

5. Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diskutiert. Im ersten Teil (5.1.) soll das untersuchte Patientenkollektiv bzw. die Tumore auf Repräsentativität für Patienten mit einem kolorektalen Karzinom im allgemeinen hin untersucht werden. Daran schließt sich in 5.2. und 5.3. ein Vergleich der experimentell ermittelten Ergebnisse bezüglich der Gefäßdichte des Tumors und der bFGF-Expression in Tumorzellen an.

5.1 Krankengut und Tumore

5.1.1. Alters- und Geschlechtsverteilung

Das Durchschnittsalter der untersuchten Patienten beträgt 64.2 Jahre und entspricht damit etwa dem vergleichbarer Untersuchungen anderer Autoren, so z.B. 59 Jahre bei Brandao (119), 67.5 bei Böhm (120) und 69 Jahre bei Chapuis (121).

Beim Vergleich der Altersstrukturen ist die Geschlechtsverteilung zu berücksichtigen. In der vorliegenden Arbeit beträgt das Durchschnittsalter bei den Männern 62.7, bei den Frauen hingegen 65.4. Ein ähnlicher geschlechtsspezifischer Altersunterschied von 2.7 Jahren liegt auch bei Untersuchungen anderer Autoren vor: 2.8 Jahre bei Böhm (120), 3 bei Chapuis (121) und 4.2 Jahren bei Boland (3). Das untersuchte Patientenkollektiv besteht zu 44.5% aus Männern und zu 55.5% aus Frauen. Ein überparitätischer Anteil weiblicher Patienten findet sich auch bei den meisten Kollektiven anderer Autoren, so z.B. von 44% zu 56% bei Böhm (120) und von 46% zu 54% bei Boland (3). Damit kann das untersuchte Patientenkollektiv bezüglich Altersstruktur und Geschlechtsverteilung als repräsentativ angesehen werden.

5.1.2. Tumor

Lokalisation

Der Ort des Tumors innerhalb des Kolons liegt in 52% aller Fälle im Rektum und in 48% im Kolon. Damit ist der Anteil der Rektumkarzinome höher als überwiegend bei anderen Untersuchungen festgestellt wurde: Rektum (36,7%) / Kolon (63,3%) bei Böhm (120), 37% zu 63% bei Boland (3). Im Kolon finden sich die Tumore zu 61%

innerhalb oder links der Flexura lienalis und zu 39% rechts, darunter mit 24,7% am häufigsten im Sigmoidium. Dies stimmt mit Untersuchungen anderer Autoren überein. Gall (122) berichtet über einen Tumoranteil von 40-60% im Rektum und 20-30% im Sigmoidium. Halvorsen (123) ermittelt ein Anteil von 59% im linken und 41% im rechten Kolon. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Bloem (124) mit 65% linksseitigen und 35% rechtsseitigen Kolontumoren bzw. Menke (125) mit einem Verhältnis von 55% zu 45%.

Das untersuchte Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit ist also bezüglich der Lokalisation des Primärtumors im Kolon als repräsentativ anzusehen. Daß der Anteil der Rektumkarzinome höher liegt als im durchschnittlichen Kollektiv der kolorektalen Karzinompatienten, stellt dabei für die zu klärende Fragestellung keine Einschränkung dar, da von einer ähnlichen pathophysiologischen Bedeutung der Angiogenese für Kolon- wie für Rektumkarzinome ausgegangen werden darf. Die durchgeführten Analysen zeigen keine Unterschiede in Bezug auf die Lokalisation des Tumors im Kolon und Rektum. Die Rate von Lokalrezidiven ist bei Rektumkarzinomen etwas höher als bei Kolontumoren (38% vs. 26%), die Metastasierungsrate hingegen niedriger (26% vs. 37%). Diese Unterschiede sind statistisch jedoch noch nicht signifikant.

Tumorstadium

Bei der Auswahl der Patienten wird eine Einschränkung hinsichtlich des Tumorstadiums vorgenommen. Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der Operation eine Metastasierung vorlag, werden nicht in das Kollektiv aufgenommen. Aus diesem Grund fehlen in dem Kollektiv die Patienten mit einem M-Stadium >0 und folglich Patienten mit einem Dukes D bzw. UICC-Stadium IV. Der Vergleich mit der Literatur muß sich also auf die Verteilung innerhalb der Stadien I-III bzw. auf die pT und pN-Kategorien beschränken. Die eigenen Patienten verteilen sich auf die UICC-Stadien I/II/III mit 15%/53%/32%. An wesentlich größeren Kollektiven ist die Verteilung bei Chapuis (121) 13%/47%/39% und bei Böhm (120) 14%/57%/30%. Die Tumore verteilen sich im untersuchten Kollektiv auf die pT-Stadien 1/2/3/4 mit 3%/18%/65%/14%. Bei Hermanek (126) ist die Verteilung mit 9%/19%/61%/11%,

ermittelt in einem Kollektiv von 1833 Patienten, ähnlich. Die Beobachtung, daß die Rektumkarzinome im Vergleich zu den Kolontumoren einen höheren Anteil von niedrigeren Tumorstadien aufweisen (28% pT1/2 vs. 14% pT1/2) findet sich auch bei Böhm (120).

Die Einschränkung des Kollektivs auf R0/ M0-Patienten erfolgt aus zwei Gründen:

- (1) Bei dieser Gruppe handelt es sich um Patienten, darunter insbesondere die mit Stadium III, bei der ein neuer Prognosefaktor für die Therapieplanung hilfreich sein könnte. Ziel ist es, diejenigen Patienten auswählen zu können, die aufgrund einer schlechteren Prognose am deutlichsten von einer adjuvanten Therapie profitieren könnten. Dies ist von erheblicher praktischer Bedeutung, da nur bei 15% der Patienten eine Chemotherapie zur Verlängerung ihrer Lebenszeit beiträgt, während 85% die toxische, mit Nebenwirkungen verbundene und teure Therapie erhalten, ohne daß ein positiver Effekt nachweisbar ist. Hingegen ließe sich mit einer gezielten Auswahl solcher Patienten, die einem erhöhten Risikos eines Tumorrezidivs unterliegen, die Ansprechrate für eine adjuvante Chemotherapie verbessern (127).
- (2) Das Ziel der Arbeit ist es, die Entwicklung der Tumorerkrankung nach Entfernung des Primärtumors hinsichtlich der Bedeutung der Angiogenese in einem frühen und mittleren Stadium an vergleichbaren Patienten bewerten zu können.

Ein Vergleich der hier gewonnenen Ergebnisse mit denen anderer Autoren zeigt, daß sich das Patientenkollektiv, abgesehen von den Einschlußkriterien in den Tumorstadien, nicht von den kolorektalen Karzinompatienten im allgemeinen unterscheidet.

Tumor-Differenzierung

Hinsichtlich der Differenzierung der untersuchten Tumore läßt sich eine weitgehende Übereinstimmung mit den Ergebnissen der herangezogenen Literatur feststellen. So verteilen sich die Tumore auf G1/2/3 in Prozent wie folgt:

- vorliegenden Arbeit: 2 / 73 / 25,
- Chapis (121) bei insgesamt 709 Tumoren: 9 / 62 / 29,

- Gasser (128) bei 310 Tumoren: 9 / 80 / 11,
- Brandao (119) bei 182 Tumoren: 26 / 59 / 15

Anzahl der entfernten Lymphknoten

Nach den Regeln des TNM-Systems müssen zur sicheren pN0- Klassifikation mindestens 12 tumorfreie Lymphknoten beurteilt werden. Nur, wenn die histologische Untersuchung der Tumorresektate nach standardisierter Technik erfolgt, gilt die pN- Klassifikation als hinreichend zuverlässig (43). Bei den Operationen, auf denen diese Arbeit basiert, wurden bei den pN0-Tumoren im Durchschnitt nur 9.4 Lymphknoten entfernt (Minimum: 1, Maximum: 37), mithin also die Regeln der pN- Klassifikation nicht ausreichend umgesetzt. Betrachtet man jedoch die Analyse der Überlebenszeiten getrennt nach Tumorstadien und vergleicht diese mit der Literatur (Kapitel 5.1.5.), dann scheint die hier vorgenommene pN- Klassifikation sich nicht wesentlich von der anderer Autoren zu unterscheiden. Ergänzend ist darauf hinzuweisen, daß in der hinzugezogenen Literatur über die Anzahl der entfernten Lymphknoten keine Angaben gemacht werden.

Gefäß- und Lymphgefäßinvasion

Beim Vergleich mit den zitierten Arbeiten ergibt sich kein einheitliches Bild bezüglich des Anteils von Tumoren mit nachgewiesener Lymphgefäß- oder Blutgefäßinfiltration. Dies hängt mit dem Tumorstadium zum Zeitpunkt der Untersuchung zusammen. In der vorliegenden Arbeit läßt sich in 7.5% aller Fälle eine Blutgefäß- und in 22% eine Lymphgefäßinvasion nachweisen. Bei den Arbeiten anderer Autoren wurden auch weiter fortgeschrittene Tumorstadien eingeschlossen. Daraus ist erklärbar, daß sich höhere Anteile von Lymphangiosisfällen ergeben, so 11% bei Takahashi (129) und sogar 58% bei Tomisaki (130). Die Werte für die Angiosisfälle liegen zwischen 15% bei Takebayashi (131) und 61% bei Tomisaki (130).

5.1.3. Therapie

Bei der Beurteilung der Behandlung der Patienten ist der Behandlungszeitraum und ein zwischenzeitlich verändertes Therapiekonzept zu berücksichtigen. Die dieser Arbeit zugrundeliegende operative Therapie des Kolonkarzinoms erfolgte nach den allgemeinen Richtlinien (132). Auffällig ist dabei der niedrige Anteil der Patienten, die eine adjuvante Chemotherapie erhielten. So wurde nur einem von 23 Patienten mit einem Kolonkarzinom im UICC- Stadium III eine adjuvante Chemotherapie verabreicht, während nach den heute üblichen Empfehlungen alle Patienten mit UICC-Stadium III für eine postoperative Chemotherapie in Frage kämen.

Die kurative Resektion des Rektumkarzinoms hat sich in den letzten Jahren erheblich geändert. Neben der tiefen anterioren Resektion, der koloanalen Anastomose, der Kolon-Pouch-analen Anastomose und der regionalen Lymphadenektomie spielt heute die totale Mesorektum- Exzision (TME) eine wichtige Rolle. Das TME - Verfahren hat erst seit wenigen Jahren Eingang in den klinischen Alltag gefunden. Durch eine minutiöse Entfernung des gesamten Mesorektums in toto unter Respektierung der umgebenden Faszien gelingt es, die Lokalrezidivrate drastisch zu senken und mithin die Überlebensrate zu steigern (133). Dieses Therapiekonzept war zum Zeitpunkt der Operationen, die der vorliegenden Untersuchung zugrunde liegen, noch nicht etabliert.

Eine adjuvante Radiochemotherapie beim Rektumkarzinom ist in den UICC-Stadien II und III indiziert (134). Im untersuchten Kollektiv befinden sich 61 Rektumkarzinompatienten im Stadium II und III. Eine adjuvante Radiochemotherapie wurde in keinem Fall durchgeführt. Von den 76 Patienten mit einem Rektumkarzinom wurden 20 präoperativ, 10 postoperativ und 24 prä- und postoperativ bestrahlt.

Der Chirurg bzw. seine operativen Fähigkeiten stellen besonders beim Rektumkarzinom einen unabhängigen Prognosefaktor dar (46), der allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt wird.

Die oben beschriebenen Veränderungen der Therapiekonzepte in den letzten Jahren erklären möglicherweise die im Vergleich zu aktuell erzielbaren Ergebnissen hohe

Rezidivrate beim hier betrachteten Patientenkollektiv. Dies dürfte keinen Nachteil für die Aussagekraft der vorliegenden Untersuchung darstellen, weil eine vorrangige Zielsetzung der Analyse in der unabhängigen Bedeutung der Angiogenese liegt. Auszuschließen ist allerdings nicht, daß eine gleichartige Untersuchung an einem Patientenkollektiv, bei dem aktuelle Therapierichtlinien berücksichtigt werden, zu abweichenden Resultaten führen könnte.

5.1.4. Rezidivrate

Während der klinischen Untersuchung entwickelten 32% der Patienten ein Lokalrezidiv und weitere 32% eine Fernmetastasierung. Diese Raten liegen höher als diejenigen der vergleichbaren Literatur. Bei Gall (135) wird eine Lokalrezidivrate von 11% bei Kolon- und von 17% bei Rektumkarzinomen genannt und bei Takebayashi (131) eine Rezidivrate von 20% bei kurativ R0-resezierten Tumoren, wobei Lokalrezidive und Fernmetastasen zusammengefaßt sind. Bei der Aufschlüsselung nach Kolon- und Rektumkarzinomen ergeben sich Lokalrezidivraten von 26% bzw. 38%. In den UICC-Tumorstadien der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine höhere Lokalrezidivrate im jeweiligen Tumorstadium, falls der Tumor im Kolon lokalisiert ist, was im Einklang mit den anderen Arbeiten steht. Der Grund der höheren Rezidivraten ist wahrscheinlich in den oben beschriebenen Unterschieden der Behandlung zu sehen. In älteren Arbeiten wird über Rezidivraten von 40% bei kurativ R0-resezierten Tumoren berichtet wie z.B. bei Gore (136).

5.1.5. Überlebensrate

Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt für das gesamte Kollektiv 55%. Dies ist vergleichbar mit Untersuchungen an 1833 Patienten mit einer Überlebensrate von 57% der R0-resezierten Tumorfälle von Hermanek (43). Die Überlebensrate beträgt in den UICC-Stadien I / II / III 86, 53 und 43%. Von Hermanek (43) werden Verteilungen von 76 /65 / 42% und bei Böhm (120) von 84 /42 /37% angegeben.

Zusammenfassend läßt sich über den Vergleich der hier gefundenen Ergebnisse mit denen der einschlägigen Literatur feststellen, daß es sich gemäß der in 3.1.2. erläuterten Einschlußkriterien bei den untersuchten Patienten, um ein selektioniertes

Kollektiv einer Universitätsklinik handelt. Die Patienten zeichnen sich, neben der angegebene Klassifikation ihres Tumors, durch eine regelmäßige Teilnahme an den Nachuntersuchungen aus. Sie unterscheiden sich ansonsten nicht hinsichtlich ihrer Krankheitsverläufe oder Behandlung von anderen Patientenkollektiven mit kolorektalen Karzinomen.

5.2 Angiogenese

5.2.1 Gefäßdichte

Bestimmungsmethode

Die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Ermittlung der Gefäßdichte unterscheiden sich zum Teil erheblich voneinander. In den **Tab. 5-1, 5-2, 5-3** sind relevanten Arbeiten zur Bestimmung der Gefäßdichte beim kolorektalen Karzinom aufgeführt. Die Verfahren lassen sich nach zwei entscheidenden Aspekten unterteilen: der Auswahl

- des verwendeten Antikörpers und
- des Quantifizierungsverfahren für die markierten Gefäße bzw. Endothelien.

In den immunhistochemischen Arbeiten zur quantitativen Analyse von Mikrogefäßen in kolorektalen Tumorpräparaten wurden bisher Antikörper gegen drei verschiedene Zielstrukturen auf Endothelzellen eingesetzt (Tab. 5-1):

- CD31,
- Anti-FVIII-Rag¹ / Anti- vWF² und
- CD34.

Für Paraffinpräparate hat sich bezüglich Sensitivität und Spezifität der Anti-CD31-Antikörper als überlegen gezeigt. Daneben ist der CD34-Antikörper als Alternative zu sehen, wobei der Nachteil einer ungewollten Anfärbung von Lymphgefäßen berücksichtigt werden muß. Der Nachteil des Anti-FVIII-RAG- Antikörpers liegt darin, daß das Antigen auf einem Teil der intratumoralen Gefäße nicht exprimiert wird, und

¹ anti- factor- eight- related antigen

² anti- von- Willebrand- factor

diese folglich nicht nachgewiesen werden können (62). Antikörper, Fixierung der Tumorpräparate sowie Behandlung der Gewebeschnitte (Kapitel 3.) bestimmen den Anteil der angefärbten und damit quantifizierbaren Mikrogefäße. Darüber hinaus können bei mangelnder Spezifität bzw. bei Auswerteverfahren, die diese unzureichend berücksichtigt, gefäßfremde Strukturen fälschlicherweise mitgezählt werden. Die Methode zur Quantifizierung der intratumoralen Blutgefäße, bestimmt auf der Basis der tatsächlich markierten Strukturen, ermöglicht einen Vergleich der Tumore bezüglich ihres Vaskularisierungsstatus. Die Auswertung bzw. Quantifizierung der intratumoralen Gefäßdichte erfolgt in dieser Arbeit nach den Regeln der einschlägigen internationalen Konsensuskonferenz (62).

Die Arbeiten der verschiedenen Autoren unterscheiden sich, wie aus Tab. 5-1 hervorgeht, hinsichtlich der gewählten Vergrößerung des Lichtmikroskops und - damit verbunden - in der Größe der ausgezählten Fläche sowie in der Anzahl der betrachteten *hotspots*. Es werden zwischen 3 und 10 *hotspots* berücksichtigt und der daraus resultierende Mittel- oder Maximalwert der Gefäßzahl für die weitergehenden Untersuchungen verwendet.

Tabelle 5-1: Vergleichende Literaturübersicht: gewählte Auswerteverfahren der Gefäßdichte.

Autor	Endothelzell-Antikörper	Vergrößerung	ausgezählte Fläche mm ²	Anzahl ausgezählter hotspots	ausgewertete Gefäßdichte
Pietra et al. (138)	CD31	x1000	0.035	30	Mittelwert
Giatromanolaki et al. (139)		x250	-	3	
Vermeulen et al. (140)		x200	0.61	5	
Eigene Daten (137)		x200	0.781	4	Maximum
Banner et al. (141)	Anti-FVIII-RAg	x40	-	10	-
Takahashi et al. (127)		x200	0.739	-	Maximum
Tanigawa et al. (142)	CD34	x200	-	5	Mittelwert
Engel et al. (143)	CD31	x400	0.152	3	Maximum
Lindmark et al. (144)	Anti- vWF	x125	-	5	Mittelwert
Mooteri et al. (145)		x100	-	3	
Takebayashi et al. (132)	Anti-FVIII-RAg	x400	-	-	-
Tomisaki et al. (130)	Anti-FVIII-RAg, CD34	x200	0.739	5	Mittelwert
Bossi et al. (146)	CD31	x200	0.635	3	Maximum, Mittelwert
Frank et al. (147)	Anti-FVIII-RAg	x100	-	3	Mittelwert
Takahashi et al. (127)		x200	0.739	-	-
Saclarides et al. (148)		x100, x200	-	3	Mittelwert

Neben der Auszählung der Gefäße in den *hotspots* wurde von Mooteri (145) und Frank (147) die Vaskularisation des gesamten Tumorschnittes subjektiv bewertet und der Tumor konsekutiv in ein Scoresystem eingeordnet.

Zum Vergleich der ermittelten absoluten Gefäßzahlen bzw. -dichten mit denen anderer Autoren sollen nur jene Arbeiten berücksichtigt werden, die ähnliche Auswertemethoden verwendet haben. Wie die in Tab. 5-2 zusammengestellten Ergebnisse zeigen, liegen bei dieser Untersuchung die maximal auftretenden Gefäßdichten aller 146 Primärtumorschnitte zwischen 29 und 171 Gefäßen pro Gesichtsfeld und der daraus abgeleitete Mittelwert bei 75. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit Arbeiten wie die von Vermeulen (140), Tanigawa (142) und Bossi (146), bei denen dieselbe 200fache Vergrößerung und derselbe Antikörper verwendet wurden. Beim selben Vergrößerungsmaßstab ergeben sich allerdings niedrigere Gefäßdichten, falls wie bei Tomisaki (130), Frank (147), Takahashi (127)

und Saclarides (148) Anti-FVIII-RAG als Antikörper eingesetzt wird. Dies dürfte im Einklang mit dem eingangs erwähnten Problem einer mangelnden Expressierung des FVIII-Antigens auf intratumoralen Mikrogefäßen stehen.

Tabelle 5-2: Vergleichende Literaturübersicht:
Untersuchungskollektive und Bestimmung der Gefäßdichte.

Autor	Anzahl und Klassifizierung untersuchter Karzinome	Follow-up-Periode / (Monat)	Mittelwert (Min.-Max.) der Gefäßdichte/ (Anzahl / Gesichtsfeld)
Pietra et al. (138)	119 (N0)	60	254 (67-626)
Giatromanolaki et al. (139)	55 UICC-I 51 UICC-III	median: 28 Überlebende: 29	29 (7-69)
Vermeulen et al. (140)	145	median:30 Überlebende: 43	74 (39-188)
Banner et al. (141)	22 (T3N0M0)	24-109	Langzeitüberlebende: 25 (16-30) Kurzzeitüberlebende: 30 (22-39)
Takahashi et al. (127)	27 (N0)	ohne Rezidiv median: 60	mit Rezidiv: 33 ohne Rezidiv: 20
Tanigawa et al. (142)	133	Mittelwert:56	112 (23-298)
Engel et al. (143)	35	median: 42	mit Rezidiv: 75 (s: ±9) ohne Rezidiv: 56 (s: ±17)
Lindmark et al. (144)	212 Biopsien	median: 55	Anzahl Gefäße: Patientenzahl
			0-5 69
			6-10 52
			>10 91
Mooteri et al. (145)	32 mit gleichzeitiger Lebermetastasierung	-	17 (s: ±9)
Takebayashi et al. (131)	166	Mittelwert: 76	65 (15-189)
Tomisaki et al. (130)	175, davon 58 mit gleichzeitiger Lebermetastasierung	-	33 (s: ±12)
Bossi et al. (146)	178	60	115 (s: ±39)
Frank et al. (147)	105 (N0)	Mittelwert: 78	28 (4-50)
Takahashi et al. (127)	52	-	49 (s: ±3)
Saclarides et al. (148)	48 Rektumkarzinome	-	100-fache Vergröß.: 40 (12-75) 200-fache Vergröß.: 17 (5-34)
Eigene Daten (137)	146 (M0)	60	75 (29-171)

Gefäßdichte und Tumorparameter

In fünf der in Tab. 5-3 aufgeführten Arbeiten wird ein Zusammenhang zwischen dem Vaskularisierungsgrad der Tumore und anderen Tumorcharakteristika nachgewiesen, so bei Tanigawa (142), wo an 133 kolorektalen Karzinomen eine höhere Gefäßdichte bei niedrigerem Differenzierungsgrad, bei Lymphgefäßinvasion, Lymphknotenmetastasierung und bei pT3/4 versus pT1/2 festgestellt wird. Zu ähnlichen Ergebnisse kommt Takebayashi (131), allerdings ohne den Einfluß des Differenzierungsgrades zu bestätigen. Tomisaki (130) stellt keinen Zusammenhang zwischen Gefäßdichte und pT-, pN-Kategorie sowie Tumordifferenzierung fest, allerdings eine signifikant erhöhte Gefäßdichte bei Infiltration von Lymph- oder Blutgefäßen und in bereits zum Zeitpunkt der Operation in die Leber metastasierten Tumoren. Eine höhere Gefäßdichte in metastasierten Tumoren findet sich bei Takahashi (129) und in größeren Tumoren und bei höherem Tumorstadium bei Saclarides (148), wobei letztere Arbeit ausschließlich Rektumkarzinome untersucht. Die Ergebnisse der anderen oben erwähnten Autoren werden von diesen beiden Arbeiten nicht bestätigt. Die Mehrzahl der Arbeiten, wie auch die vorliegende, bestätigen die Zusammenhänge zwischen der Gefäßdichte und den Tumorcharakteristika nicht. Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse kann in der Auswahl der Tumore liegen. In der vorliegenden Arbeit sind alle Tumore mit M-Stadium > 0 ausgeschlossen, während in den anderen Arbeiten auch Tumore mit Metastasen zum Zeitpunkt der Operation untersucht werden. Bei Annahme eines nicht-linearen Zusammenhangs zwischen Tumorwachstum und Gefäßdichte ist es denkbar, daß sich eine Beziehung zwischen Tumorausbreitung und Gefäßdichte erst in fortgeschritteneren Stadien nachweisen läßt.

Gefäßdichte und Tumorrezidiv

Bei den in Tab. 5-3 aufgeführten Arbeiten von Takahashi (127), Takebayashi (131) und Frank (147) wird auf eine größere Rate von Tumorrezidiven bei Tumoren mit höherer Gefäßdichte hingewiesen. In der Untersuchung von Vermeulen (140) konnte dieser Zusammenhang lediglich für das Auftreten von hämatogenen Metastasen und von Tanigawa (142) für hämatogene und peritoneale Metastasen nachgewiesen

werden. Bei der Mehrzahl der zitierten Arbeiten, so auch in der vorliegenden, kann kein Zusammenhang zwischen der Höhe der intratumoralen Gefäßdichte und dem Wiederauftreten der Tumorerkrankung festgestellt werden. Auch unterscheiden sich Tumore mit Lokalrezidiv oder Fernmetastasierung im weiteren Krankheitsverlauf nicht hinsichtlich der Höhe der Gefäßdichte. Hinzuweisen ist auch darauf, daß die Ergebnisse mit Ausnahme von Tanigawa (142) ausschließlich mit Hilfe univariater Analysen gewonnen wurden.

Gefäßdichte und Gesamtüberlebenszeit

Die vorliegende Arbeit unterscheidet sich von den anderen Untersuchungen hinsichtlich der detaillierten Analyse des zeitlichen Verlaufs der Erkrankung zwischen der Operation des Primärtumors und dem Auftreten von Lokalrezidiven und Fernmetastasen. Insbesondere wird hier der Einfluß der Gefäßdichte auf den Krankheitsverlauf des Unterkollektivs der Patienten, die tatsächlich ein Rezidiv ihrer Erkrankung bekommen, untersucht.

Die Gefäßdichte hat für die Gesamtüberlebenszeit des hier untersuchten Gesamtkollektivs der Patienten keine Bedeutung. Betrachtet man hingegen die Patienten, bei denen es zu einem Tumorereignis (Metastase und/oder Lokalrezidiv) im weiteren Verlauf kommt, dann stellt die Gefäßdichte einen unabhängigen Prognosefaktor für die Gesamtüberlebenszeit dar. Interessanterweise verlieren die anderen klassischen Prognosefaktoren wie die pT-Kategorie in diesem Unterkollektiv ihre prognostische Bedeutung. Dieses Ergebnis läßt sich in Einklang mit der zuvor beschriebenen Abhängigkeit der lokalrezidiv- bzw. metastasenfrien Überlebenszeiten von der Höhe der Gefäßdichte bringen, da der entscheidende Faktor für die Gesamtüberlebenszeit das Auftreten eines Tumorrezidivs lokal oder als Fernmetastasierung ist.

Von den in Tab. 5-3 aufgeführten Arbeiten stellt nur Tanigawa (142) für das Gesamtkollektiv in einer multivariaten Analyse fest, daß bei einer höheren Gefäßdichte die Gesamtüberlebenszeit signifikant abnimmt. Die anderen Arbeiten beschränken ihre Aussagen über die prognostische Bedeutung der Gefäßdichte auf Unterkollektive. Bei Giatromanolaki (139) sind es Dukes C- Tumore und bei

Vermeulen (140) die Astler-Coller-Stadien A-C. Frank (147) und Saclarides (148) zeigen, daß die Gefäßdichte jener Patienten im Durchschnitt niedriger lag, die 3 bzw. 5 Jahre überlebten im Vergleich zu den vorher verstorbenen. Diese Analysen wurden jedoch nur univariat durchgeführt. Im Gegensatz zu allen Arbeiten steht das Ergebnis von Lindmark (144), welches eine höhere Gefäßdichte bei der Gruppe der länger Überlebenden beschreibt, wobei sich die Quantifizierungsmethode von der anderer Arbeiten unterscheidet. Acht der aufgeführten Arbeiten verneinen einen Einfluß der Gefäßdichte auf die Gesamtüberlebenszeit oder machen dazu keine Angaben. Zur Erklärung dieser unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur muss möglicherweise beachtet werden, daß unterschiedliche immunhistochemische Verfahren, Auswertemethoden und auch verschiedenartig zusammengesetzte Patientenkollektive zu abweichenden Ergebnissen führen könnten.

Gefäßdichte und tumorereignisfreie Überlebenszeit

In den zur Diskussion herangezogenen Veröffentlichungen weisen nur vier eine Aussage zur tumorrezidivfreien Überlebenszeit aus. Eine Unterscheidung in lokalrezidivfreie und metastasenfreie Überlebenszeiten wird nicht vorgenommen und auch eine Analyse von Unterkollektiven erfolgt in diesem Zusammenhang nicht. Takahashi (127) weist in einer multivariaten Analyse eine Verkürzung der rezidivfreien Überlebenszeit durch eine höhere Gefäßdichte nach. Engel (143) zeigt in einer univariaten Untersuchung ein ähnliches Ergebnis, was aber in der multivariaten Analyse nicht bestätigt werden kann. Die restlichen beiden Arbeiten weisen keinen Zusammenhang zwischen Gefäßdichte und rezidivfreier Überlebenszeit aus. Dies stimmt auch mit dem vorliegenden Ergebnis für das untersuchte Gesamtkollektiv überein. Für einen Vergleich der für die Unterkollektive ermittelten Ergebnisse mit denen anderer Autoren fehlen einschlägige Veröffentlichungen.

Zusammenfassend kann folgendes festgestellt werden:

1. Sowohl aus den eigenen als auch aus den Ergebnissen anderer Autoren läßt sich ein Einsatz der Gefäßdichte als Prognosefaktor in der klinischen Routine nicht rechtfertigen. Die Selektion einer Gruppe von pN0 -Patienten, die aufgrund eines erhöhten Risikos für einen Tumorrezidiv von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren würden, ist mit Hilfe der immunhistochemischen Analyse der Angiogenese im Tumor nicht realisierbar.
2. Die Untersuchungsmethoden unterscheiden sich zum Teil erheblich hinsichtlich der verwendeten Antikörper und der Quantifizierungstechniken. Diese Unterschiede hinsichtlich der Methodik könnten für das uneinheitliche Bild der Ergebnisse verantwortlich sein.
3. Die Untersuchungen wurden an Patientenkollektiven durchgeführt, die in der Zusammensetzung der Tumorstadien differieren. Aber selbst bei ähnlicher Methodik und Zusammensetzung der Untersuchungskollektive unterscheiden sich die Schlußfolgerungen der Autoren voneinander. Postuliert man, daß die Heterogenität der Ergebnisse ausschließlich an unterschiedlichen Techniken und uneinheitlicher Definition der zu untersuchenden Patienten läge, dann stellte sich die Frage, ob ein für solche Abweichungen anfälliges Verfahren, eine Basis für Therapieentscheidungen im klinischen Alltag sein kann.
4. Die vorliegende Arbeit bestätigt die elementare Bedeutung der Gefäßneubildung innerhalb des Tumors für Wachstum und Rezidivbildung. Mit einer Bestimmung der Gefäßdichte läßt sich zum Zeitpunkt der Operation nicht prognostizieren, welcher Patient ein Rezidiv entwickelt. Dies hängt vielmehr von einer Vielzahl von Faktoren ab. Die Geschwindigkeit mit der aber die Rezidiventwicklung abläuft, wird von der Gefäßdichte bestimmt. Dieser Effekt ist unabhängig davon, ob sich die Erkrankung in Form eines Lokalrezidivs oder einer Fernmetastasierung erneut manifestiert. Daraus folgt, daß die Eigenschaft der Induktion der Gefäßneubildung - und damit die Wachstumspotenz - ein Charakteristikum der im Körper nach der Operation verbleibenden Tumorzellen zu sein scheint. Die Klassifizierung nach der pT- und pN-Kategorie ist dabei ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, daß es überhaupt zu einem Lokalrezidiv oder einer Fernmetastasierung kommt, was

wiederum das Gesamtüberleben maßgeblich bestimmt. Die Klassifizierung ist aber unter anderem auch vom Zeitpunkt der Tumordiagnose abhängig. Wird also ein Tumor später diagnostiziert, ist das Wachstum weiter fortgeschritten, ohne daß der Tumor ein höheres Malignitätspotential besitzen muß. Untersucht man nur die Patienten, von denen man retrospektiv weiß, daß sie ein Tumorrezidiv erleiden, dann verlieren die klassischen Prognosefaktoren ihre Bedeutung. Die Gefäßdichte ist aber gerade in diesem Unterkollektiv von prognostischer Relevanz.

Tabelle 5-3: Literaturvergleich: Gefäßdichte als Einflußgröße auf untersuchte Parameter.

Autor	Parameter			
	TNM-Stadium / Prognosefaktoren	Tumorereignis (Metastase oder Lokalrezidiv)	tumorfremie Überlebenszeit	Gesamtüberlebenszeit
Pietra et al. (138)	Nein	nein	nein	nein
Giatromanolaki et al. (139)	Nein	nein	keine Angaben (k.A.)	ja ²
Vermeulen et al. (140)	Nein	ja ³		ja ⁴
Banner et al. (141)	Nein	k.A.	keine Angaben (k.A.)	nein
Takahashi et al. (127)	k.A.	ja		k.A.
Tanigawa et al. (142)	ja ⁵	ja ⁶	k.A.	ja
Engel et al. (143)	Nein	nein ¹²	nein ¹²	k.A.
Lindmark et al. (144)	Nein	k.A.	keine Angaben (k.A.)	ja ⁷
Mooteri et al. (145)	Nein	nein		nein
Takebayashi et al. (132)	ja ⁸	ja		ja
Tomisaki et al. (130)	ja ⁹	nein		nein
Bossi et al. (146)	Nein	k.A.	nein	nein
Frank et al. (147)	k.A.	ja	keine Angaben	ja
Takahashi et al. (127)	ja ¹⁰	keine Angaben		k.A.
Saclarides et al. (148)	ja ¹¹			ja
Eigene Daten (137)	Nein	nein	ja¹	ja¹

Anmerkungen:

¹ für Unterkollektiv: Patienten mit Tumorereignis

² Nur für Dukes C-Tumore

³ Hämatogene Metastasierung ja /nein

⁴ Nur für Astler-Coller-Stadium A-C

⁵ Differenzierungsgrad, pT1/2 versus pT3/4, Lymphgefäßinvasion, pN0 versus pN>0,

⁶ Hämatogene Metastasierung ja /nein, peritoneale Metastasierung ja/nein

⁷ längere Überlebenszeit bei hoher Gefäßdichte

⁸ pN0 versus pN>0, Lymphgefäßinvasion, Blutgefäßinvasion, Dukes A versus B,C

⁹ Lymphgefäßinvasion, Blutgefäßinvasion, Lebermetastasierung

¹⁰ M0 versus M>0

¹¹ Tumorgroße, Astler-Coller B₂, C₂, D versus A₁, B₁, C₁;

¹² bei multivariater Analyse Verfehlung des Signifikanzniveaus von $p \leq 0.05$

Aufgrund der regelmäßigen Nachsorgeuntersuchungen, die eine Voraussetzung für die Aufnahme in das Untersuchungskollektiv waren, läßt sich eine relevante Verzögerung der Entdeckung von Rezidiven ausschließen. Damit ist die Gefäßdichte also tatsächlich Ausdruck eines tumorspezifischen Malignitätspotentials, welches den zeitlichen Ablauf des Prozesses beeinflusst, falls durch andere Faktoren die Rezidiventstehung eingeleitet wurde.

5.2.2. bFGF-Expression

In 25 (17%) der untersuchten kolorektalen Karzinome kann eine Expressierung des *basic Fibroblast Growth Factors* (bFGF) in Tumorzellen nachgewiesen werden. Dabei ist bFGF im Zytoplasma der malignen Zellen lokalisiert. Es zeigt sich, daß die Expressierung unabhängig von Tumorstadium, Differenzierung und sonstigen patho- bzw. histologischen Parametern ist. Patientenmerkmale wie Alter oder Geschlecht beeinflussen die Expressierung ebenfalls nicht. Die Auswertungen zeigen, daß der Nachweis von bFGF keinen Einfluß auf die aktuell im Tumor bestehende Dichte der Mikrogefäße hat.

Ein Vergleich der Rezidivraten für Fernmetastasen und Lokalrezidive sowie der entsprechenden Überlebensraten bei Patientengruppen mit und ohne bFGF-Expressierung in den kolorektalen Tumorzellen läßt den Schluß zu, daß diese sich bezüglich des Krankheitsverlaufs nicht unterscheiden. In der Literatur findet sich keine vergleichbare Arbeit für die simultane Analyse von bFGF-Expression und Gefäßdichte und deren Bedeutung für den klinischen Verlauf.

In **Tab. 5-4** sind die Arbeiten aufgeführt, die sich mit dem Nachweis des *basic Fibroblast Growth Factors* in kolorektalen Tumoren oder Tumorzellen befassen.

Takaha-

shi (129) bestimmte an einem kleinen Kollektiv mit kurzer Nachbeobachtungszeit Angiogenesefaktoren und die Gefäßdichte im Tumor immunhistochemisch. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der bFGF-Expression, dem Tumorstadium, der Expression des Angiogenesefaktors VEGF und der Gefäßdichte nachgewiesen werden. Die Ergebnisse von Ohtani (149) bestätigen die eigenen Untersuchungen. Eine fokale Anfärbung von Karzinomzellen wird in 10 von 61 Fällen (16,4%)

beschrieben und entspricht der in dieser Arbeit ermittelten Anfärbungsrate von 17%. Im Vergleich zum Normalgewebe ist die bFGF-Expression gemäß El-Hariry (150) in 47% der Fälle im Tumor reduziert, in 35% gleich stark und in 18% verstärkt. In 24% der Fälle kann kein bFGF nachgewiesen werden, in 18% wird eine zytoplasmatische, in 47% eine nukleäre und in 12% eine gemischte Lokalisation angegeben. Ein Zusammenhang zwischen der bFGF-Expression und anderen Tumorcharakteristika wird - wie auch in der vorliegenden Untersuchung - nicht gefunden. Eine verminderte Expression im Vergleich zum Normalgewebe wird auch von Landriscina (151) beschrieben, ohne daß eine Korrelation zwischen bFGF-Expression und dem Tumorstadium aufgezeigt werden kann. Während Junquera (152) eine Anfärbung von kolorektalen Tumorzellen erwähnt, wird von Nakata (153) im Gegensatz zu Untersuchungen an Zelllinien, in keinem der 44 klinischen Präparate bFGF- mRNA mittels Northern Blot nachgewiesen und folglich auch keine Zusammenhänge zum klinischen Verlauf. Der Nachweis von bFGF in Tumorzelllinien gelingt auch Takahashi (127), bei der eine verstärkte Expression in Zellen mit erhöhtem Metastasierungspotential aufgezeigt wird. Zwei Arbeiten befassen sich mit der bFGF-Messung im Blut der Tumorpatienten. Eine erhöhte bFGF- Konzentration im Mesenterialblut im Vergleich zu gesunden Probanden wird von Landriscina (151) festgestellt und von Dirix (102) gezeigt, daß Patienten mit einer Tumolvolumen-Verdopplungszeit unter 6 Monaten höhere bFGF-Serumspiegel aufweisen.

In Übereinstimmung mit der Literatur wird in der vorliegenden Arbeit eine Expression des bFGF nur in einer Minderheit von Tumoren nachgewiesen. Es läßt sich dabei keine Abhängigkeit von Tumorstadien oder anderen Tumorparametern feststellen. Insbesondere ist auch ein Zusammenhang zwischen dem Angiogenesfaktor und der intratumoralen Gefäßdichte nicht erkennbar.

Die Arbeiten der verschiedenen Autoren unterscheiden sich zwar erheblich in der Wahl der Methodik und der untersuchten Patienten wie auch der Beobachtungszeiträume, kommen aber zu ähnlichen Schlußfolgerungen wie sie diese Arbeit ausweist. Dies kann als eine indirekte Bestätigung für die Plausibilität des Untersuchungsergebnisses aufgefaßt werden. Eine mangelnde Sensitivität der Verfahren, z.B. infolge einer Antigenveränderung im Rahmen der Fixierung oder

Aufarbeitung der Tumorpräparate, ist nicht anzunehmen, da ein spezifischer Nachweis in einzelnen Tumoren bei gleicher Behandlung aller Präparate gelingt. Die allgemeine physiologische Rolle von bFGF bei der Neubildung von Gefäßen ist bekannt. Das Konzept der Tumorangiogenese basiert auf der Wechselwirkung von unterschiedlichen Angiogenesfaktoren, zellulären sowie extrazellulären Komponenten (Kapitel 1.5.). Dies erklärt auch, daß ein einzelner Faktor allein nicht unbedingt ausschlaggebend für Gefäßneubildung, Tumorwachstum oder gar Überlebenszeit sein muß. Diese Aussage steht im Widerspruch zu Kondo (154) und Takahashi (129) die den Angiogenesefaktor VEGF als einen unabhängigen Prognosefaktor bzw. als mit der intratumoralen Gefäßdichte korreliert ausweisen und Arbeiten an anderen Tumoren, so z.B. Dellacona (155), Colomer (156), Mise (157), Takanami (158), Li (103) und Yamanaka (96), die auch für bFGF eine prognostische Relevanz feststellen.

Die eigenen Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß beim kolorektalen Karzinom eine nachweisbare bFGF-Expression in Tumorzellen keinen essentiellen Beitrag für die Gefäßbildung oder das Tumorwachstum leistet. Dafür spricht neben den dargestellten Arbeiten auch die Tatsache, daß die Rezeptoren für bFGF nur selten auf den Endothelzellen im Tumor gefunden werden (129).

Tabelle 5-4: Literaturübersicht zum bFGF-Nachweis in kolorektalen Tumorzellen.

Autor	Untersuchungsmaterial	Methode
Junquera et al. (152)	8 kolorektale Karzinome	Immunhistochemie
Landriscina et al. (151)	35 kolorektale Karzinome	ELISA
Nakata et al. (153)	44 kolorektale Karzinome	Northern Blot
El-Hariry et al. (150)	17 kolorektale Karzinome	Immunhistochemie
Dirix et al. (102)	Serum von 44 kolorektalen Karzinompatienten	ELISA
Takahashi et al. (129)	52 kolorektale Karzinome	Immunhistochemie
Kitadai et al. (159)	Humane KM12 Kolonkarzinom-Zelllinien	In situ mRNA-Hybridisierung
Ohtani et al. (149)	15 kolorektale Karzinome, 46 Magenkarzinome	Immunhistochemie
Eigene Daten	146 kolorektale Karzinome	Immunhistochemie