

*„Angiogenese beim Ovarialkarzinom –
Die Expression von CD 31 und CD 143
und deren klinisch-pathologische und
prognostische Bedeutung“*

Inaugural-Dissertation

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

*vorgelegt von Thomas Buch
aus Bad Nauheim*

Gießen 2002

*Aus dem Medizinischen Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
des Universitätsklinikums Gießen*

Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. med. H. R. Tinneberg

1. Gutachter: PD Dr. med. Karsten Münstedt

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Klaus T. Preissner

Tag der Disputation: 8. Juli 2003

*Meinem Großvater Richard Großmann und
meinen Eltern Marion und Peter Buch*

In Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1	Angiogenese	7
1.1.1	Historischer Rückblick der Angiogenese-Forschung	7
1.1.2	Grundlagen der embryonalen Gefäßneubildung	9
1.1.3	Gefäßneubildung während der physiologischen Wundheilung ..	10
1.1.4	Tumorangiogenese.....	11
1.1.5	Metastasierung	13
1.1.6	Angiogenesefaktoren	16
1.1.7	Natürliche Angiogenese-Inhibitoren.....	16
1.1.8	Therapeutische Angiogenese-Inhibitoren	17
1.1.9	Literaturübersicht	18
1.1.10	Angiogenese als Prognosefaktor	19
	1.1.10.1 CD 31 (PECAM-1).....	19
	1.1.10.2 CD 143 (Angiotensin-Converting-Enzym).....	20
1.2	Das Ovarialkarzinom	22
1.2.1	Epidemiologie, Inzidenz und Mortalität	22
1.2.2	Ätiologie	22
1.2.3	Klinische Symptomatik	24
1.2.4	Histologische Klassifikation	25
	1.2.4.1 Maligne epitheliale Tumore	25
1.2.5	Diagnostik	26
1.2.6	Therapie	27
	1.2.6.1 Operative Therapie	27
	1.2.6.2 Chemotherapie	29
	1.2.6.3 Strahlentherapie	31
1.2.7	Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms	31
2	Fragestellung	32

3	Patientinnen, Material und Methoden	
3.1	Patientenkollektiv	33
3.2	Klinische und pathologische Kriterien	33
3.3	Histologie	34
3.4	Immunhistochemische Methode	34
3.4.1	Die APAAP-Methode	36
3.4.1.1	APAAP-Technik	36
3.4.1.2	Zusammensetzung der verwendeten Lösungen	37
3.4.1.3	Verwendete Primärantikörper	38
3.4.2	Auswertung der Immunhistochemie von CD 31	38
3.4.3	Auswertung der Immunhistochemie von CD 143	39
3.5	Statistik	40
4	Ergebnisse	
4.1	Patientenkollektiv, klinische und pathologische Daten	41
4.2	Häufigkeiten der exprimierten Angiogenesefaktoren CD 31 und CD 143	44
4.3	Tumorkapillarisation in Korrelation zu klinischen und pathologischen Faktoren	44
4.4	Einfluss der Tumorkapillarisation auf die Überlebenswahrscheinlichkeit am Gesamtkollektiv und innerhalb von Untergruppen der klinisch- pathologischen Faktoren	45
4.4.1	Einfluss der Tumorkapillarisation auf die Überlebens- wahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des FIGO-Stadiums	45
4.4.2	Einfluss der Tumorkapillarisation auf die Überlebens- wahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Aszitesbildung	47
4.4.3	Einfluss der Tumorkapillarisation auf die Überlebens- wahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des postoperativen Tumorrestes	49
4.4.4	Einfluss der Tumorkapillarisation auf die Überlebens- wahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Tumordifferenzierung	51
4.4.5	Einfluss der Tumorkapillarisation auf die Überlebens- wahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des Therapieerfolges	51

4.5	Klinisch-pathologische Einflussgrößen und Überlebenszeit am Gesamtkollektiv	53
4.6	Multivariate Residualanalyse des Einflusses der Tumorkapillarisation auf die Überlebenswahrscheinlichkeit bestimmter Patientengruppen	54
4.7	Histologische Abbildungen der Tumorschnitte mit exemplarischer Anfärbung von CD 31 und CD 143	58
5	Diskussion	59
6	Zusammenfassung	67
7	Anhang	68
8	Literaturverzeichnis	71
9	Danksagung	83
10	Lebenslauf	84

1 Einleitung

1.1 Angiogenese

1.1.1 Historischer Rückblick der Angiogenese-Forschung

Die Blutgefäße und das Phänomen der Gefäßbildung sind seit vielen Jahrhunderten Gegenstand medizinischer Forschung. In den Anfängen lag das Augenmerk auf der Anatomie und der Funktionsweise des Blutkreislaufes und erst im vergangenen Jahrhundert begannen Untersuchungen zur pathophysiologischen Bedeutung der Angiogenese.



Abbildung 1:
William Harvey,
geb. 1.4.1578, Mitglied
des Royal College of
Physicians, Leibarzt
Jacobs I. und Karls I.,
Professor für Anatomie
und Physiologie
in London.

Abbildung 2:
Im Jahre 1628 veröffent-
lichte William Harvey
seine Arbeit zur Entde-
ckung des Blutkreislaufes.
Titel „De Mortu cordis et
sanguinis“.



Titelblatt der Abhandlung Harveys zum Blutkreislauf

Der englische Leibarzt William Harvey (Abbildung 1) entdeckte im 17. Jahrhundert den Blutkreislauf und postulierte das Herz als zentrales Antriebsorgan. Ebenso entdeckte er Kommunikationen zwischen Arterien und Venen (communicating pores) (Abbildung 2). Durch die Arbeiten von van Leeuwenhoek und Malpighi (Abbildung 3) konnte im gleichen Jahrhundert gezeigt werden, dass diese Kommunikationen kleine röhrenhafte Gebilde sind, die als Kapillaren bezeichnet wurden (Schipperges, 1990). Hales entdeckte im 18. Jahrhundert Kontraktionen und Dilatationen der kleinen Kapillaren. Billroth forschte Mitte des 19. Jahrhunderts über die Entwicklung der Blutgefäße. Rouget be-



*Abbildung 3:
Marcello Malpighi,
1628 – 1694, beschrieb
1661 Lungenkapillare und
bewies die Funktion des
kleinen Kreislaufes.*

*Abbildung 4:
Judah Folkman,
Direktor im Children's
Hospital Medical Center
der Harvard Medical
School, entdeckte
natürliche Hemmstoffe
der Gefäßneubildung wie
Angiostatin und
Endostatin.*



schrieb Ende des 19. Jahrhunderts kleine kontraktile Zellen, die mit dem Netzwerk der Kapillaren in Verbindung stehen (Rouget-Zellen). Zu Beginn des 20. Jahrhunderts konnte Hertig eine Beteiligung dieser Rouget-Zellen (Perizyten) an der Angiogenese der maternalen Blutgefäße der Plazenta aufzeigen (Schneck, 1997).

Anfang der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts erlangte die Angiogenese bei malignen Tumoren durch die Arbeiten von Folkman (Abbildung 4) großes Interesse. Er beobachtete einen Wachstumsstillstand und ein Ausbleiben der Gefäßbildung bei Tumorzellen, die in isolierte Organe implantiert wurden. Die Frage nach der Abhängigkeit zwischen Progression und Metastasierung von Krebserkrankungen und der Angiogenese war geboren (Folkman, 1992).

1.1.2 Grundlagen der embryonalen Gefäßneubildung

Zu Beginn der dritten Woche beginnt die Bildung neuer Blutgefäße bei menschlichen Embryonen, die sich in Vaskulogenese und Angiogenese aufteilt. Zunächst wölben mesodermale Zellhaufen im ventralen Teil des Dottersackes das Endoderm vor. Diese Zellen werden als Hämangioblasten bezeichnet, da aus ihnen sowohl die primitiven Blutzellen (Hämozytoblasten), als auch die endothelbildenden Zellen (Angioblasten) entstehen. Die Zellhaufen haben eine enge Lagebeziehung zum Endoderm und bilden in der Folge sogenannte Blutinseln aus. Dabei runden sich die zentral gelegenen Zellen ab und differenzieren sich zu Vorläufern der Blutzellen. Die peripher gelegenen Zellen (Angioblasten) lagern sich zu abgrenzenden Endothelien zusammen (Abbildung 5). Es entstehen weitleumige Säckchen. Die benachbart liegenden Angioblasten gehen Verbindungen ein. Durch eine Vielzahl solcher Kommunikationen und durch weiteres paralleles Wachstum der Gefäßanlagen entsteht ein Kapillarnetz (Christ et al., 1990). Eine Interaktion zwischen den hämangiogenetischen Zellen und dem Endoderm gilt als gesicherte Voraussetzung für die Endothelzeldifferenzierung. Zunächst werden alle Gefäße als einfache Endothelrohre angelegt (Vaskulogenese). Erst durch den hämodynamischen Einfluss im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung bilden die Gefäßan-

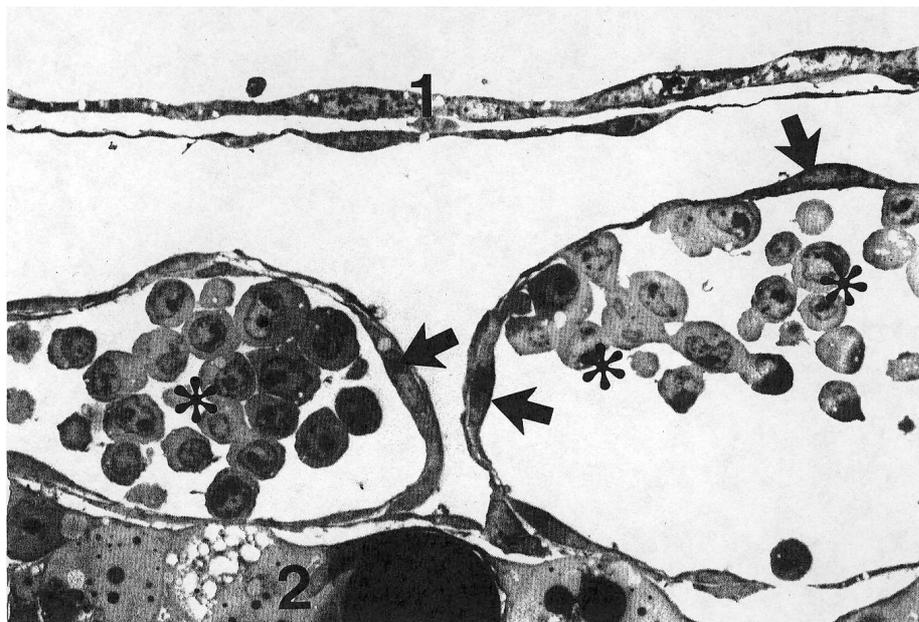


Abbildung 5: Dottersack eines Embryos
(1 = Ektoderm, 2 = Endoderm, Sterne: Hämozytoblasten, Pfeile: Angioblasten).

lagen charakteristische Muster aus. Perizyten, Fibroblasten und glatte Muskelzellen differenzieren sich aus ortsständigen Zellen.

Die Besiedlung der Organanlagen mit Angioblasten erfolgt durch Migration. Die Zellen kennen Weg und Ziel durch Zell-Substrat- und Zell-Zell-Interaktionen. Angiogene Faktoren werden von verschiedenen Geweben produziert und stimulieren die Gefäßneubildung (Angiogenese). Bestimmte Gewebe (Knorpel) werden nicht vaskularisiert oder die zuvor angelegten Vorläufer der Blutgefäße gehen zu Grunde. Es ist nachgewiesen, dass derartige Gewebe Faktoren bilden, die das Einwachsen von Kapillaren hemmen. Schon länger wird eine gezielte Unterdrückung lokaler Gefäßneubildung in der Tumorthherapie erforscht (Auerbach et al., 1994).

1.1.3 Gefäßneubildung während der physiologischen Wundheilung

Die Wundheilung ist ein komplexer und genau regulierter Vorgang mit lebenswichtiger Bedeutung. Sie wird in drei Phasen unterschieden, in denen unter anderem auch die Angiogenese eine Rolle spielt (Abbildung 6). In der Entzündungsphase wird nach der Verletzung zunächst die Gerinnungskaskade in Gang gesetzt. Vernetzte Fibrinmoleküle

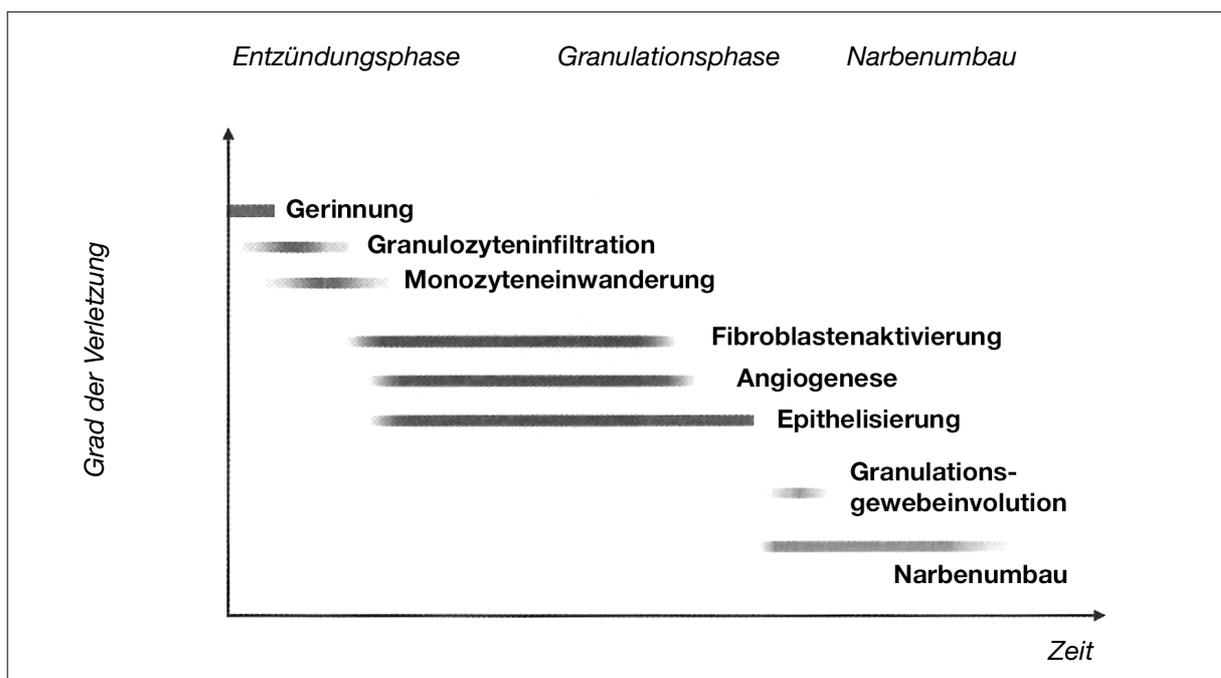


Abbildung 6: Phasen der Wundheilung.

sowie Fibronectin und Thrombospondin dienen als Leitstrukturen für einwandernde Zellen. Eingewanderte Thrombozyten setzen Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF- α , TGF- β) frei, die die Wundheilung einleiten. Neutrophile Granulozyten treten hinzu und sorgen über Phagozytose und Bildung von Sauerstoffradikalen für die Abwehr eingedrungener Mikroorganismen. Proteasen (Matrix-Metalloproteinasen, Proteinase 3, Cathepsin G) induzieren ein endogenes Debridement. Proinflammatorische Zytokine (Interleukin-1 α , Interleukin-1 β , Tumor-Nekrose-Faktor- α) stimulieren nachgeschaltete Mediatorsysteme (Interleukin-6, Interleukin-8, Monocyte Chemotactic Protein-1, Keratinocyte Growth Faktor, GM-CSF). Monozyten steuern als aktivierte Wundmakrophagen die Angiogenese und die Fibroblastenproliferation. Das über die Mediatorkreisläufe entstandene Granulationsgewebe sprosst in den Gewebedefekt ein. Nekrotisches Gewebe wird abgebaut, Normalgewebe angelagert. Die Zellzahl nimmt massiv zu, die Epidermis wandert über das Granulationsgewebe. Die Regeneration der Basalmembran beginnt durch distal gelegene Keratinozyten, proximale Keratinozyten produzieren interstitielle Kollagenasen und als Bestandteile der Basalmembran Fibronectin und Laminin. Nach dem Wundschluss normalisieren sich in der dritten Phase (Narbenumbau) die epitheliale Hyperproliferation und die Keratinisierung. Im darunter liegenden Bindegewebe finden noch längere Zeit Umbauprozesse statt.

1.1.4 Tumorangiogenese

Ähnlich dem gesunden Gewebe können maligne Neoplasmen nur dann wachsen, wenn sie zur Angiogenese fähig sind und ausreichend mit Blutgefäßen versorgt werden, da ab einer Tumorgöße von etwa 3 mm³ die Ernährung der Tumorzellen durch Diffusion nicht mehr gewährleistet ist.

Im Anfangsstadium werden alle soliden malignen Neoplasmen als eine Ansammlung von transformierten Zellen bezeichnet. Das Wachstum ist avaskulär und wird durch ein Gleichgewicht von Proliferation und Apoptose geprägt. Mit wachsendem Abstand zum Gefäß wird die Versorgung der Zellen durch Diffusion immer schlechter. Im Tumorinneren entsteht eine Hypoxie einiger Tumorzellen, die die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (v.a. VEGF) induziert. Per Diffusion gelangen diese Wachstumsfaktoren zu einem nahegelegenen Blutgefäß und binden dort an ein von Endothelzellen spezifisch

expressierten Rezeptor mit Tyrosin-Kinase-Aktivität. Diese Wechselwirkung löst eine Kaskade chemischer Reaktionen aus, an deren Ende u.a. die Expression von Matrix-Metalloproteasen und Integrinen steht. Diese Substanzen sind in der Lage, die Basalmembran des Ursprungsgefäßes abzubauen und die extrazelluläre Matrix zu remodellieren, um eine Passage hindurch zu erleichtern. Die Endothelzellen beginnen nun zu proliferieren und sprossen in den Perivasalraum ein. Die Migration wird durch die Integrine ermöglicht, die den Kontakt zwischen den wandernden Zellen und der extrazellulären Matrix herstellen. Es folgt die Bildung einer neuen Basalmembran. Perizyten und glatte Muskelzellen können sich um das neue Gefäß formieren. Kapillaren werden zu Anastomosen vereinigt, die den Blutfluss freigeben.

Als „Angiogenic switch“ wird die Transformation eines Tumors in den angiogenen Phänotyp bezeichnet. Malignes Gewebe mit einem Durchmesser von wenigen Millimetern kann jahrelang im Körper schlummern ohne zu wachsen. Durch den Einfluss von Onkogenen folgt dann die überschießende Expression proangiogener Faktoren oder die Reduktion endogener Angiogenese-Inhibitoren. Das Angiogeneseprogramm wird gestartet, der Tumor bzw. die Metastase kann schneller und invasiver wachsen.

1.1.5 Tumormetastasierung

Die metastatische Kaskade besteht aus mehreren Schritten und beginnt mit der Loslösung von malignen Zellen aus dem Zellverband durch einen Verlust der Zell-Zell-Adhäsionen. Dadurch entsteht ein Kohäsivitätsverlust des Zellverbandes (Abbildung 7 – ①). Es folgt die Degradation von Proteinen der Basalmembran und der extrazellulären Matrix durch verschiedene zelloberflächenassoziierte proteolytische Systeme (Matrix-Metalloproteinasen, Aspartatproteinasen und Serinproteinasen) (Abbildung 7 – ②). Die Serinprotease Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (uPA) und deren System (Plasminogenaktivator/Plasmin-System) haben dabei zentrale Bedeutung. Sie

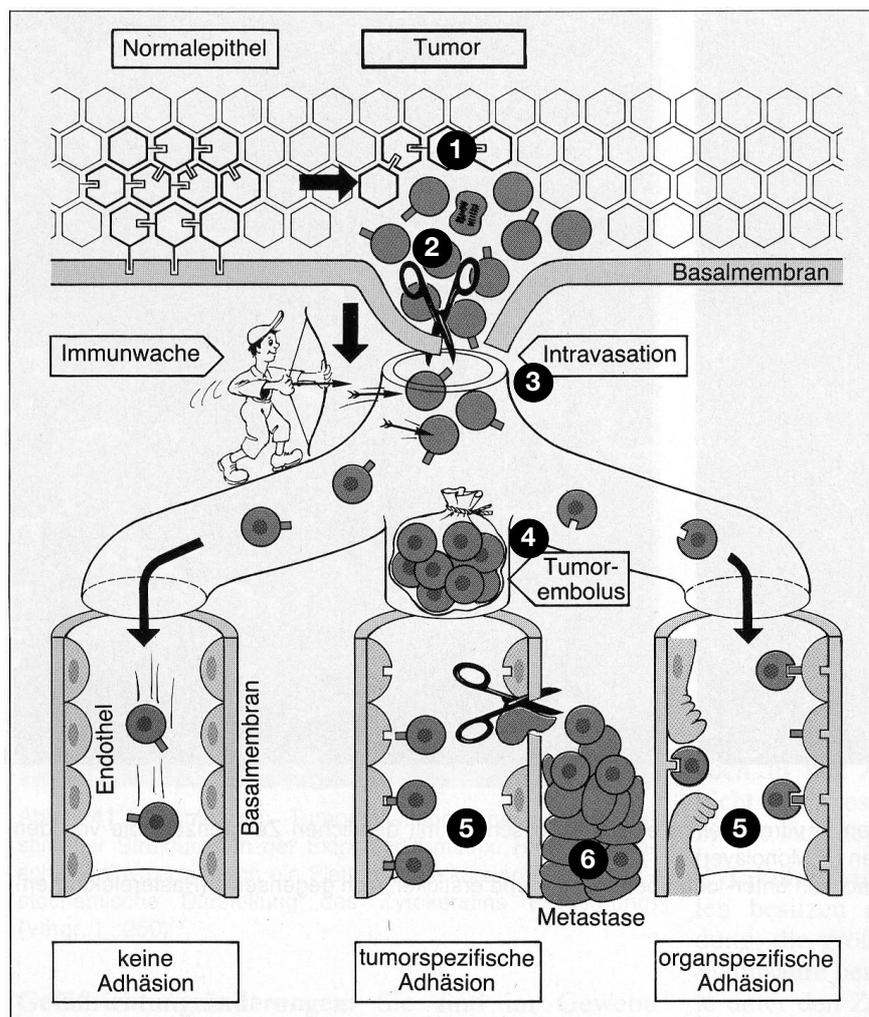


Abbildung 7: Schema der Metastasierungsschritte (Riede-Schäfer, Allgemeine und spezielle Pathologie, Stuttgart, New York, 1995).

besteht aus den Komponenten Plasmin, den Aktivatoren uPA und tPA, dem zellulären Rezeptor uPAR und den Inhibitoren PAI-1 und PAI-2. Durch Bindung von uPA an seinen Rezeptor wird die Umwandlung von inaktivem Plasmin in aktives Plasminogen, die Aktivierung von Matrixmetalloproteasen und darüber hinaus eigene proteolytische Aktivität bewerkstelligt, um extrazelluläre Matrixproteine spalten zu können.

Nach dem Auflösen der Basalmembran können sich von einem in das Gefäßlumen invadierten Tumor einzelne Zellen oder kleinere Zellverbände in die Zirkulation lösen (Abbildung 7 – ③). Bleiben Tumorzellen in der Blutstrombahn haften, können sie sich vor dem Immunsystem schützen, indem sie die eigene HLA-Expression vermindern und sich mit einer Fibrinummantelung umgeben (Abbildung 7 – ④). Mit Thrombozyten und Leukozyten in Kontakt stehend, verbleiben die Tumorzellen im Zirkulationssystem, bis sie an von Endothelzellen exprimierte Adhäsionsmoleküle andocken. Die Adhäsion kann dabei durch die Wechselwirkung mit den Endothelzellen oder durch die Bindung an die subendotheliale Matrix bewirkt werden (Abbildung 7 – ⑤). So induzieren adhärenzte Tumorzellen eine Aktivierung und Retraktion von Endothelzellen innerhalb von ein bis vier Stunden. Anschließend erfolgt die Anheftung an die subendotheliale Proteinmatrix, die Migration der Tumorzelle in das darunter liegende Gewebe, der erneute Abbau der Basalmembran und das Auswachsen des Tumors am Metastaseort (Abbildung 7 – ⑥). Zellen eines bösartigen Tumors können sich hier infolge ihrer Autonomie relativ unabhängig vom Wirtsgewebe vermehren. Allerdings wachsen tatsächlich nur etwa 0,1 % der im Blut zirkulierenden Tumorzellen tatsächlich auch zu einer Metastase aus. Man unterscheidet die sogenannte Frühmetastasierung mit Absiedlungen innerhalb der ersten Monate nach Diagnose von der Spätmetastasierung. Nach Organabsiedlung maligner Zellen ist ihr invasives Wachstum nicht immer obligat. Vielmehr ist es möglich, dass solche Zellen ihr Wachstum einstellen und erst nach 10 bis 15 Jahren zur aggressiven Metastase auswachsen. Ausschlaggebend dabei sind chemische und mechanische Noxen und endogene Faktoren (geschwächtes Immunsystem).

Den Einfluss der Angiogenese und der Vaskularisation auf die Metastasierung zeigt eine Untersuchung am malignen Melanom. Hauttumore mit einem Durchmesser kleiner 0,7 mm metastasieren nur spärlich und führen selten zum Tod des Patienten. Sie sind oberhalb der Basalmembran, die Epidermis und Subkutis trennt, lokalisiert und selten

vaskularisiert. Größere Melanome haben eine weitaus schlechtere Prognose, da sie in der gut durchbluteten Subkutis ideale Bedingungen für eine Angiogenese vorfinden und dadurch ein größeres metastatisches Potenzial besitzen (Folkman, 1987). Das Wachstum über die Diffusionsversorgungsgrenze hinaus induziert eine Hypoxie im Inneren des Tumors, die eine Bildung von Wachstumsfaktoren (vor allem VEGF) zur Folge hat.

Beim Mammakarzinom ist ebenfalls eine Abhängigkeit zwischen Angiogenese und Metastasierung beschrieben. In einem Kollektiv von 49 Patientinnen mit Mammakarzinom zeigte die Gruppe mit der geringsten Kapillarisierung (0 bis 33 Kapillaren bei 200-facher Vergrößerung im histologischen Schnitt) nur zu 14 % eine Metastasierung. Die Gruppe mit mehr als 100 Kapillaren pro Gesichtsfeld war zu 100 % mit Metastasen behaftet (Weidner et al., 1991).

1.1.6 Angiogenesefaktoren

In den letzten Jahren sind verschiedene Angiogenesefaktoren identifiziert worden. Sie werden von Zellen wie Monozyten, Endothelzellen, Bindegewebszellen, Lymphozyten und auch Tumorzellen freigesetzt (Auerbach et al., 1994). Dazu zählen u.a. als angiogenesefördernde Proteine der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF), der vasculäre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α), der Acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF), der Epidermal Growth Factor (EGF), das Interleukin-8, das Angiopoetin 1 und 2, der Placental Growth Factor (PIGF) und Angiogenin, ein 14 kD großes, einkettiges Protein (Folkman, 1998). Die gefäßneubildende Wirkung von VEGF und bFGF wird über rezeptorvermittelte Bindung an Endothelzellen erreicht. Nach der Aktivierung der Endothelzellen kommt es zum Verlust der Kontaktinhibition, wodurch Endothellücken entstehen. Es schließt sich die Endothelzellmigration, -proliferation und strukturelle Neuorganisation an. Als Folge der Aktivierung der Endothelzellen produzieren diese in erhöhtem Maße Proteasen (Bikfalvi, 1995). Migration und Proliferation erfolgen in Richtung eines angiogenen Stimulus (Auerbach et al., 1994). Angiogenin unterscheidet sich von anderen Angiogenesefaktoren, indem es nicht an Heparin bindet, keine Sequenzhomologie zur FGF-Familie aufweist und für Endothelzellen *in vitro* nicht mitogen ist. Es ist ein basisches Protein, welches von einigen Karzinomzellen und von Fibroblasten synthetisiert wird. Die angiogene Wirkung erfolgt über seine Ribonukleasefunktion und ist durch die Aktivierung akzessorischer Zellen gekennzeichnet.

1.1.7 Natürliche Angiogenese-Inhibitoren

Die Neoangiogenese unterliegt einer strengen Regulation. Neben den erwähnten Stimulatoren gibt es natürlich vorkommende Inhibitoren. Dies sind proteolytische Spaltprodukte größerer Proteine, die selbst keine antiangiogenetische Wirkung haben (Tabelle 1). Die Vorläuferproteine sind Bestandteile der extrazellulären Matrix oder gehören zum Gerinnungssystem. Die natürlichen Inhibitoren werden durch die Wirkung von Metalloproteasen im Sinne einer Rückkopplungshemmung aus den Vorläuferproteinen freigesetzt. Das Ausmaß der Neoangiogenese wird durch das Gleichgewicht angiogenetischer und antiangiogenetischer Faktoren bestimmt.

Tabelle 1: Natürliche endogene Inhibitoren der Neoangiogenese.

Inhibitor	Vorläuferprotein
Endostatin	Kollagen XVIII
Angiostatin	Plasminogen
Vasostatin	Calreticulin
Restin	Kollagen XV
Thrombospondinfragmente	Thrombospondin
Fragment von PF4	Plättchenfaktor 4
Antithrombinfragmente	Antithrombin
Tissue Inhibitor of Metalloproteases (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3)	(Kein Vorläuferprotein)
Interferon α und β	(Kein Vorläuferprotein)

1.1.8 Therapeutische Angiogenese-Inhibitoren

In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe von Medikamenten entwickelt, die bestimmte Schritte der Neoangiogenese spezifisch blockieren sollen. Die Präparate lassen sich in vier Klassen mit unterschiedlichem Wirkungsmechanismus aufteilen. Es sind die Matrixmetalloprotease-Inhibitoren (z.B. Marimastat, AG3340, COL-3, Neovastat, BMS-275291), die Inhibitoren für Endothelzellen (z.B. TNP-470, Thalidomide, Combretastatin, Endostatin), die Inhibitoren der proangiogenetischen Faktoren (z.B. VEGF-, PDGF- und FGF-Rezeptorantagonisten, Anti-VEGF-Antikörper) und die Integrin-antagonisten (z.B. EMD 121974). Das Hauptziel dieser Substanzen ist es, mit Hilfe einer Dauertherapie den Progress der Tumorerkrankung zu verhindern. Voll- oder Teilremissionen sind bei alleiniger Gabe nur selten zu erreichen, da es sich bei den Angiogenese-Inhibitoren nicht um zytotoxische Substanzen handelt. Die Zielzellen sind die Endothelzellen und nicht die Tumorzellen selbst. Resistenzmechanismen, wie sie bei der Zytostatikatherapie zu beobachten sind, entfallen, da die Endothelzellen genetisch stabil sind (Fiedler et al., 2001). Eine klinisch relevante Wirksamkeit wird sich dennoch nur durch eine Verlängerung der Überlebenszeit in Langzeitstudien nachweisen lassen. Auch Kombinationstherapien aus Chemotherapeutika und Angiogenese-Inhibitoren müssen in Zukunft getestet werden.

1.1.9 Literaturübersicht

Die Neoangiogenese nimmt wie beschrieben bei der Wundheilung und der embryonalen und plazentären Entwicklung, aber auch bei der koronaren Herzkrankheit, bei der chronischen Polyarthrit, bei der diabetischen Retinopathie und anderen Krankheiten eine wichtige Stellung ein. Gewebeneubildung und Gewebereparatur sind zentrale Aufgaben, aber auch bei der Entstehung von Krankheiten spielt sie eine Rolle. Wie erläutert sind Tumorwachstum und Metastasierung nur durch Einsprossung von Kapillaren und Tumorzellkontakt mit der Blutzirkulation möglich. Tumore mit eigener Gefäßversorgung und Gefäßneubildung in ihren Metastasen wachsen schneller und aggressiver (Folkman, 1987). Dementsprechend korrelieren signifikant die Angiogenese und die Prognose bei Patientinnen mit Mammakarzinom (Kato et al., 2001; Weidner et al., 1991) (Abbildung 8), beim Blasenkarzinom (Dickinson et al., 1994), beim kolorektalen Karzinom (Bossi et al., 1995), beim malignen Melanom (Folkman, 1987) und beim Endometriumkarzinom (Obermair et al., 1998). Auch zum Ovarialkarzinom gibt es bereits verschiedene Arbeiten hinsichtlich der Angiogenese (Abulafia et al., 1997; Darai et al., 1998; Alvarez et al., 1999; Obermair et al., 1999; Shen et al., 2000). Oft sind aber nur kleine Patientenkollektive Gegenstand der Untersuchung.

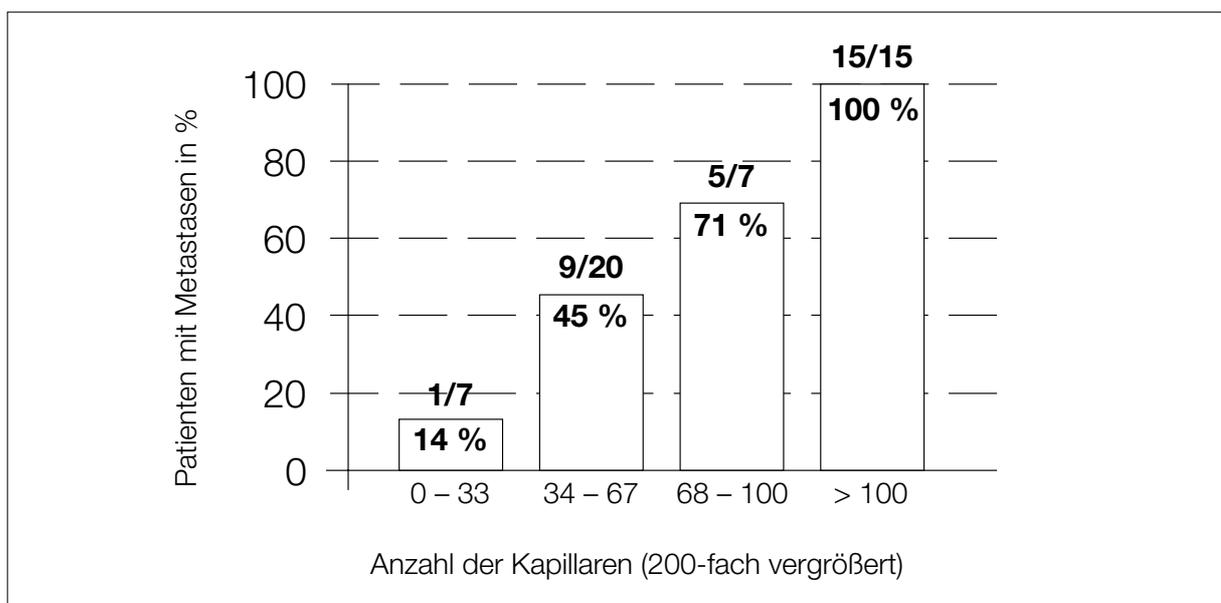


Abbildung 8: Metastasiertes Tumorleiden von 49 Patientinnen mit Mammakarzinom in Abhängigkeit der Anzahl der Kapillaren (Weidner, 1991).

1.1.10 Angiogenese als Prognosefaktor

Das zur Zeit am häufigsten verwendete Verfahren zur Quantifizierung der Angiogenese in humanen malignen Tumoren ist die Bestimmung der intratumoralen Gefäßdichte (MVD). Spezifische Marker und eine immunhistochemische Untersuchung zur Darstellung der Kapillaren sind für diese Methode erforderlich. Im Tierversuch und in vielen klinischen Studien konnte die Relevanz der Angiogenese bei Tumorerkrankungen dargestellt werden. Um dies zu zeigen, benötigt man eine sensitive und spezifische Markierung von Endothelzellen. Mit CD 31 und CD 143 fanden zwei solcher Marker in dieser Arbeit Verwendung, um endotheliale Zellen in menschlichen Geweben anzufärben.

1.1.10.1 CD 31 (PECAM-1)

Das Zelloberflächenprotein CD 31 gehört zu der Immunglobulin-Gen-Superfamilie mit adhäsiven Eigenschaften. Das einsträngige Glykoprotein vom Typ I ist Bestandteil der Zellmembran. Die Molekülmasse von 130 kD variiert in Abhängigkeit des Glykosylierungsstatus verschiedener Zelltypen. Unterteilt wird CD 31 in drei Abschnitte: Den aminoterminalen Teil (574 Aminosäuren, sechs homologe Domänen vom C2-Typ), den transmembranösen Teil (19 Aminosäuren mit hydrophobem Rest) und den carboxyterminalen, zytoplasmatischen Teil (118 Aminosäuren, Threonin- und Tyrosinreste, die eine Phosphorylierung ermöglichen, Kohlenwasserstoffe für stickstoffgebundene Glykosylierung) (Newmann, 1997).

CD 31 ist auf Zellen des vaskulären Systems weit verbreitet. Mit einer Dichte von einer Million Molekülen pro Zelle ist es auf den Endothelzellen am stärksten vertreten. Neutrophile Granulozyten und Monozyten enthalten etwa 100.000 Moleküle pro Zelle. Als einziges Mitglied der Zelladhäsionsmoleküle ist es auch auf Thrombozyten zu finden. Ebenso wird es von hämatopoetischen Stammzellen, Subpopulationen der Lymphozyten und Zellen der myeloischen Reihe exprimiert. Die Verteilung und Ausprägung von CD 31 lässt auf eine wichtige Beteiligung an den Gefäßfunktionen schließen. Bedeutung hat CD 31 bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Verbin-

dungen (Newmann, 1990). Es können drei Arten der Zell-Zell-Interaktion unterschieden werden: Eine homophile Bindung zweier CD 31-Moleküle und heterophile Verbindungen zwischen CD 31 und einem Integrin bzw. einem Glucosaminoglykan. Alle drei Adhäsionsmechanismen stellen Schlüsselsignale in der Proliferation der Endothelzellen dar. Die Interaktion von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen sind für die Formation neuer Blutgefäße wichtig. Bei der Angiogenese lösen kapilläre Endothelzellen die normalen Zell-Zell-Verbindungen auf, migrieren in die perivaskuläre Matrix, proliferieren dort und stellen ihre Zell-Zell-Verbindung wieder neu her, um so neue Kapillaren zu bilden (De Lisser et al., 1997). Bei Entzündungsprozessen spielen neutrophiles und endotheliales CD 31 eine Rolle. Das Lösen der Zell-Zell-Verbindungen ist für die transendotheliale Migration von Leukozyten ins perivasale Gewebe und die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im Entzündungsgewebe unerlässlich. Der tatsächliche Mechanismus ist noch nicht geklärt. Es werden Erhöhung adhäsiver Eigenschaften von Integrinen durch CD 31 ebenso diskutiert, wie eine Interaktion zwischen den endothelialen und neutrophilen CD 31-Molekülen, die eine Führung der Granulozyten zwischen den Endothelzellen bewirken. Eine dritte Möglichkeit ist die Bildung von Proteasen durch CD 31, die für den Durchtritt durch das Endothel oder die Basalmembran nötig sind (Christofidou-Solomidou et al., 1997). Immunhistochemisch kann CD 31 als Marker für Endothelien, die ansonsten morphologisch nur schwer von anderen Zelltypen zu unterscheiden sind, eingesetzt werden, da es ein gegen die Formalinfixierung resistentes Epitop auf Endothelzellen zuverlässig anfärbt. CD 31 ist besonders bei der tumorinduzierten Angiogenese vermehrt auf Endothelzellen und deren interzellulären Verbindungen zu finden (Berger et al., 1993).

1.1.10.2 CD 143 (Angiotensin-Converting-Enzym)

CD 143 (Angiotensin-Converting-Enzym) ist eine unspezifische, membrangebundene und heterogen verteilte Metalloprotease, die in erster Linie in der Blutdruckregulation eine Rolle spielt. Weitere Funktionen liegen in der Elektrolyt- und Flüssigkeitshomöostase, im Stoffwechsel der Neurotransmitter und in der Peptidresorption. Zwei molekulare Isoformen werden unterschieden: Eine längere somatische Form mit einem Mole-

kulargewicht von 170 kD und einer Sequenz von 1306 Aminosäuren und eine kürzere testikuläre Form mit einem Molekulargewicht von 110 kD und einer Aminosäuresequenz von 732.

Eingebunden in das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist die bekannteste Wirkung von CD 143 das Überführen von Angiotensin I in das stark vasokonstriktorisch wirksame Angiotensin II. Innerhalb des RAS spaltet das renal sezernierte Renin aus Angiotensinogen das inaktive Angiotensin I ab, welches von CD 143 katalysiert in Angiotensin II überführt wird. Angiotensin II wirkt im Organismus neben der Vasokonstriktion mit einer kardialen Inotropie und Chronotropie, bei der Bildung von ACTH und Vasopressin, bei der Aldosteron- und Katecholaminfreisetzung sowie wachstumsfördernd auf Gefäß- und Herzmuskulatur und damit überwiegend zur Stabilisierung des Blutdruckes. CD 143 steuert die Autoregulation von Flüssigkeits- und Bikarbonat-Resorption, da es reichlich im mikrovillären Bürstensaum von Niere und Dünndarm vorkommt.

Die stärkste immunhistochemische Expression von CD 143 lässt sich in Endothelzellen kleiner muskulärer Arterien und Arteriolen beobachten. Endothelien des Kapillarsystems und großer Arterien und Venen exprimieren dagegen nur geringe immunreaktive Mengen CD 143. Die Angiogenese wird durch verschiedene Zelltypen (Tumorzellen, Endothelzellen, Makrophagen, Leukozyten) kontrolliert und reguliert. Angiogenesefaktoren wie VEGF, bFGF, aFGF, FGF und TNF- α spielen eine Rolle. Aber auch proteolytische Enzyme (Plasminogenaktivatoren wie das Urokinase-Plasminogenaktivator-System), ihre Inhibitoren und Metalloproteasen, zur Auflösung von Basalmembranen und umgebender Matrix sind von Bedeutung. Die Metalloprotease CD 143 exprimiert bisher nur in Endothelien von Nierenzellkarzinomen (Skoldenberg et al., 2001) und Seminomen. Darüber hinaus ist eine Expression von CD 143 in Keimzelltumoren und ihren Vorläuferläsionen, den intratubulären Keimzellneoplasien bekannt (Pauls et al., 1999). Bei verschiedenen Malignomen können erhöhte Serumspiegel von CD 143 nachgewiesen werden, beim Lungenkarzinom kommt ihm prognostische Bedeutung zu (Romer, 1981; Mansfield, 1984).

1.2 Das Ovarialkarzinom

1.2.1 Epidemiologie, Inzidenz und Mortalität

Mit zirka 28 % aller malignen Neubildungen des weiblichen Genitaltraktes stellt das Ovarialkarzinom das dritthäufigste gynäkologische Malignom dar. Von den weiblichen Genitalmalignomen hat es mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von etwa 35 % die deutlich ungünstigste Prognose. Die Neuerkrankungsrate zeigt in den letzten 20 Jahren keine wesentliche Veränderung, die Mortalität ist in diesem Zeitraum leicht abnehmend. Im Jahre 2000 sind in Deutschland 6006 Frauen an einem malignen Ovarialtumor verstorben. Eine von 70 Frauen muss damit rechnen, während ihres Lebens an diesem Tumor zu erkranken. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen wird für Europa, einem Nord-Süd-Gefälle folgend, im Norden mit etwa 15 Fällen/100.000 Frauen und im Mittelmeerraum mit etwa 5 Fällen/100.000 Frauen angegeben. Für das Saarland, das bisher als einziges deutsches Bundesland über ein Krebsregister verfügt, wird für 1999 eine Inzidenz von 18,1 angegeben.

1.2.2 Ätiologie

Die Ätiologie des Ovarialkarzinoms ist bisher weitgehend unklar, jedoch sind einige Risikofaktoren bekannt. Wie bei vielen anderen Krebserscheinungen ist das Lebensalter ein Risikofaktor; mit zunehmendem Alter steigt auch die Inzidenz des Ovarialkarzinoms an (Tabelle 2). Umwelt und Ernährungsfaktoren scheinen eine Rolle zu spielen, Infertilität, Nulliparität, dauerhafte ovulatorische Zyklen und die medikamentöse Ovulationsauslösungen werden ebenfalls als begünstigende Faktoren beschrieben. Etwa 5 % der Ovarialkarzinome sind durch eine familiäre Belastung bedingt. Man unterscheidet das organspezifische familiäre Ovarialkarzinomsyndrom mit einem Altersgipfel, der etwa 10 Jahre früher als beim nicht familiären Ovarialkarzinom liegt. Frauen mit zwei erkrankten nahen Verwandten haben bereits eine Inzidenz von 30 bis 40 %. Das familiäre Mamma-/Ovarialkarzinomsyndrom, das mit einer Mutation des Breast Cancer Gen 1 (BRCA-1) auf Chromosom 17 q verbunden ist und eine Inzidenz für ein Ovarial-

Tabelle 2: Altersverteilung beim Ovarialkarzinom (Epidemiologisches Krebsregister Saarland, Statistisches Bundesamt Deutschland).

Altersgruppen	Alterspezifische Inzidenz Saarland 1999	Mortalität Deutschland 2000 (n = Anzahl)
15 – 19	7,4	2
20 – 24	7,4	7
25 – 29	3,3	9
30 – 34	2,4	21
35 – 39	6,6	51
40 – 44	11,9	100
45 – 49	10,3	169
50 – 54	10,1	235
55 – 59	35,1	486
60 – 64	29,7	702
65 – 69	29,3	733
70 – 74	46,3	876
75 – 79	53,0	1.103
80 – 84	63,5	654
85 – 89	57,3	596
> 90		260

karzinom von 50 % hat. Und das Lynch-II-Syndrom, welches eine Kombination aus familiärem Kolonkarzinom und einem Ovarial-, Endometrium- oder Mammakarzinom ist und ein dreifach erhöhtes Risiko für ein Ovarialkarzinom hat. Im Gegensatz dazu sind die Anzahl der Schwangerschaften und die Dauer der Einnahmen von Ovulationshemmern als protektive Faktoren anzusehen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Risikofaktoren des Ovarialkarzinoms (Ozols et al., 1997).

Risikofaktor	Geschätztes relatives Risiko
Höheres Lebensalter	3
Wohnort in Nordamerika oder Nordeuropa	2 – 5
Höheres Bildungsniveau und Einkommen	1,5 – 2
Weißer Rasse	1,5
Anamnese mit Sterilitätstherapie	2 – 5
Frühe Menarche	1,5
Späte Menopause	1,5 – 2
Status nach Hysterektomie	0,5 – 0,7
Verwendung oraler Kontrazeptiva	0,3 – 0,5
Perineale Talkum-Puder-Anwendung	1,5 – 2
Ovarialkarzinom in der Verwandtschaft	3 – 4

1.2.3 Klinische Symptomatik

Die Symptomatik beim Ovarialkarzinom ist uncharakteristisch und tritt sehr spät auf. Für die Vielfältigkeit der Symptome sind weniger histologische Merkmale verantwortlich. Vielmehr sind die Zunahme des Leibesumfangs, das Fremdkörpergefühl und die Verdrängung von Nachbarorganen von Bedeutung. Uncharakteristische Schmerzen, Peritonealreize, evtl. Stieldrehungserscheinungen mit den Zeichen eines akuten Abdomens sind ebenfalls möglich. Die Lage des Tumors kann Blasenbeschwerden (vor dem Uterus), Defäkationsschmerzen und Kreuzschmerzen (im Douglasschen Raum) hervorrufen. Es können ferner vaginale Blutungen auftreten (bei 25 % der malignen Ovarialtumore nachweisbar). Bei peritonealer Karzinose tritt Aszites auf (Pfisterer, 2000). Die Beteiligung der Pleura ist die häufigste Tumormanifestation außerhalb der Bauchhöhle. Dies erklärt sich über den Lymphabfluss der Bauchhöhle. Lebenslimitierender Faktor ist der Tumor im Bereich der Bauchhöhle in Form eines nicht operablen Tumors oder einer Peritonealkarzinose. Häufig führt eine Ileusproblematik zum Tode.

1.2.4 Histologische Klassifikation

Eine essentiell wichtige Bedeutung in der Onkologie hat die histologische Musterung von Tumorgewebe. Mikroskopisch-anatomische Eigenschaften, Differenzierungsgrad und Typ, Nekrosebezirke und das dominierende Wachstumsmuster zeigen Charakteristika der malignen Tumore auf und haben prognostische Bedeutung. Laut WHO werden die primären Ovarialkarzinome in fünf große Gruppen eingeteilt: Die malignen epithelialen Tumore, die malignen Keimstrang-Stroma-Tumore, die Steroidzell-Tumore, die malignen Keimzell-Tumore und die Gonadoblastome.

Blickt man auf die Inzidenzrate dieser fünf Gruppen, so fällt auf, dass den epithelialen Tumoren mit einem Vorkommen von 80 bis 90 % mit Abstand die größte Bedeutung zukommt. Seltener treten mit weniger als 3 % die malignen Keimstrang-Stroma-Tumoren auf, gefolgt von den Steroidzell-Tumoren, den Keimzelltumoren und den Gonadoblastomen mit einer Inzidenz von jeweils 1 bis 2 %.

1.2.4.1 Maligne epitheliale Tumore

Die größte Gruppe innerhalb der eindeutig malignen epithelialen Tumore bilden die serösen Karzinome, die durch die mehr oder weniger starke Ausbildung von papillären Strukturen auffällt. Da diese Gruppe oft als oberflächlich-peritoneale Karzinome evident wird, ist sie durch frühe extra-ovarielle Ausbreitung gekennzeichnet (Horn et al., 1995). Ein weiteres Charakteristikum dieser Gruppe bilden die Psammomkörperchen, die als rundbegrenzte Kalzifikationen mikroskopisch zu finden sind (Russell & Farnsworth, 1997). Aufgrund der frühen Metastasierung gelten die serösen Ovarialkarzinome als prognostisch ungünstig.

Eine wesentlich bessere Prognose wird den muzinösen epithelialen Karzinomen zugeschrieben, da sie in mehr als 60 % im FIGO-Stadium I und II diagnostiziert werden, in 37 % sogar im Stadium Ia (Pfleiderer, 1991). Sie sind durch eine intestinale Differenzierung charakterisiert und zeigen oft ein zystisches Wachstumsmuster.

Die dritthäufigsten epithelialen Tumoren sind die endometrioiden Karzinome. Sie wachsen oft tubulär oder solide und sind wie auch die muzinösen Karzinome größtenteils hochdifferenziert. Neuere Untersuchungen zeigen eindeutig Zusammenhänge zwischen endometrioiden Karzinomen und einer Endometriose. Bei 30 bis 50 % bestehen gleichzeitig präkanzeröse oder maligne Veränderungen des Endometriums.

Eine besonders auffällige Gruppe stellen die klarzelligen Karzinome dar, die große, unregelmäßige Zellkerne in einem hellen Zytoplasma aufweisen. Ihre Prognose ist durchweg ungünstig, da sie meist niedrig differenziert sind (Horn et al., 1995).

Die transitionalzelligen Karzinome wurden zunächst in die Gruppe der Blasenkarzinome ausgehend vom Urothel eingeordnet. In der neueren Literatur sind sie aber als eigenständige, unabhängige Formation der Ovarialkarzinome beschrieben. Sie unterscheiden sich immunhistochemisch von transitionalzelligen Blasenkarzinomen (Ordóñez, 2000).

Die Beschreibung „undifferenzierte und unklassifizierbare Karzinome“ steht für die fünfte histologische Gruppe innerhalb der epithelialen Karzinome. Hier werden alle, nicht anderweitig zugeordneten Tumore zusammengefasst. Sie sind meist schlecht differenziert, in der Hälfte der Fälle beidseitig und in 80 % metastasiert und inoperabel (11 % 5-Jahres-Überlebensrate).

1.2.5 Diagnostik

Die Stadieneinteilung und die Diagnosesicherung erfolgt intraoperativ. Zur Diagnostik gehören die ausführliche Anamnese, die körperliche Untersuchung, der gynäkologische Tastbefund und der Spiegelbefund. Die Abdominalsonografie beurteilt die Tumorgöße, kann Aszites, Pleuraerguss und vergrößerte Lymphknoten aufzeigen und kann unter Umständen das Wachstumsmuster des Tumors (zystisch, papillär, solide) einschätzen. Nierenstau und intrahepatische Metastasierung können ebenfalls mittels Ultraschall gefunden werden. Gastroskopie, Zystoskopie und Rektoskopie geben Aufschluss über einen Befall der entsprechenden Organe. Computertomografie und

Magnetresonanztomografie sind für das präoperative Staging geeignet. Eine Pleurapunktion kann bei nachgewiesenem Erguss ein Stadium IV beweisen, was Einfluss auf die Operation hätte. Tumormarker wie CA 125 eignen sich zur Verlaufskontrolle, sollten aber auch präoperativ als Ausgangswert bestimmt werden (Pfisterer, 2000).

1.2.6 Therapie

Die Therapie des Ovarialkarzinoms beruht heute im Wesentlichen auf zwei Säulen. Die Operation mit dem Ziel der Verminderung der Tumorlast. Daneben die post-operative aggressive Chemotherapie mit einem Platin- und Taxanhaltigen Schema. Hinzu kommt die Option der Bestrahlung, die in Deutschland nicht weit verbreitet ist.

1.2.6.1 Operative Therapie

Die operative Behandlung des Ovarialkarzinoms erfordert große Erfahrung und ist bei fortgeschrittenen Befunden nur im interdisziplinären Ansatz adäquat durchführbar. Das Ziel der Operation ist die vollständige Entfernung des Primärtumors. Dabei muss die perioperative Morbidität und Mortalität, der Allgemeinzustand und das biologische Alter der Patientin berücksichtigt werden. Jeder Adnextumor, der zyklusunabhängig nachgewiesen wird, sollte bis zum Beweis des Gegenteils als malignitätsverdächtig angesehen werden. Die Einschätzung der Dignität und Ausbreitung des Tumors sollte bereits präoperativ mit Hilfe der apparativen und klinischen Untersuchungsmethoden erfolgt sein. Eine Planung mit Abdominalchirurgen und Urologen ist gegebenenfalls sinnvoll, da ab dem FIGO-Stadium IIIc mit Darm- und/oder Blasenresektion gerechnet werden muss. Mit einem Längsschnitt wird das Abdomen eröffnet. Dieser kann, wenn nötig, bis zum Xyphoid erweitert werden. Eine zytologische Untersuchung des Aszites oder der Peritonealflüssigkeit ist obligat.

Es folgt die manuelle Exploration des Oberbauches, der Leber, der Zwerchfellkuppeln, des Kolonrahmens, des Dün- und Dickdarms mit jeweiligem Mesenterium sowie der paraaortalen und pelvinen Lymphknoten. Jede sichtbare Veränderung wird mit Biopsie

gesichert. Die Hysterektomie und beidseitige Adnektomie ist obligater Bestandteil der Operation. Paraaortale Metastasen sind auf Grund des Lymphabflusses der Ovarien in den Bereich der Vena renalis auch ohne Nachweis pelviner Metastasen möglich. Deshalb wird die pelvine und paraaortale Lymphonodektomie durchgeführt. Die Omentektomie wird je nach Tumorlokalisierung infrakolisch oder infragastrisch durchgeführt. Auch das Peritoneum wird bei Befall in der betreffenden Region (meist kleines Becken, Blase) resiziert.

Von der Primäroperation sind verschiedene Folgeeingriffe abzugrenzen. Eine „Kompletierungsoperation“ ist dann sinnvoll, wenn bei der Primäroperation die Voraussetzungen (apparativ, personell, strukturell) für eine vollständige Tumorreduktion nicht gegeben waren. Das „sekundäre Debulking“ wird angewendet, wenn durch erneute Tumorreduktion bei initial zurückgebliebenem Tumorrest eine Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit erreicht werden kann. Dies ist dann der Fall, wenn sich nach Primäroperation und 3 – 4 Zyklen Chemotherapie zumindest eine partielle Remission eingestellt hat. Die „Rezidivoperation“ kommt bei einem Spätrezidiv (tumorfrees Intervall > 12 Monate) zum Einsatz. Voraussetzungen dafür sind initial frühes Tumorstadium, makroskopische Tumorfreiheit bei der Primäroperation, gutes Ansprechen auf die primäre Chemotherapie, langes Zeitintervall zwischen Primärtherapie und Rezidiv. Die „Palliativoperation“ werden bei stenosierenden Tumoren im Darmbereich bzw. beim Ileus angewendet.

„Organerhaltene Operationen“ finden bei jungen Patientinnen mit besonderer histologischer Diagnose (Granulosazell- und Thekazelltumore, Dysgerminome, Androblastome, Tumore mit niedriger maligner Potenz) Anwendung. Weitere Kriterien sind glatte Tumoroberfläche, negative Peritonealzytologie, keine Kapselruptur, FIGO-Stadium Ia, kontralaterales Ovar makroskopisch tumorfrei, Omentum tumorfrei, pelvine und paraaortale Lymphknoten tumorfrei. Die „second-look-Operation“ ist in den letzten Jahren in den Hintergrund getreten, da verschiedene Studien ihren Nutzen in Frage stellen.

1.2.6.2 Chemotherapie

Eine wesentliche Voraussetzung für die optimale Wirksamkeit der Chemotherapie ist die primäre und radikale Operation, da die Effektivität der Chemotherapie exponentiell mit der Größe der Tumorreduktion steigt. Wichtig sind auch tumorbiologische Faktoren wie das Grading und das histologische Wachstumsmuster sowie das Ansprechen der ersten Chemotherapie bei einem zweiten Zyklus. Man unterscheidet die „Chemotherapie mit kurativem Ansatz“ bei einem operativen Tumorrest kleiner 1 cm im Durchmesser von der „adjuvanten Chemotherapie“, die zur Beseitigung von Mikrometastasen nach operativer Tumorreduktion eingesetzt wird. Ferner kommen die „neoadjuvante Chemotherapie“ mit nachfolgender operativer Tumorreduktion und die „palliative Chemotherapie“ zur Linderung von Beschwerden und Verkleinerung des Tumors zur Anwendung.

Eine Heilung durch den Einsatz von Kombinationschemotherapie setzt das Erreichen einer Vollremission voraus. Die höchste Rate klinischer und histologischer Vollremissionen wurde bisher mit der Kombination aus einer Platinverbindung und Paclitaxel erreicht. Die adjuvante Chemotherapie gestaltet sich in den frühen Stadien noch immer aus Cyclophosphamid und einer Platinverbindung (Tabelle 4). Zur Vermeidung einer Überbehandlung sollten in den frühen Stadien adjuvant vier Zyklen und in den fortgeschrittenen Stadien sechs Zyklen gegeben werden (Tabelle 5).

Tabelle 4: Präparatliste der gängigen Zytostatika (Fiedler, 2001).

Präparatliste – Zytostatika	
Wirkstoff	Handelsname
● Cisplatin	Cisplatin®
● Carboplatin	Carboplat®
● Paclitaxel	Taxol®
● Docetaxel	Taxotere®
● Cyclophosphamid	Endoxan®
● Treosulfan	Ovastat®
● Etoposid	Vepesid®
● Epirubicin	Farmorubicin®
● Vinblastin	Velbe®
● Bleomycin	Bleomycinum Mack®

Tabelle 5: Übersicht über die stadienadaptierte systemische Therapie beim Ovarialkarzinom (Hölzel et al., 1996).

<i>Tumorstadium</i>		<i>Empfehlung</i>
Ia/b	G1	Keine adjuvante Therapie
Ia/b	G > 1	Adjuvant Carboplatin/Cyclophosphamid
Ic, IIa/b	Gx	Adjuvant Carboplatin/Cyclophosphamid evtl. Carboplatin/Paclitaxel)
IIc, III (makroskopisch ohne Tumorrest)		Adjuvant Carboplatin/Paclitaxel (oder Carboplatin/Cyclophosphamid)
III	mit minimalem (< 1 cm) oder kleinem (> 1 cm ≤ 2 cm) Tumorrest	Carboplatin/Paclitaxel
III IV	mit Tumorrest ≥ 2 cm	Individuelle Abwägung zwischen Nutzen und Toxizität

1.2.6.3 Strahlentherapie

Die Strahlentherapie ist ein in Deutschland weniger verbreitetes Therapieprinzip. Sie kann als perkutane Bestrahlung oder als Radiokolloidtherapie intraperitoneal erfolgen. Die wenigen durchgeführten Untersuchungen, die die Ganzabdomenbestrahlung mit Alkylantien oder Platin-Chemotherapie vergleichen, ergaben eine gleiche Wirksamkeit der Methoden. Das Indikationsgebiet der primären adjuvanten Strahlentherapie erstreckt sich bei Berücksichtigung des Gratings vor allem auf die Stadien I und II oder auf höhere Stadien, wenn die Tumorreste im Oberbauch keinen größeren Durchmesser als 4 mm aufweisen. Die Vorteile der Strahlentherapie liegen in der kurzen Dauer von sechs bis sieben Wochen, der relativ geringen Toxizität und der Tatsache, dass die beim Rezidiv erforderliche Chemotherapie nicht durch Resistenzen behindert ist. Nachteile ergeben sich durch Adhäsionen und strahleninduzierte Gewebeveränderungen bei operativen Folgeeingriffen, sowie als Akutreaktionen Diarrhöe, Nausea, Meteorismus, Leukopenie und Thrombopenie. Als Spätreaktionen sind Dünndarmkomplikationen und chronische Diarrhöe zu nennen (Hölzel et al., 1996).

1.2.7 Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms

Ein Prognosefaktor ist ein zum Zeitpunkt der Diagnose verfügbarer Messwert, der in Zusammenhang mit dem Gesamt-Überleben steht. Er gibt Informationen bezüglich der Überlebenschance und hat unmittelbaren Einfluss auf die Primärtherapie. Bei Patientengruppen, die abhängig von Prognosefaktoren eingeteilt wurden, soll die Überlebenszeit verlängert, das Rezidivrisiko gesenkt und die Lebensqualität verbessert werden.

Beim Ovarialkarzinom gilt das Tumorstadium (FIGO) als gesicherter Prognosefaktor (Brinkhuis et al., 1995), ebenso wie das Alter, der Aszites, der Aktivitätsindex, die Tumorgöße, das Grading und die histologische Differenzierung (Lorigan et al., 1996). Im Rezidivfall sprechen ein kurzes krankheitsfreies Intervall, ein schlechter Allgemeinzustand, eine muzinöse Tumordifferenzierung und eine große Anzahl von Rezidivherden für einen ungünstigen Krankheitsverlauf (Lorigan et al., 1996).

2 Fragestellung

In dieser retrospektiven Analyse wurde die intratumorale Gefäßdichte in Primärtumorpräparaten von 221 Patientinnen mit Ovarialkarzinom bestimmt. Anhand der Expression von CD 31 (PECAM-1) und CD 143 (Angiotensin-Converting-Enzym) soll diese Arbeit prüfen, inwiefern Tumorangiogenese beim Ovarialkarzinom mit klinisch-pathologischen Befunden korreliert und welche Rolle sie bei der Prognose des Ovarialkarzinoms spielt.

Fragestellungen:

1. Finden sich Zusammenhänge zwischen der Angiogenese und den klassischen Prognosefaktoren?
2. Besteht eine Relevanz der Marker CD 31 und CD 143 und ihrer Expression hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit am Gesamtkollektiv sowie in Untergruppen?
3. Kann die Relevanz der etablierten Prognosefaktoren erneut bestätigt werden?

3 Patientinnen, Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Das Tumorgewebe, das formalinfixiert und in Paraffin eingebettet wurde, sowie die Krankenakte von 221 Patientinnen, die im Zeitraum von 1982 bis 1996 in der Abteilung Gynäkologische Onkologie und Strahlentherapie der Universitätsfrauenklinik Gießen behandelt wurden, war Grundlage der vorliegenden Arbeit. Als Einschlusskriterium zur Untersuchung der Prognosefaktoren musste ein histologisch gesichertes Karzinom der Ovarien vorliegen, ebenso wie eine Nachbehandlung an der Universitätsfrauenklinik Gießen. Vollständige klinische Daten insbesondere in Bezug auf Operationsbericht, Original-Histologien und postoperativer Behandlungsplan, sowie ein komplettes Follow-up der Patientinnen (bei noch lebenden Patientinnen letzter Patientenkontakt < 1 Jahr) und in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe der Primäroperation stellten weitere Einschlusskriterien dieser Untersuchung dar.

3.2 Klinische und pathologische Kriterien

Folgende klinische und pathologische Parameter wurden im Rahmen der retrospektiven Analyse erfasst:

- Alter
- Tumorstadium (FIGO)
- Radikaloperation (Hysterektomie, Ovarektomie beidseits, Omentektomie (ja/nein))
- Postoperativ verbliebene Resttumormasse
(keine Tumorresiduen, < 100 g, < 500 g, < 1000 g, > 1000 g)
- 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
- Tumorwachstumsfraktion MIB-1

3.3 Histologie

In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. F. E. Franke, Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, wurden sämtliche histologische Diagnosen überprüft und einer einheitlichen Bewertungssystematik zugeführt. Unter Heranziehung des HE-Schnittmaterials der Tumorprimäroperation wurde die Diagnose Ovarialkarzinom auch unter Berücksichtigung der weiteren Anamnese der Patientin sichergestellt, um insbesondere Ovarmetastasen anderweitig lokalisierter epithelialer Tumoren auszuschließen. Unter Berücksichtigung der aktuellsten histologischen Typisierung der Ovarialkarzinome (Russell, Farnsworth: *Surgical Pathology of the Ovaries* 2nd Edition, Churchill Livingstone New York, 1997) erfolgte histologische Subtypisierung. In den meisten Fällen vor 1990 wurde keine Beurteilung der histologischen Differenzierung (Grading) durchgeführt. In allen Fällen erfolgte eine Reevaluation in Anlehnung an Baak et al. (1987). Ferner wurde das Hauptwachstumsmuster der Tumore bestimmt, wobei zwischen den Formen „zystisch, papillär, tubulär, solid-tubulär und solide“ unterschieden wurde. Die Histologie wurde in serös, muzinös, endometrioid, undifferenziert, transitionalzellig und klarzellig unterteilt. Als weiterer möglicher Prognosefaktor wurde der relative Anteil der Nekrose im Tumorgewebe bestimmt. Unterteilt wurde dieser in nicht vorhanden, gering, mäßig und ausgeprägt.

3.4 Immunhistochemische Methode

Mit Hilfe der Immunhistochemie können zelluläre und stromale Epitope durch Antikörper markiert werden. Über Zwischenschritte werden diese Bindungen durch eine chemische Reaktion farbig dargestellt. Bei der verwendeten APAAP-Methode (alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase) wird an das betreffende Antigen der entsprechende murine Antikörper gebunden. Anschließend bindet an diesen, ein ausschließlich gegen Mäuseantikörper gerichteter, gegen alle menschlichen Proteine präabsorbierter, polyklonaler Antikörper im Überschuss, welcher dann mit seiner zweiten Bindungsstelle den anschließend aufgebracht APAAP-Komplex bindet. Durch den Einsatz von polyklonalen Brücken („Links“) ist trotz der Sensivität eine hohe Spezifität dieser Methode gesichert. Die alkalische Phosphatase setzt abschließend Neufuchsin in einen

intensiv roten Farbstoff um. Die Intensität kann erhöht werden, wenn das Anti-Maus-Immunglobulin und der APAAP-Komplex mehrfach auf die Schnitte aufgetragen wird (Abbildung 9).

Von den geprüft tumorrepräsentativen Gewebelöcken wurden je 20 Schnitte à 2 µm Dicke mit einem Mikrotom (Modell Jung SM2000R, Fa. Leica, Nussloch) angefertigt und nach Glättung im Wasserbad (Aqua destilata, 45 °C) auf spezielle, hochgereinigte Objektträger (Superfrost, Fa. Menzel-Gläser, USA) aufgezogen. Nach dem Trocknen über Nacht im Brutschrank (BE 400, Fa. Memmert, Schwabach) bei 37 °C wurde zudem je Block ein Hämatoxylin-Eosin-Kontrolle angefertigt. Die restlichen Schnitte wurden bis zur immunhistochemischen Färbung in einem Objektträgerschrank für bis zu sechs Monate aufbewahrt.

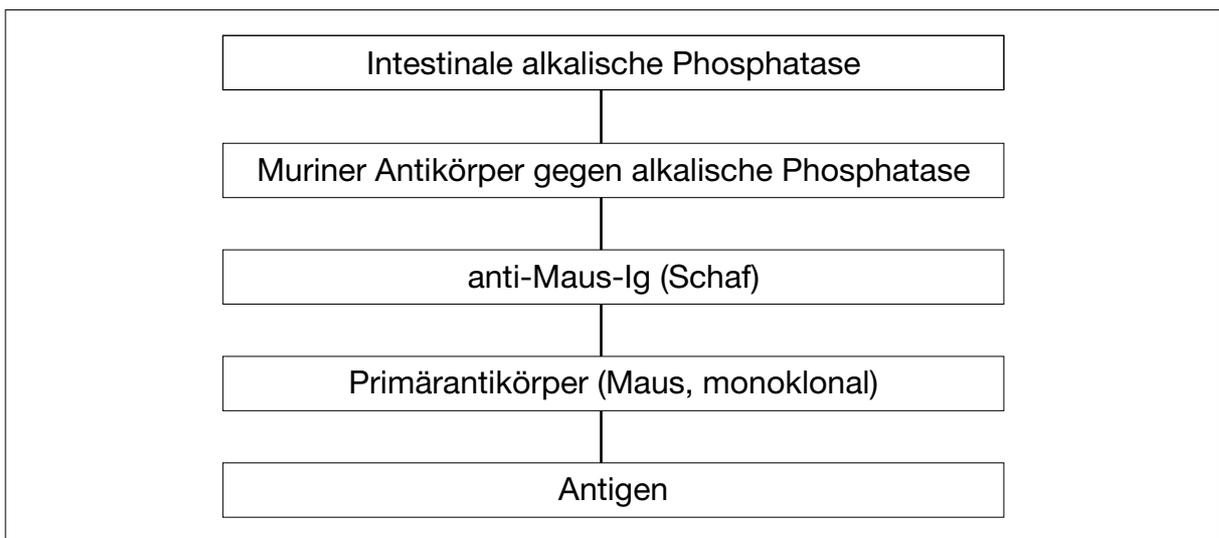


Abbildung 9: Schematische Darstellung der APAAP-Methode.

3.4.1 Die APAAP-Methode

3.4.1.1 APAAP-Technik

Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mit Hilfe der alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase (APAAP)-Methode nach Cordell et al. (1984) mit einigen Modifikationen (Zusammensetzung der Puffer unter 3.4.1.2). Das Prozedere umfasste die im Folgenden dargestellten Schritte:

- Entparaffinisierung der Paraffinschnitte in der folgenden Reihenfolge: 10 min Xylol, 10 min Aceton, 10 min Aceton-Waschpuffer-Gemisch (Verhältnis 1 : 2 = 1 + 1)
- Re-Antigenisierung in der Mikrowelle (Behandlung der Objektträger 6 x 5 Minuten bei 600 Watt in Citratpuffer gefüllten Küvetten)
- 5 Minuten Abkühlen in Waschpuffer
- Auftragen von ca. 140 µl Primärantikörper in der jeweils benötigten Endverdünnung – Einwirkzeit 30 min bei Zimmertemperatur
- anschließend mindestens 4mal Spülung in Waschpuffer
- Auftragen des Brückenantikörpers (LINK) mittels Humanserum-RPMI-Gemisch (Verdünnung 1 : 25) – Einwirkzeit 30 min
- anschließend mindestens 3mal Spülung in Waschpuffer
- Auftragen des Endantikörpers (APAAP-Komplex) mit RPMI auf eine Endkonzentration von 1 : 50 verdünnt – Einwirkzeit 30 min
- anschließend 3mal Spülung in Waschpuffer
- erneutes Auftragen des Brückenantikörpers (Reaktionsverstärkung) – Einwirkzeit 10 min
- anschließend 3mal Spülung in Waschpuffer
- erneutes Auftragen von APAAP-Komplex – Einwirkzeit 10 min
- anschließend 10mal Spülung in Waschpuffer
- Entwicklung der Reaktion mit Hilfe der Entwicklerlösung auf langsamen Schüttler – Entwicklungszeit 20 – 30 Minuten
- Gegenfärbung mit Hämalun – 1 Minute
- anschließend 2mal Spülung mit Leitungswasser
- Eindecken der fertig gefärbten Präparate mit 170 – 180 °C heißem Glycergel (Fa. DAKO Hamburg)

3.4.1.2 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

- Citratpuffer: 9 ml Stammlösung A + 41 ml Stammlösung B + 450 ml Aqua destilata
 Stammlösung A: 21,01 g Zitronensäure (0,1M) + 1000 ml Aqua dest.
 Stammlösung B: 29,41 g Natriumcitrat (0,1M) + 1000 ml Aqua dest.
- Waschpuffer für 5 l: 4,5 g Tris-Base, 34,25 g Tris-HCl, 43,9 g NaCl in 625 ml Aqua dest. auflösen, pH zwischen 7,4 und 7,6 einstellen und auf 5 l mit Aqua dest. auffüllen
- RPMI-Ansatz: 50 ml RPMI, 450 ml Aqua dest., 50 ml inaktiviertes Rinderserum, 0,5 g Natriumazid, pH zwischen 7,4 und 7,6 einstellen

- Entwicklungslösung:

Entwicklungspuffer: 87 g NaCl,
 15 g Tris HCl,
 49 g Tris Base,
 1750 ml Aqua dest.

Propandiol: 21 g Propandiol,
 1000 ml Aqua dest.

Neufuchsin: 5 g Neufuchsin,
 100 ml 2 N HCl

Herstellung:

1. Entwicklungspuffer und Propandiol zusammengießen, pH auf 9,75 einstellen
2. Laevamisol (20 mg/Küvette) abwiegen und der o.g. Lösung hinzufügen
3. Lösung 1: Natriumnitrit (10 mg/Küvette) abwiegen und in 250 µl Aqua dest./Küvette auflösen
4. Lösung 2: Naphtol (25 mg/Küvette) abwiegen und in 300 µl Dimethylformamid auflösen
5. Neufuchsin (100 µl/Küvette) abmessen und der Lösung 1 hinzufügen
6. Lösungen 1 und 2 für 1 – 2 Minuten stehenlassen
7. Lösung 1 der Entwicklungspuffer-Propandiol-Lösung zugeben
8. Lösung 2 der Entwicklungspuffer-Propandiol-Lösung zugeben
9. pH-Wert der Gesamtlösung auf 8,80 einstellen
10. Gesamtlösung filtrieren

Hämalaun: 1 g Hämatoxylin + 0,2 g NaJO₃ + 50 g Kalialaun + 1000 ml Aqua dest. + 50 g Chloralhydrat + 1 g Zitronensäure

3.4.1.3 Verwendete Primärantikörper

Für die immunhistochemische Analyse des Tumormaterials wurden Primärantikörper gegen folgende Epitope verwendet:

- Cell CD 31 (PECAM-1) (Klon JC/70A), (Maus anti-Human), monoklonal, Typ IgG1, Kappa, Konzentration 0,35 mg/ml, Katalognummer M 0823, DAKO Hamburg, Verdünnung 1:40
- Angiotensin-Converting-Enzym – CD 143 (ACE) (Klon CG2), (Maus), monoklonal, Typ IgG1, lyophilisiert, Katalognummer T-1129, Chargennummer 1193-36-18, BMA, Verdünnung 1:80 nach Rekonstitution in 1 ml Aqua dest.

Folgende Antikörper wurden als Sekundär- bzw. Tertiärantikörper zur Detektion verwendet:

- LINK Kaninchen anti-Maus Immunglobuline, polyklonal, überwiegend IgG, Chargennummer 065, Katalognummer Z 0259, DAKO Hamburg, Verdünnung 1:250
- APAAP Mouse Monoclonal (Klon AP7/6/7), Typ IgG1, Kappa, Konzentration 0,12 mg/ml, Chargennummer 025, Katalognummer D 651, DAKO Hamburg, Verdünnung 1:50

3.4.2 Auswertung der Immunhistochemie von CD 31

Unterschieden wird zwischen schwacher Kapillarisierung (1 bis 20 Kapillaren pro Gesichtsfeld), mittlerer Kapillarisierung (21 bis 60 Kapillaren pro Gesichtsfeld) und starker Kapillarisierung (> 60 Kapillaren pro Gesichtsfeld).

3.4.3 Auswertung der Immunhistochemie von CD 143

Für den CD 143-Antikörper erfolgt die Auswertung der immunhistochemischen Schnitte nach den Richtlinien von Remmele und Stegner (1987). Der genannte immunreaktive Score (IRS) berücksichtigt die beiden Parameter Färbeintensität (Staining Intensity = SI) und den Prozentsatz der positiven Zellen (PP) und wird aus dem Produkt beider Parameter errechnet. Bei der Beurteilung ist der vorherrschende Intensitätsgrad maßgebend. Die Färbeintensität wird wie folgt unterteilt:

- 0 = keine Färbeintensität
- 1 = schwache Färbereaktion
- 2 = mäßige Färbereaktion
- 3 = starke Färbereaktion

Der Prozentsatz positiver Zellen wird eingeteilt in:

- 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 ein Maximalwert des IRS von 12. Die Unterteilung des Prozentsatzes der positiven Zellen trägt auch dem Umstand Rechnung, dass diesem eine besondere Bedeutung zukommt (Remmele und Stegner, 1987). Für die Auswertung der Ergebnisse wurden die IRS wie folgt zusammengefasst:

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

3.5 Statistik

Die Datenerfassung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes „SPSS for Windows“, Version 7.5. Grundlage für die klinischen Daten war die Datenbank des Tumorzentrums Gießen (Leiter: Prof. Dr. med. H. v. Lieven), wobei die Datensätze überprüft und um o.g. klinische, histologische und immunhistochemische Parameter ergänzt wurden. Bei der statistischen Datenanalyse wurden folgende Verfahren verwendet: Bivariate Korrelationen, Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen und Residualanalyse.

Das Vorhandensein bzw. das Fehlen von postoperativen Tumorresiduen hat unmittelbare Auswirkungen auf Prognose und Therapie. Daher erfolgen die Auswertungen der Prognosefaktoren nicht nur am Gesamtkollektiv, sondern auch selektiv an den Untergruppen der Patientinnen ohne (R0 und R1) und mit makroskopischem postoperativem Resttumor (R2). Eine sichere Unterscheidung zwischen Patientinnen mit R0- und R1-Resektion war aufgrund der Angaben in den Operationsberichten und der dazugehörigen Histologie nur in wenigen Fällen zweifelsfrei möglich, so dass auf diese Unterscheidung verzichtet werden musste. Insbesondere Patientinnen mit makroskopischem Resttumor sind als Hochrisiko-Kollektiv für die Analyse prognostischer und prädiktiver Faktoren besonders geeignet, da es sich überwiegend um Patientinnen in fortgeschrittenen Tumorstadien handelt, bei denen von einer Heilung durch die Operation nicht ausgegangen werden kann. Der Einfluss verschiedener tumorbiologischer Faktoren und therapeutischer Verfahren kann daher ohne Beeinflussung durch die erfolgte operative Maßnahme geprüft werden.

Die Korrelationen werden mit den Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Spearman zweiseitig geprüft und tabellarisch dargestellt. Nicht gesondert aufgeführt werden die Ergebnisse der Radikaloperation, postoperativer Resttumor und Durchmesser des postoperativen Resttumors, Therapieerfolg und Verletzungen des Therapieprotokolls.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv, klinische und pathologische Daten

Die Krankenakten von 221 Patientinnen, die im Zeitraum von 1982 bis 1996 in der Abteilung für Gynäkologische Onkologie und Strahlentherapie der Frauenklinik der Justus-Liebig-Universität mit histologisch gesicherter Diagnose Ovarialkarzinom behandelt wurden, sind bei der Auswertung berücksichtigt worden. Dabei befanden sich die Mehrzahl der Fälle in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung, d.h. in 38,5 % der Fälle wurde ein Tumor im FIGO-Stadium III diagnostiziert. In 15,4 % der Fälle wurde ein Tumor im FIGO-Stadium IV diagnostiziert. Die fortgeschrittenen Stadien FIGO III und IV machten 53,9 % und damit mehr als die Hälfte des Gesamtkollektives aus. In 26,7 % der Fälle lag ein FIGO-Stadium I vor, d.h. der Tumor war auf ein Ovar oder beide Ovarien begrenzt. Bei 17,2 % der Fälle fand sich ein FIGO-Stadium II entsprechend einer Ausbreitung des Tumors auf andere Beckengewebe ohne Metastasierung. Bei fünf Patientinnen konnte das Stadium retrospektiv nicht exakt bestimmt und überprüft werden.

Bei der Hälfte (57 %) der Patientinnen lag bei Diagnose kein Aszites vor. Bei 8,2 % der Erkrankten ließ sich eine Aszitesmenge von weniger als 500 ml nachweisen. In 32,6 % der Fälle lag die Aszitesmenge oberhalb von 500 ml. In wiederum vier Fällen konnte die Aszitesmenge retrospektiv nicht bestimmt werden. Die Auswertung des histologischen Differenzierungsgrades zeigte die folgende Verteilung: In 56,2 % der Fälle lag ein schlecht differenzierter Tumor vor (entsprechend einem G3-Tumor). Nur 17,5 % der Patientinnen hatten einen gut differenzierten Tumor (G1). Bei 26,3 % der Patientinnen war eine mäßige Differenzierung (G2) zu registrieren. Bei 84 Fällen (= 38 %) des Gesamtkollektives konnte retrospektive keine Gradingeinteilung durchgeführt werden. Im Hinblick auf die Einflussgröße postoperativer Tumorrest zeigte sich, dass bei der Hälfte der Patientinnen (51,6 %) kein Tumorrest verblieb. Bei 47,0 % verblieben postoperative Tumorreste, die in zwei Gruppen (< 2 cm und > 2 cm) unterteilt wurden (Abbildung 10).

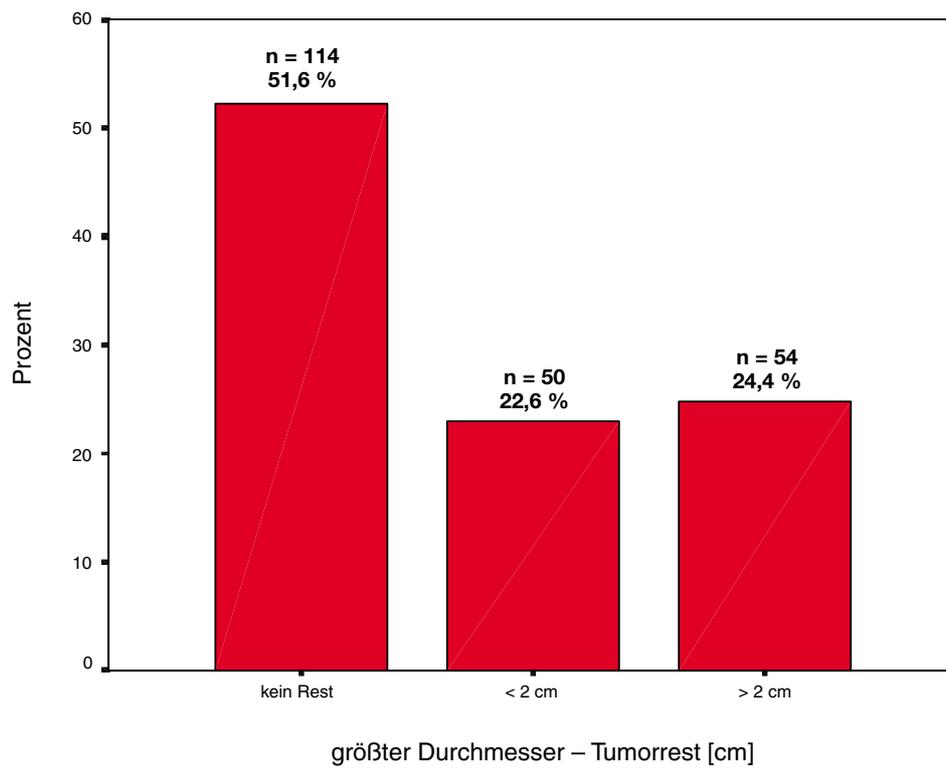


Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung des postoperativen Tumorrestes.

Im Hinblick auf das Alter bei Diagnose lag der Mittelwert bei 60,6 Jahren und der Median bei 62,60 Jahren. Die Standardabweichung betrug 12,4 Jahre. Das Erkrankungsalter lag in der Mehrzahl der Fälle zwischen 50 und 80 Jahren (= 78,3 %). Patientinnen unter 50 Jahre waren nur zu 17,7 % im Kollektiv repräsentiert, Patientinnen unter 30 Jahre nur zu 2,3 % (Abbildung 11).

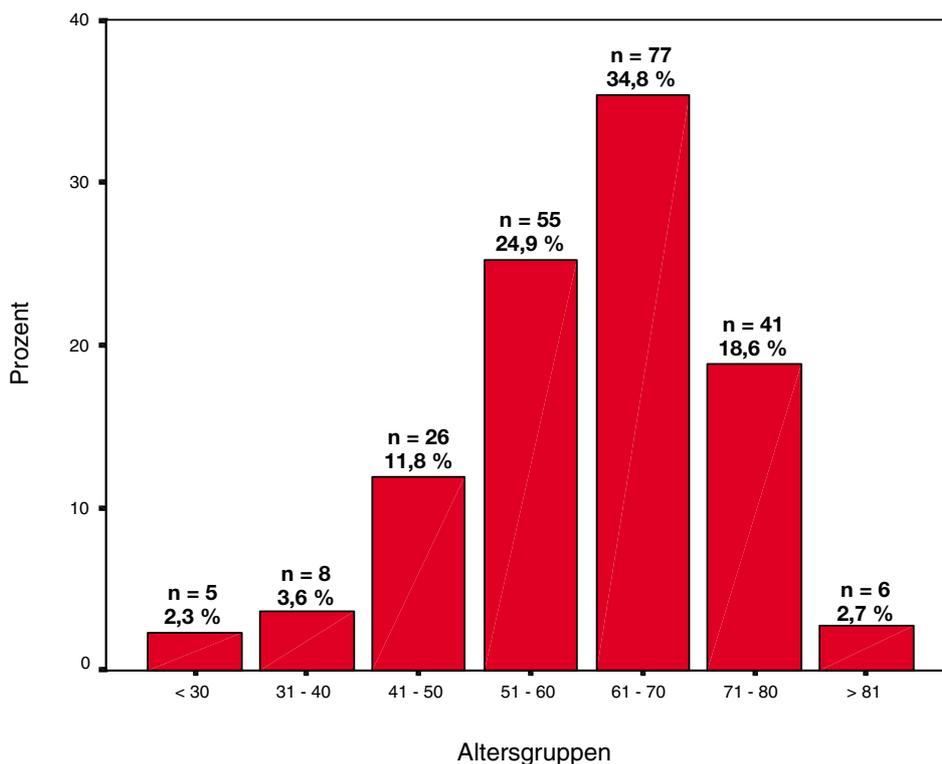


Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung des Alters der Patientinnen bei Diagnose.

Häufigster histologischer Tumortyp waren die serösen Ovarialkarzinome mit nahezu der Hälfte aller Fälle (48,8 %). An zweiter Stelle folgten die transitionalzelligen Tumore mit einer Häufigkeit von 21,3 % (n = 47 Fälle). Muzinöse Karzinome standen mit 12,7 % der Fälle an dritter Stelle der Häufigkeitsrangliste. Endometrioiden Karzinome folgten mit 6,8 %. Die Gruppe der klarzelligen Karzinome war mit 8,6 % vertreten, weiter undifferenzierte Karzinome traten mit 2,3 % eher selten auf.

Zur Therapie fanden sich in den Akten folgende Angaben: Eine Radikaloperation mit Entfernung des Primärtumors, der intra- und retroperitonealen Lymphknoten, Hysterektomie, Adnektomie sowie Omentektomie wurde bei 52,0 % der Patientinnen durchge-

führt. Die Behandlung erfolgte stadiengerecht in Anlehnung an den Washingtoner Konsensus (1994).

Als inoperabel wurden 46,6 % der Fälle eingestuft. Mehrheitlich unterzogen sich fast Dreiviertel aller Patientinnen (70,1 %) einer Chemotherapie. Eine Bestrahlung wurde bei 77,4 % zum Teil alleine, zum Teil in sequentieller Folge mit einer Chemotherapie durchgeführt. Unter den Patientinnen mit postoperativem Tumorrest konnte durch die nachfolgende Therapie bei etwa der Hälfte der Patientinnen (48,8 %) eine komplette Remission erreicht werden, bei 11,3 % der Fälle war eine partielle Remission eingetreten. Ungünstigere Verläufe waren seltener. In 7,2 % wurde das Fortschreiten der Erkrankung durch die Therapie verhindert. Bei 27,6 % wuchs der Tumor trotz Therapie weiter. In zwölf Fällen konnte der Krankheitsverlauf und der Therapieerfolg retrospektiv nicht bestimmt werden.

4.2 Häufigkeiten der exprimierten Angiogenesefaktoren CD 31 und CD 143

Folgende Verteilung der Endothelzellmarker wurde gefunden:

1. CD 31: Eine schwache Vaskularisation (1 bis 20 Kapillaren pro Gesichtsfeld) konnte in 16,3 % der Fälle registriert werden. Die mittlere Vaskularisation (21 bis 60 Kapillaren pro Gesichtsfeld) lag mit 46,6 % am häufigsten vor, gefolgt von der starken Vaskularisation (> 60 Kapillaren pro Gesichtsfeld) in 36,5 % der Fälle.
2. CD 143: In 42,5 % der Fälle fehlte die Expression von CD 143 in den Tumorzellen. Eine geringe Expression zeigten 38,3 % aller Tumore. Mittelgradige Expression wurde in 18,7 % der Fälle gefunden, eine starke Expression konnte nur bei einer Patientin (n = 1) diagnostiziert werden.

4.3 Tumorkapillarisation in Korrelation zu klinischen und pathologischen Faktoren

Im Gesamtkollektiv wurden keine Zusammenhänge zwischen der Expression von CD 31 und den verwendeten klinisch-pathologischen Parametern (siehe Abschnitt 3.2) gefunden. Lediglich die durch den Antikörper MIB-1 bestimmte Tumorstadiumsfrak-

tion korrelierte mit der Expression von CD 31 ($r = 0,22$; $p = < 0,01$). Dabei hatten stark vaskularisierte Tumore eine größere Mitoserate zu verzeichnen. Die Expression von CD 143 zeigte keine Wechselbeziehungen.

4.4 Einfluss der Tumorkapillarisation auf die Überlebenswahrscheinlichkeit am Gesamtkollektiv und innerhalb von Untergruppen der klinisch-pathologischen Faktoren

Im Gesamtkollektiv fanden sich keine Zusammenhänge zwischen der Kapillarisation und den Faktoren tumorassoziierter Tod bzw. Überlebenszeit in Jahren. Deswegen wurde im folgenden Abschnitt die Kapillarisation mit dem tumorassozierten Tod bzw. mit der Überlebenszeit in Jahren in Abhängigkeit verschiedener Untergruppen der klinisch-pathologischen Faktoren korreliert.

Folgende Untergruppen wurden gebildet: einzelne FIGO-Stadien; Patientinnen mit und ohne Aszites; Patientinnen mit und ohne postoperativ verbliebenem Resttumor; Tumordifferenzierung (G1 – G3) und Untergruppen des Therapieerfolges. Signifikante Zusammenhänge fanden sich nur zwischen der Expression von CD 31 und dem tumorassozierten Tod bzw. der Überlebenszeit in vereinzelt Untergruppen (s.u.).

4.4.1 Einfluss der Tumorkapillarisation auf die Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des FIGO-Stadiums

Die CD 31-Expression korrelierte signifikant mit dem tumorassozierten Tod ($r = -0,25$; $p < 0,05$) bei Patientinnen in der Untergruppe FIGO-Stadium I und II, wobei eine starke Kapillarisation mit einer schlechten Prognose einherging. In der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse zeigte sich dieser Zusammenhang. Patientinnen mit mittlerer Expression von CD 31 hatten eine mittlere Überlebenszeit von $7,45 \pm 1,22$ Jahren, solche mit starker Expression überlebten im Mittel $7,05 \pm 1,58$ Jahre. Patientinnen mit einer schwachen Kapillarisation hatten eine sehr gute Prognose (Abbildung 12). In den übrigen Untergruppen des FIGO-Stadiums (Stadium III und IV, einzelnen FIGO-Stadien) ließ sich kein Zusammenhang verfolgen.

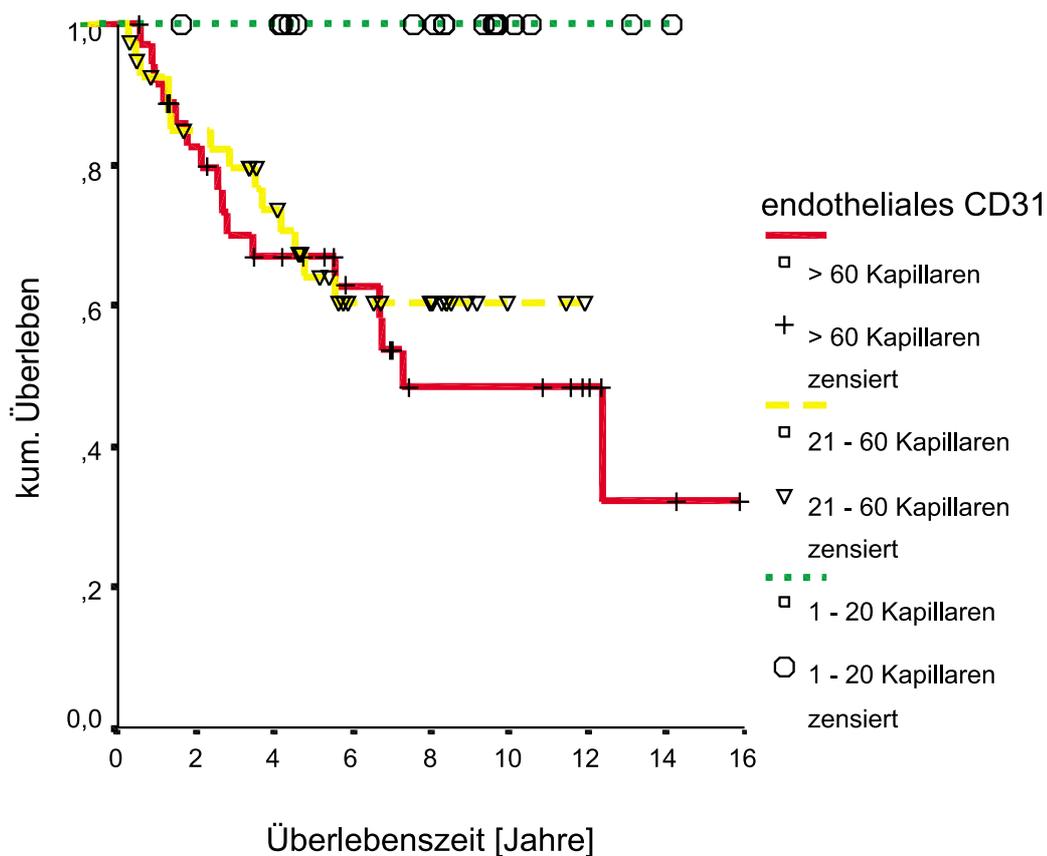


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der Kapillarisation (CD 31) bei Patientinnen im FIGO-Stadium I und II.

	Statistik	Freiheitsgrade	Signifikanzniveau
Log Rank	9,92	2	0,007
Breslow	8,26	2	0,016
Tarone-Ware	9,08	2	0,011

Marker	Expression	Fälle gesamt	Fälle gewertet	Fälle zensiert	Prozent zensiert
CD 31	schwach 1 - 20 Kapillaren	17	0	17	100,00
CD 31	mittel 21 - 60 Kapillaren	42	14	28	66,67
CD 31	stark > 60 Kapillaren	37	16	21	56,76
Insgesamt		96	30	66	68,75

Ein Einfluss von CD 143 auf die Überlebenswahrscheinlichkeit fand sich in den einzelnen Untergruppen nicht.

In der Gruppe der Patientinnen im FIGO-Stadium II fand sich eine inverse Wechselbeziehung zwischen der epithelialen CD 143-Expression und der Tumordifferenzierung ($r = -0,48$; $p < 0,05$). Je stärker die Expression von CD 143 ausgeprägt war, desto besser war der Tumor differenziert.

4.4.2 Einfluss der Tumorkapillarisation auf die Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Aszitesbildung

In der Untergruppe der Patientinnen ohne Aszites korrelierte die Expression von CD 31 mit dem tumorassoziierten Tod ($r = -0,19$, $p < 0,05$), ebenso mit der Überlebenszeit in Tagen ($r = -0,18$, $p < 0,05$). Eine starke Kapillarisation war mit einer schlechten Prognose verknüpft. In der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse ließ sich der Zusammenhang darstellen. Patientinnen mit schwacher CD 31-Expression überlebten im Mittel $11,60 \pm 1,22$ Jahre, solche mit mittlerer Expression $8,51 \pm 0,84$ Jahre. Die Gruppe mit starker Expression hatte bei mittlerer Überlebenszeit von $6,58 \pm 0,89$ Jahren die schlechteste Prognose (Abbildung 13). Die Untergruppen der Patientinnen mit Aszites (< 500 ml; > 500 ml) zeigten keine Zusammenhänge zwischen der Expression von CD 31 und den verwendeten Parametern. Die Expression von CD 143 zeigte keine Wechselbeziehungen in beiden Untergruppen.

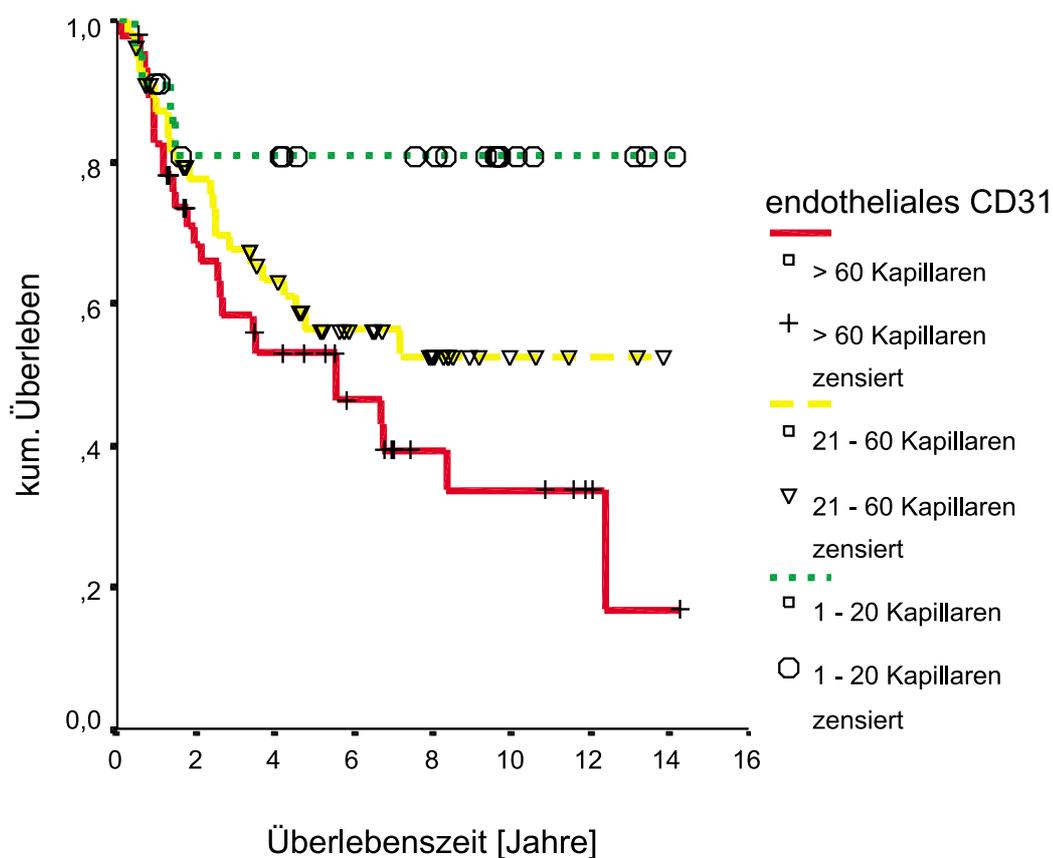


Abbildung 13: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der Kapillarisation (CD 31) bei Patientinnen ohne Aszites.

	Statistik	Freiheitsgrade	Signifikanzniveau
Log Rank	7,81	2	0,020
Breslow	4,24	2	0,120
Tarone-Ware	5,65	2	0,059

Marker	Expression	Fälle gesamt	Fälle gewertet	Fälle zensiert	Prozent zensiert
CD 31	schwach 1 - 20 Kapillaren	22	4	18	81,82
CD 31	mittel 21 - 60 Kapillaren	56	23	33	58,93
CD 31	stark > 60 Kapillaren	47	26	21	44,68
Insgesamt		125	53	72	57,60

4.4.3 Einfluss der Tumorkapillarisation auf die Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des postoperativen Tumorrestes

In der Untergruppe der Patientinnen ohne postoperativen Tumorrest korrelierte die CD 31-Expression mit dem Tumortod ($r = -0,24$; $p < 0,05$) und der Überlebenszeit in Tagen ($r = 0,21$; $p < 0,05$). Eine stärkere Kapillarisation zeigte eine schlechtere Prognose. In der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse wurde der Zusammenhang deutlich. Patientinnen mit schwacher CD 31-Expression hatten ein mittleres Überleben von $13,41 \pm 0,69$ Jahren. Eine mittlere Expression stand für ein mittleres Überleben von $10,67 \pm 0,92$ Jahren. Patientinnen mit starker CD 31-Expression überlebten im Mittel $8,33 \pm 1,33$ Jahre (Abbildung 14). Die Untergruppen mit postoperativ verbliebenem Tumorrest zeigten keine Wechselbeziehungen. Die Expression von CD 143 zeigte keine Wechselbeziehungen.

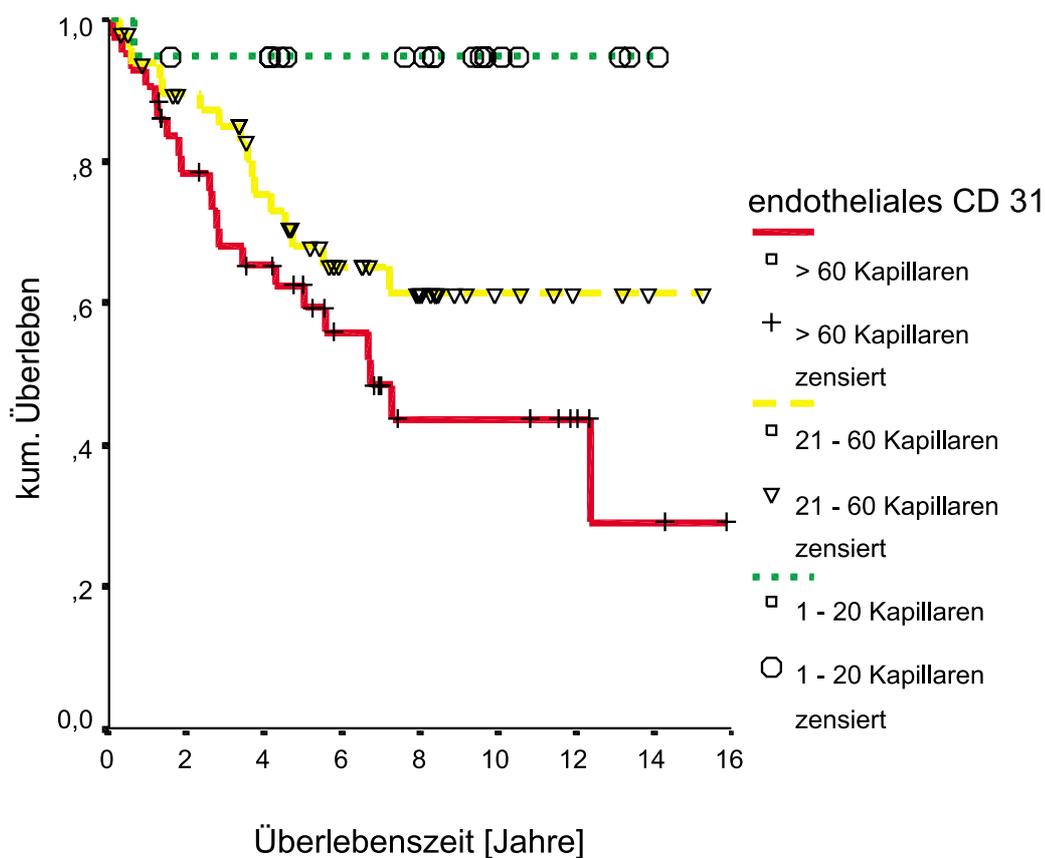


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der Kapillarisation (CD 31) bei Patientinnen ohne postoperativen Tumorrest.

	Statistik	Freiheitsgrade	Signifikanzniveau
Log Rank	11,19	2	0,003
Breslow	8,62	2	0,013
Tarone-Ware	9,87	2	0,007

Marker	Expression	Fälle gesamt	Fälle gewertet	Fälle zensiert	Prozent zensiert
CD 31	schwach 1 - 20 Kapillaren	19	1	18	94,74
CD 31	mittel 21 - 60 Kapillaren	50	16	34	68,00
CD 31	stark > 60 Kapillaren	43	21	22	51,16
Insgesamt		112	38	74	66,07

4.4.4 Einfluss der Tumorkapillarisation auf die Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Tumordifferenzierung

Die Untergruppe der Patientinnen mit gut differenziertem Tumor (G1) lieferte einen Zusammenhang zwischen der Expression von CD 31 und dem tumorassoziierten Tod ($r = -0,56$; $p < 0,01$). Je stärker die Expression, desto schlechter die Prognose. In den beiden anderen Untergruppen mit mäßig differenziertem Tumor und schlecht differenziertem Tumor fanden sich keine Zusammenhänge. Eine Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse konnte auf Grund der geringen Fallzahl in diesen Untergruppen nicht erstellt werden. Auch fanden sich keine Wechselbeziehungen zwischen der Expression von CD 143 und den einzelnen Untergruppen.

4.4.5 Einfluss der Tumorkapillarisation auf die Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des Therapieerfolges

Die Untergruppe der Patientinnen mit einer kompletten Remission lieferte einen signifikanten Zusammenhang zwischen der CD 31-Expression und dem tumorassoziierten Tod bzw. der Überlebenszeit. Je stärker die Kapillarisation in dieser Gruppe ausgeprägt war, desto schlechter war die Prognose ($r = -0,22$; $p < 0,05$). In der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse konnte der Zusammenhang dargestellt werden. In der Gruppe der Patientinnen mit kompletter Remission hatten die Patientinnen mit schwach kapillarisiertem Tumor ein mittleres Überleben von 13,49 \pm 0,61 Jahre, Patientinnen mit einem mäßig kapillarisiertem Tumor lebten im Mittel 12,68 \pm 0,81 Jahre und Patientinnen mit einem stark kapillarisiertem Tumor waren im Mittel 9,86 \pm 1,13 Jahre am Leben (Abbildung 15). In den drei anderen Untergruppen (partielle Remission, Stillstand der Erkrankung, Fortschreiten der Erkrankung) ließ sich ein solcher Zusammenhang nicht mehr aufzeigen. Die Expression von CD 143 zeigte keine Wechselbeziehungen.

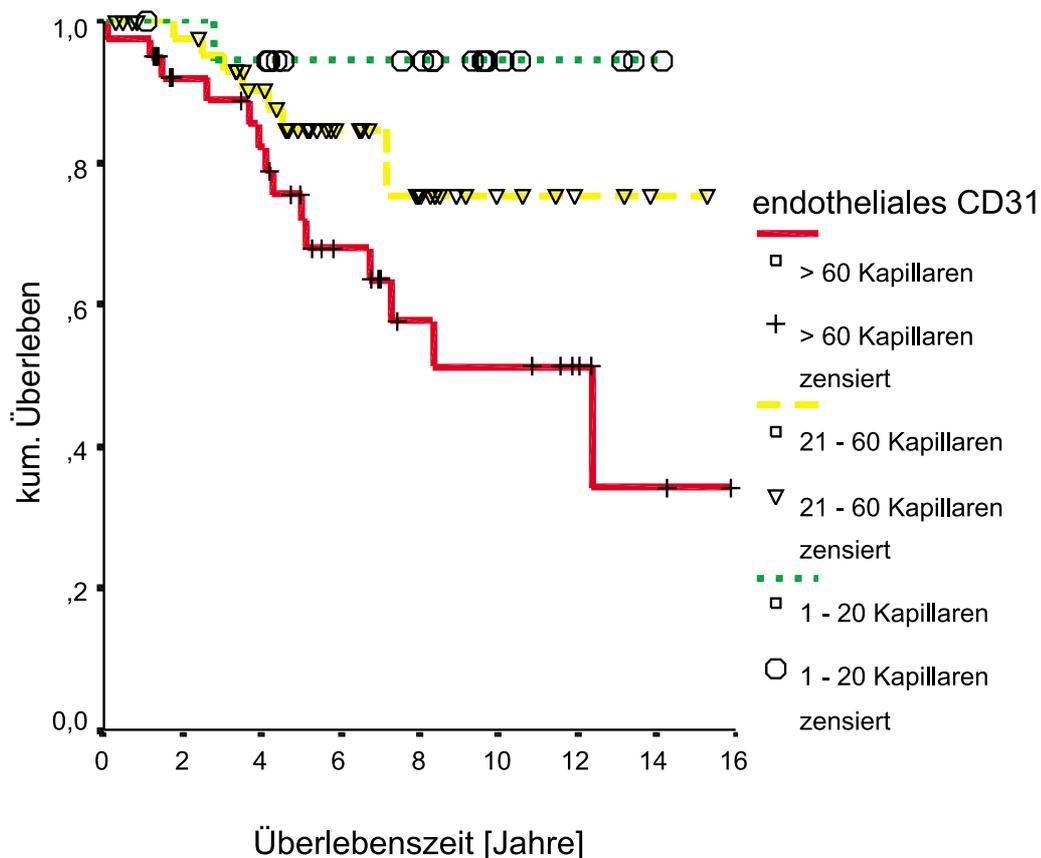


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der Kapillarisation (CD 31) bei Patientinnen mit kompletter Remission.

	Statistik	Freiheitsgrade	Signifikanzniveau
Log Rank	9,71	2	0,007
Breslow	6,99	2	0,030
Tarone-Ware	8,16	2	0,016

Marker	Expression	Fälle gesamt	Fälle gewertet	Fälle zensiert	Prozent zensiert
CD 31	schwach 1 - 20 Kapillaren	19	1	18	94,74
CD 31	mittel 21 - 60 Kapillaren	47	8	39	82,98
CD 31	stark > 60 Kapillaren	39	14	25	64,10
Insgesamt		105	23	82	78,10

4.5 Klinisch-pathologische Einflussgrößen und Überlebenszeit am Gesamtkollektiv

Im untersuchten Kollektiv zeigten die etablierten Prognosefaktoren eine signifikante Korrelation zur Überlebenszeit und bestätigten damit ihren Einfluss (Tabelle 6).

Tabelle 6: Wechselbeziehung zwischen klassischen Einflussgrößen und der Überlebenszeit (Tagen).

Korrelierter Faktor	Überlebenszeit (Tagen)
	r
FIGO-Stadium	-0,43 **
Aszitesmenge	-0,34 **
Alter bei Diagnose	-0,22 **
Tumorgrading	-0,46 **
Wachstumsfraktion (Mitosen)	-0,26 **
Postoperativer Tumorrest	-0,56 **

r = Pearson's Korrelationskoeffizient

** = Signifikanz-Niveau < 0,01

Insgesamt korrelierte die Expression von CD 31 mit dem tumorassoziierten Tod und der Überlebenszeit (Tagen) signifikant in Untergruppen, die ein frühes Stadium der Krankheit repräsentierten (FIGO-Stadium I und II, Patientinnen ohne Aszites, Patientinnen ohne postoperativ verbliebenen Resttumor, gut differenzierte Tumore, Patientinnen mit kompletter Remission nach Therapie). Dabei hatten die Patientinnen in diesen Untergruppen mit stärker kapillarisierten Tumoren die schlechtere Prognose.

4.6 Multivariate Residualanalyse des Einflusses der Tumorkapillarisation auf die Überlebenswahrscheinlichkeit bestimmter Patientengruppen

Ein Zusammenhang der Kapillarisation mit der Überlebenswahrscheinlichkeit konnte für bestimmte Untergruppen der Patientinnen aufgezeigt werden. Dabei wurde aber nicht der starke Einfluss der klassischen Prognosefaktoren auf diese Ergebnisse berücksichtigt. Um den realen Effekt der Kapillarisation herauszufiltern, wurde in der Folge eine multivariate Residualanalyse durchgeführt. Zunächst wurden alle unabhängigen Variablen, die hoch signifikant mit dem Überleben korrelierten (FIGO-Stadium, Aszites, postoperativer Tumorrest, Alter, Tumorstadium, Tumordifferenzierung) selektiert. Danach folgte die Bildung der Differenzen (Residuen) zwischen den beobachteten Werten und den durch die Regression geschätzten Werten. Dies entspricht einer Schätzung der Fehlervariablen, die nicht von den unabhängigen Variablen abhängt. Eine theoretische Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse ohne den Effekt der klassischen Prognosefaktoren war somit möglich.

Im Resultat zeigte sich nur innerhalb der Untergruppe der Patientinnen ohne postoperativen Resttumor ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von CD 31 und dem tumorassoziierten Tod bzw. der Überlebenszeit. Patientinnen mit einer mittleren Expression von CD 31 hatten eine mittlere Überlebenszeit von 8,52 Jahren \pm 1,94. Solche mit einer starken Expression überlebten im Mittel 6,65 Jahre \pm 1,02 und hatten die schlechtere Prognose (Abbildung 16).

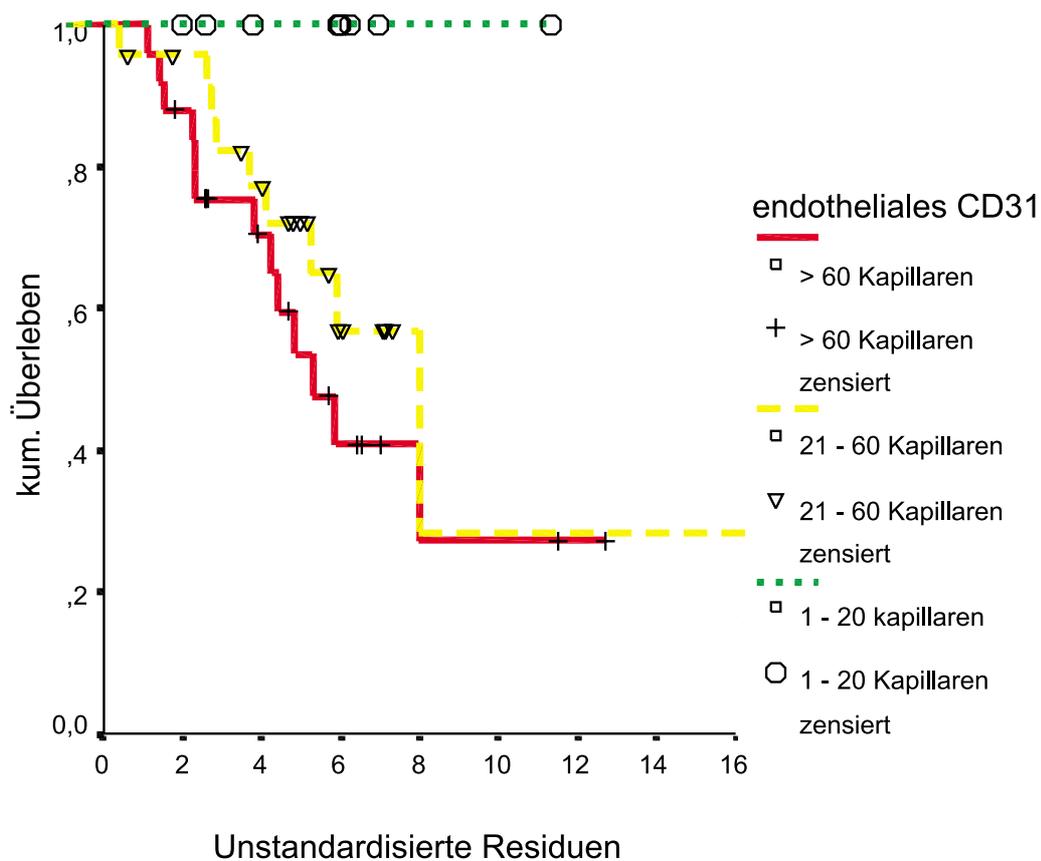


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse der unstandardisierten Residuen bei Patientinnen ohne postoperativen Resttumor.

	Statistik	Freiheitsgrade	Signifikanzniveau
Log Rank	5,52	2	0,063
Breslow	5,22	2	0,074
Tarone-Ware	5,57	2	0,062

Marker	Expression	Fälle gesamt	Fälle gewertet	Fälle zensiert	Prozent zensiert
CD 31	schwach 1 - 20 Kapillaren	8	0	8	100,00
CD 31	mittel 21 - 60 Kapillaren	24	9	15	62,50
CD 31	stark > 60 Kapillaren	25	13	12	48,00
Insgesamt		57	22	35	61,40

Im Gesamtkollektiv und den übrigen vier Untergruppen (FIGO-Stadien, Patientinnen mit und ohne Aszites, Untergruppen des Therapieerfolges, Tumordifferenzierung) konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von CD 31 und der Überlebenszeit gefunden werden.

Die Expression von CD 143 zeigte weder im Gesamtkollektiv (Abbildung 17), noch bei Betrachtung der einzelnen Untergruppen Zusammenhänge mit der Überlebenszeit.

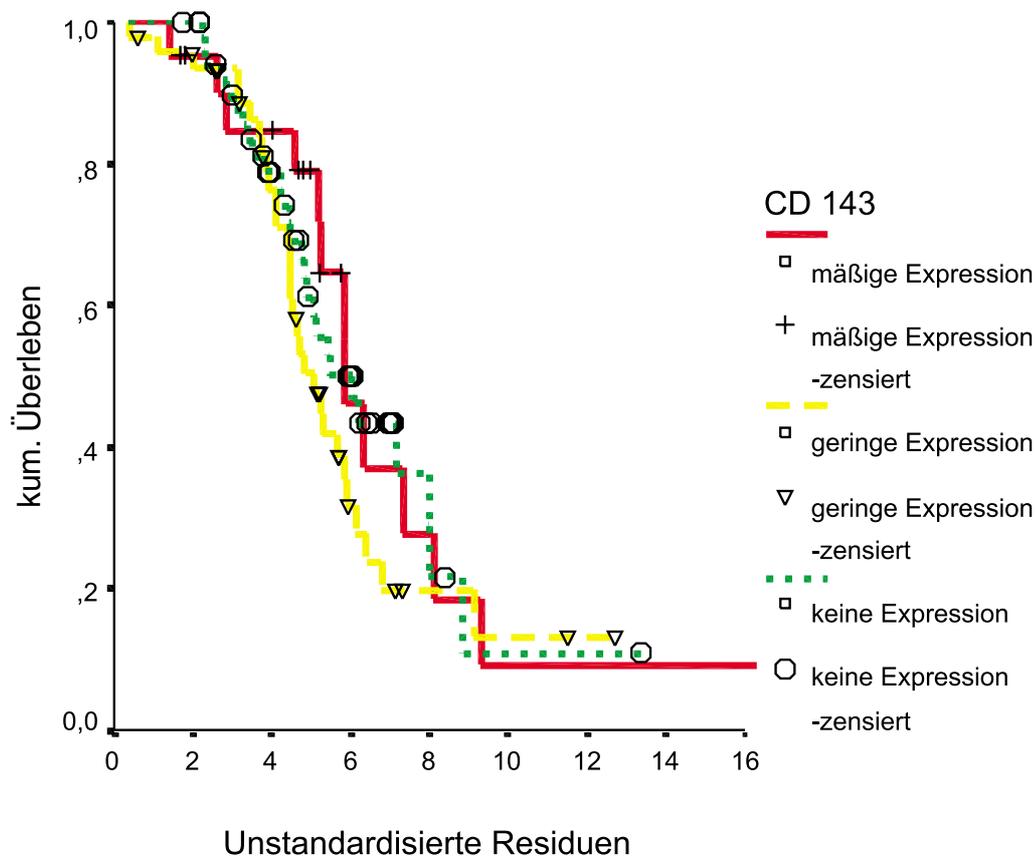


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse der unstandardisierten Residuen am Gesamtkollektiv.

	Statistik	Freiheitsgrade	Signifikanzniveau
Log Rank	1,77	2	0,412
Breslow	2,13	2	0,345
Tarone-Ware	2,32	2	0,314

Marker	Expression	Fälle gesamt	Fälle gewertet	Fälle zensiert	Prozent zensiert
CD 143	keine Expression 1 – 20 Kapillaren	52	27	25	48,08
CD 143	geringe Expression 21 – 60 Kapillaren	47	30	17	36,17
CD 143	mäßige Expression > 60 Kapillaren	21	12	9	42,86
Insgesamt		120	69	51	42,50

4.7 Histologische Abbildungen der Tumorschnitte mit exemplarischer Anfärbung von CD 31 und CD 143

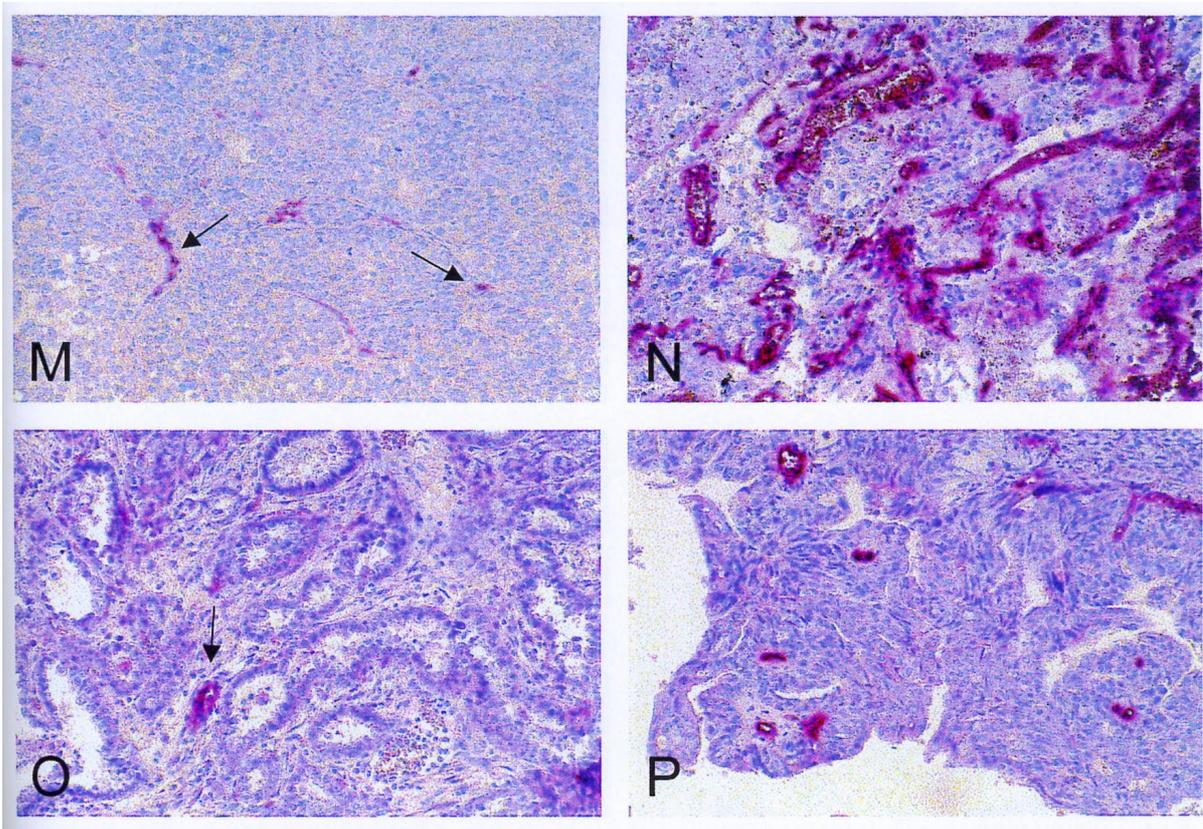


Abbildung 18: Exemplarische Abbildungen der Immunhistochemischen Reaktionsmuster der Endothelzellmarker CD 31 (M und N) und CD143 (O und P). Schwach exprimierende Tumore (M und O) sind Tumoren mit starker Vaskularisierung gegenübergestellt (N und P). Die Pfeile in M weisen auf eine spärlich vorliegende Kapillarisation in diesem Tumor hin.

5 Diskussion

Die Kapillarisation von Tumoren ist in vielen wissenschaftlichen Arbeiten als prognostischer Marker bei verschiedenen Krebserkrankungen beschrieben worden. Beim Mammakarzinom (Weidner et al., 1991), beim Bronchialkarzinom (Baillie et al., 2001), beim Blasenkarzinom (Dickinson et al., 1994) und beim malignen Melanom (Berger et al., 1993) kommt ihr Bedeutung zu. Für das Ovarialkarzinom liegen ebenfalls verschiedene Arbeiten vor, die die Angiogenese und deren Einfluss auf den Krankheitsverlauf beschreiben (Abulafia et al., 1997; Alvarez et al., 1999; Darai et al., 1998; Hollingsworth et al., 1995; Obermair et al., 1999; van Diest et al., 1995). Allerdings handelt es sich meist um kleinere Kollektive.

Die vorliegende Studie soll erstmals die Angiogenese und deren Einfluss auf die Prognose am größeren Tumorkollektiv untersuchen. Sie beschreibt die Präsenz von CD 31 (PECAM-1) und CD 143 (Angiotensin-Converting-Enzym) und damit den Einfluss der Angiogenese in malignen Ovarialtumoren. Die durch Expression von CD 31 und CD 143 ausgedrückte Kapillarisation bzw. die Angiogenese wird getrennt auf Korrelationen mit den etablierten Prognosefaktoren und auf den Einfluss hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit des Patientenkollektives sowie Untergruppen überprüft. Untersucht werden auch die bisher etablierten klassischen Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom.

Die in der Literatur beschriebenen klassischen Einflussgrößen können in dieser Arbeit bestätigt werden. Der erwartete Zusammenhang zwischen dem Krankheitsstadium nach FIGO und der Überlebenswahrscheinlichkeit lässt sich eindrucksvoll demonstrieren. Im untersuchten Kollektiv lässt sich die günstigere Prognose der FIGO-Stadien I und II darstellen. Die FIGO-Stadien III und IV zeigen deutlich verminderte mittlere Überlebenszeiten (Brinkhuis et al., 1996; Chi et al., 2001).

Ebenfalls bekräftigt werden kann der Einfluss der Aszitesmenge auf die Überlebenswahrscheinlichkeit. Patientinnen ohne Aszitesbildung haben eine deutlich bessere Prognose als Patientinnen mit Aszitesbildung (Chi et al., 2001). Nach fünf Jahren leben 60 % der Patientinnen ohne Aszitesbildung, gegenüber 20 % der Patientinnen mit As-

zites. Auch im untersuchten Kollektiv finden wir 60 % lebende Patientinnen ohne Aszites nach einer Zeitspanne von fünf Jahren. Weniger als 40 % der Patientinnen mit 500 ml und weniger Aszites leben nach fünf Jahren und unter 20 % der Patientinnen sind mit mehr als 500 ml Aszites nach fünf Jahren noch am Leben. Die Bildung von Aszites, auch die Menge, hat signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit. Ein Zusammenhang zwischen der Expression von CD 31 und der Aszitesbildung und Menge kann nicht hergestellt werden. Dies bekräftigen neuere Studien (Verheul et al., 2000) zur Theorie der Aszitesbildung, die von VEGF als wichtigstem Faktor ausgehen. Neben der insuffizienten Lymphdrainage als Folge der Tumordinvasion in abfließende Lymphgefäße, beschreibt Verheul fünf Isoformen des VEGF-Faktors und zwei verschiedene endotheliale Rezeptoren für diesen Faktor. Eine signifikant höhere Konzentration von VEGF fand Verheul in Aszites bzw. Pleuraergussproben von 47 Patienten mit einer Krebserkrankung, im Gegensatz zu elf Patienten ohne ein Malignom (Erkrankungen hier: Herzinsuffizienz, Leberzirrhose). Eine Blockade der Rezeptoren bzw. eine Behandlung mit Antikörpern gegen VEGF konnten im Tierexperiment die Aszitesbildung minimieren (Luo et al., 1998). Es wird weiter von einer Permeabilitätssteigerung der Endothelzellen durch den VEGF-Faktor ausgegangen.

Die Tumordifferenzierung hat literaturkonform Einfluss auf die Prognose der Erkrankung. Wie bekannt und erwartet haben Patientinnen mit einem gut differenzierten Tumor eine deutlich gesteigerte Lebenserwartung, während die Überlebenszeit mit abnehmender Differenzierung ebenfalls abnimmt.

Der postoperativ verbliebene Tumorrest kann als wichtige Einflussgröße beschrieben werden. Ähnlich der Arbeit von Chi et al. (2001) haben Patientinnen ohne postoperativen Resttumor eine entschieden bessere Überlebenschance als solche mit Tumorresiduen nach der Operation.

Das Alter bei Diagnose hat im untersuchten Kollektiv Einfluss auf die Prognose. Die Auswertung der Altersverteilung stimmt mit den Literaturangaben überein. Das Ovarialkarzinom ist nach wie vor eine Krebserkrankung der älteren Frau, wenn gleich das Durchschnittsalter der Erstmanifestation in den letzten Jahrzehnten sinkt. Patientinnen jenseits der 50-Jahre-Grenze haben schlechtere Überlebenschancen als jünge-

re. Dies stimmt mit der gängigen Literatur (Brinkhius et al., 1996; Thigpen et al., 1993) überein.

In Bezug auf das Wachstumsformat zeigt das untersuchte Kollektiv ebenfalls eine in der Literatur (Pfleiderer et al., 1991) vorbekannte Verteilung. Die serösen und muzinösen Karzinome kommen in dieser Reihenfolge am häufigsten vor, endometrioide und klarzellige Karzinome liegen darunter, undifferenzierte und unklassifizierbare sind sehr selten. Im Einklang zur Arbeit von Ordonez (2000) stellt die Gruppe der transitionalzelligen Karzinome eine eigene Formation innerhalb der Ovarialkarzinome dar. Ordonez (2000) zeigt immunhistochemisch phenotypisch eindeutige Unterschiede zwischen transitionalzelligen Karzinomen der Blase und des Ovars. Insgesamt verhält sich das untersuchte Kollektiv in Bezug auf die etablierten Einflussgrößen literaturkonform.

Zur Beantwortung der Frage, ob die Angiogenese beim Ovarialkarzinom erneut als Einflussgröße bestätigt werden kann und wie sie mit klinisch-pathologischen Daten in Zusammenhang steht, wird in dieser Studie anhand von Operationspräparaten von 221 Patientinnen mit Ovarialkarzinom zunächst die intratumorale Gefäßdichte mit Hilfe der CD 31-Expression ermittelt und anschließend mit klinischen und pathologischen Faktoren in Beziehung gesetzt. Im Resultat korreliert die Expression von CD 31 vorwiegend in frühen Krankheitsstadien mit der Überlebenszeit. Eine positive Korrelation von CD 31-Expression und Überlebenszeit oder tumorabhängigem Tod bei Patientinnen ohne postoperativen Resttumor, bei Patientinnen ohne Aszites, bei gut differenzierten Tumoren und bei Patientinnen im FIGO-Stadium I oder II deutet auf einen Einfluss der Kapillarisation vor allem zu Beginn der Erkrankung hin. In diesen Untergruppen spricht eine erhöhte Vaskularisierung des Tumors für eine schlechtere Prognose. Ähnliche signifikante Zusammenhänge können bei Progress der Erkrankung (höhere FIGO-Stadien, Aszitespräsenz, verbliebener Resttumor) nicht mehr nachvollzogen werden. In der Literatur wird dies kontrovers dargestellt.

In der Arbeit von Darai et al. wird der Einfluss der CD 31-Expression auf die Prognose von 20 Patientinnen (10 seröse, 10 muzinöse) mit Ovarialkarzinom beschrieben. Eine höhere Gefäßdichte in sogenannten „hot spot areas“ korreliert mit einer schlechteren Prognose. Die Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier zeigt eine deutliche Reduk-

tion der Überlebenszeit bei den Tumoren, die stärker vaskularisiert sind. Weiterhin beschreibt Darai eine Korrelation zwischen der Expression von CD 31 und a) dem histologischen Differenzierungsgrad (geringe Differenzierung entspricht größerer Kapillarisation), b) dem FIGO-Stadium (Patientinnen mit geringer Kapillarisation repräsentieren niedrige FIGO-Stadien) und c) dem histologischen Typ (seröse und muzinöse Tumore haben eine höhere Kapillarisation). Allerdings verwendet Darai et al. nur 20 Karzinome. Gasparini et al. (1996) können nur Korrelationen zwischen der Kapillarisation und der histologischen Differenzierung (mucinöse Tumore haben größere Kapillarisation) skizzieren.

Van Diest et al. (1995) beschreiben einen tendenziellen Zusammenhang zwischen der Kapillarisation und der Prognose bei 49 Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Auch hier haben die Patientinnen mit der größeren intratumoralen Gefäßdichte die schlechtere Prognose. Allerdings erreicht van Diest et al. zum einen keine statistische Signifikanz der Überlebenszeit-Analyse, zum anderen berücksichtigt er nur FIGO-Stadien III und IV, was ihn zum Schluss kommen lässt, der Kapillarisation nur eine untergeordnete Rolle zukommen zu lassen.

In der Arbeit von Obermair et al. (1999) werden 63 Präparate von Patientinnen mit Ovarialkarzinom im Stadium I – III in Bezug auf die Kapillarisation durch die Expression des Markers CD 34 untersucht. Eine Kapillarisation von $> 10/0.25 \text{ mm}^2$ zeigt eine deutlich schlechtere Lebenserwartung (Fünf-Jahre-Überlebensrate unter 30 %), während eine Kapillarisation von $< 10/0.25 \text{ mm}^2$ eine Fünf-Jahre-Überlebensrate von 60 % aufweist. Weiterhin findet Obermair keine Korrelationen der Kapillarisation mit dem Tumorstadium, dem histologischen Wachstumsmuster und dem histologischen Grading, wohl aber mit dem Alter der Patientinnen (ältere Patientinnen haben stärker vaskularisierte Tumore).

In der Arbeit von Schoell et al. (1997) wird ebenfalls der Einfluss der Kapillarisation auf die Überlebenschancen von Patientinnen mit Ovarialkarzinom dargestellt. Allerdings wird hier eine andere Erfassung der Kapillaren mit computergestützter Bildanalyse durchgeführt. Die manuelle Erfassung der Kapillaren wird als subjektiv und ungenau beschrieben, was sich in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen lässt. Eine

günstigere Überlebenszeit geht bei Schoell einher mit einer geringeren Expression der Marker CD 31, CD 34 und Faktor VIII. Keine Korrelationen können mit der Histologie, dem Grading oder dem Tumorrest hergestellt werden.

In der Arbeit von Hollingsworth et al. (1995) werden Ovarialkarzinome in den FIGO-Stadien III und IV auf die Kapillarisation untersucht. Hier dient der Marker CD 34 als Angiogenese-Detektion. Zum krankheitsfreien Überleben konnte ein signifikanter Zusammenhang hergestellt werden. Patientinnen mit verstärkter Angiogenese haben eine schlechtere Prognose.

Insgesamt scheinen die bisherigen Studien darin übereinzustimmen, dass der Grad der Angiogenese beim Ovarialkarzinom einen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit hat. Eine wichtige Rolle der Blutgefäßneubildung bei Krankheitsentstehung, Progression und Metastasierung dieser Erkrankung scheint unbestritten. Größeres Interesse wird der Fragestellung beigemessen, zu welchem Zeitpunkt des jahrelangen Krankheitsverlaufes die Angiogenese entscheidenden Einfluss hat und zu welchem Zeitpunkt sie eine untergeordnete Rolle spielt. Ebenfalls kontrovers werden die Zusammenhänge der Kapillarisation mit klinischen und pathologischen Faktoren wie Wachstumsformat, Grading, Alter der Patientinnen etc. diskutiert.

Eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisbreite sind die in der Literatur beschriebenen Unterschiede zum Einfluss der Kapillarisation, die von Mutin et al. (1997) mit der Vielfalt der in Endothelien vorkommenden Oberflächenantigenen bezeichnet wird. Danach exprimieren Kapillarendothelien unterschiedlich oft und unterschiedlich stark diverse Oberflächenantigene, die Bestimmungsmethoden sind nicht immer einheitlich. In der vorliegenden Arbeit gilt die Expression von CD 31 als Grad der Ausdifferenzierung von Kapillaren. Den weniger ausdifferenzierten Gefäßen bzw. Gefäßendothelien wird nur untergeordnet Rechnung getragen. Ein anderer Aspekt ist die mikroskopische Auswertung und die subjektive Auswahl des Areals im Tumorgewebe mit den höchsten Gefäßanteilen (sog. „hot spot areas“). Diese wird von einigen Autoren kritisch betrachtet. Schoell et al. (1997) verwenden in ihrer Studie eine computergestützte Bildanalyse zur Quantifizierung des Angiogenesepotenzials in Ovarialkarzinomen. Auf diese Art wollten sie den subjektiven Aspekt des „Ausählens der Kapillaren“, die mögliche

schlechte Qualität des Parafinschnittes und übereinanderliegende Kapillaren, die als eine Kapillare gezählt werden, als Fehlerquelle ausschließen. Vergleichende Studien zu dieser Methode fehlen aber bisher.

Die endotheliale Expression von CD 143 markiert nur einen kleinen Teil höher differenzierter Kapillaren (Franke et al., 1997). Eine Tumorzelleexpression ist ferner beim Nierenzellkarzinom (Takada et al., 1985) und bei Neuroblastomen und Phäochromocytom-Zelllinien der Ratte beschrieben worden. Ebenso ist ein heterogenes Expressionsmuster bei gonadalen und extragonadalen Seminomen bekannt. Im untersuchten Gesamtkollektiv sowie in Untergruppen können keine Korrelationen zur Überlebenswahrscheinlichkeit gefunden werden, ebenso nicht bei Patientinnen mit und ohne postoperativem Resttumor. Es finden sich auch keine Korrelationen zu den klassischen Prognosefaktoren, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die endotheliale und tumorzelluläre Expression von CD 143 bei der Prognose des Ovarialkarzinoms keine Rolle spielt.

Eine positive Korrelation zwischen der intratumoralen Gefäßdichte als Maß für die Angiogenese im Primärtumor und seiner Neigung zur Metastasierung kann bisher in zahlreichen Studien dargelegt werden. Charpin et al. (1997) beschreiben, dass die Expression von CD 31 signifikant mit der frühen Metastasenbildung beim Mammakarzinom korreliert. Eine Beziehung zu Alter, Tumorgroße, Grading oder Histopathologie besteht in der Arbeit von Charpin et al. (1997) nicht. Horak et al. (1992) können mit Hilfe des CD 31-Antikörpers eine Korrelation zwischen der Kapillarisation und dem Malignitätsgrad des Mammakarzinoms und dem Lymphknotenstatus aufzeigen. Desweiteren können sie eine höhere Sensitivität des Endothelzellmarkers CD 31 im Vergleich mit dem von Willebrand-Faktor demonstrieren, was die Eignung des Markers zur Detektion der Angiogenese unterstreicht. In Bezug auf die Angiogenese beim Ovarialkarzinom sind bereits viele Studien durchgeführt worden. Shen et al. (2000) können den Einfluss des VEGF-Markers als wichtigen Faktor der Angiogenese auf die Prognose bei 64 Patientinnen mit Ovarialkarzinom zeigen. Die VEGF-Expression korreliert mit dem Krankheitsstadium und mit dem Tumorgading. Patientinnen mit schwacher oder fehlender VEGF-Expression haben eine deutlich bessere Überlebenschance als solche mit starker Expression. Yamamoto et al. (1997) untersuchen den Einfluss der VEGF-Expression bei

110 Patientinnen mit Ovarialtumor (70 Karzinome). Sie können zeigen, dass die Expression von VEGF in den Karzinomen signifikant höher ist, als in den niedrig malignen Tumoren. Desweiteren wird ein positiver Zusammenhang zwischen der VEGF-Expression und dem Krankheitsstadium, dem klarzelligen Tumortyp, einer positiven peritonealen Zytologie und letztendlich der Überlebensrate deutlich.

Auch das an der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen beteiligte Plasminogen-Aktivierungssystem hat beim Ovarialkarzinom Einfluss auf die Prognose.

Die Arbeit von Chambers et al. (1999) skizziert die Präsenz der Marker uPA und PAI-1 in einem Kollektiv von 131 Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Eine starke Expression dieser Marker zeigt einen signifikanten Zusammenhang mit dem krankheitsfreien Intervall und der Überlebenswahrscheinlichkeit.

Kuhn et al. (1999) beschreiben einen Zusammenhang zwischen den Faktoren uPA und seinem Inhibitor PAI-1 und der Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom im Stadium IIIc nach FIGO. In einem Kollektiv von 86 Patientinnen haben die Fälle mit der stärkeren Expression die schlechtere Prognose.

In der Arbeit von Kiziridou et al. (2002) wird die Expression von uPA in verschiedenen Tumorentitäten des Ovars überprüft. Die 16 Fälle mit einem invasiven Karzinom zeigten eine deutlich stärkere Expression von uPA im Vergleich zu 20 gutartigen Ovarialtumoren, was den Stellenwert des Plasminogen-Aktivatorsystems unterstreicht.

Die Gruppe um Duffy et al. (2002) kann die Bedeutung von uPA und seinem Inhibitor PAI-1 beim Mammakarzinom herausheben. Eine stärkere Expression geht mit einer schlechteren Prognose einher. Neben der eigentlichen Angiogenese haben somit auch Faktoren des Plasminogenaktivatorsystems Einfluss auf die Prognose bei gynäkologischen Malignomen.

Insgesamt hat die Angiogenese beim Ovarialkarzinom in der vorliegenden Arbeit eine untergeordnete Bedeutung. Bei Untersuchung des Gesamtkollektives können keine Wechselbeziehungen aufgezeigt werden. Bei Betrachtung von Untergruppen, die ein

frühes Krankheitsstadium repräsentieren, hängt der Grad der Vaskularisierung mit der Prognose zusammen. Eine stärkere Kapillarisation geht mit einer schlechteren Prognose einher. Ob die Angiogenese mit einzelnen klinischen oder pathologischen Größen in Wechselbeziehung steht, ist weiter unklar. In weiteren Studien ist eine einheitliche und standardisierte Methode nötig, um zuverlässige Daten insbesondere in Bezug auf einzelne klinisch-pathologische Faktoren zu erlangen. Als Schlussfolgerung lässt sich formulieren, dass die Rolle der Angiogenese bei der Entwicklung und beim Fortschreiten des Ovarialkarzinoms nicht bis ins letzte Detail verstanden ist. Sicher scheint nicht zuletzt durch die Arbeit von Shen et al. (2000), dass Wachstumsfaktoren wie VEGF ihren Anteil an der Pathophysiologie dieser Erkrankung haben. Die Möglichkeit der Anwendung neuer Therapiestrategien sollte überprüft werden. Hier ist insbesondere an die Angiogenesefaktoren-Inhibition gedacht, die zur Zeit in Kombination mit einer Chemotherapie getestet wird. Weiter unbestritten bleibt der Wert der optimalen operativen Zytoreduktion durch radikale Entfernung des Primärtumors.

6 Zusammenfassung

Die Angiogenese nimmt bei physiologischen Vorgängen des menschlichen Organismus, wie der plazentären und embryonalen Entwicklung, der Gewebeneubildung und Gewebereparatur eine wichtige Stellung ein, spielt aber auch bei der Entstehung von Krankheiten, insbesondere bei der Entwicklung von malignen Tumoren und deren Metastasierung eine Rolle. Tumorwachstum und Metastasierung sind nur durch Einsprossung von Kapillaren und den Tumorzellkontakt mit der Blutzirkulation möglich.

Die vorliegende Dissertationsarbeit untersucht in einem Tumorkollektiv von 221 Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom die Korrelation der Angiogenese zu klinisch-pathologischen Faktoren und den Einfluss der Tumorkapillarisation auf die Prognose der Erkrankung. Als immunhistologische Marker für die Ermittlung der intratumoralen Gefäßdichte wurden die monoklonalen Antikörper gegen das endotheliale Thrombozytenadhäsionsmolekül CD 31 und gegen CD 143 verwendet. Die so detektierten Kapillaren wurden bei 200-facher Vergrößerung in einem repräsentativen Areal (hot spot area) ausgezählt. Anschließend erfolgte die Korrelation der erfassten intratumoralen Gefäßdichte mit klinisch-pathologischen Daten. Im Ergebnis korreliert die Tumorkapillarisation, ausgedrückt durch die Expression von CD 31, vorwiegend in frühen Krankheitsstadien (FIGO-Stadium I und II) oder in Untergruppen, die einen frühen Zeitpunkt des Krankheitsverlaufes repräsentieren (kein Aszites, Patientinnen ohne postoperativen Resttumor, gut differenzierter Tumor) mit der Überlebenszeit. Ein Zusammenhang mit dem Gesamtkollektiv und einzelnen klinisch-pathologischen Faktoren kann literaturkonform nicht hergestellt werden. Der Marker CD 143 bietet keine Korrelation zu anderen prognostischen Faktoren und scheint für die Prognose des Ovarialkarzinoms keine Rolle zu spielen.

Auch wenn bei bestimmten malignen Tumoren als auch Tumorsubgruppen entsprechende signifikante Zusammenhänge gezeigt werden, der Vergleich zu anderen etablierten prognostischen Faktoren macht deutlich, dass der Angiogenese beim Ovarialkarzinom nur eine untergeordnete Bedeutung zukommt. Diese vergleichende Analyse der verschiedenen Faktoren erlaubt die Einordnung der Bedeutung.

7 Anhang

I Maligne epitheliale Tumore

- Seröse Tumore
 - a) Seröse Tumore von niedriger maligner Potenz
 - b) Seröse Adenokarzinome, serös-papiläre Adenokarzinome, serös-papiläre Zystadenokarzinome, exophytische-papiläre Karzinome
- Muzinöse Tumore
 - a) Muzinöse Tumore von niedriger maligner Potenz
 - b) Muzinöse Karzinome, Adenokarzinome und Zystadenokarzinome
- Endometrioid Tumore
 - a) Endometrioid Tumore von niedriger maligner Potenz
 - b) Endometrioid Karzinome, Adenokarzinome und Zystadenokarzinome
- Klarzellige Tumore
 - a) Klarzellige Tumore von niedriger maligner Potenz
 - b) Klarzellige Karzinome
- Transitionalzellige Tumore
 - a) Von niedriger maligner Potenz
 - b) Maligne Brenner-Tumore
 - c) Transitionalzellkarzinome
- Plattenepithel-Karzinome
- Gemischt epitheliale Tumore
- Undifferenzierte Karzinome
- Unklassifizierbare Karzinome

II Maligne Keimstrang-Stroma-Tumore

- Maligner Granulosazell-Tumor
- Maligne Thekome

III Steroidzell-Tumore

- Lipidzelltumore
- Lipoidzelltumore

IV Maligne Keimzelltumore

- Dysgerminome
- Endodermaler Sinustumore
- Embryonale Karzinome
- Polyembryome
- Chorionkarzinome
- Maligne Teratome
 - a) Unreife Teratome
 - b) Reife Teratome mit maligner Entartung
 - c) Maligne Struma ovarii
 - d) Karzinoide

V Gonadoblastome

- Sondergruppe, die hauptsächlich aus zwei Zellbestandteilen besteht. Einerseits gleichen sie den Keimzelltumoren, andererseits weisen sie Tumoranteile der Keimstrangtumoren auf.

Stadieneinteilung

<i>TNM</i>	<i>FIGO</i>	<i>Befund</i>
T1a	Ia	Tumor auf ein Ovar begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars
T1b	Ib	Tumor auf beide Ovarien begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf der Oberfläche beider Ovarien
T1c	Ic	Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien mit Kapselruptur; Tumor an Ovaroberfläche oder maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
T2a	IIa	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tube
T2b	IIb	Ausbreitung auf andere Beckengewebe
T2c	IIc	Ausbreitung im Becken und maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
T3 und/ oder N1	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien, mit histologisch gesicherten Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
T3a	IIIa	Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des kleinen Beckens
T3b	IIIb	Makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung > 2cm
T3c und/ oder N1	IIIc	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens; größte Ausdehnung < 2cm und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
M1	IV	Fernmetastasen

8 Literaturverzeichnis

Abdalla S, Behzad F, Bsharah S, Kumar S, Amini S, O'Dwyer S, Haboubi N: Prognostic relevance of microvessel density in colorectal tumors. *Oncology Reports* 6: 839-842, 1999

Abulafia O, Triest WE, Sherer DM: Angiogenesis in primary and metastatic epithelial ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 177: 541-547, 1997

Abulafia O, Triest WE, Sherer DM: Angiogenesis in Malignancies of the Female Genital Tract. *Gynecol Oncol* 72: 220-231, 1999

Alvarez AA, Krigman HR, Whitaker RS, Dodge RK, Rodriguez GC: The prognostic significance of angiogenesis in epithelial ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 5: 587-591, 1999

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland. 3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken, 2002

Arihiro K, Inai K: Expression of CD31, Met/hepatocyte growth factor receptor and bone morphogenetic protein in bone metastasis of osteosarcoma. *Pathol Int* 51: 100-106, 2001

Aroca F, Renaud W, Bartoli C, Bouvier-Labit C, Figarella-Branger D: Expression of PECAM-1/CD 31 isoforms in human brain gliomas. *J of Neuro-Oncology* 43: 19-25, 1999

Auerbach W, Auerbach R: Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmac Ther* 63: 265-311, 1994

Baak JPA, Chan KK, Stolk JG, Kenemana P: Prognostic factors in borderline and invasive ovarian tumors of the common epithelial type. *Path Res Pract* 182: 755-774, 1987

Baak JPA, Langley FA, Talerman A, Delemarre JFM: The Prognostic variability of ovarian tumor grading by different pathologists. *Gynecol Oncol* 27: 166-172, 1987

Baillie R, Carlile J, Pendleton N, Schor AM: Prognostic value of vascularity and vascular endothelial growth factor expression in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 54: 116-120, 2001

Bancher-Todesca D, Rosen A, Graf A, Wasicky R, Hohlagschwandter M, Rebhandl W, Heinze G, Breiteneker G, Gitsch G, Obermair A: Prognostic significance of tumor angiogenesis in primary fallopian tube cancer. *Cancer Lett* 141: 179-186, 1999

Beckmann MW, Timmerman D: Gibt es ein Populations- oder Risikogruppen-screening für das Ovarialkarzinom? *Gynäkologe* 30: 85-91, 1997

Berger R, Albelda SM, Berd D, Loffreda M, Whitaker D, Murphy GF: Expression of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) during melanoma-induced angiogenesis in vivo. *J Cutan Pathol* 20: 399-406, 1993

Bikfalvi A: Significance of angiogenesis in tumor progression and metastasis. *Eur J cancer* 31 a: 1101-1105, 1995.

Bossi P, Viale G, Lee AKC, Alfano RM, Coggi G, Bosari S: Angiogenesis in colorectal tumors: microvessel quantitation in adenomas with clinicopathological correlations. *Cancer Res* 55: 5049-5053, 1995

Brinkhuis M, Baak JPA, Meijer GA, Vandiest PJ, Mogensen O, Bichel P, Neijt JP: Value of quantitative pathological variables as prognostic factors in advanced ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 174: 126-131, 1996

Brinkhuis M, Meijer GA, Baak JPA: An evaluation of prognostic factors in advanced ovarian cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 63: 115-124, 1995

Chambers SK, Ivins CM, Carcangiu ML: Plasminogen activator inhibitor-1 is an independent poor prognostic factor for survival in advanced stage epithelial ovarian cancer patients. *Int J Cancer* 79: 449-454, 1998

Charping C, Garcia S, Buuvier C, Martini F, Andrac L, Bonnier P, Lavaut MN, Allasia C: CD 31/PECAM automated and quantitative immunocytochemical assays in breast carcinomas: correlation with patient follow-up. *Am J Clin Pathol* 107: 534-541, 1997

Chen CA, Cheng WF, Lee CN, Chen TM, Kung CC, Hsieh FJ, Hsieh CY: Serum vascular endothelial growth factor in epithelial ovarian neoplasms: correlation with patient survival. *Gynecol Oncol* 74: 235-40, 1999

Chi DS, Liao JB, Leon LF, Venkatraman ES, Hensley ML, Bhaskaran D, Hoskins WJ: Identification of prognostic factors in advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 82: 532-537, 2001

Christ B, Steding G, Steidl W: Cardio-vaskuläres System. In: *Humanembryologie*. Hrsg.: Hinrichsen KV. Berlin, Heidelberg 10.1: 205-211, 1990

Chu JS, Huang CS, Chang KJ: The prognostic significance of tumor angiogenesis in Taiwanese patients with invasive ductal breast carcinomas. *Cancer Lett* 134: 7-14, 1998

Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KAF, Stein H, Mason DY: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 32: 219-229, 1984

Christofidou-Solomidou M, Nakada MT, Williams J: Neutrophil platelet endothelial cell adhesion molecule-1 participates in neutrophil recruitment at inflammatory sites and is down-regulated after leukocyte extravasation. *J Immunol* 158: 4872-4878, 1997

Darai E, Bringuier AF, Walker-Combrouze F, Fauconnier A, Couvelard A, Feldmann G, Madelenat P, Scoazec JY: CD 31 expression in benign, borderline, and malignant epithelial ovarian tumors: an immunohistochemical and serological analysis. *Gynecol Oncol* 71: 122-127, 1998

Deguchi M, Matsumoto Y, Ishiko O, Ogita S: Angiogenesis in ovarian clear cell carcinoma and its relation to endometriosis. *Oncol Rep* 7: 651-654, 2000

DeLisser HM: Platelet endothelial adhesion molecule-1 (CD 31). *Curr Top Microbiol Immunol* 184: 37-45, 1993

DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter R: Involvement of endothelial PECAM-1/CD 31 in angiogenesis. *Am J Pathol* 151: 671-677, 1997

Dickinson AJ, Fox SB, Persad RA, Hollyer J, Sibley GNA, Harris AL: Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas. *Br J Urol* 74: 762-766, 1994

Dominici M, Campioni D, Lanza F, Luppi M, Barozzi P, Pauli S, Milani R, Cavazzini F, Punturieri M, Trovato R, Torelli G, Castoldi G: Angiogenesis in multiple myeloma: correlation between in vitro endothelial colonies growth (CFU-En) and clinical-biological features. *Leukemia* 15: 171-176, 2001

van Diest PJ, Zevering JP, Zevering LC, Baak JPA: Lack of prognostic value of microvessel counts in FIGO 3 and 4 cisplatin treated ovarian cancer patients. *Pathol Res Pract* 191: 25-30, 1995

Di Leo S, Caschetto S, Garozzo G, Nuciforo G, Cassaro N, Meli MT, Di Mauro R, Caragliano L: Angiogenesis as a prognostic factor in cervical carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 19: 158-162, 1988

Duffy MJ: Urokinase-type plasminogen activator: a potent marker of metastatic potential in human cancers. *Biochem Soc Trans* 30: 207-210, 2002

Folkman J: What is the role of angiogenesis in metastasis from cutaneous melanoma? *Eur J Cancer Clin Oncol* 23: 361, 1987

Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D: Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339: 58-61, 1989

Folkman J: What is the evidence that tumors are angiogenesis-dependent? *J Natl Cancer Inst* 82: 4-6, 1990

Folkman J, Shing Y: Angiogenesis. *J Biol Chem* 267: 10931-10934, 1992

Fox SB, Leek RD, Smith K, Hollyer J, Greenall M, Harris AL: Tumorangiogenesis in node-negative breast carcinomas - relationship with epidermal growth factor receptor, estrogen receptor, and survival. *Breast Cancer Res Treat* 29: 109-116, 1994

Franke FE, Metzger R, Bohle RM, Kerkman L, Alhence-Gelas F, Danilov SM: CD 143 workshop: Angiotension-I-converting enzyme (CD 143) on endothelial cells in normal and in pathological conditions. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEGK, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamura K, Zola H [Hrsg.] *Leucocyte typing VI*. New York, London, Garland Publishing, Inc., 1997

Gasparini G, Bonoldi E, Viale G, Verderio P, Boracchi P, Panizzoni GA, Radaelli U, Dibacco A, Guglielmi RB, Bevilacqua P: Prognostic and predictive value of tumor angiogenesis in ovarian carcinomas. *Int J Cancer* 69: 205-211, 1996

Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI, Georgoulas V, Gatter KC, Harris AL: Intratumoral angiogenesis: a new prognostic indicator for stage I endometrial adenocarcinomas? *Oncol Res* 11: 205-212, 1999

Green A, Purdie D, Bain C, Siskind V, Webb PM: Cigarette smoking and risk of epithelial ovarian cancer (Australia). *Cancer Causes Control* 12: 713-719, 2001

Heimburg S, Oehler MK, Papadopoulos T, Caffier H, Kristen P, Dietl J: Prognostic relevance of the endothelial marker CD 34 in ovarian cancer. *Anticancer Res* 19: 2527-2529, 1999

Hölzel D, Klammert A, Schmidt M: Krebs, Häufigkeiten, Befunde und Behandlungsergebnisse; Perspektiven für die Krebsdiskussion und eine quantitative klinisch-epidemiologische Onkologie. Tumorregister München. Zuckschwert Verlag, München, 1996.

Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, Rothenberg ML, Merino MJ: Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 147: 33-41, 1995

Horak E, Leek R, Klenk N, Lejune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniwska K, Harris AL: Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as an indicator of node metastasis and survival in breast cancer. *Lancet* 340: 1120-1124, 1992

Horn L-C, Fricke K, Krugmann J: Histologische Klassifikation und morphologische Prognosefaktoren bei malignen Ovarialtumoren. *Zentralbl Gynäkol* 117: 335-345, 1995

Kath R, Schmidt CG: Tumorprogression und Metastasierung. *Zentralbl Chir* 115: 785-792, 1990

Kato T, Kameoka S, Kimura T, Nishikawa T, Kasajima T: Angiogenesis and blood vessel invasion as prognostic indicators for node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 65: 203-215, 2001

Kerns B-JM, Jordan PA, Faerman LL, Berchuck A, Bast RC, Layfield LJ: Determination of proliferation index with MIB-1 in advanced ovarian cancer using image analysis. *Am J Clin Pathol* 101: 192-197, 1994

Kiziridou HD, Tolio T, Stefanou D, Agnantis N: u-PA expression in benign, borderline and malignant ovarian tumors. *Anticancer Res* 22: 985-990, 2002

Kuhn W, Schmalfeldt B, Reuning U, Pache L, Berger U, Ulm K, Harbeck N, Spathe K, Dettmar P, Hofler H, Janicke F, Schmitt M, Graeff H: Prognostic significance of urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 for survival in advanced ovarian carcinoma stage FIGO IIIc. *Br J Cancer* 79: 1746-1751, 1999

Lamerz R, Dati F, Feller A, Schnorr G: Poly- und monoklonale Antikörper. In: Tumordiagnostik, Tumormarker bei malignen Erkrankungen. Behring Diagnostika, Behringwerke AG, Marburg, Frankfurt a. M: 30-33, 1988

Liotta LA, Stetler-Stevenson WG, Steeg PS: Cancer invasion and metastasis: positive and negative regulatory elements. *Cancer investig* 9: 543-551, 1991

Lindmark G, Gerdin B, Sundberg C, Pahlman L, Bergström R, Glimelius B: Prognostic significance of the microvessel count in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 14: 461-466, 1996

Lorigan PC, Crosby T, Coleman RE: Current drug treatment guidelines for epithelial ovarian cancer. *Drugs* 51: 571-584, 1996

Mansfield CM, Kimler BF, Henderson SD, Vats TS, Svoboda DJ: Angiotensin-I-converting enzyme in cancer patients. *J Clin Oncol* 2: 452-456, 1984

Marsoni S, Torri V, Valsecchi MG, Belloni C, Bianchi U, Bolis G, Bonazzi C, Clombo N, Epis A, Favalli G, Gambino A, Landoni F, Maggi R, Pecorelli S, Presti S, Vassena L, Zanaboni F, Mangioni C (GICOG): Prognostic factors in advanced epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 62: 444-450, 1990

Mogensen O, Sorensen FB, Bichel P, Jakobsen A: Nuclear volume and prognosis in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2: 141-146, 1992

Nakanishi Y, Kodama J, Yoshinouchi M, Tokumo K, Kamimura S, Okuda H, Kudo T: The expression of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta associates with angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Pathol* 16: 256-62, 1997

Nakayama H, Enzan H, Miyazaki E, Kuroda N, Naruse K, Hiroi M: Differential expression of CD 34 in normal colorectal tissue, peritumoral inflammatory tissue, and tumour stroma. *J Clin Pathol* 53: 626-629, 2000

Nakopoulou L, Lekkas N, Lazaris AC, Athanassiadou P, Giannopoulou I, Mavrommatis J, Davaris P: An immunohistochemical analysis of angiogenesis in invasive breast cancer with correlations to clinicopathologic predictors. *Anticancer Res* 19: 4547-4553, 1999

Nagy JA, Masse EM, Herzberg KT, Meyers MS, Yeo KT, Yeo TK, Sioussat TM, Dvorak HF: Pathogenesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation. *Cancer Res* 55: 360-368, 1995

Newmann PJ, Berndt M, Gorski J: PECAM-1 (CD 31) cloning in relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247: 1219-1221, 1990

Newmann PJ: The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 99: 3-8, 1997

Nieto JJ, Crow J, Sundaresan M, Constantinovici N, Perrett CW, MacLean AB, Hardiman PJ: Ovarian epithelial dysplasia in relation to ovulation induction and nulliparity. *Gynecol Oncol* 82: 344-349, 2001

Obermair A, Wasicky R, Kaider A, Preyer O, Lösch A, Leodolter S, Kölbl H: Prognostic significance of tumor angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Cancer Letters* 138: 175-182, 1999

Obermair A, Wanner C, Bilgi S, Speiser P, Kaider A, Reinthaller A, Leodolter S, Gitsch G: Tumor angiogenesis in stage Ib cervical cancer: Correlation of microvessel density with survival. *Am J Obstet Gynecol* 178: 314-319, 1998

Ordonez NG: Transitional cell carcinomas of the ovary and bladder are immunophenotypically different. *Histopathology* 36: 433-438, 2000

Orre M, Lotfi-Miri M, Mamers P, Rogers PA: Increased microvessel density in mucinous compared with malignant serous and benign tumours of the ovary. *Br J Cancer* 77: 2204-2209, 1998

Ozols RF, Garvin AJ, Costa J, Simon RM, Young RC: Advanced ovarian cancer. Correlation of histologic grade with response to chemotherapy and survival. *Cancer* 45: 572-581, 1980

Ozols RF, Rubin SC, Thomas G, Robboy S: Epithelial ovarian cancer. In: Hoskins WJ et al.: *Principles and Practice of Gynecologic Oncology*, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997

Paley PJ, Staskus KA, Gebhard K, Mohanraj D, Twiggs LB, Carson LF, Ramakrishnan S: Vascular endothelial growth factor expression in early stage ovarian carcinoma. *Cancer* 80: 98-106, 1997

Pauls K, Fink L, Franke FE: Angiotensin-converting-enzyme (CD 143) in neoplastic germ cells. *Lab Invest* 79: 1425, 1999

Pfisterer J: Gut- und bösartige Neubildungen der Ovarien. In: Gynäkologie und Geburtshilfe. Hrsg.: Holzgreve W, Jonat W, Schneider KTM, Weiss JM. Berlin, Heidelberg, Springer Verlag: 600-610, 2000

Pfleiderer A: Malignome des Ovars. In: Spezielle gynäkologische Onkologie Bd.II. Hrsg.: Schmidt-Matthiesen H. In: Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe Bd. 12. Hrsg.: Wulf K-H, Schmidt-Matthiesen H. Berlin, Baltimore Wien, Urban & Schwarzenberg: 45-130, 1991

Remmele W, Stegner HE: Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. Pathologe 8: 138-140, 1987

Riede UN, Schaefer HE: Allgemeine und spezielle Pathologie. Stuttgart, New York, Thieme Verlag, 1995

Romer FK: Angiotensin-converting enzyme and its association with outcome in lung cancer. Br J Cancer 43: 135-142, 1981

Russell P, Farnsworth A: Surgical Pathology of the ovaries. 2nd edition. New York, Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, San Francisco, Tokyo (Churchill Livingstone), 1997

Sapino A, Bongiovanni M, Cassoni P, Righi L, Arisio R, Deaglio S, Malavasi F: Expression of CD 31 by cells of extensive ductal in situ and invasive carcinomas of the breast. J Pathol Jun; 194: 254-261, 2001

Schipperges H: Geschichte der Medizin in Schlaglichtern. Mannheim, Meyers Lexikon Verlag, 1990

Schneck P: Aufgabenbereiche der praktischen Medizin. In: Geschichte der Medizin systematisch. Bremen, Lorch/Württemberg, UNI-Med Verlag AG 5.2.2.: 98-101, 1997

Schoell WMJ, Pieber D, Reich O, Lahousen M, Janicek M, Guecer F, Winter R: Tumor Angiogenesis as a Prognostic Factor in Ovarian Carcinoma. *Cancer* 80: 2257-2262, 1997

Seiden MV: Ovarian cancer. *Oncologist* 6: 327-332, 2001

Shen GH, Ghazizadeh M, Kawanami O, Shimizu H, Jin E, Araki T, Sugisaki Y: Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 83: 196-203, 2000

Siitonen SM, Haapsalo HK, Rantala IS, Helin HJ, Isola JJ: Comparison of different immunohistochemical methods in the assessment of angiogenesis: Lack of prognostic value in a group of 77 selected node-negative breast carcinomas. *Modern Pathol* 8: 745-752, 1995

Sion-Vardy N, Fliss DM, Prinsloo I, Shoham-Vardi I, Benharroch D: Neoangiogenesis in squamous cell carcinoma of the larynx - biological and prognostic associations. *Pathol Res Pract* 197: 1-5, 2001

Skoldenberg EG, Christiansson J, Sandstedt B, Larsson A, Lackgren G, Christoffer-son R: Angiogenesis and angiogenic growth factors in Wilms tumor. *J Urol* 165: 2274-2279, 2001

Takada Y, Hiwada K, Yokoyama M, Ochi K, Takeuchi M, Kokubu T: Angiotensin converting enzyme. A possible histologic indicator for human renal, cell carcinoma. *Cancer* 56: 130, 1985

Tenderenda M, Rutkowski P, Jesionek-Kupnicka D, Kubiak R: Expression of CD 34 in Gastric Cancer and its Correlation with Histology, Stage. *Pathol Oncol Res* 7: 129-134, 2001

Tien YW, Chang KJ, Jeng YM, Lee PH, Wu MS, Lin JT, Hsu SM: Tumor angiogenesis and its possible role in intravasation of colorectal epithelial cells. *Clin Cancer Res* 7: 1627-1632, 2001

Thigpen T, Brady MF, Omura GA: Age as a prognostic factor in ovarian carcinoma: The Gynecologic Oncology Group experience. *Cancer* 71: 606-614, 1993

„Maligne Ovarialtumore“. Hrsg.: Tumorzentrum München, 1998

Verheul HM, Hoekman K, Jorna AS, Smit EF, Pinedo HM: Targeting vascular endothelial growth factor blockade: ascites and pleural effusion formation. *Oncologist* 5: 45-50, 2000

Wapnir IL, Barnard N, Wartenberg D, Greco RS: The inverse relationship between microvessel counts and tumor volume in breast cancer. *Breast J* 7: 184-188, 2001

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J: Tumor angiogenesis and metastasis – Correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324: 1-7, 1991

Yamamoto S, Konishi I, Mandai M, Kuroda H, Komatsu T, Nanbu K, Sakahara H, Mori T: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian neoplasms: correlation with clinicopathology and patient survival, and analysis of serum VEGF levels. *Br J Cancer* 76: 1221-1227, 1997

Zweemer RP, Verheijen RH, Coebergh JW, Jacobs IJ, van Diest PJ, Gille JJ, Skates S, Menko FH, Ten Kate LP, Kenemans P: Survival analysis in familial ovarian cancer, a case control study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 98: 219-223, 2001

9 Danksagung

Herrn Privatdozent Dr. med. Karsten Münstedt, Oberarzt am Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen, gilt mein ganz besonderer Dank für die Überlassung des Themas, für die wertvolle Unterstützung und konstruktive Kritik während der gesamten Arbeit und die stete Bereitschaft zur Diskussion.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. med. Folker E. Franke, Oberarzt am Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Giessen, für die Vermittlung der Techniken zur Durchführung der immunhistochemischen Färbungen und die Hilfestellungen bei der Auswertung des histologischen Materials, sowie für die konstruktive Kritik.

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Schulz, Leiter am Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität, möchte ich für die großzügige Bereitstellung der Laborgeräte und die Möglichkeit zur Arbeit in seinem Institut danken.

Mein weiterer Dank gilt meinen Kollegen Jochen Steen und Anne Knauf für die gute Zusammenarbeit.

Schließlich möchte ich meiner Frau Andrea danken, für die außerordentliche Geduld bei computertechnischen Problemen und die hervorragende Einführung und Hilfestellung bei der Arbeit mit diversen Computerprogrammen.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Buch
Vorname: Thomas
Geboren: 26.07.1971
Geburtsort: Bad Nauheim
Familienstand: Verheiratet, 1 Tochter
Staatsbürgerschaft: Deutsch

Schulische Ausbildung

1977 – 1982 Grundschule Butzbach/Degerfeld
1982 – 1991 Weidig-Gymnasium Butzbach

Berufsausbildung

1991 – 1992 Ausbildung zum Krankenpflegehelfer in der
William-Harvey-Klinik Bad Nauheim

Hochschulausbildung

1992 – 1999 Studium der Humanmedizin an der
Justus-Liebig-Universität Gießen

1995 Ärztliche Vorprüfung
1996 1. Staatsexamen
1998 2. Staatsexamen
1999 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr

1998 – 1999 Evangelisches Krankenhaus Gießen und
Orthopädische Universitätsklinik Gießen

Arzt im Praktikum

2000 – 2001 Abteilung für Angiologie und Gefäßchirurgie der
William-Harvey-Klinik Bad Nauheim
Abteilung für Anästhesiologie und Notfallmedizin
der William-Harvey-Klinik Bad Nauheim

Assistenzarzt

Seit 01.03.2002 Abteilung für Angiologie, Gefäßchirurgie und Intensivmedizin
der William-Harvey-Klinik Bad Nauheim

Promotion

1997 Beginn der vorliegenden Arbeit