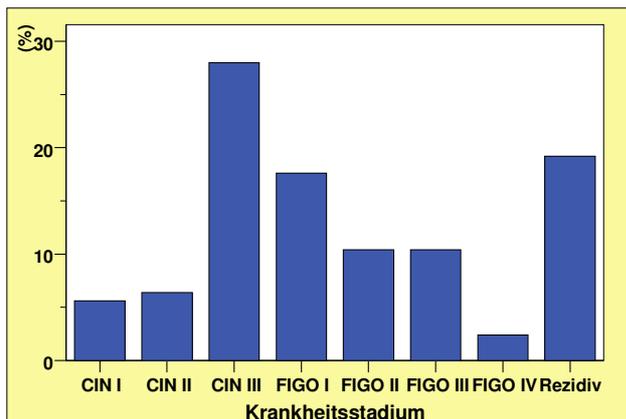


Abb. 3.1.1 Häufigkeit der Krankheitsstadien in Prozent des untersuchten Patientenkollektivs

Tab. 3.1.1 Verteilung der Krankheitsstadien

	Häufigkeit	Prozent
CIN I	7	5,6
CIN II	8	6,4
CIN III	35	28,0
FIGO I	22	17,6
FIGO II	13	10,4
FIGO III	13	10,4
FIGO IV	3	2,4
Rezidiv	24	19,2
Gesamt	125	100,0

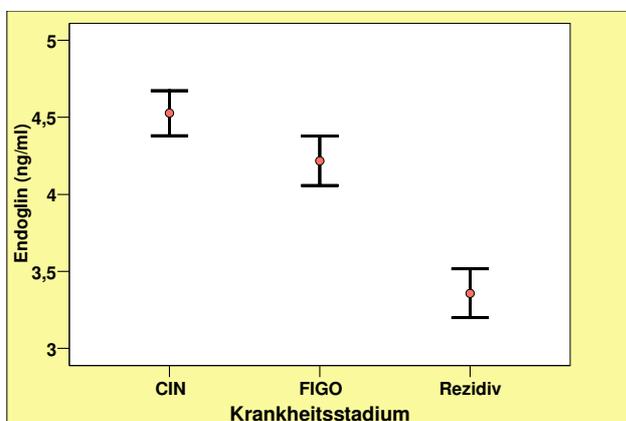


Abb. 3.1.2 Endoglinkonzentration in den verschiedenen Gruppen

Tab. 3.1.2 Endoglinkonzentration in den verschiedenen Gruppen

Krankheitsstadium	Mittelwert in ng/ml	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Median	N
CIN	4,5268	1,02676	,14521	4,3850	50
FIGO	4,2176	1,14979	,16100	4,0600	51
Rezidiv	3,3575	,77695	,15859	3,1900	24
Insgesamt	4,1762	1,11429	,09966	4,0600	125

Die höchsten Endoglin-Konzentrationen wurden bei Patientinnen mit dem Stadium CIN nachgewiesen, während die niedrigsten bei Rezidiven gemessen wurden (Abb. u. Tab. 3.1.2). Hinsichtlich dieser Unterschiede bestand im Gesamtvergleich eine statistische Signifikanz (ANOVA, $p < 0,001$), wobei für die Einzelanalysen im Bonferroni-Test beim Vergleich CIN vs. Rezidiv und FIGO vs. Rezidiv signifikante Unterschiede berechnet wurden ($p < 0,001$ bzw. $p = 0,003$).

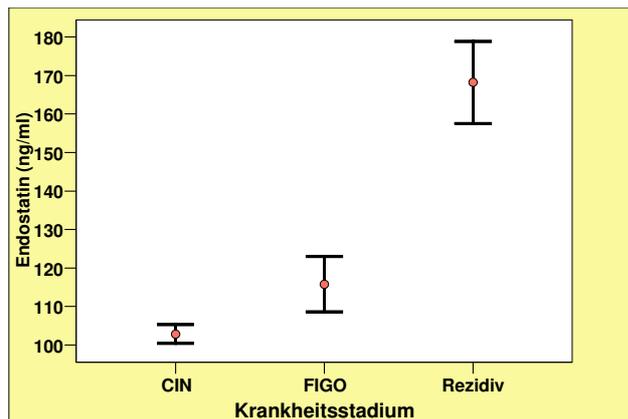


Abb. 3.1.3 Endostatinkonzentration in den verschiedenen Gruppen

Tab. 3.1.3 Endostatinkonzentration in den verschiedenen Gruppen

Krankheitsstadium	Mittelwert in ng/ml	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Median	N
CIN	102,834	17,2897	2,4451	100,950	50
FIGO	115,794	51,1074	7,1565	108,000	51
Rezidiv	168,200	52,2165	10,6586	153,500	24
Insgesamt	120,672	47,4591	4,2449	109,000	125

Die höchsten Konzentrationen von Endostatin wurden bei Frauen mit Rezidiven gemessen, wohingegen man die geringsten bei CIN-Stadien registrierte (Abb. u. Tab. 3.1.3).

Zwischen den Gruppen zeigte sich im Kruskal-Wallis-Test ein signifikanter Unterschied von $p < 0,001$, sodass nachfolgend Subanalysen erfolgten.

Im Mann-Whitney-U-Test konnten signifikante Unterschiede bei CIN vs. Rezidiv mit einem p-Wert von $p < 0,001$ und bei FIGO vs. Rezidiv $p < 0,001$ festgestellt werden.

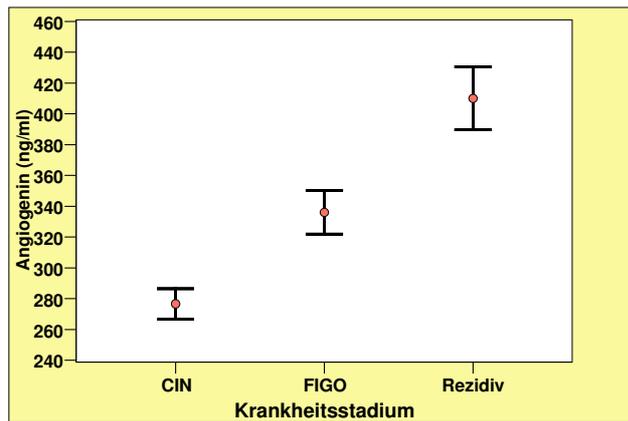


Abb. 3.1.4 Angiogenin in den verschiedenen Gruppen

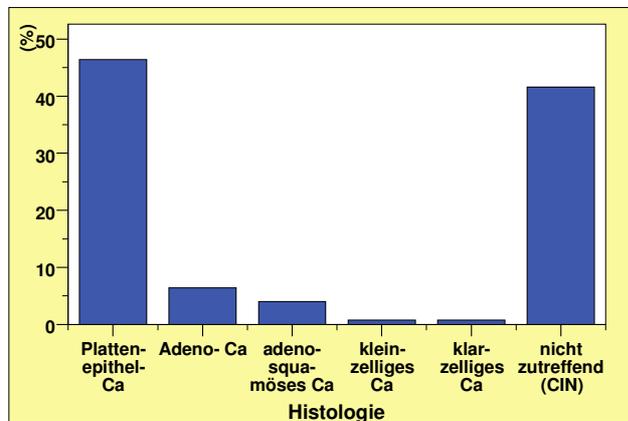
Tab. 3.1.4 Angiogenin in den verschiedenen Stadien

Krankheitsstadium	Mittelwert in ng/ml	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Median	N
CIN	276,66	69,563	9,838	271,50	50
FIGO	336,08	101,662	14,235	333,00	51
Rezidiv	410,13	100,008	20,414	407,00	24
Insgesamt	326,53	101,625	9,090	308,00	125

Bei der Untersuchung von Angiogenin in verschiedenen Krankheitsstadien zeigten sich, ähnlich wie beim Endostatin, die höchsten Konzentrationen bei Rezidivpatientinnen, die geringsten bei Frauen im CIN-Stadium (Abb. u. Tab. 3.1.4). In der Gesamtheit ergab sich ein signifikanter Unterschied von $p < 0,001$ in der ANOVA. Subanalysen mittels des Bonferroni-Tests präsentierten Signifikanz zwischen allen Gruppen, ergo CIN vs. FIGO $p = 0,004$, CIN vs. Rezidiv $p < 0,001$ und FIGO vs. Rezidiv $p = 0,003$.

3.2. Vergleich der 3 Tumormarker bei den verschiedenen histologischen Befunden

Tab. 3.2.1 Histologie in den verschiedenen Gruppen



Histologie	Häufigkeit	Prozent
Plattenepithel- Ca	58	46,4
Adeno- Ca	8	6,4
adenosquamöses Ca	5	4,0
kleinzelliges Ca	1	,8
klarzelliges Ca	1	,8
nicht zutreffend (CIN)	52	41,6
Gesamt	125	100,0

Abb. 3.2.1 Häufigkeit von histologischen Befunden beim Patientengut

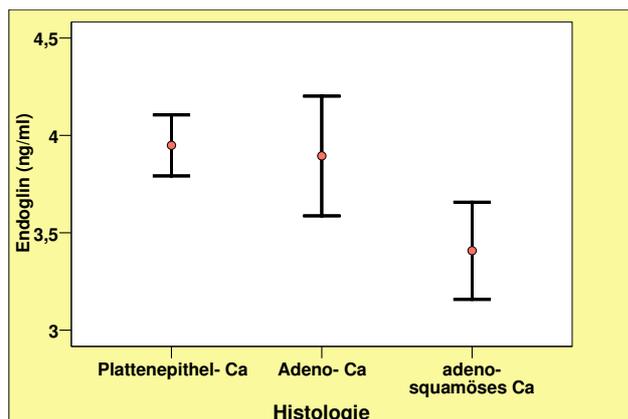


Abb. 3.2.2 Endoglin bei mikroskopisch unterschiedlichen Karzinomarten

Tab. 3.2.2 Endoglin bei histologisch unterschiedlichen Zellstrukturen

Histologie	Mittelwert in ng/ml	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Median	N
Plattenepithel- Ca	3,9495	1,19344	,15671	3,8950	58
Adeno- Ca	3,8950	,86864	,30711	3,7950	8
adenosquamöses Ca	3,4080	,55859	,24981	3,3900	5
Insgesamt	4,1762	1,11429	,09966	4,0600	71

Verglichen wurden die Konzentrationen von Endoglin beim Plattenepithel-, beim Adenokarzinom und beim adenosquamösen Karzinom: Hier zeigte sich die höchste Konzentration von Endoglin beim Plattenepithelkarzinom (Abb. u. Tab. 3.2.2).

Das klarzellige Ca, das kleinzellige Ca sowie die CIN-Stadien wurden bei der Testung nicht mit eingeschlossen.

Im Gesamtvergleich zwischen den 3 Histologien konnte jedoch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Endoglin-Konzentration gemessen werden (ANOVA, $p=0,595$).

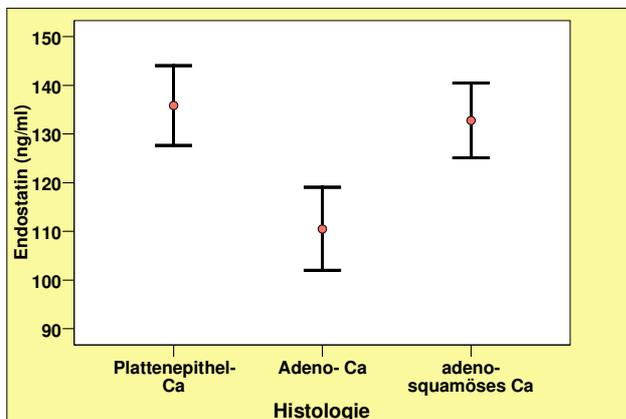


Abb. 3.2.3 Endostatin bei verschiedenen Karzinomen

Tab. 3.2.3 Endostatin beim Plattenepithel-, Adeno- und adenosquamösen Karzinom

Histologie	Mittelwert in ng/ml	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Median	N
Plattenepithel- Ca	135,852	62,4929	8,2057	122,000	58
Adeno- Ca	110,513	24,1116	8,5247	116,000	8
adenosquamöses Ca	132,800	17,1523	7,6707	125,000	5
Insgesamt	120,672	47,4591	4,2449	109,000	71

Beim Endostatin zeigte sich die höchste Konzentration beim Plattenepithelkarzinom (Abb. u. Tab. 3.2.3). Das klarzellige Ca, das kleinzellige Ca als auch die CIN-Stadien wurden bei der Berechnung ausgelassen.

Zwischen den 3 Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Endostatin-Konzentration (Kruskal-Wallis-Test; $p=0,37$).

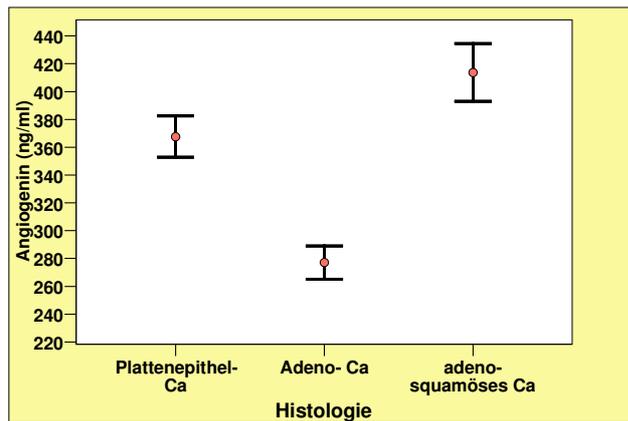


Abb. 3.2.4 Angiogeninkonzentration in Abhängigkeit vom Zelltyp

Tab. 3.2.4 Angiogenin bei verschiedenen Karzinomen

Histologie	Mittelwert in ng/ml	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Median	N
Plattenepithel- Ca	367,60	112,579	14,782	367,50	58
Adeno- Ca	277,13	33,943	12,001	276,00	8
adenosquamöses Ca	413,80	46,473	20,783	416,00	5
Insgesamt	326,53	101,625	9,090	308,00	71

Vergleich der Histologien – Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom und adenosquamöses Karzinom – hinsichtlich der Konzentrationen von Angiogenin:

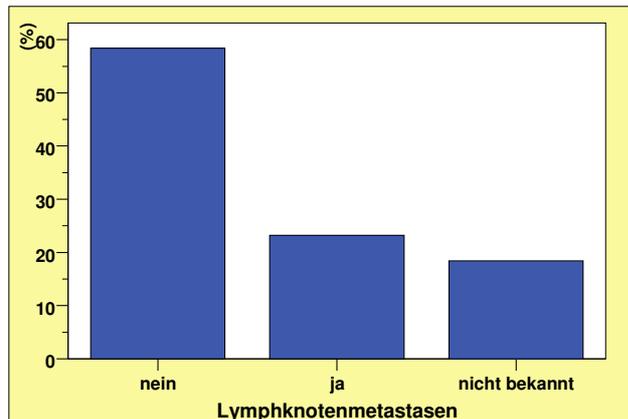
Die höchste Konzentration von Angiogenin wurde beim adenosquamösen Karzinom gemessen (Abb. u. Tab. 3.2.4).

Im Vergleich der Gesamtheit (N=71) konnte in der ANOVA ein signifikanter Unterschied von $p=0,041$ verzeichnet werden.

Einzelvergleiche mittels des LSD-Testes ergaben Signifikanzen lediglich beim Plattenepithel-Ca vs. Adeno-Ca $p=0,024$ und beim Adeno-Ca vs. adenosquamösen Ca $p=0,025$.

3.3. Vergleich der 3 Tumormarkerkonzentrationen bei unterschiedlichen Prognosefaktoren: N (Lymphknotenmetastasen), L (Invasion der Lymphgefäße mit Tumorzellen), V (Veneninvasion) und G (Grad der Tumordifferenzierung)

Tab. 3.3.1 Lymphknotenmetastasen im Gesamtkollektiv



	Häufigkeit	Prozent
nein	73	58,4
ja	29	23,2
nicht bekannt	23	18,4
Gesamt	125	100,0

Abb. 3.3.1 Lymphknotenmetastasen im Gesamtkollektiv

Dargestellt ist die Verteilung der Lymphknotenmetastasen im Gesamtkollektiv (n=125), wobei in der Subgruppe Lymphknotenmetastasen „nein“ die Patientinnen im CIN I-III Stadium mit eingeschlossen wurden (Abb. u. Tab. 3.3.1).

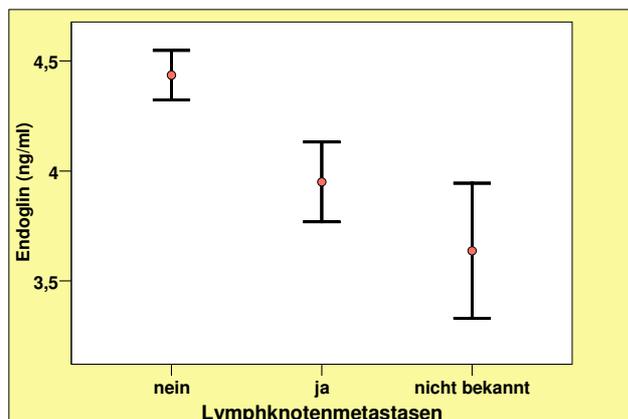


Abb. 3.3.2 Endoglin in Abhängigkeit vom Lymphknotenmetastasenbefall

Tab. 3.3.2 Endoglin beim Karzinom ohne oder mit Lymphknotenmetastasen

Lymphknotenmetastasen	Mittelwert in ng/ml	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Median	N
nein	4,4355	,96188	,11258	4,3500	73
ja	3,9507	,97705	,18143	3,9700	29
nicht bekannt	3,6374	1,47029	,30658	3,3900	23
Insgesamt	4,1762	1,11429	,09966	4,0600	125

Darstellung der Konzentrationen von Endoglin bei Patienten mit und ohne Lymphknotenmetastasen sowie bei Patientinnen, deren N-Status nicht bekannt war: Es zeigte sich, dass die höchste Konzentration bei Frauen ohne Lymphknotenmetastasen zu finden war (Abb. u. Tab. 3.3.2).

Aufgrund der Unterschiede in der Gesamtheit konnte in der ANOVA eine Signifikanz von $p=0,004$ ermittelt werden. In den Subanalysen, die mittels des Bonferroni-Tests durchgeführt wurden, war ein signifikanter Unterschied nur zwischen Lymphknotenmetastasen „nein“ vs. Lymphknotenmetastasen „unbekannt“ von $p=0.007$ zu verzeichnen.

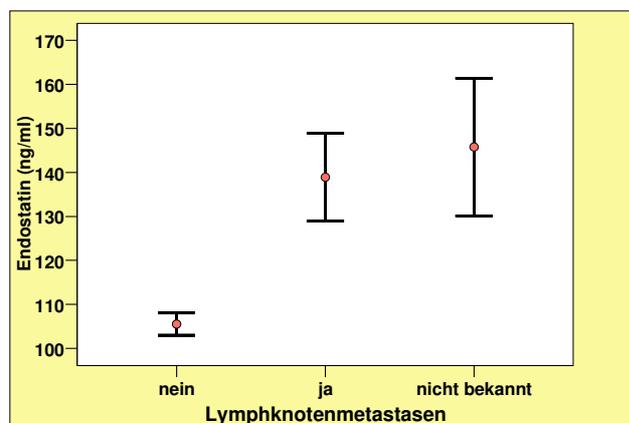


Abb. 3.3.3. Endostatin in Bezug zum Lymphknotenmetastasenbefall

Tab. 3.3.3 Endostatin in Bezug zum Lymphknotenmetastasenbefall

Lymphknotenmetastasen	Mittelwert in ng/ml	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Median	N
nein	105,532	21,7895	2,5503	102,000	73
ja	138,900	53,6412	9,9609	122,000	29
nicht bekannt	145,743	74,9897	15,6364	132,000	23
Insgesamt	120,672	47,4591	4,2449	109,000	125

Betrachtet wurden die Konzentrationen von Endostatin bei Frauen mit, ohne und nicht bekanntem N-Status der TNM-Klassifikation. Die niedrigste Konzentration konnte bei Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen ermittelt werden (Abb. u. Tab. 3.3.3).

Aufgrund von mehr als 2 unabhängigen, nicht normalverteilten Stichproben wurde der H-Test nach Kruskal-Wallis-Test verwendet. Hier stellte sich eine Signifikanz von $p<0,001$ dar. In den Einzelanalysen, die mittels Mann-Whitney-U-Test durchgeführt wurden, bestanden signifikante Unterschiede bei Lymphknotenmetastasen „nein“ vs. Lymphknotenmetastasen „ja“ mit $p=0,002$ und bei Lymphknotenmetastasen „nein“ vs. unbekanntem N-Status mit $p<0,001$.

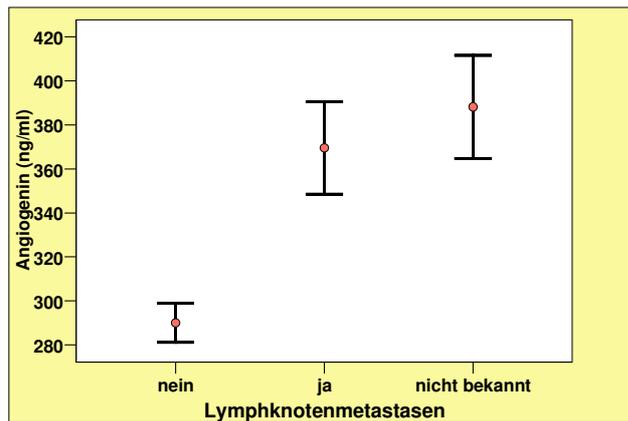


Abb. 3.3.4 Angiogenin in Relation zum Lymphknotenmetastasenbefall

Tab. 3.3.4 Angiogenin mit und ohne Lymphknotenmetastasen

Lymphknotenmetastasen	Mittelwert in ng/ml	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Median	N
nein	290,00	75,210	8,803	276,00	73
ja	369,59	113,168	21,015	356,00	29
nicht bekannt	388,17	112,040	23,362	382,00	23
Insgesamt	326,53	101,625	9,090	308,00	125

Dargestellt ist der Vergleich der Werte bei Patientinnen „mit“ vs. „ohne“ vs. nicht bekannte Lymphknotenmetastasenbeteiligung: Deutlich hohe Angiogeninkonzentrationen wurden bei Frauen mit Befall der Lymphknoten festgestellt (Abb. u. Tab. 3.3.4).

In der Gesamtanalyse zeigte sich eine Signifikanz von $p < 0,001$ in der ANOVA.

Im Bonferroni-Test konnten bei den Subanalysen signifikante Werte bei Patientinnen mit vs. ohne Lymphknotenmetastasen ($p < 0,001$) und bei keinem vs. nicht bekannten Lymphknotenbefall ($p < 0,001$) festgestellt werden.

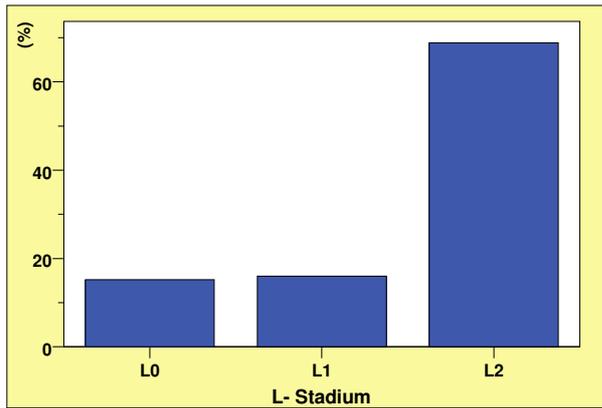


Abb. 3.3.5 L- Stadium im Gesamtkollektiv

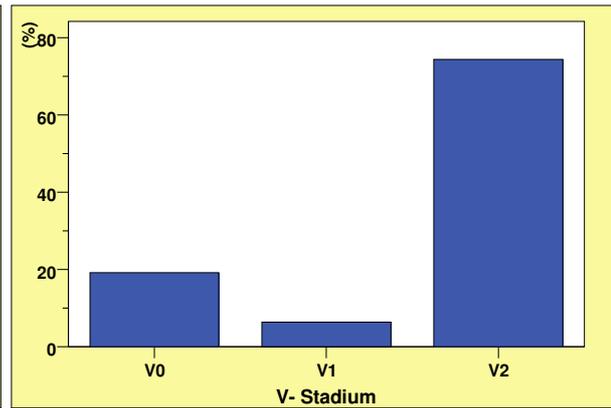


Abb. 3.3.6 V- Stadium im Gesamtkollektiv

Tab. 3.3.5 L- Stadien im Gesamtkollektiv

	Häufigkeit	Prozent	Kumulierte Prozen-te
L0	19	15,2	15,2
L1	20	16,0	31,2
L2	86	68,8	100,0
Gesamt	125	100,0	

Tab. 3.3.6 V- Stadien im Gesamtkollektiv

	Häufigkeit	Prozent	Kumulierte Prozen-te
V0	24	19,2	19,2
V1	8	6,4	25,6
V2	93	74,4	100,0
Gesamt	125	100,0	

Gezeigt wird die Verteilung bei 125 Patientinnen hinsichtlich der Invasion von Metastasen in Lymphgefäße und Venen (Abb. u. Tab. 3.3.5-3.3.6). L0/V0 bedeuten Patientinnen ohne, L1/V1 Frauen mit und L2/V2 Klientel mit nicht bekannter oder nicht zutreffender Streuung von Metastasen in Lymphgefäße/Venen, ergo CIN-Stadien.

Ein Vergleich der Endoglin-, Endostatin- und Angiogeninkonzentrationen in Bezug auf den L-/V-Status ergab keine signifikanten Unterschiede (Abb. u. Tab. 3.3.7-3.3.12).

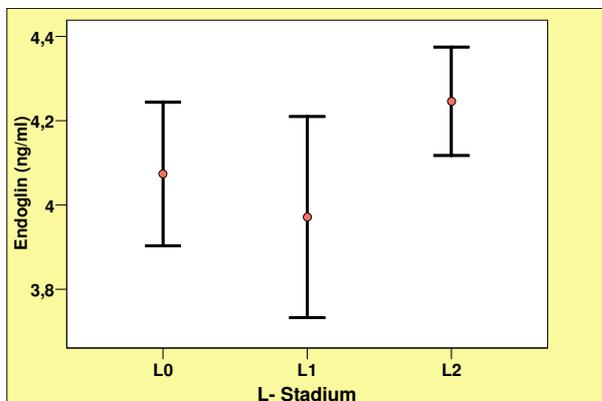


Abb. 3.3.7 Endoglin in verschiedenen L-Stadien (ANOVA, p=0,560)

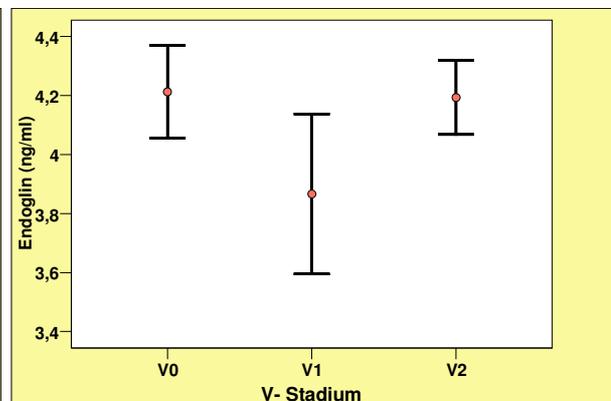


Abb. 3.3.8 Endoglin in verschiedenen V-Stadien (ANOVA, p=0,720)

Tab. 3.3.7 Endoglinkonzentration in verschiedenen L-Stadien

L	Mittelwert in ng/ml	Standard- abweichung	Standard- fehler des Mittelwertes	Median	N
L0	4,0742	,74550	,17103	3,8200	19
L1	3,9715	1,06637	,23845	4,0500	20
L2	4,2463	1,19260	,12860	4,0900	86
Insgesamt	4,1762	1,11429	,09966	4,0600	125

Tab. 3.3.8 Endoglinkonzentration in verschiedenen V-Stadien

V	Mittelwert in ng/ml	Standard- abweichung	Standard- fehler des Mittelwertes	Median	N
V0	4,2125	,77091	,15736	4,1250	24
V1	3,8663	,76675	,27109	3,9600	8
V2	4,1934	1,21293	,12578	4,0600	93
Insgesamt	4,1762	1,11429	,09966	4,0600	125

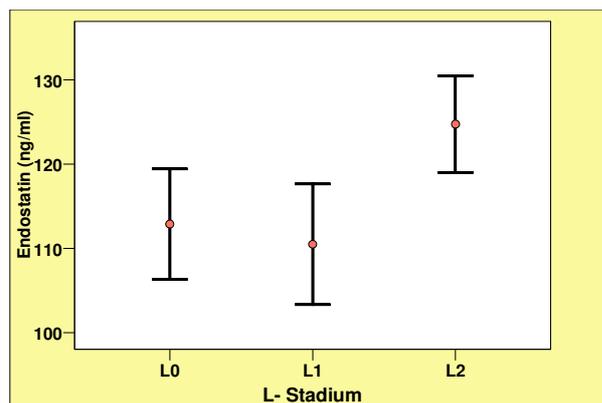


Abb. 3.3.9 Endostatin in verschiedenen L-Stadien (Kruskal-Wallis-Test, p=0,501)

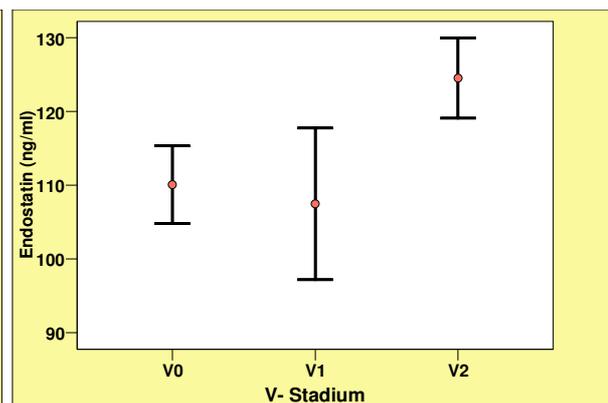


Abb. 3.3.10 Endostatin in verschiedenen V-Stadien (Kruskal-Wallis-Test, p=0,470)

Tab. 3.3.9 Endostatin in verschiedenen L-Stadien

L	Mittelwert in ng/ml	Standard- abweichung	Standard- fehler des Mittelwertes	Median	N
L0	112,895	28,5311	6,5455	108,000	19
L1	110,505	32,0683	7,1707	99,350	20
L2	124,755	53,1869	5,7353	111,500	86
Insgesamt	120,672	47,4591	4,2449	109,000	125

Tab. 3.3.10 Endostatin in verschiedenen V-Stadien

V	Mittelwert in ng/ml	Standard- abweichung	Standard- fehler des Mittelwertes	Median	N
V0	110,088	25,8184	5,2701	103,450	24
V1	107,488	29,1200	10,2955	106,900	8
V2	124,538	52,3945	5,4331	112,000	93
Insgesamt	120,672	47,4591	4,2449	109,000	125

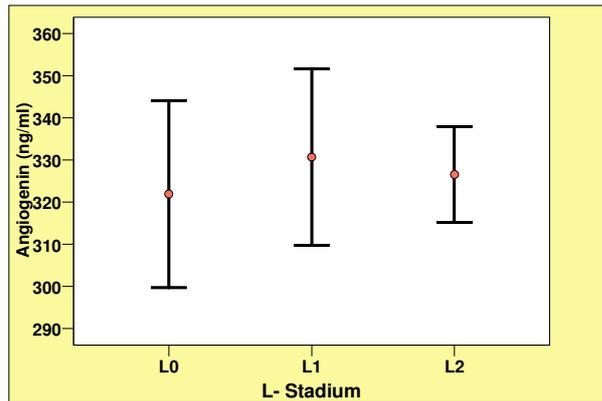


Abb. 3.3.11 Angiogenin in verschiedenen L-Stadien (ANOVA, $p=0,965$)

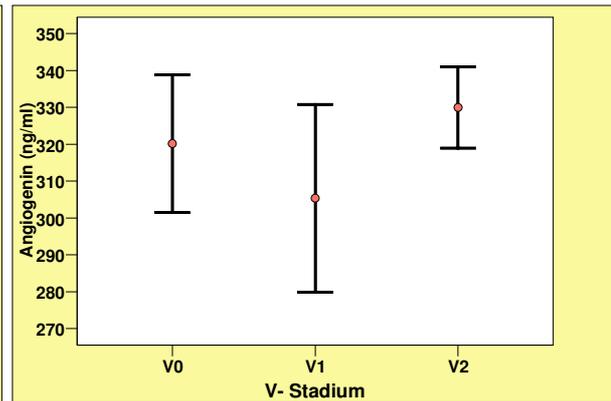


Abb. 3.3.12 Angiogenin in verschiedenen V-Stadien (ANOVA, $p=0,763$)

Tab. 3.3.11 Angiogeninkonzentration in verschiedenen L-Stadien

L	Mittelwert in ng/ml	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Median	N
L0	321,95	96,759	22,198	315,00	19
L1	330,70	93,644	20,939	306,00	20
L2	326,57	105,425	11,368	307,50	86
Insgesamt	326,53	101,625	9,090	308,00	125

Tab. 3.3.12 Angiogeninkonzentration in verschiedenen V-Stadien

V	Mittelwert in ng/ml	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Median	N
V0	320,17	91,581	18,694	312,00	24
V1	305,38	71,938	25,434	295,50	8
V2	329,99	106,619	11,056	308,00	93
Insgesamt	326,53	101,625	9,090	308,00	125

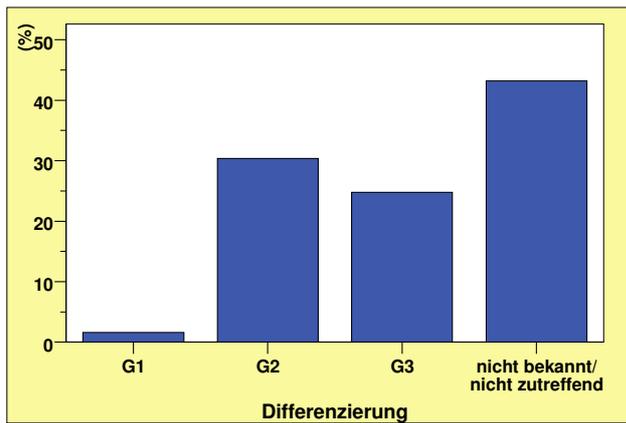


Abb. 3.3.13 Differenzierung im Gesamtkollektiv

Tab. 3.3.13 Verteilung der Tumorgrade im Gesamtkollektiv

		Häufigkeit	Prozent	Kumulierte Prozente
Gültig	G1	2	1,6	1,6
	G2	38	30,4	32,0
	G3	31	24,8	56,8
	nicht bekannt/ nicht zutreffend	54	43,2	100,0
	Gesamt	125	100,0	

Die Häufigkeit unterschiedlicher Schweregrade des Tumors beim Gesamtklientel wird dargestellt (Abb. u. Tab. 3.3.13). In der Gruppe „nicht bekannt/nicht zutreffend“ sind 50 CIN-Patientinnen enthalten.

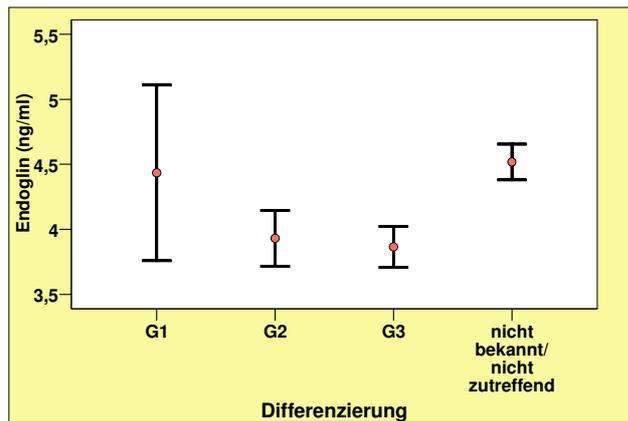


Abb. 3.3.14 Endoglin bei verschiedenem Grading

Tab. 3.3.14 Endoglin bei verschiedenem Grading

Differenzierung	Mittelwert in ng/ml	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Median	N
G1	4,4350	,95459	,67500	4,4350	2
G2	3,9308	1,32314	,21464	3,9950	38
G3	3,8648	,86991	,15624	3,8000	31
nicht bekannt/ nicht zutreffend	4,5180	1,00788	,13715	4,3550	54
Insgesamt	4,1762	1,11429	,09966	4,0600	125

Im Vergleich der Tumorgrade zeigten sich die höchsten Endoglinkonzentrationen bei Patienten mit nicht bekanntem bzw. nicht zutreffendem Grad der Differenzierung, wobei dieser Gruppe 50 Patientinnen mit einem CIN-Stadium angehörten (Abb. u. Tab. 3.3.14).

Hinsichtlich der Unterschiede in der Gesamtheit konnte in der ANOVA eine Signifikanz von $p=0,022$ ermittelt werden. In den Subanalysen, die mittels des Bonferroni-Tests durchgeführt wurden, stellten sich nur grenzwertige Signifikanzen bei den Vergleichen „unbekannt/nicht zutreffend“ vs. G2 ($p=0,71$) und „unbekannt/nicht zutreffend“ vs. G3 ($p=0,51$) dar.

Aufgrund dieses Ergebnisses entschieden wir uns für die Durchführung des LSD-Testes, wo bezüglich der Gruppen „unbekannt/nicht zutreffend“ vs. G2 und „unbekannt/nicht zutreffend“ vs. G3 signifikante Werte von $p=0,012$ bzw. $p=0,009$ ermittelt wurden.

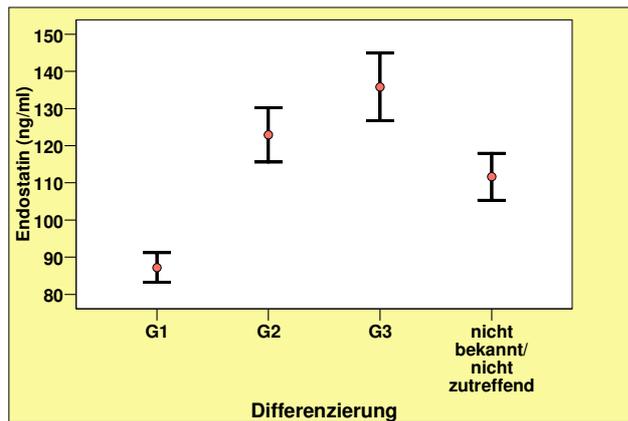


Abb. 3.3.15 Endostatin bei verschiedenem Grading

Tab. 3.3.15 Endostatin bei verschiedenem Grading

Differenzierung	Mittelwert in ng/ml	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Median	N
G1	87,200	5,6569	4,0000	87,200	2
G2	122,939	45,0800	7,3129	115,500	38
G3	135,781	50,6597	9,0988	122,000	31
nicht bekannt/ nicht zutreffend	111,643	46,2076	6,2881	103,500	54
Insgesamt	120,672	47,4591	4,2449	109,000	125

Bei der Konzentrationsermittlung von Endostatin bezüglich der Differenzierung des Tumors fand man die höchsten Konzentrationen bei Patientinnen mit dem am schlechtesten differenzierten Tumor (Abb. u. Tab. 3.3.15).

Zum Vergleich der Unterschiede im Gesamtklientel wurde der Kruskal-Wallis-Test benutzt. Hier zeigte sich eine Signifikanz von $p=0,006$.

In den Einzeltestungen, die mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt wurden, bestanden signifikante Werte jedoch nur zwischen den Gruppen G1 vs. G3 mit einem Wert von $p=0,029$ und zwischen G3 vs. unbekanntes/nicht zutreffendes Grading von $p=0,001$.

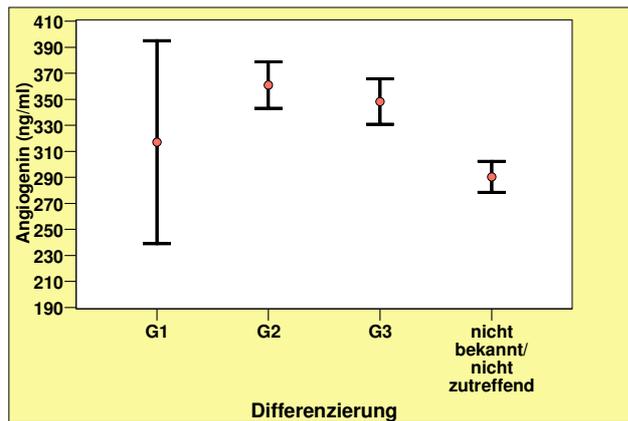


Abb. 3.3.16 Angiogenin bei verschiedenem Grading

Tab. 3.3.16 Angiogenin bei verschiedenem Grading

Differenzierung	Mittelwert in ng/ml	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Median	N
G1	317,00	110,309	78,000	317,00	2
G2	360,84	110,564	17,936	351,00	38
G3	348,13	96,653	17,359	336,00	31
nicht bekannt/nicht zutreffend	290,33	87,498	11,907	275,50	54
Insgesamt	326,53	101,625	9,090	308,00	125

Dargestellt ist die Verteilung der Konzentrationen von Angiogenin in den 3 Differenzierungsgraden des Tumors (G1–G3) und bei Patientinnen, bei denen das Grading nicht bekannt bzw. nicht zutreffend war (CIN-Stadien).

Die höchsten Konzentrationen wurden bei Patientinnen im G2-Stadium nachgewiesen (Abb. u. Tab. 3.3.16).

Aufgrund der Unterschiede ergab sich in der ANOVA ein signifikanter Wert von $p=0,005$.

Die im Anschluss durchgeführten Subanalysen zeigten eine signifikante Differenz zwischen G2 vs. unbekannt/nicht zutreffend (Bonferroni-Test, $p=0,005$) und einen grenzwertigen Unterschied zwischen G3 vs. unbekannt/nicht zutreffend mit einem p -Wert von $p=0,058$.

**3.4. Gibt es signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen FIGO-Stadien, also entsprechend der Ausprägung des Tumors?
(Ausgenommen sind die CIN-Stadien und Rezidive.)**

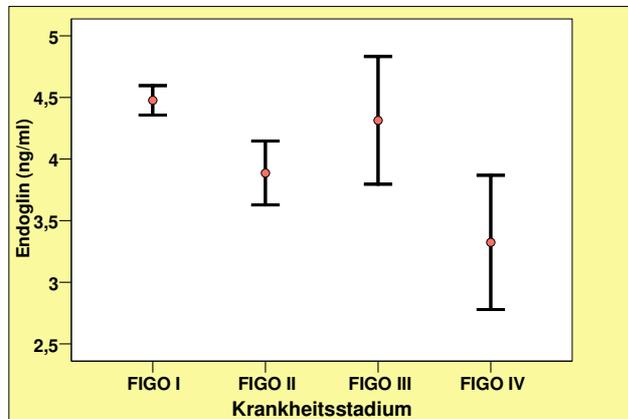


Abb. 3.4.1 Endoglin bei verschiedenen FIGO-Stadien

Tab. 3.4.1 Endoglin bei verschiedenen FIGO-Stadien

Krankheitsstadium	Mittelwert in ng/ml	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Median	N
FIGO I	4,4777	,55953	,11929	4,5200	22
FIGO II	3,8869	,93449	,25918	3,6900	13
FIGO III	4,3146	1,86718	,51786	4,0500	13
FIGO IV	3,3233	,94320	,54456	3,7000	3
Insgesamt	4,2176	1,14979	,16100	4,0600	51

Im FIGO-I-Stadium konnten die höchsten Endoglin-Konzentrationen gemessen werden, die geringsten im FIGO-IV-Stadium (Abb. u. Tab. 3.4.1).

Trotz der Unterschiede in den Stadien konnte keine statistische Signifikanz ermittelt werden (ANOVA, $p=0,254$).

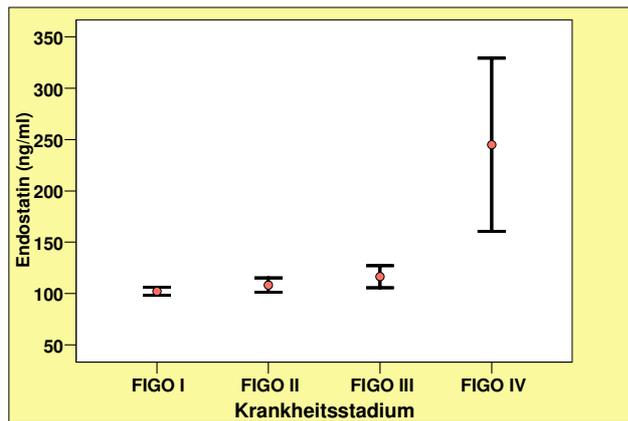


Abb. 3.4.2 Endostatin bei verschiedenen FIGO-Stadien

Tab. 3.4.2 Endostatin bei verschiedenen FIGO-Stadien

Krankheitsstadium	Mittelwert in ng/ml	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Median	N
FIGO I	102,209	18,8383	4,0163	96,850	22
FIGO II	108,308	25,3753	7,0378	96,000	13
FIGO III	116,454	38,7899	10,7584	122,000	13
FIGO IV	245,000	145,7498	84,1487	219,000	3
Insgesamt	115,794	51,1074	7,1565	108,000	51

Dargestellt werden die unterschiedlichen Konzentrationen von Endostatin bezüglich der FIGO-Stadien I–IV (Abb. u. Tab. 3.4.2).

Die deutlich höchsten Konzentrationen fanden sich bei Frauen mit FIGO IV, also mit einem Tumor, der bereits Blase und Rektum infiltriert oder bereits Fernmetastasen gesetzt hat.

Hinsichtlich der Konzentrationshöhen innerhalb der Gruppen besteht ein deutlicher Trend zum ausgeprägtesten Tumorgeschehen, jedoch konnte im Kruskal-Wallis-Test lediglich eine grenzwertige Signifikanz von $p=0,069$ ermittelt werden.

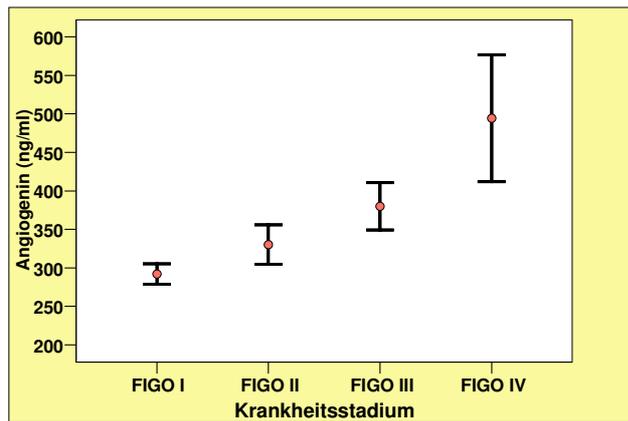


Abb. 3.4.3 Angiogenin bei verschiedenen FIGO-Stadien

Tab. 3.4.3 Angiogenin bei verschiedenen FIGO-Stadien

Krankheitsstadium	Mittelwert in ng/ml	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Median	N
FIGO I	292,05	63,007	13,433	277,50	22
FIGO II	330,23	92,188	25,568	333,00	13
FIGO III	379,92	110,870	30,750	396,00	13
FIGO IV	494,33	142,606	82,333	542,00	3
Insgesamt	336,08	101,662	14,235	333,00	51

Bei den Konzentrationen von Angiogenin fanden sich bezüglich der FIGO-Stadien, genau wie beim Endostatin, die höchsten Konzentrationen im fortgeschrittensten Stadium IV der FIGO-Klassifikation (Abb. u. Tab. 3.4.3).

Aufgrund der Unterschiede in der Gesamtanalyse ergab sich ein signifikanter Wert in der ANOVA von $p=0,001$.

Die Subanalysen innerhalb der Gruppen FIGO wiesen signifikante Differenzen auf zwischen FIGO I vs. FIGO III (Bonferroni-Test, $p=0,042$), FIGO I vs. FIGO IV mit einem p-Wert von $p=0,004$ und FIGO II vs. FIGO IV ($p=0,036$).

Alle anderen Gruppen, ergo FIGO I vs. II, FIGO II vs. III und FIGO III vs. IV, zeigten keine statistische Signifikanz ($p=1,0$, $p=0,971$ und $p=0,305$).

3.5. Vergleich der Marker bei Patienten ohne oder mit einem Tumorrezidiv

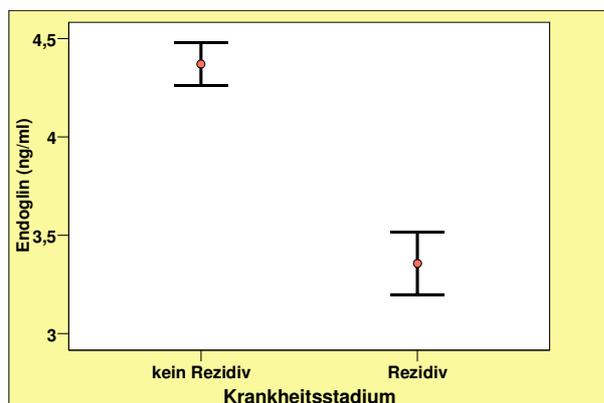


Abb. 3.5.1 Endoglin b. Pat. ohne u. mit einem Rezidiv

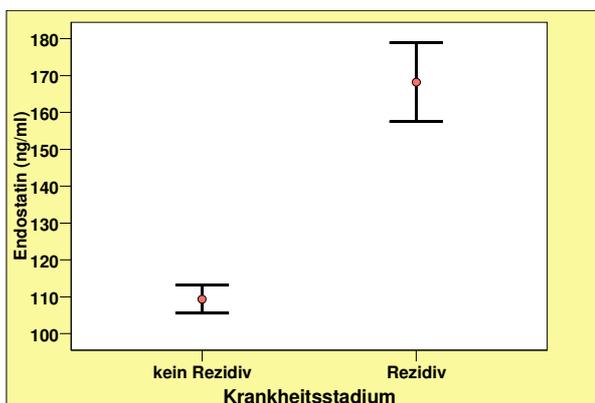


Abb. 3.5.2 Endostatin b. Pat. ohne u. mit Rezidiv

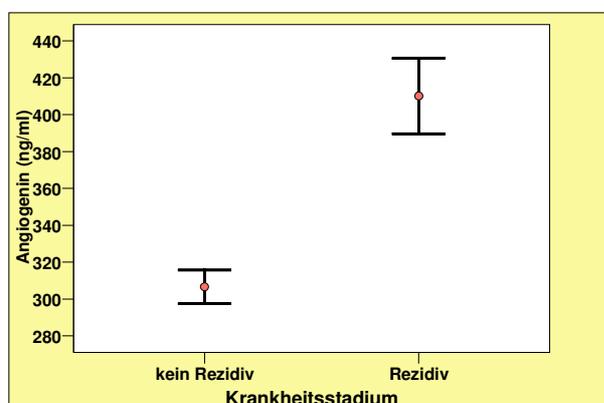


Abb. 3.5.3 Angiogenin b. Pat. ohne und mit Rezidiv

Tab. 3.5.1 Signifikanzen der 3 Werte bei Pat. ohne vs. mit Rezidiv

	Endo- glin (T-Test)	Endo- Statin (U-Test)	Angio- genin (T-Test)
Signifikanz (p-Wert)	<0,001	<0,001	<0,001

Dargestellt ist der Vergleich der Parameter Endoglin, Endostatin und Angiogenin bei Erkrankten ohne und mit Rezidiv, wobei in die Gruppe der Patientinnen ohne Rezidiv auch alle CIN- und FIGO-Stadien eingeschlossen wurden (Abb. 3.5.1 bis 3.5.3).

Bezüglich des Endoglins konnten die höchsten Konzentrationen (MW=4,3707 ng/ml, Standardfehler=0,10908) bei Frauen ohne Rezidiv festgestellt werden. Die geringste Konzentration war bei Rezidiven mit einem Mittelwert von MW=3,3575 und einem Standardfehler=0,15859 zu verzeichnen.

Beim Endostatin lag die höchste Konzentration bei MW=168,2 ng/ml, der Standardfehler bei 10,6586, beim Angiogenin bei MW=410,13 ng/ml, der Standardfehler bei 20,414 – bei Patientinnen mit einem Rezidiv.

Zur Überprüfung des Zusammenhanges zwischen den Parametern Endoglin, Endostatin und Angiogenin bei Frauen mit und ohne Rezidiverkrankung wurde für normalverteilte Stichproben der t-Test und für nicht normalverteilte der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Zwischen den Werten der 3 Parameter zeigte sich ein signifikanter Unterschied (s.Tab. 3.5.1).

3.6. Vergleich der Tumormarker bei Patientinnen mit CIN I+II (7+8=15x) versus CIN III (35x)

Hier wurden die Konzentrationen von Endoglin, Endostatin und Angiogenin bei den nichtinvasiven Vorstufen des Zervixkarzinoms, ergo den Präkanzerosen verglichen.

Aufgrund der geringen Fallzahlen sind CIN I (n=7) und CIN II (n=8) zu einer Gruppe zusammengefasst worden. Zum Vergleich der entstandenen zwei Ausprägungen wurde der Mann-Whitney-U-Test für nicht normalverteilte und der t-Test für normalverteilte Stichproben verwendet.

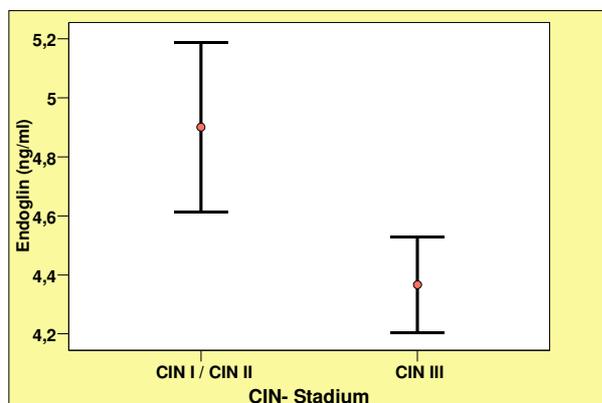


Abb. 3.6.1 Endoglin bei verschiedenen CIN-Stadien

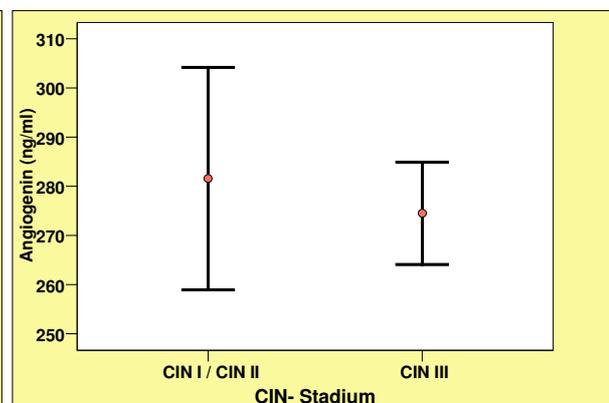


Abb. 3.6.2 Angiogenin bei verschiedenen CIN-Stadien

Bezüglich der Konzentrationen von Endoglin und Angiogenin zeigten sich die höchsten bei Patientinnen im Stadium CIN I und II mit einem Mittelwert von MW=4,9007 ng/ml, Standardfehler=0,28731 bei Endoglin und MW=281,60 ng/ml, Standardfehler=22,655 bei Angiogenin (Abb. 3.6.1 und 3.6.2).

Die geringste Konzentration von Endoglin war bei einem MW=4,3666 ng/ml mit einem Standardfehler von 0,16225 und die von Angiogenin bei MW=274,54 ng/ml und einem Standardfehler von 10,404 im Stadium CIN III zu verzeichnen.

Trotz der Unterschiede ergab sich für Endoglin und Angiogenin keine signifikante Differenz zwischen den Gruppen CIN I+II vs. CIN III ($p=0,119$ bzw. $p=0,78$)

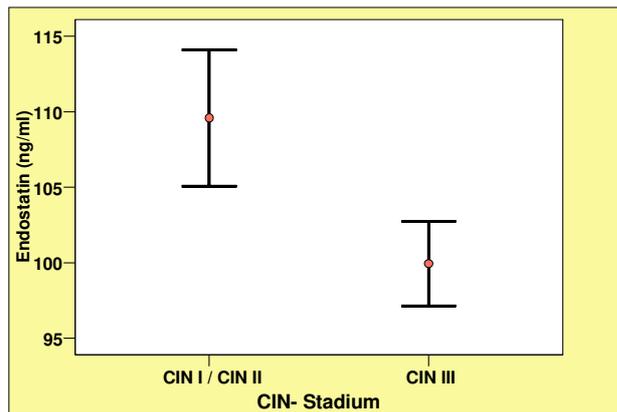


Abb. 3.6.3 Endostatin bei verschiedenen CIN-Stadien

Tab. 3.6.1 Endostatin bei verschiedenen CIN-Stadien

CIN	Mittelwert in ng/ml	Standard- abweichung	Standard- fehler des Mittelwertes	Median	N
CIN I + CIN II	109,587	17,4676	4,5101	106,000	15
CIN III	99,940	16,6265	2,8104	97,300	35
Insgesamt	102,834	17,2897	2,4451	100,950	50

Bei Patientinnen mit dem CIN-Stadium III wurden im Mittel signifikant niedrigere Endostatinkonzentrationen als bei Patientinnen mit den Stadien I bzw. II registriert, wobei sich eine grenzwertige Signifikanz nachweisen ließ (Mann-Whitney-U-Test; $p=0,061$) (Abb. 3.6.3 und Tab. 3.6.1).

3.7. Korrelation von Alter und den Konzentrationswerten von Endoglin, Endostatin und Angiogenin bei Diagnosestellung (CIN und REZIDIVE ausgenommen)

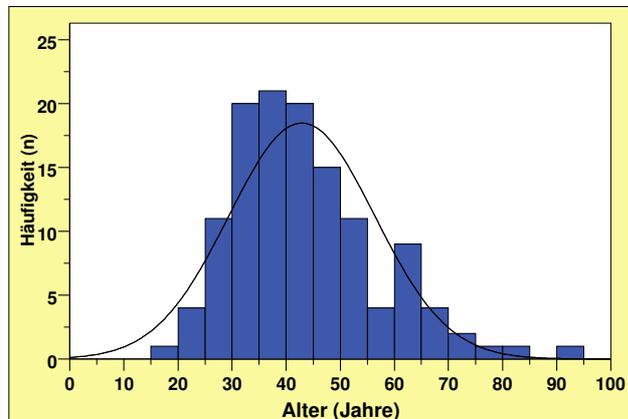


Abb. 3.7.1 Häufigkeit des Auftretens eines Zervixkarzinoms in Abhängigkeit vom Alter beim Gesamtklientel

Dargestellt ist die Abhängigkeit des Alters in Bezug zur Erkrankung (n=125).

Das Maximum lag bei 42,89 Jahren. Das Altersspektrum erstreckte sich von 19 bis 92 Jahre (Abb. 3.7.1).

Nachfolgend aufgeführt ist die Verteilung des Alters in den verschiedenen Krankheitsstadien.

Tab. 3.7.1 Alter der Patientinnen mit verschiedenen Krankheitsstadien

Krankheitsstadium	Mittelwert Jahre	Standard- abweichung	Standard- fehler des Mittelwertes	Median	N
CIN	36,24	11,607	1,641	33,00	50
FIGO	47,33	13,926	1,950	45,00	51
Rezidiv	47,29	10,618	2,167	48,50	24
Insgesamt	42,89	13,493	1,207	40,00	125

Hier waren die Patientinnen im Krankheitsstadium CIN im Durchschnitt ca. 11 Jahre jünger als Patientinnen mit dem fortgeschrittenen FIGO-Stadium und bei Nachweis eines Rezidivs (Tab. 3.7.1).

Hinsichtlich dieses Unterschiedes ließ sich eine statistische Signifikanz berechnen (ANOVA; $p < 0,001$).

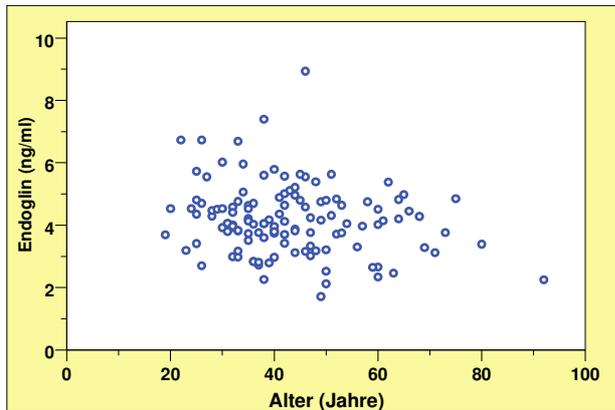


Abb. 3.7.2 Korrelation zwischen Alter und Endoglin bei Erkrankungsfällen

Tab. 3.7.2 Korrelation zwischen Alter und Endoglin

		Endoglin	Alter
Endoglin	Korrelation nach Pearson	1	-,193
	Signifikanz (2-seitig)		,031
	N	125	125
Alter	Korrelation nach Pearson	-,193	1
	Signifikanz (2-seitig)	,031	
	N	125	125

Zur Berechnung der Korrelation zwischen zwei normalverteilten Stichproben wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson verwendet.

Es zeigte sich keine relevante Korrelation zwischen dem Parameter Endoglin und dem Alter beim Zervixkarzinom (Abb. u. Tab. 3.7.2).

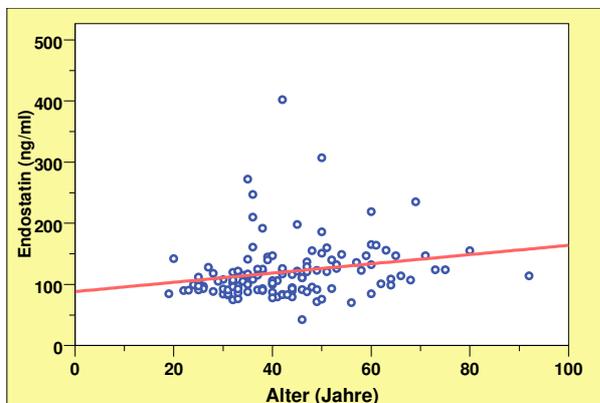


Abb. 3.7.3 Korrelation zwischen Alter und Endostatin

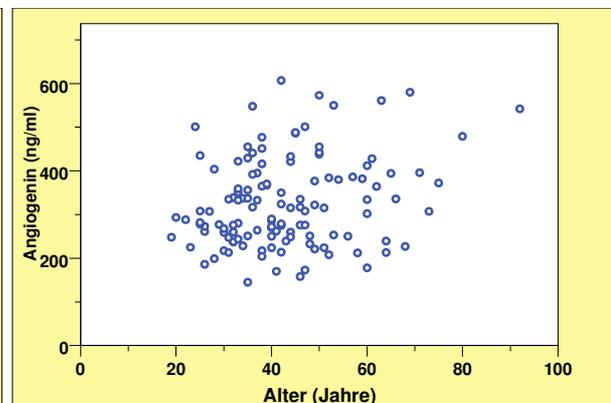


Abb. 3.7.4 Korrelationen zwischen Alter und Angiogenin

Bei der Abhängigkeit Endostatin/Alter und Angiogenin/Alter handelt es sich bei Endostatin/Alter um nicht normalverteilte und bei Angiogenin/Alter um normalverteilte Stichproben.

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson wurde zur Berechnung der normalverteilten Stichprobe verwendet.

Die Stärke des Zusammenhangs zwischen den Variablen Endostatin/Alter konnte durch den Rangkorrelationskoeffizienten (=Spearman-Rho) gemessen werden.

Zwischen dem Alter/Endostatinkonzentration sowie dem Alter/Angiogeninkonzentration bestand eine geringe, jedoch signifikante Korrelation ($r=0,34$ bzw. $r=0,261$), die klinisch aber nicht relevant ist (Abb. 3.7.3 und 3.7.4).

3.8. Bestehen Unterschiede prä-, peri- und postmenopausal?

Untersucht wurde, ob Unterschiede der Konzentrationen von Angiogenin, Endoglin und Endostatin, bezogen auf den prä-, post- und perimenopausalen Zustand, bei 125 Patientinnen mit Zervixkarzinom bestanden.

Davon befanden sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung CIN, FIGO oder Rezidiv 88 Frauen in der prämenopausalen (70,4%), 35 Patientinnen in der postmenopausalen (28,0%) und 2 Frauen in der perimenopausalen (1,6%) Phase.

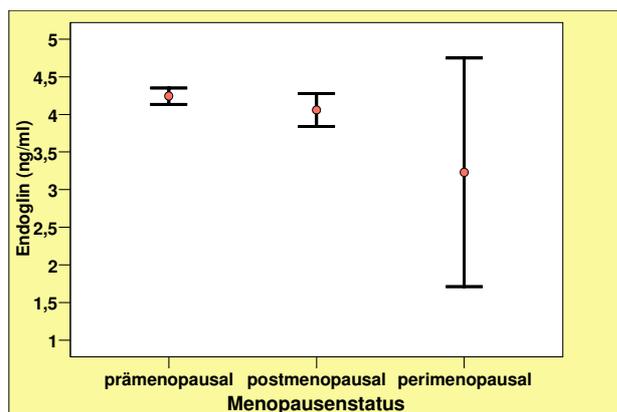


Abb. 3.8.1 Endoglin in verschiedenen Menopausezeiten beim Zervixkarzinom

Tab. 3.8.1 Endoglin in verschiedenen Menopausezeiten

Menopausestatus	Mittelwert in ng/ml	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Median	N
prämenopausal	4,2441	1,01480	,10818	4,0900	88
postmenopausal	4,0594	1,29564	,21900	4,0500	35
perimenopausal	3,2300	2,14960	1,52000	3,2300	2
Insgesamt	4,1762	1,11429	,09966	4,0600	125

Betrachtet wurden die Konzentrationen von Endoglin im prä-, post- und perimenopausalen Status (Abb. u. Tab. 3.8.1). Die höchsten Konzentrationen fanden sich in der Gruppe der prämenopausalen Frauen.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen konnte jedoch nicht ermittelt werden (ANOVA, $p=0,344$).

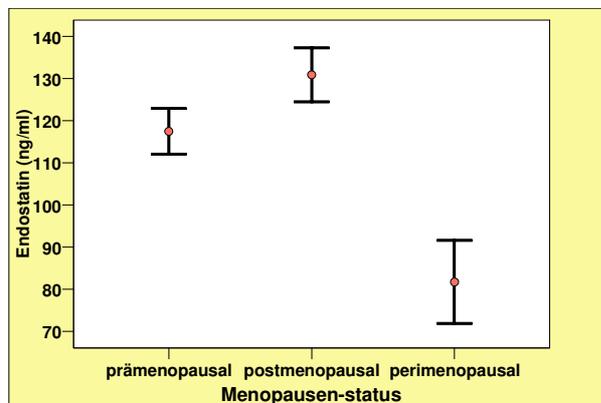


Abb. 3.8.2 Endostatin in verschiedenen Menopausephasen

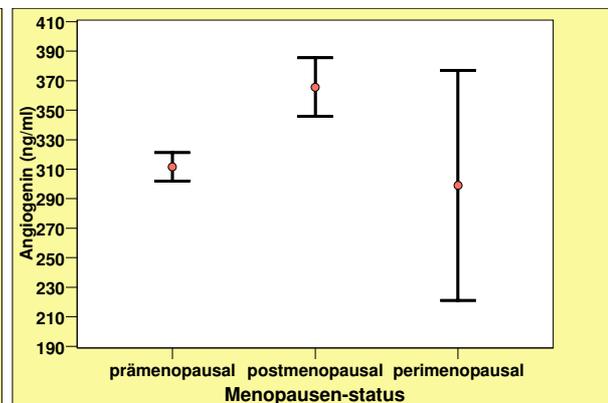


Abb. 3.8.3 Angiogenin in verschiedenen Menopausephasen

Bei Patientinnen im postmenopausalen Status fand man die höchsten Konzentrationen von Endostatin (MW=130,911 ng/ml; Standardfehler=6,4032) und von Angiogenin (MW=365,60 ng/ml; Standardfehler=19,909), s. Abb. 3.8.2 und 3.8.3.

Aufgrund der Unterschiede ergab sich für Endostatin eine Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test von $p=0,001$ und für Angiogenin ein signifikanter Wert von $p=0,026$ (ANOVA).

Die Einzeltestung von Endostatin und Angiogenin in der Gruppe prä- vs. postmenopausale Patientinnen zeigte eine Signifikanz von $p=0,001$ bzw. $p=0,023$.

Eine Subanalyse mit der perimenopausalen Gruppe erwies sich aufgrund der niedrigen Fallzahl ($n=2$) für nicht sinnvoll.

3.9. Einfluss des Nikotinabusus

Gegenstand der Untersuchung war, welcher Zusammenhang zwischen Nikotinkonsum und den Faktoren Angiogenin, Endoglin und Endostatin bestand. 45 Patientinnen (37,6%) gaben an, Raucher zu sein, und 47 Frauen (36,0%) verneinten diese Frage.

Es bestand ein hoher Anteil an Patienten, bei denen nichts über den Nikotinkonsum bekannt war ($n=33$, 26,4%). Möglicherweise war in dieser Gruppe der Raucheranteil dominierend.

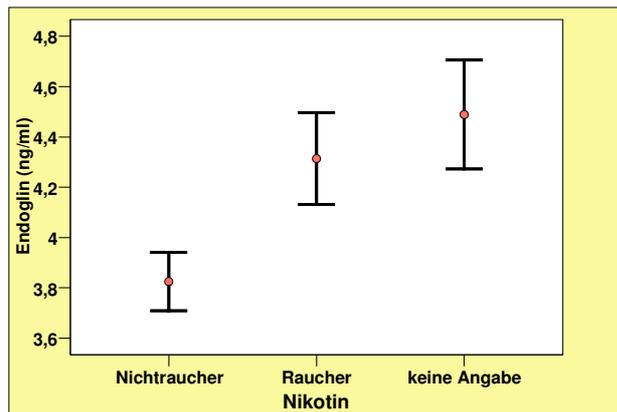


Abb. 3.9.1 Endoglin bei Rauchern vs. Nichtraucher

Tab. 3.9.1 Endoglin bei Rauchern vs. Nichtraucher

Nikotin	Mittelwert in ng/ml	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Median	N
Nichtraucher	3,8251	,79929	,11659	3,8300	47
Raucher	4,3136	1,21901	,18172	4,0600	45
keine Angabe	4,4888	1,24153	,21612	4,4100	33
Insgesamt	4,1762	1,11429	,09966	4,0600	125

Die niedrigsten Endoglinkonzentrationen wurden bei Nichtrauchern gemessen (Abb. und Tab. 3.9.1). Hinsichtlich der Unterschiede besteht im Gesamtvergleich eine statistische Signifikanz (ANOVA, $p=0,018$), wobei für die Einzelanalysen im Bonferroni-Test nur beim Vergleich Nichtraucher vs. keine Angaben ein signifikanter Unterschied berechnet wurde ($p=0,025$). Während in der Gruppe Raucher vs. Nichtraucher nur ein grenzwertiger signifikanter Unterschied von $p=0,099$ ermittelt werden konnte.

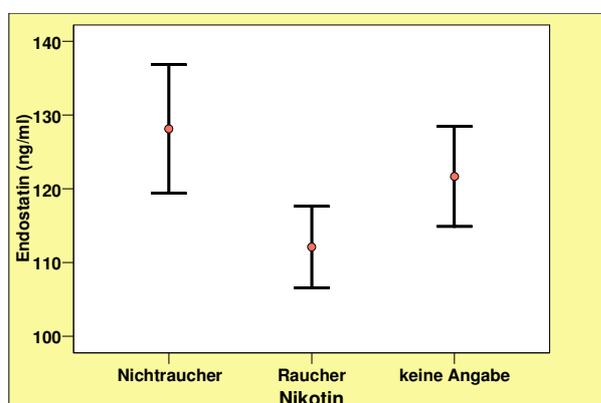


Abb. 3.9.2 Endostatin bei Rauchern vs. Nichtraucher

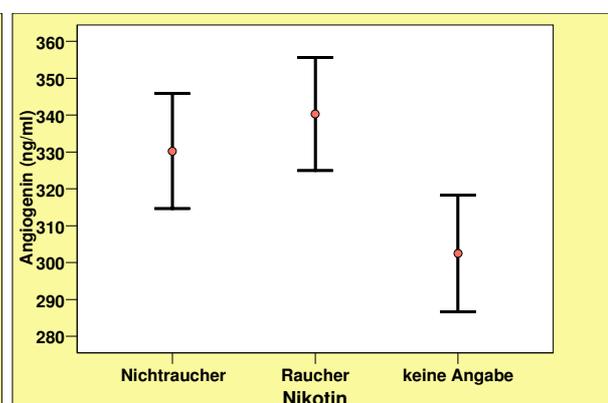


Abb. 3.9.3 Angiogenin bei Rauchern vs. Nichtraucher

Endostatin zeigte die höchsten Konzentrationen (MW=128,145 ng/ml; Standardfehler 8,7226) in der Gruppe der Nichtraucher und Angiogenin in der Gruppe der Raucher, mit einem Mittelwert von 340,29 ng/ml und einem Standardfehler von 15,298 (Abb. 3.9.2 und 3.9.3).

Die geringsten Endostatinkonzentrationen wurden in der Gruppe der Raucher mit einem Mittelwert von MW=112,129 ng/ml (Standardfehler 5,5134) und beim Angiogenin bei Patientinnen, bei denen keine Angaben über den Nikotinkonsum vorlagen (MW=302,52 ng/ml; Standardfehler=15,795), registriert.

Trotz dieser Differenzen konnte kein signifikanter Unterschied bei den Parametern Endostatin und Angiogenin bezüglich des Nikotinverhaltens ermittelt werden ($p=0,229$ bzw. $p=0,257$).

3.10. Vergleich der Tumormarker bei Pat. in Abhängigkeit der Fernmetastasierung, Vergleich von M0 mit M1 nur bei Pat. mit Karzinom (FIGO u. Rezidiv, nicht CIN)

Dargestellt ist der Vergleich der Tumormarkerkonzentrationen bezüglich der Patientinnen mit vs. ohne Fernmetastasierung, wobei Frauen mit einem FIGO-Stadium und einem Rezidiv betrachtet wurden ($n=75$).

Bei 56 Patienten (74,7%) lagen keine Fernmetastasen vor, bei 17 Patientinnen (22,7%) war der M-Status positiv und bei 2 Frauen unbekannt.

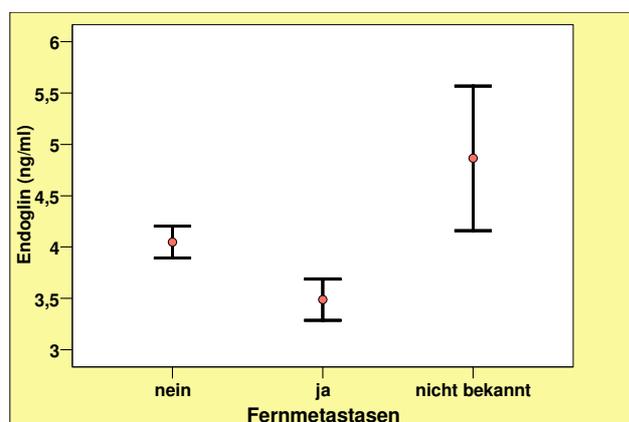


Abb. 3.10.1 Endoglin bei Patienten mit und ohne Fernmetastasenbefall

Tab. 3.10.1 Endoglin bei Patientinnen mit vs. ohne Fernmetastasen

Fernmetastasen	Mittelwert in ng/ml	Standard- abweichung	Standard- fehler des Mittelwertes	Median	N
nein	4,0475	1,16191	,15527	3,9000	56
ja	3,4876	,82828	,20089	3,2800	17
nicht bekannt	4,8650	,99702	,70500	4,8650	2
Insgesamt	3,9424	1,11537	,12879	3,8300	75

Die geringsten Konzentrationen waren bei Patientinnen mit Fernmetastasen zu verzeichnen (Abb. und Tab. 3.10.1).

Aufgrund der Unterschiede ergab sich eine Signifikanz von $p=0,03$ in der Gruppe von Patienten mit vs. ohne Fernmetastasen.

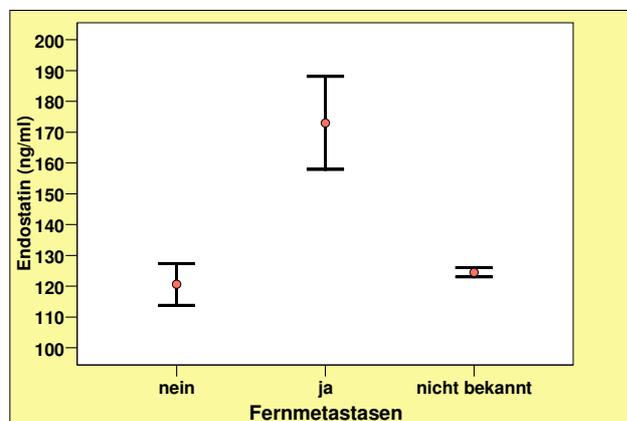


Abb. 3.10.2 Endostatin bei Patienten mit vs. ohne Fernmetastasen

Beim Endostatin fand man die höchsten Konzentrationen mit einem MW=172,988 ng/ml und einem Standardfehler=15,0990 bei Patientinnen mit Fernmetastasen (Abb. 3.10.2).

Die mittlere Endostatinkonzentration von Frauen ohne Fernmetastasen betrug 120,580 ng/ml bei einem Standardfehler=6,7459.

Im Mann-Whitney-U-Test konnte eine Signifikanz von $p \leq 0,001$ ermittelt werden.

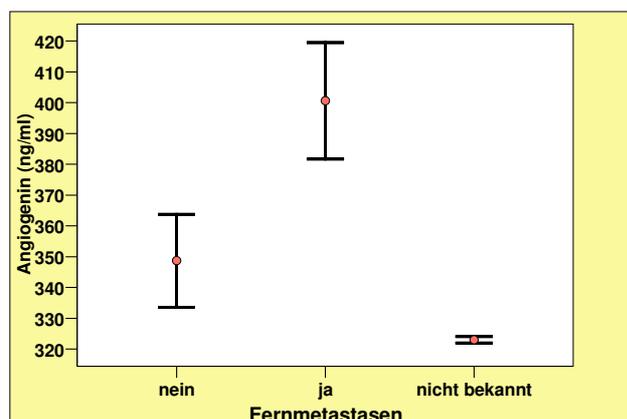


Abb. 3.10.3 Angiogenin bei Patienten mit vs. ohne Fernmetastasen

Tab. 3.10.2 Angiogenin bei Patientinnen mit vs. ohne Fernmetastasen

Fernmetastasen	Mittelwert in ng/ml	Standard- abweichung	Standard- fehler des Mittelwertes	Median	N
nein	348,70	112,908	15,088	335,00	56
ja	400,59	77,951	18,906	392,00	17
nicht bekannt	323,00	1,414	1,000	323,00	2
Insgesamt	359,77	106,306	12,275	356,00	75

Bezüglich der Angiogeninkonzentration fand man ebenfalls die höchsten Konzentrationen bei Frauen mit Fernmetastasen bei einem MW=400,59 ng/ml, Standardfehler=18,906.

Bei fehlender Fernmetastasierung betrug die Konzentration MW=348,70 ng/ml mit einem Standardfehler von 15,088 (Abb. 3.10.3 u. Tab. 3.10.2).

Aufgrund dieser Differenzen ergab sich in der ANOVA eine statistische Signifikanz von $p=0,005$. Die mittels des Bonferroni-Tests durchgeführten Subanalysen präsentierten eine Signifikanz in der Gruppe Fernmetastasierung „ja“ vs. „nein“ mit einem $p=0,003$.

3.11. Vergleich von M0 mit M1 nur bei Pat. im Stadium FIGO IVB und Rezidiv (n=25), also Stadien, in denen laut FIGO-Klassifikation eine Fernmetastasierung vorliegt, 10x M0 versus 15x M1

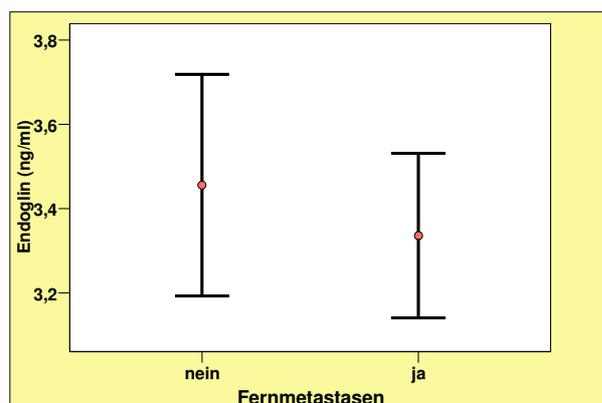


Abb. 3.11.1 Endoglin bei Pat. mit vs. ohne Fernmetastasen ($p=0,718$)

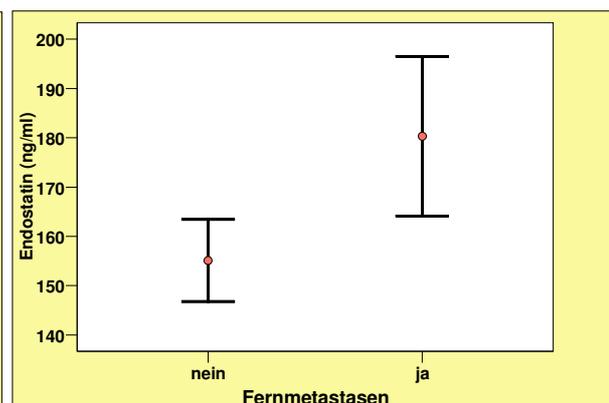


Abb. 3.11.2 Endostatin bei Patientinnen mit vs. ohne Fernmetastasen ($p=0,346$)

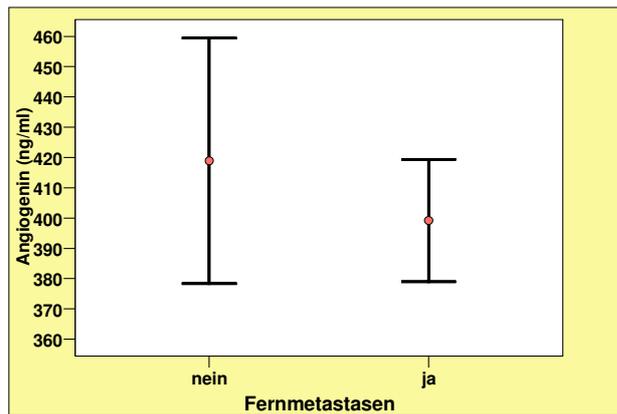


Abb. 3.11.3 Angiogenin bei Patientinnen mit vs. ohne Fernmetastasen ($p=0,67$)

Festgestellt werden sollte, ob ein Zusammenhang zwischen den Konzentrationen der 3 Parameter und Fernmetastasen „ja/nein“ bestand (Abb. 3.11.1, 3.11.2 und 3.11.3).

Eingeschlossen in diesem Teil sind nur Patientinnen, bei denen laut FIGO-Klassifikation Fernmetastasen auftreten können, ergo FIGO-IVB und Rezidiv ($n=25$).

Während bei 10 Patientinnen keine Fernmetastasen vorlagen, konnten bei 15 Frauen Fernmetastasen nachgewiesen werden.

Im Mittel fand man die höchsten Konzentrationen bei Patientinnen ohne Fernmetastasen bei den Faktoren Endoglin (MW=3,4560 ng/ml; Standardfehler=0,26322) und bei Angiogenin mit einem Mittelwert von MW=418,90 ng/ml und einem Standardfehler=40,489.

Die niedrigsten mittleren Konzentrationen lagen von Endoglin mit einem MW=3,3360 ng/ml (Standardfehler=0,19498) und von Angiogenin mit einem MW=399,20 ng/ml (Standardfehler=20,204) bei Frauen mit Fernmetastasierung vor.

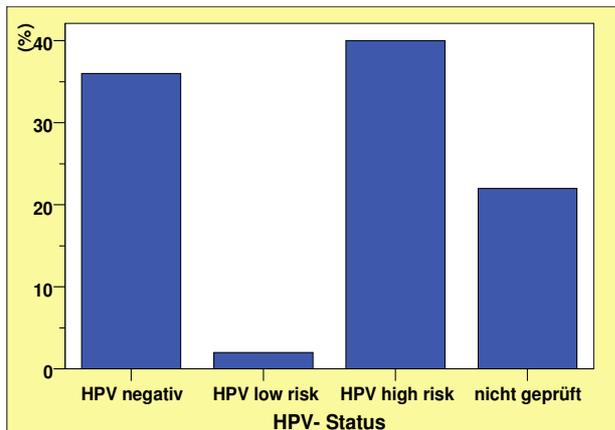
Die höchsten Konzentrationen vom Endostatin (MW=180,320 ng/ml, Standardfehler=16,2019) zeigten sich bei Patientinnen mit dem Nachweis von Fernmetastasen, wohingegen die niedrigsten Endostatinkonzentrationen bei Frauen ohne Fernmetastasen zu verzeichnen waren (MW=155,100 ng/ml, Standardfehler=8,3313).

Hinsichtlich der Unterschiede zwischen den Gruppen konnte keine statistische Signifikanz bei den Faktoren Endoglin, Endostatin und Angiogenin ermittelt werden.

3.12. Die Infektion mit einem high-risk-Typ des humanen Papillomavirus (HPV) kann eine Voraussetzung für die Entstehung des Zervixkarzinoms sein. Aus diesem Grund betrachten wir bezüglich des HPV-Status die Subgruppe Präkanzerose CIN I–III.

Vergleich von HPV-negativ (n=18) mit HPV-high-risk-positiv (n=20)

Tab. 3.12.1 HPV-Status bei Patientinnen im CIN-Stadium



	Häufigkeit	Prozent
HPV negativ	18	36,0
HPV low risk	1	2,0
HPV high risk	20	40,0
nicht geprüft	11	22,0
Gesamt	50	100,0

Abb. 3.12.1 HPV-Status bei Patientinnen im CIN-Stadium

Dargestellt ist die Häufigkeit der humanen Papillomavirusinfektion bei der Entstehung mit cervicaler intraepithelialen Neoplasien (n=50).

Differenziert wurde zwischen dem Status negativ, ergo kein Nachweis von HP-Viren, low risk, high risk und Frauen, die nicht getestet wurden (Abb. u. Tab. 3.12.1).

Patientinnen im FIGO-Stadium als auch Frauen mit einem Rezidiv wurden bei dieser Testung nicht mit betrachtet.

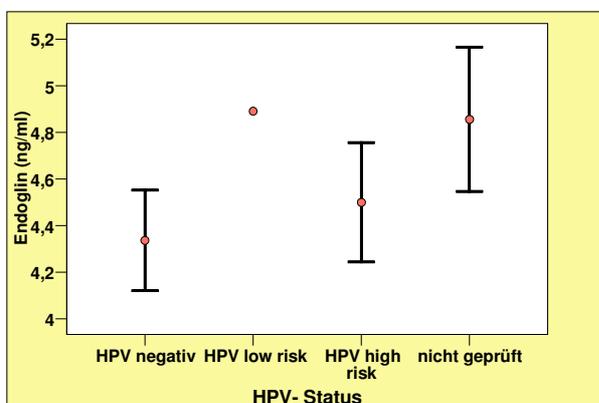


Abb. 3.12.2 Endoglin bei unterschiedlichem HPV-Status

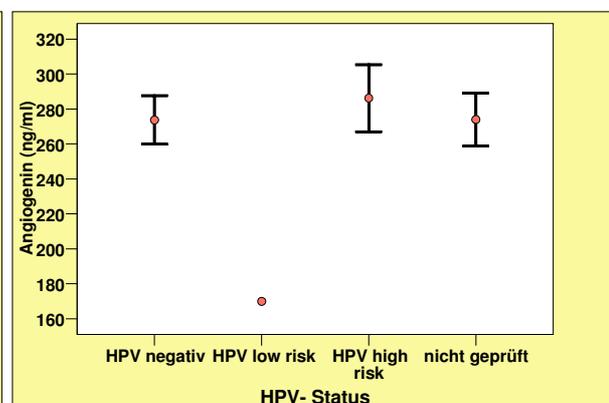


Abb. 3.12.3 Angiogenin bei unterschiedlichem HPV-Status

Tab. 3.12.2 Endoglin bei unterschiedlichem HPV-Status

HPV	Mittelwert in ng/ml	Standard- abweichung	Standard- fehler des Mittelwertes	Median	N
HPV negativ	4,3361	,91661	,21605	4,2050	18
HPV low risk	4,8900	.	.	4,8900	1
HPV high risk	4,4995	1,14366	,25573	4,3200	20
nicht geprüft	4,8555	1,02635	,30946	4,8500	11
Insgesamt	4,5268	1,02676	,14521	4,3850	50

Tab. 3.12.3 Angiogenin bei unterschiedlichem HPV-Status

HPV	Mittelwert in ng/ml	Standard- abweichung	Standard- fehler des Mittelwertes	Median	N
HPV negativ	273,67	58,778	13,854	275,50	18
HPV low risk	170,00	.	.	170,00	1
HPV high risk	286,20	85,713	19,166	271,50	20
nicht geprüft	273,91	50,348	15,180	261,00	11
Insgesamt	276,66	69,563	9,838	271,50	50

Im Vergleich HPV negativ und HPV high risk zeigten sich sowohl für Endoglin als auch für Angiogenin die geringsten mittleren Konzentrationen bei Frauen im CIN-Krankheitsstadium mit einem negativen Nachweis von humanen Papillomaviren (Abb. u. Tab. 3.12.2 – 3.12.3).

Trotz der Unterschiede konnte für keinen der Faktoren ein signifikanter Unterschied bei den unterschiedlichen HPV-Infektionen gefunden werden. Die p-Werte betragen für Endoglin $p=0,609$ und für Angiogenin $p=0,438$.

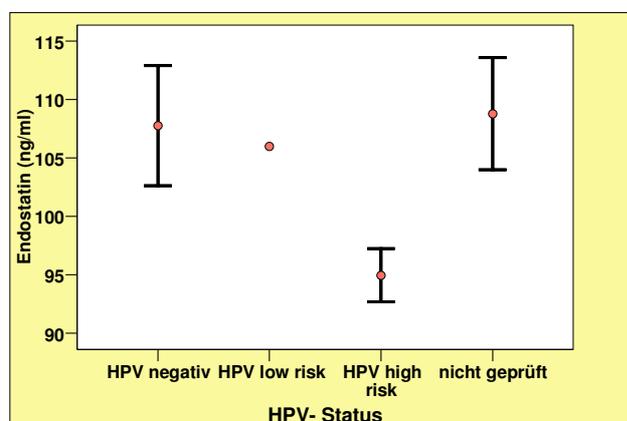


Abb. 3.12.4 Endostatin bei unterschiedlichem HPV-Status

Tab. 3.12.4 Endostatin bei unterschiedlichem HPV-Status

HPV	Mittelwert in ng/ml	Standard- abweichung	Standard- fehler des Mittelwertes	Median	N
HPV negativ	107,761	21,7920	5,1364	106,000	18
HPV low risk	106,000	.	.	106,000	1
HPV high risk	94,965	10,1863	2,2777	94,500	20
nicht geprüft	108,791	15,8976	4,7933	108,000	11
Insgesamt	102,834	17,2897	2,4451	100,950	50

Beim Endostatin zeigte sich in der Betrachtung der Gruppen HPV negativ und HPV high risk, dass man die höchsten Konzentrationen bei Frauen mit dem Befund HPV negativ fand (Abb. u. Tab. 3.12.4).

Trotz bestehender Unterschiede ergab sich lediglich eine grenzwertige Signifikanz von $p=0,73$ im Kruskal-Wallis-Test.

3.13. Gibt es signifikante Unterschiede zwischen CIN I+ II sowie CIN III innerhalb der Gruppe mit HPV-high-risk-positivem Befund?

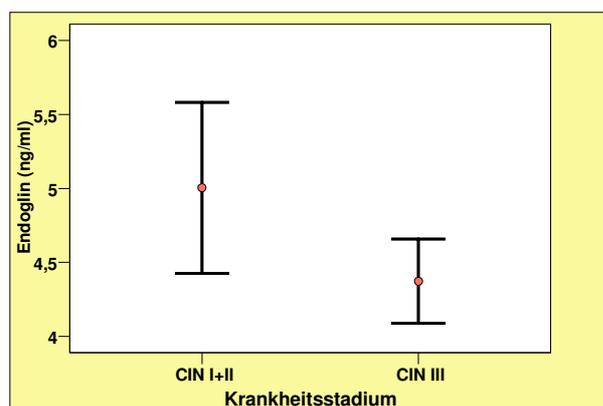


Abb. 3.13.1 Endoglin bei high-risk HPV ($p=0,375$)

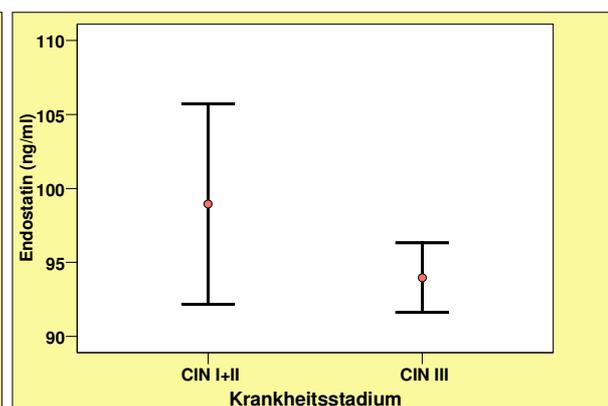


Abb. 3.13.2 Endostatin bei high-risk HPV ($p=0,257$)

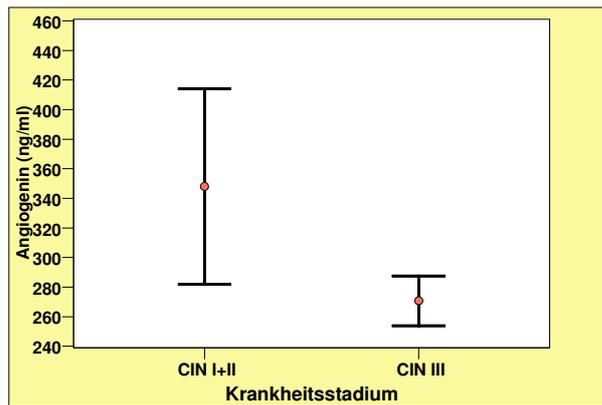


Abb. 3.13.3 Angiogenin bei high-risk HPV (p=0,331)

Untersucht wurde, ob ein signifikanter Unterschied innerhalb der CIN-Gruppen I–III (n=20) bei HPV-high-risk-Befunden bestand (Abb. 3.13.1–3.13.3). Aufgrund der geringen Anzahl wurden die Stadien CIN I und CIN II zu einer Gruppe zusammengefasst (n=4).

Bei den Faktoren Endoglin, Endostatin und Angiogenin zeigten sich jeweils die höchsten mittleren Konzentrationen bei Patientinnen im CIN I+II Stadium

(Endoglin MW=5,0050 ng/ml, Standardfehler=0,57726; Endostatin MW=98,950 ng/ml, Standardfehler=6,7943; Angiogenin MW=348,00 ng/ml, Standardfehler=66,047).

Die geringsten Konzentrationen fand man bei Patienten mit einem Nachweis von HPV-high-risk in dem Stadium CIN III bei allen 3 Parametern (Endoglin MW=4,3731 ng/ml, Standardfehler=0,28559; Endostatin MW=93,969 ng/ml, Standardfehler=2,3612; Angiogenin: MW=270,75 ng/ml, Standardfehler=16,850). Trotz dieser Unterschiede ergab sich für keinen der Prognosefaktoren eine statistische Signifikanz. Der p-Wert für Endoglin betrug im t-Test p=0,375, der für Angiogenin p=0,331 und der für Endostatin im Mann-Whitney-U-Test p=0,257.

3.14. Sensitivität/Spezifität der 3 Parameter – Roc-Kurven

Im Folgenden werden die 3 Faktoren Endoglin, Endostatin und Angiogenin hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität vorgestellt.

Orientiert an den Referenzbereichen der Parameter, erfolgte die Modifikation der cut-off-Werte anhand der Daten aus der Studie.

Zur graphischen Veranschaulichung wurden ROC-Kurven („Receiver-Operating-Characteristic“) verwendet.

Mit der ROC-Kurve wird die Sensitivität gegen den Komplementärwert der Spezifität zu 1 aufgetragen. Ein diagnostischer Wert ohne jede Vorhersagekraft ergäbe eine Diagonale, hier gestrichelt aufgetragen. Je bauchiger die ROC-Kurve ist, desto größer ist der Vorhersagewert des Tests. Ein Maß dafür ist die Fläche unterhalb der ROC-Kurve, die bei einem Test ohne jede Vorhersagekraft bei 0,5 und im Maximalfall bei 1 liegt. Diese Fläche wird als AUC („Area under Curve“) bezeichnet.

Für Endoglin wurden bei einem Referenzwert von 2,54–7,06 ng/ml verschiedene cut-off-Werte getestet.

Patientinnen mit einem CIN-Stadium hatten im Mittel höhere Werte als Frauen mit einem FIGO-Stadium oder Rezidiv.

Als Trennwert wurde zunächst 2,5 ng/ml angenommen, d.h., hohe Endoglin-Konzentrationen wurden signifikant bei Patientinnen im CIN-Stadium gefunden.

Es ergab sich bei einer sehr guten Spezifität von 100% nur eine Sensitivität von 8%.

Der positiv prädiktive Wert lag bei 100%, der negativ prädiktive Wert bei nur 42%.

Die AUC lag bei 0,54, dementsprechend ist der Vorhersagewert bei dem cut-off-Wert von 2,5 ng/ml schlecht.

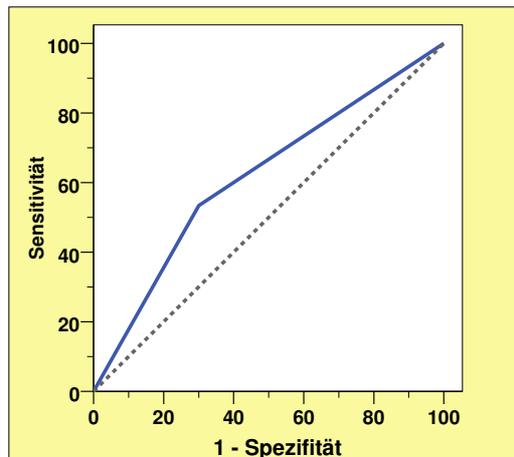
Als nächster Trennwert wurde 3,3 ng/ml gewählt. Die Spezifität betrug hier 90% und die Sensitivität 30,7%. Der positiv prädiktive Wert konnte bei 82,1% und der negativ prädiktive Wert bei 46,4% ermittelt werden. Die AUC betrug 0,603 (Abb. 3.14.1).

Bezogen auf die Spezifität und spätere prognostische Aussagekraft lag hier das beste Ergebnis vor.

In der letzten Testung lag der cut-off-Wert bei 4,0 ng/ml.

Hier konnte das beste Ergebnis für die Sensitivität errechnet werden (Ergebnis s. Tab. 3.14.1).

Die Spezifität, die bisher gut war, ist bei dieser Testung nur mäßig, so dass diese Testgrenzen weder für die Sensitivität noch für die Spezifität zufriedenstellend sind.

Tab. 3.14.1 Testergebnisse des Endoglin
(cut-off: 4,0 ng/ml)

Krankheitsstadium		Endoglin-Testergebnis		Gesamt
		≥4 ng/ml	<4 ng/ml	
Anzahl	CIN	35	15	50
	FIGO	28	23	51
	Rezidiv	7	17	24
Gesamt		70	55	125

Abb. 3.14.1 ROC-Kurve für Endoglin
(Trennwert 4,0 ng/ml), AUC=0,603

Sensitivität	=	$(23+17)/(23+17+28+7)$	=	53,3 %
Spezifität	=	$35/(35+15)$	=	70,0 %
positiv präd. Wert	=	$(23+17)/(23+17+15)$	=	72,7 %
negativ präd. Wert	=	$35/(35+28+7)$	=	50,0 %

Der Referenzbereich der Endostatinkonzentration liegt zwischen 58–232 ng/ml.

Patientinnen mit CIN hatten im Mittel niedrigere Werte als mit FIGO oder Rezidiv.

Als Trennwert wird zunächst 235 ng/ml angenommen, d.h., ein Testergebnis ≥ 235 ng/ml würde mit diesem Test für ein fortgeschrittenes Stadium sprechen.

Hier zeigte sich bei sehr guter Spezifität und einem sehr guten positiv prädiktiven Wert von jeweils 100% eine nur sehr geringe Sensitivität von 6,7%. Der negativ prädiktive Wert lag bei 41,7%.

Um die Sensitivität zu erhöhen, erfolgten Testungen mit den Trennwerten 150 ng/ml und 130 ng/ml. Auch hier zeigten sich gute Ergebnisse in der Spezifität und bei dem positiv prädiktiven Wert, andererseits nicht zufriedenstellende Werte für die Sensitivität und den negativ prädiktiven Wert.

Das beste Ergebnis konnte bei einem Trennwert der Endostatinkonzentration von 120 ng/ml erreicht werden. Hier lag die Sensitivität bei 54,7%, die Spezifität bei 82%, der positiv prädiktive Wert bei ebenfalls 82% und der negativ prädiktive Wert bei 54,7% (Tab. 3.14.2).

Die „Area under Curve“ betrug 0,683 (Abb. 3.14.2). Trotz eines hervorragenden Resultates ist der Vorhersagewert immer noch nicht aussagekräftig.

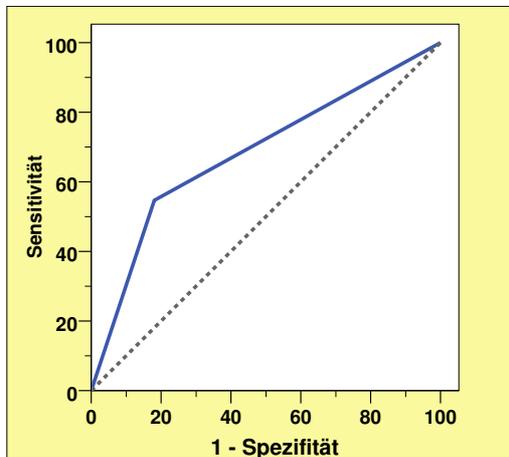


Abb. 3.14.2 ROC-Kurve für Endostatin (Trennwert 120 ng/ml), AUC=0,683

Tab. 3.14.2 Testergebnisse des Endostatins (cut-off: 120 ng/ml)

Krankheitsstadium		Endostatin-Testergebnis		Gesamt
		<120 ng/ml	≥120ng/ml	
Anzahl	CIN	41	9	50
	FIGO	32	19	51
	Rezidiv	2	22	24
Gesamt		75	50	125

Für die Angiogeninkonzentration beträgt der Referenzbereich von 196 bis 437 ng/ml.

Im vorliegenden Kollektiv war die mittlere Angiogeninkonzentration bei Patientinnen im CIN-Stadium niedriger als bei Frauen im FIGO-Stadium oder mit Rezidiv, so dass als Trennwerte höhere Werte verwendet werden mussten.

Als Trennwert wurde 300 ng/ml angenommen, d.h., ein Testergebnis ≥ 300 ng/ml entspräche einem fortgeschritteneren Stadium.

Tab. 3.14.3 Testergebnisse des Angiogenins (cut-off: 300 ng/ml)

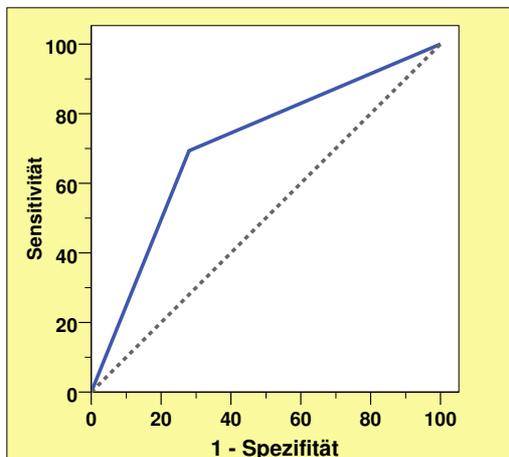


Abb. 3.14.3 ROC- Kurve für Angiogenin (Trennwert 300 ng/dl), AUC=0,707

Krankheitsstadium		Angiogenin-Testergebnis		Gesamt
		<300n g/ml	≥300n g/ml	
Anzahl	CIN	36	14	50
	FIGO	20	31	51
	Rezidiv	3	21	24
Gesamt		59	66	125

Hier war die Sensitivität mit 69,3% am höchsten, wobei die Spezifität mit 72% auch nur mäßig war (Abb. u. Tab. 3.14.3). Der positiv prädiktive Wert lag bei 78,8%, der negativ prädiktive Wert bei 61%. Eine weitere Verschiebung des Trennwertes würde die Testergebnisse nicht verbessern.

3.15. Sensitivität/Spezifität der Tumormarker in Kombination

Gezeigt werden sollte, wie sich Sensitivität und Spezifität verhalten, wenn ein oder mehrere Parameter (Endoglin, Endostatin und Angiogenin) pathologisch verändert waren. Nachfolgend verwendete man die Trennwerte der Tumormarker, die zuvor als beste Ergebnisse getestet wurden, also den cut-off-Wert von Endoglin mit 3,3 ng/ml, den von Endostatin mit 120 ng/ml und den von Angiogenin mit 300 ng/ml.

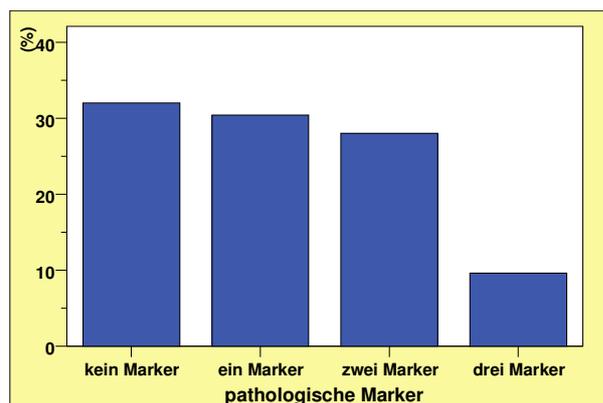


Abb. 3.15.1 Kombination von pathologischen Tumormarkern

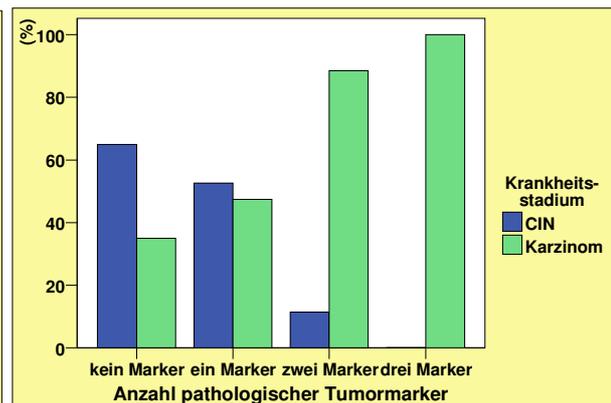


Abb. 3.15.2 Anzahl pathologischer Tumormarker bei CIN und beim Karzinom

Bei 40 Patientinnen war kein Marker (=32%), bei 38 Frauen (=30,4%) ein, bei 35 (=28%) zwei und bei 12 (=9,6%) Patientinnen drei pathologisch verändert (Abb. 3.15.1).

Auf Abb. 3.15.2 und in Tab. 3.15.1 ist diese Verteilung für Patientinnen im CIN-Stadium und FIGO/Rezidiv = Karzinom veranschaulicht.

Frauen mit einer Endoglinkonzentration unter 3,3 ng/ml, einer Endostatinkonzentration über 120 ng/ml und einer Angiogeninkonzentration über 300 ng/ml gehörten der Gruppe der Karzinompatientinnen an, ergo FIGO und Rezidiv.

Tab. 3.15.1 Anzahl pathologischer Tumormarker bei CIN und beim Karzinom

			Krankheitsstadium		Gesamt
			CIN	FIGO + Rez.	
Kombination	kein Marker	Anzahl	26	14	40
		% von Kombination	65,0%	35,0%	100,0%
		% von Krankheitsstadium	52,0%	18,7%	32,0%
	ein Marker	Anzahl	20	18	38
		% von Kombination	52,6%	47,4%	100,0%
		% von Krankheitsstadium	40,0%	24,0%	30,4%
	zwei Marker	Anzahl	4	31	35
		% von Kombination	11,4%	88,6%	100,0%
		% von Krankheitsstadium	8,0%	41,3%	28,0%
	drei Marker	Anzahl	0	12	12
		% von Kombination	,0%	100,0%	100,0%
		% von Krankheitsstadium	,0%	16,0%	9,6%
Gesamt	Anzahl	50	75	125	
	% von Kombination	40,0%	60,0%	100,0%	
	% von Krankheitsstadium	100,0%	100,0%	100,0%	

Bei der Testung von Markerkombinationen, ergo in den Krankheitsstadien CIN und manifestes Karzinom (FIGO und Rezidiv), ergab sich ein signifikanter Unterschied im Chi-Quadrat-Test von $p < 0,001$.

Tab. 3.15.2 Testergebnis

		Kombination - Testergebnis		Gesamt
		Trend benigne 0-1 Marker	Trend maligne 2-3 Marker	
Krankheitsstadium	CIN	46	4	50
	FIGO + Rezidiv	32	43	75
Gesamt		78	47	125

Aufgrund der Ergebnisse in der Kreuztabelle (Tab. 3.15.2) errechnete sich eine gute Spezifität von 92% und ein hoher positiv prädiktiver Wert von 91,5%, die Sensitivität mit 57,3% war jedoch auch bei 2 erhöhten Tumormarkern schlecht. Der negativ prädiktive Wert betrug 59%.

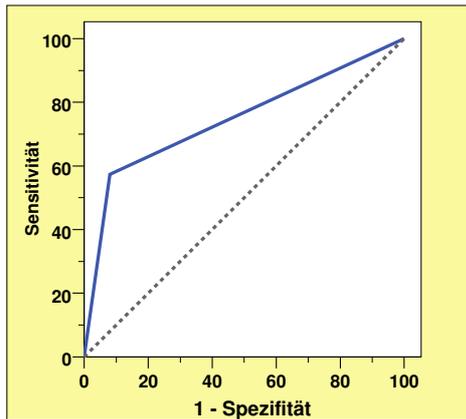


Abb. 3.15.3 ROC-Kurve bei ≥ 1 pathologischem Tumormarker; AUC=0,747

3.16. Gesamtüberlebenszeit und Mortalität bei FIGO und Rezidiv

Im folgenden Abschnitt soll der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Sterblichkeit und auf die Überlebenszeit beim Zervixkarzinom untersucht werden.

Die Mortalität ist im Folgenden definiert = Zahl der Gestorbenen dividiert durch Gesamtzahl der eingeschlossenen Patientinnen.

Zur Berechnung des Chi-Quadrat-Testes erfolgte die Darstellung der Werte in einer Kreuztabelle. Über mehrere Rechenschritte konnte der Chi-Quadrat-Wert ermittelt werden. Ein großer Chi-Quadrat-Wert korrespondiert mit großen Abweichungen der Häufigkeiten und deutet auf einen Zusammenhang zwischen beiden Variablen hin.

Zur graphischen Darstellung von Überlebenswahrscheinlichkeiten wurden Überlebenskurven, sogenannte Kaplan-Meier-Kurven, verwendet.

Bei Survivalkurven handelt es sich um Treppenfunktionen, bei denen auf der x-Achse die Nachbeobachtungszeit (Gesamtüberlebenszeit) in Monaten aufgetragen wurde. Auf der y-Achse wurde die geschätzte Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit in Prozent aufgetragen. Jeder Todesfall führt zu einer Stufe in der Überlebenskurve. An Zeitpunkten mit Zensierungen verläuft die Kurve horizontal.

Die Schätzungen der Überlebenswahrscheinlichkeiten sind für das Ende der Nachbeobachtungszeit sehr ungenau. Um diese zu quantifizieren, erfolgte die Angabe des Konfidenzintervalls.

Ein Vergleich der Überlebenskurven wurde mittels des Log-Rank-Tests durchgeführt.

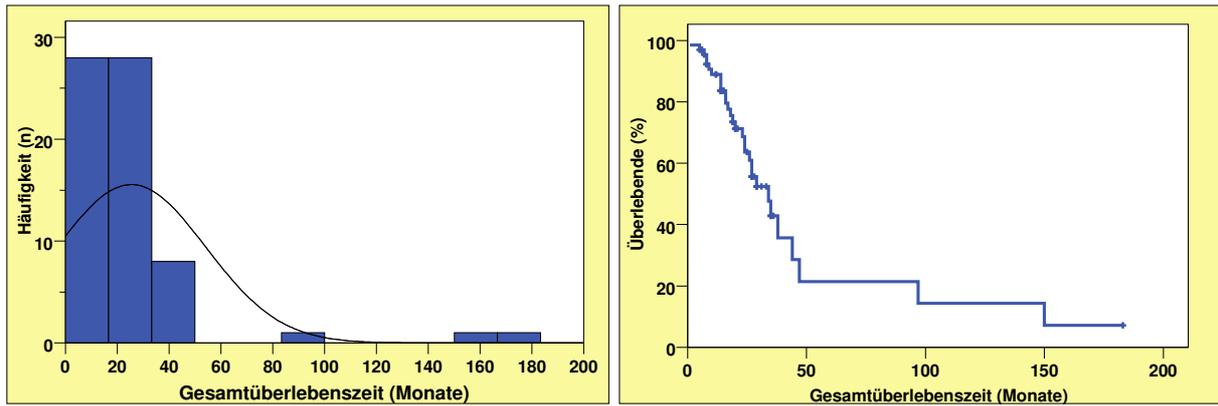


Abb. 3.16.1 Gesamtüberlebenszeit der Patientinnen mit Malignom

Ermittelt wurde die Gesamtüberlebenszeit in Monaten bei Patientinnen im FIGO-Stadium und bei Frauen mit einem Rezidiv (Abb. 3.16.1).

Im Zeitraum von Juli 2005 bis Dezember 2005 wurden 75 Frauen zum Follow-up befragt, wobei 8 Patientinnen sich der Ermittlung entzogen. Somit gelang die Auswertung von 67 Personen.

Der errechnete Mittelwert der Überlebenszeit betrug 25,45 Monate, das Minimum lag bei einem Monat und das Maximum bei 183 Monaten.

Die geschätzte mittlere Überlebenszeit der 67 eingeschlossenen Patienten betrug 51,804 Monate, wobei das Konfidenzintervall zwischen 29,223 und 74,385 Monaten lag.

Die Mortalität betrug 44,8%, was einer Anzahl von 30 Patientinnen entsprach.

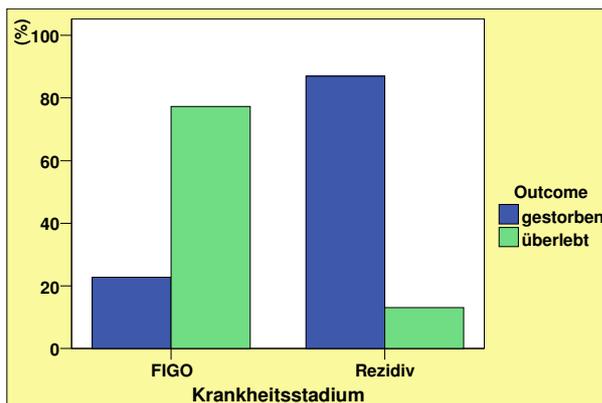


Abb. 3.16.2 Mortalität bei verschiedenen Krankheitsstadien

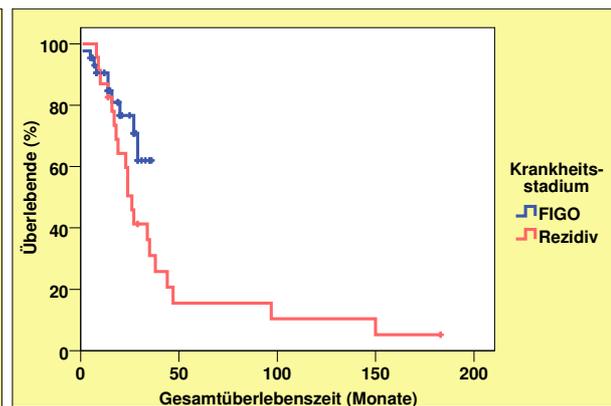


Abb. 3.16.3 Überleben der Patienten im Stadium FIGO und bei Rezidiv

Tab. 3.16.1 Mortalität bei verschiedenen Krankheitsstadien

			Outcome		Gesamt
			gestorben	überlebt	
Krankheits- stadium	FIGO	Anzahl	10	34	44
		% von Krankheitsstadium	22,7%	77,3%	100,0%
		% gestorben/überlebt/ gesamt	33,3%	91,9%	65,7%
Rezidiv		Anzahl	20	3	23
		% von Krankheitsstadium	87,0%	13,0%	100,0%
		% gestorben/überlebt/ gesamt	66,7%	8,1%	34,3%
Gesamt		Anzahl	30	37	67
		% von Krankheitsstadium	44,8%	55,2%	100,0%
		% gestorben/überlebt/ gesamt	100,0%	100,0%	100,0%

In einer weiteren Analyse wurde zwischen den Krankheitsstadien FIGO und Rezidiv (n=44 bzw. n=23) differenziert (Abb. 3.16.2 und 3.16.3, Tab. 3.16.1).

Hinsichtlich der Mortalität ergab sich zwischen den Krankheitsstadien ein signifikanter Unterschied im Chi-Quadrat-Test von $p < 0,001$. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem Rezidiv eine deutlich höhere Mortalität haben als Patientinnen im FIGO-Stadium.

Bei Betrachtung der Verläufe der Kaplan-Meier-Kurven wurde deutlich, dass die Überlebenszeiten von Patientinnen im FIGO-Stadium deutlich geringer waren als die der Rezidivpatientinnen. Der Grund dieser Differenzen bestand in einer verkürzten Beobachtungszeit der Frauen im FIGO-Stadium. Für Frauen im FIGO-Stadium lag die geschätzte mittlere Überlebenszeit bei 29,233 Monaten mit einer unteren Grenze von 25,659 Monaten und einer oberen Grenze von 32,807 Monaten.

Für Rezidivpatientinnen betrug die geschätzte mittlere Überlebenszeit 43,110 Monate bei einem Konfidenzintervall von 23,016 Monaten bis 63,204 Monaten.

Bei der Überlebenszeit, bezogen auf die Krankheitsstadien FIGO und Rezidiv, ergab sich kein signifikanter Unterschied (Log Rank; $p = 0,108$).

3.17. Mortalität und Überleben bei Lymphknotenmetastasen

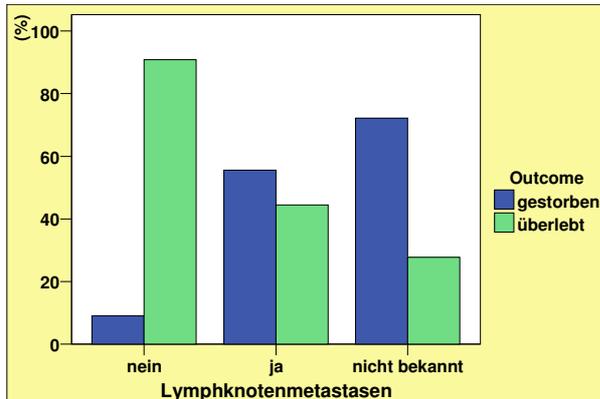


Abb. 3.17.1 Mortalität mit vs. ohne Lymphknotenmetastasen

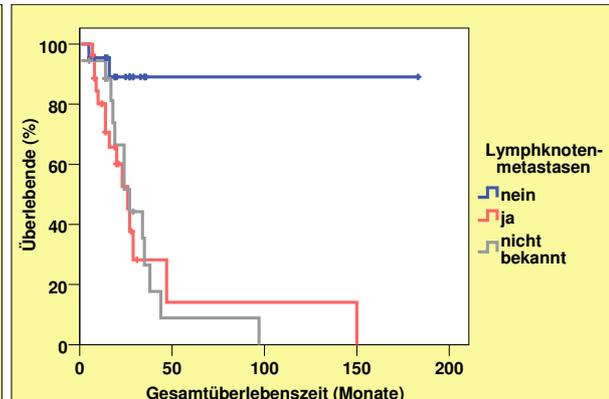


Abb. 3.17.2 Überleben mit vs. ohne Lymphknotenmetastasen

Tab. 3.17.1 Mortalität mit vs. ohne Lymphknotenmetastasen

			Outcome		Gesamt
			gestorben	überlebt	
Lymphknotenmetastasen	nein	Anzahl	2	20	22
		%	9,1%	90,9%	100,0%
		%			
		gestorben/überlebt/gesamt	6,7%	54,1%	32,8%
	ja	Anzahl	15	12	27
		% mit LK-Metastasen	55,6%	44,4%	100,0%
		%			
		gestorben/überlebt/gesamt	50,0%	32,4%	40,3%
	nicht bekannt	Anzahl	13	5	18
		%	72,2%	27,8%	100,0%
		%			
		gestorben/überlebt/gesamt	43,3%	13,5%	26,9%
Gesamt		Anzahl	30	37	67
		%	44,8%	55,2%	100,0%
		%			
		gestorben/überlebt/gesamt	100,0%	100,0%	100,0%

Dargestellt sind die Mortalität und die Überlebenszeiten bei Patientinnen mit, ohne oder nicht bekanntem Lymphknotenmetastasenstatus (Abb. 3.17.1, Abb. 3.17.2 u. Tab. 3.17.1).

Die Mortalität lag für Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen mit 9,1% (n=2) deutlich niedriger als bei Frauen mit positivem Lymphknotenmetastasennachweis. Hier betrug die Mortalität 55,6% (n=15).

In der Subgruppe mit nicht bekanntem Lymphknotenmetastasenbefall bestand eine Mortalität von 72,2% (n=13). Der p-Wert für die Sterblichkeit lag im Chi-Quadrat-Test bei $p < 0,001$, demnach bestand ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der Mortalität bei Patienten mit, ohne und nicht bekanntem Lymphknotenmetastasenbefund.

Die geschätzte mittlere Überlebenszeit für Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen lag bei 41,143 Monaten (Konfidenzintervall: 12,741 bis 69,544 Monate).

Bei Frauen mit einem negativen N-Status zeigte sich eine 4-fach höhere Überlebenszeit mit 164,282 Monaten bei einer unteren Grenze von 139,464 Monaten und einer oberen Grenze von 189,099 Monaten.

Im Vergleich der unterschiedlichen Überlebenszeiten bei Patientinnen mit, ohne und nicht bekanntem Lymphknotenmetastasenbefall ergab sich eine statistische Signifikanz im Log-Rank-Test von $p = 0,04$.

3.18. Mortalität und Überleben in Abhängigkeit von Fernmetastasen

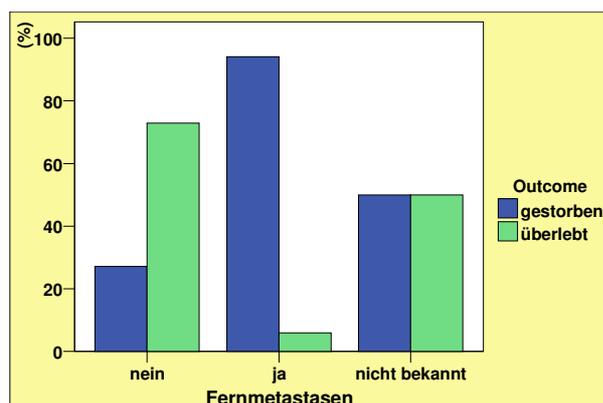


Abb. 3.18.1 Mortalität in Abhängigkeit von Fernmetastasen

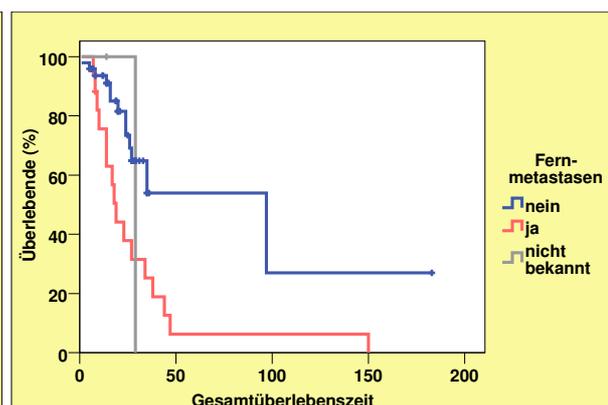


Abb. 3.18.2 Überleben mit oder ohne Fernmetastasen

Tab. 3.18.1 Mortalität mit vs. ohne Fernmetastasen

		Outcome		Gesamt	
		gestorben	überlebt		
Fern- metastasen	nein	Anzahl	13	35	48
		% ohne Fernmetastasen	27,1%	72,9%	100,0%
		% gestorben/überlebt/ gesamt	43,3%	94,6%	71,6%
	ja	Anzahl	16	1	17
		% mit Fernmetastasen	94,1%	5,9%	100,0%
		% gestorben/überlebt/ gesamt	53,3%	2,7%	25,4%
	nicht bekannt	Anzahl	1	1	2
		% von Fernmetastasen	50,0%	50,0%	100,0%
		% gestorben/überlebt/ gesamt	3,3%	2,7%	3,0%
Gesamt		Anzahl	30	37	67
		% von Fernmetastasen	44,8%	55,2%	100,0%
		% gestorben/überlebt/ gesamt	100,0%	100,0%	100,0%

Gezeigt wurden die unterschiedlichen Sterberaten bei Frauen mit, ohne und nicht bekanntem Fernmetastasenachweis (Abb.3.18.1, Abb. 3.18.2 u. Tab. 3.18.1).

Bei einem positiven M-Status lag die Mortalität um das 4-fache höher (94,1%) als bei Patientinnen ohne Nachweis von Fernmetastasen (27,1%).

Bezüglich der Mortalität bei Patientinnen mit oder ohne Fernmetastasen resultierte ein signifikanter Unterschied von $p < 0,001$ (Chi-Quadrat-Test).

Die geschätzte mittlere Überlebenszeit für Patientinnen mit Fernmetastasen betrug 30,126 Monate mit einem Konfidenzintervall von 13,161 bis 47,091. Eine 2,5-fach höhere Überlebenszeit zeigte sich bei Frauen mit einem negativen M-Status. Hier lag die Zeit des Überlebens bei 85,896 Monaten mit einer unteren Grenze von 43,741 und einer oberen Grenze von 128,051 Monaten.

Aufgrund der Unterschiede in den Überlebenszeiten bei Patientinnen mit, ohne und nicht bekanntem Fernmetastasenachweis ergab sich ein signifikanter Unterschied von $p = 0,016$ im Log-Rank-Test.

3.19. Survivalanalysen bei unterschiedlichen Tumorarten

Tab. 3.19.1 Überleben bei unterschiedlichen histologischen Typen

Histologie	Gesamtzahl N	Anzahl der Todesfälle N	Zensiert	
			N	Prozent
Plattenepithel- Ca	52	27	25	48,1%
Adeno- Ca	8	1	7	87,5%
adenosquamöses Ca	3	1	2	66,7%
kleinzelliges Ca	1	0	1	100,0%
klarzelliges Ca	1	1	0	,0%
nicht zutreffend (CIN)	2	0	2	100,0%
Gesamt	67	30	37	55,2%

Untersucht wurde, ob ein statistisch verwertbarer Zusammenhang in der Überlebenszeit bei den verschiedenen histologischen Befunden (Plattenepithel-, Adeno-, adenosquamösem, kleinzelligem und klarzelligem Karzinom) existiert (Tab. 3.19.1).

Es konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Der p-Wert lag bei $p=0,718$ im Log-Rank-Test.

3.20. Überlebenszeiten bei unterschiedlichen Konzentrationen der 3 Tumormarker

Im folgenden Teil erfolgte die Analyse der Überlebenszeiten in Abhängigkeit von der Konzentration Endoglin (Abb. 3.20.1), Endostatin (Abb. 3.20.2) und Angiogenin (Abb. 3.20.3). Es kam zur Bildung von zwei Patientengruppen, wobei der Mittelwert der drei Parameter als Trennwert diente. Insgesamt wurden je Parameter 67 Patienten betrachtet.

Für Endoglin betrug der Mittelwert 3,94 ng/ml, demzufolge wurde die 1. Gruppe von Patientinnen mit Endoglinkonzentrationen unter 3,94 ng/ml und die 2. Gruppe von Patientinnen über bzw. gleich 3,94 ng/ml zusammengestellt.

Entsprechend erfolgte die Untergliederung für Endostatin, hier lag der Mittelwert bei 132,6 ng/ml, und für Angiogenin, dessen Mittelwert 359,8 ng/ml betrug.

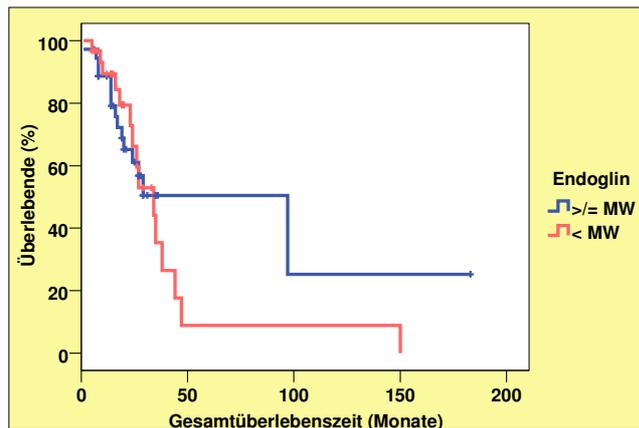


Abb. 3.20.1 Überleben bei einer Endoglin-Konzentration $\geq 3,94$ ng/ml vs. $< 3,94$ ng/ml

Eingeschlossen wurden insgesamt 67 Patientinnen, wobei 36 Frauen eine Endoglinkonzentration $\geq 3,94$ ng/ml hatten, davon waren bereits 15 Patientinnen (Mortalität bei 41,7%) verstorben, und 31 Frauen, die eine Konzentration unterhalb des Mittelwertes von $MW=3,94$ ng/ml hatten. Hier waren ebenfalls 15 Frauen verstorben, was einer Mortalität von 48,4% entspricht.

Im Mittel lebten die Patientinnen mit einer Konzentration oberhalb des Mittelwertes 79,149 Monate, mit einer unteren Grenze von 40,601 Monaten und einer oberen Grenze von 117,697 Monaten, länger als Frauen mit einer Endoglinkonzentration unterhalb von 3,94 ng/ml (Abb. 3.20.1).

Hier betrug die mittlere Überlebenszeit 39,876 Monate mit einem Konfidenzintervall von 19,480–60,272 Monaten.

Für die Unterschiede bezüglich der Überlebenszeit bei unterschiedlichen Konzentrationen ($\geq MW$ vs. $< MW$; $MW=3,94$ ng/ml) konnte jedoch keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden (Log-Rank-Test; $p=0,642$).

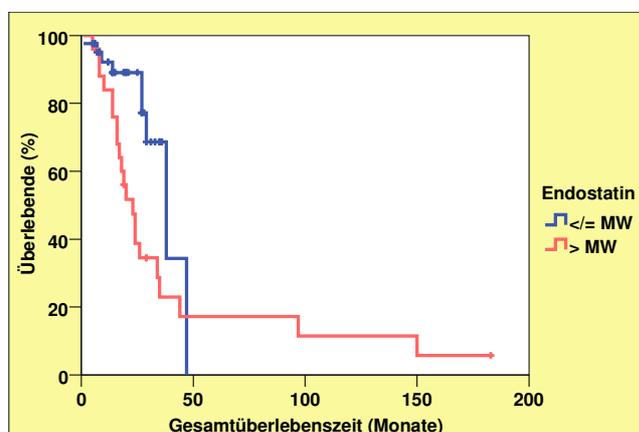


Abb. 3.20.2 Überleben bei einer Endostatin-Konzentration $\leq MW$ vs. $> MW$

Patientinnen mit einem Endostatin MW > 132,6 ng/ml (n=21) hatten eine ca. 4-fach höhere Mortalität (84,0%) als die mit einer Endostatin-Konzentration \leq 132,6 ng/ml (n=9, Mortalität 21,4%).

Eingeschlossen wurden insgesamt 67 Frauen, wovon bei 42 Patientinnen eine Endostatinkonzentration gleich/oberhalb des Mittelwertes nachgewiesen werden konnte, der übrige Anteil lag darunter.

Die mittlere Überlebenszeit war bei einer Endostatinkonzentration oberhalb von 132,6 ng/ml mit 42,028 Monaten und einem Konfidenzintervall von 20,547 bis 63,509 Monaten etwas höher als in der Gruppe unterhalb des Mittelwertes. Hier lag die mittlere Überlebenszeit bei 35,670 Monaten mit einem Konfidenzintervall von 29,277 bis 42,242 Monaten (Abb. 3.20.2). Hinsichtlich der Überlebenszeit, bezogen auf die Konzentration von Endostatin, ergab sich im Log-Rank-Test ein signifikanter Unterschied von $p=0,012$.

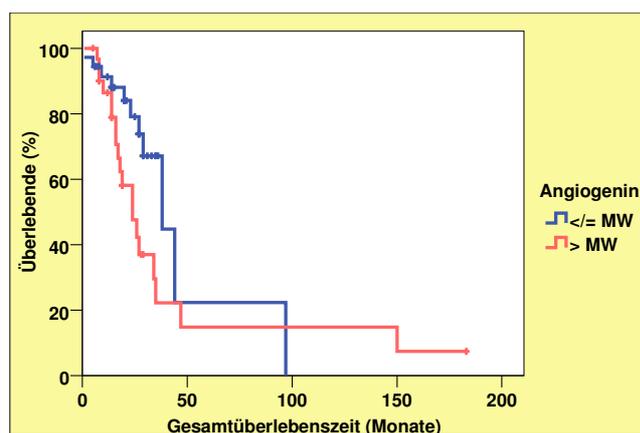


Abb. 3.20.3 Überleben bei einer Angiogenin-Konzentration \leq MW vs. > MW

Dargestellt ist die Überlebenszeit von Patientinnen mit einer Angiogeninkonzentration $MW \leq 359,8$ ng/ml (n=36) und einem Mittelwert über 359,8 ng/ml (n=31).

Die Mortalität betrug für Frauen mit einer Angiogeninkonzentration oberhalb des Mittelwertes 61,3% (n=19) und war somit höher als für Patienten mit einer Konzentration unterhalb bzw. gleich 359,8 ng/ml. Hier betrug die Mortalität 30,6% (n=11).

Im Durchschnitt lebten Frauen mit einem Wert oberhalb des Mittelwertes der Angiogeninkonzentration 2 Monate weniger (44,303 Monate; Konfidenzintervall: 18,989 bis 69,618) als Patientinnen mit einem Wert unter bzw. gleich 359,8 ng/ml. Da lag die Überlebenszeit bei 46,254 Monaten (Abb. 3.20.3). Das Konfidenzintervall befand sich zwischen 23,566 und 68,942 Monaten.

Trotz dieser Unterschiede ergab sich lediglich eine grenzwerte Signifikanz von $p=0,066$ (Log-Rank-Test).

3.21. Überleben in Abhängigkeit vom Alter

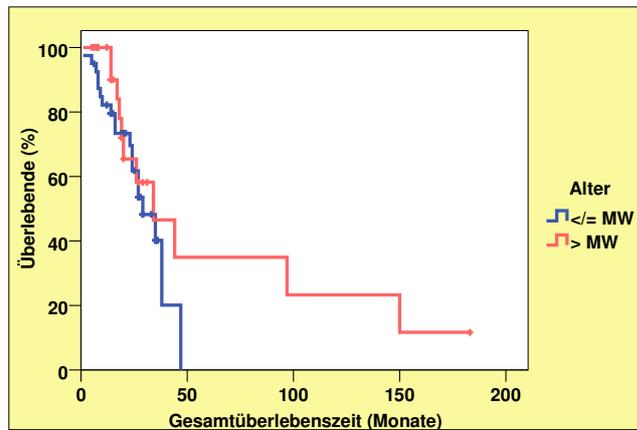


Abb. 3.21.1 Überleben in Abhängigkeit vom Alter

Dargestellt ist die Überlebenszeit bezogen auf das Alter von 67 Frauen, die dem FIGO-Stadium angehörten oder ein Rezidiv hatten (Abb. 3.21.1).

Der Mittelwert des Alters bei den Karzinompatientinnen betrug 47 Jahre.

Patientinnen mit einem Alter gleich oder unterhalb des Mittelwertes hatten eine Mortalitätsrate von 47,5% (n=19), bei Frauen oberhalb des Mittelwertes lag sie bei 40,7% (n=11).

Für Frauen mit bzw. unterhalb von 47 Jahren (n=40) betrug die mittlere Überlebenszeit 28,985 Monate mit einer unteren Grenze von 23,531 Monaten und einer oberen Grenze von 34,440 Monaten.

Die mittlere Überlebenszeit für Frauen über dem 47. Lebensjahr lag bei 66,953 Monaten mit einem Konfidenzintervall von 31,216 bis 102,690 Monaten.

Bezüglich der Überlebenszeit bei Patientinnen \leq versus $>$ 47 Jahre ergab sich keine statistische Signifikanz, der p-Wert betrug im Log-Rank-Test $p=0,288$.

3.22. Coxregression

Nachfolgend wurde als multivariate Analyse die Coxregression durchgeführt. Dabei wurden die Werte in die Analyse einbezogen, die in der univariaten Analyse signifikante Werte aufwiesen oder zumindest den Trend einer erhöhten Sterblichkeit anzeigten.

Ähnlich wie die Sterbetafeln und die Kaplan-Meier-Überlebensanalysen ist auch die Coxregression eine Methode zum Modellieren von Daten, welche in Gegenwart zensierter Fälle (überlebter Fälle) die Zeit bis zum Eintreten des Ereignisses (Tod) angeben. Es besteht die Möglichkeit, bei der Coxregression Einflussvariablen (Kovariaten) in die Modelle einzubeziehen. Dies bedeutet, dass die Cox-Regression eine multivariate Analyse ist, mit deren Hilfe man unabhängige Determinanten der Mortalität identifizieren kann. In der hier vorliegenden Coxregression identifizierten sich die Fernmetastasen ($p=0,001$), das Alter ($p=0,002$), das Endoglin ($p=0,05$) und das Endostatin ($p=0,003$) als unabhängige Prädiktoren einer erhöhten Mortalität, ergo sind diese als prognostische Faktoren anzusehen.

Tab. 3.22.1 Variablen in der Gleichung

	Wald	Signifikanz
Stadium	,550	,458
Lymphknoten- metastasen	2,546	,111
Fernmetastasen	11,132	,001
Altersgruppen	9,860	,002
Endoglin	3,856	,050
Endostatin	8,973	,003
Angiogenin	,523	,469

4. Diskussion

4.1. Angiogenesemessung an Tumoren

Die vorliegende Studie hat den Einfluss der Angiogenesestimulatoren Angiogenin und Endoglin sowie des Angiogeneseinhibitors Endostatin als Screening- und Prognosefaktoren bei Zervixkarzinompatientinnen untersucht.

Da Tumorangiogenese und -wachstum eng miteinander vergesellschaftet sind, wurde die Kapillarisation des Tumors als prognostischer Marker bei verschiedenen Krebserkrankungen beschrieben. Es existieren bereits mehrere Studien, die die Assoziation zwischen gesteigerter Angiogenese und der erhöhten Inzidenz von Metastasen mit nachfolgend verkürzter Überlebenszeit bei einer Vielzahl von Malignitäten diskutieren.

Srivastava et al. beschrieben 1988 die Wichtigkeit der Kapillarisation bei Hautmelanomen. Weidner et al. berichteten erstmals 1991 über die prognostische Signifikanz der Tumorangiogenese bei Mammakarzinompatientinnen und 1993 über die Korrelation von Tumorangiogenese und Metastasierung beim invasiven Prostatakarzinom.

Weitere Arbeiten von Macchiarini et al. (1992) und Tsuchiya et al. (2007) stellten beim nicht kleinzelligen Lungenkarzinom fest, dass der Nachweis von Blutgefäßeinbrüchen im Tumor mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert, und ebenso Dickinson et al. 1994 beim Blasenkarzinom, um nur einige Veröffentlichungen zu nennen.

Für das Zervixkarzinom liegen ebenfalls Publikationen vor, welche die Angiogenese und deren Einfluss auf den Krankheitsverlauf beschreiben. Wiggins et al. zählten 1995 beispielsweise die Kapillaren und Venolen bei 29 Frauen mit einem Plattenepithelkarzinom der Zervix. Damit konnte gezeigt werden, dass im Vergleich mit gesunden Probanden die Gefäßanzahl signifikant erhöht war. Überraschenderweise ergab sich jedoch keine Korrelation zwischen Gefäßanzahl und Lymphknotenstatus, Beteiligung der Parametrien sowie der Invasionstiefe.

Von Kaku et al. wurden 1998 56 Patientinnen im Stadium FIGO I und II mit einem Plattenepithelkarzinom des Gebärmutterhalses beobachtet. Eine hohe Mikrogefäßdichte korrelierte in dieser Studie signifikant mit einer kürzeren progressionsfreien Zeit sowie mit einem kürzeren Überleben. Zusätzlich zeigte sich eine Beziehung der Mikrogefäßdichte zur pathologischen Asziteszytologie. Wiederum ergab sich, wie bei Beobachtungen von Wiggins et al. 1995, kein statistisch verwertbarer Zusammenhang zwischen der Gefäßanzahl und dem

Lymphknotenstatus, der Invasionstiefe, dem Krankheitsstadium, dem histologischen Grad der Differenzierung und der Parametrienbeteiligung.

Insgesamt scheinen bisherige Studien darin übereinzustimmen, dass der Grad der Angiogenese, auch beim Zervixkarzinom, einen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit hat. Eine wichtige Rolle der Blutgefäßneubildung bei Krankheitsentstehung, Progression und Metastasierung scheint unumstritten.

Auf molekularer Ebene gelang es der Wissenschaft, verschiedene angiogene Komponenten in invasiven Tumoren nachzuweisen. Als Schlüsselfaktor in der Neubildung von Gefäßen wurde bisher überwiegend VEGF (vascular endothelial growth factor) genannt. Dieser Faktor wurde auch als erster Ansatzpunkt in der antiangiogenetischen Tumorthherapie gewählt.

In den letzten Jahren kam es zum Boom bei der Entwicklung von Angiogeneseinhibitoren. Der Durchbruch erfolgte im Jahr 2005 mit der Zulassung des VEGF-Antikörpers Bevacizumab (Avastin®) als Firstline-Therapie bei metastasiertem Kolon- oder Rektumkarzinom [Hurwitz et al. 2004]. Aktuell ist auch der Einsatz beim metastasierten Mammakarzinom, bei fortgeschrittenem Lungen- und Nierenzellkarzinom indiziert [Miller et al. 2007, Sandler et al. 2006, Escudier et al. 2007].

Natürlich existieren weitere vaskuläre Wachstumsfaktoren – Angiogenin, Endoglin sowie der endogene Angiogeneseinhibitor Endostatin. Die Bedeutung beim Zervixkarzinom war das Thema vorliegender Arbeit.

4.2. Bedeutung von Angiogenin

Angiogenin wurde nach mehreren Berichten mit dem Tumorwachstum, der -progression und auch der Aggressivität eines Tumors in Verbindung gebracht.

Bei verschiedenen Malignitäten konnten erhöhte Angiogeninspiegel mit einer schlechten Prognose in Beziehung gebracht werden.

Shimoyama et al. präsentierten 2003 bei Patienten mit einem Magenkarzinom, im Vergleich zu gesunden Probanden, signifikant erhöhte Angiogeninspiegel. Diese korrelierten signifikant mit einer kürzeren Überlebenszeit. Schlussfolgernd konnte Angiogenin als ein Vorhersagewert für das postoperative Outcome von Magenkarzinompatienten angegeben werden.

2001 verglichen Bodner-Alder et al. die Serumangiogeninspiegel bei Patienten im CIN-Stadium (n=47) mit den invasiven Zervixkarzinompatientinnen (n=62). Diese Daten deuteten auf signifikant erhöhte Werte für Angiogenin in der Gruppe der invasiven Zervixkarzinome hin. Allerdings schienen diese erhöhten Angiogeninspiegel lediglich bei Patienten nach der Transformation von präinvasiven in invasive Läsionen vorzukommen.

In einer Arbeit von Musolino et al. 2004 konnten erhöhte Angiogeninkonzentrationen bei Patienten mit chronisch myelodysplastischen Erkrankungen festgestellt werden. Dabei waren die höchsten Konzentrationen bei Patienten mit einer chronisch myeloischen Leukämie zu verzeichnen. Nach Interferontherapie wurde in dieser Patientengruppe ein signifikanter Abfall der Angiogeninwerte, im Vergleich zum Behandlungsbeginn, nachgewiesen.

Auch in der Arbeit von Alexandrakis et al. 2005 konnten signifikant erhöhte Angiogeninwerte bei 67 unbehandelten Patienten mit einem myelodysplastischen Syndrom gefunden werden. Zumeist war auch die Prognose der Patienten mit erhöhtem Angiogeninspiegel schlecht.

Die Aussagekraft war jedoch durch die Streubreite der Angiogeninspiegel bei den verschiedenen myelodysplastischen Tumorarten begrenzt.

Es fanden sich aber auch andere Resultate. So waren z.B. erhöhte Angiogeninkonzentrationen beim Mammakarzinom bei Sheen-Chen et al. 2000 mit einer guten Prognose behaftet.

Olsen et al. 1994 und Polakowski et al. 1993 berichteten bereits über die Anwendung von monoklonalen Angiogeninantikörpern, Aktin- und Ribonukleasehemmern bei Mäusen.

Bei Olsen et al. führte die Anwendung von monoklonalen Antikörpern an menschlichen Kolonkarzinomzellen HT-29, die Mäusen injiziert wurden, zu einer deutlichen Verminderung der Gefäßdichte.

An Hornhäuten von erwachsenen Mäusen führten Polakowski et al. 1993 mit einem rekombinanten Ribonukleasehemmer Versuche durch. Es war eine fast vollständige Hemmung der Neovaskularisation zu verzeichnen.

Auch Chen et al. 2005 waren in der Lage durch Anwendung des Ribonukleaseinhibitors cDNA (hRI) bei Patienten mit einem Melanom das Tumorwachstum zu hemmen, die Gefäßdichte zu reduzieren und die Überlebens- sowie rezidivfreie Zeit zu verlängern. Außerdem wurde die Apoptose angeregt, Zellzyklen reguliert und die Proliferation gehemmt.

Meine Studie ergab erhöhte Angiogeninspiegel beim Zervixkarzinom bei Patienten mit einem Rezidiv, im FIGO-IV-Stadium und bei nachgewiesener Lymphknotenmetastasierung.

Auch die Mortalität lag für Patientinnen mit einem Cut-off-Wert von >359,8 ng/ml der Angiogeninkonzentration deutlich höher als für Patienten mit einer Angiogeninkonzentration gleich oder unterhalb des Trennwertes.

Folglich sind die in der vorliegenden Arbeit erfassten Resultate in Einklang mit der beschriebenen Literatur zu bringen.

Zusammengefasst könnte Angiogenin ein diagnostischer und prognostischer Bestandteil sowie ein Therapie überprüfender Marker sein, dessen Anwendung, insbesondere beim Zervixkarzinom, zu klären wäre. Umfangreichere Beobachtungsstudien sind angezeigt.

4.3. Forschungen zu Endoglin

Messungen der MVD (microvessel density) bei 31 Patientinnen mit einem Zervixkarzinom erfolgten mit einer Färbemethode für Endoglin und den Faktor VIII von Brewer et al. 2000. Für Endoglin konnten, im Gegensatz zum Faktor VIII, signifikant erhöhte Gefäßzahlen ermittelt werden. Außerdem zeigte sich eine positive Korrelation sowohl von Endoglin als auch von Faktor VIII bei der Tiefe der Stromalen Invasion. Bezüglich des Lymphknotenmetastasen-status ergab sich jedoch nur für Endoglin eine statistische Signifikanz.

Takahashi et al. präsentierten 2001 in ihren Studien, dass sich signifikant erhöhte Serumendoglinkonzentrationen bei Patienten mit metastasiertem Mamma- und kolorektalem Karzinom fanden. Zusätzlich konnte der suppressive Effekt einer Chemotherapie auf die erhöhten Endoglinwerte beschrieben werden.

Andere Studien profilierten Endoglin als einen Marker für das Überleben bei soliden Tumoren [Duff et al. 2003].

Arbeiten, die sich mit der Messung der Mikrogefäßdichte (MVD) per Anwendung von Antikörpern gegen Endoglin (CD105) auseinandersetzten, zeigten, dass Endoglin im Vergleich zu panendothelialen Markern (von Willebrand Faktor [vWF], CD31 und CD34) eine größere Spezifität zu den Tumorgefäßen besaß [Balza et al. 2001, Burrows et al. 1995, Brewer et al. 2000, Tanaka et al. 2001].

Bei Saad et al. 2003 konnte für Endoglin bei Endometriumkarzinompatientinnen eine signifikant höhere Mikrogefäßdichte als für CD31 festgestellt werden. Eine positive Korrelation bestand für den Faktor Endoglin bezüglich der angiolymphatischen Invasion, der Lymphknotenmetastasen sowie des Tumorstadiums.

In einer Arbeit von Saad et al. 2004 wurde ebenfalls Endoglin als ein besser spezifischer und sensitiver Marker als die bisher verwendeten panendothelialen Marker für die Bestimmung der Mikrogefäßdichte bei Kolonkarzinompatienten identifiziert. Bei der Endoglinfärbung zeigte sich in dieser Studie eine prognostische Signifikanz mit positiver Korrelation in der Gegenwart von angiolymphatischer Invasion, Lymphknotenmetastasen, Tumorstadium sowie bei Lebermetastasen.

Minhajet et al. wiesen 2006 Endoglin als einen spezifischeren Marker der Tumorangiogenese von Hirntumoren, Bronchial-, Mamma-, Magen- und Kolonkarzinomen nach.

In der von mir durchgeführten Beobachtung fanden sich die geringsten Endoglinkonzentrationen bei Patientinnen mit einem Rezidiv. Ebenfalls wiesen Frauen mit positivem M-Status, im Vergleich zum fehlenden Fernmetastasenbefall, signifikant erniedrigte Endoglinwerte auf.

Bezüglich der Überlebenszeiten ergab sich für den Parameter Endoglin kein signifikanter Unterschied. Jedoch hatten Frauen mit $\geq 3,94$ ng/ml liegender Endoglinkonzentration im Mittel eine 30 Monate längere Überlebenszeit.

Zusammengefasst stellen in meiner durchgeführten Studie reduzierte Endoglinwerte, im Gegensatz zu der bisher beschriebenen Literatur, eine schlechtere Prognose beim Zervixkarzinom dar, wohingegen erhöhte Endoglin Spiegel mit einer längeren Überlebenszeit einhergehen.

Um Endoglin letztlich als Marker einsetzen zu können, wäre es erforderlich, einen Nulllinienwert im Serum zu erfassen. Dazu bedarf es der Anwendung eines Serumassays, der während eines Routinescreenings regelmäßig bei gesunden Individuen durchgeführt werden müsste, ökonomisch jedoch kaum realisierbar.

Alternativ bestünde die Möglichkeit, die Endoglinkonzentration von Patienten vor und nach Tumorresektion und/oder Chemotherapie kontinuierlich zu quantifizieren [Takahashi et al. 2001].

Eine besondere Bedeutung kommt den jungen Frauen während der Reproduktionsphase und Patienten mit chronischen Entzündungen (Psoriasis, rheumatoide Arthritis u.a.) zu, da diese erhöhte Endoglin Spiegel aufweisen [Folkman 1985]. Grundsätzlich liegt der Vorteil des Endoglins in der Tatsache begründet, dass es vorzugsweise nur in Gefäßen, die der Neoangiogenese unterliegen, ausgeschüttet wird. Es wäre dann zwischen Entzündung und Tumor zu unterscheiden.

Bereits im Jahr 1999 konnte von Matsuno et al. und Tabata et al. Endoglin als ein Ziel in der tumorassoziierten Antiangiogenesetherapie identifiziert werden.

Beispielsweise wendeten Tabata et al. 125-I markierte Anti-Endoglin monoklonale Antikörper bei Mäusen an, die mit humanen Mammakarzinomzellen beimpft worden waren. Für den monoklonalen Antikörper 125-I fand sich eine signifikante Tumorsuppression. Toxizität und Gewichtsverlust konnten bei den behandelten Mäusen nicht verzeichnet werden. Autoptisch waren nach 100-tägiger Beobachtung auch keine signifikanten Organschädigungen nachweisbar. Tabata et al. zogen die Konsequenz, dass die Anwendung einer Radioimmuntherapie mit 125-I markiertem Anti-Endoglin ein mögliches Ziel der antiangiogenen Therapie darstellt.

4.4. Beobachtungen zum Endostatin

Forschungsergebnisse führten zu der Erkenntnis, dass erhöhte Endostatinspiegel mit vielen Krebsformen assoziiert sind. Beispielsweise präsentierten Feldman et al. 2000 einen Vergleich von Patienten mit einem renalen Klarzellkarzinom zu gesunden Probanden. Er fand signifikant erhöhte Endostatinspiegel bei den Karzinompatienten. Außerdem zeigte sich eine Korrelation dieser gesteigerten Endostatinspiegel mit VEGF (vascular endothelial growth factor) bei Patienten mit dem Klarzellkarzinom. Er konstatierte, dass erhöhte Endostatinkonzentrationen eine kompensatorische Antwort auf den angiogenen Phänotyp des Klarzellkarzinoms darstellen.

2001 untersuchten Feldman et al. 44 Patienten mit einem Weichteilsarkom. Auch hier zeigten sich, im Vergleich zu gesunden Individuen, signifikant erhöhte Endostatinkonzentrationen. Diese konnten in einigen Fällen mit einer gesteigerten Tumoraggressivität des Primärtumors in Verbindung gebracht werden.

Bei einer weiteren Studie von Bono et al. 2003 erfolgte die Beobachtung an Patienten mit einem Non-Hodgkin-Lymphom. Auch hier fanden sich erhöhte Endostatinspiegel in der erkrankten Gruppe. Zusätzlich assoziierten die erhöhten Endostatinkonzentrationen signifikant mit fortgeschritteneren Krankheitsstadien sowie mit erhöhten VEGF-Spiegeln. Eine schlechtere Prognose war zu verzeichnen.

Bei Patienten mit einem kleinzelligen Lungenkarzinom konnten Iizasa et al. 2004 nachweisen, dass die Expression von Kollagen XVIII mit einem schlechteren Outcome bei diesen Patienten sowie mit höher zirkulierenden Endostatinkonzentrationen einhergingen.

Musso et al. 2001 beschrieben in ihren Berichten die Auswirkungen niedriger Endostatinspiegel. Diese gingen mit einem gesteigerten Tumorwachstum sowie einem

höheren Grad der histologischen Differenzierung bei Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom einher.

Zorick et al. 2001 fanden bei der Untersuchung von Patienten mit einem Downsyndrom, verglichen mit gesunden Individuen, erhöhte Endostatinspiegel bei der Trisomie 21.

Basierend auf der Behauptung, dass um ein Drittel erhöhte Endostatinkonzentrationen das Wachstum solider Tumoren hemmt, stellte der Autor die Hypothese auf, es sei der Grund für die geringe Inzidenz von soliden Tumoren bei dieser Patientengruppe.

Sund et al. stellten 2005 an Endostatin überexprimierten Mäusen des Wild- und des Zuchttypes, nach Implantation von Melanomzellen des Typs B16F10, 1,6-fach höher zirkulierende Endostatinwerte bei Zuchtmäusen fest. Dies führte bei Letztgenannten zu einer signifikanten Suppression des Tumorwachstums und zu einer deutlichen Reduktion der Blutgefäßanzahl. Es konnte somit gezeigt werden, dass 1,6-fach erhöhte Endostatinspiegel zu einer Veränderung der angiogenetischen Balance führen.

Sund et al. meinten, den experimentellen Beweis für die o.g. Hypothese von Zorick geführt zu haben, erhöhte zirkulierende Endostatinkonzentrationen stellen bei Patienten mit Trisomie 21 einen Schutz gegen das Wachstum von soliden Tumoren dar.

Mittlerweile liegen auch über den therapeutischen Einsatz des Endostatins mehrere Studien vor.

Kisker et al. beschrieben 2001 in der 1. Phase der klinischen Testung von Endostatin an Mäusen mit einer Tumorerkrankung, dass die kontinuierliche intraperitoneale Gabe via Pumpe, in deutlich reduzierten Dosen, im Vergleich mit der subkutanen Bolusgabe zu einer effektiveren Tumorsuppression führt.

In einer weiteren Phase I Studie von Thomas et al. 2003 an 21 Menschen mit soliden Tumoren erfolgte täglich die einstündige intravenöse Infusion über 28 Tage von rekombinantem menschlichen Endostatin. Diese wurde bis zu einer Dosis von 300 mg/m² gut toleriert, jedoch blieben klinische Resultate aus. Außerdem konnten keine statistisch verwertbaren Unterschiede der VEGF-Konzentrationen vor und nach Endostatingabe, egal welche Dosis verabreicht wurde, verzeichnet werden. Vereinzelt beobachtete VEGF-Konzentrationsabnahmen korrelierten in dieser Studie jedoch nicht positiv mit der Progressionszeit. Schlussfolgernd war eine tägliche intravenöse Endostatingabe für eine breite therapeutische Anwendung nicht haltbar. Besser wäre wahrscheinlich die Kombination von Radio- oder Chemotherapie mit der zusätzlichen Gabe einer antiangiogenen Substanz.

Bei meinen Untersuchungen fanden sich signifikant erhöhte Endostatinkonzentrationen in der Gruppe mit einem Rezidiv des Zervixkarzinoms, im Vergleich zu CIN- und FIGO-Stadien.

Weiterhin konnten hohe Endostatinkonzentrationen bei Patienten mit einem positiven Lymphknotenbefall, bei Vorhandensein von Fernmetastasen und bei dem am schlechtesten differenzierten Tumor (G3) nachgewiesen werden. Grund dieser Erhöhung könnte ein kompensatorischer Anstieg der Angiogeneseinhibitoren, bei gestörtem angiogenetischen Gleichgewicht mit Überwiegen der Stimulatoren, sein, wie bereits Feldmann et al. 2000 als Hypothesen aufstellten.

Widersprüchlich ist allerdings die signifikant längere Überlebenszeit bei Patienten mit erhöhten Endostatinspiegeln. Grundlage dieses Resultates sind möglicherweise die unterschiedlichen Beobachtungszeiten bei FIGO- und Rezidivpatienten.

In meiner hier durchgeführten Studie müssen die erhöhten Endostatinspiegel allerdings teilweise kritisch betrachtet werden, weil eine gesunde Kontrollgruppe nicht untersucht wurde.

Fakt ist jedoch, dass das Endostatin einen Inhibitor des angiogenetischen Prozesses darstellt, dessen Einsatz in der Therapie eine grundlegende, möglicherweise in Kombination mit bisherigen Verfahren (Chemo- und Radiotherapie) oder mit einem weiteren Angiogeneseinhibitor, Bedeutung hat.

Nicht kritiklos sollte man bei der Behandlung von Tumorpatienten mit antiangiogenetischen Substanzen vorgehen, da die Hemmung des Wundheilungsprozesses ein entscheidendes Problem darstellt.

4.5. Fazit

Abschließend ist festzustellen, dass die weitere Erforschung von Screeningfaktoren und die Entwicklung neuer Therapiekonzepte einen innovativen Fortschritt bei der Erkennung, Beobachtung und Behandlung des Zervixkarzinoms darstellen werden.

Dabei spielt auch die Behandlung bzw. der primäre Einschluss von Patienten in Studien, in denen Therapieentscheidungen adäquat umgesetzt und nach evidenzbasierten Kriterien verlaufen, eine entscheidende Rolle.

Es ist anzunehmen, dass diese innovativen Therapiestrategien multiple molekulare Strukturen angehen und mehrere verschiedene Zielstrukturen innerhalb der Angiogenese in der Therapie kombiniert werden müssen, um die Effektivität der Prognose und Behandlung zu verbessern.

Im Vordergrund stehen allerdings weiterhin die Vorsorgeuntersuchungen sowie die Teilnahme an der Impfprophylaxe, die folglich in den kommenden Jahren die Inzidenz des Zervixkarzinoms senken wird.

5. Zusammenfassung

Einleitung: Das Zervixkarzinom stellt einen der häufigsten bösartigen Tumore der Frau dar. In Europa sterben trotz vielfach etablierter Screening-Methoden und optimierter Therapie ca. 40 Frauen pro Tag an einem Zervixkarzinom [Boeing et al. 2007].

In der Arbeit sind die Präkanzerosen CIN I–III, FIGO-Stadien I–IV und Rezidivtumore betrachtet worden. Die Therapie erfolgt stadienabhängig.

Ein Meilenstein ist die Entwicklung von Impfstoffen, da eine Verbreitung des humanen Papillomavirus bei fast allen Zervixkarzinomen nachweisbar ist [Boeing et al. 2007].

Die Früherkennung des Tumors spielt eine entscheidende Rolle. Die Hauptursache, eine Infektion mit den humanen Papillomaviren Typ 16 und 18, kann bereits mit einer Zellveränderung rechtzeitig erkannt werden. Diese Routineuntersuchung erfolgt ab dem 20. Lebensjahr einmal pro Jahr.

Aktuell im Mittelpunkt stehend ist der Zusammenhang von Tumorwachstum und Angiogenese. Nur wenn die Gefäßversorgung sichergestellt ist, kann ein Tumor in größerem Umfang wachsen. Patienten mit einer hohen Gefäßdichte im Tumor haben langfristig eine schlechtere Prognose als Patienten mit einer niedrigen Gefäßdichte. Die Hemmung der Angiogenese rückt deswegen auch in den Fokus der Tumorthherapie.

Die Neovaskularisation wird von Angiogenesefaktoren stimuliert, aber auch inhibiert.

Stimulatoren sind u.a. Angiogenin, ein Mitglied der Ribonukleasen, und das Endoglin, ein TGF- β -III-Rezeptor. Angiogeneseinhibitoren sind u.a. Endostatin, welches ein Spaltprodukt des Kollagens XVIII darstellt.

Aufgabenstellung: Es ist Ziel der Studie herauszufinden, inwieweit o.g. Faktoren als Screeningwerte anwendbar sind und ob sie den Verlauf des Zervixkarzinoms prognostizieren können.

Methodik: Die vorliegende Untersuchung basiert auf den Daten von 125 erkrankten Frauen der Frauenklinik Charité Berlin, Campus Mitte, wobei 50 Patientinnen ein CIN-Stadium und 51 Frauen FIGO-Stadien aufwiesen. Bei 24 Patientinnen war ein Rezidiv nachgewiesen worden.

Die Konzentrationen der Parameter wurden in den Patientenseren mittels Sandwich-Enzymimmunoassays (ELISA) quantitativ ermittelt.

Ergebnisse: Es erfolgte die Bildung mehrerer Gruppen, in denen das Verhalten der Konzentrationen von Angiogenin, Endoglin und Endostatin betrachtet wurde.

- Bezüglich der Unterscheidung zwischen den Krankheitsstadien CIN, FIGO und Rezidiv ergaben sich für Angiogenin, Endoglin und Endostatin signifikante Ergebnisse ($p < 0,001$).
- Bei der Ermittlung eines statistisch verwertbaren Unterschiedes zwischen den histologischen Typen Plattenepithel-, Adeno- und adenosquamösem Karzinom konnte nur für Angiogenin ein signifikanter Wert von $p = 0,029$ verzeichnet werden.
- Bei einem Lymphknotenbefall und dem Grad der histologischen Differenzierung des Tumors ergaben sich signifikante Unterschiede für alle 3 Parameter (N-Status: Angiogenin $p < 0,001$, Endoglin $p = 0,004$, Endostatin $p < 0,001$; Grading: Angiogenin $p = 0,005$, Endoglin $p = 0,022$, Endostatin $p = 0,006$).
- In den Gruppen Lymphgefäß- und Veneninvasion konnte für keinen Faktor eine Signifikanz ermittelt werden.
- Beim Vergleich der FIGO-I–IV-Stadien untereinander zeigte sich für Angiogenin ein signifikanter Unterschied $p = 0,001$, für Endostatin war lediglich ein Trend zu verzeichnen, mit einem p-Wert von $p = 0,069$.
- Die Betrachtung der Patientinnen im FIGO-Stadium versus Rezidivpatientinnen erbrachte für Angiogenin, Endoglin sowie für Endostatin hochsignifikante Werte von $p < 0,001$.
- Beim Vergleich der Gruppen CINI/II und CIN III bezüglich der Angiogenin-, Endoglin- und Endostatinkonzentrationen konnte nur für Endostatin eine grenzwertige Signifikanz festgestellt werden ($p = 0,061$).
- Bezogen auf die Konzentrationen der Parameter und der Korrelation zum Alter ergaben sich keine klinisch relevanten Ergebnisse.
- Bei der Ermittlung der Untersuchungsergebnisse bei Frauen im prä-, peri- und postmenopausalen Status fanden sich signifikante Ergebnisse nur für Angiogenin ($p = 0,026$) und für Endostatin ($p = 0,001$).
- Bezüglich des Fernmetastasenstatus „ja“ vs. „nein“ zeigten sich für Endostatin und für Angiogenin signifikant erhöhte Werte ($p < 0,001$ bzw. $p = 0,003$) bei Patientinnen mit Fernmetastasen.
Endoglin dagegen präsentierte signifikant erhöhte Konzentrationen bei Frauen ohne Fernmetastasierung ($p = 0,03$).
- In dieser Studie konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Parametern bei HPV-Infektion ermittelt werden.

- Um die Sensitivität und Spezifität von Angiogenin, Endoglin und Endostatin zu errechnen, wurden Trennwerte ermittelt, die sich an den Referenzbereichen der Firma R&D-Systems orientierten. Für Endoglin war bei einem Cut-off-Wert von 3,3 ng/ml und einem Referenzbereich von 2,54–7,06 ng/ml die beste Spezifität mit 90% zu verzeichnen.

Die wiederum beste Sensitivität, jedoch mit geringem prognostischem Aussagewert von 53,3%, zeigte sich bei einem Endoglintrennwert von 4,0 ng/ml.

Bei einem Trennwert der Endostatinkonzentration von 120 ng/ml (Referenzbereich 58–232 ng/ml) ergab sich bei einer Sensitivität von 54,7% und einer Spezifität von 82% das zufriedenstellendste Ergebnis, dessen Aussagekraft dennoch nicht ausreichend ist.

Für Angiogenin wurde ein Trennwert von 300 ng/ml bei einem Referenzbereich von 196–437 ng/ml angenommen. Die Sensitivität lag nur bei 69,3% und die Spezifität bei 72%. Eine weitere Verschiebung des Trennwertes führte zu keiner Verbesserung des Testergebnisses.

- Bezüglich der Überlebenszeiten konnte für Endostatin eine statistisch verwertbare Aussage getroffen werden. Die Überlebenszeit für Frauen mit einer Endostatinkonzentration gleich oder unterhalb von 132,6 ng/ml war signifikant erniedrigt ($p=0,012$).
- In der abschließend durchgeführten Coxregression konnten Fernmetastasierung, Alter sowie die Parameter Endoglin und Endostatin als prognostische Faktoren des Zervixkarzinoms identifiziert werden.

Schlussfolgerung: Die Entdeckung von molekularen Biomarkern ist entscheidend, um den Zusammenhang von Tumorwachstum und Angiogenese besser zu verstehen. Der Einsatz der molekularen Biomarker Angiogenin, Endoglin und Endostatin als validierte Screening- oder Prognosefaktoren, speziell beim Zervixkarzinom, ist zur Zeit nur in bestimmten Situationen angebracht, z.B. in der Nachsorge. Nach Erhebungen werden, trotz eines standardisierten Nachsorgeprotokolls des Zervixkarzinoms, 43% der Rezidive vom Hausarzt erfasst. Die Zeit für ein konzentriertes Handeln bei der Bekämpfung von Krebs drängt, daher muss die onkologische Langzeitbetreuung in qualifizierten Krebszentren erfolgen.

Die Grundlage der Wirkmechanismen von Angiogenin, Endoglin und Endostatin bestimmt auch die Entwicklung therapeutischer Ansätze. Zunächst finden die aus der Werkstatt der Molekularbiologen stammenden Angiogenesehemmer nur Einsatz in den Studienkliniken, aber sie werden in den kommenden Jahren die moderne Krebstherapie bestimmen.

Schlüsselwörter: Angiogenese, Angiogenin, Endoglin, Endostatin, Zervixkarzinom

6. Literatur

1. Abdollahi A. ; Hahnfeldt P. ; Maercker C. ; Grone H.J. ; Debus J. et al.: Endostatin's antiangiogenic signaling network. *Mol. Cell.* 13 (2004), S. 649–663
2. Acharya, K. R. ; Shapiro, R. ; Allen, S.C. ; Riordan, J.F. ; Vallee, B.L.: Crystal structure of human angiogenin reveals the structural basis for its functional divergence from ribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 91 (1994), S. 2915–2919
3. Alexandrakis, M.G. ; Passam, F.H. ; Pappa, C.A. ; Sfiridaki, K. ; Tsirakis, G. et al.: Relation between bone marrow angiogenesis and serum levels of angiogenin in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* 29 (2005), S. 41–46
4. Attisano, L. ; Wrana, J.L.: Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296 (2002), S. 1646–1647
5. Balza, E. ; Castellani, P. ; Zulstra, A. ; Neri, D. ; Zardi, L. ; Siri, A: Lack of specificity of endoglin expression for tumor blood vessels. *Int. J. Cancer* 94 (2001), S. 579–585
6. Beintema, J.J. ; Schüller, C. ; Irie, M. ; Carsana, A.: Molecular evolution of the ribonuclease superfamily. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 51 (1988), S. 165–192
7. Bellón, T. ; Corbí, A. ; Lastres, P. ; Calés, C. ; Cebrián, M. et al.: Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor- β -binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur. J. Immunol.* 23 (1993), S. 2340–2345
8. Berg, J.-M. ; Stryer, L. ; Tymoczko, J.-L.: *Biochemistry*. New York : WH Freeman and Company, 2002, S. 160–165
9. Bernabeu, C. ; Conley, B.A. ; Vary, C.P.H.: Novel Biochemical Pathways of Endoglin in Vascular Cell Physiology. *J. Cell. Biochem.* 102 (2007), S. 1375–1388
10. Bloch, W. ; Huggel, K. ; Sasaki, T. ; Grose, R. ; Bugnon, P. et al.: The angiogenesis inhibitor endostatin impairs blood vessel maturation during wound healing. *FASEB J.* 14 (2000), S. 2373–2376
11. Bodner-Adler, B. ; Hefler, L. ; Bodner, K. ; Leodolter, S. ; Frischmuth, K. et al.: Serum levels of angiogenin (ANG) in invasive cervical cancer and in cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Anticancer Res.* 21 (2001), S. 809–812

12. Boeing, C. ; Kimmig, R.: Therapieentscheidung beim Zervixkarzinom: Was müssen Sie berücksichtigen? *MMW-Fortschr. Med.* 12 (2007), S. 32–34
13. Bono, P. ; Teerenhovi, L. ; Joensuu, H.: Elevated serum endostatin is associated with poor outcome in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Cancer* 97 (2003), S. 2767–2775
14. Botella, L.M. ; Sanchez-Elsner, T. ; Sanz-Rodriguez, F. ; Kojima, S. ; Shimada, J. et al.: Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signalling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood* 100 (2002), S. 4001–4010
15. Brewer, C.A. ; Setterdahl, J.J. ; Li, M.J. ; Johnston, J.M. ; Mann, J.L. ; Mcasey, M.E.: Endoglin expression as a measure of microvessel density in cervical cancer. *Obstet. Gynecol.* 96 (2000), S. 224–228
16. Burrows, F.J. ; Derbyshire, E.J. ; Tazzari, P.L. ; Amlot, P. ; Gazdar, A.F. et al.: Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin. Cancer. Res.* 1 (1995), S. 1623–1634
17. Cheifetz, S. ; Bellón, T. ; Cale's, C. ; Vera, S. ; Bernabéu, C. et al.: Endoglin is a component of the transforming growth factor- β receptor system in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 267 (1992), S. 19027–19030
18. Chen, J.X. ; Gao, Y. ; Liu, J.W. ; Tian, Y.X. ; Zhao, J. ; Cui, X.Y.: Antitumor effects of human ribonuclease inhibitor gene transfected on B16 melanoma cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 37 (2005), S. 1219–1231
19. Conley, B.A. ; Koleva, R. ; Smith, J.D. ; Kacer, D. ; Zhang, D. et al.: Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain. *J. Biol. Chem.* 279 (2004), S. 27440–27449
20. Conley, B.S. ; Smith, J.D. ; Guerrero-Esteo, M. ; Bernabéu, C. ; Vary, C.P.H.: Endoglin, a TGF-beta receptor associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 153 (2000), S. 323–335
21. DGGG (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V.): Leitlinien, Empfehlungen, Stellungnahmen 1 (2008)

22. Dhanabal, M. ; Ramchandran, R. ; Waterman, M. J.F. ; Lu, H. ; Knebelmann, B. et al.: Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274 (1999), S. 11721–11726
23. Dickinson, A.J. ; Fox, S.B. ; Persad, R.A.: Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinoma. *Br. J. Urol.* 74 (1994), S. 762–766
24. Ding, Y.H. ; Javaherian, K. ; Lo, K.M. ; Chopra, R. ; Boehm, T. et al.: Zinc-dependent dimers observed in crystals of human endostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998), S. 10443–10448
25. Duff S. E. ; Li C. ; Garland J. M. ; Kumar S.: CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.* 17 (2003), S. 984–992
26. Escudier, B. ; Pluzanska, A. ; Koralewski, P. ; Ravaud, A. ; Bracarda, S. et al.: Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* 370 (2007), S. 2103–2111
27. Feige, A. ; Rempfen, A. ; Würfel, W. ; Jawny, J. ; Caffier, H. (Hrsg.): *Frauenheilkunde – Fortpflanzungsmedizin, Geburtsmedizin, Onkologie.* Auflage 2, München, Jena : Urban & Fischer, 2001
28. Feldman, A.L. ; Pak, H. ; Yang, J.C. ; Alexander, H.R. ; Libutti, S.K.: Serum endostatin levels are elevated in patients with soft tissue sarcoma. *Cancer* 91 (2001), S.1525–1529
29. Feldman, A.L. ; Tamarkin, L. ; Paciotti, G.F. ; Simpson, B.W. ; Linehan, W.M. et al.: Serum endostatin levels are elevated and correlate with serum vascular endothelial growth factor levels in patients with stage IV clear cell renal cancer. *Clin. Cancer Res.* 6 (2000), S. 4628–4634
30. Fett, J.W. ; Strydom, D.J. ; Lobb, R.R. ; Alderman, E.M. ; Bethune, J.L. et al.: Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* 24 (1985), S. 5480–5486
31. Folkman, J.: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Natur Med.* 1 (1995), S. 27–31

32. Folkman, J.: Angiogenese. In: Dietel, M. ; Dudenhausen, J. ; Suttorp, N. (Hrsg.): Charité Harrsions – Innere Medizin. Auflage 15, Berlin : ABW-Wissenschaftsverlag, 2001, S. 575–587
33. Folkman, J.: Tumor angiogenesis. *Adv. Cancer Res.* 43 (1985), S. 175–203
34. Fonsatti, E. ; Maio, M.: Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J. Transl. Med.* 2 (2004), 18
35. Gougos, A. ; Letarte, M.: Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 265 (1990), S. 8361–8364
36. Goumans, M.J. ; Valdimarsdottir, G. ; Itoh, S. ; Rosendahl, A. ; Sideras, P. ; ten Dijke, P.: Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- β type I receptor. *EMBO J.* 21 (2002), S. 1743–1753
37. Guerrero-Esteo, M. ; Sanchez-Elsner, T. ; Letamendia, A. ; Bernabéu, C.: Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor beta receptors I and II. *J. Biol. Chem.* 277 (2002), S. 29197–29209
38. Gupta, M.K. ; Qin, R.Y.: Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J. Gastroenterol.* 9 (2003), S. 1144–1155
39. Hallahan, T.W. ; Shapiro, R. ; Vallee, B.L.: Dual site model for the organogenic activity of Angiogenin. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991), S. 2222–2226
40. Hayes, A.-J. ; Li, L.-Y. ; Lippman, M.-E.: Antivascular therapy: a new approach to cancer treatment. *Br. med. J.* 318 (1999), S. 853–856
41. Herbst, R.S. ; Mullani, N.A. ; Davis, D.W. ; Hess, K.R. ; McConkey, D.J. et al.: Development of biologic markers of response and assessment of antiangiogenic activity in a clinical trial of human recombinant endostatin. *J. Clin. Oncol.* 20 (2002), S. 3804–3814
42. Hu, G.F. ; Riordan, J.F. ; Vallee, B.L.: A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), S. 2204–2209
43. Hurwitz, H. ; Fehrenbacher, L. ; Novotny, W. ; Cartwright, T. ; Hainsworth, J. et al.: Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *New. Engl. J. Med.* 350 (2004), S. 2335–2342

44. Iizasa, T. ; Chang, H. ; Suzuki, M. ; Otsuji, M. ; Yokoi, S. et al.: Overexpression of collagen XVIII is associated with poor outcome and elevated levels of circulating serum endostatin in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 10 (2004), S. 5361–5366
45. Kaku, T. ; Hirakawa, T. ; Kamura, T. ; Amada, S. ; Kinukawa, N. et al.: Angiogenesis in Adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 7 (1998), S. 1384–1390
46. Kim, Y.M. ; Hwang, S. ; Kim, Y.M. ; Pyun, B.J. ; Kim, T.Y. et al.: Endostatin blocks VEGF-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *J. Biol. Chem.* 277 (2002), S. 27872–27879
47. Kisker, O. ; Becker, C. M. ; Prox, D. ; Fannon, M. ; D’Amato, R. et al.: Continuous administration of endostatin by intraperitoneally implanted osmotic pump improves the efficacy and potency of therapy in a mouse xenograft tumor model. *Cancer Res.* 61 (2001), S. 7669–7674
48. Kolben, M. ; Blaser, J. ; Ulm, K. ; Schmitt, M. ; Schneider, K.T. et al.: Angiogenin plasma levels during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 176 (1997), S. 37–41
49. Kumar, S. ; Ghellal, A. ; Li, C. ; Byrne, G. ; Haboubi, N. et al.: Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res.* 59 (1999), S. 856–861
50. Kumar, P. ; Wang, J.M. ; Bernabéu, C.: CD 105 and angiogenesis. *J. Pathol.* 178 (1996), S. 363–366
51. Lastres, P. ; Letamendia, A. ; Zhang, H. ; Rius, C. ; Almendro, N. et al.: Endoglin modulates cellular responses to TGF- β 1. *J. Cell Biol.* 133 (1996), S. 1109–1121
52. Leask, A. ; Abraham, D.J. ; Finlay, D.R. ; Holmes, A. ; Pennington, D. et al.: Dysregulation of transforming growth factor beta signaling in scleroderma: overexpression of endoglin in cutaneous scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 46 (2002), S. 1857–1865
53. Lebrin, F. ; Deckers, M. ; Bertolino, P. ; ten Dijke, P.: TGF- β receptor function in the endothelium. *Cardiovasc. Res.* 65 (2005), S. 599–608
54. Lebrin, F. ; Goumans, M. J. ; Jonker, L. ; Carvalho, R. L. ; Valdimarsdottir, G. et al.: Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF- β /ALK1 signal transduction. *EMBO J.* 23 (2004), S. 4018–4028

55. Li, C. ; Hampson, I.N. ; Hampson, L. ; Kumar, P. ; Bernabeu, C. ; Kumar, S.: CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor β 1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J.* 14 (2000), S. 55–64
56. Ma, X. ; Labinaz, M. ; Goldstein, J. ; Miller, H. ; Keon, W.J. et al.: Endoglin Is Overexpressed After Arterial Injury and Is Required for Transforming Growth Factor- β -Induced Inhibition of Smooth Muscle Cell Migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (2000), S. 2546–2552
57. Macchiarini, P. ; Fontani, G. ; Hardin, M.J.: Relation of neovascularization to metastasis of non-small cell lung cancer. *Lancet* 340 (1992), S. 145–146
58. Marazuela, M. ; Sanchez-Madrid, F. ; Acevedot, A. ; Larrangat, E. ; De Landazuri, M.: Expression of vascular adhesion molecules on human endothelia in autoimmune thyroid disorders. *Clin. Exp. Immunol.* 102 (1995), S. 328–334
59. Marneros, A.G. ; Olsen, B.R.: Physiological role of collagen XVIII and endostatin *FASEB J.* 19 (2005), S. 716–728
60. Matousek, J. ; Soucek, J. ; Riha, J. ; Zankel, T.R. ; Benner, S.A.: Immunosuppressive activity of angiogenin in comparison with bovine seminal ribonuclease and pancreatic ribonuclease. *Comp. Biochem. Physiol. B* 112 (1995), S. 235–241
61. Matsuno, F. ; Haruta, Y. ; Kondo, M. ; Tsai, H. ; Barcos, M. ; Seon, B.K.: Induction of lasting complete regression of performed distinct solid tumors by targeting the tumor vasculature using two new anti-endoglin monoclonal antibodies. *Clin. Cancer Res.* 5 (1999), S. 371–382
62. McAllister, K.A. ; Grogg, K.M. ; Johnson, D.W. ; Gallione, C.J. ; Baldwin, M.A. et al.: Endoglin, a TGF- β binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat. Genet.* 8 (1994), S. 345–351
63. Meng, Q.J. ; Lux, A. ; Holloschi, A. ; Li, J. ; Hughes, J.M.X. et al.: Identification of Tctex2 β , a Novel Dynein Light Chain Family Member That Interacts with Different Transforming Growth Factor- β Receptors. *J. biol. Chem.* 281 (2006), S. 37069–37080
64. Miller, K. ; Wang, M. ; Gralow, J. ; Dickler, M. ; Cobleigh, M. et al.: Paclitaxel plus Bevacizumab versus Paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *New. Engl. J. Med.* 357 (2007), S. 2666–2676

65. Minhajat, R. ; Mori, D. ; Yamasaki, F. ; Sugita, Y. ; Satoh, T. ; Tokunaga, O.: Organ-specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancers. *Pathol. Int.* 56 (2006), S. 717–723
66. Miosge, N. ; Sasaki, T. ; Timpl, R.: Angiogenesis inhibitor endostatin is a distinct component of elastic fibers in vessel walls. *FASEB J.* 13 (1999), S. 1743–1750
67. Miyazono K.: Positive and negative regulation of TGF- β signaling. *J. Cell Sci.* 113 (2000), S. 1101–1109
68. Musolino, C. ; Alonci, A. ; Bellomo, G. ; Loteta, B. ; Quartarone, E. et al.: Levels of soluble angiogenin in chronic myeloid malignancies: clinical implications. *Eur. J. Haematol.* 72 (2004), S. 416–419
69. Musso, O. ; Rehn, M. ; Theret, N. ; Turlin, B. ; Bioulac-Sage, P. et al.: Tumor progression is associated with a significant decrease in the expression of the endostatin precursor collagen XVIII in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* 61 (2001), S. 45–49
70. Oh, S. P. ; Muragaki, Y. ; Kamagata, Y. ; Timmons, S. ; Ooshima, A. ; Olsen, B. R. : Isolation and sequencing of cDNAs for proteins with multiple domains of Gly-Xaa-Yaa repeats identify a distinct family of collagenous proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994), S. 4229–4233
71. Olson K. A. ; French T. C. ; Vallee B. L. ; Fett J. W.: A monoclonal antibody to human angiogenin suppresses tumor growth in athymic mice. *Cancer Res.* 54 (1994), S. 4576–4579
72. O'Reilly, M.S.; Boehm, T.; Shing, Y.; Fukai, N.; Vasios, G. et al.: Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88 (1997); S. 277–285
73. Ortega, N. ; Werb, Z.: New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *J. Cell. Sci.* 115 (2002), S. 4201–4214
74. Polakowski, I.J. , Lewis, M.K. , Muthukkaruppan, V.R. ; Erdman, B. ; Kubai, L. ; Auerbach, R.: A ribonuclease inhibitor expresses anti-angiogenic properties and leads to reduced tumor growth in mice. *Am. J. Pathol.* 143 (1993), S. 507–517

75. Rehn, M. ; Pihlajaniemi, T.: $\alpha 1(\text{XVIII})$, a collagen chain with frequent interruptions in the collagenous sequence, a distinct tissue distribution, and homology with type XV collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994), S. 4234–4238
76. Rehn, M. ; Veikkola, T. ; Kukk-Valdre, E. ; Nakamura, H. ; Ilmonen, M. et al.: Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001), S. 1024–1029
77. Riordan, J.F.: Structure and Function of Angiogenin. In: D’Alessio, G. ; Riordan, J. F. (Hrsg.): *Ribonucleases: Structures and Functions*. New York : Academic Press, 1997, S. 445–489
78. Rössner, A. ; Pfeiffer, U. ; Müller-Hermelink, H.K.: *Allgemeine Pathologie*. München : Urban und Fischer, 2004, S. 189–248
79. Saad, R.S. ; Jasnosz, K.M. ; Silverman, J.F.: Endoglin (CD105) expression in endometrial carcinoma. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 22 (2003), S. 248–253
80. Saad, R.S. ; Liu, Y.L. ; Nathan, G. ; Celebrezze, J. ; Medich, D. ; Silverman, J.F.: Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod. Pathol.* 17 (2004), S. 197–203
81. Sandler, A. ; Gray, R. ; Perry, M.C. , Brahmer, J. ; Schiller, J.H. et al.: Paclitaxel-Carboplatin alone or with Bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *New. Engl. J. Med.* 355 (2006), S. 2542–2550
82. Schmidt-Petruschkat, S.: Was der Hausarzt über die HPV-Impfung wissen sollte. *MMW-Fortschr. Med.* 12 (2007), S. 29–31
83. Shapiro, R. ; Riordan, J.F. ; Vallee, B.L.: Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Biochemistry* 25 (1986), S. 3527–3532
84. Sheen-Chen, S.M. ; Eng, H.L. ; Chen, W.J. ; Chou, F.F. ; Chen, H.S.: Serum level of angiogenin in breast cancer. *Anticancer Res.* 20 (2000), S. 4769–4771
85. Shimoyama, S. ; Kaminishi, M.: Angiogenin in sera as an independent prognostic factor in gastric cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 129 (2003), S. 239–244
86. Srivastava, A. ; Laidler, P. ; Davies, R.P. ; Horgan, K. ; Hughes, L.E.: The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate thickness (0.76–4.0mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study. *Am. J. Pathol.* 133 (1988), S. 419–423

87. Sund, M. ; Hamano, Y. ; Sugimoto, H. ; Sudhakar, A. ; Soubasakos, M. et al.: Function of endogenous inhibitors of angiogenesis as endothelium-specific tumor suppressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005), S. 2934–2939
88. Strydom, D.J.: The angiogenins. *Cell. mol. life sci.* 54 (1998), S. 811–824
89. Strydom, D.J. ; Fett, J.W. ; Lobb, R.R. ; Alderman, E.M. ; Bethune, J.L. et al.: Amino acid sequence of tumour derived Angiogenin. *Biochemistry* 24 (1985), S. 5486–5494
90. Tabata, M. ; Kondo, M. ; Haruta, Y. ; Seon, B.K.: Antiangiogenic radioimmunotherapy of human solid tumors in SCID mice using (125)I-labeled anti-endoglin monoclonal antibodies. *Int. J. Cancer* 82 (1999), S. 737–742
91. Takahashi, N. ; Kawanishi-Tabata, R. ; Haba, A. ; Tabata, M. ; Haruta, Y. et al.: Association of Serum Endoglin with Metastasis in Patients with Colorectal, Breast, and Other Solid Tumors, and Suppressive Effect of Chemotherapy on the Serum Endoglin. *Clin. Cancer Res.* 7 (2001), S. 524–532
92. Tanaka, F. ; Otake, Y. ; Yanagihara, K. ; Kawano, Y. ; Miyahara, R. et al.: Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin. Cancer Res.* 7 (2001), S. 3410–3415
93. Tello-Montoliu, A. ; Patel, J.V. ; Lip, G.Y.: Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications. *J. Thromb. Haemost.* 4 (2006), S. 1864–1874
94. Ten Dijke, P. ; Goumans, M.J. ; Pardali, E.: Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* 11 (2008), S. 79–89
95. Thomas, J. P. ; Arzoomanian, R. Z. ; Alberti, D. ; Marnocha, R. ; Lee, F. et al.: Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of Recombinant Human Endostatin in Patients With Advanced Solid Tumors. *J. Clin. Oncol.* 21 (2003), S. 223–231
96. Tsuchiya, T. ; Akamine, S. ; Muraoka, M. ; Kamohara, R. ; Tsuji, K. et al.: Stage IA non-small cell lung cancer: vessel invasion is a poor prognostic factor and a new target of adjuvant chemotherapy. *Lung Cancer* 56 (2007), S. 341–348
97. Vallee, B. L. ; Riordan, J. F.: Organogenesis and angiogenin. *Cell. mol. life sci.* 53 (1997), S. 803–815

98. Weidner, N. ; Carroll, P.R. ; Flax, J. ; Blumenfeld, W. ; Folkman, J.: Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am. J. Pathol.* 143 (1993), S. 401–409
99. Weidner, N. ; Semple, J.P. ; Welch, W.R.: Tumor angiogenesis and metastasis: Correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 324 (1991), S. 1–8
100. Wickström, S. A. ; Veikkola, T. ; Rehn, M. , Pihlajaniemi, T. ; Alitalo, K. ; Keski-Oja, J.: Endostatin-induced modulation of plasminogen activation with concomitant loss of focal adhesions and actin stress fibers in cultured human endothelial cells. *Cancer Res.* 61(2001), S. 6511–6516
101. Wiggins, D.L. ; Granai, C.O. ; Steinhoff, M.M.: Tumor angiogenesis as a prognostic factor in cervical carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 56 (1995), S. 353–356
102. Wulf, K.H. ; Schmidt-Matthiesen, N.: *Allgemeine gynäkologische Onkologie, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Band 10.* München, Wien, Baltimore : Urban und Schwarzenberg, 1991
103. Zatterstrom, U.K. ; Felbor, U. ; Fukai, N. ; Olsen, B.R.: Collagen XVIII/endostatin structure and functional role in angiogenesis. *Cell. Struct. Funct.* 25 (2000), S. 97–101
104. Zeller, W.J. ; ZurHausen, H. (Hrsg.) : *Onkologie: Grundlagen – Diagnostik – Therapie – Entwicklungen.* 1. Auflage, Landsberg/Lech : Ecomed, 1996
105. Zorick, T.S. ; Mustacchi, Z. ; Bando, S.Y. ; Zatz, M. ; Moreira-Filho, C.A. et al.: High serum endostatin levels in Down syndrome: implications for improved treatment and prevention of solid tumours. *Eur. J. Hum. Genet.* 9 (2001), S. 811–814

Danksagung

Mein Dank richtet sich ganz besonders an Prof. Dr. W. Lichtenegger, Chefarzt der Klinik für Gynäkologie und Geburtsmedizin an der Charité Universitätsmedizin Berlin Campus Virchow, für die Möglichkeit, diese Dissertation zu verfassen, für die wertvolle Unterstützung sowie für die gewissenhafte Betreuung und Kritik während der Ausformulierung.

Ich danke Frau Susanne Korlach für ihre fachliche Hilfe im Labor bei der Vermittlung von Techniken zur Durchführung der Versuche, die wertvollen Hilfestellungen bei der Auswertung von Daten sowie für die stete Bereitschaft zur Diskussion. Sie ist für mich im Rahmen der Dissertationsabhandlung zu einer liebevollen Vertrauensperson geworden.

Weiterhin gebührt Dank meiner Mutti, Gudrun Mordelt, die unermüdlich die diversen Versionen dieser Arbeit gegengelesen hat und in schwierigen Zeiten es immer wieder verstanden hat, durch stete Motivation, Liebe und Geduld zum Gelingen beizutragen.

Ein Dankeschön auch an alle Familienangehörigen und Freunde für die Hilfestellung und Unterstützung beim Verfassen der Dissertation.

Erklärung

Ich, Konstanze Mordelt, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema - Angiogenin, Endoglin und Endostatin als prognostische Faktoren beim Zervixkarzinom - selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Konstanze Mordelt

Lebenslauf

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