

### 6 Zusammenfassung

Weltweit gehört das Mammakarzinom zu den häufigsten Krebserkrankungen der Frau. 25% aller bösartigen Neubildungen, in Deutschland rund 47.500, entfallen dabei auf den Brustdrüsenkrebs. Verständlicherweise ist die Früherkennung dieser Erkrankung daher ein Schwerpunkt in der klinischen Forschung. Besonders der Zusammenhang zwischen Tumorwachstum, Metastasierung und Neoangiogenese ist in jüngerer Zeit in den Fokus der Krebsforschung gerückt. Diese Prozesse sind eng verbunden mit der Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel dem vascular endothelial growth factor (VEGF) oder dem basic fibroblast growth factor (bFGF). Durch diese bedingt kommt es zur Freisetzung endothelialer Vorläuferzellen (CEP, EPC) aus dem Knochenmark, welche beim Tumorwachstum im Rahmen der Vaskulogenese eine bedeutende Rolle spielen.

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Bestimmung der Anzahl zirkulierender endothelialer Vorläuferzellen im peripheren Blut von Mammakarzinom-Patientinnen sowie der möglichen Verwendbarkeit dieser Methode im Rahmen der Karzinomfrüherkennung, Verlaufskontrolle oder Rezidivfrüherkennung. Des Weiteren wurde der Serumspiegel der Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF bestimmt, um so mögliche Zusammenhänge zwischen ihrer Konzentration, der Anzahl der EPC's sowie dem Krankheitsbild erkennen zu können.

Es wurde dafür ein Kollektiv von 87 Frauen untersucht, die entweder aufgrund einer malignen oder benignen Erkrankung der Brustdrüse in der Charité, Campus Benjamin Franklin behandelt wurden oder zur Kontrollgruppe gehörten, deren Probanden keine angiogenetisch relevanten Erkrankungen aufwiesen. Für einen genaueren Vergleich wurde innerhalb der Hauptgruppen eine Einteilung in Subgruppen vorgenommen. Unterteilt wurde dabei nach Menopausenstatus sowie innerhalb der Gruppe der malignen Brustdrüsenerkrankungen nach der Histologie, der Tumorgröße, dem Lymphknoten- und dem Hormonrezeptorstatus.

Die zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen im peripheren Blut wurden auf der Basis ihrer Oberflächenrezeptoren CD34 und VEGFR2 identifiziert und ihr prozentualer Anteil innerhalb der mononukleären Zellpopulation mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Dabei zeigten sich zwischen den 3 Hauptgruppen signifikante Unterschiede. In der Gruppe der Patientinnen mit malignen Brustdrüsenerkrankungen waren die endothelialen Vorläuferzellen deutlich erhöht. Sie wiesen einen Mittelwert von 0,44 % (Median 0,41 %) auf. Im Vergleich dazu lag Mittelwert bei den benignen Brustdrüsenerkrankungen bei 0,25 % (Median 0,27 %) und in der Kontrollgruppe bei 0,175 % (Median 0,135 %). Der Menopausenstatus besaß keinen Einfluss auf den Anteil der zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen. Innerhalb der Subgruppen (prä-, peri-,

postmenopausal) zeigten sich nur geringe Abweichungen vom Median der jeweiligen Hauptgruppe.

In der Gruppe, der an einem Karzinom erkrankten Frauen, zeigten sich bei der Beurteilung der TumorgroÙe deutliche Unterschiede. Schon ab dem Stadium T1 war eine Verdoppelung im Median der gemessenen EPC's im Vergleich zum Median der Kontrollgruppe feststellbar. Dieser Anstieg, der im Durchschnitt gemessenen endothelialen Vorläuferzellen, war in den höheren T-Stadien noch markanter. Dahingegen war kein Zusammenhang zwischen der Anzahl zirkulierender endothelialer Vorläuferzellen und dem Lymphknotenstatus, dem histologischen Typ des Tumors, dem Steroidhormonrezeptorstatus oder dem c-erbB2/HER-2-neu-Rezeptorstatus erkennbar.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war der Vergleich des prä- und postoperativ gemessenen Anteils der EPC's im peripheren Blut. Dabei zeigte sich ein deutlicher Abfall dieser Zellen schon wenige Stunden nach der Operation. Innerhalb der nächsten postoperativen Tage fielen die gemessenen Werte sogar bis in den Schwankungsbereich der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Tumore in der Lage sind eine erhöhte Freisetzung endothelialer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zu induzieren. In einigen Publikationen wurden ähnliche Beobachtungen für die Wachstumsfaktoren VEGF (Yamamoto 1996) und bFGF (Sliutz 1995) gemacht. Auch in ihren Studien sind diese Faktoren kurze Zeit nach Operation des Mammakarzinoms in ihrer Konzentration im Serum gefallen.

Beide Faktoren wurden ebenfalls in dieser Arbeit untersucht. Ziel dieser Untersuchung war das Erkennen von Zusammenhängen zwischen den Konzentrationen von VEGF und bFGF im Serum mit der Menge der aus dem Knochenmark mobilisierten endothelialen Vorläuferzellen im peripheren Blut. Mittels eines Enzyme-linked Immunoassays (ELISA) wurden beide Faktoren im Serum bestimmt und anschließend ausgewertet.

Für den VEGF-Serumspiegel zeigten sich signifikante Unterschiede ( $p=0,03$ ) zwischen Tumorpatienten (Median 94,4 pg/ml, Mittelwert 155,6 pg/ml) und der Kontrollgruppe (Median 30,2 pg/ml, Mittelwert 97,7 pg/ml). Auch der bFGF-Serumspiegel bei Patientinnen mit einem Karzinom (Median 9,1 pg/ml, Mittelwert 9,5 pg/ml) unterschied sich signifikant ( $p=0,059$ ) von der Kontrollgruppe (Median 3,1 pg/ml, Mittelwert 3,7 pg/ml). Dadurch entsteht die Vermutung, dass die Menge der aus dem Knochenmark mobilisierten endothelialen Vorläuferzellen proportional zu der Höhe der Konzentration dieser Faktoren sein könnte. Diese Hypothese hat sich nicht bestätigt. Weder konnte eine Korrelation der beiden Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF (Korrelationsfaktor  $p=0,1323$ ) zueinander noch zu der Höhe des Anteils der endothelialen Vorläuferzellen im Serum festgestellt werden (Korrelationsfaktor für VEGF 0,21 und für bFGF

0,23). Ebenso wenig zeigten sich Korrelationen zu anderen prognostischen Parametern, welche heute zur Beschreibung des Mammakarzinoms genutzt werden.

Um zu zeigen, dass die anhand ihrer Oberflächenrezeptoren identifizierten endothelialen Vorläuferzellen in der Lage sind sich in Endothelzellen zu differenzieren, wurden diese *in vitro* unter selektiven Bedingungen kultiviert. Durch eine anschließende Antikörper-Markierung mit dem endothelzellspezifischen von-Willebrand-Faktor, sowie der metabolischen Aufnahme eines farbstoff-konjugierten acetylierten Low Density Lipoproteins (Dil-Ac-LDL), konnten die entstandenen Endothelzellkolonien identifiziert werden.

Die Bestimmung der zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen im peripheren Blut ist mit einer Sensitivität von 70 % und einer Spezifität von 90 % eine sehr aussagekräftige Methode um angiogenetische Prozesse aufzuspüren. Ein zukünftiger Einsatz im Rahmen von Früherkennungsprogrammen für maligne Brustdrüsenerkrankungen ist somit durchaus vorstellbar. Aufgrund des ebenfalls erhöhten Anteils zirkulierender EPC's im peripheren Blut bei einigen anderen Tumorerkrankungen, ist der alleinige Einsatz als Marker zu unspezifisch. Die Kombination mit einem weniger sensitiven dafür aber spezifischeren Tumormarker könnte eine mögliche Lösung darstellen. Der klinische Vorteil einer Bestimmung des Anteils endothelialer Vorläuferzellen liegt in der Kinetik dieser Zellen beim Auftreten maligner Erkrankungen. Beim Mammakarzinom ist schon ab dem T1-Stadium im peripheren Blut eine signifikante Erhöhung feststellbar. Wiederum kommt es schon wenige Tage postoperativ zu einem Absinken dieses Zellanteils in die als normal erachteten Grenzen. Dadurch wird die Annahme gestützt, dass der Anstieg endothelialer Vorläuferzellen mit der Anwesenheit eines malignen Prozesses korreliert.

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt haben, besitzt die Methode der Bestimmung des Anteils der im peripheren Blut zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen viel Potential um zukünftig im Rahmen der Therapieüberwachung, der Rezidivfrüherkennung oder dem Aufspüren von Metastasen beim Mammakarzinom Einzug in die Praxis zu finden.