

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

DISSERTATION

Die Bedeutung der Angio-/Lymphangiogenesefaktoren VEGF,
VEGF-C und VEGF-D für die Genese und Progression des
Zervixkarzinoms und ihr Nutzen für die Diagnostik desselben

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Andrea Sylvia Füger
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W. Lichtenegger
2. Prof. Dr. med. F. Jänicke
3. Priv.-Doz. Dr. med. C. Denkert

Datum der Promotion: 14.06.2009

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einer Reihe von Personen bedanken, ohne die die vorliegende Arbeit in dieser Form nicht zustande gekommen wäre.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Werner Lichtenegger, danke ich für die freundliche Überlassung des Themas.

Weiterhin möchte ich meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Sherko Kümmel, für die kritischen Anregungen und sein stetiges Bemühen, sich trotz seiner knapp bemessenen Zeit immer noch um meine Belange zu kümmern, danken.

Ein herzlicher Dank geht an Frau Susanne Korlach für ihre wertvolle Hilfe im Labor und ihre liebenswürdige Art, ohne die vieles schwieriger gewesen wäre.

Bei Frau Monika Kriner vom Institut für medizinische Biometrie, Universitätsklinikum Rechts der Isar, TU München, bedanke ich mich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich herzlich bei Raphael Kurzawa.

Schließlich, jedoch deswegen nicht weniger wichtig, möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Medizinstudium als Voraussetzung für diese Arbeit ermöglicht haben und auf deren Unterstützung ich mich immer verlassen konnte.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Die Angiogenese	1
1.2. Die Lymphangiogenese	2
1.3. Angiogenese und Lymphangiogenese als Schrittmacher der Tumorprogression	3
1.4. Das Zervixkarzinom.....	5
1.5. Die VEGF-Familie.....	7
1.5.1. VEGF.....	8
1.5.2. VEGF-C und VEGF-D	11
2. Herleitung einer Aufgabenstellung.....	16
2.1. Angiogenese, Lymphangiogenese und die drei.....	16
2.2. Aufgabenstellung.....	19
3. Methoden.....	22
3.1. Patientinnen.....	22
3.2. Ethische Aspekte.....	23
3.3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	24
3.3.1. Bestimmung von VEGF-C	25
3.3.2. Bestimmung von VEGF und VEGF-D.....	29
3.4. Statistische Auswertung	33
4. Ergebnisse.....	34
4.1. Stichprobe	34
4.2. Vorbetrachtung der Daten	35
4.3. Prüfung der Fragestellungen	37
5. Diskussion	58
5.1. Ziel der Studie	58
5.2. Zusammenfassung der Ergebnisse	59
5.3. Verknüpfung der Ergebnisse mit der relevanten Literatur	61
5.3.1. Tumorstadium	61
5.3.2. Histologischer Subtyp.....	64
5.3.3. Prognosefaktoren	66
5.3.4. Überleben und Zeit bis zum Auftreten des Rezidivs.....	72
5.3.5. Korrelation der Faktoren untereinander.....	74
5.3.6. Sensitivität und Spezifität	74
5.4. Probleme der Studie.....	76
5.5. Schlussfolgerung und Ausblick.....	77
6. Zusammenfassung	79
7. Literaturverzeichnis.....	81

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Messprinzip des ELISA-Verfahrens (aus R&D Systems: Overview of Immunoassay Technology).....	25
Abbildung 2: Beispielhafte Eichkurve (aus R&D Systems: Quantikine®, Human VEGF-C Immunoassay, Catalog Number DVEC00)	28
Abbildung 3: Boxplot VEGF/Tumorstadiengruppen	38
Abbildung 4: Boxplot VEGF-D/Tumorstadiengruppen.....	39
Abbildung 5: Boxplot VEGF-D/Lymphgefäßinvasion	42
Abbildung 6: Boxplot VEGF-C/Krankheitsstadium	46
Abbildung 7: Boxplot VEGF-C/CIN-Stadium	47
Abbildung 8: Roc-Kurve für VEGF	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation des Zervixkarzinoms nach FIGO und TNM	6
Tabelle 2: Überprüfung der Normalverteilung von VEGF/Plasma.....	36
Tabelle 3: Überprüfung der Normalverteilung von VEGF-C/Serum	36
Tabelle 4: Überprüfung der Normalverteilung von VEGF-D/Serum	36
Tabelle 5: Prüfung auf Unterschiede der Faktorenkonzentrationen zwischen den Gruppen CIN I-III, FIGO I-IV und Rezidiv.....	37
Tabelle 6: Prüfung auf Konzentrationsunterschiede der drei Faktoren zwischen den histologischen Subtypen.....	40
Tabelle 7: Prüfung auf Konzentrationsunterschiede der drei Faktoren zwischen dem Vorliegen und dem Fehlen von Lymphknotenmetastasen	41
Tabelle 8: Prüfung auf Konzentrationsunterschiede der drei Faktoren zwischen dem Vorliegen und dem Fehlen einer Lymphgefäßinvasion.....	41
Tabelle 9 : Prüfung auf Konzentrationsunterschiede der drei Faktoren zwischen dem Vorliegen und dem Fehlen einer Veneninvasion der Tumorzellen.....	43
Tabelle 10: Prüfung auf Konzentrationsunterschiede der drei Faktoren zwischen dem Vorliegen und dem Fehlen einer Fernmetastasierung	43
Tabelle 11: Prüfung auf Konzentrationsunterschiede der drei Faktoren zwischen den drei Graden der histologischen Tumordifferenzierung	44
Tabelle 12: Prüfung auf Konzentrationsunterschiede der drei Faktoren zwischen den einzelnen invasiven Tumorstadien.....	45
Tabelle 13: Prüfung auf Konzentrationsunterschiede der drei Faktoren zwischen den einzelnen CIN-Stadien	47
Tabelle 14: Prüfung des Zusammenhangs zwischen den Faktorenkonzentrationen und dem Überleben der Patientinnen	48

Tabelle 15: Prüfung des Zusammenhangs zwischen den Faktorenkonzentrationen und der Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs.....	49
Tabelle 16: Prüfung auf Korrelation der Faktoren untereinander	50
Tabelle 17: Prüfung der Korrelation zwischen der VEGF-C/VEGF-D-Ratio und histo- /klinischpathologischen Parametern	50
Tabelle 18: Sensitivität und Spezifität von VEGF im Plasma mit dem Normwert des Testherstellers	51
Tabelle 19: Sensitivität und Spezifität von VEGF-C im Serum mit dem Normwert des Testherstellers	52
Tabelle 20: Sensitivität und Spezifität von VEGF-D im Serum mit dem Normwert des Testherstellers	52
Tabelle 21: Logistische Regression für VEGF bezüglich der Unterscheidung zwischen intraepithelialer Neoplasie und invasivem Zervixkarzinom.....	53
Tabelle 22: Sensitivität und Spezifität von VEGF im Plasma mit dem durch die logistische Regression ermittelten Cut-off-Wert.....	54
Tabelle 23: Sensitivitäten und Spezifitäten bei Verschiebung des Cut-off-Wertes.....	55
Tabelle 24: Fläche unter der ROC-Kurve für VEGF.....	56
Tabelle 25: Logistische Regression für VEGF-C bezüglich der Unterscheidung zwischen intraepithelialer Neoplasie und invasivem Zervixkarzinom.....	57
Tabelle 26: Logistische Regression für VEGF-D bezüglich der Unterscheidung zwischen intraepithelialer Neoplasie und invasivem Zervixkarzinom.....	57

1. Einleitung

In den letzten Jahren sind Angiogenese und Lymphangiogenese - also die Bildung neuer Blut- und Lymphgefäße - und ihre Bedeutung für das Wachstum und die Ausbreitung solider Tumoren zunehmend in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle der die Angio- und Lymphangiogenese stimulierenden Faktoren VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D während der Entstehung und Ausbreitung des Zervixkarzinoms sowie deren Nutzen für die Diagnostik desselben.

In diesem Kapitel sollen zunächst die Mechanismen der Angio- und Lymphangiogenese dargestellt werden, danach folgen Erläuterungen zu ihrer Bedeutung für die Progression von Tumoren allgemein sowie ein kurzer Abriss der wichtigsten Fakten zum Zervixkarzinom. Anschließend werden die im Zentrum dieser Arbeit stehenden Angio- bzw. Lymphangiogenesefaktoren VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D ausführlich beleuchtet.

1.1. *Die Angiogenese*

Während der Embryogenese kommt es auf zwei verschiedene Arten zur Bildung neuer Blutgefäße: Zunächst tritt die sog. Vaskulogenese auf, bei der sich mesodermale Präkursorzellen, die Angioblasten, zu einem primären Gefäßplexus formieren¹. Später kommt es zum zweiten Mechanismus der Gefäßneubildung, der sog. Angiogenese. Hierbei können neue Gefäße entweder durch die „sprossende Angiogenese“ (Aussprossung von neuen Zweigen aus bereits bestehenden Kapillaren) oder durch die „nicht sprossende Angiogenese“ (bereits bestehende Gefäße teilen sich oder vergrößern ihr Lumen durch Wachstum) entstehen². Auf diese Weise kommt es langsam zur Ausbildung eines baumartigen Gefäßsystems mit Gefäßen unterschiedlicher Größe³.

Im erwachsenen Organismus kommt es physiologischerweise nur noch bei der Wundheilung und während bestimmter Phasen des weiblichen Reproduktionszyklus

(wie Ovulation, Plazentaentwicklung und Wiederaufbau des Endometriums nach der Menstruation) zur Bildung neuer Blutgefäße durch Angiogenese⁴.

Die Angiogenese steht unter dem Einfluss stimulierender und hemmender Faktoren. Unter physiologischen Bedingungen stehen diese Faktoren im Gleichgewicht miteinander und lassen eine Neubildung von Gefäßen nur in den oben erwähnten Ausnahmen zu.

Wenn dieses Gleichgewicht jedoch auseinander gerät und die stimulierenden Regulatoren überwiegen, kommt es zu einer überschüssigen Bildung von neuen Blutgefäßen. Dieser Mechanismus spielt eine große Rolle bei der Pathogenese z.B. der Psoriasis, rheumatoiden Arthritis sowie der diabetischen Retinopathie und vor allem bei der Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen^{5,6}. Die positiven Regulatoren können beispielsweise von Tumorzellen produziert, von der extrazellulären Matrix mobilisiert oder von Entzündungszellen wie Lymphozyten und Makrophagen sezerniert werden⁷. Als erster Induktor der Angiogenese wurde 1982 der Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) identifiziert.

1.2. Die Lymphangiogenese

Das lymphatische System besteht aus den Lymphknoten und den Lymphbahnen, die als blind endende Kapillaren beginnen, sich zu größeren Gängen zusammenschließen und letztlich wieder in die Blutzirkulation eingespeist werden; dies geschieht hauptsächlich über die Mündung des Ductus thoracicus in den linken Venenwinkel. Die Aufgabe des Lymphsystems besteht zum einen in der Aufrechterhaltung des interstitiellen Flüssigkeitsdrucks durch Rücktransport von ca. 10% der aus dem Gewebebett drainierten Flüssigkeit in das venöse System. Zum anderen kommt ihm eine bedeutende Rolle für die körpereigene Abwehr zu: Die Lymphknoten dienen als Filter beim Eindringen von Pathogenen in den Körper und fungieren als Entstehungsort und Speicher von Lymphozyten, die dann über die Lymphbahnen zum Bedarfsort transportiert werden⁸. Wie Blutgefäße sind Lymphgefäße durch eine einzelne Schicht von Endothelzellen ausgekleidet. Im Gegensatz zu Blutgefäßen fehlen lymphatischen Gefäßen jedoch sowohl die kontinuierliche Basalmembran als auch die interendothelialen Tight Junctions⁹. Zu Beginn des letzten Jahrhunderts kristallisierten

sich vor allem zwei Theorien über die Entstehung von Lymphgefäßen heraus: zum einen die Überzeugung, dass neue Lymphgefäße durch Aussprossung aus Venen hervorgehen¹⁰ und zum anderen die Annahme, dass sich Lymphgefäße aus primären Lymphsäcken im Mesenchym formieren¹¹. Heute gehen einige Autoren davon aus, dass wahrscheinlich beide Mechanismen für die Entwicklung des lymphatischen Systems notwendig sind¹².

Im gesunden erwachsenen Organismus beschränkt sich die Lymphangiogenese auf die Wundheilung, bei der, wie bei der sprossenden Angiogenese, neue Zweige aus bereits bestehenden Lymphgefäßen aussprossen. Die Neubildung von Lymphgefäßen bei der Wundheilung ist der Angiogenese jedoch untergeordnet und erscheint erst sekundär und damit langsamer als die Bildung der neuen Blutgefäße^{13, 14}.

Die pathologische Lymphangiogenese spielt vor allem bei akuten und chronischen entzündlichen Prozessen¹⁵ sowie bei der metastatischen Ausbreitung von Tumoren eine Rolle¹⁶.

1.3. Angiogenese und Lymphangiogenese als Schrittmacher der Tumorprogression

Das Vermögen solider Tumore, sich zu vergrößern und auszubreiten, hängt von einer ausreichenden Versorgung des Tumors mit Blutgefäßen ab.

Neoplasmen entwickeln sich zunächst langsam und verharren oft Monate bis Jahre in einer sog. prävasculären Phase, in der sie meist nicht größer als 2-3 mm sind und aus etwa einer Million Zellen bestehen^{17, 18}. In dieser Phase haben sie die Basalmembran noch nicht durchbrochen und somit noch keinen Anschluss an das Blutgefäßsystem.

Die Zellen in solchen prävasculären Tumoren können sich zwar genauso schnell vermehren wie in fortgeschritteneren Neoplasmen, jedoch wird das Tumorwachstum durch die ohne suffiziente Blutversorgung schnell absterbenden Zellen rasch begrenzt^{18, 19}. Schließlich kommt es zur sog. angiogenetischen „Umschaltung“, d.h. ein Teil der Zellen ist nun in der Lage, neue Blutgefäße für die Versorgung des Tumors zu bilden²⁰. Diese „Umschaltung“ kommt wahrscheinlich durch ein Ungleichgewicht zwischen den positiven und negativen Regulatoren der Angiogenese zugunsten der positiven Faktoren zustande²¹.

Der Befall von regionalen Lymphknoten durch Tumorzellen ist häufig das erste Anzeichen dafür, dass ein Tumor metastatisches Potential erlangt hat und der regionale Lymphknotenstatus hat sich für ein weites Tumorspektrum als prognostisch hoch bedeutsam herausgestellt ²². Damit ein Tumor lymphogen metastasieren kann, muss er Anschluss an das lymphatische System finden. Dies kann einerseits durch Drainage von Lymphe aus dem Tumorgebiet geschehen, wobei die Tumorzellen, begünstigt durch die lockeren interzellulären Verbindungen von lymphatischen Endothelzellen, passiv in bereits bestehende Lymphgefäße „hineingerissen“ werden ²³. Andererseits stellte sich in den letzten Jahren heraus, dass es auch zu einer aktiven Neubildung von lymphatischen Gefäßen kommt, die zur Tumormetastasierung beiträgt und durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine reguliert wird ²⁴. Die durch den Tumor hervorgerufene Lymphangiogenese stellte sich zudem als Risikofaktor für das Auftreten von Lymphknotenmetastasen heraus ^{25, 26}.

Zusammengefasst bedienen sich Malignome also sowohl der Angiogenese als auch der Lymphangiogenese, um sich zu vergrößern und zu metastasieren. Einige der wichtigsten proangiogenetischen und prolymphangiogenetischen Faktoren gehören zu der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Familie, welche in der vorliegenden Arbeit später noch eingehend beleuchtet wird.

1.4. Das Zervixkarzinom

Das folgende Unterkapitel bezieht sich im Wesentlichen auf die Ausführungen von Haag²⁷ und Baltzer²⁸.

Das Zervixkarzinom ist mit weltweit ca. 370.000 Neuerkrankungen pro Jahr eine der häufigsten Krebserkrankungen des weiblichen Geschlechts. Die höchste Inzidenz findet sich hierbei in den Entwicklungsländern; in Deutschland werden etwa 7000 Neuerkrankungen pro Jahr verzeichnet. Die Erkrankungshäufigkeit weist einen ersten Gipfel zwischen dem 35 - 45. Lebensjahr und einen zweiten zwischen dem 65 - 75. Lebensjahr auf. Histologisch handelt es sich in 80% der Fälle um Plattenepithelkarzinome; Adenokarzinome (15%) und Mischtumore oder Karzinome des Gartner-Ganges (5%) sind seltener; vereinzelt kommt auch das hochgradig entdifferenzierte, nicht verhornende, kleinzellige Karzinom bei jungen Frauen <35 Jahren vor. Die zervikale Kanzerogenese durchläuft gut definierte Stadien der leichten, mittleren und schweren „Cervicalen Intraepithelialen Neoplasie“ (CIN I-III), die meist durch eine Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) der Hochrisikotypen 16 und 18 bedingt ist. Hierdurch erhöht sich das Risiko, an einem Zervixkarzinom zu erkranken, um das 30-90fache. Weitere, bisher bekannte Risikofaktoren stellen früher, regelmäßiger Geschlechtsverkehr, mangelnde Genitalhygiene (auch des Partners), niedriger sozialökonomischer Status, Promiskuität, Infektion mit *Neisseria gonorrhoeae*, HIV-Infektion sowie Nikotinabusus dar.

Das Zervixkarzinom kann exo- oder endophytisch oder als Höhlenkarzinom mit tonnenförmiger Auftreibung der Zervix nach außen wachsen. Es metastasiert frühzeitig per continuitatem in Vagina, Parametrien und Nachbarorgane; später lymphogen in die parametranen, iliakalen und sakralen Lymphknoten. Von dort aus kommt es zum Befall der paraaortalen, sehr selten auch der mediastinalen und Skalenus-Lymphknoten. Selten und spät kann eine hämatogene Metastasierung in Leber, Lunge, Darm, Ovarien, Skelettsystem und Gehirn erfolgen.

In Tabelle 1 ist die Einteilung des Zervixkarzinoms durch die Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) in Bezug zur entsprechenden TNM-Klassifikation dargestellt.

**Tabelle 1: Klassifikation des Zervixkarzinoms nach FIGO und TNM
(in Anlehnung an Haag (2007))**

FIGO 0 (=Tis) Carcinoma in situ (präinvasives Karzinom)
FIGO I (=T1) Tumor auf den Uterus begrenzt IA (=T1a) mikroinvasives Karzinom (nur mikroskopische Diagnose) <ul style="list-style-type: none"> • IA1 (=T1a1) Stromainvasion <3mm Tiefe und <7mm horizontal (sog. frühe Stromainvasion) • IA2 (=T1a2) Stromainvasion 3-5mm Tiefe und <7mm horizontal (sog. Mikrokarzinom) IB1 (=T1b1) Tumordurchmesser <4cm (bereits klinisch sichtbar) IB2 (=T1b2) Tumordurchmesser >4cm
FIGO II (=T2) Tumor überschreitet den Uterus (jedoch nicht bis zur Beckenwand und nicht in das untere Scheidendrittel ausgebreitet) <ul style="list-style-type: none"> • IIA (=T2a) ohne Infiltration der Parametrien • IIB (=T2b) mit Infiltration der Parametrien (Beckenwand noch nicht erreicht)
FIGO III (=T3) Tumor überschreitet die Cervix uteri bis zur Beckenwand oder/und bis in das untere Vaginaldrittel <ul style="list-style-type: none"> • IIIA (=T3a) Infiltration der unteren 1/3 der Vagina, Infiltration der Parametrien erreicht aber noch nicht die Beckenwand • IIIB (=T3b) Tumorausbreitung bis zur Beckenwand und/oder Hydronephrose oder stumme Niere, regionärer LK-Befall (=N1)
FIGO IVA (=T4) Infiltration benachbarter Organe (Blasen-/Rektumschleimhaut) und/oder Überschreitung des kleinen Beckens FIGO IVB (=M1) Fernmetastasen

Klinisch macht sich das Zervixkarzinom meist erst spät bei schon fortgeschrittener Größe, bei Ulzeration oder bei Einbruch in Nachbarorgane durch unregelmäßige Blutabgänge und bräunlich-blutigen Fluor, Kontaktblutungen oder Unterbauchschmerzen bemerkbar. Sehr spät kann es bei Infiltration des kleinen Beckens mit Verlegung von Gefäßen zu einer venösen Stauung und einem Lymphödem der unteren Extremität kommen.

Die Diagnostik erfolgt durch die Anamnese und eine gynäkologische Untersuchung mit SpekulumEinstellung und Kolposkopie, Abstrichentnahme mit nachfolgender zytologischer Diagnostik nach Papanicolaou und ggf. Entnahme einer Knipsbiopsie aus makro- oder kolposkopisch verdächtigen Bezirken. Bei unklarem Befund kann eine diagnostische Konisation erwogen werden. Zur Ausbreitungsdiagnostik werden eine Vaginal- und Abdomensonographie sowie ein Röntgen-Thorax und je nach Verdacht weitere Untersuchungen wie Rektoskopie, Zystoskopie, Röntgen von LWS und Becken oder ein CT/MRT des kleinen Beckens, PET/PET-CT, intravenöses Pyelogramm oder Staginglaparoskopie/-tomie durchgeführt. Vielversprechende Tumormarker existieren bislang nicht; ggf. kann SCC beim Plattenepithelkarzinom oder CA 125 beim Adenokarzinom zur Therapieüberwachung herangezogen werden.

Die Therapie erfolgt abhängig vom Stadium und noch bestehendem Kinderwunsch der Patientin mittels Konisation, einfacher oder erweiterter Hysterektomie nach Wertheim-Meigs mit pelviner und ggf. paraaortaler Lymphonodektomie; in den Stadien IB2 - IIB sind radikale Op mit adjuvanter Therapie und primäre Radio-Chemotherapie äquieffektiv. Ab dem Stadium FIGO III ist eine kurative Operation nicht mehr möglich, so dass primär mit einer Cisplatin-haltigen Radiochemotherapie behandelt wird.

Die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) aller Zervixkarzinome beträgt 65%, im FIGO-Stadium 1A ist die Prognose sehr gut mit nahezu 100 % 5-JÜR, diese sinkt jedoch mit fortschreitendem Stadium rapide ab bis auf lediglich 5-10 % 5-JÜR im Stadium FIGO IV

27

1.5. Die VEGF-Familie

Bei der Betrachtung von physiologischer und pathologischer Angiogenese und Lymphangiogenese ist es heutzutage nicht mehr denkbar, die VEGF-Familie außer Acht zu lassen. Als erstes Mitglied der VEGF-Familie wurde VEGF-A erstmals 1983 in einer Leberkarzinomzelllinie als ein Protein identifiziert, das in der Lage war, die Gefäßpermeabilität in der Haut von Meerschweinchen zu erhöhen, und zwar in der 50.000fachen Intensität von Histamin. So wurde es zunächst Vascular Permeability Factor (VPF) genannt. Die hervorgerufene vaskuläre Hyperpermeabilität war zeitlimitiert, reversibel und mit einem intakten Endothel assoziiert. Weiterhin waren die

Effekte von VPF weder durch antihistamine Substanzen zu blockieren noch war VPF zur Degranulation von Mastzellen oder basophilen Leukozyten in der Lage. Die Autoren schlossen daraus, dass VPF ein sezerniertes Protein sein muss, das die Gefäßpermeabilität durch direkte Einflussnahme auf das Gefäßendothel zu erhöhen vermag²⁹. 1989 entdeckten Ferrara und Henzel einen für Endothelzellen spezifischen Wachstumsfaktor, der nun Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF/VEGF-A) genannt wurde³⁰. Noch im gleichen Jahr beschrieben zwei verschiedene Gruppen die kompletten komplementären DNA-Sequenzen für VPF und VEGF und es stellte sich bald heraus, dass es sich um das identische Protein handelte³¹⁻³⁴. Über die Jahre wurden fünf VEGF (bzw. VEGF-A)- verwandte Proteine, nämlich VEGF -B, -C, -D und -E, mit den zugehörigen Rezeptoren VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/Flk-1 und VEGFR-3/Flt-4 identifiziert. Auch Placenta Growth Factor (PlGF) gehört zur VEGF-Familie³⁵. Im adulten Organismus sind VEGFR-1 und -2 hauptsächlich auf den Endothelzellen der Blutgefäße exprimiert, während VEGFR-3 weitestgehend auf lymphatische Endothelien beschränkt bleibt³⁵. VEGFR-3 wurde sogar als spezifischer Marker für die Identifikation von Lymphgefäßen in fetaler und adulter Haut beschrieben. Hierdurch wurde es möglich, die Rolle der Lymphangiogenese (beispielsweise während der Tumorprogression) näher zu charakterisieren³⁶.

VEGF-A bindet sowohl an VEGFR-1 und -2, VEGF-C und -D binden beide an VEGFR-2 und -3. Es ist bis dato nicht eindeutig bekannt, über welchen Rezeptor die Permeabilität der Blutgefäße induziert wird; diskutiert wird VEGFR-2³⁵.

Für die vorliegende Studie sollen aus der VEGF-Familie nur VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D eingehender betrachtet werden.

VEGF und VEGF-A sind synonyme Begriffe für dasselbe Protein; im folgenden wird daher der Einfachheit halber nur noch von VEGF gesprochen.

1.5.1. VEGF

VEGF ist ein endothelzellspezifisches, homodimeres, heparinbindendes Glykoprotein mit potenten angiogenetischen, mitogenen, permeabilitätserhöhenden und chemotaktischen Eigenschaften³⁷. Durch molekulares Klonen wurden in Säugetieren bis jetzt fünf verschiedene Isoformen von VEGF (VPF/VEGF-A) mit 121, 145, 165, 189

und 206 Aminosäuren identifiziert, die durch alternatives Spleißen der mRNA eines einzelnen Gens, das aus 8 Exons zusammengesetzt ist, generiert werden und unterschiedliche biochemische Eigenschaften und biologische Effekte aufweisen³⁸⁻⁴¹. VEGF 165 scheint hierbei die wichtigste Isoform darzustellen, die die weiter unten genannten Effekte von VEGF hauptsächlich vermittelt⁴². VEGF spielt sowohl in der physiologischen als auch in der pathologischen Angiogenese eine bedeutsame Rolle.

Embryonalphase:

Zwei Studien konnten demonstrieren, dass VEGF in Mäusen eine essentielle Funktion während der embryonalen Vaskulogenese und Angiogenese besitzt^{43, 44}. Die Inaktivierung eines einzelnen VEGF-Allels resultierte im Tod der Embryonen am 11. und 12. Tag. Sie boten eine Reihe von Entwicklungsanomalien sowie eine defiziente Vaskularisierung in einigen Organen. Zusätzlich war nur ein irregulärer Plexus aus erweiterten Kapillaren im Dottersack und in der Plazenta vorhanden, was nahelegt, dass VEGF sowohl die Vaskulogenese als auch die frühe Angiogenese reguliert. In den homozygot VEGF-defizienten Embryonen war die Gefäßentwicklung noch schwerer beeinträchtigt, so dass die Autoren davon ausgingen, dass für eine normale Gefäßentwicklung zwei intakte Allele notwendig sind. In einer weiteren Studie wurden aus Hühnerembryonen eine Population Mesodermzellen isoliert, die allesamt VEGFR-2 exprimierten. In der Gegenwart von VEGF waren diese Zellen in der Lage, sich zu Endothelzellen zu differenzieren, was zu der Annahme führte, dass VEGF das entscheidende Signal für Hämangioblasten zur endothelialen Differenzierung ist⁴⁵.

Physiologische Angiogenese:

Postnatal kommt VEGF im gesunden Organismus eine Rolle im Rahmen der physiologischen Aufgaben der Angiogenese zu. Es wurde beispielsweise im Ovar während der Gelbkörperentstehung entdeckt⁴⁶ und während der proliferativen Phase der Wundheilung nachgewiesen⁴⁷. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass VEGF auch in der Lage ist, über Bindung an VEGF-Rezeptoren eine Mobilisation von hämatopoietischen Stammzellen aus dem Knochenmark, eine Chemotaxis von Monozyten, eine osteoblastenvermittelte Knochenneubildung sowie eine Neuroprotektion zu bewirken^{48, 49}.

Pathologische Angiogenese:

Auch bei der Entstehung von Krankheiten, die mit einer pathologischen Angiogenese einhergehen, wie z.B. die rheumatoide Arthritis oder die Neovaskularisation bei diabetischer Retinopathie und anderen ischämischen Retinaerkrankungen, wurde VEGF eine bedeutsame Rolle zugeschrieben^{50, 51}.

Der Einfluss von VEGF auf die Tumorentstehung und -progression war in den letzten Jahren Thema vieler wissenschaftlicher Untersuchungen. Blutgefäße in Tumoren sind ungeordnet strukturiert und von Defekten durchsetzt; hierdurch verlangsamt sich der Blutstrom und der interstitielle Flüssigkeitsdruck steigt. Es kommt zur Ausbildung von hypoxischen Regionen, wodurch die VEGF mRNA-Expression der Endothelzellen hochreguliert wird⁵². Das gebildete VEGF erhöht die Durchlässigkeit der Gefäße und erzeugt Fenestrierungen in ihnen^{53, 54}. Dadurch wird die Auswanderung von Plasmaproteinen und anderen Makromolekülen aus den Tumorgefäßen begünstigt, was zur Bildung eines Fibringels führt. Dieses wiederum formiert sich als neue, provisorische Matrix, die das Wachstum von Endothelzellen und Fibroblasten und damit die Bildung von neuen Blutgefäßen unterstützt⁵³. VEGF induziert zusätzlich die Proliferation, Aussprossung und Migration von Endothelzellen und regt diese an, sich zu Schläuchen zu formieren⁴⁸. Außer durch die sich im wachsenden Tumor ohne suffiziente Gefäßversorgung entwickelnde Hypoxie wird die VEGF-Bildung auch durch eine Anämie, eine niedrige Glucosekonzentration und einen niedrigen pH-Wert stimuliert^{55, 56}, welche ebenfalls Folgen unzureichender Durchblutung darstellen.

Eine VEGF-Expression wurde in zahlreichen Tumorzelllinien sowohl in vitro als auch in vivo nachgewiesen, wobei die Rezeptoren für VEGF nur in den peritumoralen Kapillaren und nicht in den Endothelien des gesunden Gewebes erschienen⁵⁷. Da die Expression der Gene für VEGFR-1 und -2 auf Endothelien durch Gewebehypoxie in Kombination mit einer lokal erhöhten VEGF-Konzentration heraufreguliert wird³⁵, deutet dies darauf hin, dass VEGF von den Tumorzellen selbst gebildet wird, um die Voraussetzung für die Expansion des Tumors, nämlich eine ausreichende Durchblutung, herzustellen. Es konnte weiterhin ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen der intratumoralen VEGF-Konzentration und erhöhter Mikrogefäßdichte beim Mammakarzinom hergestellt werden, was die proangiogenetische Wirkung des VEGF unterstreicht⁵⁸.

Eine erhöhte Expression von VEGF mRNA wurde in den Zellen von zahlreichen bösartigen Tumoren, darunter Ovarial-, Lungen- und kolorektales Karzinom, nachgewiesen⁵⁹⁻⁶¹. Teilweise wurde auch eine positive Korrelation zwischen der VEGF mRNA-Expression im Tumor und der Invasionstiefe, der Metastasenpräsenz und der Prognose für rezidivfreies und Gesamtüberleben gefunden^{60, 61}. Dies lässt darauf schließen, dass die Fähigkeit eines Tumors, VEGF zu bilden, seine maligne Potenz entscheidend beeinflussen könnte.

Seit über 10 Jahren ist es möglich, nicht nur die VEGF mRNA-Expression der Tumorzellen selbst zu bestimmen, sondern auch die Konzentration des im Blutkreislauf zirkulierenden VEGFs zu messen. Es stellte sich heraus, dass Karzinompatienten höhere VEGF-Serumkonzentrationen als gesunde Kontrollgruppen aufwiesen⁶². In einer weiteren Studie wurden die VEGF-Konzentrationen in den Sera von Patientinnen mit Ovarialkarzinom untersucht⁶³; diese waren signifikant höher als in einer Kontrollgruppe mit Tumoren niedriger Malignität oder benignen Kystadenomen. Nach erfolgreicher Entfernung der Ovarialkarzinome sanken die VEGF-Level im Serum wieder ab, wodurch das Serum-VEGF in die Nähe eines suffizienten Tumormarkers gerückt wurde, der sich möglicherweise zur Therapieüberwachung (zumindest des Ovarialkarzinoms) eignen könnte.

Wenn es andererseits möglich wäre, den Effekt von VEGF zu antagonisieren, müsste dies zu einer Regression des Tumors führen; und mit solch einer antiangiogenetischen Therapie sind bereits beim kolorektalen und Mammakarzinom gute Erfolge erzielt worden: Bevacizumab, ein VEGF-blockierender Antikörper, ist inzwischen zur Behandlung dieser Karzinome im metastasierten Stadium zugelassen worden^{42, 64, 65}.

1.5.2. VEGF-C und VEGF-D

VEGF-C und -D stellen eine eigene Untergruppe in der VEGF-Familie dar, da sie beide sowohl eine sehr ähnliche VEGF- Homologiedomäne und lange N- und C-terminale Ausläufer besitzen als auch an dieselben Rezeptoren, nämlich VEGFR-2 und -3, binden^{66, 67}.

- **VEGF-C**

VEGF-C wurde 1996 als erster Ligand für VEGFR-3/Flt-4 identifiziert⁶⁶. VEGF-C wird als Präpropeptid produziert und dann proteolytisch zu einer reifen Form in Gestalt eines Homodimers von ungefähr 40 Kilodalton prozessiert. Diese Prozessierung erhöht die Affinität von VEGF-C für VEGFR-3 um das 400-fache, an VEGFR-2 kann jedoch nur das vollständig prozessierte VEGF-C binden⁶⁸.

Die vorwiegende Expression von VEGFR-3 auf lymphatischen Endothelzellen deutet darauf hin, dass VEGF-C vor allem die Neubildung von Lymphgefäßen induziert, was durch nachfolgende Untersuchung bestätigt werden konnte: Überexprimiert in der Haut von transgenen Mäusen stimulierte VEGF-C fast ausschließlich die Lymphangiogenese⁶⁹, sodass mit VEGF-C der erste lymphangiogenetische Faktor entdeckt wurde^{69, 70}.

Embryonalphase/Physiologische Bedeutung:

Die Rolle von VEGF-C während der Embryogenese wurde durch die Ausschaltung des VEGF-C-Gens bei Mäuseembryonen untersucht, was in ihrem Tod resultierte; die Zellen differenzierten sich zwar entlang der lymphatischen Linie, sie konnten jedoch keine suffizienten Lymphgefäße bilden⁷¹. Dies lässt auf eine essentielle Funktion von VEGF-C während der Embryogenese schließen.

Die Beobachtung, dass die VEGF-C-Expression in Endothelzellen durch proinflammatorische Zytokine induziert wird, lässt annehmen, dass die Funktion der Lymphgefäße, während einer Entzündungsreaktion die Immunfunktion und die Leukozytenwanderung zu kontrollieren, durch VEGF-C reguliert sein könnte⁴².

Pathologische Lymphangiogenese:

Im Rahmen von Tumorerkrankungen wurde VEGF-C vor allem eine Rolle bei der lymphogenen Metastasierung zugeschrieben, und diese Annahme wurde durch eine Reihe von Untersuchungen bekräftigt. Joukov und Kollegen beschrieben die Fähigkeit von VEGF-C, die Permeabilität von Lymphgefäßen zu erhöhen und so eventuell die Invasion von Tumorzellen zu ermöglichen⁶⁸. Andere Autoren zeigten darüber hinaus, dass eine Überexpression von VEGF-C auch neues Lymphgefäßwachstum in experimentellen Tumoren induziert. Hierzu erzeugten sie VEGF-C mRNA-überexprimierende Zellen des MCF-7- Mammakarzinoms, die dann orthotopisch in weibliche Mäuse mit schwerer kombinierter Immundefizienz eingesetzt wurden. In den

sich entwickelnden Tumoren wurde ein signifikantes Tumorwachstum (aber geringer als bei VEGF) und eine starke Entwicklung von Lymphgefäßen, jedoch nicht von Blutgefäßen, beobachtet. Im Gegensatz dazu fehlten VEGF mRNA-überexprimierenden und Kontrolltumoren fast komplett jegliche lymphatische Gefäße. Diese Beobachtungen legten nahe, dass VEGF-C, das von Tumorzellen produziert wird, das Wachstum von Lymphgefäßen hervorrufen und somit die intralymphatische Streuung von Tumorzellen ermöglichen könnte ⁷². Diese Hypothese konnte durch weitere Untersuchungen, auch an nicht-experimentellen Tumoren, gestützt werden: Es konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der durch VEGF-C erhöhten Lymphgefäßdichte und der Lymphknotenmetastasierung bei doppelt transgenen Mäusen hergestellt werden ⁷³. Beim Magenkarzinom wurde eine positive Korrelation zwischen der VEGF-C mRNA-Expression im Tumorgewebe und dem Ausmaß der Tumordinfiltration sowie der lymphatischen Invasion und der Präsenz von Lymphknotenmetastasen gefunden ⁷⁴. Auch bei Prostatakarzinompatienten, die Lymphknotenmetastasen aufwiesen, war die VEGF-C mRNA-Expression im Tumorgewebe höher als bei den Patienten ohne befallene Lymphknoten ⁷⁵ und VEGF-C stimulierte ebenso die Metastasenentwicklung in eigentlich wenig invasiven, östrogenabhängigen MCF-7- Mammakarzinomen ⁷⁶, um nur einige Beispiele zu nennen.

Seit wenigen Jahren existiert ein enzymgebundener Immunoassay-Test, mit dem die VEGF-C-Konzentration im Blutserum bestimmt werden kann, was erstmals 2003 bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom untersucht wurde. Patienten mit bereits befallenen Lymphknoten wiesen höhere VEGF-C-Serumkonzentrationen auf als Patienten ohne Lymphknotenmetastasen, aufgrund dessen die Autoren die VEGF-C-Serumkonzentration als zuverlässigen Marker für den Lymphknotenbefall beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom beschrieben ⁷⁷. Desweiteren hat VEGF-C auch eine angiogenetische Potenz und ist, hauptsächlich über seinen Rezeptor VEGFR-2, in der Lage, proliferative, migrative und chemotaktische Reize auf Endothelzellen auszuüben sowie, ebenso wie VEGF, die Permeabilität von Blutgefäßen zu erhöhen ^{66, 78}. Diese angiogenetische Funktion scheint jedoch der lymphagiogenetischen Bedeutung von VEGF-C untergeordnet zu sein.

- **VEGF-D**

1997 wurde erstmals über das molekulare Klonen von menschlichem VEGF-D berichtet, das zu 23,3 % mit VEGF-C identisch ist ⁷⁹. Das VEGF-D-Homolog der Maus stellte sich kurz zuvor als identisch mit dem c-fos-Induced Growth Factor (FIGF) heraus, welcher, aktiviert durch das Protoonkogen c-fos, die Zelltransformation und/oder maligne Progression von Tumoren stimuliert ⁸⁰. VEGF-D wird initial als Präkursorprotein, das N- und C-terminale Propeptide und eine zentrale, rezeptorbindende VEGF-Homologiedomäne enthält, synthetisiert ⁶⁷. Diese Propeptide werden dann, ähnlich wie VEGF-C, proteolytisch zu einer reifen Form prozessiert ⁸¹.

Physiologische Bedeutung :

Über die physiologische Rolle des VEGF-D herrscht noch keine abschließende Klarheit. VEGF-D fand sich sowohl im vaskulären Endothel als auch im Herz, Skelettmuskel, in der Lunge sowie im Dün- und Dickdarm exprimiert. Es stellte sich in einigen Studien als potenter angiogenetischer Faktor heraus, der in der Lage war, die Migration und Proliferation von Endothelzellen in vitro und in vivo zu stimulieren ^{67, 82}. Dies erscheint naheliegend durch die Tatsache, dass VEGF-D an VEGFR-2 binden kann. Bei transgener Überexpression stimulierte VEGF-D jedoch wiederum nur die Lymphangiogenese und rief keine Neubildung von Blutgefäßen hervor ⁸³. Einige Autoren spekulierten, dass es über VEGFR-3 in die Regulation von Wachstum und Differenzierung des lymphatischen Endothels involviert sein könnte ⁶⁷. Nach Baldwin et al. scheint es jedoch für die Lymphangiogenese während der Embryonalentwicklung von Mäusen nicht nötig zu sein, denn VEGF-D-defiziente Mäuse konnten ein morphologisch und funktionell normales Lymphsystem entwickeln ⁸⁴. Die Autoren zogen daher eine mögliche Kompensation dieser Funktion durch VEGF-C in Betracht.

Pathologische Bedeutung:

Nicht weniger widersprüchlich als die Untersuchungen zur physiologischen Rolle von VEGF-D stellten sich diejenigen heraus, die Aufschluss über die Bedeutung des Wachstumsfaktors während der Tumorausbreitung erbringen sollten. Wie oben bereits angedeutet, steht das VEGF-D-codierende Gen unter regulativer Kontrolle des Protoonkogens c-fos, das bekannt für seine Rolle während der malignen Progression ist ⁸⁰. In einem experimentellen Tumormodell wurde die Fähigkeit von VEGF-D

beschrieben, sowohl die Angiogenese als auch die Lymphangiogenese zu stimulieren. VEGF hingegen war nicht in der Lage, die Bildung neuer Lymphgefäße hervorzurufen. Aus dieser Beobachtung schlossen die Autoren, dass die VEGF-D-Expression im Tumor die Streuung seiner Zellen über das Lymphgefäßsystem fördert⁸⁵. Eine weitere Studie untersuchte die Expression von VEGF-D und seinem Rezeptor VEGFR-3 in Proben von normaler Darmschleimhaut, prämaligen Läsionen und kolorektalen Karzinomen⁸⁶. Verglichen mit den untersuchten Adenomen und der normalen Darmschleimhaut, boten die Karzinome regelmäßig hohe VEGF-D-Expressionen. Patienten mit solch einer hohen VEGF-D-Expression hatten öfter Lymphknotenmetastasen und Rezidive als Patienten mit niedriger VEGF-D-Expression. Darüber hinaus stellte sich die VEGF-D-Expression im Tumorgewebe als unabhängiger prognostischer Faktor für rezidivfreies und Gesamtüberleben der Patienten dar. Eine signifikante Korrelation zwischen der VEGF-D-Expression und der Mikrogefäßdichte bzw. vaskulären Invasion konnte jedoch nicht gefunden werden. Die Autoren sahen diese Ergebnisse als Hinweis darauf an, dass VEGF-D im kolorektalen Karzinom eine allenfalls nur geringe Rolle für die Angiogenese spielen, dafür aber umso wichtiger für die Entwicklung und/oder Funktion der Lymphgefäße sein und dadurch die Lymphknotenmetastasierung fördern könnte.

In verschiedenen anderen Untersuchungen jedoch stellte sich die VEGF-D-Expression z.B. beim Adenokarzinom der Lunge, beim Kolonkarzinom und beim Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses als niedriger verglichen zu gesundem Gewebe heraus⁸⁷⁻⁸⁹. Es wurde ein Zusammenhang zwischen einer hohen VEGF-C-Expression/niedrigen VEGF-D-Expression und einer lymphatischen Invasion bzw. dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen beschrieben^{87, 88}, doch eine suffiziente Erklärung hierfür fehlt. Die Autoren zogen einen eventuellen anti-metastatischen Effekt von VEGF-D in Betracht und Onogawa und Kollegen vermuteten, dass die Reduktion der VEGF-D-Level in der Adenom-Karzinom-Sequenz des Magenkarzinoms möglicherweise den potenteren angiogenetischen Zytokinen VEGF und VEGF-C eine verstärkte Bindung an ihre Rezeptoren erlauben könnte⁹⁰. Die tatsächliche Rolle von VEGF-D bleibt jedoch bislang sowohl physiologisch als auch pathologisch von allen drei behandelten Faktoren am unklarsten.

2. Herleitung einer Aufgabenstellung

Obwohl die Inzidenz des Zervixkarzinoms in den letzten Jahrzehnten durch die Verfügbarkeit von zytologischen Screeningprogrammen zurückgegangen ist, stellt die Krankheit immer noch ein großes Gesundheitsproblem in der ganzen Welt dar. Tumorgroße, Tiefe der Stromainvasion, lymphovaskuläre Emboli, Parametrieninvasion und pelvine Lymphknotenmetastasen gelten hierbei als wichtige prognostische Faktoren⁹¹.

In diesem Kapitel wird zunächst die Bedeutung der in der Einleitung behandelten Themengebiete für das Zervixkarzinom erläutert; anschließend folgt die Formulierung der durch die vorliegende Studie zu prüfenden Aufgabenstellungen.

2.1. *Angiogenese, Lymphangiogenese und die drei Wachstumsfaktoren VEGF, VEGF-C und VEGF-D im Kontext des Zervixkarzinoms*

Für die Ausbreitung und die Metastasierung des Zervixkarzinoms kommt der Angiogenese und Lymphangiogenese eine bedeutende Rolle zu, was durch folgende Untersuchungen verdeutlicht werden kann.

Es konnte gezeigt werden, dass es auch hier zu der bereits oben beschriebenen angiogenetischen „Umschaltung“ kommt, nach der die Tumoren in der Lage sind, neue Blutgefäße zu bilden. Die Untersuchung der Kapillardichte in dysplastischen Zervixläsionen mithilfe des von-Willebrand-Faktors zeigte die Umschaltung in die angiogenetische Phase bereits im CIN II-III Stadium. Entlang der Basalmembran, die von den neoplastischen Zellen noch nicht durchbrochen war, konnte die Bildung kleiner Gefäße beobachtet werden^{92, 93}. Ein milder Anstieg der Mikrogefäßdichte wurde bereits im CIN I-Stadium entdeckt.

Die angiogenetische Umschaltung scheint also erstens ein notwendiger Mechanismus für die Tumorausbreitung und zweitens ein relativ frühes Ereignis auf dem Weg zum invasiven Zervixkarzinom zu sein²⁰. Mehrere Studien ermittelten in der Tumorgefäßdichte sogar einen prognostischen Faktor für Rezidiverkrankungen und das Überleben der Patientinnen beim invasiven Zervixkarzinom⁹⁴⁻⁹⁶.

Zusammengefasst zeigen die vorgenannten Studien die zentrale Bedeutung der Mikrogefäßdichte als Ausdruck einer stattfindenden Angiogenese für die Entstehung und Progression des Zervixkarzinoms auf.

Die Verknüpfung dieser Erkenntnisse zum angiogenetischen Wachstumsfaktor VEGF wurde in verschiedenen Studien hergestellt, in denen in Cervikalen Intraepithelialen Neoplasien (CIN) ein positiver Zusammenhang zwischen der Mikrogefäßdichte, dem CIN-Stadium und der VEGF mRNA-Expression gefunden wurde^{92, 97}. Dies kann als Hinweis dafür gewertet werden, dass VEGF während der Genese des Zervixkarzinoms für die verstärkte Neubildung von Blutgefäßen eine bedeutsame Rolle spielt.

Auch andere Autoren beschrieben die Bedeutung von VEGF für die maligne Transformation der Cervix uteri, indem sie die VEGF mRNA-Expression in Gewebeproben von Cervikalen Intraepithelialen Neoplasien und invasiven Zervixkarzinomen untersuchten. Sie fanden einen Anstieg der VEGF mRNA-Expression bei ansteigender Schwere der intraepithelialen Läsion, während die Expression in gesundem Zervixgewebe signifikant niedriger war. Die VEGF mRNA-Expression in CIN III-Läsionen war derjenigen in den invasiven Karzinomen vergleichbar. Sie schlugen daher die VEGF mRNA-Expression als Indikator für den Grad der malignen Transformation der Zervix vor⁹⁸. In einer weiteren Studie wurden die VEGF-Protein-Level in 104 Zervixkarzinomen und 30 gesunden Zervices untersucht und es wurden, verglichen mit dem untersuchten gesunden Gewebe, höhere VEGF-Konzentrationen im Gewebe der Karzinome gefunden. Darüber hinaus konnte auch eine Korrelation zwischen der VEGF-Konzentration und der Tumorgröße sowie dem Parametrien- und Lymphknotenbefall festgestellt werden⁹⁹. Die Fähigkeit von zervikalen Karzinomen, VEGF zu bilden, scheint also eine zentrale Bedeutung für ihre Ausbreitung zu haben.

Was die tumorinduzierte Lymphangiogenese angeht, so gibt es insgesamt nur wenige Studien, die sich mit der Untersuchung der tumorassoziierten lymphatischen Gefäßdichte in Bezug zur derjenigen im gesunden Gewebe beschäftigt haben. Für das Zervixkarzinom existiert eine Studie, die einen - jedoch nicht signifikanten - Trend zur verstärkten lymphatischen Gefäßdichte im Karzinomgewebe, verglichen zu normalem Zervixgewebe, aufzeigen konnte¹⁰⁰. Dies allein reicht nicht aus, um von einer Neubildung von Lymphgefäßen durch das Zervixkarzinom selber auszugehen; betrachtet man jedoch die in mehreren Studien belegte lymphangiogenetische Wirkung

von VEGF-C^{69, 70, 72} und die Korrelation zwischen der VEGF-C mRNA-Expression und der Präsenz von Lymphknotenmetastasen beim Zervixkarzinom^{101, 102}, so liegt es nahe, dass die Tumorzellen in der Lage sein könnten, mit Hilfe von VEGF-C die Bildung neuer Lymphgefäße zu induzieren und damit die lymphatische Invasion des Tumors zu erleichtern bzw. zu ermöglichen.

Diese Hypothese lässt sich durch weitere Untersuchungen festigen: Es wurde die VEGF-C mRNA-Expression in verschiedenen gynäkologischen Karzinomzelllinien (Zervix-, Endometrium- und Ovarialkarzinome) bestimmt und eine signifikante Korrelation zwischen der VEGF-C mRNA-Expression und der Anzahl der Tumorzellen, die migrierten und infiltrierten, gefunden. Die Autoren vermuteten daher, dass Tumorzellen, die VEGF-C mRNA in hohem Maße exprimieren, aufgrund ihrer Fähigkeit, sowohl Gewebearrrieren zu durchdringen als auch die Lymphangiogenese zu stimulieren, ein höheres metastatisches Potential haben könnten¹⁰³.

Darüber hinaus zeigte sich für Patientinnen mit stark VEGF-C mRNA-exprimierenden Tumoren eine schlechtere Prognose¹⁰¹.

Die vorgenannten Untersuchungen weisen also daraufhin, dass VEGF-C auch beim Zervixkarzinom eine lymphangiogenetische Potenz zu besitzen scheint und dadurch wahrscheinlich in der Lage ist, eine lymphogene Metastasierung hervorzurufen bzw. zu erleichtern.

Was die Rolle von VEGF-D in der zervikalen Karzinogenese betrifft, so existieren hierzu bislang kaum Daten. Einige Autoren fanden eine höhere Expression in CIN III-Läsionen als in CIN I- oder CIN II-Läsionen, was darauf hindeutet, dass VEGF-D die Endothelzellen in präinvasiven Stadien stimuliert¹⁰⁴. Ob es jedoch einen Zusammenhang mit dem Ausmaß der lymphatischen Invasion bzw. der Lymphknotenmetastasierung gibt, wie es für VEGF-D als lymphangiogenetischen Faktor denkbar wäre, bleibt unklar.

2.2. Aufgabenstellung

Die Konzentration der drei Angio-/Lymphangiogenesefaktoren im Zervixkarzinomgewebe selbst war bislang schon Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Die drei Faktoren lassen sich jedoch nicht nur dort nachweisen, sondern ebenfalls im zirkulierenden Blut. Wenn man davon ausgeht, dass diese Faktoren wesentlich zur Ausbreitungsfähigkeit des Zervixkarzinoms beitragen und dass das Karzinom die drei Faktoren in das Blut sezerniert, so müsste sich die Höhe der dort gemessenen Konzentrationen mit der fortschreitenden Ausbreitung des Tumors verändern. Für das VEGF ist bereits gezeigt worden, dass seine Konzentration im Serum von Patientinnen mit Zervixkarzinom signifikant höher war als im Serum von gesunden Frauen ¹⁰⁵. In einer weiteren Studie wurden die VEGF- und VEGF-C-Level im Blut von Patientinnen mit einem Plattenepithelkarzinom der Zervix bestimmt. Es fand sich ein signifikanter Anstieg der jeweiligen Konzentration mit dem FIGO-Stadium und der TumorgroÙe. Nach erfolgter Behandlung sanken die Werte wieder signifikant ab, sodass die Autoren einen potentiellen Nutzen beider Parameter als Tumormarker in Aussicht stellten ¹⁰⁶.

Insgesamt ist die Datenlage hierzu jedoch dürftig und was VEGF-D betrifft, so gibt es bislang kein Studienmaterial, welches sich mit der Blutkonzentration dieses Faktors bei Frauen mit Zervixkarzinom beschäftigt. Die vorliegende Arbeit soll deshalb den Nutzen der Bestimmung der Konzentrationen dieser drei Angiogeneseparameter im zirkulierenden Blut für die Diagnostik und Therapie des Zervixkarzinoms genauer beleuchten. Hierzu wurden Blutproben von 125 Patientinnen entnommen, bei welchen entweder eine präkanzeröse Dysplasie der Zervix (CIN I-III), ein invasives Zervixkarzinom oder ein Rezidiv eines Zervixkarzinoms nachgewiesen worden ist. Aus diesen Proben wurden die Konzentrationen von VEGF, VEGF-C und VEGF-D ermittelt und auf einen möglichen Zusammenhang mit verschiedenen histo- bzw. klinisch-pathologischen Parametern untersucht. Weiterhin interessierte eine mögliche Auswirkung der Faktorenkonzentrationen auf das Überleben der Patientinnen sowie die Eignung dieser Untersuchung zur Aufdeckung maligner Zervixprozesse.

Es wird angenommen, dass die VEGF-Konzentration im Plasma aufgrund der angiogenetischen Potenz von VEGF mit dem Tumorstadium und der Blutgefäßinvasion korreliert, während für VEGF-C eher ein Einfluss auf die Invasion von LymphgefäÙen sowie auf die Präsenz von Lymphknotenmetastasen vermutet wird.

Für das VEGF-D hingegen existieren einerseits bislang noch wenig Studien im Zusammenhang mit dem Zervixkarzinom; andererseits wird seine Bedeutung in der Tumorgenese allgemein kontrovers diskutiert (karzinogener vs. protektiver Effekt), sodass in dieser Arbeit seine Rolle zumindest für das Zervixkarzinom etwas besser geklärt werden soll. Darüberhinaus interessiert ein möglicher Zusammenhang zwischen VEGF-D und VEGF-C, der bereits durch einige Untersuchungen an anderen Karzinomen nahegelegt wurde^{87, 88}.

Kann für die Konzentrationen der drei Faktoren im Blut ein positiver Zusammenhang mit den klinisch-pathologischen Parametern hergestellt werden, oder vermag die Höhe der Faktorenkonzentrationen sogar zwischen nicht invasiven und invasiven Prozessen zu unterscheiden, so würde dies einen entscheidenden Fortschritt in der Diagnostik sowie in der Therapieplanung und -überwachung bedeuten, da suffiziente Tumormarker für das Zervixkarzinom bislang fehlen.

Zusammengefasst lassen sich folgende Fragen formulieren:

1. Gibt es signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen „CIN“, „invasives Karzinom“ und „Rezidiv“ hinsichtlich der Plasma- bzw. Serumkonzentration der drei Angio-/Lymphangiogenesefaktoren VEGF-A (VEGF), VEGF-C und VEGF-D?
2. Gibt es hinsichtlich der Plasma-/Serumkonzentrationen der drei Angio-/Lymphangiogenesefaktoren signifikante Unterschiede zwischen den histologischen Subtypen (Plattenepithel-, Adeno-, Adenosquamöses Karzinom)?
3. Gibt es einen signifikanten Konzentrationsunterschied der drei Angio/Lymphangiogenesefaktoren hinsichtlich der Prognosefaktoren N (Lymphknotenmetastasen), M (Fernmetastasen), L (Invasion der Lymphgefäße), V (Veneninvasion) bzw. des Grades der Tumordifferenzierung (G)?
4. Gibt es hinsichtlich der Konzentrationen der Angio-/Lymphangiogenesefaktoren signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen FIGO-Stadien und Rezidiv?
5. Unterscheiden sich die Vorstadien CIN I-III signifikant bezüglich der Konzentrationen der Angio-/Lymphangiogenesefaktoren?
6. Wie beeinflusst die Höhe der Konzentrationen der drei Parameter das rezidivfreie und Gesamtüberleben der Patientinnen?
7. Gibt es eine Korrelation der Konzentrationen der drei Angio-/Lymphangiogenesefaktoren untereinander?
8. Mit welcher Sensitivität gelingt es, über die Plasma-/Serumkonzentrationen der drei Angio-/Lymphangiogenesefaktoren einen invasiven von einem nicht invasiven Prozess zu unterscheiden?

3. Methoden

In diesem Kapitel sollen die zur Prüfung der o.g. Fragestellungen notwendigen Untersuchungsmethoden erläutert werden. Hierzu wird zunächst auf die Patientinnenrekrutierung eingegangen; anschließend werden die verwendeten laborchemischen und statistischen Analysemethoden dargestellt.

3.1. Patientinnen

Zwischen 2002 und 2005 wurden in der Frauenklinik der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, Blutproben von insgesamt 125 Patientinnen mit verschiedenen Krankheitsstadien entnommen. Von insgesamt 50 festgestellten präkanzerösen Läsionen befanden sich 7 Patientinnen im CIN I-Stadium, 8 Patientinnen im CIN II- und 35 Patientinnen im CIN III-Stadium. Bei 51 Patientinnen wurde ein invasives Karzinom der Zervix festgestellt, davon wurde nach den Richtlinien der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) für 22 Patientinnen ein FIGO I-, für 13 Patientinnen ein FIGO II-, ebenfalls für 13 ein FIGO III- und für 3 Patientinnen ein FIGO IV-Stadium klassifiziert. Bei 24 Patientinnen wurde ein Rezidiv nachgewiesen. Eine ausführliche Beschreibung der Stichprobe findet sich im Ergebnisteil.

Folgende Einschlusskriterien mussten erfüllt sein:

- Vorliegen einer Zervixkarzinomvorstufe (Cervikale Intraepitheliale Neoplasie, Grad I-III), eines invasiven Zervixkarzinoms (FIGO I-IV) oder eines Zervixkarzinomrezidivs mit jeweiliger histopathologischer Bestätigung
- Entnahme der Blutproben jeweils bei Diagnosestellung, also vor Beginn einer Therapie bzw. bei Diagnose des Rezidivs
- Vorliegen einer von der Patientin unterschriebenen Einverständniserklärung zur Verwendung ihrer Blutproben und Krankenakten zu Forschungszwecken

Als Ausschlusskriterium wurde definiert:

- Vorhandensein einer anderen malignen Erkrankung in den letzten fünf Jahren

Da VEGF während des Gerinnungsprozesses von Thrombozyten freigesetzt wird und eine signifikante Korrelation zwischen der Plättchenzahl und der VEGF-Konzentration im Serum gefunden wurde¹⁰⁷, wurde die Bestimmung der VEGF-Konzentration im Plasma vorgenommen, um Verfälschungen der Resultate durch die thrombozytenbedingte VEGF-Sekretion zu vermeiden. Die Werte für VEGF-C und -D dagegen wurden jeweils im Serum bestimmt.

Aus den jeweiligen Krankenakten wurden folgende Daten entnommen: Alter, Menopausenstatus, Rauchverhalten, erfolgte Therapie, Body-Mass-Index und im Falle der invasiven Karzinome histologischer Subtyp, histologische Differenzierung, Vorliegen von Lymphknoten- und Fernmetastasen, Lymphgefäß- oder venöser Invasion der Tumorzellen. Darüberhinaus wurde für die Rezidivpatientinnen die rezidivfreie Zeit ermittelt und ein Follow-up über einen Zeitraum von 24 Monaten bezüglich des Überlebens durchgeführt.

3.2. Ethische Aspekte

Im Rahmen dieser Studie bestanden keine ethischen Probleme, da es sich lediglich um eine Auswertung von Blutproben handelte, wodurch weder die Behandlung noch der Krankheitsverlauf der Patientinnen beeinflusst wurde. Desweiteren erklärten sich alle Patientinnen schriftlich mit der Verwendung ihrer Blutproben und der dazugehörigen persönlichen Daten zu Forschungszwecken einverstanden.

3.3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Konzentrationen von VEGF, VEGF-C und -D im Blut der Patientinnen wurden mit Hilfe der ELISA-Technik ermittelt, deren Prinzip und Durchführung im Folgenden dargestellt wird:

Die ELISA-Methode wurde in den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts entwickelt und stellt eine sensitive Methode zur Auffindung und Quantifizierung gesuchter Antigene bzw. Antikörper in einer Vielzahl von biologischen Proben (wie z.B. Serum, Plasma oder auch Zellkulturen) auf immunologischer Basis dar.

Für die hier benötigten Bestimmungen wurde die sog. „Sandwich-Technik“ angewandt, die eine spezielle Form des ELISA-Tests darstellt.

Hierbei ist ein jeweils für VEGF, VEGF-C und -D spezifischer Antikörper an einer festen Phase, nämlich den Boden einer Mikrotiterplattenvertiefung, adsorbiert. Der Wachstumsfaktor, der hierbei als Antigen fungiert, bindet an den festen Antikörper. An diesen Antikörper-Antigen-Komplex bindet in einem nächsten Schritt wiederum ein zweiter, für das Antigen spezifischer Antikörper, an den wiederum ein färbendes Konjugat bindet. Als Folge verfärbt sich die Probe. Die Stärke der Verfärbung, die mit Hilfe der Messung der optischen Dichte quantifiziert werden kann, verhält sich proportional zu der Konzentration des zu bestimmenden Faktors in der Probe. Hierbei ist es wichtig, dass Antikörper und Antigen nicht von derselben Spezies stammen, da sonst Bindungen der Antikörper untereinander zu einem falsch positiven Testergebnis führen können.

Um aus der optischen Dichte die VEGF (bzw. VEGF-C, VEGF-D)-Konzentration einer Probe zu ermitteln, wird aus einer Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen eine Eichkurve erstellt (siehe unten), anhand derer dann auch die unbekanntes VEGF (bzw. VEGF-C, VEGF-D)-Konzentrationen bestimmt werden können.

Abbildung 1 stellt das Messprinzip graphisch dar:

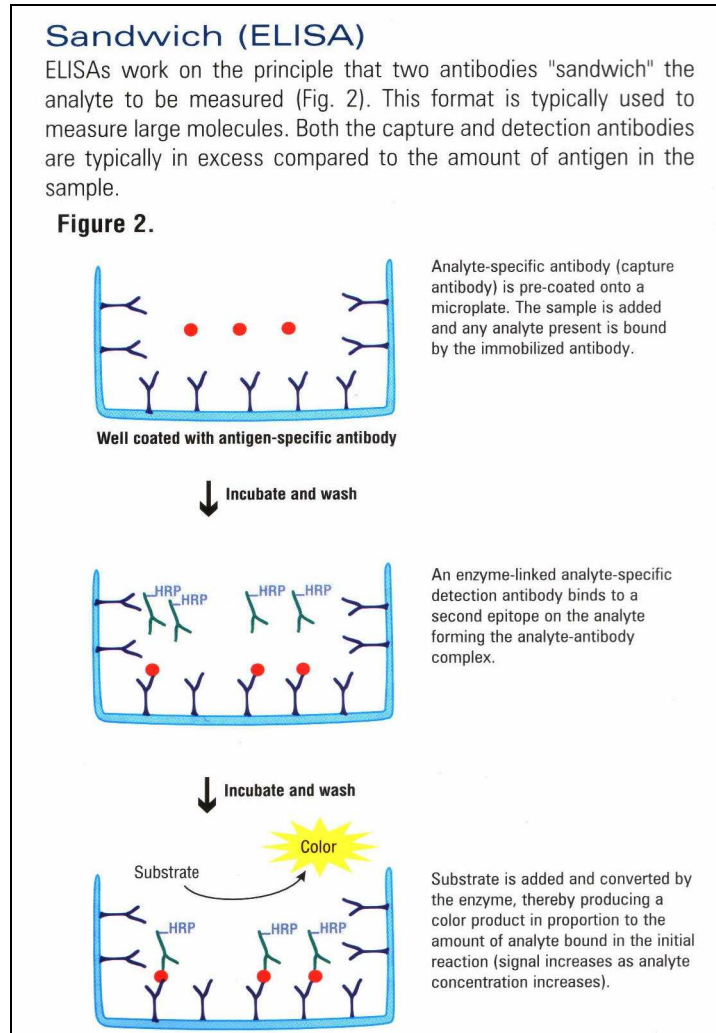


Abbildung 1: Messprinzip des ELISA-Verfahrens (aus R&D Systems: Overview of Immunoassay Technology)

3.3.1. Bestimmung von VEGF-C

Die Konzentration von VEGF-C im Serum wird mit Hilfe eines Sandwich-ELISA-Tests der Firma IBL bestimmt. Die einzelnen Schritte sind im Folgenden dargestellt:

Vorbereitung:

1. Zunächst wird der Waschpuffer zubereitet, indem 50 ml des konzentrierten Waschpuffers mit 1,95 ml destilliertem Wasser verdünnt werden.
2. Der konjugierte Antikörper (ein HRP (horseradish peroxidase)-konjugiertes, anti-humanes VEGF-C IgG des Hasen) wird mit den 10,5 ml der für ihn mitgelieferten Lösung versetzt und 5 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird die Lösung sanft und vollständig vermischt. Dieser Schritt sollte unmittelbar vor seiner Applikation erfolgen.
3. Die vom Hersteller gelieferte Standardlösung wird mit 0,5 ml destilliertem Wasser versetzt, die Konzentration von VEGF-C beträgt nun 12000 pg/ml.
4. Nun wird eine Verdünnungsreihe der Standardlösung zur Ermittlung einer Eichkurve zubereitet. Dazu werden in acht kleine Röhrchen jeweils 230 µl des EIA-Puffers gefüllt. Nun werden in das erste Röhrchen 230 µl der Standardlösung (die eine Konzentration von 12000 pg/ml VEGF-C enthält) gefüllt, sodass sich in diesem Röhrchen nun eine Konzentration von 6000 pg/ml ergibt. Daraufhin werden aus dem ersten Röhrchen wiederum 230 µl der Lösung entnommen und dem zweiten Röhrchen zugeführt. Hierbei resultiert nun eine Konzentration von 3000 pg/ml VEGF-C. Analog wird mit den weiteren Röhrchen verfahren, sodass folgende Konzentrationen entstehen:

3. Röhrchen: 1500 pg/ml

4. Röhrchen: 750 pg/ml

5. Röhrchen: 375 pg/ml

6. Röhrchen: 187,5 pg/ml

7. Röhrchen: 93,75 pg/ml.

Röhrchen 8 enthält ausschließlich den EIA-Puffer und dient als Nullwert

5. Die zu testenden Proben ebenfalls mit dem EIA-Puffer 1:10 verdünnt (30 µl der Probe auf 270 µl EIA-Puffer)

Messung:

1. Alle Reagenzien werden etwa eine halbe Stunde vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und sanft und vollständig gelöst.
2. Es werden Vertiefungen für die zu testenden Proben, die Verdünnungsreihe der Standardlösung (Röhrchen 1-7) sowie die Nullprobe (Röhrchen 8) festgelegt und in jede Vertiefung 100 µl der jeweiligen Probe pipettiert. Es werden für alle Proben Doppelbestimmungen vorgenommen, um die Testergebnisse zuverlässiger zu machen.
3. Die gesamte Platte wird nun abgedeckt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit bindet nun das in der Probe vorhandene VEGF-C an den festen Antikörper.
4. Der nicht an die Antikörper gebundene Rest der Proben wird nun entfernt, indem jede Vertiefung der beschichteten Platte mit Hilfe des Waschpuffers gewaschen wird. Der Waschpuffer wird hierzu mit einer Multikanalpipette in jede Vertiefung appliziert, nach 15-30 Sekunden wird die überstehende Flüssigkeit ausgekippt. Hierbei wird darauf geachtet, dass möglichst jegliche Flüssigkeit aus der Vertiefung entfernt wird. Diese Prozedur wird mindestens sieben Mal wiederholt; nach dem letzten Mal wird die Platte auf einem Papierhandtuch ausgeklopft, um die letzte Flüssigkeit aus den Vertiefungen zu entfernen.
5. Nun wird in jede Vertiefung 100 µl des konjugierten Antikörpers pipettiert und die Platte wiederum abgedeckt 30 Minuten bei 4°C inkubiert. In dieser Zeit bindet der konjugierte Antikörper an das bereits an den festen Antikörper gebundene VEGF-C.
6. Die beschichtete Platte wird nun neun Mal in der gleichen Weise wie unter 4. gewaschen, um die nicht gebundenen konjugierten Antikörper vollständig aus den Vertiefungen zu entfernen.

7. Jetzt wird den Vertiefungen jeweils 100 µl des färbenden Agens (Tetramethylbenzidin) zugesetzt und die gesamte Platte bei Raumtemperatur 30 Minuten im Dunkelheit stehen gelassen. Während dieser Zeit bindet das Tetramethylbenzidin an das Konjugat des zweiten Antikörpers und färbt die Lösung umso stärker blau, je mehr VEGF-C in der Vertiefung gebunden worden ist.

8. Zuletzt wird in jede Vertiefung 100 µl der Stoplösung pipettiert. Dadurch entsteht ein Farbumschlag in gelb. Innerhalb von 30 Minuten nach Applikation der Stoplösung wird die optische Dichte der jeweiligen Vertiefung mit Hilfe eines Enantiometers bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Auswertung der Testergebnisse:

Die Absorption der Nullwertprobe (Röhrchen 8) wird von den jeweiligen Absorptionen aller unbekannt Proben sowie der Verdünnungsreihe der Standardlösung abgezogen. Nun wird die Eichkurve erstellt, indem alle bekannten VEGF-C-Konzentrationen der Standardreihe (x-Achse) der jeweiligen optischen Dichte (y-Achse) auf log-log-Papier graphisch gegenübergestellt werden. Die unbekannt Konzentrationen der zu testenden Proben können jetzt mit Hilfe der jeweiligen Absorption an der Eichkurve abgelesen werden. Zur Veranschaulichung dieses Verfahrens dient Abbildung 2.

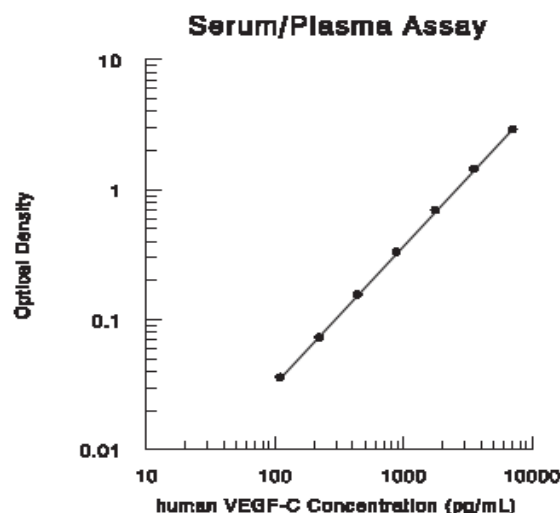


Abbildung 2: Beispielhafte Eichkurve (aus R&D Systems: Quantikine®, Human VEGF-C Immunoassay, Catalog Number DVEEC00)

Die ermittelten Konzentrationen werden aufgrund der vorgenommenen Verdünnung mit zehn multipliziert, um den tatsächlichen Wert zu erhalten.

Präzision des verwendeten Tests:

Intra-Assay-Präzision:

3 Proben bekannter Konzentration wurden von der Firma IBL 21 Mal auf derselben Platte bestimmt. Die durchschnittliche Streuung zwischen den einzelnen Bestimmungen betrug 6%; 6,7% und 5,5%.

Inter-Assay-Präzision:

Jeweils 3 Proben bekannter Konzentration wurden von IBL auf 16 verschiedenen Platten getestet. Die durchschnittliche Streuung der ermittelten Werte betrug 7,8%; 7,1% und 7,4%.

3.3.2. Bestimmung von VEGF und VEGF-D

Die Konzentrationen von VEGF und VEGF-D werden mit einem Sandwich-ELISA-Test der Firma R&D Systems bestimmt. Dieser Test beruht auf dem gleichen Prinzip wie der oben beschriebene Test zur Bestimmung von VEGF-C, die Inhaltsstoffe sind jedoch leicht unterschiedlich. Diese Unterschiede sollen im folgenden ausgearbeitet werden, wobei auf die Wirkungsweise des Tests hier nicht noch einmal so ausführlich eingegangen wird.

Vorbereitung:

1. Da VEGF auch im Speichel vorhanden ist, wird während der Testdurchführung ein Mundschutz getragen, um eine Ergebnisverfälschung zu vermeiden.
2. 20 ml des vollständig gelösten konzentrierten Waschpuffers werden mit 480 ml destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt.
3. Die Farbreagenzien A und B werden in gleichen Volumina 15 Minuten vor Gebrauch miteinander gemischt. Sie müssen lichtgeschützt stehen.

4. Verdünnungsreihe für die Standardlösung von VEGF:

Das Standard-VEGF wird in 1 ml Kalibratorlösung über 15 Minuten gelöst und hat nun eine Konzentration von 2000 pg/ml. In sechs kleine Röhrchen werden nun jeweils 500 µl Kalibratorlösung gefüllt. Aus dem Gläschen mit der Standardlösung werden 500 µl in das erste Röhrchen überführt, sodass darin eine Konzentration von 1000 pg/ml VEGF entsteht. Dies ist die höchste Standardkonzentration. Analog wird mit 6 weiteren Röhrchen verfahren, sodass sich folgende Konzentrationen ergeben:

1. Röhrchen 1: 1000 pg/ml
2. Röhrchen 2: 500 pg/ml
3. Röhrchen 3: 250 pg/ml
4. Röhrchen 4: 125 pg/ml
5. Röhrchen 5: 62,5 pg/ml
6. Röhrchen 6: 31,25 pg/ml
7. Röhrchen 8 enthält nur die Kalibratorlösung und stellt den Nullwert dar.

5. Verdünnungsreihe für die Standardlösung von VEGF-D:

Das Standard-VEGF-D wird in 1ml destilliertem Wasser über 15 Minuten gelöst und hat nun eine Konzentration von 40.000 pg/ml VEGF-D. In ein Röhrchen werden 900 µl Kalibratorlösung gefüllt, in sechs weitere Röhrchen jeweils nur 500 µl. Durch Überführung von 100 µl der 40.000 pg/ml-Lösung in das erste Röhrchen wird eine 1:10-Verdünnung hergestellt. Aus diesem Röhrchen werden wiederum 500 µl entnommen und in das zweite Röhrchen pipettiert, sodass folgende Konzentrationen zustande kommen:

8. Röhrchen 1: 4000 pg/ml
9. Röhrchen 2: 2000 pg/ml
10. Röhrchen 3: 1000 pg/ml
11. Röhrchen 4: 500 pg/ml
12. Röhrchen 5: 250 pg/ml
13. Röhrchen 6: 125 pg/ml
14. Röhrchen 7: 62,5 pg/ml
15. Röhrchen 8 enthält nur die Kalibratorlösung und dient als Nullstandard.

Messung:

1. Die Plattenverteilung wird festgelegt und in jede Vertiefung wird 100 μl Lösungsmittel für VEGF bzw. für VEGF-D pipettiert.
2. Nun werden für die VEGF-Bestimmungen 100 μl , für die VEGF-D-Bestimmungen jeweils 50 μl der Verdünnungsreihe und der Proben unbekannter Konzentration in die vorgesehenen Vertiefungen eingebracht. Die Platte wird mit Folie abgedeckt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.
3. Die Vertiefungen werden viermalig auf die für VEGF-C beschriebene Weise (siehe oben) mit Waschpuffer gewaschen.
4. In jede Vertiefung werden jetzt 200 μl des polyklonalen Antikörpers gegen VEGF bzw. des monoklonalen Antikörpers gegen VEGF-D hinzugeführt. Beide Antikörper sind an Merettichperoxidase konjugiert. Die Platte wird wiederum mit Folie abgedeckt und nochmals zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.
5. Die Vertiefungen werden vier Mal gewaschen.
6. Nun wird jeder Vertiefung 200 μl der Färbelösung (bestehend aus den Farbreagenzien A und B) zugesetzt und die Platte in Dunkelheit für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
7. In jede Vertiefung der Platte wird 50 μl Stopplösung gegeben und innerhalb von 30 Minuten im Enantiometer die optische Dichte der Proben bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt.

Auswertung der Testergebnisse:

Die Extinktion des Nullstandards wird wiederum von den anderen Werten subtrahiert, es wird eine Eichkurve auf die schon oben beschriebene Weise erstellt (beispielhafte Abbildung siehe oben) und die unbekanntene Konzentration an der Kurve abgelesen.

Präzision der verwendeten Tests:

Intra-Assay- Präzision:

Jeweils 3 Proben von VEGF und VEGF-D mit bekannten Konzentrationen wurden von der Firma R&D Systems 20 Mal auf jeweils derselben Platte bestimmt. Die durchschnittliche Streuung zwischen den einzelnen Bestimmungen betrug für VEGF 6,7%; 4,5% und 5,1% und für VEGF-D 6,2%; 4,2% und 2,4%.

Inter-Assay-Präzision:

Jeweils 3 Proben von VEGF und VEGF-D mit bekannten Konzentrationen wurden von der Firma R&D Systems auf jeweils 40 verschiedenen Platten getestet. Die durchschnittliche Streuung der ermittelten Werte betrug für VEGF 8,8%; 7,0% und 6,2% und für VEGF-D 8,0%; 7,2% und 7,2%.

3.4. *Statistische Auswertung*

Die durch die laborchemischen Untersuchungen und das Aktenstudium erhobenen Daten wurden umfangreichen statistischen Analysen unterzogen. Hierzu wurde das Statistikprogramm „SPSS“, Version 14.0, verwendet.

Die Überprüfung der Normalverteilung der ermittelten Faktorenkonzentrationen erfolgte mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests.

Zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben wurde aufgrund der ordinalskalierten Variablen der Mann-U-Whitney-Test angewendet, im Falle mehr als zwei zu vergleichenden Stichproben kam der Kruskal-Wallis-Test zum Einsatz.

Um die Korrelation verschiedener Parameter miteinander zu prüfen, musste aufgrund der nicht normalverteilten Faktorenkonzentrationen der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet werden.

Darüber hinaus konnte mit Hilfe der Regressionsanalyse nach Cox der Einfluss der Konzentrationen der drei Angio-/Lymphangiogenesefaktoren auf das Überleben der Patientinnen bestimmt werden.

Abschließend wurde zur Überprüfung der Eignung der vorgenommenen Bluttests zur Unterscheidung zwischen einem präinvasiven und einem invasiven Zervixprozess eine binäre logistische Regression vorgenommen.

Für alle Fragestellungen wurde ein Signifikanzniveau mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit $p \leq .05$ gewählt.

4. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu prüfenden Fragestellungen mittels statistischer Verfahren untersucht.

Nach einer ausführlichen Beschreibung der Stichprobe folgen die einzelnen Fragestellungen mit Erläuterungen zur Auswahl des jeweiligen Verfahrens sowie der Darstellung der ermittelten Ergebnisse.

4.1. *Stichprobe*

Es wurden von insgesamt 125 Patientinnen Blutproben entnommen. Die Patientinnen waren zwischen 19 und 92 Jahren alt. 88 Frauen befanden sich im gebärfähigen Alter, waren also prämenopausal. 35 Patientinnen waren postmenopausal und zwei Patientinnen befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme in der Perimenopause.

Der Body-Mass-Index war durch das Aktenstudium nur für 98 Patientinnen ermittelbar; er bewegte sich hierbei zwischen 16,65 und 51,42 kg/m².

Bei 45 Patientinnen bestand anamnestisch ein Nikotinabusus, 47 Patientinnen waren nach eigenen Angaben Nichtraucherinnen. In 33 Fällen war der Nikotinkonsum aus den Akten nicht mehr eruierbar.

Durch histopathologische Untersuchungen wurden 50 Cervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN), davon 7 mit niedriger Dysplasie (CIN I), 8 mit mittlerer Dysplasie (CIN II) und 35 mit schwerer Dysplasie (CIN III), identifiziert. Weiterhin wurden 51 invasive Zervixkarzinome festgestellt; darunter 22 im Stadium FIGO I, 13 im Stadium FIGO II und 13 im Stadium FIGO IV. Bei 24 Patientinnen kam es trotz erfolgter Therapie zu einem Rezidiv des Zervixkarzinoms.

Von den 101 Patientinnen mit der Erstdiagnose eines Zervixkarzinoms bzw. einer Karzinomvorstufe (CIN I-III) konnten 16 Patientinnen durch eine Probeexzision und Kürettage therapiert werden. 65 Patientinnen wurden operiert, davon erhielten 18 Patientinnen zusätzlich eine adjuvante Strahlen- bzw. Chemotherapie und 20 Patientinnen unterzogen sich einer neoadjuvanten oder primären Radio-/Chemotherapie.

Unter den invasiven Karzinomen fanden sich 68 Plattenepithelkarzinome, 8 Adenokarzinome, 5 adenosquamöse Karzinome, 1 kleinzelliges und 1 klarzelliges Karzinom. Weiterhin lag bei den invasiven Karzinomen zweimalig eine hohe histologische Differenzierung (G1), in 38 Fällen eine mittlere (G2) und in 31 Fällen eine niedrige Differenzierung (G3) des Tumorgewebes vor. Von 5 Patientinnen mit invasivem Karzinom war der Differenzierungsgrad aus den vorhandenen Unterlagen nicht feststellbar.

Von 52 Patientinnen mit invasivem Karzinom, bei denen der Lymphknotenstatus festgelegt werden konnte, hatten 24 Frauen keine befallenen Lymphknoten (N0), während bei 28 Patientinnen ein Tumorbefall der Lymphknoten festgestellt wurde (N1). Bei 23 Patientinnen war der Lymphknotenstatus unbekannt.

Zum Zeitpunkt der Blutentnahme wiesen 17 Patientinnen mit invasivem Karzinom Fernmetastasen auf (M1), bei 54 Patientinnen waren keine Fernmetastasen feststellbar (M0). Von 4 Patientinnen war der Fernmetastasenstatus durch die Unterlagen nicht eruierbar.

Bei 19 Patientinnen wurde keine Invasion der Lymphgefäße durch die Tumorzellen nachgewiesen (L0), 20 Patientinnen wiesen eine solche auf (L1). Für 36 Patientinnen lag diesbezüglich kein Datenmaterial vor.

Bei 24 Patientinnen lag keine Invasion der Tumorzellen in die venösen Gefäße vor, für 8 Patientinnen wurde eine solche nachgewiesen. Bei 43 Patientinnen blieb der Status der Veneninvasion unbekannt.

4.2. *Vorbetrachtung der Daten*

Um zu entscheiden, welche statistischen Testverfahren zur Berechnung der einzelnen Fragestellungen angewendet werden müssen, werden zunächst die zu prüfenden Variablen VEGF, VEGF-C und VEGF-D auf Normalverteilung untersucht.

Dies erfolgt mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests.

Tabelle 2: Überprüfung der Normalverteilung von VEGF/Plasma

N	125
MW	119.15
s	116.85
K-S-Z	2.09
p	.000

N= Anzahl Blutproben; MW= Mittelwert; s= Standardabweichung; K-S-Z = Kolmogorov-Smirnov-Z-Wert; p= p-Wert

Tabelle 3: Überprüfung der Normalverteilung von VEGF-C/Serum

N	125
MW	10314.22
s	3858.36
K-S-Z	1.45
p	.030

N= Anzahl Blutproben; MW= Mittelwert; s= Standardabweichung; K-S-Z = Kolmogorov-Smirnov-Z-Wert; p= p-Wert

Tabelle 4: Überprüfung der Normalverteilung von VEGF-D/Serum

N	125
MW	398.71
s	261.92
K-S-Z	1.48
p	.025

N= Anzahl Blutproben; MW= Mittelwert; s= Standardabweichung; K-S-Z = Kolmogorov-Smirnov-Z-Wert; p= p-Wert

Eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung besteht bei $p < .05$. Wie aus den Tabellen 2-4 abgelesen werden kann, erbrachte der Kolmogorov-Smirnov-Test für alle drei betrachtete Faktoren (VEGF, VEGF-C und VEGF-D) ein $p < .05$. Keiner der drei Parameter ist also normalverteilt.

4.3. Prüfung der Fragestellungen

1. Gibt es signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen „CIN“, „invasives Ca“ und „Rezidiv“ hinsichtlich der Plasma- bzw. Serumkonzentration der drei Angio-/Lymphangiogenesefaktoren VEGF-A, -C und -D?

Um herauszufinden, ob sich die Blutkonzentrationen der drei Parameter während der Tumorprogression signifikant verändern, werden zunächst folgende Gruppierungen vorgenommen: „Tumorvorstufe“ (CIN I-III), „invasives Karzinom“ (FIGO I-IV) und „Rezidiv“. Da die Variable „Gruppe“ ordinalskaliert ist und mehr als zwei Stufen hat, wird zur Überprüfung der o.g. Fragestellung der Kruskal-Wallis-Test angewendet.

Tabelle 5: Prüfung auf Unterschiede der Faktorenkonzentrationen zwischen den Gruppen CIN I-III, FIGO I-IV und Rezidiv

	VEGF/Plasma	VEGF-C/Serum	VEGF-D/Serum
MR-C (N=50)	50.96	58.64	72.83
MR-F (N=51)	68.50	63.89	55.90
MR-R (N=24)	76.40	70.19	57.60
χ^2	9.980	1.700	6.172
Df	2	2	2
P	.007	.427	.046

MR-C= Mittlere Rangzahl der Gruppe CIN I-III; MR-F= Mittlere Rangzahl der Gruppe FIGO I-IV; MR-R= Mittlere Rangzahl der Gruppe Rezidiv; N=Anzahl der Blutproben; χ^2 = Prüfgröße CHI-Quadrat; df= Anzahl der Freiheitsgrade; p= p-Wert

In Tabelle 5 können die mittleren Rangzahlen der Faktorenkonzentrationen für die jeweiligen Stadien der Tumorprogression abgelesen werden.

Für VEGF und VEGF-C sind die mittleren Rangzahlen der Plasma- bzw. Serumkonzentration bei der Gruppe „CIN I-III“ am niedrigsten und steigen zur Gruppe „Rezidiv“ hin an.

Für das VEGF-D dagegen weisen die mittleren Rangzahlen der Gruppe „CIN I-III“ die höchsten Werte auf; den niedrigsten Wert hat die Gruppe „FIGO I-IV“. In der Gruppe „Rezidiv“ ist die mittlere Rangzahl wieder leicht höher als bei „FIGO I-IV“.

Der Kruskal-Wallis-Test zeigt jedoch nur für VEGF ($p=.007$) und VEGF-D ($p=.046$) signifikante Unterschiede der Plasma- bzw. Serumkonzentrationen an.

Die Abbildungen 3 und 4 zeigen die zu den Berechnungen für VEGF und VEGF-D gehörenden Boxplots; hierbei sind die zu untersuchenden Gruppen den absoluten Plasma- bzw. Serumkonzentrationen (in pg/ml) gegenübergestellt.

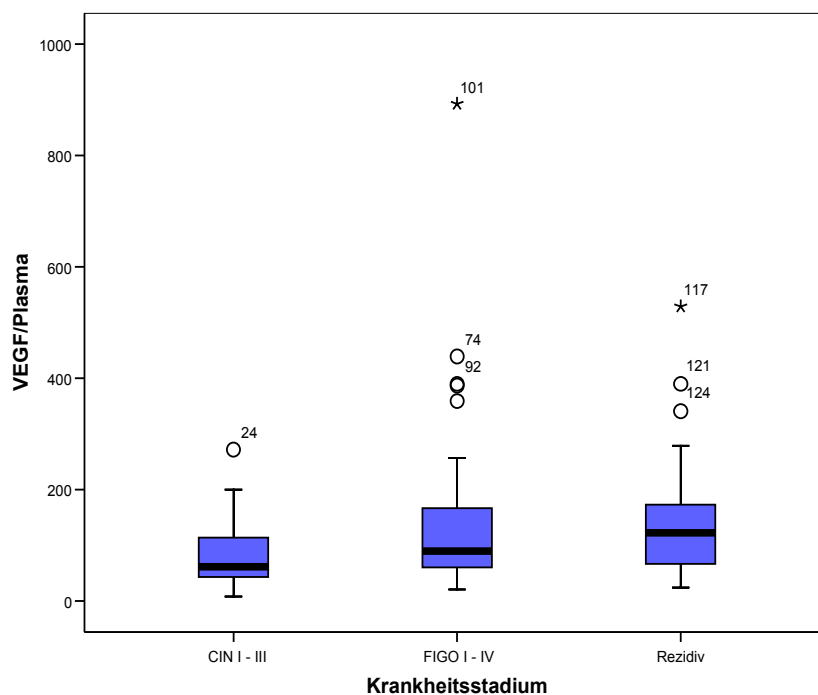


Abbildung 3: Boxplot VEGF/Tumorstadiengruppen

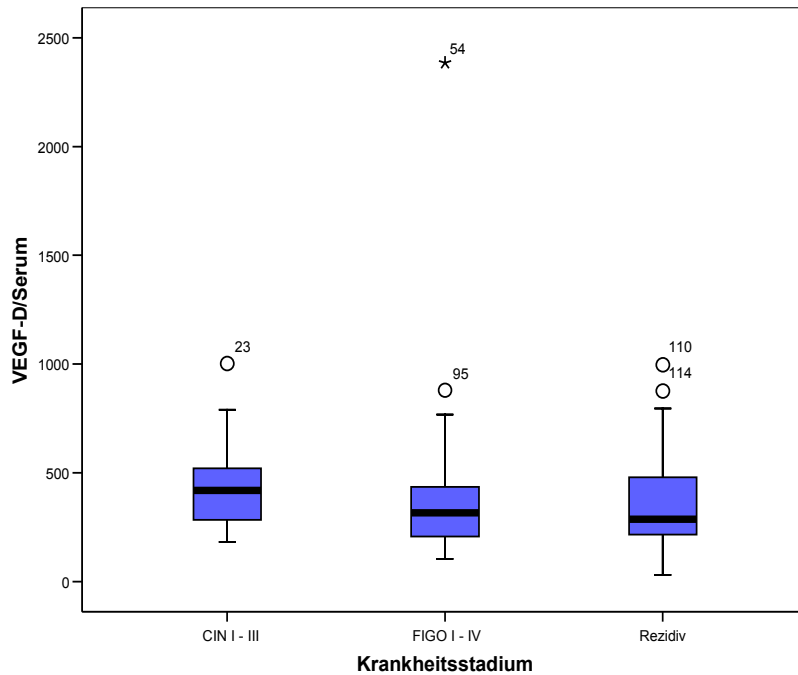


Abbildung 4: Boxplot VEGF-D/Tumorstadiengruppen

In Abbildung 4 wird ersichtlich, dass der Medianwert der VEGF-D-Serumkonzentration der Gruppe „Rezidiv“ trotz der höheren mittleren Rangzahl im Kruskal-Wallis-Test niedriger als derjenige der Gruppe „FIGO I-IV“ ist.

2. Gibt es hinsichtlich der Plasma-/Serumkonzentrationen der drei Angio-/Lymphangiogenesefaktoren signifikante Unterschiede zwischen den histologischen Subtypen (Plattenepithel-, Adeno-, Adenosquamöses Karzinom)?

Um der Frage nachzugehen, ob sich zwischen den histologischen Subtypen des Zervixkarzinoms signifikante Unterschiede in den Serum-/Plasmakonzentrationen der drei Parameter finden, werden zunächst drei Gruppen (Plattenepithel-/Adeno-/Adenosquamöses Karzinom) gebildet. Das kleinzellige und das klarzellige Karzinom werden aufgrund der sehr geringen Fallzahl (jeweils 1) aus der Betrachtung ausgeschlossen.

Da die Plasma-/Serumkonzentrationen der drei Faktoren nicht normalverteilt sind, wird zur Untersuchung der Fragestellung wiederum der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

Tabelle 6: Prüfung auf Konzentrationsunterschiede der drei Faktoren zwischen den histologischen Subtypen

	VEGF/Plasma	VEGF-C/Serum	VEGF-D/Serum
MR-PL (N=58)	35.42	35.66	37.12
MR-A (N=8)	33.94	34.38	33.06
MR-AS (N=5)	46.00	42.60	27.70
χ^2	1.299	.577	1.142
df	2	2	2
p	.522	.749	.565

MR-PL= Mittlere Rangzahl Plattenepithel-Ca; MR-A= Mittlere Rangzahl Adeno-Ca; MR-AS= Mittlere Rangzahl Adenosquamöses Ca; N= Anzahl der Blutproben; χ^2 = Prüfgröße CHI-Quadrat; df= Anzahl der Freiheitsgrade; p= p-Wert

Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests. Bei Betrachtung der mittleren Rangzahlen scheinen die Blutkonzentrationen von VEGF und VEGF-C beim adenosquamösen Karzinom am höchsten zu sein, während sie für das VEGF-D dort am niedrigsten sind. Für keinen der drei Parameter kann jedoch ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den histologischen Subtypen ermittelt werden. Auf die ursprüngliche Intention, die beiden Gruppen „Adenokarzinom“ und „Adenosquamöses Karzinom“ zu einer Gruppe zusammenzufassen, wird aufgrund der deutlichen Unterscheidung der mittleren Rangwerte beider Gruppen verzichtet, auch wenn dieser Unterschied nicht signifikant ausfällt.

3. Gibt es einen signifikanten Konzentrationsunterschied der drei Angio/Lymphangiogenesefaktoren hinsichtlich der Prognosefaktoren N (Lymphknotenmetastasen), M (Fernmetastasen), L (Invasion der Lymphgefäße), V (Veneninvasion) bzw. des Grades der Tumordifferenzierung (G)?

Um zu ermitteln, ob sich beim Vorliegen von Lymphknoten- oder Fernmetastasen, Lymphgefäß-/Veneninvasion oder bei den unterschiedlichen Graden der Tumordifferenzierung die Blutkonzentrationen der drei Faktoren ändern, werden für jeden Prognosefaktor jeweils zwei Gruppen, nämlich „nicht vorhanden“ vs. „vorhanden“

(0 vs. 1) gebildet. Da hier jeweils nur eine zweistufige, ordinalskalierte Variable mit den nicht normalverteilten Faktorenkonzentrationen verglichen werden soll, wird hier der U-Test nach Mann und Whitney angewendet.

a. Lymphknotenmetastasen:

Tabelle 7: Prüfung auf Konzentrationsunterschiede der drei Faktoren zwischen dem Vorliegen und dem Fehlen von Lymphknotenmetastasen

	VEGF/Plasma (pg/ml)	VEGF-C/Serum (pg/ml)	VEGF-D/Serum (pg/ml)
MR-N0 (N=24)	25.08	29.69	29.02
MR-N1 (N=28)	27.71	23.77	24.34
U	302.000	259.500	275.500
Z	-.624	-1.404	-1.111
p	.533	.160	.267

MR-N0= Mittlere Rangzahl der Gruppe ohne Lymphknotenbefall; MR-N1= Mittlere Rangzahl der Gruppe mit Lymphknotenbefall; N= Anzahl der Blutproben, U= U-Wert (Prüfgröße); Z= Z-Wert; p= p-Wert

Bei Betrachtung der mittleren Ränge haben Patientinnen mit Lymphknotenbefall höhere VEGF-Werte und niedrigere VEGF-C- und VEGF-D-Werte als Patientinnen ohne Lymphknotenbefall. Der Mann-Whitney-U-Test erbringt jedoch für keinen der drei Faktoren einen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen N0 und N1.

b. Tumorzellinvasion der Lymphgefäße:

Tabelle 8: Prüfung auf Konzentrationsunterschiede der drei Faktoren zwischen dem Vorliegen und dem Fehlen einer Lymphgefäßinvasion

	VEGF/Plasma (pg/ml)	VEGF-C/Serum (pg/ml)	VEGF-D/Serum (pg/ml)
MR-L0 (N=19)	20.05	21.39	24.34
MR-L1 (N=20)	19.95	18.68	15.88
U	189.000	163.500	107.500
Z	-.028	-.745	-2.318
p	.989	.461	.019

MR-L0= Mittlere Rangzahl der Gruppe ohne Lymphgefäßinvasion; MR-L1= Mittlere Rangzahl der Gruppe mit Lymphgefäßinvasion; N= Anzahl der Blutproben, U= U-Wert (Prüfgröße); Z= Z-Wert; p= p-Wert

Patientinnen mit einer Invasion der Tumorzellen in die Lymphgefäße haben signifikant niedrigere VEGF-D-Werte als Patientinnen ohne Lymphgefäßinvasion. Für VEGF und VEGF-C ergeben sich keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen L0 und L1 (vgl. Tabelle 8).

Abbildung 5 zeigt den zu den Berechnungen für VEGF-D gehörenden Boxplot; hierbei sind die untersuchten Gruppen „L0“ und „L1“ den absoluten VEGF-D-Konzentrationen im Serum (in pg/ml) gegenübergestellt.

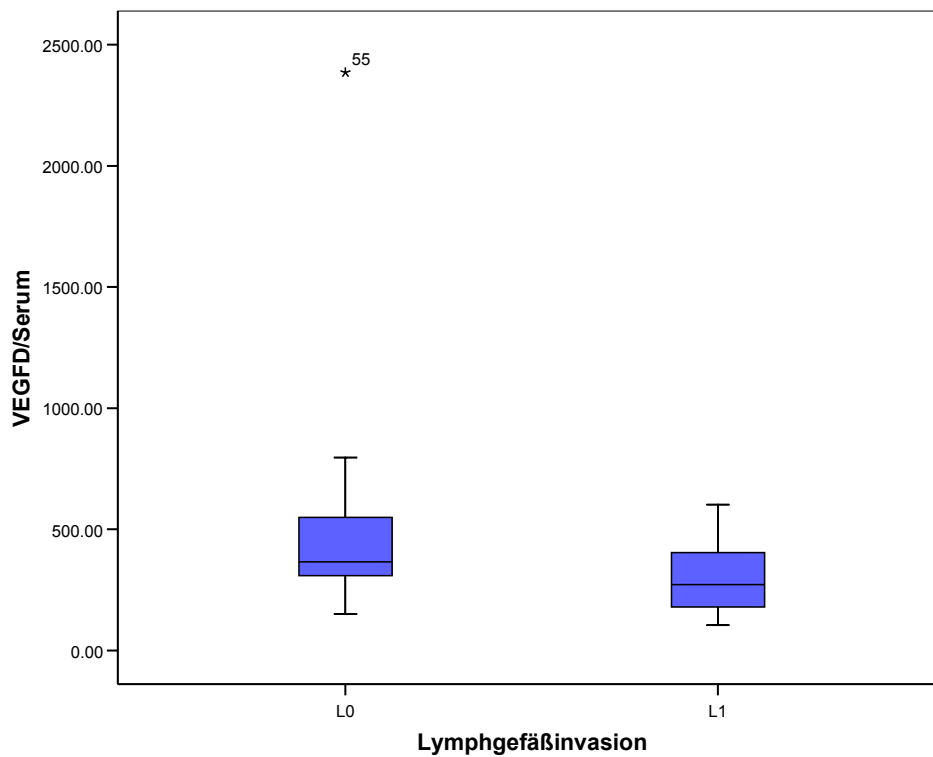


Abbildung 5: Boxplot VEGF-D/Lymphgefäßinvasion

c. Invasion der Tumorzellen in venöse Gefäße:

Tabelle 9 : Prüfung auf Konzentrationsunterschiede der drei Faktoren zwischen dem Vorliegen und dem Fehlen einer Veneninvasion der Tumorzellen

	VEGF/Plasma (pg/ml)	VEGF-C/Serum (pg/ml)	VEGF-D/Serum (pg/ml)
MR-V0 (N=24)	15.60	17.71	16.35
MR-V1 (N=8)	19.90	12.88	16.94
U	74.500	67.000	92.500
Z	-.936	-1.262	-.152
p	.357	.220	.881

MR-V0= Mittlere Rangzahl der Gruppe ohne Veneninvasion; MR-V1= Mittlere Rangzahl der Gruppe mit Veneninvasion; N= Anzahl der Blutproben, U= U-Wert (Prüfgröße); Z= Z-Wert; p= p-Wert

Anhand der mittleren Rangzahlen in Tabelle 9 ist ersichtlich, dass Patientinnen mit einer Veneninvasion der Tumorzellen höhere VEGF-, niedrigere VEGF-C- und in etwa gleiche VEGF-D-Konzentrationen aufweisen als Patientinnen ohne Veneninvasion; der Mann-U-Whitney-Test zeigt jedoch für keinen der drei Parameter einen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen den Gruppen „V0“ und „V1“ an.

d. Fernmetastasen:

Tabelle 10: Prüfung auf Konzentrationsunterschiede der drei Faktoren zwischen dem Vorliegen und dem Fehlen einer Fernmetastasierung

	VEGF/Plasma (pg/ml)	VEGF-C/Serum (pg/ml)	VEGF-D/Serum (pg/ml)
MR-M0 (N=54)	33.68	35.73	35.90
MR-M1 (N=17)	42.79	36.85	36.32
U	343.500	444.500	453.500
Z	-1.556	-.195	-.074
p	.120	.845	.941

MR-M0= Mittlere Rangzahl der Gruppe ohne Fernmetastasen; MR-V1= Mittlere Rangzahl der Gruppe mit Fernmetastasen; N= Anzahl der Blutproben, U= U-Wert (Prüfgröße); Z= Z-Wert; p= p-Wert

Obwohl die mittleren Rangzahlen (siehe Tabelle 10) aller drei Parameter in der Gruppe „M1“ höher sind als in der Gruppe „M0“ (am ausgeprägtesten ist dies bei VEGF), kann

für keinen der drei Faktoren ein signifikanter Unterschied ihrer Plasma- bzw. Serumkonzentrationen ermittelt werden.

e. Differenzierung des Tumorgewebes:

Die histologische Differenzierung eines malignen Tumors ist ein prognostische Faktor und wird durch das Ausmaß der histomorphologischen Übereinstimmung mit dem Ausgangsgewebe (in diesem Fall also gesundes Zervixgewebe) bestimmt. Eine gute Differenzierung bedeutet hohe Ähnlichkeit zum ursprünglichen Gewebe und lässt auf eine geringere Aggressivität und damit günstigere Prognose schließen.

Da hier eine ordinalskalierte Variable mit drei Stufen mit den jeweiligen Faktorenkonzentrationen verglichen werden soll, wird der Kruskal-Wallis-Test angewendet.

Tabelle 11: Prüfung auf Konzentrationsunterschiede der drei Faktoren zwischen den drei Graden der histologischen Tumordifferenzierung

	VEGF/Plasma (pg/ml)	VEGF-C/Serum (pg/ml)	VEGF-D/Serum (pg/ml)
MR-G1 (N=2)	6.50	17.50	58.50
MR-G2 (N=38)	38.20	35.50	38.03
MR-G3 (N=31)	35.21	37.81	32.06
χ^2	4.562	1.867	3.870
df	2	2	2
p	.102	.393	.144

MR-G1= Mittlere Rangzahl gut differenzierter Karzinome; MR-G2= Mittlere Rangzahl mittelmäßig differenzierter Karzinome; MR-G3= Mittlere Rangzahl schlecht differenzierter Karzinome ; N= Anzahl der Blutproben;
 χ^2 = Prüfgröße CHI-Quadrat; df= Anzahl der Freiheitsgrade;
 p= p-Wert

Wie anhand Tabelle 11 ersichtlich wird, ergibt sich für keinen der drei Parameter ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den Tumordifferenzierungsgraden.

4. Gibt es hinsichtlich der Konzentrationen der Angio-/Lymphangiogenesefaktoren signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen FIGO-Stadien und Rezidiv?

In Fragestellung 1 wurde bereits ermittelt, ob bezüglich der Konzentrationen von VEGF, VEGF-C und VEGF-D im Plasma bzw. Serum ein signifikanter Unterschied zwischen den drei grob eingeteilten Tumorprogressionsgruppen „CIN“, „invasives Ca“ und „Rezidiv“ existiert.

Nun sollen zusätzlich die einzelnen Gruppen der Patientinnen mit invasivem Karzinom, nämlich „FIGO I, II, III, IV“ und „Rezidiv“, auf eventuelle Konzentrationsunterschiede der drei Faktoren untersucht werden.

Da es sich hierbei um eine fünfstufige, ordinalskalierte Variable handelt, wird zur Überprüfung des o.g. Zusammenhangs wiederum der Kruskal-Wallis-Tests angewandt; aufgrund der geringen Fallzahl für das Stadium FIGO IV werden die FIGO-Stadien III und IV zusammengefasst.

Tabelle 12: Prüfung auf Konzentrationsunterschiede der drei Faktoren zwischen den einzelnen invasiven Tumorstadien

	VEGF/Plasma (pg/ml)	VEGF-C/Serum (pg/ml)	VEGF-D/Serum (pg/ml)
MR-F1 (N=22)	35.75	43.07	39.05
MR-F2 (N=13)	35.69	43.27	36.96
MR-F3/4 (N=16)	38.25	23.09	37.16
MR-R (N=24)	41.15	40.44	38.17
χ^2	.882	9.735	.106
df	3	3	3
p	.830	.021	.991

MR-F1= Mittlere Rangzahl FIGO I; MR-F2= Mittlere Rangzahl FIGO II; MR-F3= Mittlere Rangzahl FIGO III/IV; N= Anzahl der Blutproben; χ^2 = Prüfgröße CHI-Quadrat; df= Anzahl der Freiheitsgrade; p= p-Wert

Wie aus Tabelle 12 entnommen werden kann, lässt sich einzig für VEGF-C ein signifikanter Konzentrationsunterschied ($p=.021$) feststellen. Bei Betrachtung der mittleren Ränge wird ersichtlich, dass die Konzentration von VEGF-C im Serum der Patientinnen mit FIGO-Stadium II in etwa gleich bis minimal höher ist als bei denen mit FIGO-Stadium I; bei Patientinnen mit den FIGO-Stadien III+IV sinkt sie wieder ab und steigt letztlich bei Patientinnen, die ein Rezidiv entwickelt hatten, wieder leicht an. Letztere Konzentration fällt jedoch geringer aus als im Stadium FIGO I und II.

Abbildung 6 zeigt den zu den Berechnungen für VEGF-C gehörenden Boxplot; hierbei sind die einzelnen invasiven Krankheitsstadien den absoluten VEGF-C-Serumkonzentrationen (in pg/ml) gegenübergestellt.

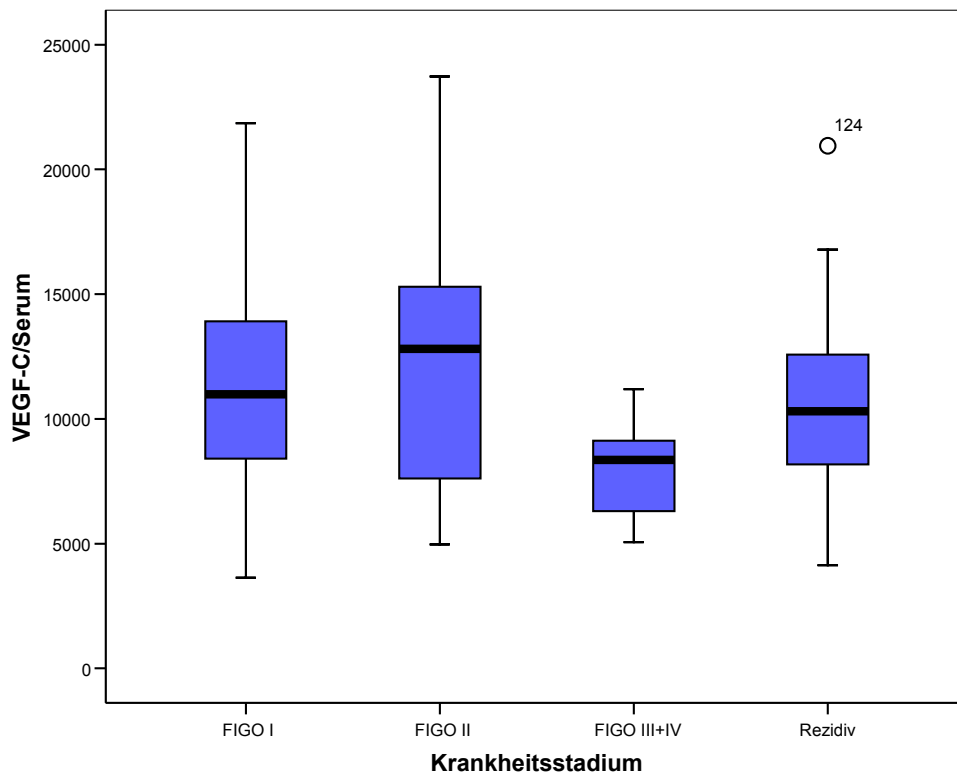


Abbildung 6: Boxplot VEGF-C/Krankheitsstadium

5. Unterscheiden sich die Vorstadien CIN I-III signifikant bezüglich der Konzentration der Angio-/Lymphangiogenesefaktoren?

Analog zur vorherigen Fragestellung sollen nun auch die einzelnen CIN-Stadien genauer betrachtet werden. Es wird untersucht, ob es zwischen den einzelnen Karzinomvorstufen einen signifikanten Unterschied bezüglich der Konzentrationen der drei Faktoren gibt. Aufgrund der geringen Fallzahlen der Gruppen „CIN I“ und „CIN II“ werden diese zu einer Gruppe (CIN I+II) zusammengefasst. Da die Variable „CIN-Stadium“ zweistufig und ordinalskaliert ist, wurde der Mann-U-Whitney-Test angewendet.

Tabelle 13: Prüfung auf Konzentrationsunterschiede der drei Faktoren zwischen den einzelnen CIN-Stadien

	VEGF/Plasma	VEGF-C/Serum	VEGF-D/Serum
MR-C1/2 (N=15)	25.27	20.20	25.60
MR-C3 (N=35)	25.60	27.77	25.46
U	259.000	183.000	261.000
Z	-.074	-1.683	-.032
p	.941	.092	.975

MR-C1/2= Mittlere Rangzahl CIN I/II; MR-C3= Mittlere Rangzahl CIN III; N= Anzahl der Blutproben, U= U-Wert (Prüfgröße); Z= Z-Wert; p= p-Wert

Tabelle 13 kann entnommen werden, dass sich für VEGF-C mit $p=.092$ ein Trend zu einer höheren Serumkonzentration im Stadium CIN III, verglichen zu den Stadien CIN I+II, abzeichnet. Das Signifikanzniveau von $\alpha=5\%$ wird jedoch nicht erreicht. Für VEGF und VEGF-D zeigt sich ebenfalls kein signifikanter Konzentrationsunterschied.

Abbildung 7 zeigt den zu den Berechnungen für VEGF-C gehörenden Boxplot mit den absoluten Serumkonzentrationen von VEGF-C (in pg/ml).

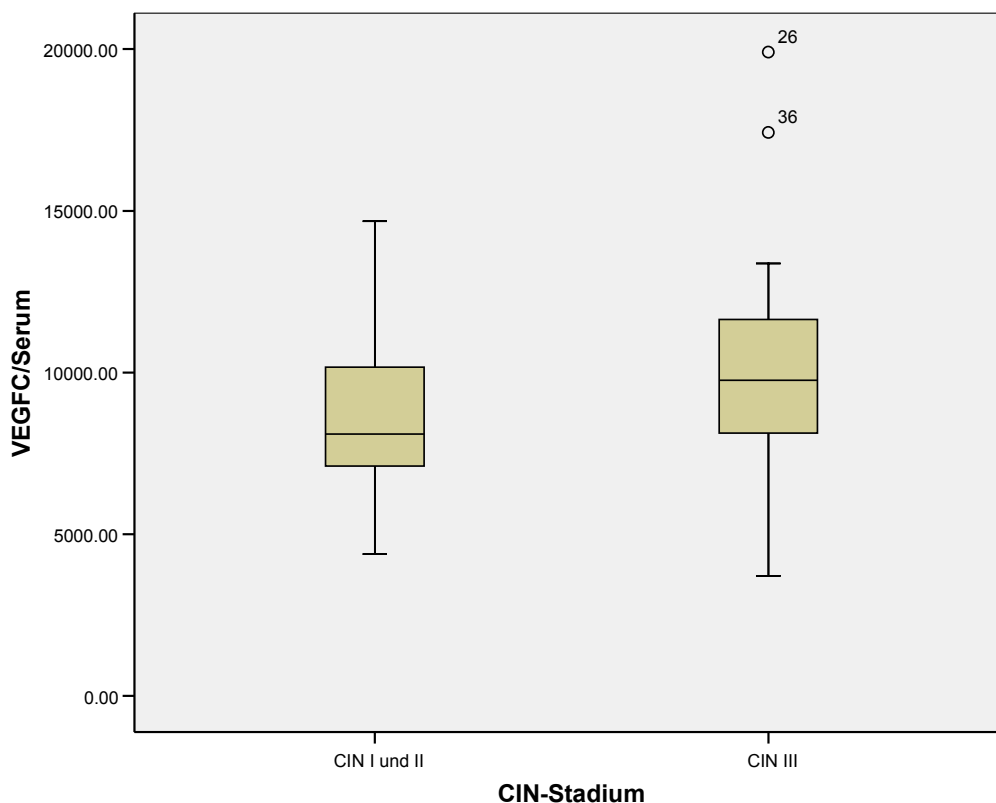


Abbildung 7: Boxplot VEGF-C/CIN-Stadium

6. Wie beeinflusst die Höhe der Konzentrationen der drei Parameter das rezidivfreie und Gesamtüberleben der Patientinnen?

Um zu ermitteln, wie sich die Angio-/Lymphangiogenesefaktoren VEGF, VEGF-C und VEGF-D auf das Gesamtüberleben der Patientinnen auswirken, wurde für die Rezidivpatientinnen ein Follow-up über einen Zeitraum von 24 Monaten durchgeführt. Dieses konnte an 23 von 24 Frauen, bei denen ein Rezidiv festgestellt wurde, vollzogen werden. 12 Frauen mit der Diagnose „Rezidiv“ waren nach 24 Monaten verstorben, während 11 Rezidivpatientinnen zu diesem Zeitpunkt noch am Leben waren. Die Gesamtüberlebenszeit der Patientinnen ab der Erstdiagnose des Zervixkarzinoms schwankte hierbei zwischen 8 und 183 Monaten (gemessen bis zum Ende des Beobachtungszeitraums).

Mit den zum Ende des Beobachtungszeitraumes vorhandenen Daten wird nun eine Regressionsanalyse nach Cox durchgeführt.

Durch die Cox-Regressionsanalyse wird ein Korrelationskoeffizient B berechnet, der ein Maß für die Stärke der Bedeutung der zu prüfenden Kovariate (in diesem Fall die Blutkonzentrationen der drei Faktoren) darstellt. Der berechnete Koeffizient wird anschließend mittels der Chi-Quadrat-verteilten Wald-Statistik (quadrierter Quotient aus dem Regressionskoeffizienten und seinem Standardfehler) auf Signifikanz überprüft.

Wie Tabelle 14 verdeutlicht, kann für keinen der drei Parameter ein signifikanter Korrelationskoeffizient B berechnet werden.

Tabelle 14: Prüfung des Zusammenhangs zwischen den Faktorenkonzentrationen und dem Überleben der Patientinnen

	B	SF	Wald	df	p
VEGF/Plasma	.000	.002	.033	1	.857
VEGF-C/Serum	.000	.000	.823	1	.364
VEGF-D/Serum	-.001	.001	1.415	1	.234

B= Regressionskoeffizient; SF= Standardfehler; Wald= Wert der Wald-Statistik; df= Anzahl der Freiheitsgrade;
p= p-Wert

Keiner der drei Faktoren hat also einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patientinnen mit Rezidiv.

Darüberhinaus ist von Interesse, ob die Höhe der Blutkonzentrationen der drei Parameter evtl. einen Zusammenhang mit der Auftretenswahrscheinlichkeit eines Rezidivs haben könnte. Hierzu wurde der Zeitraum von der Erstdiagnose bis zum Auftreten des Rezidivs aus den Akten der Rezidivpatientinnen ermittelt. Der Einfluss der drei Parameter auf das rezidivfreie Überleben wird wiederum mit Hilfe der Cox-Regressionsanalyse untersucht. Für diese Berechnung liegen von allen 24 Rezidivpatientinnen Daten vor. Die Zeit von der Erstdiagnose des Zervixkarzinoms bis zum Auftreten des Rezidivs schwankte zwischen 0 und 96 Monaten.

Tabelle 15: Prüfung des Zusammenhangs zwischen den Faktorenkonzentrationen und der Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs

	B	SF	Wald	df	p
VEGF/Plasma	.002	.002	.478	1	.489
VEGF-C/Serum	.000	.000	.977	1	.323
VEGF-D/Serum	-.001	.001	.409	1	.522

B= Regressionskoeffizient; SF= Standardfehler; Wald= Wert der Wald-Statistik; df= Anzahl der Freiheitsgrade; p= p-Wert

Tabelle 15 zeigt, dass auch in dieser Hinsicht für keinen der Faktoren ein signifikanter Korrelationskoeffizient B ermittelt werden kann; die Konzentrationen von VEGF, VEGF-C und VEGF-D haben keinen signifikanten Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Rezidivs.

7. Gibt es eine Korrelation der Konzentrationen der drei Angio-/Lymphangiogenesefaktoren untereinander?

Um zu untersuchen, ob die Konzentrationen der einzelnen Faktoren untereinander korrelieren und daher evtl. zwei oder alle drei Faktoren im Zusammenhang betrachtet werden müssen, wird die Durchführung einer Korrelationsanalyse nötig. Da, wie anfangs berechnet, die Konzentrationen von VEGF, VEGF-C und VEGF-D im Plasma/Serum nicht normalverteilt sind, wird zur Untersuchung des oben genannten Zusammenhangs der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet.

Tabelle 16: Prüfung auf Korrelation der Faktoren untereinander

		VEGF/ Plasma (pg/ml)	VEGF-D/ Serum (pg/ml)	VEGF-C/ Serum (pg/ml)
VEGF/Plasma (pg/ml)	rho	1.000	.085	.064
	p	.	.345	.477
	N	125	125	125
VEGF-D/Serum (pg/ml)	rho	.085	1.000	-.182
	p	.345	.	.042
	N	125	125	125
VEGF-C/Serum (pg/ml)	rho	.064	-.182	1.000
	p	.477	.042	.
	N	125	125	125

rho= Korrelationskoeffizient nach Spearman; p= p-Wert; N= Anzahl der Blutproben

Wie in Tabelle 16 abgelesen werden kann, weisen einzig VEGF-C und VEGF-D eine signifikante ($p=.042$), schwach negative Korrelation ($\text{rho} = -.182$) auf. Bei hohen Werten von VEGF-C treten gleichzeitig niedrige Werte von VEGF-D auf und umgekehrt.

In einem nächsten Schritt soll überprüft werden, ob zwischen zwei Parametern eine Korrelation bezüglich des Krankheitsstadiums oder des Vorliegens von Lymphknoten- und Fernmetastasen besteht. Da in der ersten Berechnung einzig VEGF-C und VEGF-D eine signifikante Korrelation aufwiesen, werden im folgenden nur diese beiden Parameter betrachtet. Aus ihnen wird ein Quotient gebildet und anschließend aufgrund der nichtgegebenen Normalverteilung der VEGF-C-/VEGF-D-Konzentrationen wiederum der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Im Falle der Lymphknoten- und Fernmetastasen werden nur Patientinnen mit invasivem Karzinom in die Berechnung miteinbezogen.

Tabelle 17: Prüfung der Korrelation zwischen der VEGF-C/VEGF-D-Ratio und histo-/klinischpathologischen Parametern

		Stadium	LK	M
VEGF-C/VEGF-D	rho	.194	-.023	-.003
	p	.030	.871	.979
	N	125	52	71

rho= Korrelationskoeffizient nach Spearman; p= p-Wert; N=Anzahl der Blutproben; Stadium= Krankheitsstadium;; LK= Lymphknotenmetastasen; M= Fernmetastasen

Anhand der Tabelle ist ersichtlich, dass die VEGF-C/VEGF-D-Ratio eine signifikante, schwach positive Korrelation mit dem Krankheitsstadium ($\rho=.194$; $p=.030$) aufweist. Bei einem höheren Wert des Quotienten liegt ein höheres Krankheitsstadium vor. Der Wert des Quotienten wird umso höher, je höher die VEGF-C-Serumkonzentration und je niedriger die VEGF-D-Serumkonzentration ist.

8. Mit welcher Sensitivität gelingt es, über die Plasma-/Serumkonzentrationen der drei Angio-/Lymphangiogenesefaktoren einen invasiven(FIGO/Rezidiv) von einem nicht invasiven Prozess (CIN I-III) zu unterscheiden?

Um dieser Fragestellung auf den Grund zu gehen, werden zunächst die von den Herstellern der Tests (IBL für VEGF-C, R&D Systems für VEGF und VEGF-D) angegebenen Normwerte als cut-off-Werte verwendet und in einer Kreuztabelle den tatsächlich beobachteten Fällen von Patientinnen mit nicht invasivem (CIN I-III) und mit invasivem Zervixprozess (FIGO I-IV, Rezidiv) gegenübergestellt.

Tabelle 18: Sensitivität und Spezifität von VEGF im Plasma mit dem Normwert des Testherstellers

vorhergesagter Befund		tatsächlicher Befund		Total
		CIN	FIGOI-V/Rezidiv	
gesund (VEGF ≤ 61 pg/ml)	N	24	18	42
	%	57.1%	42.9%	100.0%
krank (VEGF > 61 pg/ml)	N	26	57	83
	%	31.3%	68.7%	100.0%
Total	N	50	75	125
	%	40.0%	60.0%	100.0%

N= Anzahl der Patientinnen; %= Prozentualer Anteil der Patientinnen; CIN= nicht invasiver Befund; FIGO I-V/Rezidiv= invasiver Befund

Tabelle 18 zeigt, dass der Test mit dem von R&D Systems für VEGF im Plasma angegebenen Normbereich von ≤ 61 pg/ml eine Spezifität von 57,1% und eine Sensitivität von 68,7% hat. Das bedeutet, dass 57,1% der Frauen, die in der histopathologischen Untersuchung einen nicht invasiven Prozess der Zervix aufwiesen, durch den Befund einer VEGF-Plasmakonzentration innerhalb des Normbereiches richtig als gesund eingestuft werden können. 42,9% der kranken Frauen wiesen jedoch

einen normalen VEGF-Wert im Plasma auf, obwohl sie an einem invasiven Zervixkarzinom oder einem Rezidiv litten.

68,7% der Patientinnen mit einem invasiven Karzinom bzw. einem Rezidiv werden über eine pathologisch ausfallende VEGF-Plasmakonzentration richtig als krank identifiziert, während 31,3% der CIN-Patientinnen fälschlicherweise eine pathologische VEGF-Plasmakonzentration aufweisen.

Tabelle 19: Sensitivität und Spezifität von VEGF-C im Serum mit dem Normwert des Testherstellers

vorhergesagter Befund		tatsächlicher Befund		Total
		CIN	FIGOI-V/Rezidiv	
gesund (VEGF-C ≤ 13412 pg/ml)	N	47	56	103
	%	45.6%	54.4%	100.0%
krank (VEGF-C > 13412 pg/ml)	N	3	19	22
	%	13.6%	86.4%	100.0%
Total	N	50	75	125
	%	40.0%	60.0%	100.0%

N= Anzahl der Patientinnen; %= Prozentualer Anteil der Patientinnen; CIN= nicht invasiver Befund; FIGO I-V/Rezidiv= invasiver Befund

Anhand Tabelle 19 wird ersichtlich, dass der Test mit dem vom Hersteller IBL angegebenen Normbereich für VEGF-C im Serum (≤13412 pg/ml) eine Spezifität von 45,6% und eine Sensitivität von 86,4% aufweist.

Tabelle 20: Sensitivität und Spezifität von VEGF-D im Serum mit dem Normwert des Testherstellers

vorhergesagter Befund		tatsächlicher Befund		Total
		CIN	FIGOI-V/Rezidiv	
gesund (VEGF-D ≤ 297 pg/ml)	N	16	36	52
	%	30.8%	69.2%	100.0%
krank (VEGF-D > 297 pg/ml)	N	34	39	73
	%	46.6%	53.4%	100.0%
Total	N	50	75	125
	%	40.0%	60.0%	100.0%

N= Anzahl der Patientinnen; %= Prozentualer Anteil der Patientinnen; CIN= nicht invasiver Befund; FIGO I-V/Rezidiv= invasiver Befund

Tabelle 20 zeigt, dass der Test mit dem vom Hersteller R&D Systems angegebenen Normbereich für VEGF-D im Serum (≤297 pg/ml) eine Spezifität von 30,8% und eine Sensitivität von 53,4% hat.

Um die weitestgehend unbefriedigenden Sensitivitäten und Spezifitäten der vorgegebenen Normwerte für die Vorhersage eines invasiven Prozesses der Zervix zu verbessern, sollen nun eigene cut-off-Werte der jeweiligen Faktorenkonzentrationen ermittelt werden. Dies geschieht mit Hilfe der logistischen Regression. Hierdurch kann die Abhängigkeit einer dichotomen Variablen (in diesem Fall „invasiv/nicht invasiv“) von anderen unabhängigen Variablen (in diesem Fall die Konzentrationen der drei Faktoren), die ein beliebiges Skalenniveau aufweisen können, untersucht werden. Es wird ein Regressionskoeffizient B berechnet, der ein Maß für die Stärke der zu prüfenden Variable (hier: die Faktorenkonzentrationen) darstellt. Dieser wird anschließend mittels der Chi-Quadrat-verteiltern Wald-Statistik auf Signifikanz überprüft.

Tabelle 21: Logistische Regression für VEGF bezüglich der Unterscheidung zwischen intraepithelialer Neoplasie und invasivem Zervixkarzinom

	B	SF	Wald	df	p
VEGF/Plasma	.008	.003	7.951	1	.005
a	-.457	.332	1.898	1	.168

B= Regressionskoeffizient; a= Konstante; SF= Standardfehler; Wald= Wert der Wald-Statistik; df= Anzahl der Freiheitsgrade; p= p-Wert

Tabelle 21 zeigt, dass für VEGF mit Hilfe der logistischen Regression ein signifikanter Regressionskoeffizient B ermittelt werden kann. Dies bedeutet, dass die Bestimmung von VEGF im Plasma in der Lage ist, die CIN-Patientinnen von den Frauen mit invasivem Karzinom zu unterscheiden.

Tabelle 22 zeigt erneut eine Gegenüberstellung der vorhergesagten und tatsächlichen Befunde; diesmal jedoch in Bezug auf den durch die logistische Regression ermittelten Cut-off-Wert von 55.5 pg/ml (siehe Tabelle 23).

Tabelle 22: Sensitivität und Spezifität von VEGF im Plasma mit dem durch die logistische Regression ermittelten Cut-off-Wert

		vorhergesagter Befund		Prozentsatz der richtigen Vorhersagen
		CIN	FIGOI-V/Rezidiv	
Beobachteter Befund	CIN	23	27	46.0
	FIGOI-V/Rezidiv	15	60	80.0
Gesamtprozentsatz				66.4

CIN= nicht invasiver Befund;
FIGO I-V/Rezidiv= invasiver Befund

Die Messung der Plasmakonzentration von VEGF mit einem festgelegten Normbereich von ≤ 55.5 pg/ml kann mit einer Sensitivität von 80 % einen invasiven Prozess der Zervix vorhersagen. Allerdings können mit Hilfe desselben Tests nur 46% der CIN-Patientinnen als solche erkannt werden.

Der durch die logistische Regression ermittelte Cut-off-Wert kann nun nach oben bzw. unten verschoben werden; dadurch ändern sich Sensitivität und Spezifität. Man kann folglich eigene Grenzwerte je nach gewünschter Sensitivität bestimmen.

Tabelle 23 zeigt in einem Auszug, wie sich Sensitivität und Spezifität bei Verschiebung des Cut-off-Wertes verändern.

Tabelle 23: Sensitivitäten und Spezifitäten bei Verschiebung des Cut-off-Wertes

maligne, wenn VEGF/Plasma (pg/ml) größer oder gleich	Sensitivität	1- Spezifität
27.4000	.960	.920
28.8500	.960	.900
30.5000	.960	.880
31.6500	.933	.860
32.6500	.933	.840
33.9500	.920	.840
34.7500	.907	.820
35.0500	.893	.820
35.4500	.880	.820
36.4000	.880	.800
37.8000	.867	.800
38.8500	.867	.780
39.9500	.867	.760
40.9500	.853	.760
42.2000	.840	.760
44.0500	.840	.740
45.5000	.840	.700
46.2000	.827	.700
47.0500	.827	.660
49.2500	.813	.660
51.3500	.800	.640
52.3000	.800	.620
53.2500	.800	.600
54.0000	.800	.580
54.4500	.800	.560
55.5000	.800	.540
56.4500	.787	.540
57.1000	.787	.520
58.6000	.773	.520
60.5000	.760	.520
61.4500	.760	.500
62.0500	.760	.480
63.0500	.747	.480
63.5500	.733	.480
64.5000	.720	.480
66.4500	.707	.480
67.6500	.707	.460
68.9500	.693	.460
71.6500	.680	.460

Abbildung 8 stellt den Zusammenhang zwischen Sensitivität und Spezifität des Tests in Form einer Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurve graphisch dar.

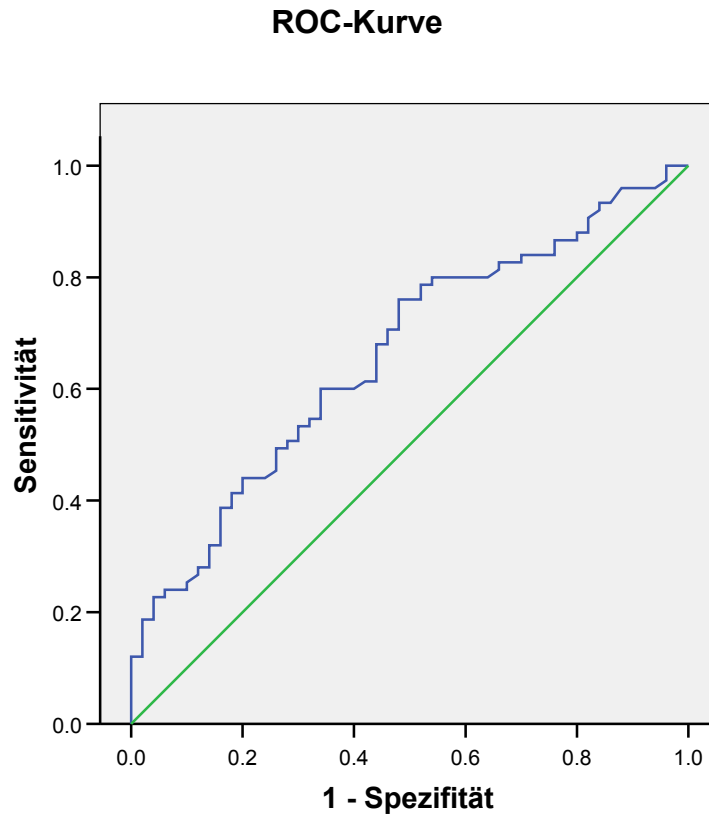


Abbildung 8: Roc-Kurve für VEGF

Tabelle 24: Fläche unter der ROC-Kurve für VEGF

AUC	SF	p	Asymptotisches 95% Konfidenzintervall	
			Untergrenze	Obergrenze
.661	.049	.002	.565	.756

AUC= Fläche unter der Kurve; SF= Standardfehler, p= p-Wert

Die Fläche unter der Kurve ist ein Maß für die Vorhersagekraft bzw Trennschärfe des diagnostischen Tests. Ohne jegliche Vorhersagekraft beträgt sie 0.5; bei maximaler Vorhersagekraft liegt sie bei 1. Die Fläche unter der oben erstellten ROC-Kurve beträgt

.661; der VEGF-Test im Plasma hat also eine eher geringe Vorhersagekraft bzw. diagnostische Trennschärfe.

Tabelle 25 zeigt, dass für VEGF-C durch die logistische Regression kein signifikant von Null verschiedener Regressionskoeffizient B ermittelt werden kann.

Tabelle 25: Logistische Regression für VEGF-C bezüglich der Unterscheidung zwischen intraepithelialer Neoplasie und invasivem Zervixkarzinom

	B	SF	Wald	df	p
VEGF-C/Serum	.000	.000	2.402	1	.121
a	-.399	.544	.539	1	.463

B= Regressionskoeffizient; a= Konstante; SF= Standardfehler; Wald= Wert der Wald-Statistik; df= Anzahl der Freiheitsgrade; p= p-Wert

Gleiches gilt für VEGF-D (siehe Tabelle 26).

Tabelle 26: Logistische Regression für VEGF-D bezüglich der Unterscheidung zwischen intraepithelialer Neoplasie und invasivem Zervixkarzinom

	B	SF	Wald	df	p
VEGF-D/Serum	-.001	.001	.839	1	.360
a	.672	.343	3.827	1	.050

B= Regressionskoeffizient; a= Konstante; SF= Standardfehler; Wald= Wert der Wald-Statistik; df= Anzahl der Freiheitsgrade; p= p-Wert

Die Bestimmung von VEGF-C und VEGF-D im Serum eignet sich nicht zur Unterscheidung zwischen einem nicht invasiven und einem invasiven Zervixprozess.

5. Diskussion

In diesem Kapitel wird zunächst noch einmal das Ziel der vorliegenden Studie erläutert, anschließend erfolgt eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse. Danach werden die im Rahmen der Studie gewonnenen Erkenntnisse in die vorhandene Literatur eingebettet und Probleme der Studie diskutiert. Abschließend erscheint eine Schlussfolgerung mit Ausblick.

5.1. Ziel der Studie

Angiogenese und Lymphangiogenese, die Bildung neuer Blut- und Lymphgefäße, haben sich in den letzten Jahren als hoch bedeutsam für die Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen herausgestellt. In diesem Zusammenhang ist im Besonderen die VEGF-Familie zu nennen, deren Mitglieder VEGF, VEGF-C und VEGF-D angio- bzw. lymphangiogenetische Potenz besitzen. Viele Malignome sind in der Lage, diese Faktoren zu bilden und sich auf diese Weise mit der Bildung von neuen Blut- und Lymphgefäßen selbst eine Grundlage für ihr Wachstum und ihre metastatische Streuung zu schaffen.

Auch für das Zervixkarzinom sind solche Zusammenhänge bereits beschrieben worden. VEGF, VEGF-C und VEGF-D lassen sich jedoch nicht nur im Tumorgewebe selber nachweisen, sondern auch im zirkulierenden Blut. Geht man davon aus, dass diese Faktoren vom Tumor selbst sezerniert werden, so müsste es einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Tumorprogression und der Höhe der Blutkonzentrationen der drei Faktoren geben. Während für das VEGF bereits einige Studien existieren, die einen positiven Zusammenhang zwischen seiner Serumkonzentration und der Ausbreitung des Zervixkarzinoms hergestellt haben, gibt es für das VEGF-C nur vereinzelte Untersuchungen zur Bedeutung seiner Konzentration im Serum für das Zervixkarzinom. Für das VEGF-D hingegen liegt bislang keine Studie vor, die die Serumkonzentration im Hinblick auf die Progression des Zervixkarzinoms untersucht hat.

Die vorliegende Studie sollte daher den Zusammenhang zwischen den Blutkonzentrationen dieser drei angio- bzw. lymphangiogenetischen Faktoren und dem

Ausmaß der Ausbreitung des Zervixkarzinoms näher bestimmen. Hierzu wurden Blutproben von Patientinnen entnommen, die an einer Vorstufe des Zervixkarzinoms, an einem invasiven Zervixkarzinom oder an einem Zervixkarzinomrezidiv litten. Anschließend wurden die Plasmakonzentration von VEGF und die Serumkonzentrationen von VEGF-C und VEGF-D ermittelt. Die gemessenen Konzentrationen wurden dann auf einen statistischen Zusammenhang mit klinisch- und histopathologischen Parametern wie Tumorstadium, histologischer Subtyp, Lymphknoten- und Fernmetastasenstatus, Invasion der Lymphgefäße, Veneninvasion und Grad der Tumordifferenzierung überprüft. Weiterhin war eine mögliche Korrelation der einzelnen Faktorenkonzentrationen untereinander von Interesse, denn für VEGF-C und VEGF-D ist eine negative Korrelation bereits beschrieben worden. Schließlich sollte der Einfluss der Faktorenkonzentrationen im Blut auf das Überleben der Patientinnen ermittelt werden und geprüft werden, ob die Bestimmung derselben dafür geeignet ist, einen malignen Zervixprozess zu erkennen.

5.2. Zusammenfassung der Ergebnisse

Es wurden Blutproben von 125 Patientinnen in verschiedenen Stadien der Kanzerogenese des Zervixkarzinoms entnommen und die Plasmakonzentration von VEGF sowie die Serumkonzentrationen von VEGF-C und VEGF-D bestimmt. Diese wurden anschließend mittels statistischer Verfahren auf oben genannte Zusammenhänge hin analysiert.

Zunächst wurde der Zusammenhang zwischen den drei Gruppen der Tumorprogression (CIN, invasives Ca und Rezidiv) und den drei Faktorenkonzentrationen untersucht. Hierbei ergab sich ein signifikanter Anstieg der Plasmakonzentration von VEGF und ein signifikanter Abfall der Serumkonzentration von VEGF-D von der Gruppe mit dem niedrigsten Stadium der Tumorprogression (CIN) hin zur Gruppe mit dem fortgeschrittensten Stadium (Rezidiv). Für VEGF-C konnte diesbezüglich kein signifikanter Unterschied der Serumkonzentration ermittelt werden.

Bezüglich des histologischen Subtyps zeigte sich für keinen der drei Angio-/Lymphangiogeneseparameter ein signifikanter Unterschied der Blutkonzentrationen. Patientinnen mit einer Invasion der Tumorzellen in die Lymphgefäße hatten signifikant niedrigere VEGF-D-Werte als Patientinnen ohne Lymphgefäßinvasion. Für VEGF und VEGF-C konnte diesbezüglich kein signifikanter Konzentrationsunterschied bestimmt werden.

Für die anderen Prognosefaktoren (Lymphknoten-/Fernmetastasenstatus, Veneninvasion, Grad der Tumordifferenzierung) zeigte sich ebenfalls für keinen der drei Faktoren ein signifikanter Unterschied der Plasma-/Serumkonzentrationen.

Bei Betrachtung der einzelnen Stadien des invasiven Zervixkarzinoms (FIGO I-IV und Rezidiv) zeigte sich einzig für VEGF-C ein signifikanter Konzentrationsunterschied: Die Konzentration von VEGF-C im Serum der Patientinnen mit FIGO-Stadium II war höher als bei denen mit FIGO-Stadium I; bei Patientinnen mit den FIGO-Stadien III+IV sank sie wieder ab und stieg letztlich bei Patientinnen, die ein Rezidiv entwickelt hatten, wieder leicht an. Letztere Konzentration fiel jedoch geringer aus als im Stadium FIGO I und II. Für VEGF und VEGF-D war diesbezüglich kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen.

Bei Betrachtung der einzelnen Vorstufen des Zervixkarzinoms (CIN I-III) erbrachte die statistische Analyse für keinen der drei Parameter einen signifikanten Konzentrationsunterschied. Ein Trend zu höheren Serumkonzentrationen bei Patientinnen im Stadium CIN III, verglichen zum Stadium CIN I+II, war für VEGF-C zu verzeichnen.

Die durchgeführte Cox-Regressionsanalyse ergab, dass keiner der drei Parameter einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Rezidivpatientinnen hatte.

In der Korrelationsanalyse der Faktorenkonzentrationen untereinander wiesen einzig VEGF-C und VEGF-D eine signifikante, schwach negative Korrelation auf. Die anschließend gebildete VEGF-C-/VEGF-D-Ratio wies eine positive Korrelation mit dem Krankheitsstadium auf; jedoch keine mit dem Lymphknoten- und Fernmetastasenstatus.

Weiterhin konnten mit Hilfe der logistischen Regression für die VEGF-Plasmakonzentration Cut-off-Werte definiert werden, mit deren Hilfe mit

unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität (je nach Festlegung des Cut-off-Wertes) zwischen einem (noch) nicht malignen (CIN I-III) und einem malignen Zervixprozess (FIGO I-IV, Rezidiv) unterschieden werden konnte. Für VEGF-C und VEGF-D dagegen war dies nicht möglich.

5.3. Verknüpfung der Ergebnisse mit der relevanten Literatur

5.3.1. Tumorstadium

In einer ersten, groben Betrachtung der drei Hauptstufen in der Kanzerogenese des Zervixkarzinoms (CIN, invasives Ca, Rezidiv) waren für das VEGF im Plasma in der jeweils höheren Stufe signifikant höhere Werte zu verzeichnen. Dies kann als Hinweis dafür gewertet werden, dass VEGF vom Karzinom sezerniert werden und über seine angiogenetische Potenz bedeutend zur Ausbreitung des Zervixkarzinoms beitragen könnte. Diese Erkenntnis scheint zunächst im Einklang mit verschiedenen Studien zu stehen, welche sich sowohl mit der VEGF mRNA-Expression im Karzinomgewebe⁹⁸ als auch mit der Serumkonzentration von VEGF¹⁰⁵ beschäftigt haben. Betrachtete man jedoch die einzelnen Tumorstadien genauer (Fragestellungen 4 und 5), so ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der VEGF-Plasmakonzentration und den einzelnen CIN-Stadien bzw. den einzelnen FIGO-Stadien und Rezidiv. Dies wiederum erweist sich als nicht konsistent mit den Erkenntnissen von Soufla et al. (2005), die außer einer VEGF mRNA-Expression in CIN-Läsionen und invasiven Zervixkarzinomen, die signifikant höher als diejenige in gesunden Zervices war, auch noch einen signifikanten Anstieg der VEGF mRNA-Expression innerhalb der CIN-Gruppe nachweisen konnten⁹⁸. Die Bedeutung dieses Ergebnisses ist jedoch auf Grund der sehr niedrigen Fallzahl in dieser Studie (14 Patientinnen mit Cervikaler Intraepithelialer Neoplasie) fragwürdig. Was das invasive Zervixkarzinom angeht, so konnten sowohl Lebrecht et al. (2002) als auch Mitsuhashi et al. (2005) im Gegensatz zur vorliegenden Studie einen signifikanten Anstieg der VEGF-Serumkonzentration bei fortschreitendem Tumorstadium innerhalb der FIGO-Gruppe nachweisen^{105, 106}. Dieser gegenteilige Befund kann zum einen durch die Testung von VEGF im Serum zustande kommen, da hier Verfälschungen der Ergebnisse durch eine VEGF-Freisetzung aus den Thrombozyten möglich sind. Zum

anderen haben Mitsuhashi et al. (2005) nur das Plattenepithelkarzinom berücksichtigt, da sie in einer ersten Betrachtung keinen signifikanten Unterschied der VEGF-Serumkonzentration zwischen gesunden Frauen und Patientinnen mit Adenokarzinom feststellen konnten¹⁰⁶. In der vorliegenden Studie wurden jedoch auch VEGF-Werte von Patientinnen mit Adeno- bzw. adenosquamösem Zervixkarzinomen berücksichtigt. Es wäre also möglich, dass sich die Blutkonzentration von VEGF entweder nur grob zwischen verschiedenen Stufen der Tumorprogression des Zervixkarzinomes unterscheidet, oder aber, dass ihre Bestimmung nur für die Diagnostik von Plattenepithelkarzinomen der Zervix geeignet ist. Ob die Bestimmung von VEGF im Plasma oder im Serum diagnostisch, therapeutisch und prognostisch relevantere Ergebnisse erbringt, bleibt in Zukunft noch genauer zu klären.

Das VEGF-C im Serum zeigte in der Betrachtung der drei Tumorprogressionsstufen CIN, invasives Karzinom und Rezidiv keinen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Bei Prüfung der Konzentrationen der drei CIN-Stadien war ein Trend zu einer höheren VEGF-C- Serumkonzentration im Stadium CIN III, verglichen zur Gruppe „CIN I+II“ zu verzeichnen, der allerdings kein signifikantes Niveau erreichte. Da es sich beim Stadium CIN III um ein sog. „präinvasives Karzinom“ handelt, wäre es denkbar, dass VEGF-C bereits von intraepithelialen Neoplasien auf dem Weg zur Invasivität gebildet wird. Bei einer höheren Fallzahl an Patientinnen wäre dieser Unterschied möglicherweise signifikant geworden.

Zwischen den einzelnen FIGO-Stadien waren jedoch signifikante Unterschiede der VEGF-C-Serumkonzentration zu beobachten. Die Gruppen „FIGO I“ und „FIGO II“ wiesen die höchsten VEGF-C-Konzentrationen auf. In der Gruppe FIGO III+IV sank die Konzentration wieder ab und stieg bei Patientinnen mit Rezidiv nochmals leicht an. Dies könnte folgendermaßen erklärt werden: Die lymphogene Metastasierung wird in den Stadien FIGO I und II gewissermaßen „vorbereitet“ (im Sinne einer lymphangiogenetischen „Umschaltung“), daher müssen hier vom Tumor die größten Mengen an VEGF-C gebildet werden. Im Stadium FIGO III ist die lymphogene Metastasierung häufig und im Stadium IV definitionsgemäß schon erfolgt, sodass hier der Tumor nicht mehr so viel VEGF-C produzieren muss, da er sein „Ziel“, nämlich den Anschluss an das Lymphsystem, schon erreicht hat. Bei den Rezidiven könnte die wieder leicht erhöhte VEGF-C-Serumkonzentration für besonders aggressive Karzinome sprechen, die weiterhin größere Mengen an VEGF-C bilden und so in der

Lage sind, trotz einer erfolgten Therapie erneut aufzutreten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie konnten Mitsuhashi et al. (2005) jedoch eine signifikante Erhöhung der VEGF-C-Serumkonzentration bei Patientinnen mit Stadium FIGO III und IV, verglichen zu solchen mit Stadium FIGO I und II, nachweisen¹⁰⁶. Dies könnte ebenfalls durch die singuläre Betrachtung von Plattenepithelkarzinomen durch die Autoren zustande kommen. Möglich wäre jedoch auch, dass die Bestimmung von VEGF-C im Serum nur für die Diagnostik des Plattenepithelkarzinoms geeignet ist, sodass die in dieser Studie ermittelten Ergebnisse durch die Berücksichtigung von Adeno- und adenosquamösen Karzinomen verfälscht sein könnten.

Die VEGF-D -Serumkonzentration war in der Betrachtung der groben Tumorstufen CIN, invasives Karzinom und Rezidiv in der CIN-Gruppe am höchsten und sank dann in der FIGO- und Rezidivgruppe signifikant ab. Bisher existieren noch keine anderen Untersuchungen der VEGF-D-Serumkonzentration beim Zervixkarzinom; jedoch sind bereits für andere Karzinome ähnliche Befunde beschrieben worden. Sowohl in Kopf- und Halstumoren als auch im Adenokarzinom der Lunge fanden Forscher eine im Vergleich zum jeweiligen gesunden Gewebe niedrigere VEGF-D mRNA-Expression^{87, 88}. Sie vermuteten daher eine Art protektiven Effekt von VEGF-D und das hier gewonnene Ergebnis deutet im Kontext des Zervixkarzinoms ebenfalls in diese Richtung.

Allerdings zeigte sich bei genauerer Betrachtung der Tumorstufen weder ein signifikanter Unterschied der VEGF-D-Serumkonzentration zwischen den einzelnen CIN-Stadien noch zwischen den einzelnen FIGO-Stadien und der Gruppe „Rezidiv“. Die VEGF-D-Serumkonzentration könnte daher beim Zervixkarzinom möglicherweise als „Anhaltspunkt“ für das Ausmaß der malignen Progression dienen; für die genaue Unterscheidung der einzelnen Tumorstadien scheint sie jedoch nicht geeignet zu sein. Interessant wäre hier auch noch eine singuläre Betrachtung des Plattenepithelkarzinoms gewesen.

5.3.2. Histologischer Subtyp

Bei der Untersuchung des histologischen Subtyps konnte für keinen der drei Faktoren ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen Plattenepithel-, Adeno- und adenosquamösem Zervixkarzinom detektiert werden.

Für das VEGF steht dieser Befund im Widerspruch zu den Untersuchungen von Santin und Kollegen, die eine signifikant höhere VEGF-Sekretion von zervikalen Adenokarzinomen, verglichen zu Zervixkarzinomen plattenepithelialer Differenzierung, beschrieben¹⁰⁸. Die Autoren sahen dies als Hinweis darauf an, dass Adenokarzinome mit Hilfe von VEGF ein aggressiveres Potential erlangen könnten.

Mitsubishi et al. (2005) fanden jedoch im Serum von Patientinnen mit Plattenepithelkarzinomen signifikant höhere VEGF-Konzentrationen als bei Patientinnen mit Adenokarzinom¹⁰⁶. Gleichzeitig zeigte sich kein signifikanter Unterschied der VEGF-Serumkonzentrationen zwischen Patientinnen mit Adenokarzinom und gesunden Frauen. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte darin bestehen, dass aggressivere Karzinome zwar mehr VEGF bilden, diese Aggressivität jedoch unabhängig vom histologischen Subtyp auftritt. Auf diese Weise würden sich auch die Ergebnisse dieser Studie erklären: Die VEGF-Plasmakonzentration zeigte sich zwar in höheren Stufen der Tumorprogression signifikant erhöht (als Zeichen höherer Tumoraggressivität in fortgeschrittenen Stadien); der histologische Subtyp zeigte jedoch keinen Zusammenhang mit der VEGF-Plasmakonzentration. Diese Hypothese kann durch die Untersuchungen von Bachtary et al. unterstützt werden, bei denen kein signifikanter Unterschied der VEGF-Serumkonzentration zwischen den histologischen Typen gefunden werden konnte¹⁰⁹. Um diese Frage abschließend zu klären, wären jedoch noch weitere Studien notwendig, die sich explizit mit dieser Fragestellung beschäftigen.

Auch für das VEGF-C existieren bezüglich des histologischen Subtyps widersprüchliche Ergebnisse zwischen der vorliegenden und anderen Studien. Mitsubishi et al. (2005) konnten höhere VEGF-C-Serumkonzentrationen bei Patientinnen mit Plattenepithelkarzinomen als bei solchen mit Adenokarzinomen der Zervix nachweisen¹⁰⁶. Die Untersuchung der VEGF-C mRNA-Expression in zervikalen Karzinomen durch Ueda et al. (2002) erbrachte dagegen keinen signifikanten Unterschied zwischen

Plattenepithel-, adenosquamösem und Adenokarzinom ¹⁰¹. Auch hier kann vermutet werden, dass diese gegenteiligen Ergebnisse dadurch zustande kommen, dass aggressivere Tumore mehr VEGF-C bilden, dies aber nicht vom histologischen Subtyp abhängig ist. Bei Mitsuhashi et al. (2005) wiesen die Patientinnen mit einem Plattenepithelkarzinom neben signifikant höheren VEGF-C-Serumkonzentrationen als solche mit Adenokarzinom gleichzeitig auch einen signifikanten Anstieg der VEGF-C-Serumkonzentrationen mit dem Tumorstadium auf ¹⁰⁶. Hier schienen also die Plattenepithelkarzinome aggressiveres Potential zu besitzen, während dies in der vorliegenden Studie nicht der Fall zu sein scheint. Die oben geäußerte Vermutung, dass die Bestimmung der VEGF- und VEGF-C-Konzentration im Blut möglicherweise nur für die Diagnostik des Plattenepithelkarzinoms geeignet sein könnte, steht hierzu nicht im Widerspruch, da diese Eignung nicht durch die höhere Aggressivität eines histologischen Subtyps bedingt sein müsste.

Was das VEGF-D betrifft, so existieren bislang keine Studien, die sich mit dem Zusammenhang seiner Serumkonzentration und dem histologischen Subtyp des Zervixkarzinoms beschäftigt haben. Geht man davon aus, dass VEGF-D, wie oben bereits angedeutet, möglicherweise einen protektiven Effekt besitzt, so scheint nach den vorliegenden Ergebnissen keiner der histologischen Subtypen ein aggressiveres Potential zu besitzen, da sich dies in der VEGF-D- Serumkonzentration hätte widerspiegeln müssen; hier wäre für den aggressiveren Subtyp ein niedrigerer VEGF-D-Serumwert zu erwarten gewesen.

Diese Hypothese steht mit den Ergebnissen für die anderen beiden Faktoren im Einklang, da für keinen von diesen ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den histologischen Subtypen hergestellt werden konnte, obwohl alle drei Faktoren einen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen den einzelnen Tumorstadien aufwiesen, sei es zwischen den grob eingeteilten Tumorprogressionsstufen (VEGF, VEGF-D) oder den einzelnen Stadien des invasiven Zervixkarzinoms (VEGF-C).

5.3.3. Prognosefaktoren

a. Lymphknotenmetastasen

Für keinen der drei Faktoren zeigte sich ein signifikanter Konzentrationsunterschied bezüglich des Lymphknotenstatus.

Die für das VEGF gewonnenen Ergebnisse entsprechen den Erkenntnissen von Bachtary et al. (2002), Lebrecht et al. (2002) und Mitsuhashi et al. (2005), die ebenfalls keinen signifikanten Konzentrationsunterschied von VEGF im Serum zwischen Zervixkarzinompatientinnen ohne und mit Lymphknotenbefall finden konnten^{105, 106, 109}. Dies erscheint plausibel unter der Annahme, dass VEGF als angiogenetischer Faktor hauptsächlich das Wachstum eines malignen Tumors stimuliert, jedoch nicht seine lymphogene Metastasierung zu erleichtern vermag.

Für VEGF-C dagegen war zu erwarten, dass sich die Serumkonzentration bei Vorliegen von Lymphknotenmetastasen signifikant erhöhen würde, was durch diese Studie nicht nachgewiesen werden konnte. Dagegen konnten sowohl Hashimoto et al. (2001) als auch Ueda et al. (2002) eine signifikant höhere VEGF-C mRNA-Expression in Zervixkarzinomen, die bereits einen Lymphknotenbefall aufwiesen, demonstrieren^{101, 102}. Mitsuhashi et al. (2005) fanden jedoch bei der Untersuchung der Serumkonzentrationen von VEGF-C ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen der Präsenz und dem Fehlen von Lymphknotenmetastasen¹⁰⁶. Sie vermuteten, dass das vom Karzinom produzierte VEGF-C möglicherweise erst zu einem späteren Zeitpunkt an das zirkulierende Blut abgegeben wird. Diese Hypothese kann durch die Erkenntnisse dieser Studie unterstützt werden. Möglich wäre auch, dass VEGF-C als lymphangiogenetischer Faktor zu keinem Zeitpunkt in einem zur VEGF-C mRNA-Expression des Karzinomgewebes äquivalenten Verhältnis an das Blut abgegeben wird, da sich seine Wirkung ja hauptsächlich auf das Lymphgefäßsystem bezieht. Beide Theorien hätten jedoch zur Folge, dass VEGF-C im Serum nicht als Marker für die Diagnostik der Lymphknotenmetastasierung beim Zervixkarzinom herangezogen werden könnte. In diesem Fall wäre natürlich auch die oben beschriebene Hypothese zur Entwicklung der VEGF-C-Serumkonzentration während der einzelnen Stadien des invasiven Zervixkarzinoms hinfällig.

Die VEGF-D- Konzentration im Serum scheint ebenfalls nicht zur Detektion von Lymphknotenmetastasen geeignet zu sein. Auch ein protektiver Effekt von VEGF-D kann hier nicht postuliert werden, da kein signifikanter Unterschied seiner Serumkonzentration zwischen Patientinnen ohne und mit Lymphknotenmetastasen nachweisbar war. Ähnliche Studien zum Zervixkarzinom, die zum Vergleich herangezogen werden könnten, existieren bislang nicht. Das vorliegende Ergebnis widerspricht jedoch Beobachtungen beim Adenokarzinom der Lunge, nach denen dieses beim Vorliegen von Lymphknotenmetastasen eine signifikant niedrigere VEGF-D mRNA-Expression als ohne Lymphknotenmetastasen aufweist⁸⁷. Möglicherweise wird beim Zervixkarzinom die schützende Wirkung von VEGF-D hauptsächlich über seinen Rezeptor VEGFR-2, der im Wesentlichen auf Blutgefäßendothelien exprimiert ist, vermittelt. Dies hätte zur Folge, dass eine hohe VEGF-D-Konzentration zwar das Wachstum des Zervixkarzinoms behindern kann (was auch die Ergebnisse zum Tumorstadium nahelegen), nicht jedoch die über VEGFR-3-vermittelte Bildung neuer Lymphgefäße als Grundlage für eine lymphogene Metastasierung.

b. Lymphgefäßinvasion

Für VEGF im Plasma konnte diese Studie keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorliegen und dem Fehlen von tumorzellinfiltrierten Lymphgefäßen nachweisen. Dieses Resultat stimmt mit den Ergebnissen von Tjalma et al. überein, die beim invasiven Zervixkarzinom im Falle einer lymphovaskulären Invasion durch die Karzinomzellen keine signifikante Erhöhung der VEGF mRNA-Expression nachweisen konnten¹¹⁰. Dies erscheint angesichts der Hypothese einer alleinigen angiogenetischen Potenz des Faktors plausibel, was im Einklang mit dem oben beschriebenen Ergebnis zur Beeinflussung seiner Plasmakonzentration durch die Präsenz von Lymphknotenmetastasen steht, welches nicht signifikant ausfiel.

Auch für VEGF-C konnte in dieser Hinsicht kein signifikantes Ergebnis erzielt werden. Dies steht im Widerspruch zu den Beobachtungen von Hashimoto et al. (2001), die in Zervixkarzinomen mit einer Lymphgefäßinvasion durch die Tumorzellen eine signifikant höhere VEGF-C mRNA-Expression verzeichneten als in solchen ohne lymphovaskuläre

Beteiligung ¹⁰². Geht man jedoch, wie oben beschrieben, davon aus, dass das vom Karzinom gebildete VEGF-C nicht in einem äquivalenten Verhältnis zur VEGF-C mRNA-Expression an das zirkulierende Blut abgegeben wird, da es dort als lymphangiogenetischer Faktor keinen Effekt hat, so sind die Erkenntnisse dieser und der Studie von Hashimoto et al. (2001) wieder miteinander vereinbar. Dies lässt ein weiteres Mal darauf schließen, dass die Bestimmung von VEGF-C im Serum nicht zur Beurteilung einer Affektion des Lymphgefäßsystems durch die Tumorzellen geeignet ist und für diese Fragestellung eher auf andere Methoden zurückgegriffen werden sollte, wie zum Beispiel die direkte Messung der VEGF-C mRNA-Expression im Tumorgewebe.

Hinsichtlich dieses Prognosefaktors konnte einzig für VEGF-D eine signifikante Veränderung seiner Serumkonzentration nachgewiesen werden. Patientinnen mit einer Lymphgefäßinvasion durch die Tumorzellen hatten eine signifikant niedrigere VEGF-D-Serumkonzentration als solche ohne lymphovaskuläre Beteiligung. Bezüglich dieser Fragestellung existieren für das Zervixkarzinom bislang keine anderen Untersuchungen, jedoch steht das hier ermittelte Ergebnis in Einklang mit der Studie von Niki et al. (2000) ⁸⁷, die beim Adenokarzinom der Lunge eine signifikant niedrigere VEGF-D mRNA-Expression im Falle einer lymphovaskulären Beteiligung aufzeigen konnten. Dies unterstreicht die Hypothese eines protektiven Effektes von VEGF-D, den bereits andere Autoren postuliert haben ^{87, 88}. Es widerspricht jedoch der oben beschriebenen Beobachtung, dass sich die VEGF-D-Serumkonzentration im Falle eines Lymphknotenbefalls nicht signifikant geändert hat und damit der daraus folgenden Hypothese, dass sich der protektive Effekt von VEGF-D nicht auf die lymphogene Streuung des Zervixkarzinoms bezieht. Möglicherweise wären hier durch größere Fallzahlen eindeutigere Ergebnisse erzielt worden. Sicher aber ist, dass für die Rolle von VEGF-D während der lymphogenen Ausbreitung des Zervixkarzinoms noch weiterer Forschungsbedarf besteht.

c. Invasion der Tumorzellen in venöse Gefäße

Für diesen Prognosefaktor konnte zu keiner der drei Faktorenkonzentrationen ein signifikanter Zusammenhang hergestellt werden.

Für das VEGF wäre hier aufgrund seiner angiogenetischen Potenz eine signifikante Erhöhung seiner Plasmakonzentration im Falle einer venösen Invasion durch die Tumorzellen zu erwarten gewesen. Für das Zervixkarzinom existieren ähnliche Studien bislang nicht; für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom konnten jedoch Tamura et al. (2003) eine signifikante Erhöhung der VEGF-Serumkonzentration bei venöser Invasion der Tumorzellen nachweisen¹¹¹. Möglicherweise liegt bei Tamura et al. (2003) eine Verfälschung der Ergebnisse durch die Sekretion von VEGF durch die Thrombozyten im Serum vor. Vielleicht dient aber VEGF im Plasma im Falle des Zervixkarzinoms nicht als geeigneter Marker, um eine Aussage über die venöse Infiltration mit Karzinomzellen treffen zu können. Dies sollte in zukünftigen Studien noch eingehender eruiert werden.

Für das VEGF-C im Serum sind die Ergebnisse der vorliegenden Studie wiederum konsistent mit den Erkenntnissen von Tamura et al. (2003), die beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom keine signifikante Erhöhung der VEGF-C-Serumkonzentration im Falle einer venösen Invasion ermitteln konnten. Dies erscheint sinnvoll, da VEGF-C als lymphangiogenetischem Faktor hauptsächlich eine Bedeutung für die lymphogene Streuung von Malignomen zugeschrieben wird, während es keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf die hämatogene Metastasierung zu haben scheint.

Auch für das VEGF-D existieren bislang keine ähnlichen Untersuchungen beim Zervixkarzinom. Onogawa et al. (2005) konnten für das Magenfrühkarzinom keine signifikante Veränderung der VEGF-D mRNA-Expression im Falle von infiltrierten venösen Gefäßen nachweisen⁹⁰, was mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie zur VEGF-D-Konzentration im Serum in Einklang steht. Hier kann also weder ein angiogenetischer noch ein protektiver Effekt von VEGF-D postuliert werden.

d. Fernmetastasen

Auch in Bezug auf das Vorliegen von Fernmetastasen konnte für keinen der drei Faktoren ein signifikanter Konzentrationsunterschied ermittelt werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie konnten Karayiannakis und Kollegen sowohl beim Pankreas- als auch beim Magenkarzinom eine signifikante Erhöhung der VEGF-Serumkonzentration im Falle eines Vorliegens von Fernmetastasen nachweisen^{112, 113}. Für das Bronchialkarzinom konnte derselbe Nachweis jedoch nicht erbracht werden¹¹⁴. Möglicherweise ist die Bestimmung der VEGF-Konzentration im Blut eher für die Detektion von Fernmetastasen bei gastrointestinalen Malignomen geeignet, während sie beim Zervixkarzinom keine Aussage hierüber zu treffen vermag. Dies würde auch zum Ergebnis der vorigen Fragestellung passen, da die venöse Invasion durch Tumorzellen die Voraussetzung für eine hämatogene Metastasierung darstellt und hier ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang mit der VEGF-Plasmakonzentration hergestellt werden konnte.

Das vorliegende Ergebnis für VEGF-C unterstützt die Hypothese seiner vorwiegenden lymphangiogenetischen Potenz und damit seinem Unvermögen, die hämatogene Metastasierung zu stimulieren. Es stimmt mit der Studie von Ueda et al. (2002) überein, in der beim invasiven Zervixkarzinom keine signifikante Erhöhung der VEGF-C mRNA-Expression beim Vorliegen von ovariellen Metastasen (die bereits als Fernmetastasen angesehen werden) ermittelt werden konnte¹⁰¹. Widersprochen wird diesem Ergebnis jedoch wiederum aus dem Bereich der Gastroenterologie. Onogawa et al. (2004) konnten für das Kolorektale Karzinom eine signifikant erhöhte VEGF-C mRNA-Expression des Karzinomgewebes beim Vorliegen von Lebermetastasen aufzeigen und Wang et al. (2007) gelang es, eine erhöhte VEGF-C-Serumkonzentration von Magenkarzinompatienten mit Fernmetastasen nachzuweisen^{115, 116}. Es wäre möglich, dass VEGF-C eher als Metastasierungsparameter für gastrointestinale Malignome geeignet ist, oder aber, dass die erhöhten VEGF-C-Level hier als Nebeneffekt zustande kommen, da bei metastasierten Karzinomen auch regelmäßig eine Lymphknotenmetastasierung vorhanden ist. Insgesamt stellen sich die Ergebnisse zur Rolle von VEGF-C während der Fernmetastasierung als sehr widersprüchlich heraus.

Das in der vorliegenden Studie ermittelte Ergebnis zum Zusammenhang zwischen einer Fernmetastasierung beim Zervixkarzinom und der VEGF-D-Konzentration im Serum steht (im Gegensatz zu den anderen beiden Faktoren) mit dem wenigen, zu dieser Thematik vorhandenen Studienmaterial in Einklang. Weder beim Kolorektalen Karzinom noch beim Mammakarzinom konnte ein signifikanter Unterschied der VEGF-D mRNA-Expression zwischen dem Vorliegen und dem Fehlen von Fernmetastasen gefunden werden ^{115, 117}. In dieser Hinsicht scheint das VEGF-D also weder eine stimulierende noch eine protektive Potenz zu besitzen.

e. Differenzierung des Tumorgewebes

Auch hinsichtlich des letzten der fünf untersuchten Prognosefaktoren erbrachten die statistischen Analysen für keinen der drei Faktoren einen signifikanten Konzentrationsunterschied.

Für VEGF und VEGF-C steht dies im Einklang mit den vorhandenen Studien zum Zervixkarzinom. Weder konnte eine Veränderung der VEGF mRNA-Expression des Karzinomgewebes ¹¹⁰ oder der VEGF-Serumkonzentration ¹⁰⁵ noch eine Veränderung der VEGF-C mRNA-Expression ¹⁰¹ bei verschiedengradig differenzierten Zervixkarzinomen nachgewiesen werden. Für VEGF-D existieren hinsichtlich dieses Themas bislang keine Studien zum Zervixkarzinom, jedoch kann durch Untersuchungen der VEGF-D mRNA-Expression anderer Karzinomen, wie Kolorektales ¹¹⁵ und Mammakarzinom ¹¹⁷, der in dieser Studie ermittelte fehlende Zusammenhang mit dem Grad der histologischen Differenzierung bestätigt werden. Dies ist erstaunlich angesichts der Tatsache, dass schlechter differenzierte Karzinome ein aggressiveres Potential besitzen und daher eine Auswirkung auf die Faktorenkonzentrationen im Blut zu erwarten gewesen wäre. Aus den inzwischen für verschiedene Karzinome gewonnenen, identischen Ergebnissen lässt sich jedoch folgern, dass die histologische Differenzierung eines Malignoms wahrscheinlich keinen Einfluss auf seine Fähigkeit hat, einen der drei Faktoren zu bilden und zu sezernieren.

5.3.4. Überleben und Zeit bis zum Auftreten des Rezidivs

Keiner der drei Faktoren zeigte einen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit oder die Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs.

Zur Bedeutung von VEGF für das rezidivfreie und insgesamt Überleben existieren recht widersprüchliche Studien. Während Cheng und Kollegen die zytosolische VEGF-Konzentration und Bachtiry et al. (2002) die VEGF-Serumkonzentration als unabhängigen prognostischen Faktor für rezidivfreies Überleben (und Cheng et al. (2000) auch für Gesamtüberleben) beim Zervixkarzinom deklarierten^{109, 118}, konnten Tjalma et al. (2000) keinen prognostischen Wert der VEGF mRNA-Expression für das Gesamtüberleben von Patientinnen mit Zervixkarzinom feststellen¹¹⁰. Lebrecht et al. (2002) schlossen das Serum-VEGF als prognostischen Faktor für rezidivfreies und Gesamtüberleben aus und Mitsuhashi et al. (2005) konnten ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der VEGF-Serumkonzentration und dem Auftreten von Karzinompersistenz oder -rezidiv herstellen^{105, 106}, was mit dem Ergebnis der vorliegenden Studie in Einklang steht. Diese konträren Befunde zeigen die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen auf; zum gegenwärtigen Zeitpunkt erscheint es jedoch ratsam, von der Annahme eines prognostischen Wertes der VEGF-Blutkonzentration für das Zervixkarzinom Abstand zu nehmen.

Das in dieser Studie ermittelte Fehlen einer prognostischen Relevanz des VEGF-C-Serumwertes steht in Widerspruch zu anderen Untersuchungen beim Zervixkarzinom. Hashimoto et al. (2001) konnten einen Trend zu einer kürzeren rezidivfreien Überlebenszeit von Patientinnen mit Karzinomen mit hoher VEGF-C mRNA-Expression nachweisen, der nur sehr knapp ein signifikantes Niveau verpasste¹⁰². Ueda et al. (2002) stellten eine signifikant kürzere Gesamtüberlebenszeit beim Vorliegen von Karzinomen mit hoher VEGF-C mRNA-Expression fest¹⁰¹ und Mitsuhashi et al. (2005) konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der VEGF-C-Serumkonzentration und dem Auftreten einer Karzinompersistenz oder eines Rezidives aufzeigen¹⁰⁶. Möglicherweise kommt das gegenteilige Ergebnis der vorliegenden Untersuchung dadurch zustande, dass hier nur Patientinnen betrachtet wurden, bei denen bereits ein Rezidiv festgestellt worden war, während in den anderen drei Studien Patientinnen mit einem invasivem Zervixkarzinom aller Stadien in die Untersuchung

miteinbezogen wurden. Die Blutentnahme fand überdies in der vorliegenden Studie bei Diagnosestellung des Rezidivs statt und die rezidivfreie Zeit wurde retrospektiv ermittelt. Möglicherweise wäre ein anderes Ergebnis erzielt worden, wenn die Blutentnahmen bei Erstdiagnose erfolgt wären. Dies würde auch zu der für die einzelnen FIGO-Stadien und das Rezidiv ermittelten, signifikanten Entwicklung der VEGF-C-Serumkonzentration (siehe oben) passen, die zeigt, dass sich die höchsten VEGF-C-Serumkonzentrationen im FIGO-Stadium I und II fanden, während im Stadium des Rezidivs kein starker Anstieg mehr zu verzeichnen war. Möglicherweise hätten die Patientinnen, die später ein Rezidiv entwickelten, prätherapeutisch signifikant höhere VEGF-C-Serumkonzentrationen aufgewiesen, wenn diese bei Erstdiagnose des Zervixkarzinoms bestimmt worden wären.

Für das VEGF-D als prognostischen Faktor beim Zervixkarzinom sind bis anhin keine Untersuchungen durchgeführt worden. Im Hinblick auf andere Tumorentitäten zeigen sich jedoch widersprüchliche Befunde: Für das Mammakarzinom konnte von Gisterek und Kollegen kein prognostischer Wert von VEGF-D ermittelt werden ¹¹⁹, während andere Autoren eine signifikante Verringerung der rezidivfreien und Gesamtüberlebenszeit von Patienten mit Kolorektalem Karzinom und einer hohen VEGF-D mRNA-Expression nachweisen konnten ¹²⁰. In einer weiteren Studie wurde die VEGF-D mRNA-Expression als unabhängiger prognostischer Faktor für das Adenokarzinom des Magens beschrieben ¹²¹. Dies könnte darauf hindeuten, dass VEGF-D für manche Karzinome eine prognostische Relevanz besitzt, wie das hier für gastroenterologische Malignome angedeutet wird, während dies für andere Karzinome, wie z.B. das Mamma- und nach der vorliegenden Studie auch das Zervixkarzinom, nicht der Fall zu sein scheint. Dieser Hypothese widerspricht jedoch eine ältere Untersuchung, in der sich die VEGF-D mRNA-Expression beim Mammakarzinom als unabhängiger prognostischer Faktor für rezidivfreies und Gesamtüberleben zeigte ¹²². Ein protektiver Effekt, nach dem Patienten mit hohen VEGF-D-Konzentrationen im Serum oder einer hohen VEGF-D mRNA-Expression im Tumorgewebe eine längere rezidivfreie und Gesamtüberlebenszeit aufweisen müssten, konnte jedoch in keiner der Untersuchungen verifiziert werden.

5.3.5. Korrelation der Faktoren untereinander

Einzig die Serumkonzentrationen von VEGF-C und VEGF-D wiesen eine schwach negative Korrelation miteinander auf. Die daraufhin gebildete VEGF-C/VEGF-D-Ratio wiederum korrelierte schwach positiv mit dem Krankheitsstadium, jedoch nicht mit dem Lymphknoten- oder Fernmetastasenstatus. Dies bedeutet, dass Patientinnen mit fortgeschrittenerem Krankheitsstadium gleichzeitig hohe Serumkonzentrationen an VEGF-C und niedrige an VEGF-D aufwiesen, was die Hypothese eines protektiven Effektes von VEGF-D unterstützt^{87, 88}. Weiterhin kann hieraus gefolgert werden, dass VEGF-C und VEGF-D möglicherweise im Zusammenhang miteinander betrachtet werden müssen. Eine niedrige VEGF-D-Produktion durch ein Malignom könnte seine Fähigkeit, mehr VEGF-C zu bilden, begünstigen. Auf diese Weise könnte sein aggressives Potential als Voraussetzung für seine weitere Ausbreitung und Metastasierung erhöht werden. Allerdings wäre dann auch eine Erhöhung dieser Ratio im Falle einer Präsenz von Lymphknotenmetastasen zu erwarten, wenn man VEGF-C als einen lymphangiogenetischen Faktor betrachtet. Niki et al. (2000) konnten dies für die VEGF-C- und VEGF-D mRNA-Expression beim Adenokarzinom der Lunge⁸⁷ und Koyama und Kollegen dasselbe beim Mammakarzinom nachweisen¹²³. Beim Zervixkarzinom scheint dieser Zusammenhang jedoch nur für das Tumorstadium gegeben zu sein, was mit den oben beschriebenen Ergebnissen, nach denen die VEGF-C-Serumkonzentration keinen Zusammenhang mit dem Befall des Lymphsystems aufwies, übereinstimmt. Denkbar wäre daher in letzter Konsequenz auch, dass VEGF-C beim Zervixkarzinom eher angiogenetisch über seinen Rezeptor VEGFR-2 wirken und die lymphangiogenetische, über VEGFR-3-vermittelte Wirkung hier weniger zum Tragen kommen könnte.

5.3.6. Sensitivität und Spezifität

Durch die logistische Regression konnte von den drei Faktoren einzig die VEGF-Plasmakonzentration als geeignet befunden werden, zwischen einem (noch) benignen (CIN I-III) und einem malignen Zervixprozess zu unterscheiden.

Legt man für die VEGF-Konzentration im Plasma einen Cut-off-Wert von 55.5 pg/ml fest, so erhält man das günstigste Verhältnis von 80% Sensitivität und 46% Spezifität. Dies bedeutet, dass man durch diesen Test zwar 80% der Patientinnen mit invasivem Karzinom identifizieren kann, allerdings nur 46% der gesunden Frauen richtig als solche einstufen kann. Es erscheint zwar wichtiger, die kranken Frauen mit höherer Trefferrate zu identifizieren, auch wenn sich dafür einige, fälschlicherweise als krank eingestufte Frauen unnötig weiteren diagnostischen Maßnahmen unterziehen müssen. Allerdings ist die Rate der falsch als positiv eingestuften Frauen so hoch (54%), dass ein praktischer Nutzen des Tests im klinischen Alltag fraglich ist.

Auch die Bestimmung von VEGF-C im Serum scheint sich nach den vorliegenden Ergebnissen nicht zur Unterscheidung zwischen einer intraepithelialen Neoplasie und einem invasiven Zervixkarzinom zu eignen.

Andere Untersuchungen zur gleichen Fragestellung existieren bislang nicht. Einige Forscher haben sich bereits mit der Tauglichkeit von VEGF und VEGF-C für die Diagnostik von Lymphknotenmetastasen beschäftigt. Cheng et al. (2000) konnten aufzeigen, dass die Bestimmung der zytosolischen VEGF-Konzentration mit hoher Sensitivität und Spezifität dafür geeignet ist, das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen beim Zervixkarzinom zu identifizieren ¹¹⁸. Tamura und Kollegen konnten ähnliches für die Bestimmung von VEGF-C im Serum beim Adenokarzinom der Lunge berichten ¹¹¹. Ob die Bestimmung der Plasma- bzw. Serumkonzentration von VEGF und VEGF-C beim Zervixkarzinom dafür geeignet ist, Lymphknotenmetastasen zu detektieren, bleibt zum gegenwärtigen Zeitpunkt unklar und sollte in zukünftigen Untersuchungen genauer beleuchtet werden.

Zum Nutzen der Quantifizierung von VEGF-D in der Diagnostik von Tumorerkrankungen, sei es durch Messung der mRNA-Expression im malignen Gewebe oder durch Bestimmung seiner Serumkonzentration, existieren bislang keine Untersuchungen. Nach den vorliegenden Ergebnissen hat die Bestimmung der VEGF-D- Serumkonzentration beim Zervixkarzinom keinen diagnostischen Wert.

5.4. Probleme der Studie

Obwohl in der vorliegenden Studie versucht wurde, möglichst solide Grundvoraussetzungen zum Erhalt aussagekräftiger Ergebnisse zu schaffen, gibt es doch einige kritische Punkte anzumerken.

Zunächst wäre es wünschenswert gewesen, von allen betrachteten Gruppen ähnlich hohe Fallzahlen vorliegen zu haben, um in den Analysen in jeder Hinsicht in etwa gleich große Stichproben miteinander vergleichen zu können. Dies gilt vor allem für die fortgeschritteneren Tumorstadien FIGO III und IV, von denen nur einzelne Fälle in die Berechnungen miteinfließen konnten. Auch in der Gruppe der Cervikalen Intraepithelialen Neoplasien (CIN) waren die Fallzahlen der Gruppen CIN I und CIN II zu niedrig, als dass sie einzeln mit der Gruppe CIN III hätten verglichen werden können. Weil retrospektiv aus den Patientinnenakten erhoben, waren viele klinischen Daten nicht mehr ermittelbar, sodass sich hierdurch für einige Berechnungen die Fallzahl von ursprünglich 125 Patientinnen noch verkleinerte.

Weiterhin wäre es sinnvoll gewesen, eine zusätzliche Vergleichsgruppe von gesunden Frauen zu bilden, da die Patientinnen mit einer Cervikalen Intraepithelialen Neoplasie, obwohl sie noch nicht an einem Zervixkarzinom litten, streng genommen trotzdem nicht als gesund betrachtet werden können. Dies ist vor allem für die Prüfung der Faktorenkonzentrationen als diagnostischer Test (siehe 5.3.6) zu bedenken. Denn bei diesen Patientinnen vollzieht sich die maligne Transformation der Zervix bereits, sodass schon hier eine veränderte Bildung der drei betrachteten Faktoren vermutet werden kann. Andererseits haben diese Intraepithelialen Neoplasien definitionsgemäß noch keinen Anschluss an das Blutgefäßsystem, sodass die Werte der CIN-Patientinnen mit denen gesunder Frauen vergleichbar sein müssten.

Wie bereits oben angedeutet, wäre es für die Überprüfung des Einflusses der drei Faktorenkonzentrationen im Plasma bzw. Serum auf das rezidivfreie und Gesamtüberleben der Patientinnen sinnvoll gewesen, alle Patientinnen mit invasivem Karzinom in die Betrachtung miteinzubeziehen. Hierzu wäre es jedoch notwendig gewesen, eine prospektive Studie mit einer Blutabnahme bei Erstdiagnose und längerem Follow-up-Zeitraum durchzuführen. In der vorliegenden Untersuchung wurden jedoch nur Patientinnen mit Rezidiv, bei denen die Blutabnahme bei Diagnose des Rezidivs durchgeführt wurde, berücksichtigt. Möglicherweise hätten diese Patientinnen bereits bei Erstdiagnose auffällige Werte aufgewiesen. Hierzu wären weitere

Untersuchungen wünschenswert, die den genannten Beanstandungen Rechnung tragen.

5.5. Schlussfolgerung und Ausblick

Insgesamt betrachtet, konnte die vorliegende Studie die erwarteten Ergebnisse nicht im erhofften Maße bestätigen. Ein einheitliches Konzept, das die Rolle der Blutkonzentrationen der drei Faktoren für die Diagnostik und Therapie des Zervixkarzinoms eindeutig charakterisiert, konnte aufgrund der teils widersprüchlichen Ergebnisse nicht geschaffen werden.

Die VEGF-Konzentration im Plasma verändert sich mit den groben Stufen der Genese und Progression des Zervixkarzinoms und seine Bestimmung vermag zwischen nicht invasiven und invasiven Zervixprozessen zu unterscheiden. Allerdings ist ein praktischer Nutzen dieses Tests im klinischen Alltag aufgrund seiner eher geringen diagnostischen Trennschärfe fragwürdig.

Die Bestimmung der VEGF-C-Serumkonzentration erbrachte nicht den erhofften Wert für die Diagnostik der lymphogenen Aussaat des Zervixkarzinoms. Die VEGF-C-Konzentration im Serum veränderte sich zwar während der einzelnen Stadien der Tumorprogression, jedoch spiegelte sich die angenommene lymphangiogene Potenz von VEGF-C in seiner Serumkonzentration in keiner der hier durchgeführten Untersuchungen zur lymphogenen Streuung des Zervixkarzioms wider.

Was VEGF-D betrifft, so konnte durch die Untersuchung seiner Serumkonzentration teilweise ein protektiver Effekt in der Progression des Zervixkarzinoms bestätigt werden, der sich sowohl auf die Ausbreitung des Tumors (und damit eher auf die angiogenetische Potenz des Zervixkarzinoms) als auch auf die Fähigkeit, Lymphgefäße zu infiltrieren, bezieht. Als interessant erwies sich auch die negative Korrelation von VEGF-C und VEGF-D untereinander sowie die positive Korrelation der VEGF-C-/VEGF-D-Ratio mit dem Krankheitsstadium, nach der ein Zusammenhang der beiden Faktoren vermutet werden kann.

Ob die drei Faktoren in einem äquivalenten Verhältnis zu ihrer Bildung im Tumorgewebe in das zirkulierende Blut sezerniert werden (was hier v.a. für das VEGF-C angezweifelt wurde) und sich über ihre Blutkonzentrationen tatsächlich Rückschlüsse

auf ihre Rolle während der Entstehung und der Progression des Zervixkarzinoms ziehen lassen, oder ob sich trotz ihrer entscheidenden Bedeutung hierfür einfach nur die Bestimmung der Blutkonzentrationen nicht für die Diagnostik eignet, bleibt zum gegenwärtigen Zeitpunkt unklar und sollte Gegenstand zukünftiger Forschung sein. Ebenso ist künftig zu klären, ob die Bestimmung der drei Faktorenkonzentrationen im Blut eventuell nur für die Diagnostik des Plattenepithelkarzinoms herangezogen werden kann und dann die alleinige Betrachtung desselben eindeutigere Ergebnisse als die vorliegende Studie erbringen könnte.

6. Zusammenfassung

Angiogenese und Lymphangiogenese, die Bildung neuer Blut- und Lymphgefäße, haben sich in den letzten Jahren als hoch bedeutsam für die Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen erwiesen. Hierbei ist vor allem die Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Familie zu nennen, deren Mitglieder VEGF, VEGF-C und VEGF-D über ihre Rezeptoren VEGFR-1, -2 und -3 angio- bzw. lymphangiogenetische Potenz besitzen und in den letzten Jahren das wissenschaftliche Interesse in besonderem Maße auf sich gezogen haben. Während VEGF durch seine Fähigkeit, die Bildung neuer Blutgefäße zu induzieren, vor allem eine Rolle während des Wachstums von Malignomen zugeschrieben wird, wird VEGF-C eine Bedeutung für die lymphogene Streuung eines malignen Tumors beigemessen. Über VEGF-D bestehen dagegen widersprüchliche Theorien zu seiner Rolle während der malignen Progression. Einige Autoren schreiben ihm eine lymphangiogene Potenz zu, während andere Forscher einen protektiven Effekt von VEGF-D für möglich halten.

Die mRNA-Expression der drei Faktoren im Gewebe sowohl von Malignomen allgemein als auch des Zervixkarzinoms ist inzwischen in einer Vielzahl von Studien eingehend beleuchtet worden. Zu ihrer Konzentration im zirkulierenden Blut existiert dagegen bislang weit weniger Studienmaterial. Die vorliegende Studie sollte daher die Rolle von VEGF, VEGF-C und VEGF-D für die Entstehung und die Progression des Zervixkarzinoms näher eruieren und die Bedeutung ihrer Blutkonzentrationen für die Diagnostik desselben bestimmen.

Hierzu wurden zwischen 2002 und 2005 Blutproben von 125 Patientinnen in verschiedenen Stadien der Zervixkanzerogenese (CIN I-III, FIGO I-IV und Rezidiv) entnommen und die Plasmakonzentration von VEGF sowie die Serumkonzentrationen von VEGF-C und VEGF-D mit Hilfe der Sandwich-ELISA-Technik ermittelt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mittels statistischer Analysen auf einen Zusammenhang mit zahlreichen histopathologischen Parametern und dem rezidivfreien und Gesamtüberleben überprüft; zusätzlich wurde die Korrelation der einzelnen Faktoren untereinander untersucht. Weiterhin wurden die Blutkonzentrationen der drei Faktoren auf einen Nutzen für die Unterscheidung von nicht invasiven (CIN I-III) und invasiven Zervixprozessen (FIGO I-IV, Rezidiv) getestet.

Patientinnen mit dem höchsten Tumorstadium wiesen die höchsten VEGF-Plasmakonzentrationen ($p=.007$) auf, während bei ihnen gleichzeitig die niedrigsten VEGF-D-Serumkonzentrationen zu verzeichnen waren ($p=.046$). Patientinnen mit einer Tumorzellinvasion der Lymphgefäße wiesen ebenfalls signifikant niedrigere VEGF-D-Serumkonzentrationen auf als Frauen ohne befallene Lymphgefäße ($p=.019$). Bezüglich der anderen histopathologischen Parameter wie Lymphknotenbefall und Fernemetastasen, venöse Infiltration, histologischer Subtyp sowie histologischer Differenzierungsgrad konnte kein signifikanter Zusammenhang mit den Faktorenkonzentrationen hergestellt werden. Keiner der drei Parameter zeigte überdies einen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie und insgesamte Überleben der Patientinnen mit Rezidiv. Es konnte aber eine signifikante, negative Korrelation der VEGF-C- mit der VEGF-D-Serumkonzentration ermittelt werden ($p=.042$; $\rho=-.182$) sowie eine positive Korrelation der VEGF-C/VEGF-D-Ratio mit dem Krankheitsstadium ($p=.030$; $\rho=.194$). Die Bestimmung der VEGF-Plasmakonzentration erwies sich als geeignet, zwischen intraepithelialen und invasiven Zervixprozessen zu unterscheiden ($p=.005$)

Die VEGF-Plasmakonzentration könnte ein Hilfsmittel für die Diagnostik des Zervixkarzinoms darstellen, während die Serumkonzentration von VEGF-C nach den vorliegenden Ergebnissen hierfür nicht geeignet zu sein scheint. VEGF-D könnte während der Entstehung und Ausbreitung des Zervixkarzinoms einen protektiven Effekt besitzen. Die VEGF-C- und VEGF-D-Serumkonzentrationen scheinen in Zusammenhang miteinander zu stehen und könnten sich möglicherweise im gemeinsamen Kontext für die Diagnostik des Zervixkarzinoms als nützlich erweisen.

7. Literaturverzeichnis

1. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11:73-91.
2. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386:671-4.
3. Saaristo A, Karpanen T, Alitalo K. Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis. *Oncogene* 2000; 19:6122-9.
4. Folkman J. Angiogenesis in female reproductive organs. In: Alexander N, d'Arcangues, C., ed. *Steroid hormones and uterine bleeding*. Washington, DC.: AAAS Press, 1992:143-158.
5. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267:10931-4.
6. Nickoloff BJ, Mitra RS, Varani J, Dixit VM, Polverini PJ. Aberrant production of interleukin-8 and thrombospondin-1 by psoriatic keratinocytes mediates angiogenesis. *Am J Pathol* 1994; 144:820-8.
7. Ribatti D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *British Journal of Haematology* 2004:303-309.
8. Thiele W, Sleeman JP. Tumor-induced lymphangiogenesis: a target for cancer therapy? *J Biotechnol* 2006; 124:224-41.
9. Leak LV. The structure of lymphatic capillaries in lymph formation. *Fed Proc* 1976; 35:1863-71.
10. Sabin FR. On the origin and development of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. *AM J Anat.* 1902:367-389.
11. Huntington GS, McClure, C.F.W. The anatomy and development of the jugular lymph sac in the domestic cat (*Felis domestica*). *Am J Anat.* 1908:1-19.
12. He Y, Karpanen T, Alitalo K. Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1654:3-12.
13. Paavonen K, Puolakkainen P, Jussila L, Jahkola T, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol* 2000; 156:1499-504.
14. Clark ER, Clark, L.C. Observations on the new growth of lymphatic vessels as seen in transparent chambers introduced into the rabbit ear. *AM J Anat.* 1932:49-87.
15. Pullinger BD, Florey, H.W. Proliferation of lymphatics in inflammation. *J. Pathol. Bacteriol.* 1937:157-170.

16. Nisato RE, Tille JC, Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Thromb Haemost* 2003; 90:591-7.
17. Folkman J. Tumor angiogenesis. In: Mendelsohn J, Howley, P.M., Israel, M.A., Liotta, M.A., ed. *The molecular basis of cancer*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995:206-232.
18. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1:27-31.
19. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995; 1:149-53.
20. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86:353-64.
21. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265:1582-4.
22. Sleeman JP. The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. *Recent Results Cancer Res* 2000; 157:55-81.
23. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407:249-57.
24. Ji RC. Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: New insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25:677-94.
25. Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, et al. Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol* 2003; 162:1951-60.
26. Maula SM, Luukkaa M, Grenman R, Jackson D, Jalkanen S, Ristamaki R. Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Res* 2003; 63:1920-6.
27. Haag P. Zervixkarzinom. In: Müller M, ed. *Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis* 2007/2008. Breisach: Medizinische Verlags- und Informationsdienste, 2007:60-63.
28. Baltzer J. MH-G, Bahnsen J. *Praxis der gynäkologischen Onkologie*: Thieme Verlag, 1999:158ff.
29. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219:983-5.

30. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161:851-8.
31. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989; 246:1309-12.
32. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246:1306-9.
33. Ferrara N, Leung DW, Cachianes G, Winer J, Henzel WJ. Purification and cloning of vascular endothelial growth factor secreted by pituitary folliculostellate cells. *Methods Enzymol* 1991; 198:391-405.
34. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992; 13:18-32.
35. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000; 60:203-12.
36. Lymboussaki A, Partanen TA, Olofsson B, et al. Expression of the vascular endothelial growth factor C receptor VEGFR-3 in lymphatic endothelium of the skin and in vascular tumors. *Am J Pathol* 1998; 153:395-403.
37. Hartenbach EM, Olson TA, Goswitz JJ, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and survival in human epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Lett* 1997; 121:169-75.
38. Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem* 1991; 47:211-8.
39. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991; 5:1806-14.
40. Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999; 9:211-20.
41. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407:242-8.
42. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005; 65:550-63.
43. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380:439-42.

44. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380:435-9.
45. Eichmann A, Corbel C, Nataf V, Vaigot P, Breant C, Le Douarin NM. Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:5141-6.
46. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, et al. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med* 1998; 4:336-40.
47. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 1998; 152:1445-52.
48. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9:669-76.
49. Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays* 2004; 26:943-54.
50. Koch AE, Harlow LA, Haines GK, et al. Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1994; 152:4149-56.
51. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994; 331:1480-7.
52. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003; 9:685-93.
53. Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 1987; 57:673-86.
54. Roberts WG, Palade GE. Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res* 1997; 57:765-72.
55. Chiarotto JA, Hill RP. A quantitative analysis of the reduction in oxygen levels required to induce up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA in cervical cancer cell lines. *Br J Cancer* 1999; 80:1518-24.
56. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* 1994; 71:374-9.
57. Senger DR, Brown LF, Claffey KP, Dvorak HF. Vascular permeability factor, tumor angiogenesis and stroma generation. *Invasion Metastasis* 1994; 14:385-94.

58. Obermair A, Kucera E, Mayerhofer K, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in human breast cancer: correlation with disease-free survival. *Int J Cancer* 1997; 74:455-8.
59. Abu-Jawdeh GM, Faix JD, Niloff J, et al. Strong expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in ovarian borderline and malignant neoplasms. *Lab Invest* 1996; 74:1105-15.
60. Fontanini G, Boldrini L, Chine S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor mRNA in non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 1999; 79:363-9.
61. Ishigami SI, Arai S, Furutani M, et al. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 78:1379-84.
62. Kondo S, Asano M, Matsuo K, Ohmori I, Suzuki H. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is detectable in the sera of tumor-bearing mice and cancer patients. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1221:211-4.
63. Yamamoto S, Konishi I, Mandai M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian neoplasms: correlation with clinicopathology and patient survival, and analysis of serum VEGF levels. *Br J Cancer* 1997; 76:1221-7.
64. Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21:60-5.
65. Traina TA, Rugo HS, Dickler M. Bevacizumab for advanced breast cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007; 21:303-19.
66. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *Embo J* 1996; 15:1751.
67. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, et al. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:548-53.
68. Joukov V, Sorsa T, Kumar V, et al. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *Embo J* 1997; 16:3898-911.
69. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997; 276:1423-5.
70. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, et al. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 1996; 122:3829-37.

71. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004; 5:74-80.
72. Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 2001; 61:1786-90.
73. Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, et al. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *Embo J* 2001; 20:672-82.
74. Amioka T, Kitadai Y, Tanaka S, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression predicts lymph node metastasis of human gastric carcinomas invading the submucosa. *Eur J Cancer* 2002; 38:1413-9.
75. Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Br J Cancer* 1999; 80:309-13.
76. Mattila MM, Ruohola JK, Karpanen T, Jackson DG, Alitalo K, Harkonen PL. VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors. *Int J Cancer* 2002; 98:946-51.
77. Tamura M, Ohta Y. Serum vascular endothelial growth factor-C level in patients with primary nonsmall cell lung carcinoma: a possible diagnostic tool for lymph node metastasis. *Cancer* 2003; 98:1217-22.
78. Cao Y, Linden P, Farnebo J, et al. Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:14389-94.
79. Yamada Y, Nezu J, Shimane M, Hirata Y. Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. *Genomics* 1997; 42:483-8.
80. Orlandini M, Marconcini L, Ferruzzi R, Oliviero S. Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:11675-80.
81. Stacker SA, Stenvers K, Caesar C, et al. Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J Biol Chem* 1999; 274:32127-36.
82. Marconcini L, Marchio S, Morbidelli L, et al. c-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:9671-6.
83. Al-Rawi MA, Mansel RE, Jiang WG. Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31:117-21.

84. Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, et al. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol* 2005; 25:2441-9.
85. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001; 7:186-91.
86. White JD, Hewett PW, Kosuge D, et al. Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62:1669-75.
87. Niki T, Iba S, Tokunou M, Yamada T, Matsuno Y, Hirohashi S. Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6:2431-9.
88. O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer* 2001; 92:556-68.
89. George ML, Tutton MG, Janssen F, et al. VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression. *Neoplasia* 2001; 3:420-7.
90. Onogawa S, Kitadai Y, Amioka T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in early gastric carcinoma: correlation with clinicopathological parameters. *Cancer Lett* 2005; 226:85-90.
91. Lurain JR. Uterine cancer. In: Berek JS, ed. *Novaks Gynecology*. Maryland: Williams and Wilkins, 1996:1057-1110.
92. Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, et al. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:1237-45.
93. Smith-McCune KK, Weidner N. Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer Res* 1994; 54:800-4.
94. Dellas A, Moch H, Schultheiss E, et al. Angiogenesis in cervical neoplasia: microvessel quantitation in precancerous lesions and invasive carcinomas with clinicopathological correlations. *Gynecol Oncol* 1997; 67:27-33.
95. Dinh TV, Hannigan EV, Smith ER, Hove MJ, Chopra V, To T. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in stage Ib squamous cell carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol* 1996; 87:751-4.
96. Schlenger K, Hockel M, Mitze M, et al. Tumor vascularity--a novel prognostic factor in advanced cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1995; 59:57-66.
97. Obermair A, Bancher-Todesca D, Bilgi S, et al. Correlation of vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1212-7.

98. Soufla G, Sifakis S, Baritaki S, Zafiroopoulos A, Koumantakis E, Spandidos DA. VEGF, FGF2, TGFB1 and TGFBR1 mRNA expression levels correlate with the malignant transformation of the uterine cervix. *Cancer Lett* 2005; 221:105-18.
99. Cheng WF, Chen CA, Lee CN, Chen TM, Hsieh FJ, Hsieh CY. Vascular endothelial growth factor in cervical carcinoma. *Obstet Gynecol* 1999; 93:761-5.
100. Schoppmann SF, Schindl M, Breiteneder-Geleff S, et al. Inflammatory stromal reaction correlates with lymphatic microvessel density in early-stage cervical cancer. *Anticancer Res* 2001; 21:3419-23.
101. Ueda M, Terai Y, Yamashita Y, et al. Correlation between vascular endothelial growth factor-C expression and invasion phenotype in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 2002; 98:335-43.
102. Hashimoto I, Kodama J, Seki N, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression and its relationship to pelvic lymph node status in invasive cervical cancer. *Br J Cancer* 2001; 85:93-7.
103. Ueda M, Terai Y, Kumagai K, et al. Vascular endothelial growth factor C gene expression is closely related to invasion phenotype in gynecological tumor cells. *Gynecol Oncol* 2001; 82:162-6.
104. Van Trappen PO, Steele D, Lowe DG, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D, and their receptor VEGFR-3, during different stages of cervical carcinogenesis. *J Pathol* 2003; 201:544-54.
105. Lebrecht A, Ludwig E, Huber A, et al. Serum vascular endothelial growth factor and serum leptin in patients with cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2002; 85:32-5.
106. Mitsuhashi A, Suzuka K, Yamazawa K, Matsui H, Seki K, Sekiya S. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C levels as tumor markers in patients with cervical carcinoma. *Cancer* 2005; 103:724-30.
107. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 1998; 77:956-64.
108. Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Pecorelli S, Cannon MJ, Parham GP. Secretion of vascular endothelial growth factor in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1999; 94:78-82.
109. Bachtiry B, Selzer E, Knocke TH, Potter R, Obermair A. Serum VEGF levels in patients undergoing primary radiotherapy for cervical cancer: impact on progression-free survival. *Cancer Lett* 2002; 179:197-203.
110. Tjalma W, Weyler J, Weyn B, et al. The association between vascular endothelial growth factor, microvessel density and clinicopathological features in invasive cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 92:251-7.

111. Tamura M, Oda M, Tsunezuka Y, et al. Chest CT and serum vascular endothelial growth factor-C level to diagnose lymph node metastasis in patients with primary non-small cell lung cancer. *Chest* 2004; 126:342-6.
112. Karayiannakis AJ, Bolanaki H, Syrigos KN, et al. Serum vascular endothelial growth factor levels in pancreatic cancer patients correlate with advanced and metastatic disease and poor prognosis. *Cancer Lett* 2003; 194:119-24.
113. Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A, et al. Circulating VEGF levels in the serum of gastric cancer patients: correlation with pathological variables, patient survival, and tumor surgery. *Ann Surg* 2002; 236:37-42.
114. Takigawa N, Segawa Y, Fujimoto N, Hotta K, Eguchi K. Elevated vascular endothelial growth factor levels in sera of patients with lung cancer. *Anticancer Res* 1998; 18:1251-4.
115. Onogawa S, Kitadai Y, Tanaka S, Kuwai T, Kimura S, Chayama K. Expression of VEGF-C and VEGF-D at the invasive edge correlates with lymph node metastasis and prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci* 2004; 95:32-9.
116. Wang TB, Deng MH, Qiu WS, Dong WG. Association of serum vascular endothelial growth factor-C and lymphatic vessel density with lymph node metastasis and prognosis of patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13:1794-7; discussion 1797-8.
117. Mohammed RA, Green A, El-Shikh S, Paish EC, Ellis IO, Martin SG. Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors -A, -C and -D in breast cancer and their relationship with angio- and lymphangiogenesis. *Br J Cancer* 2007; 96:1092-100.
118. Cheng WF, Chen CA, Lee CN, Wei LH, Hsieh FJ, Hsieh CY. Vascular endothelial growth factor and prognosis of cervical carcinoma. *Obstet Gynecol* 2000; 96:721-6.
119. Gisterek I, Matkowski R, Kozlak J, et al. Evaluation of prognostic value of VEGF-C and VEGF-D in breast cancer--10 years follow-up analysis. *Anticancer Res* 2007; 27:2797-802.
120. Hu WG, Li JW, Feng B, et al. Vascular endothelial growth factors C and D represent novel prognostic markers in colorectal carcinoma using quantitative image analysis. *Eur Surg Res* 2007; 39:229-38.
121. Jüttner S, Wissmann C, Jons T, et al. Vascular endothelial growth factor-D and its receptor VEGFR-3: two novel independent prognostic markers in gastric adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24:228-40.
122. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in breast carcinoma with long-term follow-up. *Clin Cancer Res* 2003; 9:716-21.

123. Koyama Y, Kaneko K, Akazawa K, Kanbayashi C, Kanda T, Hatakeyama K. Vascular endothelial growth factor-C and vascular endothelial growth factor-d messenger RNA expression in breast cancer: association with lymph node metastasis. *Clin Breast Cancer* 2003; 4:354-60.

Erklärung

„Ich, Andrea Sylvia Füger, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Die Bedeutung der Angio-/Lymphangiogenesefaktoren VEGF, VEGF-C und VEGF-D für die Genese und Progression des Zervixkarzinoms und ihr Nutzen für die Diagnostik desselben

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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