

5 Diskussion

5.1 Vergleich der Ergebnisse mit dem bisheriger Kenntnisstand

Eine verstärkte Gefäßneubildung ist ein Merkmal fast aller Tumore und ein entscheidender Schritt für deren Wachstum und hämatogene Metastasierung. Dabei korreliert, wie in vielen Studien untersucht wurde, die Anzahl der Blutgefäße im Primärtumor mit der rezidivfreien Überlebenszeit, der Metastasierungstendenz und der Gesamtüberlebenszeit (Harstrick 2000). Am Beispiel des Mammakarzinoms konnte gezeigt werden, dass die Prognose um so schlechter ausfällt, je höher die intratumorale MVD (microvessel density) ist, wobei das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen darauf keinen Einfluss besitzt.

Zwei Mechanismen sind für die Neubildung von Gefäßen verantwortlich, die Angiogenese und die Vaskulogenese. Bei der Angiogenese, ein auch als „Sprouting“ bezeichneter Vorgang, entstehen neue Blutgefäße durch Sprossung aus bereits bestehenden Gefäßen. Dass eine Abhängigkeit des Tumorwachstums von der Angiogenese besteht, ist schon seit längerem bekannt und wurde erstmals 1971 von Folkman beschrieben (Folkman 1971). Bei dem Prozess der Vaskulogenese war man bis vor wenigen Jahren der Meinung, dass dieser auf die Embryonalentwicklung beschränkt ist. Neuere Untersuchungen aber haben bewiesen, dass man aus dem Knochenmark stammende endotheliale Vorläuferzellen im peripheren Blut adulter Organismen nachweisen kann und diese sich an der Neovaskularisation beteiligen (Kalka 1999).

Das Ziel dieser Studie war die Untersuchung, ob die Quantifizierung dieser endothelialen Vorläuferzellen im peripheren Blut eine Methode darstellt um eine tumor-assoziierte Neubildung von Blutgefäßen frühzeitig zu erfassen. Ein weiterer Schwerpunkt war die Analyse der Verwendbarkeit dieser Methode als Tumormarker bei Früherkennung, Verlaufskontrolle und Rezidivfrüherkennung des Mammakarzinoms. Des weiteren wurde der diagnostische und prognostische Wert einer Konzentrationsmessung von VEGF₁₆₅ und bFGF im Serum sowie deren Zusammenhang mit der Anzahl der zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen ermittelt.

Aus dem Knochenmark stammende endotheliale Vorläuferzellen, auch Angioblasten genannt, exprimieren eine Vielzahl von Oberflächen-Antigenen, wie zum Beispiel den VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR2, KDR), CD34 und CD133. Nachdem diese Zellen, durch Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Hypoxie stimuliert, das Knochenmark verlassen, ändert sich auch die Expression dieser Antigene.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Oberflächenproteine genutzt, um die endothelialen Vorläuferzellen im peripheren Blut zu quantifizieren. Dadurch sollte ermittelt werden, ob diese

Methode genügend Aussagekraft besitzt, um im Rahmen der Diagnostik und Prognostik des Mammakarzinoms eingesetzt zu werden.

Auf der Basis der Rezeptoren VEGFR2 (KDR) und CD34 konnten diese Zellen innerhalb der mononukleären Zellpopulation markiert (Kalka 1999) und mittels FACS-Analyse ausgewertet werden. Ziegler et al (1999) stellte fest, dass diese Zellen unter physiologischen Bedingungen 0,1 – 0,5 % der mononukleären Zellen ausmachen. Er verglich unter anderem auch Proben aus dem Knochenmark und dem peripheren Blut und fand bei CD34 positiven Zellen nur geringe Unterschiede in der VEGFR2-Expression. Der Anteil an VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im peripheren Blut betrug dabei $0,19 \pm 0,04$ %.

In dieser Arbeit wurden die endothelialen Vorläuferzellen im peripheren Blut von 47 Frauen mit maligner Brustdrüsenerkrankung, 12 Frauen mit benigner Brustdrüsenerkrankung und 28 Kontrollpatientinnen bestimmt und verglichen. Die Quantifizierung erfolgte ebenfalls über die Rezeptoren VEGFR2 und CD34. Ein Vergleich dieser Gruppen zeigte signifikante Unterschiede in der Anzahl dieser Zellen. Im Median machten die EPC's 0,41 % (Mittelwert 0,45 %) aller mononukleären Zellen in der Gruppe der Karzinompatientinnen, 0,27 % (Mittelwert 0,26 %) in der Gruppe der benignen Brustdrüsenerkrankungen und 0,135 % (Mittelwert 0,175 %) in der Gruppe der Kontrollpatientinnen aus. In Letzterer schwankte der Anteil an EPC's zwischen 0,04 % und 0,7 %, wobei die 90 Perzentile aber bei 0,333 % lag. Betrachtet man Werte über dieser Perzentile als erhöht, erreicht die Methode der Bestimmung endothelialer Vorläuferzellen zur Erkennung des Mammakarzinoms eine Sensitivität von 70 % und eine Spezifität von 90 %. Bei der Patientengruppe mit malignen Brustdrüsenerkrankungen wurde eine Einteilung in mehrere Subgruppen vorgenommen. Unterteilungskriterien waren dabei die Tumorgröße, die Anwesenheit von Lymphknotenmetastasen, der histologische Typ des Karzinoms, der Rezeptorstatus, der Menopausenstatus sowie der Vergleich von prä- und postoperativen Werten. Aufgrund der geringen Fallzahlen innerhalb der einzelnen Subgruppen konnte man allerdings keine signifikanten Unterschiede sondern lediglich Tendenzen erkennen.

In Hinsicht auf die Tumorgröße sieht man schon ab dem Stadium T1, also einer Größe bis zu 2cm nach TNM Klassifikation, eine Verdoppelung der endothelialen Vorläuferzellen im Median. Dieser liegt im Stadium T1 bei 0,35 % im Vergleich zu 0,135 % in der Kontrollgruppe. Einen noch deutlicheren Anstieg sieht man ab dem Tumorstadium T2, also ab einem Durchmesser des Tumors über 2cm. Der Median lag ab dieser Tumorgröße bei über 0,4 %. Keinen Einfluss auf den Anteil der endothelialen Vorläuferzellen im peripheren Blut scheinen der Lymphknotenstatus, der histologische Typ des Tumors, der Steroidhormonrezeptorstatus oder der Menopausenstatus zu haben. Während bei Tumorpatientinnen ohne erkennbare

Lymphknotenmetastasen der Anteil endothelialer Vorläuferzellen innerhalb der mononukleären Zellpopulation im Durchschnitt bei 0,4 % (Median 0,385 %) lag, stieg er in der Gruppe der Patientinnen mit Metastasen auf 0,52 % (Median 0,49 %). Dieser Unterschied war aber nicht signifikant ($p=0,1445$). Patientinnen mit einem invasiv-duktalem Karzinom hatten im Durchschnitt einen Anteil von 0,44 % (Median 0,41 %) und Patientinnen mit einem invasiv-lobulärem Karzinom einen Anteil von 0,51 % (Median 0,44 %). Auch dieser Unterschied wies keine Signifikanz auf ($p=0,5$). Bei rezeptornegativen Tumorpatientinnen machten die EPC's im Median 0,45 % aus, während bei positiven Rezeptorbefund 0,41 % gemessen wurden. Um den Einfluss der Menopause zu beurteilen, wurden die Kontroll- und Karzinompatientinnen weiter in Subgruppen (prä-, peri- und postmenopausal) unterteilt. Ein Vergleich dieser drei Subgruppen innerhalb ihrer Hauptgruppe zeigte dabei nur geringe Abweichungen. So lag der Median in der Kontrollgruppe (0,135 % Median der gesamten Gruppe) bei den prämenopausalen Probanden bei 0,13 %, bei den perimenopausalen Probanden bei 0,22 % und bei den postmenopausalen Probanden bei 0,115 %. In der Gruppe der Patienten mit einer malignen Brustdrüsenerkrankung (0,41 % Median der gesamten Gruppe) lag der Median bei den prämenopausalen Probanden bei 0,485 %, bei den perimenopausalen Probanden bei 0,41 % und bei den postmenopausalen Probanden bei 0,395 %.

Von weiterem Interesse war die Veränderung der Anzahl der endothelialen Vorläuferzellen im Verlauf der Tumorerkrankung. Dabei wurde den jeweiligen Patientinnen eine präoperative und in unregelmäßigen Abständen mehrere postoperative periphere Blutproben entnommen. Es zeigte sich dabei, dass es schon wenige Stunden nach der Operation zu einem deutlichen Abfall der EPC's kam. Im Laufe der nächsten postoperativen Tage fiel der Anteil dieser Zellen sogar soweit ab, dass die gemessenen Werte innerhalb des Schwankungsbereiches der Kontrollgruppe lagen.

Neben den $CD34^+VEGFR2^+$ Zellen gibt es eine weitere Zellpopulation, die der $CD34^+CD133^+$ Zellen, welche bei der Frühentdeckung maligner Prozesse hilfreiche Informationen liefern könnte.

CD133 ist ein relativ neu entdecktes Antigen, das auf hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert wird. Neuere Studien konnten aber zeigen, dass dieses Antigen auch auf endothelialen Vorläuferzellen zu finden ist. Peichev et al (2000) und Gehling et al (2000) haben mit ihren Arbeiten demonstrieren können, dass $CD34^+$ endotheliale Vorläuferzellen, welche ebenfalls CD133 koexprimieren, die Fähigkeit besitzen zu Endothelzellen zu differenzieren. Heute ist bekannt, dass CD133 von endothelialen Vorläuferzellen innerhalb des Knochenmarkes und sogenannten früh zirkulierenden EPC's (early circulating EPC's) exprimiert wird (siehe Abb. 10, Hristov 2003). Wann genau und durch welchen Grund die Expression von

CD133 nachlässt ist derzeit noch ungeklärt. Der beginnende Verlust von CD133 geht jedoch mit einer zunehmenden Expression des vW-Faktors, VE-Cadherin und CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM) einher. Dieser Wechsel des Expressionsmusters reflektiert den Reifungsprozess zirkulierender endothelialer Vorläuferzellen (siehe Abb. 10, Hristov 2003). Demzufolge stellen die CD34⁺CD133⁺ Zellen im peripheren Blut einer Population, welche auch als die Vorstufe der hämatopoietischen sowie endothelialen Zelllinie bezeichnet werden kann, dar. Da beide Zelllinien für die Entstehung einer funktionierenden Tumervaskularisation notwendig sind (Rafii 2002), könnte ein Anstieg der CD34⁺CD133⁺ Zellen im peripheren Blut auf einen malignen Prozess hindeuten.

Um diese These zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Quantifizierung dieser Zellpopulation durchgeführt. Dafür wurden von insgesamt 16 Patientinnen periphere Blutproben entnommen und der darin befindliche Anteil der CD34⁺CD133⁺ Zellen bestimmt. 11 dieser Frauen waren an einem Karzinom der Brustdrüse erkrankt und weitere 5 Frauen dienten als Kontrolle. In beiden Gruppen machte der Anteil dieser Zellen allerdings nur 0,2 % im Median aus. Obwohl die Fallzahl in beiden Gruppen gering ist, zeigt die Tendenz aber deutlich, dass die Quantifizierung dieser Zellpopulation für einen Einsatz zur Früherkennung maligner Prozesse der Brustdrüse zu wenig Aussagekraft besitzt. Es ist anzunehmen, dass der Grund dafür im wechselnden Expressionsmuster der Oberflächenproteine nach dem Verlassen des Knochenmarkes, insbesondere von CD133, zu suchen ist. Um CD133 zukünftig bei dem Aufspüren von malignen Prozessen einsetzen zu können, scheint es unerlässlich den Zeitpunkt und die Ursache für den Wechsel in der Expression herauszufinden.

Um zu zeigen, dass die in dieser Arbeit anhand ihrer Oberflächenproteine identifizierten Zellen die Fähigkeit besitzen sich in Endothelzellen zu differenzieren, wurden sie *in vitro* unter selektiven Bedingungen kultiviert. Aufgrund der Expression des Oberflächenrezeptors CD34 lassen sich diese Zellen aus der mononukleären Zellpopulation mittels magnetisch konjugierter Antikörper isolieren (Hristov 2003, Salven 2003, Schumm 1999). Nach anschließender Kultivierung, in einem Medium mit spezifischen Wachstumsfaktoren, kommt es innerhalb der nächsten 3-4 Wochen zum Verlust der Vorläufercharakteristika und zur Expression endothelspezifischer Antigene wie VE-Cadherin, vW-Faktor oder CD31 (PECAM). Anhand dieser Marker und der metabolischen Aufnahme eines farbstoff-konjugiertem acetylierten Low Density Lipoproteins (Dil-Ac-LDL) lassen sich dann Endothelzellkolonien identifizieren (Gill 2001, Lin 2000).

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass der Prozess der Angiogenese allein verantwortlich ist für die Neubildung von Blutgefäßen nach der Embryonalentwicklung. Erst der Nachweis

endothelialer Vorläuferzellen im peripheren Blut adulter Organismen konnte beweisen, dass der Prozess der Neoangiogenese komplexer ist als bisher angenommen und Angiogenese sowie Vaskulogenese daran beteiligt sind. Die Regulation beider Prozesse erfolgt über ein komplexes System, bestehend aus wachstumsfördernden und wachstumshemmenden Faktoren. VEGF und bFGF sind wachstumsfördernde Faktoren, wobei VEGF der wichtigste parakrine Mediator der Angiogenese ist. Die Konzentration bzw. Konzentrationsänderung solcher Wachstumsfaktoren im Serum kann wichtige Hinweise auf die Entstehung bzw. den Verlauf maligner Prozesse geben. In den letzten Jahren wurde bei Untersuchungen von Krebspatienten ein Anstieg von Endothelzellen im peripheren Blut festgestellt. Dabei zeigte sich eine Korrelation von Tumolvolumen und VEGF-Produktion zur Anzahl zirkulierender Endothelzellen (Mancuso 2001, Monestiroli 2001).

Mehrere Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit der Bestimmung der Konzentration von VEGF im Serum von Patienten mit malignen Erkrankungen und verglichen diese mit denen gesunder Probanden. Die dabei erhaltenen Daten sind bis heute kontrovers.

Heits et al hat in seinen Arbeiten (1997,1998) gezeigt, dass bei Tumorpatienten die VEGF-Konzentration im Serum signifikant erhöht ist. Dabei waren keine Unterschiede zwischen Sarkom- oder Karzinompatienten erkennbar. Es zeigte sich vielmehr, dass die Tumormasse der bestimmende Faktor für die Höhe des VEGF-Serumspiegels war. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in den Arbeiten von Dirix et al (1997), Kondo et al (1994) und Yamamoto et al (1996) veröffentlicht.

Kraft et al (1999) ermittelte den VEGF-Serumspiegel von 145 Frauen mit lokalisierten oder metastasierten Mammakarzinom. Bei keiner der Patientinnen mit einem lokalisierten und nur bei 11 % der Patientinnen mit einem metastasierten Mammakarzinom wurde ein erhöhter VEGF-Spiegel im Serum nachgewiesen. Als Obergrenze für den als normal erachteten VEGF-Serumspiegel diente die 95 Perzentile der gesunden Kontrollgruppe. Bei dieser variierte das lösliche VEGF im Serum zwischen 30 pg/ml und 1752 pg/ml (Median 294 pg/ml, 95 Perzentile 883 pg/ml). Bei der Gruppe der Mammakarzinom-Patientinnen lag der Median bei 362 pg/ml und die Schwankung des Serumspiegels zwischen 10 - 2426 pg/ml. Ein signifikanter Unterschied des VEGF-Serumspiegels konnte aber zwischen Patientinnen mit metastasierten und Patienten mit lokalisierten Mammakarzinom festgestellt werden.

Salven et al (1999) hat den VEGF-Serumspiegel von Patientinnen mit benignen sowie malignen Prozessen der Brustdrüse miteinander verglichen. Die Ergebnisse von Kraft et al (1999) konnten dabei bestätigt werden. Außerdem zeigte sich, dass der Serumspiegel bei Patientinnen mit lokalisiertem duktalem Karzinom (Median 107 pg/ml) signifikant höher war als bei Patientinnen

mit lokalisiertem lobulären Karzinom (Median 44 pg/ml). Ein signifikanter Unterschied zwischen den VEGF-Spiegeln im Serum von Patientinnen mit metastasiertem duktalem (Median 184 pg/ml) oder lobulären (Median 188 pg/ml) Karzinom konnte hingegen nicht erkannt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls der VEGF-Serumspiegel von Patientinnen mit benignen und malignen Erkrankungen der Brustdrüse sowie von gesunden Probanden der Kontrollgruppe miteinander verglichen. Die Ergebnisse von Kraft et al (1999) und Salven et al (1999) konnten dabei nicht bestätigt werden. Vielmehr waren die gemessenen VEGF-Serumspiegel konform mit den von Heits et al (1997,1998) veröffentlichten Daten. Wie in seinen Studien zeigten sich signifikante Unterschiede ($p=0,03$) zwischen Tumorpatienten und der Kontrollgruppe beim Vergleich des durchschnittlichen VEGF-Serumspiegels. Eine Abhängigkeit von der Tumorgröße, wie in seinen Arbeiten beschrieben wurde, konnte aber nicht bestätigt werden. Auch ein Zusammenhang mit der Menge der endothelialen Vorläuferzellen im peripheren Blut war nicht erkennbar ($p=0,21$).

Insgesamt lag der durchschnittliche VEGF-Serumspiegel in der Gruppe der Tumorpatientinnen bei 155,6 pg/ml (Median 94,4 pg/ml) bei einer Schwankung zwischen 1,2 - 764 pg/ml. 70,5 pg/ml (Median 76,8 pg/ml) betrug er in der Gruppe der Patientinnen mit einer benignen Brustdrüsenerkrankung bei einer Schwankung zwischen 8,8 - 120 pg/ml und bei 97,7 pg/ml (Median 30,2 pg/ml) lag er in der Kontrollgruppe bei einer Schwankung zwischen 5 – 593 pg/ml. Trotz des signifikanten Unterschiedes in der Höhe des VEGF-Serumspiegels in den miteinander verglichenen Gruppen existieren beachtliche Überlappungen der gemessenen Werte. Dadurch könnte der Eindruck entstehen, dass eine Messung des VEGF-Serumspiegels zur Entdeckung einer aktiven Angiogenese bei Tumorpatienten ungeeignet ist. Tatsächlich liegen aber lediglich 12 % der bei den Tumorpatienten gemessenen Werte unter dem Durchschnittswert der Kontrollgruppe. Obgleich die gemessenen Serumspiegel nicht mit der Größe des Tumors oder der Menge der endothelialen Vorläuferzellen korreliert, stehen die Ergebnisse dennoch nicht im Widerspruch mit der Hypothese, dass der VEGF-Serumspiegel das Ausmaß einer aktiven Angiogenese bei Tumorpatienten widerspiegeln kann. Granato et al (2003) hat in ihrer Arbeit zeigen können, dass die Tumorzellexpression nicht mit dem zugehörigen Serumspiegel korrelieren muss. Diese Tatsache, würde das Überlappen der gemessenen VEGF-Serumspiegel in den Vergleichsgruppen erklären. Zum Aufspüren einer aktiven Angiogenese wäre dadurch eine alleinige Bestimmung des löslichen VEGF's im peripheren Blut sicherlich nicht sinnvoll. Die Kombination mit Faktoren, welche ebenfalls mit der Neubildung von Blutgefäßen in Verbindung stehen, wäre eine mögliche Alternative die Wahrscheinlichkeit einer Entdeckung des Tumors zu

erhöhen. Die Verwendung der Anzahl endothelialer Vorläuferzellen als Kombinationspartner führte allerdings zu keiner verbesserten Tumor-Erkennungsrate.

Der bFGF-Serumspiegel (basic Fibroblast Growth Factor) ist im Vergleich zum VEGF-Serumspiegel weniger gut untersucht. In vitro Experimente zeigten aber, dass bFGF in den Zelllinien von verschiedenen humanen malignen Erkrankungen, wie dem Mammakarzinom, überexprimiert wird (Sliutz 1995, McLeskey 1994, Fernig 1991). Zusammenhänge zwischen der Konzentration des löslichen bFGF's im Serum und verschiedenen klinischen Parametern dieser Erkrankung wären dadurch denkbar. Bei Bestätigung dieser Annahme könnte die Konzentrationsmessung des freien bFGF bei der Früherkennung des Mammakarzinoms hilfreich sein.

In der Arbeit von Granato et al (2003) wurde unter anderem die Beziehung der VEGF- und bFGF-Serumspiegel bei Patientinnen mit Mammakarzinom sowie einer Kontrollgruppe, bestehend aus gesunden Probandinnen, untersucht. Die Spanne des im Serum bestimmbar bFGF lag dabei zwischen 0,3 und 26,6 pg/ml (Median 2,3 pg/ml) in der Gruppe der Patientinnen und zwischen 0 und 5,7 pg/ml (Median 0,4 pg/ml) in der Kontrollgruppe. Ein Serumspiegel von über 6 pg/ml wurde dabei nur bei Karzinompatientinnen bestimmt. Ein komplettes Fehlen von bFGF im Serum hingegen war nur bei gesunden Frauen zu beobachten. Damit konnten sie damit einen Zusammenhang zwischen einer Erhöhung des bFGF-Serumspiegels mit dem Auftreten maligner Erkrankungen der Brustdrüse feststellen. Somit wäre ein Einsatz im Rahmen von Screeningprogrammen zur Früherkennung sporadischer Tumore sowie im Monitoring von Hochrisikopatienten denkbar.

Auch die Arbeit von Dirix et al (1997) beschäftigte sich mit dem Vergleich der Serumspiegel von VEGF und bFGF in den Sera von Tumorpatienten. Im Unterschied zur Arbeit von Granato (2003) bestand das Patientenkollektiv aber nur aus Personen mit einem metastasierendem Karzinom. Bezogen auf das Mammakarzinom zeigten seine Ergebnisse, dass bei 67 % aller unbehandelten Patienten der Serumspiegel von mindestens einem dieser beiden Parameter erhöht war. Dieser Anteil stieg sogar über 90 % wenn man nur die Patienten einschloss, deren Erkrankung mit einer schnellen Wachstumsfraktion verbunden war. Einzeln betrachtet war bei 38 % aller Patienten ein erhöhter VEGF-Serumspiegel und bei 58 % ein erhöhter bFGF-Serumspiegel nachweisbar. Bei $\frac{2}{3}$ aller Patienten, bei denen trotz einer Chemo- oder Hormontherapie die Erkrankung fortschritt, stiegen die Serumspiegel im weiteren Verlauf an. Hingegen kam es bei weniger als $\frac{1}{10}$ der Patienten, die auf die Therapie ansprachen, zu einem Anstieg. Insgesamt wurde zwischen den beiden angiogenen Zytokinen, VEGF und bFGF, eine schwache signifikante Korrelation ($p < 0,05$) festgestellt. Als Ursache für den Anstieg der

Konzentration dieser beiden Faktoren im Serum wurde die fortschreitende Kinetik der metastasierten Karzinome angenommen.

Takei und seine Mitarbeiter haben 1994 den basic Fibroblast Growth Factor in den Sera von unbehandelten Patienten mit einem Mammakarzinom bestimmt und mit der Größe des Tumors verglichen. Ziel dieser Untersuchung war die Klärung der Korrelation des bFGF-Serumspiegels mit der Malignität des Tumors. Die TNM-Klassifikation für das Mammakarzinom war dabei die Grundlage für die Einteilung des Patientenkollektivs. Ausschlusskriterien waren die T-Stadien Tis, 0 und 4 sowie der makroskopische oder histopathologische Nachweis von Fernmetastasen. Ohne Berücksichtigung des T-Stadiums, zeigte sich in 76 % eine erhöhte bFGF-Serumkonzentration. Für das T-1-Stadium zeigte sich in 71 % der Fälle eine Konzentrationserhöhung, in 77 % für das T-2-Stadium und in 100 % für das T-3-Stadium. Des Weiteren wurde bei 23 Patienten 1 Woche postoperativ, also nach der Entfernung des Tumors sowie der axillären Lymphknoten der bFGF-Serumspiegel bestimmt. Bei nur 6 Patienten (26 % der Fälle) war nach dieser Zeit noch eine erhöhte Konzentration messbar. Damit kam auch diese Arbeit zu dem Ergebnis, dass die bFGF-Konzentrationsmessung als Tumormarker einsetzbar wäre. Die Höhe der gemessenen Werte reflektierte dabei jedoch nicht die Malignität, beziehungsweise die Größe des jeweiligen Tumors.

In der Arbeit von Sliutz et al (1995) wurde ebenfalls die bFGF-Konzentration im Serum bestimmt und mit weiteren prognostischen Parametern des Mammakarzinoms verglichen. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durchschnittliche Menge des löslichen bFGF im Serum bei Anwesenheit eines Tumors signifikant erhöht ist. Die Höhe der präoperativ gemessenen Konzentration besitzt aber keinerlei prognostische Aussagekraft, da keine Korrelation mit der Tumorgröße, dem histologischen Typ oder dem Lymphknotenstatus nachgewiesen werden konnte. Werte von über 5 pg/ml entsprachen einer erhöhten Serumkonzentration. Für diese Grenze wurde aus den erhobenen Daten eine Sensitivität von 61,7 % und eine Spezifität von 87,8 % für bFGF als Marker für einen Tumor der Brustdrüse errechnet. Die heute gebräuchlichsten Tumormarker, die zur klinischen Diagnosefindung und postoperativen Nachsorge des Mammakarzinoms eingesetzt werden, sind CEA und CA153. Aber vor allem auf Grund ihrer geringen Sensitivität von lediglich 15-20 % eignen sie sich nicht für den Einsatz als Screening-Parameter sondern sind nur zur Verlaufskontrolle und Rezidivfrüherkennung dieser Erkrankung verwendbar. Die Korrelation zwischen erhöhten bFGF-Serumspiegel und der Präsenz eines Tumors der Brustdrüse, sowie das gute Verhältnis von Sensitivität und Spezifität dieses Markers könnten seinen Einsatz in der Früherkennung des Mammakarzinoms, der Rezidivfrüherkennung sowie im Therapiemonitoring in Zukunft

ermöglichen. Voraussetzung für diese Verwendungsmöglichkeit wären aber weitere Studien. Durch höhere Fallzahlen muss der prognostische Wert und die Fähigkeit zum Monitoring der Erkrankung weiter abklärt werden.

Beobachtung und Vergleich der Verläufe der Serumkonzentrationen von bFGF und des Tumormarkers CA153 waren das Thema in der Arbeit von Pichon et al (2000). Ziel dieser Studie war die Bewertung der Aussagekraft des basic Fibroblast Growth Factors als biologischer Marker beim Monitoring des Mammakarzinoms. bFGF wurde dafür in 166 Serumproben von Patienten bestimmt. Bei den Proben waren alle Tumorstadien vertreten. CA153 diente hier als Referenz. In dieser Arbeit wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p=0.03$, Kolmogorov-Smirnov-Test) in der Serumkonzentration von bFGF zwischen einer Kontrollgruppe (Median 5 pg/ml), bestehend aus 50 gesunden Frauen, und dem Patientenkollektiv (Median 8 pg/ml) festgestellt. Serumlevel ab 10 pg/ml wurden als erhöht betrachtet. Diese Grenze entspricht einer errechneten Sensitivität von 42,2 % sowie einer Spezifität von 80 %. Erhöhte bFGF-Werte im Serum von Karzinompatienten vor Beginn der Therapie wurden in 39,4 % der Fälle gemessen. CA153 war in 9,1 % der Fälle erhöht, wobei Werte über 30 U/ml als pathologisch betrachtet wurden. Es konnte keine Korrelation zwischen diesen beiden Vergleichsgruppen festgestellt werden. Ebenso wie in den Arbeiten von Sliutz et al (1995) und Takei et al (1994) war auch keine Korrelation von bFGF mit klinischen oder histologischen Charakteristika der Tumore nachweisbar. Die Höhe der gemessenen CA153-Werte dagegen korrelierte mit der Tumgröße und der Anwesenheit von Lymphknotenmetastasen. Um zu beurteilen wie sich die beiden Parameter im Therapieverlauf verhalten, wurde 166 Karzinompatienten während ihrer Behandlung insgesamt 190 Serumproben entnommen und ausgewertet. Davon wurden 92 dieser Proben in einem erkrankungsfreien Intervall entnommen von denen alle CA153 negativ und nur 6 (6,5 %) bFGF positiv waren. Weitere 15 wurden im Stadium der Regression (33,3 % CA153 positiv, 86,7 % bFGF positiv), 16 in einer stabilen Phase der Erkrankung (56,2 % CA153 positiv, 50 % bFGF positiv) und 67 im Stadium der Progression (52,2 % CA153 positiv, 68,7 % bFGF positiv) entnommen. Es zeigte sich also, dass bei Wiederauftreten der Erkrankung bFGF im Serum häufiger erhöht ist als CA153. Die Gruppe der erkrankungsfreien Patienten und die Gruppe der Patienten mit einem Rückfall ihrer Erkrankung wurden in weitere Subgruppen unterteilt. Diese Gruppierung bezog sich auf die Art ihrer Behandlung und unterteilte sich wie folgt: keine Behandlung, adjuvante Hormontherapie, adjuvante Chemotherapie, Rückfall vor der Behandlung, Rezidivbehandlung durch Hormone und Rezidivbehandlung durch eine Chemotherapie. Signifikante Unterschiede der Serumspiegel von CA153 und bFGF fanden sich zwischen den beiden Hauptgruppen. Zwischen den Subgruppen sowie innerhalb der Gruppe mit

den erkrankungsfreien Patienten wurden aber kaum Unterschiede für beide Parameter festgestellt. Des weitern waren keine Unterschiede für CA153 bei der Auswertung der Subgruppen der Rezidivpatienten ersichtlich. Die durchschnittlichen bFGF-Serumwerte hingegen unterschieden sich signifikant zwischen den Subgruppen der Patienten vor und nach der Behandlung. In der Art der Behandlung, ob Hormon- oder Chemotherapie, zeigten sich aber keine Differenzen. Zusammenfassend zeigten die Daten, dass bFGF und CA153 einige gemeinsame Merkmale besitzen, wie eine niedrige Positivrate im erkrankungsfreien Stadium sowie einen Anstieg ihrer Serumkonzentration bei Auftreten von Rezidiven. Deutliche Unterschiede hingegen weisen sie in Bezug auf diverse klinische Situationen auf. Es existiert keine Korrelation der bFGF-Serumkonzentration mit den klassischen Kriterien, die heute zur Beschreibung des Tumors genutzt werden. Dadurch eignen sich laut dem Autor die bFGF-Serumlevel nicht zur Beobachtung des Therapieverlaufs. Ebenso wenig brachte das Variationsmuster der bFGF-Serumlevel im Vergleich zum CA153 ergänzende Informationen.

In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls die bFGF-Serumspiegel von Patientinnen mit benignen und malignen Erkrankungen der Brustdrüse sowie von gesunden Probanden der Kontrollgruppe miteinander verglichen. Auch hier konnten signifikante Unterschiede ($p=0,059$) zwischen den durchschnittlichen Werten der Kontrollgruppe (Median 3,1 pg/ml, Schwankungsbereich 1,9 - 7 pg/ml) und der Patientengruppe mit einem Karzinom (Median 9,1 pg/ml, Schwankungsbereich 0,2 - 31 pg/ml) festgestellt werden. Der Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen war hingegen gering ($p=0,85$). Allerdings war die Fallzahl in der Gruppe der Patienten mit einer benignen Brustdrüsenerkrankung sehr niedrig ($n=4$, Median 6,9 pg/ml, Schwankungsbereich 4,6 - 15,7 pg/ml). Insgesamt lag der Schwankungsbereich des Serumspiegels aller Proben zwischen 0,2 - 31 pg/ml und besaß damit die gleiche Größenordnung wie der in den Arbeiten von Sliutz et al (1995, Schwankungsbereich 0 - 56,4 pg/ml), Dirix et al (1997, Schwankungsbereich 0 - 33 pg/ml) und Pichon et al (2000, Schwankungsbereich 1 - 33 pg/ml). Trotz der signifikanten Unterschiede des mittleren Serumspiegels zwischen Tumorpatienten und Kontrollgruppe wurde keine Korrelation zwischen der Höhe des freien bFGF's im Serum und prognostischen Parametern des Tumors gefunden. Ein Ergebnis, welches die Resultate der genannten Autoren bestätigt. Des weiterern war auch kein Zusammenhang mit der Menge der endothelialen Vorläuferzellen im peripheren Blut war nicht erkennbar ($p=0,23$).

Da derzeit kein allgemein anerkannter Schwellenwert existiert, stellte sich die Frage, ab welchem Grenzwert der bFGF-Serumspiegel als erhöht zu betrachten ist. Obwohl die Arbeitsgruppen von Sliutz et al (1995), Dirix et al (1997) und Pichon et al (2000), mit Ausnahme von Takei et al (1994), den ELISA-Kit des gleichen Herstellers (Quantikine HS human FGF basic, R&D

Systems Europe, Abingdon, England) verwendeten, wurden jeweils unterschiedliche Grenzwerte benutzt (Bereich zwischen 5 und 10 pg/ml). Dadurch erklären sich auch die Differenzen für Sensitivität und Spezifität in den Arbeiten von Sliutz et al (1995) und Pichon et al (2000), da dieser Grenzwert Einfluss auf die Berechnung dieser Vorhersagewerte besitzt.

Benutzt man für die Auswertung, der in dieser Arbeit erhobenen Werte, den niedrigsten Grenzwert von 5 pg/ml, war eine Erhöhung des bFGF-Serumspiegels bei 68 % der Patienten mit einem Karzinom und bei 25 % der Probanden in der Kontrollgruppe feststellbar. Bei der Wahl der am höchsten beschriebene Grenze von 10 pg/ml war zwar keine Erhöhung in der Kontrollgruppe mehr zu finden aber im Patientenkollektiv betrug sie noch 36 %. Der höchste gemessene Serumwert von bFGF in der Kontrollgruppe betrug in dieser Arbeit 7 pg/ml. Betrachtet man diesen Wert als Obergrenze, wäre bei 64 % der Tumorpatienten der Serumspiegel als erhöht zu bezeichnen. Diese gute Positivrate zusammen mit dem guten Verhältnis von Spezifität und Sensitivität macht einen Einsatz dieses Faktors im Rahmen der Früherkennung sporadischer Tumore denkbar. Vergleichbare Schlussfolgerungen waren auch von anderen Arbeitsgruppen (Takei 1994, Sliutz 1995, Granato 2003) mit ähnlichen Resultaten getroffen worden. Aufgrund des fehlenden Zusammenhanges zwischen der Höhe des gemessenen löslichen bFGF im Serum und den klinischen Tumorkriterien ist er aber für eine Verwendung zum Monitoring vom Patienten mit einer malignen Brustdrüsenerkrankung ungeeignet. Auch eine ergänzende Bestimmung des bFGF-Serumspiegels zu den heute eingesetzten Tumormarkern ist wenig sinnvoll, da keine zusätzlichen Erkenntnisse zu gewinnen sind (Pichon 2000).

Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Aufspürungsrate tumor-assoziiertes angiogenetischer Prozesse wäre die Verwendung von mehreren Parametern. Der bFGF-Serumspiegel und die Bestimmung des Anteils der endothelialen Vorläuferzellen im peripheren Blut stellen mögliche Kombinationspartner da. Beide Parameter wurden in einer Gruppe bestehend aus 25 Patienten mit einem Mammakarzinom und einer Kontrollgruppe bestehend aus 8 gesunden Probanden bestimmt. Ein Anteil von über 0,333 % der endothelialen Vorläuferzellen an der mononukleären Zellpopulation wurde als erhöht betrachtet. Diese Grenze entsprach der 90 % Perzentile einer erkrankungsfreien Kontrollgruppe (n=28). Werte von über 7 pg/ml des bFGF-Serumspiegels, was wiederum dem maximal gemessenen Serumlevel der Kontrollgruppe entspricht, wurden als erhöht angesehen. bFGF war in 64 % (n=16) und die endothelialen Vorläuferzellen in 84 % (n=21) der Fälle erhöht. In 56 % (n=14) der Fälle wurden beide Parameter als erhöht gemessen. Somit war in 96 % (n=24) der Fälle innerhalb des Patientenkollektivs mindestens ein Parameter erhöht. Im Vergleich dazu konnte bei keinem der Probanden der Kontrollgruppe erhöhte

Messwerte festgestellt werden. Daraus wird ersichtlich, dass die Nutzung einer Kombination von mehreren Faktoren die Tumor-Entdeckungsrate erhöht.

5.2 Zukünftige Anwendungsmöglichkeiten und Projekte

Die Hypothese, dass endotheliale Vorläuferzellen die Fähigkeit besitzen das Wachstum der meisten Tumore zu beeinflussen, wurde in den letzten Jahren immer mehr zum Forschungsschwerpunkt vieler Arbeitsgruppen. Ihre Resultate, wie auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, stützen diese Annahme und konnten zeigen, dass diese Zellen ein wichtiger Faktor bei der Entstehung neuer Blutgefäße in Tumoren sind. So wurden in dieser Arbeit signifikante Unterschiede in der Anzahl der EPC's bei Mammakarzinom-Patienten im Vergleich zum Patientenkollektiv mit benignen Erkrankungen oder der Kontrollgruppe festgestellt.

Es gibt aber noch andere Einflüsse unter denen es zu einer Änderung der Anzahl zirkulierender endothelialer Vorläuferzellen *in vivo* kommen kann. Unter pathologischen Bedingungen wie beispielsweise ischämischen Prozessen, der koronaren Gefäßkrankheit oder vaskulärer Traumatas erhöht sich die Anzahl von EPC's im peripheren Blut. Aber auch die Verwendung von Medikamenten, wie HMG-CoA Reduktase-Hemmer, führen zu einem vermehrten Auftreten endothelialer Vorläuferzellen in der Blutzirkulation (Dimmeler 2001). Kardiovaskuläre Risikofaktoren hingegen führen zu einer erniedrigten Konzentration dieser Zellen in der Peripherie (Vasa 2001, Hill 2003).

Zurückliegende Studien haben gezeigt, dass einige Tumore in der Lage sind endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zu rekrutieren. Es ist aber nicht möglich, aus einer erhöhten Population dieser Zellen auf die Lokalisation des Tumors zu schließen. Dieser Punkt sowie die oben angeführten Faktoren machen die alleinige Bestimmung der Anzahl zirkulierender endothelialer Vorläuferzellen für die Verwendung in einem Screening-Programm zur Früherkennung von Brustkrebs derzeit schwierig. Bei einem begründetem Verdacht könnte man aber diese Methode zur Unterstützung der Abgabe einer Prognose oder bei der Wahl der zu Verfügung stehenden Therapieoptionen einsetzen.

Eine Möglichkeit die Sensitivität und Spezifität dabei zu erhöhen, wäre die Bestimmung in Kombination mit einem zweiten Tumomarker, wie z.B. CA153. Aber auch die Nutzung des bFGF-Serumspiegels als zweiten Parameter wäre eine mögliche Variante. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse unterstützen eine solche Option. Aber auch andere

Ursachen führen zu erhöhten Serumkonzentrationen von bFGF im Serum, wie z.B. ein akuter Herzinfarkt (Cuevas 1997) oder einer chronischer Leberschaden (Jin-No 1997).

Als Voraussetzung für einen zukünftigen Einsatz der endothelialen Vorläuferzellen als Tumormarker ist es aber unerlässlich das Verhalten dieser Zellen auch bei malignen Erkrankungen eines anderen Ursprunges sowie weiteren pathologischen Zuständen zu untersuchen.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit wäre im Rahmen der Rezidivfrüherkennung, wo ein Aufspüren endothelialer Vorläuferzellen auf einen erneuten malignen Prozess hinweisen könnte. Durch den schnellen Abfall des Anteils der endothelialen Vorläuferzellen im peripheren Blut nach einer Operation eignet sich diese Methode auch zum Einsatz in der Therapieüberwachung. Um diese zukünftigen Einsatzmöglichkeiten anwenden zu können, muss noch vieles beantwortet werden. Einige dieser noch offenen Fragen sind zum Beispiel:

- Wann beginnt die Mobilisation der endothelialen Vorläuferzellen im Rahmen der Tumorentstehung, mit dem „angiogenic switch“ oder erst mit einer beginnenden Metastasierung?
- Wovon hängt die Anzahl der mobilisierten Zellen ab?
- In welcher exakten zeitlichen und räumlichen Beziehung stehen die Mobilisation und die Rekrutierung der endothelialer Vorläuferzellen mit dem Tumorwachstum?
- Wie hoch ist der Anteil dieser aus dem Knochenmark rekrutierter endothelialer Vorläuferzellen in der entstandenen Tumolvaskularisation?

Zur Beantwortung dieser Fragen muss ein großes Patientenkollektiv regelmäßig und in geringen Zeitabständen in einer Langzeitverlaufsstudie untersucht werden.

In Zukunft könnte das Wissen über das Verhalten der CEP's bei Tumorerkrankungen auch bei der Entwicklung neuer Therapieoptionen helfen. Dabei wäre ein Einsatz zur Erfolgskontrolle von neuen anti-angiogenetischen Therapieansätzen denkbar. Diese haben einige theoretische Vorteile gegenüber der konventionellen Chemotherapie (Eichhorn 2004):

1. Sie sind unabhängig von den histologischen Merkmalen des Tumors.
2. Die Tumolvaskularität stellt keine endotheliale Grenze für therapeutische Substanzen wie bei der Chemotherapie dar, sondern wird bei einer systemischen anti-vaskulären Therapie mit einbezogen.

3. Jedes Tumorgefäß versorgt Hunderte von Tumorzellen, wodurch eine anti-vaskuläre Therapie sehr effektiv erscheint.
4. Es besteht eine hohe Selektivität, dadurch weniger schwere Nebenwirkungen, da physiologische Angiogenese bei adulten Organismen nur unter bestimmten Bedingungen vorkommt.
5. Endothelzellen sind genetisch stabil, wodurch sie für eine Medikamentenresistenz weniger anfällig sind.

Derzeit werden mehrere klinische Versuche durchgeführt, welche auf folgenden Strategien basieren (www.cancertrials.nci.nih.gov):

- die Behinderung oder vollständige Störung der Signalübertragung zwischen angiogenetischen Liganden und ihren Rezeptoren
- Stimulation einer vermehrten Ausschüttung endogener Inhibitoren oder einer direkten Verabreichung dieser
- die selektive Zerstörung der Tumolvaskularisation

Bis jetzt durchgeführte Phase-I-Studien zeigten, dass es anti-vaskulären Monotherapien an Effizienz fehlt. Weitere präklinische Studien der letzten Dekade konnten aber auch zeigen, dass eine Behandlungskombination aus anti-vaskulärer Tumorthherapie und Chemotherapie bei einigen Tumoren ermutigende Ergebnisse erreichen kann. So wurde beispielsweise beim Kolonkarzinom eine Verbesserung der Überlebenszeit erreicht (Eichhorn 2004).

Die in den Studien eingesetzten anti-angiogenetischen Substanzen, wie beispielsweise Inhibitoren des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF), beeinflussen auch den Anteil der aus dem Knochenmark freigesetzten endothelialen Vorläuferzellen. Diese Zellen könnte man wiederum zur Beurteilung der Dosis und Effektivität solcher Medikamente heranziehen.

Diese Anwendungsmöglichkeit hat sich Bertolini et al (2003) in seinen Studien zunutze gemacht. Dabei zeigte sich, dass eine Hochdosistherapie mit Cyclophosphamid (CTX) und eine metronomische Therapie mit kleineren Dosen dieses Medikaments unterschiedliche Effekte auf die Mobilisation und Überlebensfähigkeit endothelialer Vorläuferzellen haben. Die Hochdosistherapie erfolgte mit der maximal tolerablen Dosis in einem 21-tägigem Intervall. Untersuchungsobjekt waren immundefiziente Mäuse mit humanen Lymphom-Zellen. Die Tiere die eine Hochdosistherapie erhielten, zeigten nach jedem Zyklus einen starken Anstieg der CEP's. Außerdem zeigte der Tumor selbst schnell Resistenzen gegenüber dem Medikament. Die

metronomische Therapie war hingegen verbunden mit einem konstantem Absinken der Überlebensfähigkeit und der Anzahl endothelialer Vorläuferzellen im Blut der Tiere. Damit erreichte man durch die Reduktion des vaskulogenese-abhängigen Mechanismus eine dauerhaftere Inhibition des Tumorwachstums.

Diese Studie zeigte, dass die Bestimmung der CEP's im peripheren Blut ein fähiger Marker zum Monitoring von anti-angiogenetischen Effekten im Rahmen von Studien oder Therapien sein kann. Weiterhin sollten auf Grund dieser Ergebnisse die Schemata der Chemotherapie von Tumorerkrankungen hinsichtlich dieser Effekte neu überdacht werden.

Trotz aller noch offenen Fragen besitzt die Bestimmung endothelialer Vorläuferzellen im peripheren Blut viel Potential und dadurch vielfältige Einsatzmöglichkeiten in Klinik und Forschung.