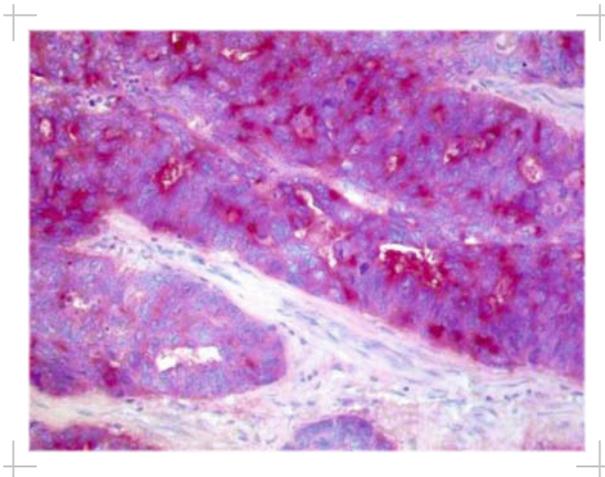


Vorkommen und prognostische Relevanz des Granulozyten-Kolonie-Stimulierenden Faktors im Ovarialkarzinomgewebe

KOSAI ESKEF



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Vorkommen und prognostische Relevanz des Granulozyten-Kolonie-Stimulierenden Faktors im Ovarialkarzinomgewebe

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Kosai Eskef

aus Msherfet/Syrien

Gießen 2013

Aus der Frauenklinik der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Direktor Prof. Dr. med. Dr. h.c. H.-R. Tinneberg

Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. H.-R. Tinneberg

Gutachter: Prof. Dr. med. S. Kanse

Tag der Disputation: 10.06.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ovarialkarzinome	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Ätiologie	2
1.1.2.1	Genetik des Ovarialkkrzinoms	3
1.1.3	Risikofaktoren und protektive Faktoren	3
1.1.4	Therapie	4
1.2	Prognostische und prädiktive Faktoren	4
1.2.1	Anforderungskatalog an einen prognostischen/prädiktiven Faktor	5
1.2.2	Prognose und die Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms	5
1.3	Klonie-stimulierende Faktoren CSFs	7
1.3.1	Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor G-CSF	7
1.3.2	Intrazelluläre Signalkaskaden	8
1.3.3	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor GM-CSF	10
1.3.4	CSF und Tumore	10
1.3.5	Aktuelle therapeutische Verwendung des CSF	11
2	Fragestellungen	12
3	Material und Methoden	13
3.1	Patientenkollektiv	13
3.1.1	Klinische und pathologische Kriterien	13
3.2	Histologie	15
3.3	Immunohistochemie	15
3.3.1	Verwendete Primärantikörper	16
3.3.2	Bewertungen	16
3.6	Statistiken	17
4	Ergebnisse	18
4.1	Patientenkollektiv	18
4.1.1	FIGO-Stadien	18
4.1.2	Altersgruppen	20
4.1.3	Aszites	21
4.2	Histologie	22

4.2.1	Histologischer Subtyp	22
4.2.2	Resttumor	23
4.2.3	Differenzierungsgrade (Grading)	24
4.2.4	Aktuelle Immunhistochemie	25
4.2.4.1	G-CSF-Expression im Tumor	26
4.2.4.2	G-CSF-Expression im Stroma	28
4.2.4.3	Granulozyten-Expression im Stroma	30
4.3	Korrelationen von G-CSF und Granulozyten in Tumor und Stroma mit histologischen und biologischen Faktoren	31
4.3.1	Korrelationen der G-CSF-Expression im Tumor mit histologischen und biologischen Faktoren	31
4.3.2	Korrelationen der G-CSF-Expression im Stroma mit histologischen und biologischen Faktoren	32
4.3.3	Korrelationen der Granulozyten im Stroma mit histologischen und biologischen Faktoren	33
4.3.4	Korrelationen der Expression von G-CSF und der Granulozyten in Tumor und Stroma mit den peripheren Blutwerten	34
4.4	Einfluss der G-CSF-Expression und der Granulozyten in Tumor und Stroma auf das Überleben	35
5	Diskussion	39
5.1	Rollen der G-CSF in Tumoren	40
5.1.1	Die Rolle der G-CSF in der Krebstherapie	41
5.1.2	Anwendung von G-CSF und Entstehung der Malignome	42
5.2	Leukozyten in Tumorstroma	42
6	Zusammenfassung	45
7	Abkürzungsverzeichnis	47
8	Abbildungsverzeichnis	48
9	Tabellenverzeichnis	49
10	Literaturverzeichnis	50
11	Publikationsverzeichnis	66
12	Eidesstattliche Erklärung	67
13	Danksagung	68
14	Lebenslauf	69

1 Einleitung

1.1 Ovarialkarzinome

1.1.1 Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom ist die fünfthäufigste maligne Erkrankung der Frau (Jemal et al. 2008, FIGO Annual Report 2006). Gleichzeitig stellen Ovarialkarzinome die vierthäufigste Todesursache bei Krebserkrankungen dar, und haben die führende Rolle als Todesursache unter den malignen gynäkologischen Erkrankungen in Europa. Die Prognose beim Ovarialkarzinom ist schlechter als bei anderen Krebserkrankungen des weiblichen Genitaltrakts.

Die Inzidenz lag bei 7.790 Neuerkrankungen im Jahr 2008 in Deutschland (Robert Koch-Institut 2012). Insgesamt fanden sich in Deutschland im Jahr 2008 ca. 20.300 Frauen, bei denen im Verlauf der vorangegangenen fünf Jahre ein Ovarialkarzinom festgestellt worden war (5-Jahres-Prävalenz); davon verstarben über 5.500 Patientinnen (Robert Koch-Institut 2012).

Weltweit liegt die Inzidenz bei 11,4/100.000 Frauen/Jahr und die Mortalität bei 5,3/100.000 Frauen/Jahr (Robert Koch-Institut 2010). Am häufigsten wird das Ovarialkarzinom im Alter zwischen 50 und 59 Jahren diagnostiziert (Scharf et al. 2002). Die Inzidenz des Ovarialkarzinoms erhöht sich jedoch mit steigendem Alter, um ab 85 Jahren dann wieder abzufallen.

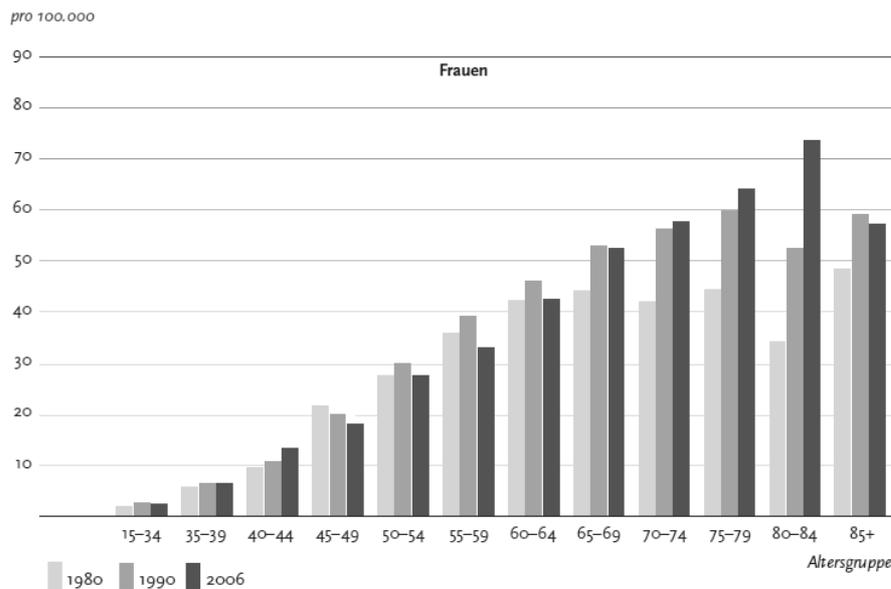


Abbildung 1: Altersspezifische Ovarialkarzinomerrkrankunsraten in Deutschland für 1980, 1990, 2006 (Robert Koch-Institut 2010)

Die Ovarialkarzinomerrkrankungsrate hat seit 1980 bis Mitte der 90er-Jahre in Deutschland leicht zugenommen und ist anschliessend auf etwa 16 Fälle pro 100.000 abgefallenden.

1.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie des Ovarialkarzinoms ist noch weitgehend ungeklärt. Mehrere unterschiedliche Hypothesen wurden als Erklärungsmodelle diskutiert:

Ständiger Eisprung („Incessant Ovulation“): Die Entstehung eines Ovarialkarzinoms ist mit der wiederholten Ruptur des Oberflächenepithels bei der Ovulation und dem nachfolgenden, fehlerhaften Reparatur-Mechanismus assoziiert (Fathalla 1971). Diese Hypothese wird durch epidemiologische Daten unterstützt. Diese Daten zeigen, dass Multiparität, Stillepisoden und die Einnahme von oralen Kontrazeptiva das Risiko der Entstehung eines Ovarialkarzinoms reduzieren (Casagrande et al. 1979).

Gonadotropin-Hypothese: Es wird vermutet, dass die Entstehung eines Ovarialkarzinoms durch eine übermäßige Sekretion von Gonadotropinen (FSH oder LH) und dadurch die vermehrte Wirkung von Östrogen hervorgerufen werden kann (Cramer et al.1982). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass eine Assoziation

zwischen Endometriose und histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms, dem endometrioiden und klarzelligem Ovarialkarzinom, diskutiert wird (Kobayashi et al. 2009).

Eine neue Theorie in der Ätiologie des serösen epithelialen Ovarialkarzinoms besagt dass das Epithel der Tubenschleimhaut, insbesondere der Fimbrienenden als Ausgangspunkt der Erkrankung anzusehen ist. Anhaltspunkt für diese Theorie ist die Beobachtung, dass bei prophylaktischer Entfernung der Adnexe von Frauen mit BRCA-1- oder BRCA-2-Genmutationen in der histologischen Aufarbeitung auffallend häufig ein In-situ-Karzinom des Tubenepithels gefunden wurde (Carlson et al. 2008).

1.1.2.1 Genetik des Ovarialkarzinoms

Ovarialkarzinome treten meistens sporadisch auf. In bevölkerungsbezogenen Studien sind BRCA1- und BRCA2-Mutationen in 5-15% aller Patientinnen mit Ovarialkarzinom nachweisbar. Mutationsträgerinnen erkranken zu 20 bis 50 % an einem Ovarialkarzinom (Meindl et al. 2011). BRCA1- und BRCA2-Mutation sind für etwa die Hälfte aller Familien mit zwei oder mehr Ovarialkarzinomen verantwortlich (Ramus et al. 2009). Eine prophylaktische beidseitige Salpingoovarektomie führt bei gesunden Mutationsträgerinnen BRCA1/2 zu einer Ovarialkarzinomrisikoreduktion von 80-95 % (Finch et al. 2006, Domchek et al. 2007).

Beim Lynch-Syndrom sind Mutationen der Gene MLH1, MSH2 und MSH6 zu finden. Die geschätzten kumulativen Risiken für das Ovarialkarzinom wurden jeweils mit 20 %, 24 % und 1 % gefunden (Bonadona et al. 2011).

1.1.3 Risikofaktoren und protektive Faktoren

Die Inzidenz des Ovarialkarzinoms nimmt mit zunehmendem Alter zu. Ernährungs- und Umweltfaktoren, Nulliparität, Infertilität, früh einsetzende Menarche und spätes Eintreten der Menopause, medikamentöse Ovarstimulation, Übergewicht und eine belastete Familienanamnese könnten bei der Entstehung des Ovarialkarzinoms eine

Rolle spielen. In der „Million Women Study“ lag das relative Risiko für die Ovarialkarzinominzidenz bei 1,20 und für die Mortalität bei 1,23 unter einer Hormontherapie (HT) (Beral 2007).

Umstände, die zu einer Verringerung der Anzahl von Menstruationszyklen der Frau führen, könnten protektive Faktoren sein. Hier sind vor allem wiederholte Gravidität, eine lange Stillzeit und die Einnahme von Ovulationshemmern zu zählen.

Selbst eine Stillzeit von über 6 Monaten konnte das Risiko des Ovarialkarzinoms um 15% reduzieren (John et al. 1993). Die Verwendung von Ovulationshemmern für 4 Jahre oder mehr ist mit einer Reduktion des Ovarialkarzinomrisikos auf ca. die Hälfte in der Allgemeinbevölkerung assoziiert (Whittemore et al. 1992). Chirurgische Maßnahmen, wie eine Hysterektomie oder eine beidseitige Tubenligatur, konnten ebenfalls zur Reduktion des Ovarialkarzinomrisikos führen (Whittemore et al. 1992, Hankinson et al. 1993).

1.1.4 Therapie

Die chirurgische Sanierung gefolgt von Chemotherapie ist immer noch der Goldstandard der Therapie.

Da das Ovarialkarzinom oft in fortgeschrittenen Stadien (ab FIGO IIb) festgestellt wird, ist ein Tumordebulking anzustreben ohne Verbleib makroskopischer Tumorreste. Es gibt aber noch kein universelles klinisches Modell zum verlässlichen Einschätzen der Operabilität (Ibeanu et al. 2010).

Im Anschluss an die optimale chirurgische Vorgehensweise wird die Chemotherapie eingeleitet. Das Standardprotokoll ist Paclitaxel 175 mg/m² Infusion über 3 Stunden gefolgt von Carboplatin AUC 5 über 1 Stunde alle 3 Wochen für insgesamt 6 Zyklen. Bei fortgeschnittenem Ovarialkarzinom (ab FIGO IIIb) kann zusätzlich eine Antikörpertherapie mit Bevacizumab zum Einsatz kommen (AGO-Ovar 2013).

1.2 Prognostische und prädiktive Faktoren

Die Prognose stellt die statistische Wahrscheinlichkeit für ein Lokalrezidiv, bzw. Metastase oder aber einen karzinom-bedingten Tod dar. Prädiktion heißt die relative

Vorhersage eines Effektes aufgrund therapeutischer Intervention (z. B. adjuvante Therapie, Operation etc.).

1.2.1 Anforderungskatalog an einen prognostischen/prädiktiven Faktor

Folgender Anforderungskatalog sollte vor der Akzeptanz eines „neuen prognostischen/prädiktiven Faktors“ erfüllt sein (AGO-Mamma-Leitlinie 2013; McShane et al. 2012):

- Biologisches Modell.
- Einfache und sichere Bestimmung, Qualitätssicherung des Tests.
- Prospektive Planung der statistischen Beurteilung.
- Validierung der klinischen Bedeutung nach „Oxford Level of Evidence (LoEOx2001)“-Kriterien und „Grades of Recommendation“ sowie nach modifizierten LOE Kriterien am archivierten Gewebe (LoE2009) und Art der Tumormarkerstudie.
- Klinische Relevanz für Therapieentscheidung.

Die Identifikation von neuen prognostischen Faktoren kann sehr nützlich für die Therapie der Ovarialkarzinome und für die Intensivierung der Nachsorge bei bestimmten Patientengruppen sein und trägt dazu bei, das biologische Verhalten der Ovarialkarzinome besser verstehen zu können (Schneider et al. 1997).

1.2.2 Prognose und Prognostische Faktoren des Ovarialkarzinoms

Relative 5-Jahres-Überlebensraten liegen laut epidemiologischen Krebsregistern in Deutschland zwischen 35 % und 49 %. Diese Raten sind vergleichbar mit denen in den USA 46 % (Robert Koch Institut 2010).

Die Prognose des Ovarialkarzinoms wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Die wichtigsten günstigen prognostischen Faktoren beinhalten jüngeres Alter, guter Allgemeinzustand, nicht muzinöser oder klarzelliger Tumotyp, frühe Stadien, gut differenzierte Tumoren sowie Fehlen von Aszites und kleiner Resttumor nach der

primären zytoreduktiven Operation (Omura et al. 1991, Houwelingen et al. 1989, Neijt et al. 1991, Hoskins et al. 1992, Thigpen et al. 1993).

Das Tumorstadium bei Erstdiagnose weist einen der wichtigsten Prognoseparameter auf. Die 5-Jahres-Überlebens-Rate verschlechtert sich stetig mit höheren Tumorstadien. Patientinnen mit Fernmetastasen bei Diagnosestellung (FIGO IV) haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von 12 % im Vergleich zu 82-92 % für Patientinnen im Frühstadium (FIGO I) (Nguyen et al. 1993).

Das Alter bei Erstdiagnose ist ein klarer prognostischer Parameter. Patientinnen unter 45 Jahren haben unabhängig vom Tumorstadium ein mittleres 5-Jahres-Überleben von 67 %, aber Patientinnen über 80 Jahren weisen nur ein mittleres 5-Jahres-Überleben von 12 % auf (Omura et al. 1991).

Der Allgemeinzustand der Patientin spielt ebenso eine Rolle. Patientinnen mit einem Karnofsky-Index (KI) < 70 zeigten eine signifikant schlechtere Überlebensrate (Thigpen et al. 1993). Die Wahl der Second-Line-Behandlung von epithelialen Ovarialkarzinomen sollte mehr durch die Bewertung des Allgemeinzustands als des Alters bestimmt werden (Gronlund et al. 2002).

Der Grad der Tumordifferenzierung beeinflusst wesentlich das Überleben. Wenn man die Frühstadien (FIGO I- II) mit den fortgeschrittenen Stadien (FIGO III- IV) vergleicht, beträgt das 5-Jahres-Überleben für G1 Tumoren 87 % bzw. 38 %, für G2 Tumoren 70 % bzw. 25 % und für G3 Tumoren 64 % bzw. 19 % (Pecorelli et al. 1998). Die G2-3 Tumoren haben eine relative hazard Rate von 2,5 (Makar et al. 1995).

Ebenfalls ist der histologische Subtyp ein prognostischer Faktor. Muzinöse und klarzellige Karzinome haben eine ungünstigere Prognose im Vergleich zu seröspapillären und endometrioiden Karzinomen (Makar et al. 1995, Trope 1998, Sugiyama et al. 2000). Das Ansprechen auf eine konventionelle platinhaltige Kombinationschemotherapie ist bei muzinösen Tumoren deutlich schlechter. (Hess et al. 2003, Enomoto et al. 2003).

Die Bedeutung einer primären, zytoreduktiven Operation in der Therapie des Ovarialkarzinoms und damit die prognostische Wertigkeit des Tumorrests wurden in vielen retrospektiven Studien und Metaanalysen bewiesen (Heintz et al. 1986, Hoskins et al. 1992; Allen et al. 1995, Eisenkop et al. 1998, Bristow et al. 2002.).

Eine Cochrane Analyse zeigte die prognostische Bedeutung einer vollständigen Zytoreduktion, wo keine sichtbaren Tumorreste verbleiben. Das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben waren in dieser Gruppe von R0-resezierten Patientinnen deutlich verlängert (Elattar et al. 2011).

1.3 Kolonie-stimulierende Faktoren (CSFs)

Das Konzept des Kolonie-stimulierenden Faktors (CSF) als hämatopoetischen Induktions-, Differenzierungs- und Wachstumsfaktor wurde erstmals 1966 diskutiert (Brandley et al. 1966). CSFs sind anerkannt als natürlich vorkommende Glykoproteine (Lieschke et al. 1992-1).

Hämatopoetische Kolonie-stimulierende Faktoren (CSFs) treten natürlicherweise im Rahmen einer Infektions- oder Entzündungsreaktion auf. Es ist bekannt, dass sie die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen regeln (Lieschke et al. 1992-1). Darüber hinaus können sie aber auch in mehrere andere Prozesse einschließlich Atherogenese, postinfarktbedingtes kardiales Remodelling, Lungen- und Leberfibrogenese und generell im Rahmen der Wundheilung und Reparatur von Gewebe einbezogen werden (Parissis et al. 2006, Yannaki et al. 2005).

1.3.1 Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF)

Der humane Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (h-G-CSF) ist ein einzelnes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 18,8 Kilodalton und hat 174 Aminosäurereste. Er hat ein freies Cystein an Position 17 und zwei intramolekulare Disulfidbrücken, Cys36-Cys42 und Cys64-Cys74, die notwendig sind für die G-CSF Bioaktivität (Basu et al. 2002). G-CSF wird von einem Gen auf Chromosom 17q11-12 codiert. G-CSF beeinflusst die späte myeloische Zelldifferenzierung, und fördert damit die Entwicklung von Granulozyten.

G-CSF-Produktion wird in der Regel durch inflammatorische Zytokine induziert. G-CSF wird von Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen hergestellt. Der G-CSF-Rezeptor ist ein Teil der Zytokin-Rezeptor-Typ-I-Familie. Die Signale werden durch

Januskinase (JAK) / Signal Transducer und Aktivator der Transkription (STAT) vermittelt.

1.3.2 Intrazelluläre Signalkaskaden

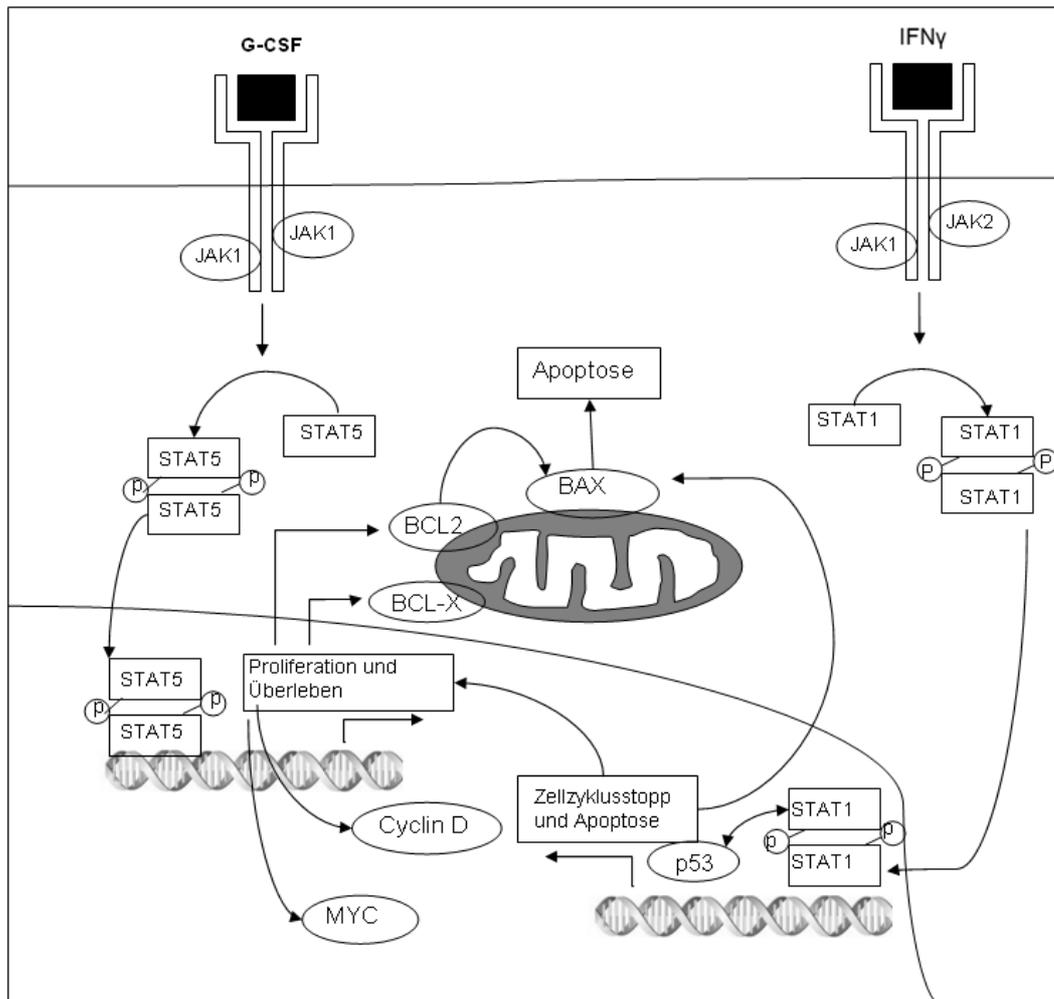


Abbildung 2: Die JAK-STAT Signale in einer Krebszelle.

Als Folge der durch die Januskinase 1 (JAK1) vermittelten G-CSF-Signale ergibt sich eine Phosphorylierung des Signal Transducers und Aktivators der Transkription STAT 5, eine nukleäre Translokation und Aktivierung von Genen, werden Proliferation und Überleben vermitteln. Zur selben Zeit resultiert im STAT 1 aus dem IFN-γ-Signal, welches über JAK2 vermittelt wird, eine Phosphorylierung, nukleäre Translokation und Transkription von Genen, die Zellzyklusstopp und Apoptose vermitteln. Daraus ergibt

sich, dass eine DNA-schädigende Therapie für Patienten dennoch effektiv sein könnte, welche dieses Profil zeigen (Irish et al. 2006).

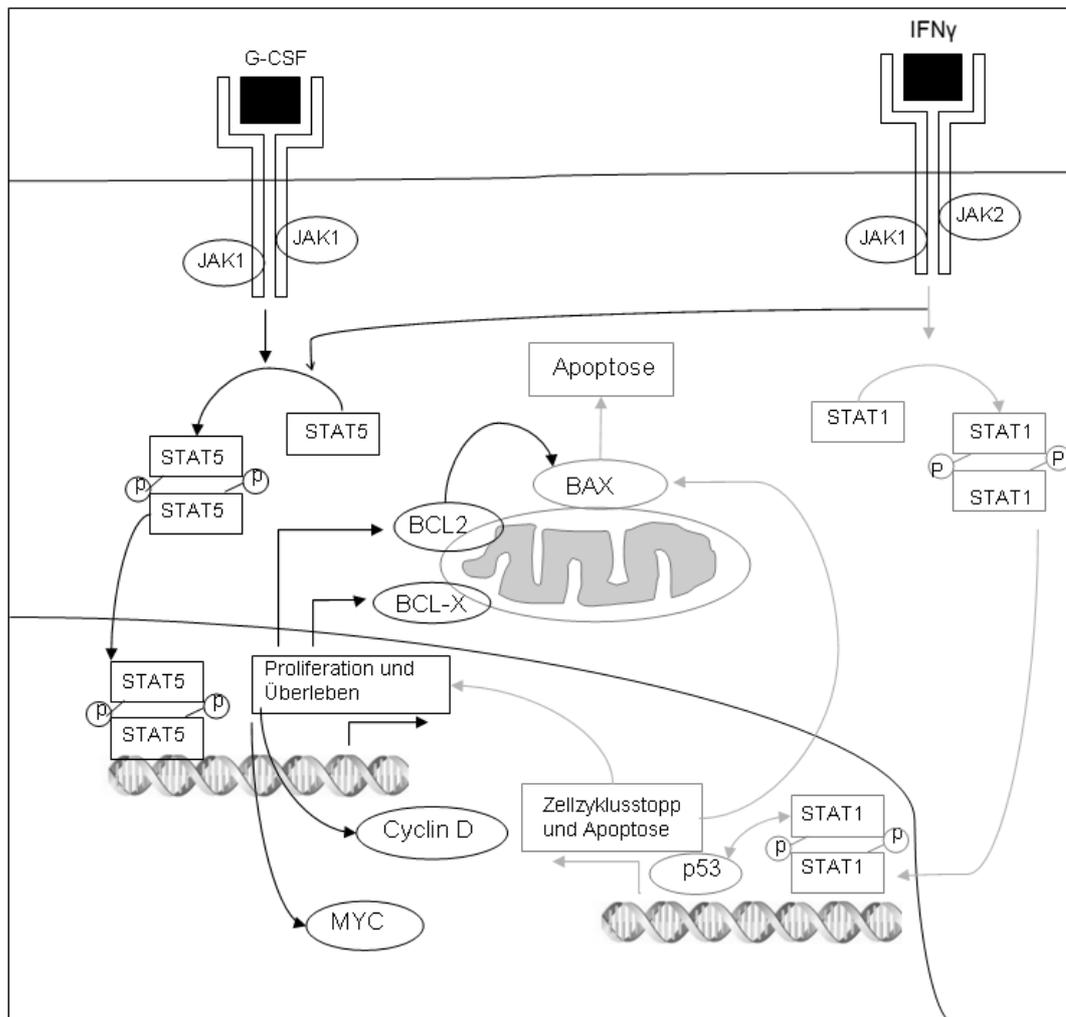


Abbildung 3: Änderung der JAK-STAT Signale bei therapieresistenten Krebszellen. Das IFN- γ -Signal ist umgeleitet worden, um STAT5 zu aktivieren. Daraus resultiert die Transkription von Proliferations- und Überlebensgenen, im Gegensatz zu den anti-proliferativen Effekten von STAT1 könnten Patienten mit diesem Signalprofil wesentlich resistenter gegenüber der Induktion einer DNA-Schädigung sein. Eine Hemmung von STAT5, dem entscheidenden Punkt bei der Aktivierung einer therapieresistenten Krebszelle, könnte daher das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose verschieben und dadurch den Respons auf eine Krebstherapie verbessern (Irish et al. 2006).

1.3.3 Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)

Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) ist ein 127 Aminosäuren Säure-Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 22 Kilodalton. GM-CSF wird von einem Gen auf Chromosom 5q31 kodiert und wirkt bei der frühen und späten myeloischen Zell-Entwicklung.

1.3.4 CSF und Tumore

Ein Fallbericht über ein Malignom mit erhöhter CSF-Aktivität in Serum und Urin wurde 1974 beschrieben (Robinson 1974). Danach wurde erstmalig 1977 bewiesen, dass CSF direkt von einer Lungenkrebs-Gewebeprobe produziert wurde (Asano et al. 1977).

Der Spiegel von Tumor-sezerniertem G-CSF kann im Blut nachgewiesen werden und somit als Tumormarker dienen (Mroczko et al. 2004). Die tumorbedingte Leukozytose im peripheren Blut wurde mit einer schlechten Prognose verbunden (Kasuga et al. 2001). G-CSF-produzierende Tumoren sind in der Regel mit schlechter Prognose assoziiert. Unterschiedliche Publikationen haben dies für verschiedene Krebsarten, zum Beispiel Karzinome des Hypopharynx (Tamura et al. 2008), der Lunge (Kaira et al. 2008), des Kolorektums (Takahashi et al. 2008), der Leber (Hayashi et al. 2001), der Gallenwege (Sohda et al. 2006), der Harnblase (Ueno et al. 2000), des Pankreas (Uematsu et al. 1996) und anderen Karzinomen gezeigt (Kobashi et al. 2004).

In-vitro-Untersuchungen zeigten, dass G-CSFs direkt das Tumorzellwachstum stimulieren können und durch Modulation des Tumorstromas die Tumorprogression stimulieren (Obermueller et al. 2004). Ebenfalls konnte für Blasenkrebs gezeigt werden, dass G-CSF wahrscheinlich die Tumorproliferation durch basischen Fibroblasten Wachstumsfaktor vermittelt (Ohmi et al. 2003).

CSF-Expression und Sekretion durch den Tumor selbst korreliert mit erhöhter Tumorproliferation und Vaskularisation in Meningeomen (Braun et al. 2004) und mit schlechterer Prognose bei Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses (Ninck et al. 2003).

Es ist unklar, ob G-CSF auch eine prognostische Bedeutung hat. Im Rahmen dieser Untersuchung sollte geprüft werden, ob G-CSF eine mögliche prognostische Bedeutung zukommt.

1.3.5 Aktuelle therapeutische Verwendung des CSF

Die aktuelle therapeutische Verwendung von G-CSF besteht hauptsächlich in der Prävention und Therapie von febriler Neutropenie. In einer Meta-Analyse konnte die Verkürzung des Krankenhausaufenthaltes sowie eine Beschleunigung der Neubildung von neutrophilen Granulozyten nach CSF-Gabe gezeigt werden (Clark et al. 2005). Ein möglicher Effekt auf die Mortalität war aber nicht nachweisbar (Clark et al. 2009).

Verschiedene Arten von G-CSF und GM-CSF wurden in klinischen Studien getestet und sind auf dem Markt erhältlich. Zu den am häufigsten G-CSF gehören Filgrastim und Lenograstim. Zu verwendeten GM-CSF zählen Sargramostim und Molgramostim. Sowohl G-CSF als auch GM-CSF haben gezeigt, dass sie bei der Verringerung der Inzidenz einer febrilen Neutropenie wirksam sind, wenn sie unmittelbar nach der Chemotherapie (Freyer 1998; Lyman 2002) und als unterstützende Therapie bei Patienten nach Knochenmarktransplantation gegeben werden (Petros 2001; Griffin 2001).

Vor einiger Zeit konnte gezeigt werden, dass niedrigdosierter Granulozyten-Makrophagen-CSF (GM-CSF) auch einen direkten therapeutischen Effekt bei Patienten mit rezidivierenden Tumoren der Brust oder des weiblichen Genitaltraktes hat (Kurbacher et al. 2005).

2 Fragestellungen

In der vorliegenden Untersuchung sollte im Rahmen einer retrospektiven Studie untersucht werden, welche Rolle G-CSF beim Ovarialkarzinom zukommt. Dazu sollten folgende Fragen geprüft werden:

1. Ist G-CSF im Ovarialkarzinomgewebe nachweisbar?
2. In welcher Menge wird G-CSF in Ovarialkarzinomen exprimiert?
3. Welche Korrelationen ergeben sich zu klinisch-pathologischen Parametern?
4. Welche prognostische Relevanz hat die Expression des G-CSF für das Gesamtüberleben beim Ovarialkarzinom?
5. Was ist der Unterschied zwischen einer Manifestation des G-CSF in den Tumorzellen oder im Stroma des Tumors?
6. Hat die Leukozyten-Manifestation im Stroma des Ovarialkarzinoms eine prognostische Relevanz?

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Grundlage dieser Untersuchung bildet ein Kollektiv von Patientinnen mit histologisch gesichertem Ovarialkarzinom (GK). Diese Patientinnen wurden im Zeitraum von 1982 bis 1996 in der Abteilung für Gynäkologische Onkologie und Strahlentherapie der Frauenklinik der Justus-Liebig-Universität behandelt. Außerdem sind die Gewebeblöcke dieser Patientinnen im Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen archiviert worden.

Die Krankenakten wurden im Juli 2006 in Hinblick auf die klinischen Daten und klinischen Prognosefaktoren, den Überlebenszeitraum und die Todesursache evaluiert. Die rezidivfreie Überlebenszeit wird im Rahmen dieser Untersuchung aufgrund von methodischen Schwierigkeiten nicht ausgewertet, da sich in vielen Fällen keine Daten der Tumorpersistenz eruieren lassen.

Einschlusskriterien sind:

- histologisch gesichertes Ovarialkarzinom.
- postoperative Nachbehandlung an der Universitätsfrauenklinik Gießen.
- Vorliegen kompletter klinischer Daten, vor allem Operationsbericht, Originalhistologie, postoperatives Behandlungsschema.
- komplettes Follow-up der Patientinnen.
- Vorliegen Paraffin-eingebetteten Tumorgewebes der Primäroperation.

3.1.1 Klinische und pathologische Kriterien

Folgende klinische und pathologische Parameter welche bereits in früheren Studien als prognostische Faktoren analysiert wurden, sind im Rahmen der retrospektiven Analyse erfasst worden:

- Alter
- Tumorstadium (FIGO)
- Größter Durchmesser des verbliebenen Resttumors (< 2 cm, > 2 cm)

- Aszitesmenge bei Primäroperation (nicht vorhanden, < 500 ml, > 500 ml)
- Histologie (Format und Wachstumsmuster)
- Tumordifferenzierung (Grading)
- Erfolg der Therapie

- Tumormarker

- CA 125
- CA153
- CEA Karzinoembryonales Antigen

- Angiogeneese

- CD31 Vaskularisation Marker (PECAM-1)
- CD143 Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)

- Proliferationsmarker:

- MIB 1 Tumorwachstumsfraktion

- Onkoprotein

- bcl-2-Protein(inhibiert Apoptose)
- Fibronektin Zelladhäsion

- Steroidrezeptoren

- Östrogenrezeptoren
- Progesteronrezeptor

- Hämatologische Parameter

- Leukozyten
- Hämoglobin
- Thrombozyten

-

Für die Berechnung der Überlebenszeit und des Überlebensstatus wurde die Erhebung aus dem Jahr 2006 zugrunde gelegt.

Das Projekt wurde der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität vorgestellt und am 10.05.2007 mit der Nummer 80/07 genehmigt.

3.2 Histologie

Die Diagnose Ovarialkarzinom wurde sowohl unter Heranziehung des HE-Schnittmaterials der Tumorprimäroperation und auch unter Berücksichtigung der Patientenanamnese sichergestellt.

In Anbetracht der histologischen Typisierung der Ovarialkarzinome nach Russell et al. (Russell et al. 1997) erfolgte die histologische Subtypisierung. In den meisten Fällen vor 1990 erfolgte keine primäre Beurteilung der histologischen Differenzierung (Grading). Hier wurde das Grading in Anlehnung an Baak et al. (Baak et al. 1987) bestimmt. Außerdem wurde das Hauptwachstumsmuster der Tumoren festgelegt. Die Formen wurden in zystisch, papillär, tubulär, solid-tubulär und solide unterteilt.

Die Proben aller Primärtumoren wurden routinemäßig in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. 2-3-µm dicke Gewebeschnitte wurden angefertigt. Histologische Diagnosen wurden auf standardisierten HE-gefärbten Schnitten durchgeführt und reevaluiert. Die Histologie wurde in serös, muzinös, endometrioid, undifferenziert, transitionalzellig und klarzellig eingeteilt.

3.3 Immunohistochemie

Für die Immunhistochemie wurden jeweils repräsentative Tumorproben ausgewählt. Die Verfügbarkeit der vollständigen klinischen Daten und von Tumorgewebe der primären Tumorchirurgie zählten zu den Einschlusskriterien.

Nach Entfernung des Wachses wurden die Gewebeschnitte in 0,1 M Citratpuffer sechsmal für 5 min bei 600 W mit Mikrowellen vorbehandelt, um die ordnungsgemäße Antigenität wiederherzustellen.

Der primäre G-CSF-Antikörper wurde 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Zur

Detektion der Antigene wurde die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase- (APAAP-) Technik verwendet.

3.3.1 Verwendete Primärantikörper

Zur G-CSF-Erkennung wurden monoklonale Maus-Antikörper (G-CSF Ab-1,GF05, Klon 5,24; Oncogene Research Products von Calbiochem) bei einer Konzentration von 5 µg / ml und der APAAP-Komplex in einer Verdünnung von 1:50 verwendet, die jeweils für 30 Minuten mit anschließender Wiederholung der je 10 min bei RT inkubiert wurden. Die Alkalische-Phosphatase-Substratreaktion wurde mit Neufuchsin und Levamisol für 20 min bei RT durchgeführt wie vorher beschrieben. Ein menschliches Mammakarzinomgewebe diente als interne positive und negative Kontrollen.

3.3.2 Bewertungen

Mindestens ein ganzer Gewebeabschnitt (von etwa 1,5 cm x 2 cm) über 5,000-250,000 Tumorzelle Profile) wurde analysiert. Die Immunhistochemie wurde semiquantitativ ausgewertet.

Der immunreaktive Score IRS oder Remmele-Score berücksichtigt die Färbeintensität SI und den Prozent-Quote der positiven Zellen PP. Der IRS wird aus dem Produkt beider Parameter berechnet. Bei der Bewertung ist der vorherrschende Intensitätsgrad maßgebend.

Die Färbeintensität SI wird eingeteilt in:

0	keine Färbereaktion
1	schwache Färbereaktion
2	mäßige Färbereaktion
3	starke Färbereaktion

Der Prozentsatz positiver Zellen (PP) wird wie folgt unterteilt:

0	keine positiven Zellen
1	< 10 % positive Zellen
2	10-50 % positive Zellen

- 3 51-80 % positive Zellen
- 4 > 80 % positive Zellen

Bei der Multiplikation beider Faktoren ergibt sich somit das IRS (Remmele et al. 1987).

Tabelle 1: Remmele-Score (IRS = SI x PP)

	SI = 0	SI = 1	SI = 2	SI = 3
PP = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0
PP = 1	IRS = 0	IRS = 1	IRS = 2	IRS = 3
PP = 2	IRS = 0	IRS = 2	IRS = 4	IRS = 6
PP = 3	IRS = 0	IRS = 3	IRS = 6	IRS = 9
PP = 4	IRS = 0	IRS = 4	IRS = 8	IRS = 12

Für die Analyse der Resultate wurden die IRS wie folgt zusammengefasst:

- 0 keine Expression
- 1 - 3 geringe Expression
- 4 - 8 mittlere Expression
- 9 - 12 hohe Expression

3.4 Statistiken

Das Datenmanagement und die Analyse erfolgten mit Hilfe des Computerprogrammes SPSS für Windows®, Version 14. Folgende Verfahren wurden bei der statistischen Datenauswertung eingesetzt: Bivariate Korrelationen, Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen, Residualanalysen nach Cox sowie einfache und schrittweise Diskriminanzanalysen. Ein wahrscheinlicher Fehler von <0,05 wurde als signifikant betrachtet.

Die Korrelationen werden mit den Korrelationskoeffizienten nach Pearson zweiseitig geprüft und tabellarisch dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

175 Patientinnen (GK) mit histologisch gesichertem Ovarialkarzinom, die im Zeitraum von 1982 bis 1996 in der Abteilung für Gynäkologische Onkologie und Strahlentherapie der Frauenklinik der Justus-Liebig-Universität untersucht wurden.

Die individuelle Nachbeobachtungszeit der Patientinnen lag bei 7 Jahren, der Median betrug 3,6 Jahre mit einer Spannweite von 4 Tagen bis 25,1 Jahren.

Von den untersuchten 175 Patientinnen wurden 97 optimal operiert, d.h. laut Operationsbericht waren keine Tumorresiduen belassen. Nach dem Schema zur Nachbehandlung des Ovarialkarzinoms erhielten 13/175 der Patientinnen keine adjuvante Nachbehandlung (Stadium Ia und Ib sowie bei Ablehnung der Therapie). 42/175 der Patientinnen (Stadium Ic bis IIc) wurden mit intraperitonealem Radiophosphor (P^{32}) und/oder systematischer Chemotherapie überwiegend mit PEC-Kombinationen (Cisplatin 50mg/m², Epirubicin 60mg/m² und Cyclophosphamid 500mg/m²; q28) behandelt. Die übrigen Patientinnen erhielten eine alleinige PEC-Chemotherapie. Bei der Mehrzahl nämlich 62,9 % bestand der Behandlungsplan aus einer Kombination o.g. radiotherapeutischer und chemotherapeutischer Maßnahmen.

4.1.1 FIGO-Stadien

Die Mehrzahl der Fälle befand sich in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung. Die fortgeschrittenen Stadien FIGO III und IV machten 52,0 % der Fälle aus. In 27,4 % der Fälle lag ein FIGO-Stadium I vor, d.h. der Tumor war auf ein Ovar oder beide Ovarien begrenzt. Bei 20,0 % der Fälle fand sich ein FIGO-Stadium II entsprechend einer Ausbreitung des Tumors auf andere Beckengewebe ohne Metastasierung. Bei einer Patientin konnte das Stadium retrospektiv nicht exakt bestimmt und überprüft werden.

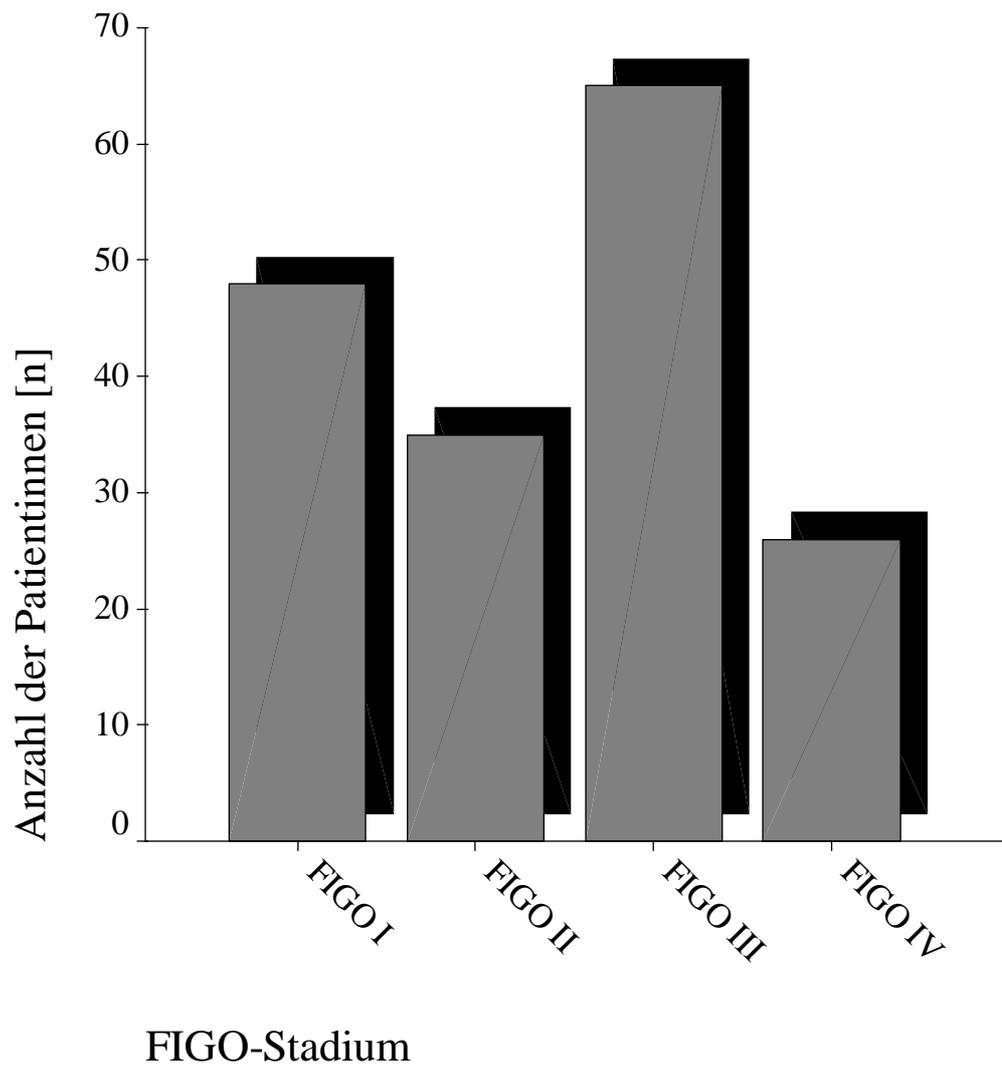


Abbildung 4: Verteilung der FIGO-Stadien.

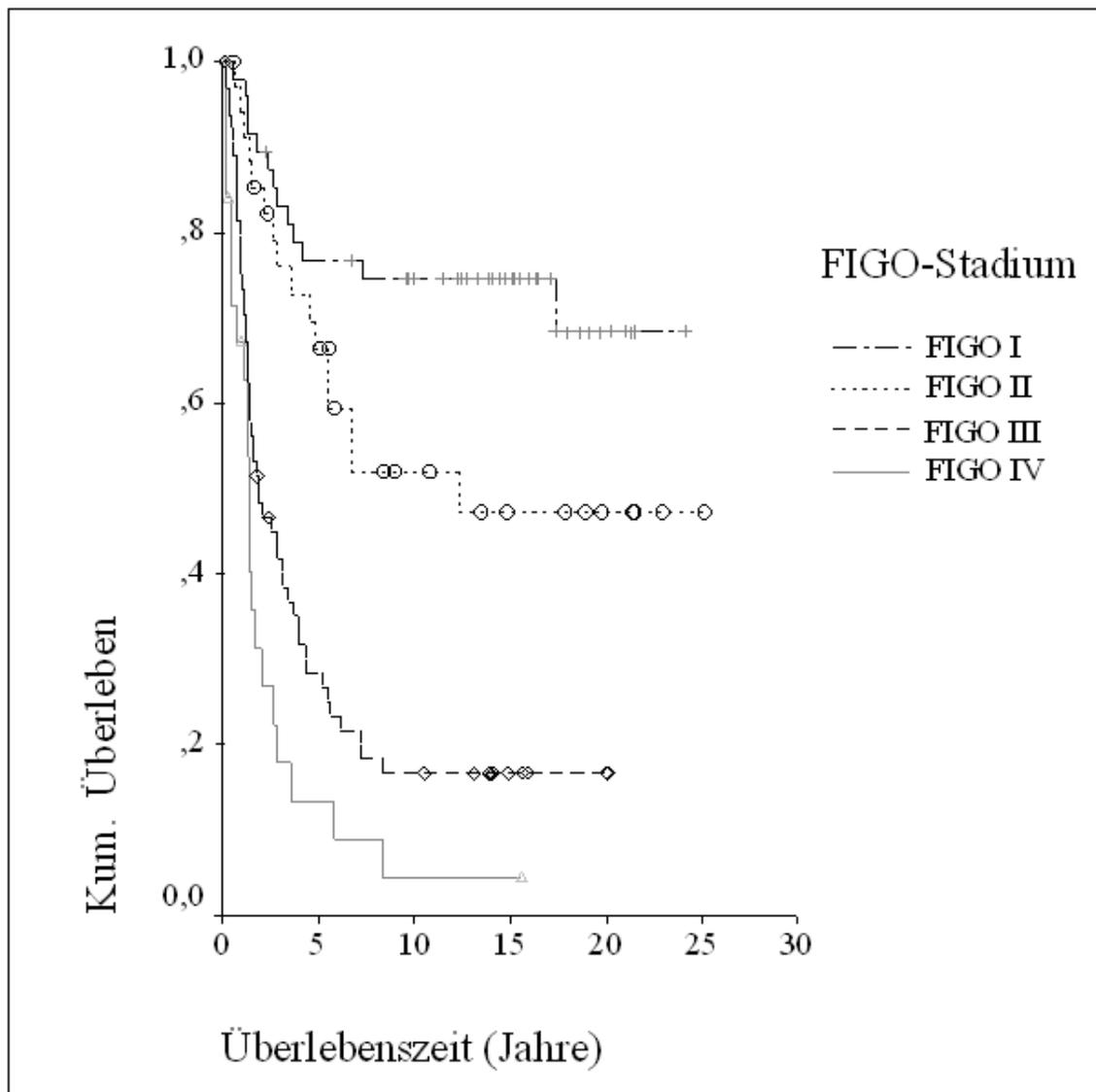


Abbildung 5: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse, Einfluss des FIGO-Stadiums im GK. (Log rank= 65,65, df = 3, p < 0,0001)

Die Überlebenszeitanalyse zeigt für die FIGO-Stadien deutliche Unterschiede bei den mittleren Überlebenszeiten zwischen den einzelnen FIGO-Stadien I-IV. Außerdem hat das FIGO-Stadium einen signifikanten Einfluss auf das kumulative Überleben.

4.1.2 Altersgruppen

Zwei Drittel der Patientinnen waren bei Feststellung der Diagnosestellung zwischen 71 und 80 Jahre alt. Patientinnen unter 50 Jahren waren nur zu 21,1 % im Kollektiv

repräsentiert, Patientinnen unter 30 Jahren nur zu 2,9 %. Die Verteilung nach Altersgruppen ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

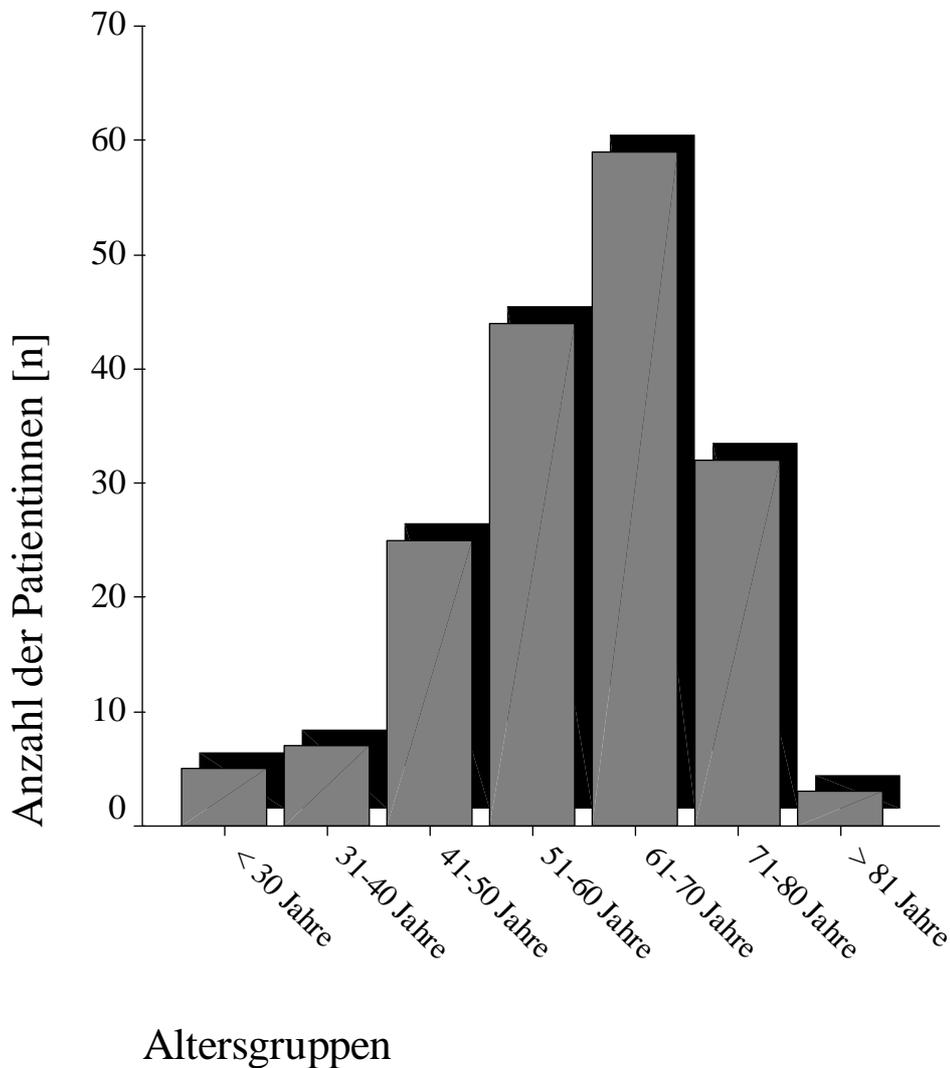


Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung des Patientenalters der Patientinnen bei Diagnosestellung.

4.1.3 Aszites

Bei 99 (56,6 %) der Patientinnen lag bei Diagnose kein Aszites vor. Bei 17 Fällen (9,7 %) betrug die Aszitesmenge weniger als 500 ml. Bei einem Drittel der Erkrankten (33,1 %, n=58) ließ sich eine Aszitesmenge von mehr als 500 ml nachweisen. Es fehlen jedoch die Angaben bei einer Patientin.

Die Azites-Menge hat einen signifikanten Einfluss auf das kumulative Überleben.

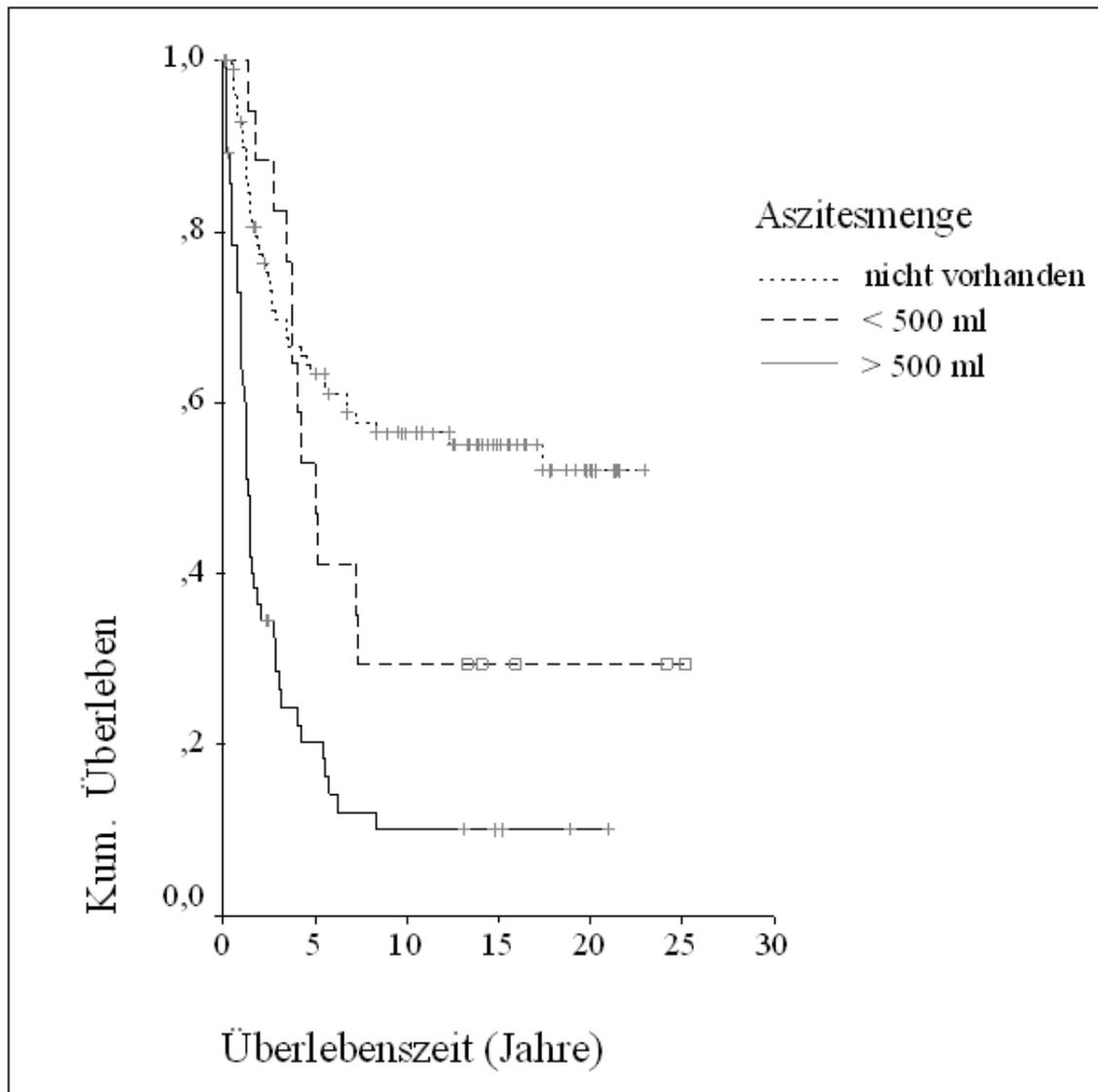


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse, Einfluss des Aszites im GK. (Log rank= 49,04, df = 2, p < 0,0001)

4.2 Histologie

4.2.1 Histologischer Subtyp

Die serösen Ovarialkarzinome waren mit knapp über die Hälfte aller Fälle (50,3 %) der häufigste histologische Tumortyp. An zweiter Stelle folgten die muzinösen Karzinome

mit 13,7 % der Fälle. Endometrioid Karzinome folgten mit 12,6 %. Die Gruppe der klarzelligen Karzinome stand mit 8,6 % an der vierten Stelle.

Im GK hat der histologische Subtyp keinen signifikanten Einfluss auf das kumulative Überleben.

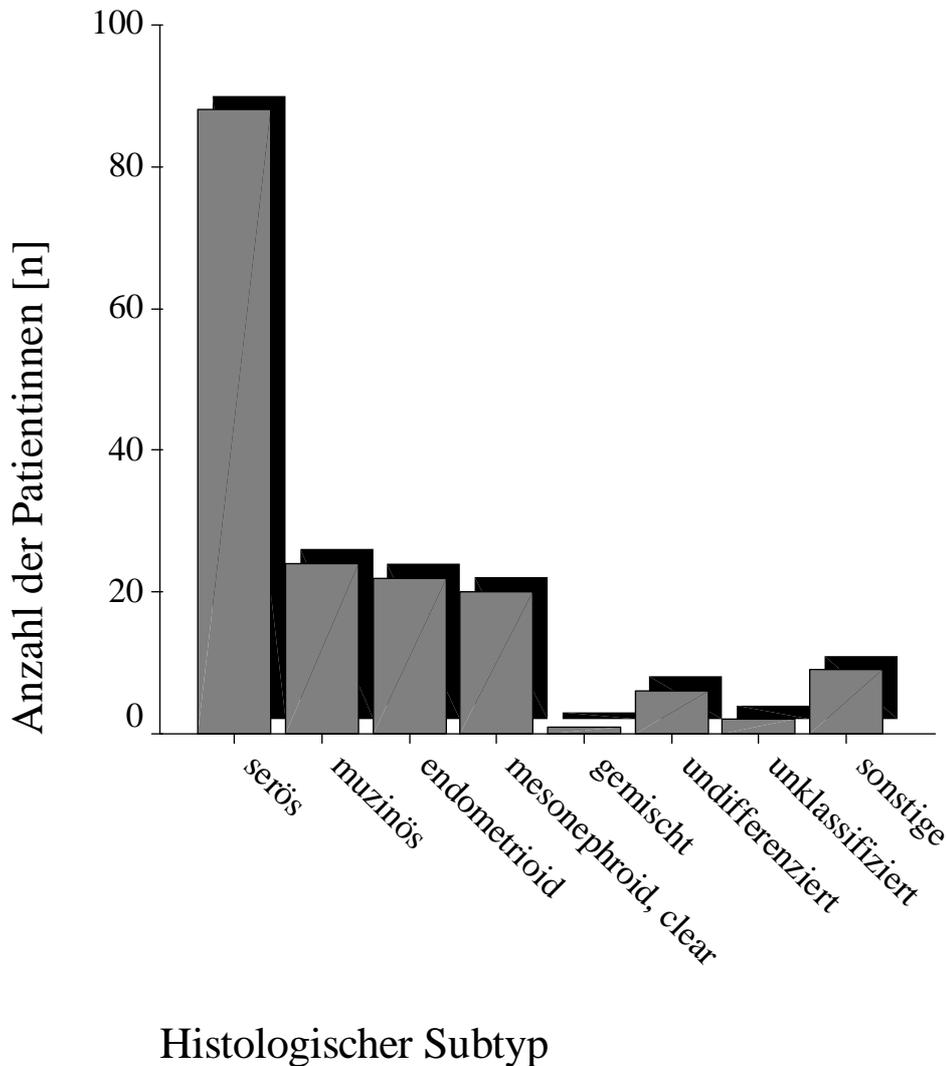


Abbildung 8: Verteilung der histologischen Subtypen.

4.2.2 Resttumor

In Hinblick auf die Einflussgröße „postoperativer Tumorrest“ zeigte sich, dass bei mehr als der Hälfte der Patientinnen (55,4 %; n= 97) kein Tumorrest (R0) verblieb. Die zwei Gruppen (< 2 cm (R1) und > 2 cm (R2)) sind fast gleich häufig vertreten (R1 n=37; R2 n=41).

Der Tumorrest hat einen signifikanten Einfluss auf das kumulative Überleben.

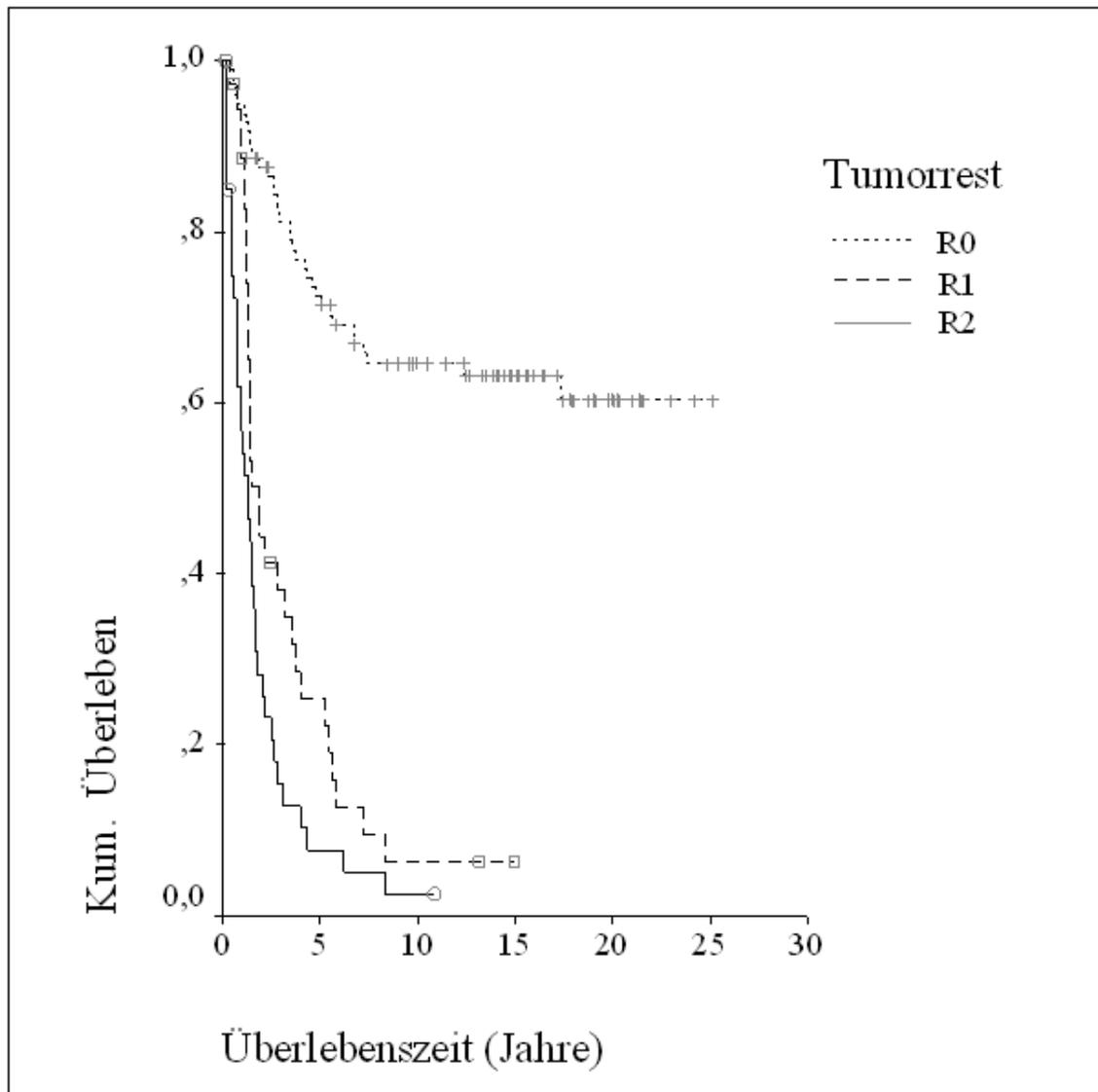


Abbildung 9: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse, Einfluss des Tumorrestes im GK. (Log rank= 102,95, df = 2, p < 0,0001)

4.2.3 Differenzierungsgrade (Grading)

Die Auswertung des histologischen Differenzierungsgrades zeigte die folgende Verteilung: In 51,7 % der Fälle lag ein schlecht differenzierter Tumor vor (entsprechend einem G3-Tumor). Nur 9,8 % der Patientinnen hatten einen gut differenzierten Tumor (G1). Bei 38,5 % der Patientinnen war eine mäßige Differenzierung (G2) zu registrieren. Bei einer Patientin konnte den Differenzierungsgrad retrospektiv nicht exakt bestimmt und überprüft werden.

Der Differenzierungsgrad hat einen signifikanten Einfluss auf das kumulative Überleben.

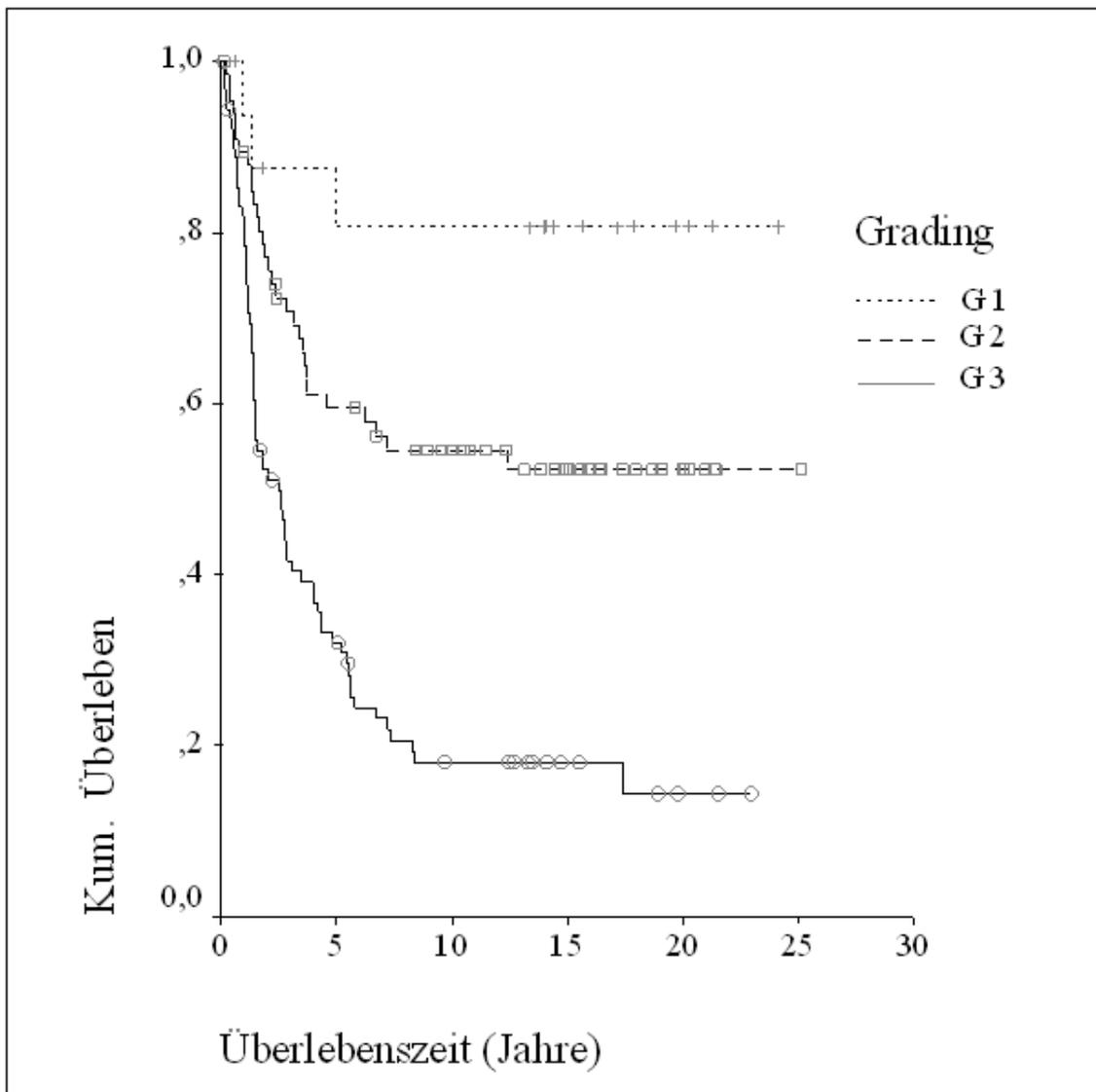


Abbildung 10: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse, Einfluss des histologischen Differenzierungsgrades im GK. (Log rank= 31,90, df = 2, $p < 0,0001$)

4.2.4 Aktuelle Immunhistochemie

In der allgemeinen Färbung der G-CSF-Immunhistochemie zeigten sich deutlich analysierbare Expressionsmuster der Proteine in den Tumorzellen und dem umgebenden Stroma. Die Intensität der Färbung und der Anteil der positiven

Tumorzellen waren nicht abhängig vom Alter oder der Lagerzeit der in Paraffin eingebetteten Tumorproben. (siehe Abb.8)

4.2.4.1 G-CSF-Expression im Tumor

Folgende Verteilung wurde gefunden:

In 28,6 % der Fälle fehlte die Expression von G-CSF in den Tumorzellen. Eine geringe Expression zeigte 25,1 % aller Tumore. Mittelgradige Expression wurde in 33,1 % der Fälle gefunden, eine starke Expression konnte bei 13,1 % der Fälle diagnostiziert werden.

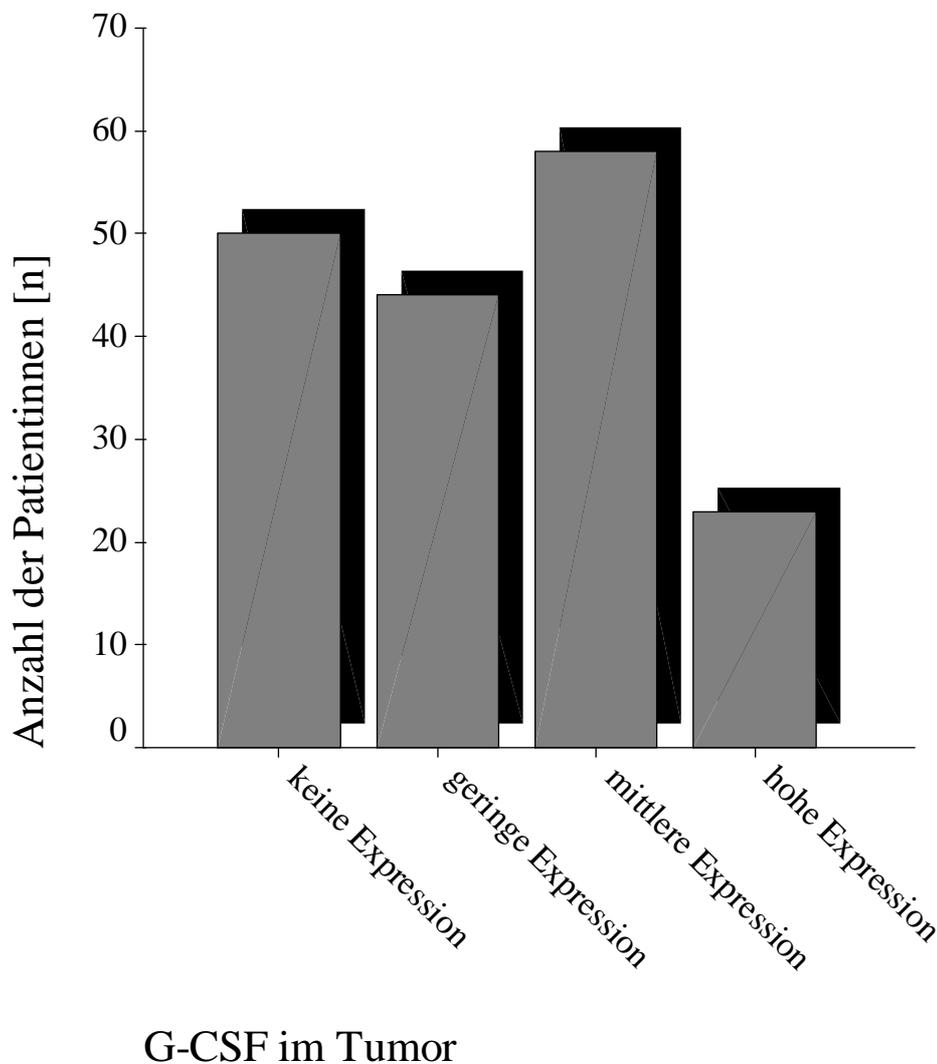


Abbildung 11: Verteilung der G-CSF-Expression im Tumor.

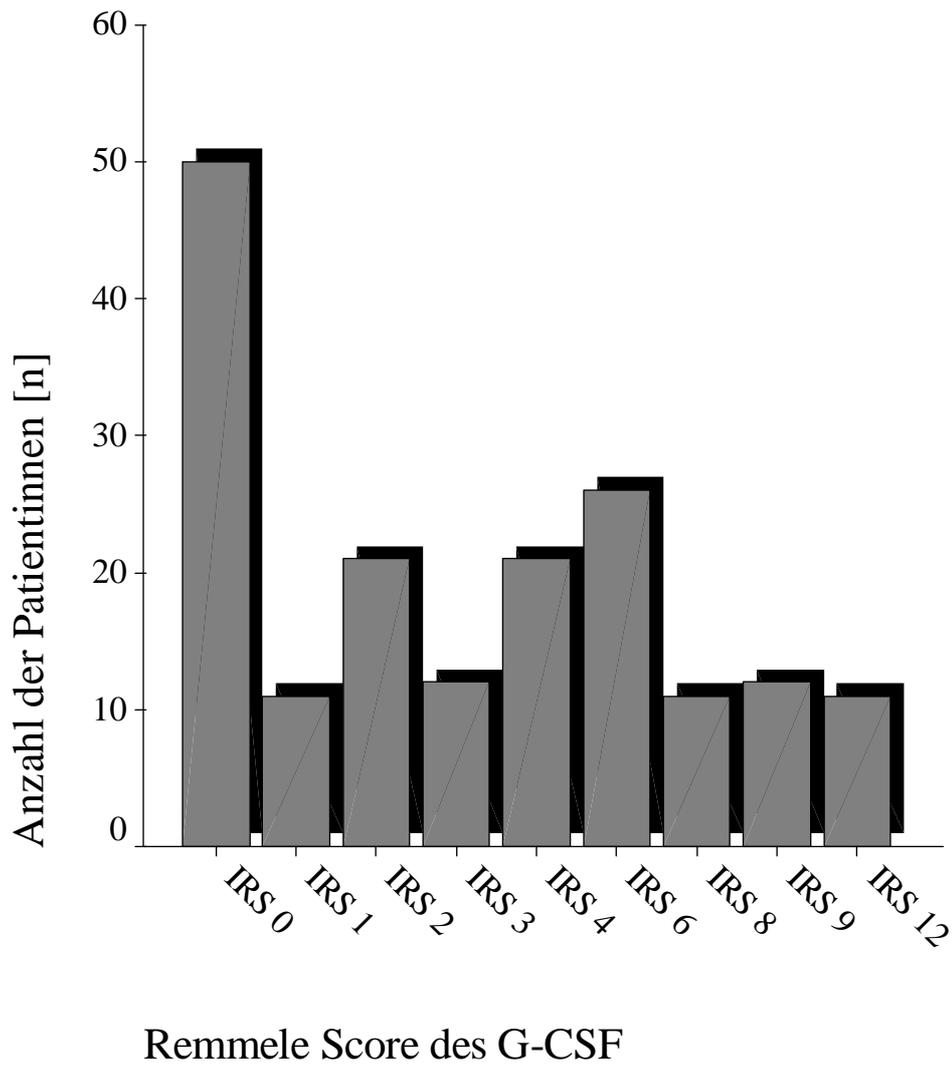


Abbildung 12: Verteilung nach Remmele-Score des G-CSF im Tumor.

4.2.4.2 G-CSF-Expression im Stroma

In über einem Drittel der Tumoren wurde eine geringe Expression von G-CSF im Stroma nachgewiesen. In einem ähnlich großen Anteil der Tumoren wurde eine mittelgradige Expression von G-CSF im Stroma gezeigt. Dagegen wiesen nur 20 Fälle eine starke Expression von G-CSF im Stroma auf. In weniger als 20 Fällen wurde keine Expression von G-CSF im Stroma nachgewiesen.

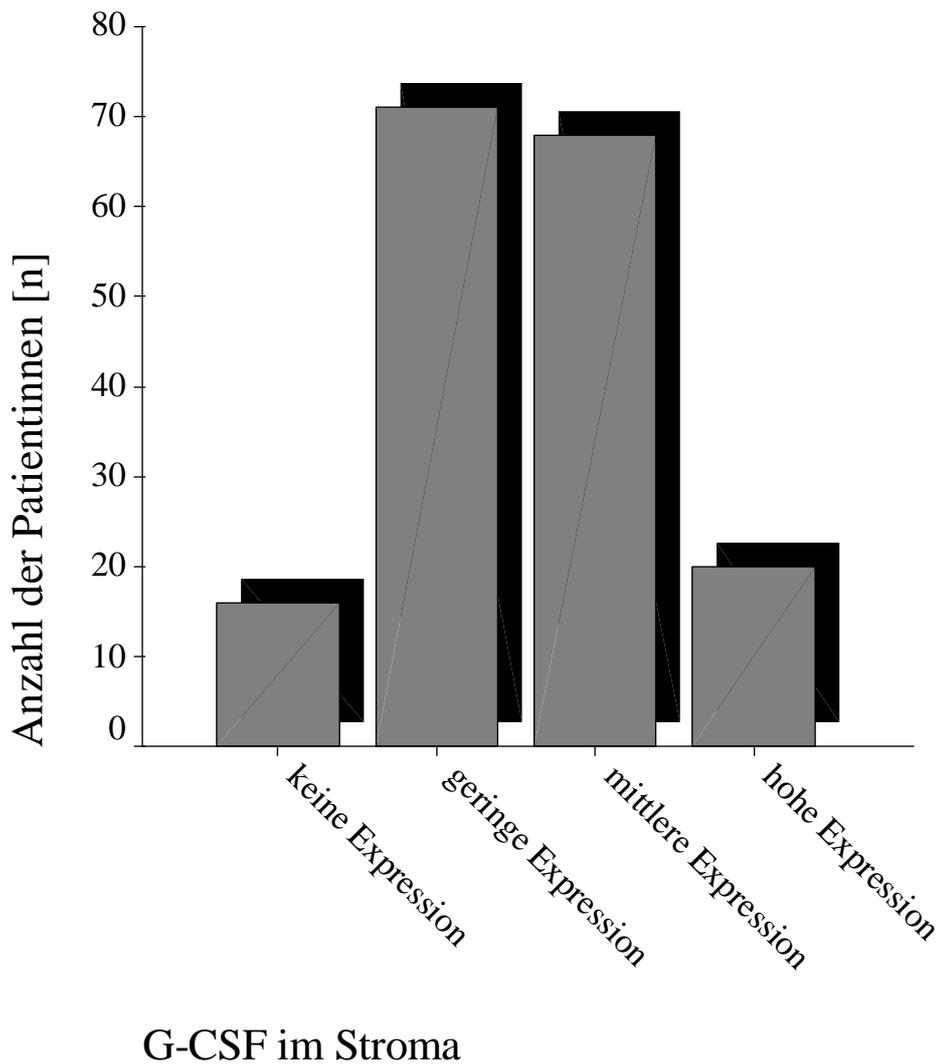


Abbildung 13: Verteilung der G-CSF-Expression im Stroma.

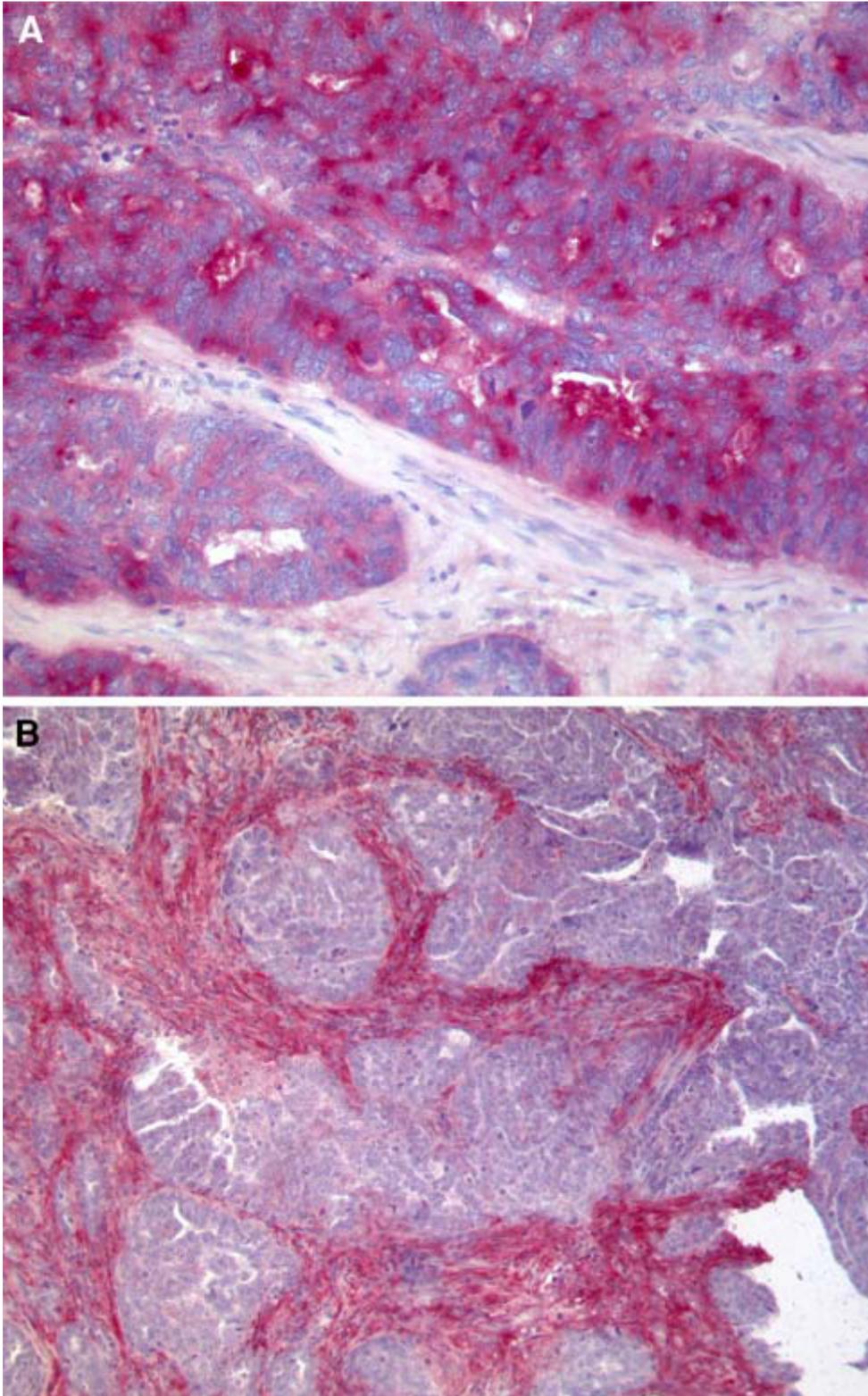


Abbildung 14: Beispiel von zwei positiv G-CSF-gefärbten Tumorabschnitten. A. Beispiel eines Tumors mit positiv G-CSF-gefärbten Tumorzellen und G-CSF-negativem Stroma. B. Beispiel eines Tumors mit ungefärbten Tumorzellen und positiv gefärbtem Stroma.

4.2.4.3 Granulozyten-Expression im Stroma

Die Auswertung zeigt die folgende Verteilung: In ca. 60 Fällen wurden keine Granulozyten im Stroma registriert. In der Mehrheit der Fälle lag eine geringe Anzahl von Granulozyten im Stroma vor.

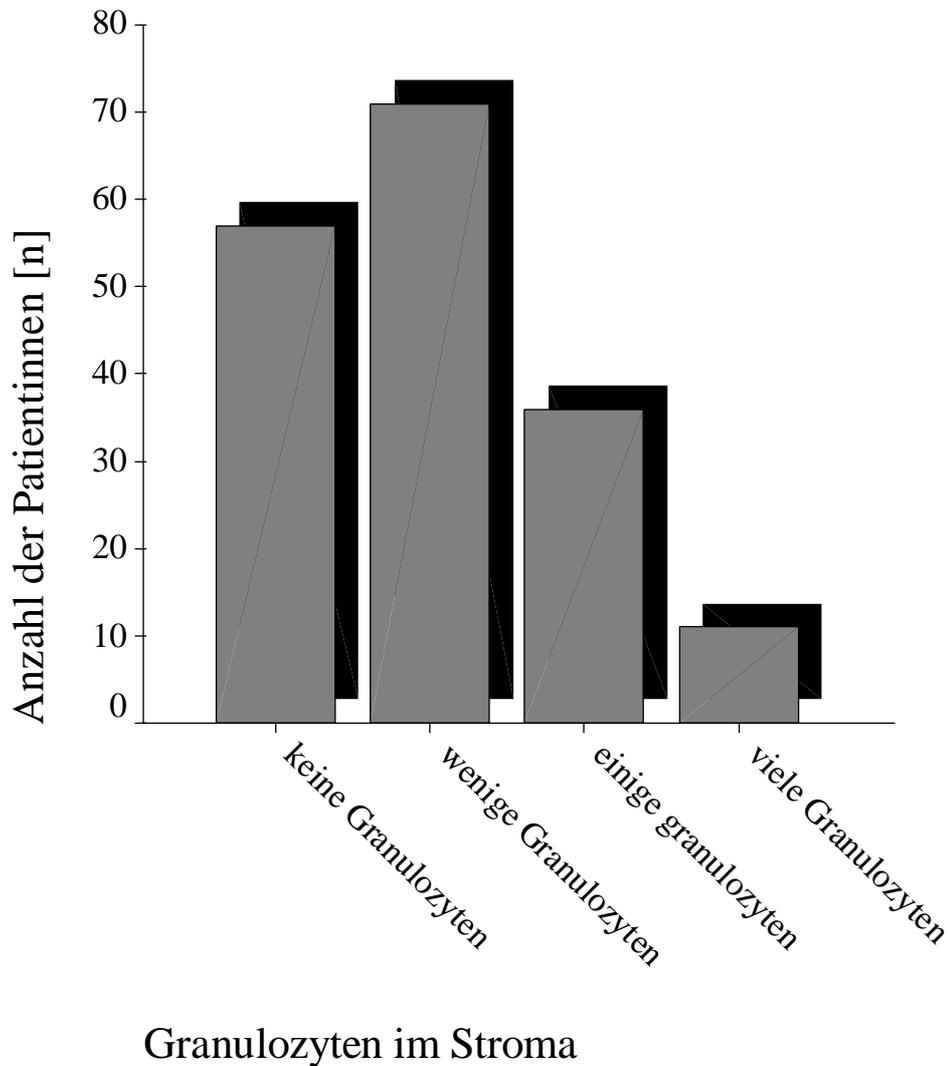


Abbildung 15: Verteilung der Granulozyten-Expression im Stroma.

4.3. Korrelationen von G-CSF und Granulozyten in Tumor und Stroma mit histologischen und biologischen Faktoren

Tabelle 2: Korrelationen von G-CSF und Granulozyten in Tumor und Stroma mit histologischen und biologischen Faktoren. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant, n.s. nicht signifikant.

	Expression von G-CSF im Tumor		Expression von G-CSF im Stroma		Expression der Granulozyten im Tumor	
	Korrelation (r)	Signifikanz (p)	Korrelation (r)	Signifikanz (p)	Korrelation (r)	Signifikanz (p)
Alter der Patientinnen bei Diagnose		n.s.		n.s.		n.s.
Tumorstadium		n.s.		n.s.	-0,196	0,010
Histologie		n.s.		n.s.		n.s.
Grading	0,150	0,048		n.s.		n.s.
Erfolg der Therapie		n.s.		n.s.	-0,170	0,027
CEA	0,248	0,001		n.s.	0,279	<0,001
CA125	0,241	0,002		n.s.		n.s.
CA153	0,258	0,001		n.s.		n.s.
Östrogen-Rezeptor		n.s.		n.s.		n.s.
Progesteron-Rezeptor	0,234	0,002		n.s.		n.s.
MIB-1		n.s.		n.s.		n.s.
Bcl 2	0,214	0,005		n.s.		n.s.
Fibronectin		n.s.		n.s.		n.s.
CD31		n.s.	0,212	0,005		n.s.
CD143		n.s.		n.s.		n.s.
Expression von G-CSF im Tumor				n.s.	0,206	0,006
Expression von G-CSF im Stroma		n.s.				n.s.
Expression der Granulozyten im Tumor	0,206	0,006		n.s.		

4.3.1 Korrelationen der G-CSF-Expression im Tumor mit histologischen und biologischen Faktoren

Die Expression von G-CSF im Tumor war mit der Anzahl der Granulozyten im Tumor

($r=0,206, p=0,006$), der Bcl-2-Expression ($r = 0,214, p = 0,005$), der Progesteron-Rezeptor-Expression ($r = 0,234, p = 0,002$), CA125 ($r = 0,241, p = 0,002$), CA153 ($r = 0,258, p = 0,001$), CEA ($r = -0,248, p = 0,001$) und dem Grading des Tumors ($r = 0,150, p = 0,048$) korreliert.

Tabelle 3: Korrelationen zwischen der G-CSF-Expression im Tumor und histologischen und biologischen Faktoren. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

	Expression von G-CSF im Tumor	
	Korrelation (r)	Signifikanz (p)
Grading	0,15	0,048
CEA	0,248	0,001
CA125	0,241	0,002
CA153	0,258	0,001
Progesteron-Rezeptor	0,234	0,002
Bcl 2	0,214	0,005
Expression der Granulozyten im Tumor	0,206	0,006

4.3.2 Korrelationen der G-CSF-Expression im Stroma mit histologischen und biologischen Faktoren

Alleinig mit der Kapillarisierung (CD31) konnte eine Korrelation von G-CSF im Stroma nachgewiesen werden ($r = 0,212, p = 0,005$). Alle anderen Faktoren (G-CSF im Tumor, Anzahl von Granulozyten im Stroma, Alter der Patientinnen bei Diagnose, Tumorstadium, Histologie, Grading, CEA, CA125, CA153, Östrogen- und Progesteron-Rezeptor, Fibronectin, Bcl-2, Tumor-Proliferation durch MIB-1, Angiotensin-Converting-Enzym (CD143) zeigten keine Korrelation mit der Expression von G-CSF im Stroma. Es gab auch keine Korrelation mit dem Ansprechen auf die Therapie.

Tabelle 4: Korrelation zwischen der G-CSF-Expression im Stroma und der Kapillarisation (CD-31). Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

	Expression von G-CSF im Stroma	
	Korrelation (r)	Signifikanz (p)
CD31	0,212	0,005

4.3.3 Korrelationen der Granulozyten im Stroma mit histologischen und biologischen Faktoren

Die Zahl der Granulozyten im Stroma korrelierte mit CEA ($r = 0,279$, $p < 0,001$), dem Tumorstadium ($r = -0,196$, $p = 0,010$), dem Erfolg der Therapie ($r = -0,170$, $p = 0,027$) und der Expression von G-CSF im Tumor ($r = 0,206$, $p = 0,006$).

Tabelle 5: Korrelationen zwischen der Anzahl von Granulozyten im Stroma und histologischen und biologischen Faktoren. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

	Expression der Granulozyten im Tumor	
	Korrelation (r)	Signifikanz (p)
Tumorstadium	-0,196	0,01
Erfolg der Therapie	-0,17	0,027
CEA	0,279	<0,001
Expression von G-CSF im Tumor	0,206	0,006

4.3.4. Korrelationen der Expression von G-CSF und der Granulozyten in Tumor und Stroma mit den peripheren Blutwerten

Es zeigten sich keine Korrelationen zwischen der G-CSF-Expression in den Tumorzellen oder im Tumorstroma und den hämatologischen Parametern (Anzahl der Leukozyten, Hämoglobin oder Thrombozyten) vor der Operation.

Tabelle 6: Korrelationen zwischen der G-CSF-Expression in den Tumorzellen und hämatologischen Parametern vor der Operation. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant, n.s. nicht signifikant.

	Expression von G-CSF im Tumor	
	Korrelation (r)	Signifikanz (p)
Thrombozyten vor OP	-0,038	0,379 n.s.
Leukozyten vor OP	0,008	0,940 n.s.
Hämoglobin vor OP	0,100	0,362 n.s.

Tabelle 7: Korrelationen zwischen der G-CSF-Expression im Stroma und hämatologischen Parametern vor der Operation. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant, n.s. nicht signifikant.

	Expression von G-CSF im Stroma	
	Korrelation (r)	Signifikanz (p)
Thrombozyten vor OP	-0,097	0,732 n.s.
Leukozyten vor OP	-0,104	0,345 n.s.
Hämoglobin OP	-0,156	0,153 n.s.

Tabelle 8: Korrelationen zwischen der Anzahl der Granulozyten im Stroma und hämatologischen Parametern vor der Operation. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant, n.s. nicht signifikant.

	Anzahl der Granulozyten im Stroma	
	Korrelation (r)	Signifikanz (p)
Thrombozyten vor OP	-0,010	0,931 n.s.
Leukozyten vor OP	0,027	0,810 n.s.
Hämoglobin vor OP	-0,023	0,837 n.s.

4.4. Einfluss der G-CSF-Expression und der Granulozyten in Tumor und Stroma auf das Überleben

Weder die Expression von G-CSF in den Tumorzellen noch im Stroma beeinflussten das Gesamtüberleben der Patienten. Darüber hinaus zeigte eine kombinierte Analyse der beiden Faktoren keinen Einfluss auf das Überleben auch nach getrennten Analysen der verschiedenen Tumorstadien und mit Hilfe einer multifaktoriellen Regressionsanalyse. Dagegen beeinflusste die Höhe der Granulozyten im Stroma das Überleben (Abb. 18). Die Analyse anderer Einflussfaktoren (Grading, Stadium, Alter, Tumorproliferation, Resttumor, Erfolg der Therapie) mittels einer multifaktoriellen Regressionsanalyse zeigte keine Korrelation zur Anwesenheit von Granulozyten innerhalb des Tumors und dem Überleben.

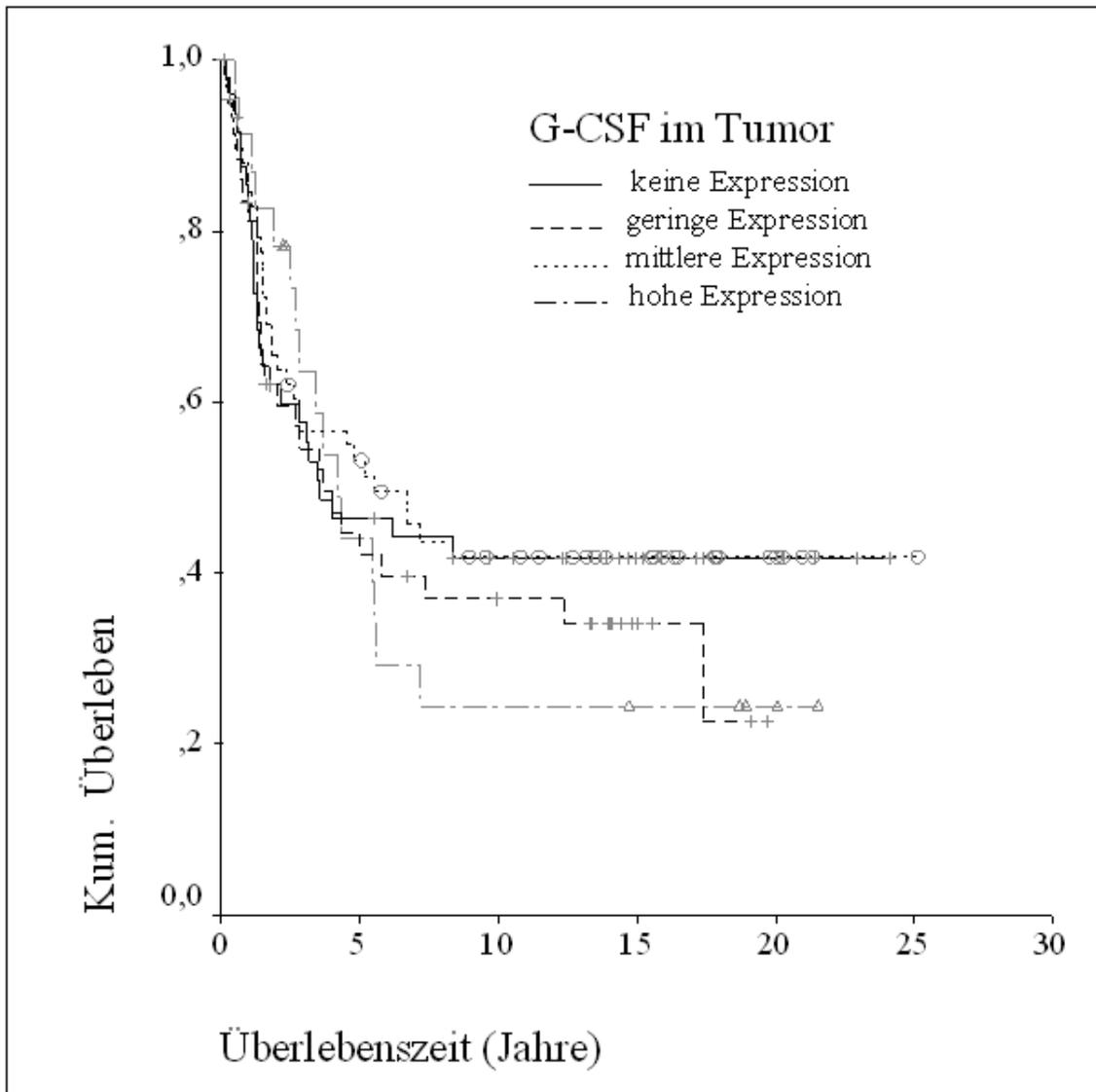


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse, Einfluss der G-CSF-Expression im Tumor im GK. (Log rank= 1,13, df= 3, p=0,7709).

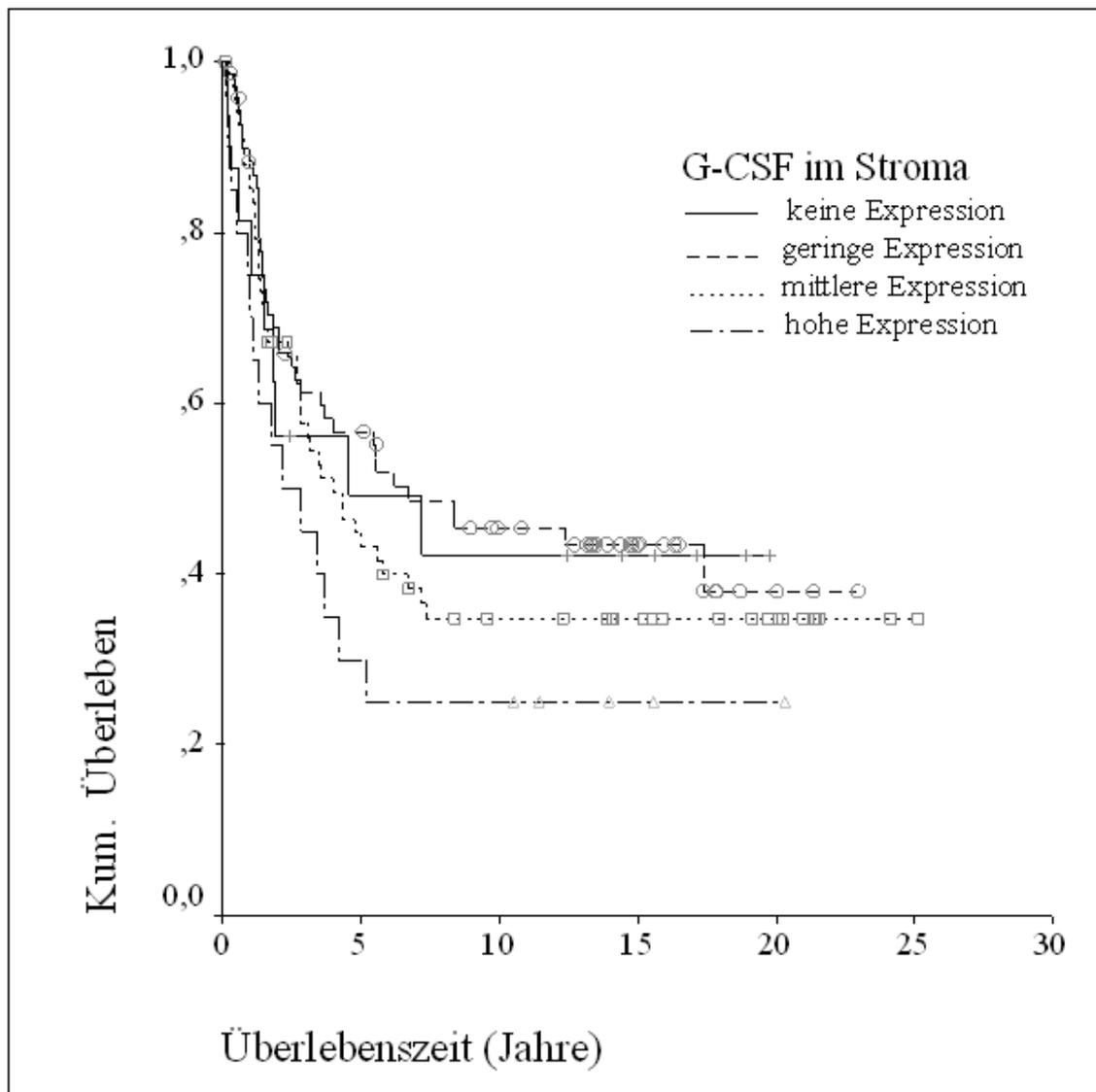


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse, Einfluss der G-CSF-Expression im Stroma im GK. (Log rank= 3,82, df= 3, p=0,2811).

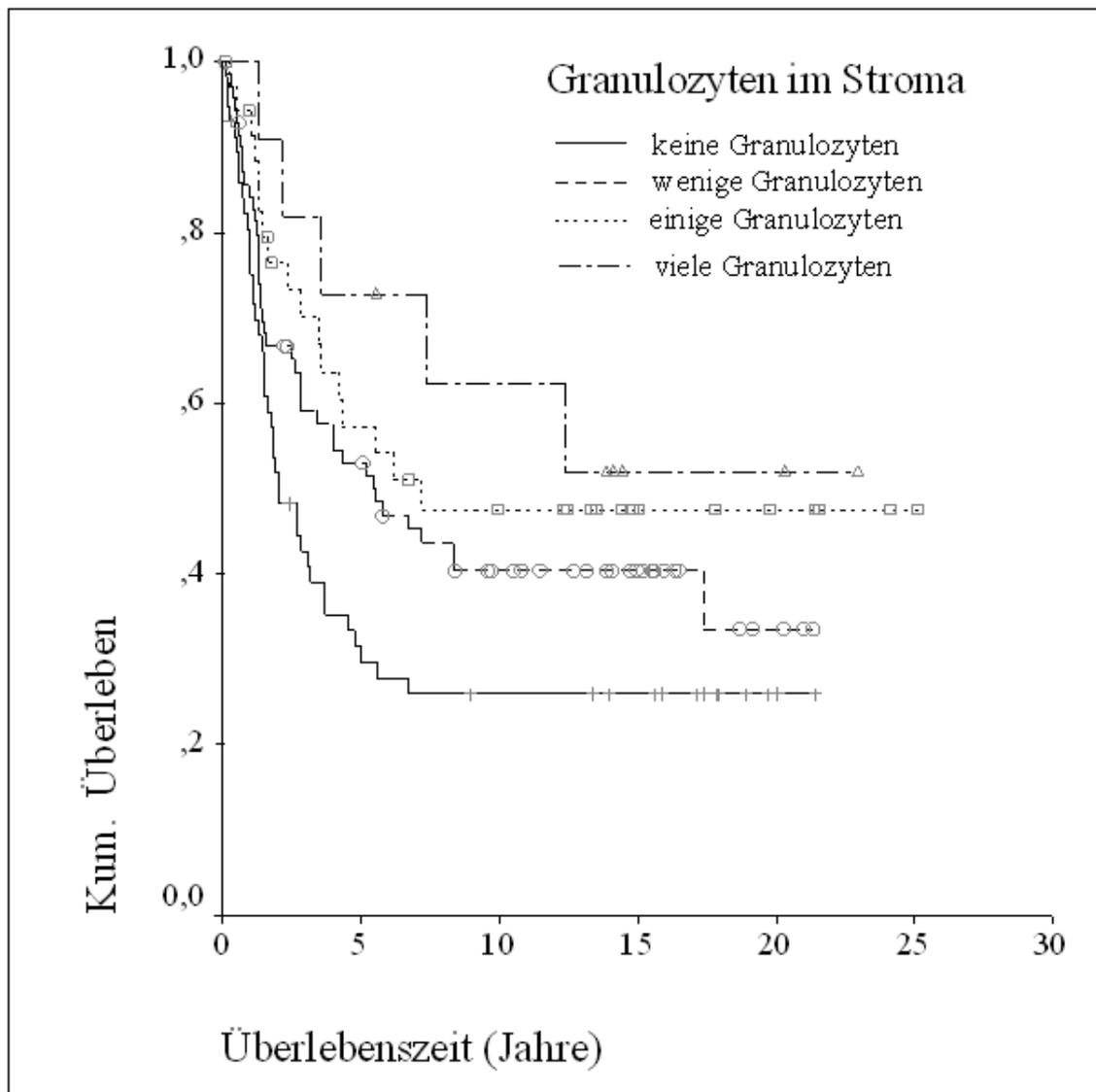


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse, Einfluss der Granulozyten im Stroma im GK. (Log rank= 9,022, df= 3, p=0,029).

5 Diskussion

Die Analyse der 175 Ovarialkarzinomfälle zeigte eindeutig, dass die G-CSF-Expression in Eierstockkrebszellen und in ihrem umgebenden Stroma keinen negativen prognostischen Faktor darstellt. Dies steht im Gegensatz zu vielen Fallbeispielen aus anderen Tumorentitäten.

Nur die Anzahl der Granulozyten im Tumorstroma hat einen gewissen Einfluss auf das Gesamtüberleben, der jedoch nicht in einer stabilen multifaktoriellen Analyse nachweisbar ist. Bis heute gibt es keine großen Kohorten-Studien über die Rolle von G-CSF bei malignen Tumoren.

Diese Studie kann keine Antwort auf die Frage geben, ob die therapeutische Gabe von G-CSF die Prognose von Patienten verschlechtern kann. Es wurde in einer In-vitro-Untersuchung gezeigt, dass CSF das Tumorwachstum fördern kann (Obermueller et al. 2004).

Die diagnostischen Kriterien für einen G-CSF-produzierenden Tumor (Asano et al. 1977, Joshita et al. 2009) sind folgende:

- extreme Leukozytose
- erhöhte G-CSF-Aktivität
- Abfall der Leukozyten nach Tumorresektion oder Nachweis von G-CSF-Produktion im Tumor.

Die Immunhistochemie ist eine zuverlässige Methode zum Nachweis der G-CSF-Produktion im Tumorgewebe (Shimamura et al. 1990).

Es wurde festgestellt, dass G-CSF das Wachstum von nicht-hämatopoetischen malignen Zelllinien *in vivo* stimulieren kann (Segawa et al. 1991). Weiterhin gilt G-CSF als ein wichtiger autokriner Wachstumsfaktor bei schneller Tumorproliferation und Metastasierung (Miyagawa et al. 1990, Baba et al. 1995, Tachibana et al. 1995).

Außerdem kann der exogene G-CSF die Proliferation von nicht-hämatopoetischen Tumorzellen induzieren (López-Marure et al. 1998).

Die Prognose von G-CSF-produzierenden Tumoren gilt allgemein als schlecht (Higaki et al. 2001). Über G-CSF-produzierendes Pankreaskarzinom wurde selten berichtet (Joshita et al. 2009). Die Prognose war überwiegend schlecht.

Die vorhergehende Untersuchung erhält ihre Bedeutung auch dadurch, dass rekombinanter G-CSF für die Behandlung und Prävention bei chemotherapiebedingter febriler Neutropenie eingesetzt wird.

Prinzipiell ist diese Sorge, dass die therapeutische Gabe von G-CSF die Prognose von Patienten verschlechtern kann, gerechtfertigt, da eine Studie über Kopf- und Halstumore zeigte, dass rekombinantes Erythropoietin die Prognose beeinträchtigen kann, wenn Krebszellen Erythropoietin-Rezeptoren exprimieren (Henke et al. 2006.). Solange keine eindeutigen Daten vorliegen, sollte die Gabe von Erythropoietin als ultima ratio gesehen werden (Arcasoy 2008, Sinclair et al. 2007). GM-CSF hingegen kann interessanterweise auch positive Einflüsse auf den Verlauf von Eierstock- und Prostatakrebs haben (Kurbacher et al. 2005, Rini et al. 2003, Rini et al. 2006, Small et al. 1999). Allerdings gibt es erhebliche Unterschiede zwischen G-CSF und GM-CSF, die sich sowohl auf die differentielle Stimulation von hämatologischen Vorläuferzellen als auch auf die therapeutischen Wirkungen beziehen.

Obwohl die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht auf andere Tumorentitäten übertragbar sind und durch die Tatsache beeinträchtigt werden, dass die heutigen chemotherapeutischen Regimes sich von den in dieser Studie verwendeten unterscheiden, wird hier davon ausgegangen, dass die negativen prognostischen Wirkungen der G-CSF-Expression in Tumoren in den zahlreichen veröffentlichten Fallberichten einen potenziellen Publikationsbias der Extreme darstellen.

5.1 Rollen des G-CSF in Tumoren

Matsumoto berichtet 2010 über 4 Cervixkarzinomfälle. Bei der Erstdiagnose zeigten alle vier Patienten eine klare Leukozytose ohne offensichtliche Anzeichen einer Infektion. Trotz aggressiver Behandlung hatten alle diese Patienten innerhalb von 6 Monaten Rezidive. In allen Fällen waren die Leukozyten als Antwort auf die erste Behandlung in den Normbereich gesunken und stiegen anschließend bei Rezidiven wieder an. Alle Patientinnen starben im Krankheitsverlauf in weniger als 15 Monaten.

Diese Fälle weisen stark auf die aggressive Natur des G-CSF-produzierenden Gebärmutterhalskrebses hin (Matsumoto et al. 2010).

Kawaguchi beschrieben 2010 einen Fall mit einem aggressiven Rezidiv von Magenkrebs als G-CSF-produzierenden Tumor. Sie schlugen vor, dass ein G-CSF-produzierender Tumor in Betracht gezogen werden sollte, wenn Leukozytose in Bezug auf einen nicht lympho- hämatopoetischen bösartigen Tumor festzustellen ist (Kawaguchi et al. 2010). Die ektopische Produktion von G-CSF konnte in Nierenbeckenkarzinom (Higaki et al. 2001), Larynx-Plattenepithelkarzinom (Tanaka et al. 2005), Blasenkarzinom (Tachibana et al. 1995) und Magenkarzinom (Saeki et al. 1990) nachgewiesen werden.

Takahashi et al. beschrieben den ersten Fall von G-CSF-produzierendem Rektalkarzinom mit einer sehr schlechten Prognose. Der Patient hatte eine ausgeprägte Leukozytose (Takahashi et al. 2008).

5.1.1 Die Rolle der CSF in der Krebstherapie

Der Nutzen einer GM-CSF-Gabe bei febriler Neutropenie wurde bewiesen.

In einer Phase-II-Studie in Bezug auf GM-CSF bei Frauen mit asymptomatischen rezidivierenden Müllerschen Tumoren wurde GM-CSF gut toleriert und war häufig mit einem Abfall des CA-125 verbunden, dies korreliert mit einer Leukozytose. Obwohl der Median der Zeitdauer bis zur Beendigung der Behandlung 78 Tage betrug, blieb bei einem Teil der Frauen die Erkrankung für längere Zeit stabil (Roche et al. 2010).

Zytokin- sezernierende Tumorzell-Impfungen lösen eine systemische tumor-spezifische Immunantwort in Maus-Tumor-Modellen aus (Dranoff et al. 1993). Impfstoffe mit GM-CSF-sezernierenden Zellen wurden in der Klinik bei Melanomen (Kusumoto et al. 2001), beim Pancreaskarzinom (Jaffee et al. 2001), beim nicht kleinzelligen Lungenkarzinom, beim Myelom, bei der Leukämie (Mach et al. 2000) und beim Prostatakarzinom (Lim et al. 1999) ausgetestet. Die Anti-Tumor-Wirksamkeit eines GM-CSF-sezernierenden Tumorzellen Impfstoff wird nicht durch Docetaxel Anwendung gehemmt (Prell et al. 2006).

5.1.2 Anwendung von G-CSF und Entstehung der Malignome

Der langfristige Einsatz von G-CSF wurde bei schwerer kongenitaler Neutropenie gut untersucht. Es wurde ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Entwicklung des myelodysplastischen Syndroms (MDS) und AML mit dem Einsatz von G-CSF für mehr als 8 bis 10 Jahre beobachtet (Rosenberg et al. 2006). Weiterhin hat sich ein Zusammenhang zwischen MDS / AML und schwerer aplastischer Anämie bei Patienten mit immunsuppressiver Behandlung mit G-CSF gezeigt (Socie et al. 2007).

Auch wurde eine erhöhte Inzidenz von MDS / AML bei Brustkrebspatientinnen, die mit einer adjuvanten Chemotherapie und gleichzeitiger Anwendung von G-CSF behandelt wurden, nachgewiesen (Hershman et al. 2007). Seltene Fälle von Leukämieknoten und Myelominfiltrationen an der Stelle einer G-CSF-Injektion wurden beschrieben (Kikuchi et al. 2002). In Einzelfällen wurde ebenfalls der Einsatz von G-CSF mit der schnellen Progression des multiplen Myeloms, der Transformation von aleukämischer Leukämie und Leukämie mit ausgeprägter Lymphadenopathie in ein diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (Richter-Syndrom) in Verbindung gebracht (Fata et al. 1997).

Vermutlich kann eine langfristige G-CSF-Exposition die Genominstabilität durch die Schaffung abnormer Genklone erleichtern (Sloand et al. 2006). (D'Souza et al. 2008).

5.2 Leukozyten in Tumorstroma

Die Tumor-Mikroumgebung ist sehr wichtig in Hinblick auf die Erhaltung und Förderung der Tumorentwicklung. Ein entzündliches Milieu aus Immunzellen und deren sekretorische Produkte kann eine Tumorprogression fördern (Rao et al. 2012). Das Vorkommen von Leukozyten im Tumorstroma wurde mittlerweile ausführlich diskutiert. Die Leukozyten haben in allgemein sowohl ein antikarzinogenes und auch prokarzinogenes Effekt. Man unterscheidet hierbei zwischen Makrophagen, T-Zellen und Neutophilen.

In dieser Studie wurde das Vorkommen der Granulozyten im Tumorstroma bewertet. Diese konnte eine signifikante positive Wirkung auf die Überlebenschancen haben.

Die Höhe der tumorassoziierten Makrophagen hat einen negativen Effekt auf das Überleben bei Patienten mit Ovarialkarzinom, Mammakarzinom, Magenkarzinom, Blasenkrebs und orale Plattenepithelkarzinom (Zahng et al. 2012). Jedoch gibt es einige Ausnahmen wo die Höhe der tumorassoziierten Makrophagen mit erhöhtem Überleben in verschiedenen Tumoren zum Beispiel im Kolorekalkarzinom (Tan et. Al. 2005) und im nicht kleinzelligen Lungenkarzinom (Kawai et al. 2008) vereinbart.

Intratumorale Granulozyten haben unterschiedliche Effekte auf Tumorzellen. In einigen experimentellen Tumoren sind Granulozyten zytolytisch und können Tumorzellpopulationen beseitigen (Di Carlo et al. 2001), während intratumorale Granulozyten in anderen experimentellen Tumoren das Tumorwachstum möglicherweise durch direkte Förderung der Tumorigenese induzieren können (Welch et al. 1989).

Neutrophile informieren und formen die Immunreaktionen. Sie tragen zu der Reparatur des Gewebes sowie dessen Abbau bei, da Neutrophile spezifische Tötungsmechanismen verwenden (Nathan 2006).

Die Rolle von Neutrophilen in der Tumor-Mikroumgebung bleibt unklar. In einer an Mäusen durchgeführten Studie zeigte, dass in der Tumor-Mikroumgebung Neutrophile sowohl pro- als auch anti-karzinogene Wirkung haben. Die meisten Tumor-assoziierten Neutrophilen scheinen von einem protumorigenen Phänotyp zu sein, die zu Tumorwachstum und Immunsuppression beitragen (Fridlender et al. 2009)

An experimentellen Tumor-Modellen konnte gezeigt werden, dass Neutrophile zum Tumorwachstum, der Metastasierung und der Immunsuppression beitragen können, indem sie angiogene Faktoren produzieren (Tazzyman et al. 2009), durch die Erleichterung Extravasation der Tumorzelle (Liang et al. 2007), und durch die Unterdrückung der Zytokinssynthese von T-Lymphozyten (Müller et al. 2009).

Klinische Studien über Nierenkarzinom (Jensen et al. 2009), Melanom (Jensen et al 2012), Bronchialkarzinom (Bellocq et al. 1998), nicht kleinzelliges Lungenkarzinom (Ilie et al. 2012), Zervixkarzinom (Carus et al. 2013), hepatozelluläres Karzinom (Li et al. 2011), Kolorektales Krzinom (Rao et al. 2012) und Magenkarzinom (Liu et al. 2009)

deuten auf die Existenz eines Zusammenhangs zwischen Zunahme der Tumordinfiltration mit Neutrophilen und schlechter Prognose hin.

Makrophagen in der Tumor-Mikroumgebung erleichtern Angiogenese und extrazellulären Matrix-Abbau und Umbau. Sie fördern die Motilität der Tumorzelle. Studien zeigten, dass die direkte Kommunikation zwischen Makrophagen und Tumorzellen zur Invasion und zum Austritt von Tumorzellen in die Blutgefäße (intravasation) führen kann (Condeelis et al. 2006).

Um die Sicherheit einer G-CSF Gabe zur Prävention oder Behandlung der Neutropenie herauszufinden, wären Langzeit-Follow-up und immunhistochemische Charakterisierung des Tumors zu empfehlen

Zusammenfassung

Hintergrund: Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) produzierende Tumoren wurden im Zusammenhang mit einer schlechten Prognose beobachtet. Leider basiert diese Feststellung nur auf mehreren Fallberichten. Daher wurde die Untersuchung der Expression von G-CSF in Tumorzellen und Tumor Stroma in einem großen Kollektiv von ovarialkarzinomerkrankten Patientinnen mit Langzeit-Follow-up vorgenommen.

Methode: Tumorgewebe und klinische Datensätze von 175 Patienten mit histologisch gesichertem Ovarialkarzinom wurden auf G-CSF Expression in Tumorzellen und dem umgebenden Stroma analysiert. Die Ergebnisse wurden mit dem peripheren Blutbild und anderen prognostischen Faktoren beim Ovarialkarzinom verglichen.

Ergebnisse: Es konnte weder eine Korrelation zwischen den beiden G-CSF Expressionen in Tumorzellen und umgebendem Stroma noch hinsichtlich der Prognose oder peripherem Blutbild gefunden werden. Man fand nur einen positiven Einfluss von Granulozyten in dem Tumor-Stroma auf die Prognose, die sich jedoch in multifaktoriellen Analysen nicht als signifikant erwies.

Schlussfolgerungen: Im Gegensatz zu den vielen Fallberichten aus anderen Disziplinen, stellt die G-CSF Expression in Tumorzellen und dem umgebenden Stroma keinen nachteiligen prognostischen Faktor beim Ovarialkarzinom dar. Um die Sicherheit einer G-CSF Gabe zur Prävention oder Behandlung der Neutropenie herauszufinden, wären Langzeit-Follow-up und immunhistochemische Charakterisierung des Tumors zu empfehlen.

summary

Objective: Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) producing tumours were found associated with poor prognosis. Unfortunately, this finding is based on several case reports only. Thus, the study of the expression of G-CSF in tumour cells and tumour stroma was performed in a large collective of patients with ovarian cancer with long-term follow-up.

Methods: Tissue and clinical records of 175 patients with histologically confirmed ovarian carcinoma were analysed for G-CSF expression in tumour cells and the surrounding stroma. The results were compared with peripheral blood counts and other prognostic factors in ovarian cancer.

Results: No correlation was found between both G-CSF expression in tumour cells and the surrounding stroma and prognosis as well as peripheral blood counts. It was only found, that granulocytes in the tumour have a positive influence on prognosis, which however, was not significant in multifactorial analyses.

Conclusions: In contrast to the many case reports from other entities, G-CSF expression in tumour cells and the surrounding stroma is not an adverse prognostic factor in ovarian carcinomas. To find out the safety of G-CSF administration for the prevention or treatment of febrile neutropenia, it is suggested for clinical trials to include long-term follow-up and immunohistochemical characterisation of the tumour.

7 Abkürzungsverzeichnis

AGO	Arbeitsgemeinschaft G ynäkologische O nkologie e.V.
AML	A kute m yeloische L eukämie
APAAP	A lkalische P hosphatase a ntialkalische P hosphatase
AUC	A rea u nder the C urve
BMI	B ody m ass i ndex
BRCA 1 und BRCA 2	B reast c ancer a ntigen 1 und 2
CD	C luster of d ifferentiation
CSF	C olony stimulating f actor
DGGG	D eutsche G esellschaft für G ynäkologie und G eburtshilfe e.V.
FIGO	F édération I nternational de G ynecologiste et O bstetricians
G-CSF	G ranulozyten- C olony stimulating f actor
GK	G iessener- O varialkarzinom- K ollektiv
GM-CSF	G ranulozyten- M akrophagen- C olony stimulating f actor
GR	G rades of R ecommendation
H&E	H ämatoxylin- E osin Färbung
HT	H ormontherapie
ICAM	I ntercellular a dhesion m olecule
IFN γ	G amma- I nterferon
IRS	I mmunreaktive S core
JAK	J anuskinas
KRAS	v - Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
M-CSF	M akrophagen- C olony stimulating f actor
MDS	M yelodysplastisches S yndrom
n.s.	n icht s ignifikant
RT	R aum T emperatur
RH	R elative H azard
PP	P rozensatz der p ositiven Zellen
SI	S taining I ntensity (Färbeintensität)
STAT	S ignal T ransducer und A ktivator der T ranskription

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Alterspezifische Ovarialkarzinomerkrankungsraten in Deutschland für 1980, 1990, 2006	2
Abbildung 2: Die JAK-STAT Signale in einer Krebszelle	8
Abbildung 3: Änderung der JAK-STAT Signale bei therapieresistenten Krebszellen	9
Abbildung 4: Verteilung der FIGO-Stadien	19
Abbildung 5: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse, Einfluss des FIGO-Stadiums im GK	20
Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung des Alters der Patientinnen bei Diagnosestellung	21
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse, Einfluss des Aszites im GK	22
Abbildung 8: Verteilung der histologischen Subtypen	23
Abbildung 9: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse, Einfluss des Tumorrestes im GK	24
Abbildung 10: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse, Einfluss des histologischen Differenzierungsgrades im GK	25
Abbildung 11: Verteilung der G-CSF-Expression im Tumor	26
Abbildung 12: Verteilung nach Remmele-Score des G-CSF im Tumor	27
Abbildung 13: Verteilung der G-CSF-Expression im Stroma	28
Abbildung 14: Beispiel von zwei positiv G-CSF-gefärbten Tumorabschnitten	29
Abbildung 15: Verteilung der Granulozyten-Expression im Stroma	30
Abbildung 16: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse, Einfluss der G-CSF-Expression im Tumor im GK	36
Abbildung 17: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse, Einfluss der G-CSF-Expression im Stroma im GK	37
Abbildung 18: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse, Einfluss der Granulozyten im Stroma im GK.	38

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Remmele-Score ($IRS = SI \times PP$)	17
Tabelle 2:	Korrelationen von G-CSF und Granulozyten in Tumor und Stroma mit histologischen und biologischen Faktoren	31
Tabelle 3:	Korrelationen zwischen der G-CSF-Expression im Tumor und histologischen und biologischen Faktoren	32
Tabelle 4:	Korrelation zwischen der G-CSF-Expression im Stroma und der Kapillarisation (CD-31)	33
Tabelle 5:	Korrelationen zwischen der Anzahl der Granulozyten im Stroma und histologischen und biologischen Faktoren	33
Tabelle 6:	Korrelationen zwischen der G-CSF-Expression in den Tumorzellen und hämatologischen Parametern vor der Operation	34
Tabelle 7:	Korrelationen zwischen der G-CSF-Expression im Stroma und hämatologischen Parametern vor der Operation.	34
Tabelle 8:	Korrelationen zwischen der Anzahl der Granulozyten im Stroma und hämatologischen Parametern vor der Operation	34

10 Literaturverzeichnis

Allen DG, Heintz APM, Touw FWMM. A meta-analysis of residual disease and survival in stage III and IV carcinoma on the ovary. *Eur J Gynaecol Oncol* 1995; 16(5):349-356.

Arcasoy MO. Erythropoiesis-stimulating agent use in cancer: preclinical and clinical perspectives. *Clin Cancer Res* 2008; 14(15):4685–4690.

Asano S, Urabe A, Okabe T, Sato N, Kondo Y. Demonstration of granulopoietic factor(s) in the plasma of nude mice transplanted with a human lung cancer and in the tumor tissue. *Blood* 1977; 49(5):845-852.

Baak JP, Chan KK, Stolk JG, Kenemans P. Prognostic factors in borderline and invasive ovarian tumors of the common epithelial type. *Pathol Res Pract* 1987; 182(6):755-774.

Baba M, Hasegawa H, Nakayabu M, Shimizu N, Suzuki S, Kamada N, Tani K. Establishment and characteristics of a gastric cancer cell line (HuGC-OOHIRA) producing high levels of G-CSF, GM-CSF, and IL-6: the presence of autocrine growth control by G-CSF. *Am J Hematol* 1995; 49:207-215

Bellocq A, Antoine M, Flahault A, et al. Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome. *Am J Pathol* 1998; 152:83-92.

Beral V. Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the million women study. *Lancet* 2007; 369(9574):1703-1710.

Bonadona V, Bonaïti B, Olschwang S, Grandjouan S, Huiart L, Longy M, Guimbaud R, Buecher B, Bignon YJ, Caron O, Colas C, Noguès C, Lejeune-Dumoulin S, Olivier-Faivre L, Polycarpe-Osaer F, Nguyen TD, Desseigne F, Saurin JC, Berthet P, Leroux D, Duffour J, Manouvrier S, Frébourg T, Sobol H, Lasset C, Bonaïti-Pellié C; French

Cancer Genetics Network. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA* 2011; 305(22):2304-2310.

Bradley TR, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1966; 44(3):287-299.

Brandstetter T, Ninci E, Bettendorf H, Perewusnyk G, Stolte J, Herchenbach D, Sellin D, Wagner E, Koöchli OR, Bauknecht T. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor gene expression of ovarian carcinoma does not correlate with G-CSF caused cell proliferation. *Cancer* 2001; 91(7):1372–1383.

Braun B, Lange M, Oeckler R, Mueller MM. Expression of G-CSF and GM-CSF in human meningiomas correlate with increased tumor proliferation and vascularization. *J Neurooncol* 2004; 68(2):131–140.

Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 2002; 20(5):1248-1259.

Carlson JW, Miron A, Jarboe EA, Parast MM, Hirsch MS, Lee Y, Muto MG, Kindelberger D, Crum CP. Serous tubal intraepithelial carcinoma: its potential role in primary peritoneal serous carcinoma and serous cancer prevention. *J Clin Oncol* 2008; 26(25):4160-4165.

Carus A, Ladekarl M, Hager H, Nedergaard BS, Donskov F. Tumour-associated CD66b+ neutrophil count is an independent prognostic factor for recurrence in localised cervical cancer. *Br J Cancer* 2013; 108(10):2116-2122.

Casagrande JT, Louie EW, Pike MC, Roy S, Ross RK, Henderson BE. "Incessant ovulation" and ovarian cancer. *Lancet*. 1979; 2(8135):170-173.

Chabner, Bruce, Lynch. *Harrison's Manual of Oncology*. McGraw-Hill Professional; Auflage: 1 (2007).

Clark OA, Lyman GH, Castro AA, Clark LG, Djulbegovic B. Colony-stimulating factors for chemotherapy-induced febrile neutropenia: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Clin Oncol* 2005; 23(18):4198–4214.

Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006; 124(2):263-266.

Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren, AWMF 032/035 (S2k), Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. Leitlinien, Empfehlungen, Stellungnahmen. Stand August 2010. http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-035l-abgelaufen.pdf.

Diagnostik und Therapie von Patientin mit primärem und metastasiertem Brustkrebs (2013).

http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2013_02_Februar/pdfs_D/2013D%2005_Prognostische%20und%20pra%CC%88diktive%20Faktoren.pdf.

Di Carlo E, Forni G, Lollini P, Colombo MP, Modesti A, Musiani P. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood* 2001; 97(2):339-345.

Domchek SM, Rebbeck TR. Prophylactic oophorectomy in women at increased cancer risk. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2007; 19(1):27-30.

Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, Mulligan RC. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(8):3539–3543

D'Souza A, Jaiyesimi I, Trainor L, Venuturumili P. Granulocyte colony-stimulating factor administration: adverse events. *Transfus Med Rev.* 2008; 22(4):280-290.

Eisenkop SM, Friedman RL, Wang HJ. Complete cytoreductive surgery is feasible and maximizes survival in patients with advanced epithelial ovarian cancer: a prospective study. *Gynecol Oncol* 1998; 69(2):103-108

Elattar A, Bryant A, Winter-Roach BA, Hatem M, Naik R. Optimal primary surgical treatment for advanced epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011; (8):CD007565.

Enomoto T, Kuragaki C, Yamasaki M. Is clear cell carcinoma and mucinous carcinoma of the ovary sensitive to combination chemotherapy with paclitaxel and carboplatin? *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003; 22(1797):447.

Fata F, Myers P, Addeo J, Nawabi I. Acceleration of leukaemia with granulocyte colony-stimulating factor in a patient with aleukaemic leukaemia. *Br J Hosp Med* 1997;58(2-3):111-112.

Fathalla MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971; 2(7716):163.

FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet*. 2006; 95 Suppl 1:S1-257.

Finch A, Beiner M, Lubinski J, Lynch HT, Moller P, Rosen B, Murphy J, Ghadirian P, Friedman E, Foulkes WD, Kim-Sing C, Wagner T, Tung N, Couch F, Stoppa-Lyonnet D, Ainsworth P, Daly M, Pasini B, Gershoni-Baruch R, Eng C, Olopade OI, McLennan J, Karlan B, Weitzel J, Sun P, Narod SA; Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group. Salpingo-oophorectomy and the risk of ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancers in women with a BRCA1 or BRCA2 Mutation. *JAMA* 2006; 296(2):185-92.

Franke FE, von Georgi R, Zygmunt M, Münstedt K. Association between fibronectin expression and prognosis in ovarian carcinoma. *Anticancer Res* 2003; 23(5b):4261–4267.

Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, Worthen GS, Albelda SM. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 2009; 16(3):183-194.

Gronlund B, Høgdall C, Hansen HH, Engelholm SA. Performance status rather than age is the key prognostic factor in second-line treatment of elderly patients with epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 2002; 94(7):1961-1967.

Hankinson SE, Hunter DJ, Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Rosner B, Hennekens CH, Speizer FE. Tubal ligation, hysterectomy, and risk of ovarian cancer. A prospective study. *JAMA* 1993; 270 (23): 2813-2818.

Hayashi T, Mizuki A, Yamaguchi T, Hasegawa T, Kunihiro T, Tsukada N, Matsuoka K, Orihara H, Yamazaki K. Primary adenosquamous carcinoma of the liver which produces granulocyte-colony-stimulating factor and parathyroid hormone related protein: association with leukocytosis and hypercalcemia. *Intern Med* 2001; 40(7):631-634.

Heintz APM, Hacker NF, Berek JS, Rose TP, Munoz AK, Lagasse LD. Cytoreductive surgery in ovarian carcinoma: feasibility and morbidity. *Obstet Gynecol* 1986; 67(6):783-788.

Henke M, Mattern D, Pepe M, Bezay C, Weissenberger C, Werner M, Pajonk F. Do erythropoietin receptors on cancer cells explain unexpected clinical findings? *J Clin Oncol* 2006; 24(29):4708-4713.

Hershman D, Neugut AI, Jacobson JS, Wang J, Tsai WY, McBride R, Bennett CL, Grann VR. Acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome following use of granulocyte colony-stimulating factors during breast cancer adjuvant chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99(3):196-205.

Hess V, A'Hern RP, Gore R. UK. Relative platinum-resistance of mucinous carcinoma of the ovary. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003; 22(1796):447.

Higaki I, Hirohashi K, Fukushima S, Wanibuchi H, Seike N, Yamane T, Kubo S, Tanaka H, Shuto T, Yamamoto T, Kinoshita H. Renal pelvic carcinoma producing granulocyte colony-stimulating factor: report of a case. *Surg Today* 2001; 31(3):266-268.

Hoskins WJ, Bundy BN, Thigpen JT, Omura GA. The influence of cytoreductive surgery on recurrence-free interval and survival in small-volume stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 1992; 47(2):159-166.

van Houwelingen JC, ten Bokkel Huinink WW, van der Burg ME, van Oosterom AT, Neijt JP. Predictability of the survival of patients with advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1989; 7(6):769-773.

Ibeanu OA, Bristow RE. Predicting the outcome of cytoreductive surgery for advanced ovarian cancer: a review. *Int J Gynecol Cancer* 2010; 20 Suppl 1:1-11.

Ilie M, Hofman V, Ortholan C, Bonnetaud C, Coëlle C, Mouroux J, Hofman P. Predictive clinical outcome of the intratumoral CD66b-positive neutrophil-to-CD8-positive T-cell ratio in patients with resectable nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2012; 118(6):1726-1737.

Irish JM, Kotecha N, Nolan GP. Mapping normal and cancer cell signaling networks: towards single-cell proteomics. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(2):146-155.

Jaffee EM, Hruban RH, Biedrzycki B, Laheru D, Schepers K, Sauter PR, Goemann M, Coleman J, Grochow L, Donehower RC, Lillemoe KD, O'Reilly S, Abrams RA, Pardoll DM, Cameron JL, Yeo CJ. Novel allogeneic granulocytemacrophage colony-stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic cancer: a phase I trial of safety and immune activation. *J Clin Oncol* 2001; 19(1):145-156.

Jensen HK, Donskov F, Marcussen N, Nordmark M, Lundbeck F, von der Maase H. Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2009; 27(28):4709-17.

Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, Donskov F, Høyer M, Sjoegren P, Christensen IJ, Steiniche T. Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer* 2012; 118(9):2476-2485.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58(2):71-96.

John EM, Whittemore AS, Harris R, Itnyre J. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of seven U.S. case-control studies. Epithelial ovarian cancer in black women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(2):142-147.

Joshita S, Nakazawa K, Sugiyama Y, Kamijo A, Matsubayashi K, Miyabayashi H, Furuta K, Kitano K, Kawa S. Granulocyte-colony stimulating factor-producing pancreatic adenosquamous carcinoma showing aggressive clinical course. *Intern Med* 2009; 48(9):687-691

Kaira K, Ishizuka T, Tanaka H, Tanaka Y, Yanagitani N, Sunaga N, Hisada T, Ishizuka T, Mori M. Lung cancer producing granulocyte colony-stimulating factor and rapid spreading to peritoneal cavity. *J Thorac Oncol* 2008; 3(9):1054–1055.

Kasuga I, Makino S, Kiyokawa H, Katoh H, Ebihara Y, Ohyashiki K. Tumor-related leukocytosis is linked with poor prognosis in patients with lung carcinoma. *Cancer* 2001; 92(9):2399–2405.

Kawai O, Ishii G, Kubota K, Murata Y, Naito Y, Mizuno T, Aokage K, Saijo N, Nishiwaki Y, Gemma A, Kudoh S, Ochiai A. Predominant infiltration of macrophages and CD8(+) T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2008; 113(6):1387-1395.

Kikuchi M, Inagaki T, Ueda R. A case of multiple myeloma with infiltration into skeletal muscle after injections of a granulocyte-colony stimulating-factor. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi* 2002;39(4):433-438.

Kobashi Y, Okimoto N, Sakamoto K. Squamous cell carcinoma of the lung producing granulocyte colony-stimulating factor and resembling a malignant pleural mesothelioma. *Intern Med* 2004; 43(2):111–116.

Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg); Berlin (2010).

http://edoc.rki.de/documents/rki_fv/re2vZ21t28Ir8Y/PDF/22aJOdYnmXV0I.pdf

Krebs in Deutschland 2007/2008. Häufigkeiten und Trends. 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg); Berlin (2012).

http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2012.pdf?__blob=publicationFile

Kurbacher CM, Kurbacher JA, Cramer EM, Rhiem K, Mallman PK, Reichelt R, Reinhold U, Stier U, Cree IA. Continuous low-dose GM-CSF as salvage therapy in refractory recurrent breast or female genital tract carcinoma. *Oncology (Williston Park)* 2005; 19(4 Suppl 2):23–26.

Kusumoto M, Umeda S, Ikubo A, Aoki Y, Tawfik O, Oben R, Williamson S, Jewell W, Suzuki T. Phase 1 clinical trial of irradiated autologous melanoma cells adenovirally transduced with human GM-CSF gene. *Cancer Immunol Immunother* 2001; 50(7):373–381.

Li YW, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Gao Q, Xiao YS, Xu YF. Intratumoral neutrophils: a poor prognostic factor for hepatocellular carcinoma following resection. *J Hepatol* 2011; 54(3):497-505.

Liang S, Sharma A, Peng HH, Robertson G, Dong C. Targeting mutant (V600E) B-Raf in melanoma interrupts immunoediting of leukocyte functions and melanoma extravasation. *Cancer Res* 2007; 67(12):5814-5820.

Lieschke GJ, Burgess AW. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (1). *N Engl J Med* 1992; 327(1):28-35.

Lieschke GJ, Burgess AW. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (2). *N Engl J Med* 1992;327(2):99-106.

Lim M, Simons JW. Emerging concepts in GM-CSF gene-transduced tumor vaccines for human prostate cancer. *Curr Opin Mol Ther* 1999; 1(1):64–71.

Liu H, Ubukata H, Tabuchi T, Takemura A, Motohashi G, Nishimura M, Satani T, Hong J, Katano M, Nakada I, Saniabadi AR, Tabuchi T. It is possible that tumour-infiltrating granulocytes promote tumour progression. *Oncol Rep* 2009; 22(1):29-33.

López-Marure R, Hernández-Montes J, Sánchez-Sánchez L, Weiss-Steider B. Hematopoietic growth factors induce proliferation of non-hematopoietic tumor cells. *Rev Invest Clin* 1998; 50(5):413-8

Mach N, Dranoff G. Cytokine-secreting tumor cell vaccines. *Curr Opin Immunol* 2000; 12(5):571–575.

Makar AP, Baekelandt M, Tropé CG, Kristensen GB. The prognostic significance of residual disease, FIGO substage, tumor histology, and grade in patients with FIGO stage III ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1995; 56(2):175-180.

McShane LM, Hayes DF. Publication of tumor marker research results: the necessity for complete and transparent reporting. *J Clin Oncol* 2012; 30(34):4223-4232.

Meindl A, Ditsch N, Kast K, Rhiem K, Schmutzler RK. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes, new treatments, new concepts. *Dtsch Arztebl Int* 2011; 108(19):323-330.

Miyagawa K, Chiba S, Shibuya K, Piao YF, Matsuki S, Yokota J, Terada M, Miyazono K, Takaku F. Frequent expression of receptors for granulocyte-macrophage colony-

stimulating factor on human nonhematopoietic tumor cell lines. *J Cell Physiol* 1990; 143(3):483-487.

Mink PJ; Sherman ME; Devesa SS. Incidence patterns of invasive and borderline ovarian tumors among white women and black women in the United States. Results from the SEER Program, 1978-1998. *Cancer* 2002; 95(11):2380-2389.

Mroczko B, Szmitkowski M. Hematopoietic cytokines as tumor markers. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42(12):1347-1354.

Müller I, Munder M, Kropf P, Hänsch GM. Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? *Trends Immunol* 2009; 30(11):522-530.

Münstedt K, Steen J, Knauf AG, Buch T, von Georgi R, Franke FE. Steroid hormone receptors and long-term survival in invasive ovarian cancer. *Cancer* 2000; 89(8):1783-1791.

Münstedt K, von Georgi R, Franke FE. Correlation between MIB1-determined tumor growth fraction and incidence of tumor recurrence in early ovarian carcinomas. *Cancer Invest* 2004; 22(2):185-194.

Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(3):173-182.

Neijt JP, ten Bokkel Huinink WW, van der Burg ME, van Oosterom AT, Willemse PH, Vermorken JB, van Lindert AC, Heintz AP, Aartsen E, van Lent M, et al. Long-term survival in ovarian cancer. Mature data from The Netherlands Joint Study Group for Ovarian Cancer. *Eur J Cancer* 1991; 27(11):1367-1372.

Ninck S, Reisser C, Dyckhoff G, Helmke B, Bauer H, Herold-Mende C. Expression profiles of angiogenic growth factors in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 2003; 106(1):34-44.

Ninci EB, Brandstetter T, Meinhold-Heerlein I, Bettendorf H, Sellin D, Bauknecht T. G-CSF receptor expression in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2000; 10(1):19–26.

Nguyen HN, Averette HE, Hoskins W, Sevin B., Penalver M, Steren A. National survey of ovarian carcinoma.VI. Critical assessment of current International Federation of Gynecology and Obstetrics staging system. *Cancer* 1993; 72(10):3007-3011.

Obermueller E, Vosseler S, Fusenig NE, Mueller MM. Cooperative autocrine and paracrine functions of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colonystimulating factor in the progression of skin carcinoma cells. *Cancer Res* 2004; 64(21):7801–7812.

Ohmi C, Matsuyama H, Tei Y, Yoshihiro S, Shimabukuro T, Ohmoto Y, Naito K. Granulocyte colony-stimulating factor may promote proliferation of human bladder cancer cells mediated by basic fibroblast growth factor. *Scand J Urol Nephrol* 2003; 37(4):286–291.

Omura GA, Brady MF, Homesley HD, Yordan E, Major FJ, Buchsbaum HJ, Park RC. Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: the Gynecologic Oncology Group experience. *J Clin Oncol* 1991; 9(7):1138-1150.

Parissis J, Filippatos G, Adamopoulos S, Li X, Kremastinos DT, Uhal BD. Hematopoietic colony stimulating factors in cardiovascular and pulmonary remodeling: promoters or inhibitors? *Curr Pharm Des* 2006; 12(21):2689–2699.

Pecorelli S, Odicino F, Maisonneuve P et al. Carcinoma of the ovary. Annual report on the results of treatment in gynaecological cancer. *J Epidemiol Biostat* 1998; 3:75-102.

Prell RA, Gearin L, Simmons A, Vanroey M, Jooss K. The anti-tumor efficacy of a GM-CSF-secreting tumor cell vaccine is not inhibited by docetaxel administration. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55(10):1285-1293.

Ramus SJ, Gayther SA. The contribution of BRCA1 and BRCA2 to ovarian cancer. *Mol Oncol* 2009; 3(2):138-150

Rao HL, Chen JW, Li M, Xiao YB, Fu J, Zeng YX, Cai MY, Xie D. Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis. *PLoS One* 2012; 7(1):e30806.

Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologie* 1987; 8(3):138-140.

Rini BI, Weinberg V, Bok R, Small EJ. Prostate-specific antigen kinetics as a measure of the biologic effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with serologic progression of prostate cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21(1):99-105.

Rini BI, Fong L, Weinberg V, Kavanaugh B, Small EJ. Clinical and immunological characteristics of patients with serologic progression of prostate cancer achieving long-term disease control with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Urol* 2006; 175(6):2087-2091.

Robinson WA. Granulocytosis in neoplasia. *Ann N Y Acad Sci* 1974; 230:212-218.

Rosenberg PS, Alter BP, Bolyard AA, Bonilla MA, Boxer LA, Cham B, Fier C, Freedman M, Kannourakis G, Kinsey S, Schwinger B, Zeidler C, Welte K, Dale DC; Severe Chronic Neutropenia International Registry. The incidence of leukemia and mortality from sepsis in patients with severe congenital neutropenia receiving long-term G-CSF therapy. *Blood* 2006; 107(12):4628-4635.

Russell P, Farnsworth A. *Surgical pathology of the ovaries*, 2nd edn. Churchill Livingstone; London (1997).

S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren (2013). <http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/ovar/S3-Ovarialkarzinom-OL-Langversion.pdf>.

Saeki T, Saeki S, Yokoyama H, Fukuda T, Sato R, Morooka C, Inoue S, Uesaka Y. A case of colony stimulating factor (CSF) producing gastric carcinoma. *Gan No Rinsho* 1990; 36(14):2469-2474.

Scharf A, Günter HH, Sohn S. Screening auf Ovarialkarzinom. *Der Gynäkologe* 2002; 35:537-547.

Schneider J, Centeno M, Jimenez E, Rodriguez-Escudero FJ, Romero H. Correlation of MDR1 expression and oncogenic activation in human epithelial ovarian carcinoma. *Anticancer Res* 1997; 17(3C):2147-2151.

Segawa K, Ueno Y, Kataoka T. In vivo tumor growth enhancement by granulocyte colony-stimulating factor. *Jpn J Cancer Res* 1991; 82(4):440-447.

Shimamura K, Fujimoto J, Hata J, Akatsuka A, Ueyama Y, Watanabe T, Tamaoki N. Establishment of specific monoclonal antibodies against recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) and their application for immunoperoxidase staining of paraffin-embedded sections. *J Histochem Cytochem* 1990; 38(2):283-286.

Sinclair AM, Todd MD, Forsythe K, Knox SJ, Elliott S, Begley CG. Expression and function of erythropoietin receptors in tumors: implications for the use of erythropoiesis-stimulating agents in cancer patients. *Cancer* 2007; 110(3):477-488.

Sloand EM, Yong AS, Ramkissoon S, Solomou E, Bruno TC, Kim S, Fuhrer M, Kajigaya S, Barrett AJ, Young NS. Granulocyte colony-stimulating factor preferentially stimulates proliferation of monosomy 7 cells bearing the isoform IV receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(39):14483-14488.

Small EJ, Reese DM, Um B, Whisenant S, Dixon SC, Figg WD. Therapy of advanced prostate cancer with granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res* 1999; 5(7):1738-1744.

Socie G, Mary JY, Schrezenmeier H, Marsh J, Bacigalupo A, Locasciulli A, Fuehrer M, Bekassy A, Tichelli A, Passweg J. Granulocyte-stimulating factor and severe aplastic anemia: a survey by the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood* 2007; 109(7):2794-2796.

Sohda T, Shiga H, Nakane H, Watanabe H, Takeshita M, Sakisaka S. Cholangiocellular carcinoma that produced both granulocyte-colony-stimulating factor and parathyroid hormone-related protein. *Int J Clin Oncol* 2006; 11(3):246-249.

Sugiyama T, Kamura T, Kigawa J, Terakawa N, Kikuchi Y, Kita T, Suzuki M, Sato I, Taguchi K. Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer* 2000; 88(11):2584-2589.

Tachibana M, Miyakawa A, Tazaki H, Nakamura K, Kubo A, Hata J, Nishi T, Amano Y. Autocrine growth of transitional cell carcinoma of the bladder induced by granulocyte-colony stimulating factor. *Cancer Res* 1995; 55(15):3438-3443

Takahashi H, Yasuda A, Ochi N, Sakamoto M, Takayama S, Wakasugi T, Funahashi H, Sawai H, Satoh M, Akamo Y, Takeyama H. Granulocyte-colony stimulating factor producing rectal cancer. *World J Surg Oncol* 2008; 6:70.

Tamura K, Yoshinaga T, Tanino M, Kimura T, Yamada N, Nishimura M, Fukuda S, Nishihara H, Shindoh M, Tanaka S. Hypopharyngeal squamous cell carcinoma producing both granulocyte colony-stimulating factor and parathyroid hormone-related protein. *Pathol Int* 2008; 58(10):652-656.

Tan SY, Fan Y, Luo HS, Shen ZX, Guo Y, Zhao LJ. Prognostic significance of cell infiltrations of immunosurveillance in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11(8):1210-1214.

Tanaka K, Nibu K. Laryngeal squamous cell carcinoma with ectopic production of granulocyte colony-stimulating factor and parathyroid hormone-related protein. *Int J Clin Oncol* 2005; 10(3):195-197.

Tazzyman S, Lewis CE, Murdoch C. Neutrophils: key mediators of tumour angiogenesis. *Int J Exp Pathol* 2009; 90(3):222-231.

Thigpen T, Brady MF, Omura GA, Creasman WT, McGuire WP, Hoskins WJ, Williams S. Age as a prognostic factor in ovarian carcinoma. The Gynecologic Oncology Group experience. *Cancer* 1993; 71(2 Suppl):606-614.

Trope, C. Prognostic factors in ovarian cancer. *Cancer Treat Res* 1998; 95:287-352.

Uematsu T, Tsuchie K, Ukai K, Kimoto E, Funakawa T, Mizuno R. Granulocyte-colony stimulating factor produced by pancreatic carcinoma. *Int J Pancreatol* 1996; 19(2):135-139.

Ueno M, Ban S, Ohigashi T, Nakanoma T, Nonaka S, Hirata R, Iida M, Deguchi N. Simultaneous production of granulocyte colony-stimulating factor and parathyroid hormone-related protein in bladder cancer. *Int J Urol* 2000; 7(2):72-75.

Welch DR, Schissel DJ, Howrey RP, Aeed PA. Tumor-elicited polymorphonuclear cells, in contrast to "normal" circulating polymorphonuclear cells, stimulate invasive and metastatic potentials of rat mammary adenocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(15):5859-5863.

Whittemore AS, Harris R, Itnyre J. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am J Epidemiol* 1992; 136 (10):1184-1203.

Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, Constantinou V, Batsis I, Kaloyannidis P, Proya E, Anagnostopoulos A, Fassas A G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol* 2005; 33(1):108-119.

Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; 348(3):203–213.

Zhang QW, Liu L, Gong CY, Shi HS, Zeng YH, Wang XZ, Zhao YW, Wei YQ. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One* 2012; 7(12):e50946.

11 Publikationsverzeichnis:

1. Hackethal A, Koppan M, Eskef K, Tinneberg HR, Handheld articulating laparoscopic instruments driven by robotic technology. First clinical experience in gynecological surgery *Gynecological Surgery* 2012; 9(2):203-206.
2. Enzensberger C, Eskef K, Schwarze A, Faas D, Axt-Fliedner R. Course and Outcome of Pregnancy After Maternal Exposure to Angiotensin-II-Receptor Blockers - Case Report and Review of the Literature. *Ultraschall Med* 2012; 33(5):493-396.
3. Eskef K, Oehmke F, Tchartchian G, Muenstedt K, Tinneberg HR, Hackethal A. A new variable-view rigid endoscope evaluated in advanced gynecologic laparoscopy: a pilot study. *Surg Endosc* 2011; 25(10):3260-3265.
4. Hackethal A, Luck C, von Hobe AK, Eskef K, Oehmke F, Konrad L. A structured questionnaire improves preoperative assessment of endometriosis patients: a retrospective analysis and prospective trial. *Arch Gynecol Obstet* 2011; 284(5):1179-1188.
5. Hackethal A, Ionesi-Pasacica J, Eskef K, Oehmke F, Münstedt K, Tinneberg HR. Transvaginal NOTES with semi-rigid and rigid endoscopes that allow adjustable viewing angles. *Arch Gynecol Obstet* 2011; 283(1):131-132.
6. **Münstedt K, Hackethal A, Eskef K, Hrgovic I, Franke FE. Prognostic relevance of granulocyte colony-stimulating factor in ovarian carcinomas. *Arch Gynecol Obstet.* 2010; 282(3):301-305.**

12 Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Giessen, 20.08.2013

Kosai Eskef

13 Danksagung

Mein Dank gilt in besonderem Maße Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Hans-Rudolf Tinneberg und Herrn Prof. Dr. med. Karsten Münstedt, meinen akademischen und klinischen Lehrern, für ihre dauerhafte Förderung und wohlwollende Unterstützung. Jede Phase dieser Arbeit wurde von den beiden intensiv, professionell und warmherzig begleitet. Ihr kompetenter Rat und ihre Hilfe kamen mir in zahlreichen Angelegenheiten sehr zugute.

Weiterer Dank geht an alle aktuellen und ehemaligen Kollegen für die stets gute Zusammenarbeit und für die nette Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt hier Herrn PD Dr. med. Andreas Hackethal.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich an meine Frau, Dr. Yana Abdullah, richten, die immer zu meiner Seite steht. Ohne ihre Bemühung und Unterstützung hätte ich vieles nicht erreichen können. Ebenso danke ich meiner Freude im Leben, meinen Kindern Selena, Zena und Kariem.

Ein besonderer Dank gilt meinem Vater Essa, meiner Mutter Kamleh, meinem Schwiegervater Ghassan, meinen Geschwistern und dessen Familien.

Letztendlich geht ein ganz großer Dank an meine Heimatuniversität Aleppo und mein Heimatland Syrien.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

