

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE  
PROF. DR. FERDINAND HOFSTÄDTER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Vergleichende Untersuchungen des Gefäßsystems**  
**mit dem Gefäßmarker CD31 bei mit Hochdosis-**  
**Chemotherapie behandelten Mammakarzinomen**

Inaugural – Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

Der  
Fakultät für Medizin  
Der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Verena Artinger

08/2011



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE  
PROF. DR. FERDINAND HOFSTÄDTER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Vergleichende Untersuchungen des Gefäßsystems**  
**mit dem Gefäßmarker CD31 bei mit Hochdosis-**  
**Chemotherapie behandelten Mammakarzinomen**

Inaugural – Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

Der  
Fakultät für Medizin  
Der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Verena Artinger

08/2011

**Dekan:** Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

**1. Berichterstatter:** PD Dr. Andreas Gaumann

**2. Berichterstatter:** Prof. Dr. Jürgen Strutz

**Tag der mündlichen Prüfung:** **01.03.2012**

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Hochrisiko-Brustkrebs .....	1
1.2. Hochdosis Chemotherapie.....	2
1.3. Angiogenese .....	3
1.4. Endotheliale Zelladhäsionsmoleküle.....	6
1.5. Antikörper.....	7
1.6. MVD als prognostischer Parameter bei Brustkrebs .....	8
1.6. Genexpressionen bei Hochrisiko Brustkrebs Patientinnen .....	11
1.7. Hochdosis- gegenüber Niedrigdosis- Chemotherapie .....	14
<b>2. Ziel der Untersuchung.....</b>	<b>17</b>
<b>3. Materialien .....</b>	<b>18</b>
3.1 Chemikalien .....	18
3.2 Puffer und Substratlösungen .....	19
3.3. Antikörper und Antikörperkomplexe.....	20
3.3.1. CD31 .....	20
3.3.2. Sekundärantikörper .....	20
3.3.3. Antikörperkomplexe.....	20
<b>4. Patienten und Methoden.....</b>	<b>21</b>
4.1. Patienten.....	21
4.1.1. Kollektiv der WSG AM01 .....	21
4.1.2. Behandlungsregime .....	21
4.1.3. Auswertung der Gewebeproben.....	22
4.2 Vorbehandlung des Gewebes.....	23
4.3. Immunhistochemische Färbung:.....	23
4.4 Morphometrie des Gefäßsystems.....	24
4.5. Mikroskopie und Auswertung .....	25
4.6. Statistische Auswertung.....	26
<b>5. Ergebnisse.....</b>	<b>27</b>
5.1. Morphometrische Auswertung .....	27
5.2. Korrelation von MVD und VSA mit klinisch relevanten Parametern .....	27

---

5.3. Korrelation von CD31 mit anderen Gefäßmarkern (CD105, FVIII) .....	29
5.4. Morphometrische Analyse der Angiogenese unabhängig von der angewendeten Therapie .....	29
5.4.1. Gefäßzählung (MVD) .....	29
5.4.2. Gefäßfläche (VSA) .....	30
5.5. Morphometrische Analysen der Angiogenese abhängig von der angewendeten Therapie (DDCT vs. HDCT) .....	31
5.6. Bildertafel .....	32
<b>6. Diskussion.....</b>	<b>34</b>
6.1. Bedeutung der Angiogenese .....	34
6.2. Morphometrische Analyse .....	34
6.3. Korrelierende Analyse von MVC und VSA in Abhängigkeit des verwendeten Gefäßmarker .....	37
6.4. Korrelierende Analyse von CD 31 mit konventionellen Parametern .....	38
6.4.1. Korrelation mit Her-2 Expression .....	39
6.4.2. Korrelation mit dem histologischen Grad .....	40
6.4.3. Korrelation zu Ki-67-Expression .....	41
6.4.4. Korelation zur molekularen Klassifizierung .....	42
6.4.5. Korrelation zu Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus .....	44
6.4.6. Korrelation zum Lymphknotenstatus .....	45
6.4.7. Korrelation zur Tumogröße .....	46
6.5. Überlebensanalysen von zwei prognostischen Gruppen in Abhängigkeit von MVD und VSA .....	47
6.6. Überlebensanalysen in Abhängigkeit von der chemo-therapeutischen Behandlung .....	49
6.7. Ausblick.....	53
<b>7. Anhang.....</b>	<b>55</b>
7.1. Tabellen .....	55
7.2. Abbildungen .....	58
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>62</b>
<b>9. Danksagung .....</b>	<b>74</b>
<b>10. Lebenslauf.....</b>	<b>75</b>
<b>Erklärung zu den erbrachten Leistungen.....</b>	<b>77</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A.d.	Aqua dest. (destilliertes Wasser)
AEC	Aminoethylcarbazol
A.G.	Andreas Gaumann
AP	Alkalische Phosphatase
AK	Antikörper
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BSA	Bovines Serum Albumin
cM0	klinisch keine Fernmetastasen
CD	Cluster of differentiation (Differenzierungsmarker)
CK	Creatinkinase
CXCR4	CXC-Motiv-chemokinrezpor 4 (Gen-Name)
DDCT	Dense-Dose Chemotherapy (Niedrigdosis Chemotherapie)
ECAM	Endotheliale Zelladhäsionsmoleküle
ECE	Endothelin-Converting Enzyme (Endothelin- Konversionsenzym)
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EFS	Event Free Survival (ereignisfreies Überleben)
EGF	Epidermal Growth Factor (Wachstumsfaktor)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (Wachstumsfaktor Rezeptor)
ER	Östrogen
ET	Endothelin
ET-A	Endothelin Rezeptor-A
FVIII	Faktor VIII

---

5-FU	5-Flurouracil
G3	Grad 3 (Differenzierungsgrad)
HCl	Salzsäure
HDCT	High Dense Chemotherapy (Hochdosis Chemotherapie)
HER-2	Herceptin Rezeptor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
ICAM	Intercellular adhesion molecules (Interzelluläre Adhäsionmoleküle)
IgG	Immunglobuline der Klasse G
Ki-67	Gen- Name (Proliferationsmarker)
LK	Lymphknoten
LN	Lymphknoten
MM	Multiple Marker
MMN	Multiple Marker Negative
MMPs	Matrix Metalloproteininasen
Mol. Class.	Molekulare Klassen
MVD	Micro Vessel Density (Mikrogefäßdichte)
N0	kein Lymphknotenbefall
OV	Overall survival (Gesamtüberleben)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molekule
PR	Progesteron Rezeptor
RFS	Relapsing Free Survival (Rezidivfreies Überleben)
TAF	Tumor Angiogenese Factor
TAM	Tumor assoziierte Makrophagen
TGF	Transforming Growth Factor

TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TTPA	Tissue Plasminogen Activator
UPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VSA	Vascular Surface Area (Gefäßfläche)
vWF	von Willebrand-Faktor
WSG AM-01	West German Group AM-01 (Westdeutsche Arbeitsgruppe)

## **1. Einleitung**

### **1.1. Hochrisiko-Brustkrebs**

Brustkrebs gilt als die häufigste bösartige Erkrankung der Frau und stellt die Haupttodesursache im Alter zwischen 35 und 55 Jahren dar. Die 5-Jahres Überlebensrate liegt bei durchschnittlich 65% mit einer großen Streuung zwischen den einzelnen klinischen Stadien (Uzzan et al. 2941-55).

Hochrisikobrustkrebs ist charakterisiert durch eine ausgedehnte Lymphknotenbeteiligung. Die durchschnittliche jährliche Letalitätsrate bei Patientinnen mit mindestens 10 befallenen Lymphknoten beträgt das 5-fache im Vergleich zu nodal- negativen Brustkrebspatientinnen (Fisher et al. 1551-57). Carter et al. beschreiben in einer Studie über 24 740 Brustkrebspatientinnen den Lymphknotenstatus als einen unabhängigen Prognosefaktor und wichtigen Indikator hinsichtlich der Tumorprogression (Carter, Allen, and Henson 181-87).

Trotz intensiver Bemühungen der letzten Jahre, das Therapieregime zu optimieren, bleibt die Prognose für nodal- positive Patientinnen ungünstig. Einige Studien berichtet über eine Assoziation zwischen einer zunehmend schlechten Prognose und steigender Tumorgröße, höherem Grading, Östrogen- oder Progesteronrezeptor-Negativität, sowie Überexpression von HER-2 und p53 (Gluz et al. 861-70).

Die Rate an 5-Jahres rezidivfreiem Überleben beträgt für Hochrisiko Brustkrebspatientinnen ohne einer adjuvanten Therapie <30% (Montero et al. 229-35). Bisher kann der rezidivfreie Zeitraum für 5 Jahre durch adjuvante Therapieregimes auf 40-52% angehoben werden (Rodenhuis et al. 7-16;Tallman et al. 17-26;Rodenhuis et al. 588-96).

## **1.2. Hochdosis Chemotherapie**

Einige Studien konnten eine signifikante Überlegenheit einer Hochdosis-Therapie gegenüber einer konventionellen Chemotherapie bezüglich des rezidivfreien Intervalls bei Befall von mindestens 10 Lymphknoten herausarbeiten (Rodenhuis et al. 588-96; Roche et al. 42-47; Nitz et al. 1935-44). Leonard et al. oder Peters et al. konnten keinen prognostischen Benefit durch eine Intensivierung der Therapie in ihren Arbeiten nachweisen (Leonard et al. 1076-83; Peters et al. 2191-200). Insgesamt bleibt die Anwendung einer Hochdosis Chemotherapie ein kontrovers diskutiertes Thema in der Behandlung von Brustkrebspatientinnen. Randomisierte Studien, welche sich häufig durch unterschiedliche Studiendesigns und Selektionskriterien bezüglich des Patientenkollektivs auszeichnen, führen zu widersprüchlichen Ergebnissen.

Die Westdeutsche Studiengruppe WSG AM-01 stellt aktuell die einzige Studie vor, welche ein signifikant reduziertes Risiko für das Rezidiv und die Mortalität durch Anwendung einer Hochdosis Chemotherapie im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie für Hochrisiko Patientinnen festgestellt hat (Nitz et al. 1935-44).

Kürzlich konnte eine signifikante prognostische Bedeutung für molekulare Brustkrebs- Subklassen basierend auf Mikromatrix Analysen gezeigt werden (Perou et al. 747-52; Sorlie et al. 10869-74). Die Westdeutsche Studiengruppe analysierte die Effizienz einer Therapieintensivierung anhand von pädiktiven Markern. Hierbei wurde zunächst das Hochrisiko- Kollektiv basierend auf immunhistochemischen Markern in molekulare Subklassen eingeteilt. Es konnten Patientinnen der „basal-like“ und Her-2 neu Subgruppe als prognostisch ungünstig identifiziert werden. Den größten Benefit aus einer Hochdosis- Therapie zogen Patientinnen mit hochproliferierenden tripel-negativen oder undifferenzierten G3 Tumoren, sowie die

basale und Her-2 Subgruppe (Diallo-Danebrock et al. 488-97; Hannemann et al. 1334-41).

Jedoch ist der zugrunde liegende Mechanismus dieser Ergebnisse bisher auf histopathologischer, als auch klinischer Ebene noch unzureichend untersucht. Die Identifikation von therapeutischen Targets innerhalb dieser Subpopulationen, sowie ein verbesserter Einblick in die Biologie der Erkrankung werden beforscht, um die Effizienz der systemischen Therapie bei Mammakarzinom zu verbessern (Folkman 27-31).

### **1.3. Angiogenese**

Viele primäre Studien, sowie Zusammenfassungen in Metaanalysen konnten zeigen, dass die Progression und Metastasierung des Brustkrebs mit seinem angiogenen Potential korreliert. Erfasst wurde hierbei die Angiogenese durch die Mikrogefäßdichte (MVD) (Gasparini et al. 454-66; Heimann et al. 1764-69; Uzzan et al. 2941-55).

Als Angiogenese - (aus dem Griechischen „die Gefäßentstehung“) bezeichnet man die Neubildung von Blutgefäßen aus dem bereits bestehenden Gefäßsystem. Das Wachstum, die Invasion und Metastasierung einer Vielzahl von Tumoren ist von der Angiogenese abhängig. Solide Tumore benötigen eine Gefäßneubildung, um eine Größe über  $1\text{mm}^3$  erreichen zu können (Folkman, Cole, and Zimmerman 491-502), (Gimbrone, Jr. et al. 261-76; Gimbrone, Jr. et al. 261-76). Dabei handelt es sich um ein komplexes molekulares Zusammenspiel aus Tumorsuppressorgenen, Zelladhäsionsmolekülen, ebenso wie Onkogenen, Apoptose und einer Beteiligung des Immunsystems (Carmeliet 932-36). Die Angiogenese stellt einen notwendigen Prozess für das Wachstum und die Reparaturvorgänge von Gewebe dar. Ein

Ungleichgewicht in diesem Vorgang kann bei Tumoren, Ischämie oder entzündlichen Prozessen auftreten (Carmeliet 932-36). Die Gefäßneubildung erfordert zunächst die Degradation der bestehenden vaskulären Basalmembran, die Migration der Endothelzellen und Invasion der extrazellulären Matrix, sowie die endotheliale Zellproliferation. Als entscheidender Faktor induziert VEGF die Expression vieler Enzyme und Proteine, wie Matrix-Metallproteininasen, Serinproteininasen, Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) und TTPA (tissue-type plasminogen activator). Anschließend muss die Bildung eines neuen Gefäßlumens erfolgen, bevor es zur Ausreifung und Stabilisierung des neuen Gefäßes kommen kann. Letzteres erfordert die Hemmung weiterer endothelialer Proliferation und die Rekonstruktion der Basalmembran, sowie die Ausbildung eines zusammenhängenden Komplexes und Organisation der Endothelzellen innerhalb des neuen Lumens (Fox, Generali, and Harris 216). Reguliert wird der gesamte Vorgang von pro- und anti-angiogenen Molekülen. Der sogenannte „angiogene switch“ zum angiogenen Phänotyp, wird dann erreicht, wenn die pro-angiogenen Faktoren überwiegen. Dieser Vorgang wird in einem weithin akzeptierten Modell von Folkman beschrieben, welches besagt, dass Tumoren sich initial avaskulär entwickeln können und ab einer gewissen Größe ihr eigenes Gefäßsystem durch aktive Angiogenese ausbilden (Folkman 27-31).

Im „normalen“ Gewebe beschränkt sich die Angiogenese auf den Prozess der Wundheilung, und Reproduktion. Dabei wird die Gefäßneubildung lediglich passager für ein Zeitintervall von wenigen Tagen induziert und nach Abschluss des Prozesses wieder vollständig gehemmt. Eine persistierende Angiogenese ist für einige Erkrankungen charakteristisch. Dazu zählt beispielsweise die Arthritis, wobei neu gebildete Kapillargefäße in den Gelenkspalt einwachsen und dort unmittelbar an der Knorpeldestruktion beteiligt sind. Bei Diabetes mellitus als weiteres Beispiel kann eine Gefäßinvasion des Glaskörpers im Auge beobachtet werden, wodurch es in der

Folge zur Erblindung kommen kann (Ludovini et al. 159-68). Ergebnisse einiger Studien suggerieren, dass die Tumorprogression und Metastasierung bei Brustkrebs wesentlich von der Angiogenese abhängig sind (Brem, Gullino, and Medina 880-82;Weinstat-Saslow et al. 6504-11). Die Fähigkeit von Tumoren, die Bildung neuer Blutgefäße zu induzieren, hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einem der wichtigsten Schwerpunkte in der Krebsforschung entwickelt. Man weiß heute, dass VEGF, der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor, als pro-angiogener Faktor eine zentrale Rolle bei diesem Prozess der Angiogenese spielt (Senger et al. 983-85). Einige publizierte Studien konnten durch die Hemmung des VEGF/VEGF-Rezeptor Systems eine signifikante Reduktion der Gefäßdichte aufzeigen. In der Folge schlossen die Autoren auf einen anti-angiogenen Effekt durch die Blockade von VEGF (Brem, Gullino, and Medina 880-82;Marne 1-5).

Der Angiogenese als Parameter wird von einigen Autoren eine, von der Tumorgröße und dem Grading unabhängige prognostische Bedeutung zugesprochen (Brem, Gullino, and Medina 880-82;Gasparini et al. 454-66;Brem, Gullino, and Medina 880-82;Heimann et al. 1764-69;Brem, Gullino, and Medina 880-82;Uzzan et al. 2941-55). Die Gefäßdichte (MVD) oder –fläche (VSA) kann mittels immunhistochemischer Färbung unter Verwendung unterschiedlicher Antikörper ermittelt werden. In der Vergangenheit fanden Faktor VIII, ebenso wie CD 31 in der Analyse von Tumorvaskularisation Anwendung. In der vorliegenden Arbeit wurde CD 31 zur immunhistochemischen Färbung und Quantifizierung der Angiogenese herangezogen. Es handelt sich hierbei um ein Zelladhäsionsmolekül (PECAM-1), welches die Gefäßneubildung sowohl in malignem, als auch benignem Gewebe detektiert. Auch andere hämatopoetische Zellen, wie Plasmazellen werden mittels CD 31 markiert.

#### **1.4. Endotheliale Zelladhäsionsmoleküle**

Fox et al. studierten die Expression einiger ECAMs, wie ICAMs, PECAMs (CD31) und P-, sowie E - Selektine im Endothel normalen Gewebes im Vergleich zu tumorassoziierten Mikrogefäßen. Darin zeigte sich, dass Endothelzellen in Tumorgewebe aktiviert werden und in der Folge höhere Level von ICAMs 1-3 und PECAMs exprimieren; wahrscheinlich als Konsequenz der Zytokinstimulation. Entscheidend für ein invasives Wachstum des Tumors scheinen auch vasoaktive Peptide, die Endotheline zu sein. Diese steuern eine Vielzahl unterschiedlichster Prozesse, wie das Zellwachstum, die Differenzierung, Inflammation, Angiogenese und Chemotaxis. Die „endotheliale Achse“ besteht aus drei Endothelin- Isoformen, ET-1, ET-2 und ET-3, welche auf jeweils unterschiedlichen Genen kodiert werden, zwei Peptidasen (ECE-1 und ECE-2) und zwei G- Protein gekoppelten Rezeptoren (ET-RA und ET-RB). Endotheline werden von vielen Tumoren exprimiert und besitzen eine Vielzahl autokriner und parakriner Funktionen z.B. bei Brustkrebs (Ferrara, Gerber, and LeCouter 669-76).

Freigesetzt werden diese Peptide sowohl von den Tumorzellen selbst, als auch von den Tumor assoziierten Makrophagen (TAM) und führen zu komplexen zellulären Interaktionen. Korrelationen findet man zu höheren histologischen Graden des Tumors und zur Ausprägung der lympho- vaskulären Invasion. Die physiologische Bedeutung der Endotheline besteht in Folgendem: 1. bezüglich der Blutgefäße halten sie den Gefäßtonus aufrecht; 2. die Frequenz und Ionotropie der Herzkontraktion wird reguliert; 3. in der Lunge wird der Tonus der Luftwege und Blutgefäße moduliert; 4. in der Niere wird die Natrium- und Wasser- Sekretion, sowie der Säure-Base-Haushalt und 5. im Gehirn die Hormonfreisetzung und das Atemzentrum beeinflusst.

Im Tumorgewebe werden Endotheline und deren Rezeptoren von den Tumorzellen produziert und regulieren einige wichtige Prozesse. Ihr mitogener Effekt auf Tumor- und Stromazellen führt zum Wachstum des Tumors, die Stimulation der Endothelzellen und Induktion von VEGF moduliert die Angiogenese. Außerdem führt die Stimulation der Tumorzelle durch Endothelin mittels Aktivierung von MMPs (Matrix Metalloproteininasen) zum invasiven Wachstum. Auch der Schutz der Tumorzelle vor hypoxie -induzierter Apoptose wird durch die Endotheline vermittelt.

Neben ihrer mitogenen Aktivität stimulieren Endotheline das Wachstum von Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten. Außerdem sind sie als angiogene Faktoren wirksam. ET-1 moduliert unterschiedliche Stadien der Neovaskularisation, einschließlich der Endothellzellproliferation, Migration, Invasion, sowie die Produktion von Proteasen und stimuliert des weiteren die Gefäßneubildung in vivo (Ferrara, Gerber, and LeCouter 669-76;Fonsatti et al. 1-7).

Eine erhöhte Expression von ET-1 ist signifikant assoziiert mit der Gefäßdichte (MVD) und der Expression des endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF). ET-1 erhöht die mRNA-Expression von VEGF und induziert VEGF-Level (Brem, Gullino, and Medina 880-82;Ferrara, Gerber, and LeCouter 669-76;Grimshaw 233-44;Hicklin and Ellis 1011-27).

Die Expression von ET-1 und seinen Rezeptoren steigt während der Progression eines Brustkrebs in Korrelation mit seinem malignen Potential an (Brem, Gullino, and Medina 880-82;Ellis and Fidler 388-90;Smollich and Wulffing 239-48)..

## **1.5. Antikörper**

Zur immunhistochemischen Erfassung der Mikrogefäßdichte stehen einige Antikörper zur Verfügung. Neben dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten CD 31-Antikörper

zur immunhistochemischen Detektion ist CD 34 ein oft verwendeter Marker. Dieses Molekül erfasst jedoch neben den Gefäßen auch Fibroblasten und hämatopoetische Stammzellen, wodurch die Sensitivität reduziert wird. Ein neuer Marker, CD105, bekannt als Endoglin, gehört zur Familie der TGF-Rezeptoren (Brem, Gullino, and Medina 880-82; Kumar et al. 856-61). Kumar et al. arbeitete eine prognostische Bedeutung für die Gefäßdichte, ermittelt durch CD105, heraus, nicht jedoch bei Verwendung des panendothelialen Markers CD34. CD105 wird von Gefäßendothelzellen exprimiert und spielt eine zentrale Rolle in der Angiogenese bei Brustkrebs (Bodey et al. 3621-28) und weiteren malignen Prozessen (Dallas et al. 1931-37). Im Gegensatz zu anderen angiogenen Markern scheint die Spezifität für CD105 gegenüber der Gefäßneubildung in Tumoren höher zu sein. Einige Studien zeigten unter Verwendung von CD105 als Antikörper eine Assoziation zwischen einer höheren Gefäßdichte und einer schlechteren Prognose für unterschiedliche Tumorentitäten (Dallas et al. 1931-37; Fujita et al. 664-69; Kumar et al. 856-61; Yao et al. 201-06).

Auch wenn bisher noch kein Konsens über die Zuverlässigkeit der einzelnen immunhistochemischen Marker existiert, gelten sowohl CD31, als auch CD105 und Faktor VIII als adäquat, die Angiogenese zu erfassen (Dallas et al. 1931-37; Vermeulen et al. 2474-84; Vermeulen et al. 1564-79).

## **1.6. MVD als prognostischer Parameter bei Brustkrebs**

Die MVD (mikrovessel density), oder Gefäßdichte ist ein wichtiger Parameter, um die Vaskularisation eines Tumors zu quantifizieren. Viele Studien der letzten 20 Jahre haben die Bedeutung der Tumorgefäßdichte als unabhängigen prognostischen Faktor beschrieben (Dallas et al. 1931-37; Nisato, Tille, and Pepper 591-97). Die

mikroskopische Auswertung immunhistochemisch gefärbten Gewebes stellt ein relativ kostengünstiges, jedoch subjektives Verfahren dar. Daneben existiert die halbautomatisierte Bild – Zytometrie als ein teures, aber leichter zu standardisierendes Verfahren zur Bestimmung der Mikrogefäßdichte. In den frühen 1990er Jahren beschrieben Weidner et al. die quantitative Bestimmung der MVD innerhalb bestimmter Regionen größter Gefäßdichte, den so genannten „hot spots“ als prognostischen Faktor für das Mammakarzinom und berichteten von einer signifikanten Korrelation zwischen dem Grad der intratumoralen Mikrogefäßdichte innerhalb der „hot spot“ Areale und der Wahrscheinlichkeit zur Metastasierung (Dallas et al. 1931-37;Weidner et al. 1-8). In der Folge wurde der Parameter MVD in zwei unabhängigen Studien von Horak et al. (Horak et al. 1120-24) und Weidner et al. (Weidner et al. 1875-87) als signifikanter und unabhängiger Prognoseindikator bei Brustkrebspatientinnen beschrieben. In den bisher veröffentlichten Studien berichten über 75% aller Autoren von einer positiven Assoziation zwischen MVD und der klinischen Prognose der Patientinnen (Gasparini 103-07;Gasparini and Harris 765-82;Gasparini 97-114). Über 85% der durchgeführten Studien identifizierten die Gefäßdichte als einen unabhängigen Prognosefaktor. Die in einem Tumor bestimmte Gefäßdichte wurde auch als Hilfsparameter herangezogen, um Aussagen über die vorliegende Wahrscheinlichkeit zur Metastasierung oder Entwicklung eines Rezidivs zu treffen. Ebenso richtete man sich in der Auswahl des jeweiligen adjuvanten Therapiekonzepts häufig nach dieser prognostischen Größe.

In einer Studie aus dem Jahr 2005 von William et al., wurde die Angiogenese bei Brustkrebs durch die Mikrogefäßdichte unter Verwendung von CD31 quantifiziert. Hierbei wurde die visuelle mit der automatisch detektierten Gefäßdichte für CD31 verglichen und diese in Beziehung zu klinischen Parametern bei Brustkrebs gesetzt. Es ergab sich ein positiver Zusammenhang zwischen MVD und Prognosefaktoren,

wie den Lymphknotenmetastasen. In einer japanischen Studie konnte die Mikrogefäßdichte, welche mittels Faktor VIII Antigen detektiert wurde, als unabhängiger Prädiktor für das rezidivfreie Intervall, sowie das Gesamtüberleben in einem Kollektiv von 252 Patientinnen nachgewiesen werden (Tsutsui, Kume, and Era 312-19). Hinsichtlich der Korrelation zwischen der Angiogenese und der klinischen Prognose gilt das Mammakarzinom als der meist untersuchte solide Tumor (Uzzan et al. 2941-55). In einer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2004 von Uzzan et al. über die Gefäßdichte MVD als prognostischer Parameter bei Frauen mit Brustkrebs wurden 43 Studien mit insgesamt 8936 Patientinnen ausgewertet (Uzzan et al. 2941-55). Hierbei ergab sich in einer Metaanalyse für die MVD als einen Angiogenesemarker eine prognostische Bedeutung hinsichtlich des Überlebens. Dies galt insbesondere bei Patientinnen mit tumorfreien Lymphknoten. Die Wahl des immunhistochemischen Markers schien den Aussagen der Untersucher zufolge das jeweilige Studienergebnis zu beeinflussen. So verwendete Weidner et al. in seiner ersten Studie im Jahr 1992 einen Antikörper gegen Faktor VIII. Dieser färbt insbesondere reife Blutgefäße und zeigt eine Kreuzreaktion mit lymphatischem Endothel (Weidner et al. 1875-87). Dieser ist der am meisten verwendete Marker in den von Uzzan et al. untersuchten Studien. In einigen neueren Studien wurden Antikörper herangezogen, welche sich direkt gegen endotheliale Zelladhäsionsmoleküle richteten, wie CD31 oder CD34. Antikörper gegen CD31 haben gegenüber Faktor VIII den Vorteil, auch unreife Blutgefäße darzustellen. In der Literatur liegen die quantitativen Ergebnisse unter Verwendung von CD31 um 30% höher gegenüber den FVIII-verwendeten Studien (Bodey et al. 3621-28; Dallas et al. 1931-37; Yao et al. 201-06). CD31 und CD34 können jedoch auch mit Fibroblasten und einigen Plasmazellen kreuzreagieren und sind dort meistens nur sehr schwach exprimiert. CD31/PECAM-

1, ein 130-kd Membran-Glycoprotein aus der Immunglobulinfamilie vermittelt Zelladhäsionen (Newman et al. 1219-22).

In einer Studie über die Bedeutung von PECAM-1 in der Angiogenese von Newman et al. (Newman et al. 1219-22) aus dem Jahr 1997 wurde dieses Immunglobulin mittels eines Antikörper im Mausmodell blockiert und folglich die Gefäßneubildung signifikant gehemmt. Insgesamt konnte auch in einer durchgeführten Metaanalyse von Uzzan et al. über MVD als Prognosefaktor eine statistisch signifikante inverse Beziehung zwischen der Angiogenese, repräsentiert durch die Gefäßdichte MVD, und dem Überleben herausgearbeitet werden.

Jedoch findet man zu den statistisch signifikanten Korrelationen in der Literatur auch kontroverse Aussagen. Axelson et al. beispielsweise konnten keine Korrelation zwischen der Angiogenese, welche in dieser Studie durch anti-FVIII Antigen erfasst wurde und Prognosefaktoren, wie dem Lymphknotenstatus feststellen (Axelsson et al. 997-1008).

### **1.6. Genexpressionen bei Hochrisiko Brustkrebs Patientinnen**

Bereits im Jahr 1989 untersuchte Carter et al. ein Kollektiv aus 24 740 Brustkrebspatientinnen hinsichtlich signifikanter Prognoseindikatoren. Die Resultate beschrieben den Lymphknotenstatus und die Tumogröße als unabhängige und additive Prognoseparameter (Carter, Allen, and Henson 181-87).

Zum aktuellen Zeitpunkt gelten die Tumogröße, das Grading und der axilläre Lymphknotenstatus als allgemein anerkannte prognostische Parameter, wobei zuletzt genannter als relevanter Prognosefaktor angesehen wird (Sorlie et al. 10869-74). Sorlie et al. gelang es bereits innerhalb eines unselektierten Brustkrebskollektivs unter Einbeziehung verschiedener Prognoseparameter, 5

Subgruppen zu differenzieren (luminal-A, luminal-B, die normale, HER-2 und basale Subgruppe.), welche mit unterschiedlichen klinischen Verläufen assoziiert waren. Frühere Studien hinsichtlich einzelner Proteinexpressionsprofile berichten von 2 – 6 unterschiedlichen definierten Subgruppen, je nach verwendeten Proteinmarkern, herangezogenen statistischen Auswertungsmethoden und Anzahl der untersuchten Brustkrebsproben. Gemeinsam war allen Studien eine Differenzierung zwischen Östrogen-positiven und -negativen, sowie hoch proliferativen Subgruppen. Letztere wurde weiterhin in Übereinstimmung aller Studien in die basale gegenüber der HER-2-Gruppe unterteilt (Abd El-Rehim et al. 340-50; Jacquemier et al. 767-79; Korschling et al. 1525-33; Makretsov et al. 6143-51; Zhang et al. S75-S76). Mit dem Progress der molekularbiologischen Analysen wurde eine Vielzahl an Genen bei Brustkrebspatientinnen untersucht mit dem Ziel, das Ansprechen auf chemotherapeutische Behandlungsverfahren besser einschätzen und effektiver gestalten zu können, sowie die Brustkrebsbehandlung zu optimieren.

In einer Studie aus dem Jahr 2007 untersuchte Diallo-Danebrock 34 Proteine in einem Kollektiv aus 236 Patientinnen hinsichtlich ihrer Bedeutung in Bezug auf Brustkrebs. Ziel der Studie war es, basierend auf der Proteinexpression prognostisch relevante Subgruppen bei Hochrisiko-Brustkrebspatientinnen herauszuarbeiten. Hierbei erwiesen sich 24 der primär 34 untersuchten Proteine als suffizient, fünf prognostische Subgruppen zu definieren: luminal-A-, luminal-B-, HER-2-, die basale- und die multipel Marker negative Gruppe. Die in der Studie herangezogenen Proteine wurden bereits in vorausgegangenen Arbeiten auf ihre prognostische Bedeutung hin untersucht (Iwao et al. 199-206; Sorlie et al. 10869-74). Die luminal-A und -B Gruppe zeigten ein vergleichbares Proteinexpressionsmuster. Sie zeichneten sich hauptsächlich durch eine starke Ausprägung von Östrogen- und Progesteronrezeptoren, sowie Cytokeratin 8 aus. Weiterhin sind beide Gruppen mit

einer Endothelin-1, ET R $\beta$  und S6 Proteinexpression assoziiert. Im Gegensatz zu der luminal- B Gruppe zeigt die luminal- A Gruppe eine starke Expression von Bcl-2 und  $\beta$ -Cathenin. Luminal- B zeichnet sich durch eine Expression des nukleären CXCR4 aus. Beide Gruppen sind negativ für Basalzellmarker CK5, CK17, EGFR und Vimentin. Hinsichtlich der klinischen Prognose ergab sich zwischen diesen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied. Die dritte selektierte Untergruppe ist charakterisiert durch eine Negativität für multiple Marker, insbesondere den Basalzellmarkern und nimmt hinsichtlich der Prognose eine Mittelstellung ein. Bis auf die Basalzellmarker teilen sich die HER-2 und die basale Gruppe ähnliche Expressionsmuster und zeichnen sich darüber hinaus durch eine schlechtere Prognose aus.

Basierend auf der Zugehörigkeit zur jeweiligen Subgruppe und definiert durch das Proteinexpressionsmuster wurden zwei Behandlungsregime untersucht. Hierbei stand die Hochdosischemotherapie der konventionellen chemotherapeutischen Behandlung gegenüber. Es zeigten die Brustkrebspatientinnen der HER-2- und basalen- Gruppe einen signifikanten prognostischen Vorteil durch die Hochdosis-Chemotherapie hinsichtlich des Gesamtüberlebens und des rezidivfreien Intervalls, verglichen mit einer konventionellen Chemotherapie. Dagegen profitierten die luminalen Subgruppen nicht von einem aggressiveren Therapiekonzept. Die Patientinnen aus der „mehrfach negativen“ Gruppe wiesen tendenziell einen Vorteil von der Hochdosistherapie auf, ohne ein statistisch signifikantes Niveau zu erreichen. Die Resultate aus der Studie von Diallo-Danebrock wurden auch in einer Untersuchung von Rouzier et al. bestätigt. Hierbei definierten Rouzier et al. unterschiedliche Sensitivitäten auf eine präoperativ durchgeführte Chemotherapie mit Anthracyclin und Taxan innerhalb verschiedener Brustkrebsklassen, welche mittels

Genexpressionen analysiert wurden (Abd El-Rehim et al. 340-50; Rouzier et al. 5678-85).

### **1.7. Hochdosis- gegenüber Niedrigdosis- Chemotherapie**

Bisher untersuchten nur wenige Studien den prädiktiven prognostischen Vorteil einer Hochdosis gegenüber einer konventionellen Chemotherapie bei Hochrisiko Brustkrebspatientinnen. Die meisten der erfolgten Untersuchungen fokussierten nur einzelne oder die Kombination weniger Marker. Dazu gehörten insbesondere der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, p53, Her-2/neu und bcl-2 (Abd El-Rehim et al. 340-50; Rodenhuis et al. 7-16). Somlo et al. konnte im Jahr 2002 ein erhöhtes Rezidivrisiko bei p53- und Her-2/neu-Expression und einen prognostischen Vorteil einer intensivierten, chemotherapeutischen Behandlung herausarbeiten. Dagegen war eine Expression von Östrogen- oder Progesteronrezeptor mit einer verminderten Rezidivwahrscheinlichkeit ohne Behandlungsvorteil durch die Hochdosistherapie assoziiert (Abd El-Rehim et al. 340-50; Somlo et al. 281-88).

Der prognostische Vorteil einer Hochdosis-Chemotherapie gegenüber einer konventionellen Behandlung wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert. So evaluierte eine US-Studie aus dem Jahr 2001 eine Reduktion der Rezidivrate, während sich das Gesamtüberleben durch Behandlung einer intensivierten Chemotherapie aufgrund nebenwirkungsbedingter Mortalitäten nicht verlängern ließ (Abd El-Rehim et al. 340-50; Vredenburgh et al. 815-21). Im Gegensatz zu früheren Arbeiten konnte die Westdeutsche Studiengruppe WSG AM-01 eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens und des rezidivfreien Intervalls durch die Anwendung einer Hochdosis-Chemotherapie bei Patientinnen mit Hochrisiko Brustkrebs feststellen. Das Therapieregime wird an anderer Stelle detailliert

beschrieben. Es konnte hierbei ein signifikant höheres rezidivfreies Intervall bei den hochdosistherapierten Patientinnen der HER-2 und basalen Subgruppe erfasst werden (70 gegenüber 56 Monate). Für das Gesamtüberleben als Endpunkt ergab sich ebenfalls ein signifikanter Vorteil in dieser Gruppe durch die aggressivere Therapie mit 87 versus 76 Monaten. In der luminalen Subgruppe dagegen konnte kein Profit von einer intensivierten Therapie aufgezeigt werden. Patientinnen der MMN-Gruppe (multiple marker negative) wiesen eine Tendenz auf, von der HDCT zu profitieren, möglicherweise je nach individueller Expression einzelner Marker innerhalb dieser Gruppe. Patientinnen der MMN-Subgruppe zeichneten sich durch eine starke Expression von CK-8, eine geringe Ausprägung des Östrogen- sowie Progesteronrezeptors und eine fehlende Expression für alle weiteren spezifischen Marker aus.

Diese Ergebnisse sind vereinbar mit den Resultaten einer Studie von Rouzier et al., in welcher unterschiedliche molekulare Brustkrebsklassen, definiert durch Genexpressionsanalysen beschrieben wurden (Abd El-Rehim et al. 340-50; Rouzier et al. 5678-85; Vredenburgh et al. 815-21). Einige Studien mit kontroversen Ergebnissen bezogen sich auf ein Patientenkollektiv mit niedrigerem Erkrankungsrisiko und geringerer Lymphknotenbeteiligung (meist 4 - 9 positive Lymphknoten) (Abd El-Rehim et al. 340-50; Gianni et al. 2312-21; Rodenhuis et al. 588-96; Rouzier et al. 5678-85; Vredenburgh et al. 815-21; Gianni et al. 13-29). In einer retrospektiven Arbeit von Dutch et al. wurde die Effektivität der HDCT bei Patientinnen mit mehr als 9 positiven Lymphknoten gegenüber einem Kollektiv mit 4-9 befallenen Lymphknoten als signifikant höher beschrieben (Rodenhuis et al. 7-16). Zu berücksichtigen ist neben dem prognostischen Vorteil auch das Nebenwirkungsprofil, sowie die therapieinduzierten Mortalitäten und Morbiditäten, so dass es als entscheidende Herausforderung in der Behandlung von

Brustkrebspatientinnen gilt, die einzelnen Behandlungsgruppen genau zu selektieren, um den maximalen therapeutische Erfolg mit dem geringsten Nebenwirkungsprofil zu erzielen.

## **2. Ziel der Untersuchung**

Das Ziel dieser Studie bestand darin, in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe eines bereits gut definierten Kollektivs von 236 Hochrisiko Patientinnen mit mehr als neun befallenen LK der WSG AM 01 Studie hinsichtlich des Gefäßsystems morphometrisch zu analysieren.

Detektiert wurden die Gefäße mittels CD31 als Marker. Anschließend wurden sowohl die Gefäßdichte (MVD), als auch Gefäßfläche (VSA) zur quantitativen Analyse bestimmt.

Diese hieraus gewonnenen Daten untersuchten wir statistisch mit anderen- bereits in einer Vorarbeit als prognostisch oder therapeutisch relevant eingestuften Parametern. Dazu gehörten das Alter, die Tumorgröße, das Grading, der ER-, PR- und Her-2- Rezeptorstatus und die Proliferation. Als Endpunkte unserer Analysen bezogen wir uns auf das Gesamtüberleben (OS) und das rezidivfreie Intervall (EFS). Ziel sollte es sein, zu überprüfen, ob die Tumorvaskularisation ein prognostisch relevantes Merkmal bei Hochrisiko-Brustkrebspatientinnen ist.

### **3. Materialien**

#### **3.1 Chemikalien**

- Aceton pro analysi (Riedel - de Haën, Seelze, Deutschland), 32201
- AEC (Aminoethylcarbazol) (Fa. Linaris, Weinheim; SK - 4200)
- Aquatex® (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- BSA Bovines Serum Albumin (SIGMA), A - 7638
- Citrat Acid Monohydrat (SIGMA), C - 1909
- Di - Natrium - hydrogenphosphat (Merck), 5104.100
- EDTA (ethylen - di - amin - tetra - acetic acid) (SIGMA), E - 5134
- Ethanol, vergällt
- Hämalaun nach Mayer (Hämatoxyllin)
- Kaliumchlorid (Merck), 5189
- Kalium - dihydrogenphosphat (Merck), 4873.5000
- Levamisol (SIGMA), L - 9756
- Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 3957.2
- Salzsäure, HCl 37%ig (Merck), 1.00317.1000
- Tri - Natriumcitrat Dihydrat (Roth), 3580.1
- Trishydroxymethylaminomethan [TRIS] (Roth), 4855.2
- TRIZMA® (Trispuffer) Hydrochloride (SIGMA), T - 3253
- Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) 30%, (Merck), 1.08597.1000
- Xylol
- Ziegenserum (DAKO Ziegenserum X0907)

### 3.2 Puffer und Substratlösungen

- AP - Substratlösung:

Fast Red in Tablettenform in TRIS - Puffer aufgelöst, filtriert und als Chromogen eingesetzt.

- BSA / PBS bzw. BSA / TRIS 1%:

0,5g BSA in 50ml PBS bzw. TRIS - Puffer (pH6,7) lösen

- Citrat - Puffer (pH3,8):

25,5g Citrat Acid Monohydrat + 23,5g tri - Natriumcitrat in 400ml aqua bidest. lösen

- Phosphat - Puffer (Phosphate Buffered Saline [PBS - Puffer]) (pH7,4):

- 10 - fach konzentrierte Lösung:

8,7g Natriumchlorid + 0,2g Kaliumchlorid + 0,2g Kalium - dihydrogenphosphat + 1,15g di - Natrium - hydrogenphosphat ad 100ml aqua bidest. pH7,4 einstellen

Gebrauchslösung: konzentrierte Lösung 1:10 mit aqua bidest. verdünnen und pH - Wert (7,4) kontrollieren

- TRIS - Puffer (pH 7,6) Stammlösung:

8,78g Natriumchlorid + 6,85g TRIZMA®HCl + 0,9g TRIS ad 1000ml aqua bidest. pH7,6 einstellen

Gebrauchslösung: Stammlösung 1:10 mit aqua bidest. verdünnen

### **3.3. Antikörper und Antikörperkomplexe**

#### **3.3.1. CD31**

CD31 ist auch unter der Bezeichnung PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molekule-1) bekannt. Es ist ein 130 kDa schweres integrales Membranprotein, ein Mitglied der Immunglobulinfamilie, welche Zell- zu- Zell- Adhäsionen vermitteln. CD31 wird auf der Oberfläche adulter und embryonaler Endothelzellen exprimiert und findet sich darüber hinaus in schwacher Ausprägung auf peripheren Leukozyten und Thrombozyten. Außerdem wurde CD31 auf hämatopoetischen und embryonalen Stammzellen detektiert. Dieses Membranprotein ist an der transendothelialen Migration von neutrophilen Granulozyten beteiligt und scheint nach stattgefunder Extravasation in entzündliches Gewebe auf den neutrophilen Granulozyten herunterreguliert zu werden. Bisher wurden mehrere Isoformen beschrieben, welche durch alternatives Splicen entstehen können und bei der Regulation der Spezifität für bestimmte Liganden eine spezifische Rolle spielen. CD38 und der Vitronectin Rezeptor fungieren als Liganden für CD31 zu.

#### **3.3.2. Sekundärantikörper**

Biotinylierter goat anti - mouse IgG Vectastain (Linaris, Weinheim, Deutschland)- monoklonaler Maus Antikörper

#### **3.3.3. Antikörperkomplexe**

Alkalische Phosphatase markierter Avidin - Biotin - Komplex Vectastain (Alkalische Phosphatase Standard ABC Kit PK 5002)

## **4. Patienten und Methoden**

### **4.1. Patienten**

#### **4.1.1. Kollektiv der WSG AM01**

In der vorliegenden Arbeit wurden Gewebeproben eines bereits im Vorfeld gut charakterisierten Patientenkollektivs von 236 Mamma - Karzinom Patientinnen morphometrisch analysiert. Das Patientenkollektiv wurde in der West German Study Group AM01 randomisiert und in einer vorangegangenen Studie auf die Expression von 24 Proteinmarkern hin untersucht und anhand der Ergebnisse in fünf Subgruppen eingeteilt. Bei den charakterisierten Patientinnen handelte es sich um ein sog. Hochrisikokollektiv, welches sich durch einen Befall von mindestens neun axillären Lymphknoten zum Zeitpunkt der Primärdiagnose auszeichnete.

Behandelt wurden die Patientinnen innerhalb einer prospektiven multizentrischen Studie, wobei eine Hochdosis- mit einer Niedrigdosis- Chemotherapie verglichen wurde. Das pathologische Institut der westdeutschen Studiengruppe AM-01 stellte repräsentatives Tumorgewebe von 236 (56%) aus dem initial 403 Patientinnen umfassenden Kollektiv zur Verfügung (Diallo-Danebrock et al. 488-97).

#### **4.1.2. Behandlungsregime**

Die Hochdosis- Chemotherapie bestand aus einer kurzen Induktion aus zwei Zyklen Epirubicin und Cyclophosphamid (90:600 mg/m<sup>2</sup>), gefolgt von einer gleichzeitigen Gabe von Epirubicin, Cyclophosphamid und Thiopeta (90:3000:4000 mg/m<sup>2</sup>). Supportiv wurden autologe periphere Stammzellen infundiert. Die Niedrigdosis-Chemotherapie charakterisierte sich durch vier Zyklen von Epirubicin und

Cyclophosphamid (90:600 mg/m<sup>2</sup>), sowie drei Zyklen bestehend aus Cyclophosphamid, Methotrexat und Flurouracil. Verabreicht wurde dieses Schema in 2-wöchigem Intervall mit supportiver Gabe von Wachstumsfaktoren.

Im Vorfeld wurde mittels Röntgen-Thorax, Lebersonographie und Knochenszintigraphie klinisch eine Metastasierung ausgeschlossen und somit ein cM0 Status vorausgesetzt.

Die WSG AM-01 Studie wurde durch die Ethikkommission überwacht und es lag von jeder Patientin ein schriftliches Einverständnis vor.

#### **4.1.3. Auswertung der Gewebeproben**

Die immunhistochemische Färbung wurde in einer vorausgegangenen Arbeit von Diallo-Danebrock et al. an 3µm dicken Paraffinschnitten vorgenommen und schloss 34 Proteine als untersuchte Merkmale ein (Diallo-Danebrock et al. 488-97). Die Ergebnisse aus dieser Untersuchung standen uns zur Verfügung und waren nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Die gefärbten Schnitte wurden anschließend von zwei Pathologen bewertet, ohne dass diese Informationen über das klinische follow-up erhielten. Die unabhängig voneinander durchgeföhrten Analysen zeigten eine Korrelation von 96%. Als bekannte Größen galten in dem Kollektiv das Alter, der Lymphknotenstatus, der menopausale Status, die Tumorgröße, der Grad des Karzinoms und der Rezeptorstatus. 116 Patientinnen wurden einer Hochdosis Behandlung zugeführt, während 120 Frauen in den Niedrigdosis- Arm randomisiert wurden.

Als Endpunkte betrachtete man zum einen das ereignisfreie Intervall (EFS) und zum anderen das Gesamtüberleben (OS). Ersteres definiert sich als das Zeitintervall von der primären therapeutischen Intervention, bis zum Auftreten des ersten

lokoregionären Rezidivs oder einer Metastase. Es zeigte sich hinsichtlich dieser Parameter ein signifikant besseres EFS nach Behandlung mit Hochdosis Chemotherapie gegenüber einem dose - dense Schema in der Vergleichsgruppe. Der zweite betrachtete Endpunkt charakterisiert das Intervall vom Beginn der Behandlung bis zum Zeitpunkt des Todes. Auch hier zeigte sich ein signifikantes Überlegen der aggressiveren, intensivierten Zytostatikabehandlung.

## **4.2 Vorbehandlung des Gewebes**

Durch die Formalinfixierung und anschließende Prozessierung des Gewebes in Paraffin findet eine Denaturierung zellulärer Proteine statt. Dies führt zu einer Maskierung von Epitopen der primären Aminosäuresequenz der Proteine, welche die immunhistochemische Detektion erschwert oder unmöglich macht. Es wurden Methoden verwendet, die es ermöglichen, maskierte Proteinepitope wieder für Antikörper zugänglich zu machen. Hierzu gehört die Hitzebehandlung von Geweben in der Mikrowelle, wobei eine Zitrat - Lösung (pH 9,0) als Puffer verwendet wird. Die Inkubationsdauer und die Energie (Watt) wurden dabei für jeden Antikörper optimiert.

## **4.3. Immunhistochemische Färbung:**

1. Schnitte über Nacht bei 37°C oder 30min. bei 70°C trocknen (auf SuperFrost OT)
2. Entparaffinieren: Xylol (5min., 5min., 5-45min), absteigende Alkohol-Reihe (2x5min Propanol, 2x5min. 96% Ethanol, 5min. 70% Ethanol) → A.d. gründlich waschen
3. Im Autoklav bei 96°C 30min. in TRS pH 9,0 erhitzen (Antigen-Demaskierung) → 30min. bei Raumtemperatur abkühlen (Target Retrieval Solution pH 9,0, Dako, REF S 2367)
4. Waschen in Aqua dest. → PBS

5. 1h Blocken mit 10% Goat/1%BSA/PBS
6. 1°AK Pecam1 (CD31 monoklonal) 1:20 in 5. über Nacht bei 4°C (mono mouse anti human CD31, clone:JC70A, DAKO)
7. Waschen in PBS
8. 1h mit 2°C AK anti-mouse-AP 1:50 in 5. (Raumtemperatur) (goat anti-mouse-AP konj., Sigma-Aldrich Chemie)
9. Waschen in A.d.
10. 1h mit Fast Red färben (RT) (Fast Red TR/Naphthol As Mx Ta, Sigma-Aldrich-Chemie)
11. Waschen in A.d.
12. 1min. gegen färben mit Hämalaun
13. Waschen mit A.d. (keine Alkohol-Reihe)
14. Eindeckeln mit Aquatex (Merck)

#### **4.4 Morphometrie des Gefäßsystems**

Die vorliegenden Gewebeschnitte wurden zunächst bei niedriger Vergrößerungsstufe durchmustert, um die am stärksten vaskularisierten Abschnitte („hot spots“) zu identifizieren. Dabei wurde nach dem Protokoll von Weidner und Mitarbeiter verfahren (Gasparini et al. 454-66; Weidner et al. 1875-87). Anschließend erfolgte die Identifikation der „hot spots“ mit einem Mikroskop (Zeiss Axiophot, Göttingen, Deutschland) bei einer 200-fachen Vergrößerung unter Einsatz eines digitalen Bildbearbeitungsprogramms (Zeiss Axiovision, Göttingen, Deutschland). Je Tumor wurden 4 - 6 Areale ohne Kenntnis klinischer oder prognostischer Parameter ausgewertet und anschließend jeweils die Mittelwerte und Mediane gebildet. Als Mikrogefäß wurde dabei jede Struktur gewertet, die durch eine rote Anfärbung klar von anderen Mikrogefäßen, Tumorzellen oder Bindegewebe unterschieden werden konnte. Zur Bestimmung der Gefäßdichte innerhalb der „hot spots“ wurde neben der Gefäßanzahl (micro vessel density, MVD) auch die Gesamtgefäßfläche (vascular

surface area, VSA) ermittelt. Dies geschah manuell unter Verwendung eines transparenten Gitternetzes, bestehend aus 3400 Quadraten (Fläche DIN A4) mit einer Kantenlänge von 4mm. Auf Ausdrucken der digitalisierten Bilder der CD31 Färbung der Tumoren wurde das Gitternetz platziert und anschließend die Flächenauswertung vorgenommen, wobei jedes Quadrat, in dessen linker, oberer Ecke ein Gefäß angeschnitten wurde, als positiv gewertet wurde. Die Summe der Quadrate wurde in Relation zur Gesamtsumme von 3400 Quadraten in Prozent ausgewertet.

Für die Untersuchung fanden ausschließlich Tumorpräparate guter Farbqualität, mit einer fehlenden bzw. geringen Hintergrundfärbung Verwendung. Bei der Untersuchung des Mammakarzinom Tumorgewebes konnte in 107 Fällen keine auswertbare CD 31 Färbung erzielt werden. Diese Präparate wurden daher nicht in die morphometrische Analyse einbezogen. In den meisten Fällen der ausgeschlossenen Präparate konnte keine hinreichende Färbequalität erreicht werden, um die Gefäße eindeutig identifizieren zu können. In wenigen Präparaten war nur Normalgewebe angefärbt, oder die Areale mit Tumornekrose dominierten das Präparat. Im Falle schlechter Färbequalität wurden zunächst Nachfärbungen vorgenommen und erst bei wiederholter mangelhafter Qualität das Präparat von der Auswertung ausgeschlossen.

#### **4.5. Mikroskopie und Auswertung**

Die mittels CD 31 immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden von zwei unabhängigen Beobachtern lichtmikroskopisch semiquantitativ analysiert (Zeiss Axiophot, Göttingen, Deutschland). Die CD31 Markierung wurde gemäß der oben

beschriebenen Methode von Weidner et al. beurteilt (Weidner et al. 1991, Konerding et al. 2001) und bis zu 9 verschiedene Areale pro Brustkrebsgewebe ausgewertet. 10 % randomisierter Fälle wurden ohne Kenntnis des primären Ergebnis von einem erfahrenen Pathologen (A.G.) re-evaluierter, um die interindividuellen Unterschiede der einzelnen Beobachter hinsichtlich des Ergebnis zu analysieren.

#### **4.6. Statistische Auswertung**

Die Endpunkte beider Therapieoptionen stellten das rezidivfreie Intervall (EFS) und das Gesamtüberleben (OS) dar. Dabei wurde die Kaplan-Meier Methode verwendet, um die kumulative Überlebenszeit für prä- definierte Subgruppen abschätzen zu können. Mit dem standardisierten log-rank Test wurde überprüft, ob die Populationen sich statistisch signifikant unterscheiden ( $p<0,05$ ).

Das Cox - Hazards - Modell wurde in die statistische Auswertung zur Einschätzung der Auswirkungen unterschiedlicher Kovariablen, wie histopathologische Parameter und die Expression von Markern mit einbezogen. Die Vergleiche der Hazard ratio wurden unter Berücksichtigung eines 95%-igen Konfidenzintervalls vorgenommen. Dadurch konnte jeweils das relative Risiko zu einem bestimmten Zeitpunkt abgeschätzt werden. Alle Variablen wurden als kategorisierte Daten verwendet, weshalb eine Korrespondenz zu den Ergebnissen der unterschiedlichen Proteinmarker (positiv/negativ) vorausgesetzt wurde. Alle statistischen Berechnungen wurden mit der Statistiksoftware SPSS 5.0 für Windows ausgeführt.

## **5. Ergebnisse**

### **5.1. Morphometrische Auswertung**

Aus dem Kollektiv der 236 Patientinnen konnte in 129 Fällen eine gute Färbequalität mit Antikörper gegen CD31 erzielt und diese für die morphometrische Analyse herangezogen werden. Von diesen wurden 72 Patientinnen innerhalb der Hochdosischemotherapie - Gruppe und 57 innerhalb der konventionellen Chemotherapie randomisiert behandelt. Der für das Alter ermittelte Median betrug 48 Jahre (Mittelwert  $48.07 \pm 8.73$  Jahre), für die Tumorgröße 3 cm (Mittelwert  $3,55 \pm 1.89$  cm) und für die Anzahl an positiven Lymphknoten 16 (Mittelwert  $18 \pm 7$ ). Die Erhebung der Gefäßanzahl ergab einen Median von 13 Mikrogefäßen (Mittelwert  $13.8 \pm 5.30$ ) und die Bestimmung der Gefäßfläche (VSA) einen Median von 2.52% (Mittelwert  $2.62 \pm 1.03$ ). Die Mediane für MVD (13) und VSA (2.52%) definierten den cut-off zweier Untergruppen (niedrige vs. hohe Gefäßdichte). Nachfolgend wurden beide Gruppen einer statistischen Auswertung hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens (EFS) und des Gesamtüberlebens (OS) unterzogen. Die Gruppe mit niedriger Gefäßdichte wurde als Gruppe A, diejenige mit hoher Gefäßdichte als Gruppe B bezeichnet.

### **5.2. Korrelation von MVD und VSA mit klinisch relevanten Parametern**

Sowohl die Mikrogefäßdichte, als auch die Mikrogefäßfläche wurden in Korrelation zu klinisch relevanten Parametern beim Mammakarzinom gesetzt. Ein Teil dieser Daten wurde in einer vorangegangenen Studie bei diesem Kollektiv erhoben (Östrogenrezeptorexpression, Progesteronrezeptorexpression, Expression von Her-

2neu, Ki-67 Expression (Proliferation) und die molekulare Klassifikation) und in dieser Arbeit erneut verwendet, um sie mit der Vaskularisation zu korrelieren (Diallo-Danebrock et al. 488-97). Klinische Parameter waren das Alter der Patientinnen, die Tumorgröße, die Anzahl positiver Lymphknoten und der Tumorgrad.

Hierbei ergab sich bei der Bestimmung der VSA (Mikrogefäßfläche) für das Grading ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p= 0,059$ ), während sich bei der Mikrogefäßzählung keine statistische Signifikanz zeigte. Für die Ki-67 Expression konnte ebenfalls lediglich für VSA ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p= 0,006$ ) herausgearbeitet werden, während die Bestimmung der Gefäßzahl keine statistische Signifikanz erbrachte. Auch für die Molekulare Klassifikation als dritten Parameter ergab sich mit  $p= 0,018$  ein statistisch signifikanter Unterschied in der Bestimmung der Gefäßfläche (VSA), nicht jedoch der Mikrogefäßdichte (MVD).

Keine Korrelation ergab sich zwischen allen weiteren untersuchten Parametern. Weder das Alter der Patientinnen als erfasste Größe, noch die Tumorgröße, der Lymphknotenstatus, der Östrogen-, Progesteron- oder HER-2 neu Rezeptorstatus konnte bei der Korrelation mit der Gefäßfläche oder Gefäßdichte eine statistische Signifikanz ausdrücken. Weiterhin haben wir die untersuchten vaskulären Parameter Mikrogefäßdichte und Mikrogefäßfläche in Beziehung zur Proteinexpression des Faktors Endothelin-1 und deren korrespondierenden Rezeptoren ET-RA und ET-RB gesetzt.

Hierbei ergab sich in der univariaten Analyse für alle diese Parameter keine statistisch signifikante Beziehung im Vergleich zur Mikrogefäßdichte und den Gefäßflächen sowohl für die Hochdosis Gruppe als auch für die Dose-dense Therapiegruppe. Die Analyse ist in **Tabelle 1** zusammengefasst.

### **5.3. Korrelation von CD31 mit anderen Gefäßmarkern (CD105, FVIII)**

Am gleichen Tumorkollektiv wurde mittels Immunhistochemie der Marker CD105 und Faktor VIII gefärbt und eine morphometrische Analyse der Mikrogefäßdichte und der Mikrogefäßfläche vorgenommen, deren detaillierte Auswertungen jedoch nicht Gegenstand dieser Dissertation sind. Hierbei zeigte sich eine enge Korrelation sowohl für den MVD als auch für die VSA zwischen CD31 und CD105 [ $p<0.001$ ]. Auch eine korrelierende Analyse zwischen Faktor VIII und CD31 hinsichtlich der beiden untersuchten Parameter ergab eine Signifikanz mit  $p=0.045$  für MVD und  $p=0.048$  für VSA. Die Details sind in **Tabelle 2** dargestellt.

In der statistischen Auswertung kam der Spearman rho Test als Maß für die Stärke des untersuchten monotonen Zusammenhangs zur Anwendung. Dieser nimmt Werte zwischen +1 und -1 an, wobei ein negatives Vorzeichen einen gegensinnigen, ein positives Vorzeichen einen gleichsinnigen Zusammenhang widerspiegelt. Im Falle  $r=0$  besteht kein monotoner Zusammenhang.

### **5.4. Morphometrische Analyse der Angiogenese unabhängig von der angewendeten Therapie**

#### **5.4.1. Gefäßzählung (MVD)**

Weiterhin wurden Überlebensanalysen von zwei prognostischen Gruppen (Gruppe A und Gruppe B; siehe Beschreibung des Patientenkollektivs) in Abhängigkeit von VSA und MVD vorgenommen. Dabei wurde der cut-off Level jeweils durch den Median definiert. In der CD31-Färbung ergab sich ein cutt-off Wert von <13 vs.  $\geq 13$  für MVD und für VSA < 2.52% vs.  $\geq 2.52\%$ .

Für die Mikrogefäßzählung ergab sich für das mediane rezidivfreie Überleben in der Gruppe A mit niedrigem MVD  $60 \pm 11.0$  Monate (38 Ereignisse) und  $58 \pm 17.6$  Monate (36 Ereignisse) für die Gruppe mit hoher Gefäßanzahl. Der Vergleich beider Gruppen hinsichtlich der Gefäßzahl zeigte sich als nicht statistisch signifikant [ $p=0.667$ ]. In der Analyse des gesamten Überlebens wurden  $87 \pm 9.2$  Monate (26 Ereignisse) für die Patientinnen mit niedrigem MVD ermittelt, während bei der Gruppe mit einer hohen Gefäßzahl die mittlere Überlebenszeit  $113 \pm 25.9$  betrug (28 Ereignisse). Der Unterschied ist ebenfalls nicht statistisch signifikant [ $p=0.776$ ].

#### **5.4.2. Gefäßfläche (VSA)**

Bei der Analyse der Gefäßflächen ergab sich für das mediane rezidivfreie Überleben  $72 \pm 13.3$  Monate (34 Ereignisse) für die Patientinnen mit niedrigem VSA und  $58 \pm 15.3$  Monate (40 Ereignisse) für die Gruppe mit hoher Gefäßfläche [ $p=0.425$ ]. In der Analyse des gesamten Überlebens errechneten wir 98 (mangelnde Streubreite der Ergebnisse) Monate (26 Ereignisse) für die Patientinnen mit niedrigem VSA während bei der Gruppe mit einer hohen Gefäßfläche die mittlere Überlebenszeit aufgrund mangelnder Streubreite nicht in die Auswertung einbezogen werden konnte (28 Ereignisse). Der Unterschied war nicht statistisch signifikant mit [ $p= 0.588$ ].

Zusammenfassend konnte keine statistisch signifikante Korrelation der beiden Gruppen A und B in Abhängigkeit von MVD oder VSA hinsichtlich der beiden untersuchten Parameter des rezidivfreien Intervalls und der Gesamtüberlebenszeit erfasst werden. Die Details sind in **Tabelle 3** dargestellt.

## **5.5. Morphometrische Analysen der Angiogenese abhängig von der angewendeten Therapie (DDCT vs. HDCT)**

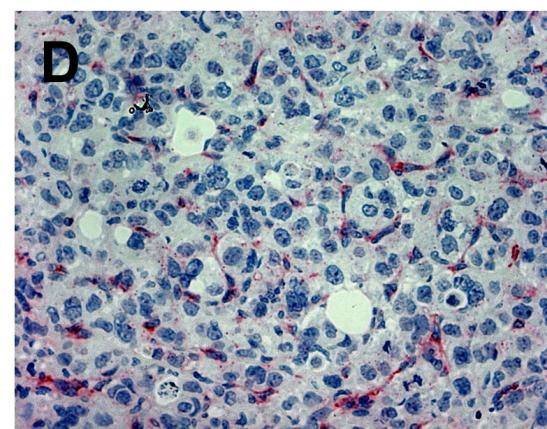
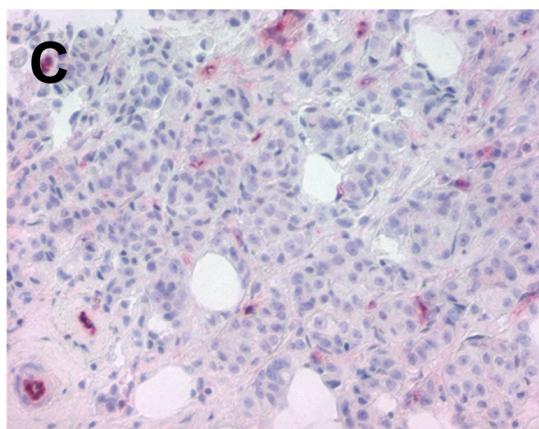
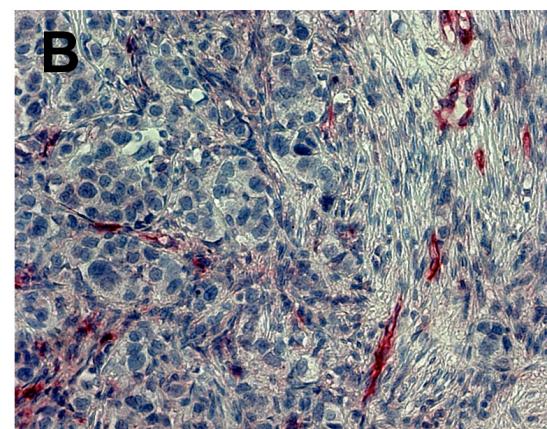
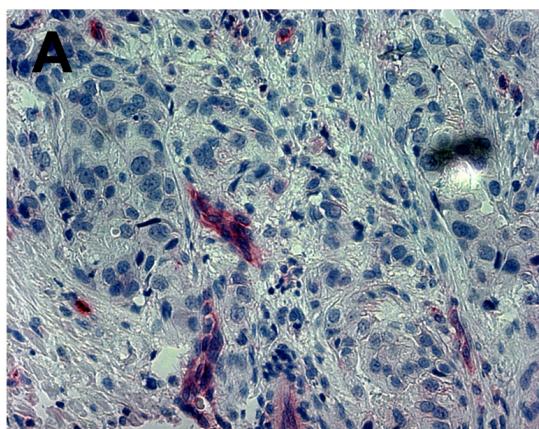
Bei diesem Vergleich wurden innerhalb der Gruppe mit niedriger Gefäßdichte/Gefäßfläche die Patientinnen mit DDCT denen mit der HDCT gegenübergestellt. Hier ergab sich innerhalb der Gruppe A für den MVD  $98 \pm 19.2$  Monate in der HDCT Gruppe (16 Ereignisse) gegenüber  $46 \pm 5.0$  Monate für die DDCT- Gruppe (22 Ereignisse), ohne statistisch signifikantem Unterschied [ $p=0.135$ ] für das rezidivfreie Überleben. Beim Gesamtüberleben ergab sich mit  $98 \pm 27.4$  im Falle einer HDCT vs.  $77 \pm 4.8$  für DDCT ebenfalls kein statistischer Unterschied [ $p=0.268$ ] bei der Gruppe A. Für die Gefäßfläche VSA als untersuchten Parameter konnte hinsichtlich beider untersuchter Endpunkte EFS und OS kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Therapiegruppen HDCT vs. DDCT mit [ $p= 0.103$ ] und [ $p=0.095$ ] erfasst werden.

Beim Vergleich innerhalb der Gruppe B mit hoher Gefäßdichte/Gefäßfläche ergab sich hinsichtlich des rezidivfreien Intervalls mit  $86 \pm 20.9$  Monaten (20 Ereignisse) bei Hochdosis behandelten Patientinnen gegenüber  $38 \pm 12.8$  Monaten ( 16 Ereignisse) im Falle einer DDCT und einem errechneten  $p = 0.127$  kein statistisch signifikanter Unterschied.

Beim Gesamtüberleben als definierender Endpunkt ließ sich mit  **$p = 0.026$**  der einzige statistisch signifikante Unterschied zwischen einer Hochdosis- und Niedrigdosisbehandlung innerhalb der Gruppe B feststellen. Dabei lag MVD für HDCT- Patientinnen bei  $113 \pm 18.9$  (13 Ereignisse) vs.  $54 \pm 9.6$  für DDCT- Patientinnen (15 Ereignisse).

Im Falle des VSA konnte für die Gruppe B weder hinsichtlich des rezidivfreien Intervalls mit  $73 \pm 19.4$  (20 Ereignisse) gegenüber  $38 \pm 13.1$  (20 Ereignisse) und  $p=0.103$ , noch des Gesamtüberlebens mit  $p = 0.097$  eine statistisch signifikante Abhängigkeit gezeigt werden. Im Falle der Hochdosisbehandlung ließ sich aufgrund mangelnder Streubreite für das Gesamtüberleben kein verwertbares Ergebnis für VSA bestimmen.

### 5.6. Bildertafel



#### Legende:

In den Abbildungen A – D ist jeweils eine Färbung von Mammakarzinom mit Antikörper gegen CD31 dargestellt. Abbildung A und B zeigt zwei Karzinome mit Hochdosis Chemotherapie behandelt, wobei in A eine geringe und in Abbildung B

eine starke Vaskularisation dargestellt ist. In Abbildung C und D ist eine Färbung gezeigt, von „Dose Dense“ therapierten Mammakarzinomen. In Abbildung C ist ein Karzinom mit geringer und in Abbildung D mit starker Vaskularisation dargestellt.  
(ABC/AP Färbung Vergrößerung 20-fach)

## **6. Diskussion**

### ***6.1. Bedeutung der Angiogenese***

Judah Folkman erkannte als einer der Ersten die zentrale Bedeutung der Gefäße für das Tumorwachstum, die Tumorinvasion sowie hämatogene und lymphogene Metastasierung von Tumoren und formulierte grundlegende Theorien zur Tumorangiogenese (Folkman 1182-86).

Folkman's Hypothesen basieren darauf, dass Tumoren bis zu einer gewissen Größe nur durch Diffusion aus dem bereits bestehenden Gefäßsystem mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. Erst bei weiterem Tumorwachstum rekrutiert der Tumor Gefäße durch Aussprossung neuer Gefäßknospen („sprouts“) aus dem bestehenden Gefäßsystem des umgebenden Gewebes. Er bezeichnete diesen Vorgang als „angiogenic switch“ (Folkman 27-31). Weiterhin postulierte er bereits in frühen Arbeiten einen Faktor, der die Tumorgefäße zur Proliferation anregen kann. Er bezeichnete diesen als Tumor Angiogenese Faktor (TAF). Seit dieser Zeit wird der Vorgang der Angiogenese in Tumoren intensiv beforscht mit dem Ziel, Moleküle auf der Tumorendothelzelle zu identifizieren und therapeutisch nutzbar zu machen.

### ***6.2. Morphometrische Analyse***

Für die morphometrische Auswertung der intratumoralen Mikrogefäß stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Im Jahr 1991 veröffentlichten Weidner und Folkman die erste Arbeit zur Bedeutung des Mikrogefäßsystems für die Prognose und Metastasierung bei Patientinnen mit Mammakarzinom. Sie ermittelten an immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparaten mit Antikörpern gegen Faktor VIII Areale höchster Gefäßdichte und bezeichneten diese als „hot spots“. Damit

legten sie die Grundlage für die morphometrische Erfassung der Mikrovaskularisation von Tumoren und konnten zeigen, dass eine höhere Mikrogefäßdichte mit einer frühen Metastasierung korreliert und ein unabhängiger prädiktiver Faktor ist. Mit jeder Erhöhung um 10 Mikrogefäße stieg das Risiko für eine Metastasierung des Mammakarzinoms um den Faktor 1.17 an (Weidner et al. 1-8), (Weidner et al. 1875-87). Der Methode nach Weidner steht die Auswertung mittels „Chalkley Count“ gegenüber. Das Vorgehen der Zählung nach Chalkley wurde in früheren Arbeiten detailliert beschrieben (Fox et al. 275-83) (Fox et al. 109-16). Die Methode nach Weidner bestimmt die Gefäßdichte, während der „Chalkley Count“ die relative Fläche in einem Areal hoher Gefäßdichte des Tumors evaluiert. Hierbei wird bei der Bestimmung des „Chalkley Counts“ die Größe eines Mikrogefäßes in die Bewertung mit einbezogen. Bei der Methode nach Weidner werden in die Auswertung auch einzelne angefärbte Endothelzellen erfasst. Die Ausbildung eines Gefäßlumens ist hier keine notwendige Voraussetzung, um als intratumorales Gefäß gewertet zu werden. In zahlreichen vorausgegangenen Arbeiten wurden die Methoden zur morphometrischen Auswertung analysiert und kontrovers diskutiert. Aufgrund der häufig widersprüchlichen Aussagen hinsichtlich der Methodik zur morphometrischen Analyse von Tumorgewebe wurde 1996 und 2002 ein internationaler Konsensus über die Methodik und die Kriterien zur quantitativen Evaluation der Angiogenese publiziert (Vermeulen et al. 1564-79). Dabei beziehen sich die Angaben ausschließlich auf epitheliale Tumore (z.B. Mammakarzinom), (Tomlinson et al. 3516-22).

In der Literatur findet man zahlreiche Beispiele über die Variabilität der Ergebnisse in Abhängigkeit der verwendeten morphometrischen Analyse. (Hansen et al. 428-36;Dhakal et al. 1049-59;Dhakal et al. 1049-59;Minhajat et al. 717-23). In einer Arbeit von de Jong et al. wurde die Bestimmung der Gefäßdichte MVD nach drei

unterschiedlichen Zählungsverfahren bestimmt. Zum einen erfassten die Autoren die Gefäßdichte innerhalb der Areale größter Gefäßdichte in 4 und 10 Feldern. Daneben bestimmten sie MVD im gesamten Tumorareal, ohne primär die „hot spots“ in niedriger Vergrößerung mikroskopisch zu identifizieren. Hierbei ergab sich die signifikanteste prognostische Bedeutung bei der Bestimmung von 4 Feldern innerhalb der „hot spot Areale“. Im Falle 10 ausgewerteter Felder war die prognostische Bedeutung geringer signifikant und bei der Errechnung der globalen Gefäßdichte konnte kein statistisch signifikanter Prognosefaktor aus dem Parameter MVD errechnet werden (de Jong, van Diest, and Baak 306-12). Auf Grund dieser Daten haben wir in der hier vorliegenden Arbeit 4-6 Areale größter Gefäßdichte sowohl im Randbereich, als auch im Zentrum ausgewertet. Die nach Weidner et al. beschriebene Methode zur Bestimmung der Gefäßdichte gilt in der Literatur als ein allgemein anerkanntes Verfahren und findet in vielen vorangegangenen Studien als ein Standard Anwendung - so auch in unserer Arbeit. Als Untersuchungsmaterial standen uns 20 x 35 mm große Paraffinblöcke zur Verfügung, aus denen 3 µm große Paraffinstücke immunhistochemisch gefärbt wurden. Die Auswahl der „hot spot“ Areale unterliegt zwar der Subjektivität des Untersuchers, dennoch konnten wir eine enge Korrelation zwischen den erhobenen Primärdaten und einer Reevaluation eines erfahrenen Tumorpathologen mit einer Interobservervariabilität von ≤ 5% zeigen (Gluz et al.). Dies scheint aus unserer Sicht vernachlässigbar klein zu sein.

Insgesamt werden die Methoden zur quantitativen Bestimmung der Gefäßmorphometrie in der Literatur sehr kontrovers diskutiert und es bedarf sicher noch weiterer insbesondere vergleichender Untersuchungen, um einen „Goldstandard“ in der morphometrischen Analyse von Tumorgewebe formulieren zu können. In der hier vorliegenden Arbeit kamen zur Bestimmung der

Gefäßmorphometrie und Erhebung der Angiogeneseparameter MVD und VSA nach heutigem Kenntnisstand allgemein anerkannte Methoden zur Anwendung.

### **6.3. Korrelierende Analyse von MVC und VSA in Abhängigkeit des verwendeten Gefäßmarker**

Für den Nachweis der Neoangiogenese am Primärtumor steht unter anderem die immunhistochemische Färbung zur Verfügung. Hierbei beeinflusst einige Autoren zufolge die Wahl des Antikörpers die Auswertungsmethode wesentlich. Erstmals beforschten Weidner et al. 1991 die intratumorale Gefäßdichte (MVD) bei Brustkrebspatientinnen unter Verwendung von Faktor VIII als immunhistochemischen Marker. Hierbei konnte ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und der Metastasierung festgestellt werden. Diese Arbeit definierte die heute noch angewandte Methode in der morphometrischen Auswertung der intratumoralen Mikrogefäßfläche (Weidner et al. 1-8). Dieser Studie folgten zahlreiche weitere, welche die Angiogenese unter Verwendung verschiedener Antikörper als prognostisch ungünstigen Parameter beschrieben. Die Verwendung des „optimalen“ Markers ist immer noch Gegenstand kontroverser Diskussionen. CD 31 wurde in vorausgegangenen Arbeiten als panendothelialer Marker kontrovers bewertet. Exprimiert wird dieser sowohl von Plasmazellen, als auch Makrophagen und Neutrophilen (Leek 4325-31), während hingegen CD 105 fast ausschließlich auf Endothelzellen von peri- und intra-tumoralen Blutgefäßen exprimiert wird (de Caestecker, Piek, and Roberts 1388-402). Neben CD 31 wurde in einer weiteren parallelen Arbeit dasselbe, hier untersuchte Patientenkollektiv, unter Verwendung von CD 105 (Endoglin) morphometrisch analysiert. Sowohl die Proliferation zu malignem Gewebe, als auch die Hämatopoiese scheinen über Endoglin gesteuert zu

werden. TGF- $\beta$  wird nahezu ausschließlich von Endothelzellen in peri- und intratumoralen Blutgefäßen, sowie von tumoralen Stromazellen exprimiert (de Caestecker, Piek, and Roberts 1388-402). Im Gegensatz zu weiteren TGF- $\beta$  Rezeptoren wurde für Endoglin eine nahezu ausschließliche Expression auf Gefäßendothelzellen gefunden. Somit scheint die Spezifität für CD 105 im Gegensatz zu CD 31 höher zu sein, auch wenn eine Korrelation der verwendeten Gefäßmarker CD 31, Faktor VIII und CD 105 in Bezug auf die morphometrischen Parameter MVD und VSA eine statistisch signifikante Assoziation aller drei Marker erbrachte. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Klon JC 70, einem anti- CD31 Antikörper, stand uns ein Endothelmarker zur Verfügung, mit dem ein verlässlicher Mikrogefäßnachweis bei formalinfixierten in Paraffin gebetteten Präparaten möglich ist und bereits in einer Vielzahl vorausgegangener Arbeiten Anwendung fand (Hlatky, Hahnfeldt, and Folkman 883-93). Dennoch lassen sich divergierende Ergebnisse zwischen dieser und einer Parallelarbeit mit CD 105 hierdurch möglicherweise erklären.

#### **6.4. Korrelierende Analyse von CD 31 mit konventionellen**

##### **Parametern**

Entscheidungen über das jeweilige Therapiekonzept bei Brustkrebspatientinnen stellen aufgrund der Heterogenität des Kollektivs eine enorme Herausforderung dar. Bereits bekannte und allgemein akzeptierte Prognosefaktoren sind die Tumogröße, der Lymphknotenstatus, der Tumordifferenzierungsgrad und der Östrogen-, Progesteron-, sowie HER-2-Rezeptorstatus (Carter, Allen, and Henson 181-87; Erdem et al. 46-52; Gasparini et al. 454-66). In unserer Arbeit konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Tumorgrad, dem

Proliferationsmarker Ki-67 und der molekularen Klassifizierung einerseits, und der Gefäßfläche VSA andererseits festgestellt werden. Die Mikrogefäßdichte weist hingegen keine statistisch signifikante Beziehung zu allen untersuchten Prognoseparametern auf. Es handelt sich bei der Auswertung um eine univariate Analyse, wobei jede Variable einzeln untersucht wurde. Zusammenhangstrukturen zwischen den Variablen können hierbei nicht erkannt werden. Im Folgenden soll näher auf die einzelnen untersuchten Prognoseparameter eingegangen werden.

#### **6.4.1. Korrelation mit Her-2 Expression**

Auch wenn eine HER-2-Expression in der Literatur häufig als Angiogenese induzierender Faktor beschrieben wird (Kumar et al. 856-61; Kumar and Yarmand-Bagheri 27-32), konnten wir keine statistisch signifikante Korrelation beider Parameter finden. Koukourakis et al. beschrieben in einem Kollektiv von Brustkrebspatientinnen ohne Lymphknotenbefall eine Abhängigkeit von HER-2 und MVD (Koukourakis et al. 29-34). Andere Autoren unterstützen unser Ergebnis einer Unabhängigkeit beider Parameter (Vogl et al. 138-45), während Ludovini et al. in ihrer Arbeit zur Evaluation der prognostischen Bedeutung von MVD eine Korrelation zu HER-2 fanden. Dies war Ludovini et al. zufolge die einzige Korrelation zwischen einem konventionellen Prognosefaktors und der Mikrogefäßanzahl (Ludovini et al. 159-68). In der hier vorliegenden Patientengruppe handelt es sich um ein vorselektiertes Kollektiv, wodurch sich die gegenüber weiteren Arbeiten zum Teil kontroversen Aussagen erklären lassen. Möglicherweise ist die Anzahl der Her-2 neu amplifizierten Fälle in unserer Arbeit zu gering, um statistisch verlässliche Aussagen zu erbringen. Dies liegt primär am hohen „drop out“ einer retrospektiven Studie und spricht dafür, eine erneute prospektive Untersuchung durchzuführen.

Die Expression von Angiogenesemarkern MVD und VSA könnte die Resistenz gegenüber chemotherapeutischer Behandlung bei Brustkrebspatientinnen widerspiegeln, insbesondere gegenüber einer Hochdosistherapie. Tumore mit hoher angiogener Aktivität könnten nicht suffizient auf eine Intensivierung der chemotherapeutischen Behandlung alleine ansprechen. Diallo Danebrock identifizierte in einer vorausgegangenen Arbeit Patientinnen mit hoher Her-2 neu-Expression als eine Gruppe, welche von einer Hochdosis Chemotherapie profitiert (Diallo-Danebrock et al. 488-97). Die fehlende statistisch signifikante Korrelation der untersuchten Gefäßparameter VSA und MVD zur Her-2 neu-Expression in unserer Arbeit könnte die These einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bei hoher Angiogenese in einem Tumor unterstützen.

#### **6.4.2. Korrelation mit dem histologischen Grad**

In der Literaturdatenbank findet man zum aktuellen Zeitpunkt nur wenige verfügbare Studien über die Korrelation der Gefäßfläche- oder dichte mit dem histologischen Tumorgrad bei Brustkrebspatientinnen. Nieto et al. konnten in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2007 keine statistisch signifikante Korrelation mit dem Tumorgrad feststellen. (Nieto et al. 391-97). Dieses Ergebnis wird auch von Ludovini et al. vertreten (Ludovini et al. 159-68).

Ein steigender histologischer Tumorgrad ist charakterisiert durch ein weniger differenziertes Gewebe und geht einigen Studien zufolge mit einer schlechteren Prognose einher (Hayes, Isaacs, and Stearns 375-92). Mit der statistisch signifikanten Beziehung zwischen der Gefäßfläche VSA und dem histologischen Tumorgrad in unserer Arbeit ergibt sich eine Abhängigkeit von einem bereits gut charakterisierten Prognoseparameter beim Mammakarzinom. Eine höhere

Mikrogefäßfläche könnte Ausdruck für eine höhere Enddifferenzierung des Tumors sein und somit ein aggressiveres Tumorverhalten mit gesteigerter angiogener Potenz widerspiegeln.

#### **6.4.3. Korrelation zu Ki-67-Expression**

Mit der statistisch signifikanten Korrelation zwischen VSA und der Ki-67-Expression zeigt sich eine Beziehung zu einem etablierten und gut charakterisierten Proliferationsmarker. Es handelt sich hierbei um einen monoklonalen Antikörper, welcher erstmals 1983 von Lellé et al. als statistisch signifikanter Prognoseparameter beschrieben wurde. Eine höhere Expressionsrate impliziert den Autoren zufolge eine schlechtere Prognose (Lelle 109-24). In einer Studie aus dem Jahr 1990 wird diesem Proliferationsmarker eine unabhängige prognostische Bedeutung für Brustkrebspatientinnen und Patienten mit einem malignen Melanom oder Non-Hodgkin-Lymphom zugeschrieben (Gerdes 199-206). Im Jahr 2002 wurde von den Autoren Spyros et al. die Ki-67 – Expression mit weiteren Proliferationsmarkern korreliert und seine klinische Bedeutung untersucht. Hierbei konnte bei einer Proliferationsrate von 10% für Ki-67 ein niedriges und bei 25% ein hohes Risiko für ein Tumorrezidiv erfasst werden (Spyros et al. 2151-59). Dies impliziert die Aggressivität eines Tumors bei hoher Ki-67-Expression. Dalquen et al. beschrieben eine Abhängigkeit des Proliferationsmarker Ki-67 von dem Tumorgrad. Sie fordern die Einbeziehung dieses Markers in die Indikationsstellung für eine adjuvante Chemotherapie (Dalquen et al. 229-37). In der hier vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine univariate Analyse, wobei jede Variable einzeln analysiert wurde. Zusammenhänge zwischen den Variablen werden hierbei nicht untersucht. Mit der statistisch signifikanten Beziehung zu einem Parameter, welcher eine schlechtere

Prognose reflektiert, ergibt sich in unserer Arbeit eine wachsende Aggressivität eines Tumors mit höherer angiogener Aktivität. Kontroverse Aussagen liefern andere Studien, wie z.B. von Hlatky et al., in der keine Korrelation zwischen der Gefäßdichte und der Expression des Ki67- Antigen beschrieben wird (Hlatky, Hahnfeldt, and Folkman 883-93;Tomlinson et al. 3516-22). Diese zum Teil differierenden Aussagen spiegeln die Komplexität des Prozesses der Angiogenese wider, welcher bis heute noch kontroverse Annahmen liefert und wohl weitere Studien fordert, um bis ins letzte Detail erforscht werden zu können.

#### **6.4.4. Korelation zur molekularen Klassifizierung**

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen über verschiedene molekulare Proteinexpressionsmuster unternommen, um Subgruppen innerhalb des heterogenen Brustkrebspatientinnen Kollektivs bilden zu können (Abd El-Rehim et al. 340-50; Diallo-Danebrock et al. 488-97; Dobbe et al. 23-28; Gluz et al. 861-70; Iwao et al. 199-206; Jacquemier et al. 767-79; Perou et al. 747-52; Sorlie et al. 10869-74). Hierbei wurde durch Selektion des heterogenen Patientenkollektivs eine Verbesserung des Therapieergebnisses und Reduktion der Toxizität verfolgt. Abd El-Rehim et al. identifizierten anhand von Proteinexpressionsmustern 5 Subgruppen. Dies spiegelt die biologische Heterogenität von Brustkrebs wider (Abd El-Rehim et al. 340-50). Diallo-Danebrock untersuchte das Patientenkollektiv der hier vorliegenden Arbeit auf Proteinexpressionsprofile. In dieser Patientengruppe wurden anhand von 24 Proteinmarkern 5 Subklassen beschrieben. Im Gegensatz zur luminal-A- und luminal-B-Gruppe profitierten die HER-2- und basale-Gruppe von einer Hochdosistherapie. Die Patienten mit mehrfach negativen Markern ließen einen Trend zu einem Benefit aus einer intensiveren Therapie erkennen (Diallo-Danebrock

et al. 488-97). Im Jahr 2008 erschien eine Arbeit von Dobbe et al., in welcher 2 Genexpressionsprofile durch Analyse von 21 Genen beschrieben wurden. Die Autoren befassten sich hier jedoch mit Patientinnen ohne Lymphknotenbefall. Ziel ihrer Arbeit war es, eine Prognose hinsichtlich der Rezidivwahrscheinlichkeit aufzustellen (Dobbe et al. 23-28). Gluz et al. berichten über einen prognostischen Vorteil der triple-negativen Brustkrebspatientinnen von einer Hochdosis-Chemotherapie. Diese charakterisieren sich durch ein negatives Expressionsmuster für den Östrogen-, Progesteron-, sowie HER-2 neu. Auch Iwao et al. versuchten anhand von Proteinexpressionen die biologischen Variabilitäten von Brustkrebspatientinnen besser zu beschreiben. Es wurden 2412 Gene mittels RT-PCR Technik anhand von 98 Gewebsproben untersucht. Hierbei konnten 3 Gruppen gebildet werden (Iwao et al. 199-206). Jacquemier et al. beschrieben 26 Proteine bei 1600 untersuchten Präparaten von 552 Brustkrebspatientinnen (Jacquemier et al. 767-79). Daneben erkannten Sorlie et al. die Heterogenität des Brustkrebs und die daraus resultierende unterschiedliche Sensibilität auf Therapeutika. 8102 Gene wurden durch die Autoren im Jahr 2000 erforscht (Sorlie et al. 10869-74). Bereits 1 Jahr später beschrieben Sorlie et al. eine Differenzierung zwischen der basalen Gruppe, der HER-2 positiven und der „normalen“ Subklasse mit divergierenden Prognosen (Sorlie et al. 10869-74).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den molekularen Klassen und der Gefäßfläche VSA gefunden werden, während die Mikrogefäßdichte MVD keine statistische Signifikanz in der Korrelation mit den molekularen Klassen erkennen ließ. Es zeigt sich also, dass die molekulare Subklassifikation welche die Her-2 neu amplifizierten Tumoren und die basale Gruppe (Östrogen und Progesteron negativ) als prognostisch ungünstig definiert hat auch eine enge Beziehung zur Gefäßfläche herstellt. Interessanterweise sind die

Tumoren mit ungünstiger Prognose diejenigen, die am ehesten von der Hochdosis-Chemotherapie profitieren. Daher liegt es nahe, dass diese ohnehin metastasierten Tumoren in unserem Kollektiv sich durch eine starke Vaskularisation auszeichnen und damit eine bessere Suszeptibilität für eine intensive Chemotherapie aufweisen. Dies wird untermauert durch MRI Studien (Bergh et al. 253-81; Venkatasubramanian et al. 486-97; Ah-See et al. 6580-89), welche gezeigt haben, dass stark vaskularisierte Tumoren eine hohe Sensibilität für eine Chemotherapie zeigen und es im Verlauf zu einer Tumorregression kommen kann. Die fehlende Korrelation mit der Mikrogefäßdichte kann hierdurch nicht erklärt werden.

#### **6.4.5. Korrelation zu Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus**

Mit dem Progesteron- und Östrogenrezeptorstatus wurden zwei weitere prognostisch und therapeutisch relevante Parameter mit der untersuchten Gefäßdichte und – fläche in Korrelation gesetzt. In vorausgegangenen Arbeiten wurde eine positive Progesteron- und Östrogenexpression mit einer besseren Prognose assoziiert (Elston and Ellis 403-10). Vamesu et al. fanden einen Zusammenhang zwischen einer Östrogen- und Progesteronrezeptor-Positivität zu einer höheren intratumoralen Gefäßanzahl MVD (Vamesu 25-31). Untersucht wurde hier der ER-/PR-status anhand von 158 Feinnadelaspirationszytologien. In den von Diallo Danebrock aufgestellten Subgruppen repräsentierten die A - und B - luminalen Gruppe die Patientinnen mit Östrogen und Progesteron positivem Status. Diese Patientinnen profitierten nicht von einer Hochdosischemotherapie und zeichneten sich durch eine insgesamt bessere Prognose im Vergleich zu der Basalen - und HER-2- Subgruppe aus. In unserer Studie ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen dem Östrogen- oder Progesteronrezeptor – Status und der Gefäßfläche. Dies reflektiert

die bessere Prognose der ER-/ und PR- positiven Patientinnen ohne Beziehung zu einem höheren angiogenen Potential des Tumors. Untermauert wird unser Ergebnis durch eine Arbeit von Aranda et al. Diese konnten ebenfalls in einem Kollektiv von 130 Brustkrebspatientinnen keine Assoziation zwischen dem Östrogen- und Progesteronrezeptor- Status und der intratumoralen Gefäßanzahl beschreiben (Aranda and Laforga 124-29). Auch Ludovini et al. kamen in ihrer Arbeit mit einer fehlenden statistischen Korrelation zwischen dem Östrogen- oder Progesteronrezeptorstatus und MVD zu demselben Ergebnis (Ludovini et al. 159-68).

In der Auswertung der Ergebnisse muss auch der hohe drop-out der vorliegenden retrospektiven Studie mit berücksichtigt werden, weshalb möglicherweise die Progesteron-und Östrogenamplifizierung des untersuchten Patientenkollektivs zu gering ist. Neuste Evaluationen vorhandener Literaturdaten fanden in bis zu 20% falsch positive oder falsch negative Ergebnisse über das Östrogen- und Progesteron-Expressionsmuster bei Brustkrebs. Als ursächlich hierfür wurden Variationen bei prä-analytischen Variablen, unterschiedliche cut-off Levels und eine Streubreite in der Interpretation der immunhistochemischen Präparate genannt. Die amerikanische Gesellschaft für Onkologie fordert deshalb ein standardisiertes Vorgehen bei immunhistochemischen Färbungen (Pathologists' Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer 185-87).

#### **6.4.6. Korrelation zum Lymphknotenstatus**

Unter allen bisher untersuchten Prognosefaktoren gilt der Lymphknotenstatus als der bedeutendste Parameter. Resultierend aus den Ergebnissen einer Datenbank aus den Vereinigten Staaten wird die 5-Jahres Überlebensrate für Lymphknoten-negative

Patientinnen mit 92% angegeben. Im Falle von 1-3 positiven Lymphknoten fällt die 5-jahres Überlebensrate auf 81% und bei mehr als 4 befallenen Lymphknoten auf 57% (Li et al. 75-78). Der Lymphknotenstatus, als ein unabhängiger Prognoseparameter korrelierte in unserer Arbeit nicht mit der Gefäßanzahl oder -fläche. In der Arbeit von Diallo-Danebrock wurde als Einschlusskriterium in das Patientenkollektiv ein Befall von mindestens 9 Lymphknoten vorausgesetzt. Hieraus ergibt sich bereits eine Vorselektion, da es sich bei den untersuchten Personen ausschließlich um Hochrisiko Patientinnen handelte. Patientinnen mit niedrigem oder keinem Lymphknotenbefall wurden nicht berücksichtigt. In einer Studie von Jing et al. aus dem Jahr 2002 (Li et al. 75-78) konnten die Autoren in einem Kollektiv von Lymphknoten-negativen Patientinnen die Gefäßdichte als prognostisch relevanten Parameter herausarbeiten. In unserer Arbeit scheint die Gefäßfläche eine, von dem Lymphknotenstatus unabhängige Größe zu sein. Dieses Ergebnis wird von einer Arbeit aus dem Jahr 2003 unterstützt. Hier fanden Ludovini et al. ebenfalls keine signifikante Assoziation zwischen MVD und dem Lymphknotenstatus (Ludovini et al. 159-68).

#### **6.4.7. Korrelation zur Tumorgröße**

In einer Arbeit von Carter et al. wird die Tumorgröße neben dem Lymphknotenstatus als einer der wichtigsten Prognosefaktoren beschrieben (Carter, Allen, and Henson 181-87). Im Vergleich der Gefäßdichte und – fläche mit der Tumorgröße konnte keine statistisch signifikante Korrelation erfasst werden. Auch Ludovini et al. berichten von keiner statistisch relevanten Korrelation zwischen MVD und der Tumorgröße (Ludovini et al. 159-68). Die fehlende Korrelation in dem von uns untersuchten Kollektiv aus Hochrisikopatientinnen könnte an dem fortgeschrittenem

Tumorstadium liegen, in welchem die Hypoxietoleranz der Tumorzellen im Vergleich zu frühen Erkrankungsstadien ansteigt. Im normalen Gewebe findet man im Gegensatz zu Tumorgewebe deutlich höhere Gefäßdichten (Eberhard et al. 1388-93). Die Mikrogefäßdichte MVD korreliert mit keinem der oben beschriebenen prognostischen Parametern.

## ***6.5. Überlebensanalysen von zwei prognostischen Gruppen in Abhängigkeit von MVD und VSA***

Vorausgegangene Studien erbrachten bisher kontroverse Ergebnisse hinsichtlich einer prognostischen und/oder prädiktiven Bedeutung von MVD als Parameter. Bisher durchgeführte Arbeiten fokussierten sich meist auf das frühe Erkrankungsstadium des Brustkrebs, definiert durch fehlende oder limitierte Lymphknotenmetastasen. So berichteten Vertreter wie Toi et al. (Toi et al. 2513-19), Obermair et al.(Obermair et al. 455-58) oder Weidner et al. (Weidner et al. 1875-87) für Patientinnen in einem frühen Brustkrebsstadium von einer prognostischen Bedeutung der Gefäßanzahl MVD. Einer Studie von Lodovini et al. zufolge ergab sich keine Assoziation zwischen MVD, welcher hier mittels CD 34 Antikörper ermittelt wurde, und dem rezidivfreien Überleben, oder Gesamtüberleben (Ludovini et al. 159-68). In einer umfassenden Metaanalyse aus dem Jahr 2004 gaben B. Uzzan, P. et al. (Uzzan et al. 2941-55) einen Überblick über die Ergebnisse von 87 veröffentlichten Studien zur intratumoralen Gefäßdichte (MVD). Dieser Parameter wurde auf seine Assoziation zum rezidivfreien Überleben und dem Gesamtüberlebens untersucht. Insgesamt konnten 8936 Patienten nach Ausschluss einiger Arbeiten mit einbezogen werden. Die Ergebnisse erbrachten eine statistisch signifikante prognostische Bedeutung für den Parameter MVD, wobei sich die

Signifikanz deutlicher bei Verwendung eines AK gegen CD31 oder CD34 im Vergleich zur immunhistochemischen Färbung mittels FVIII-AK abzeichnete. Insbesondere für Patientinnen ohne Lymphknotenbefall erwies sich MVD als statistisch signifikanter Prognoseparameter.

Andere Studien berichten von kontroversen Ergebnissen. So konnten Hall et al. keine signifikante pognostische Bedeutung für MVD in ihrer Studie erkennen (Hall et al. 223-29). Diese Aussage unterstützen Axellson et al. (Axelsson et al. 997-1008), Van Hoef et al. (Van Hoef et al. 1141-45) und Guidi et al. (Guidi et al. 732-42) in ihren Arbeiten. Erst genannte Autoren beobachteten die Prognose von 220 Patientinnen über einen Zeitraum von 11,5 Jahre. Diese fanden eine große Variabilität der untersuchten Gefäßanzahl MVD je nach ausgewerteter Tumorregion und erkannten keine signifikante prognostische Bedeutung von MVD für das rezidivfreie Intervall oder das Gesamtüberleben. Van Hoef et al. (Van Hoef et al. 1141-45) bezogen sich bei ihren Untersuchngens auf Lymphknoten-negative Patientinnen. Guidi et al. fanden in der quantitativen Analyse von Tumorgewebe mittels Faktor VIII keine signifikante prognostische Bedeutung von MVD (Guidi et al. 732-42). Aufgrund der Diskrepanzen in den Ergebnissen wurde bislang die Mikrogefäßdichte nicht als Standardparameter in die Prognoseabschätzung mit einbezogen (Hayes, Isaacs, and Stearns 375-92)

Im Vergleich der Gruppe A mit niedriger Gefäßanzahl und -fläche zur Gruppe B ergab sich in unserer Arbeit kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Prognose. Beide Gruppen hatten ein ähnlich langes rezidivfreies Intervall, sowie Gesamtüberleben ohne statistisch signifikante Korrelation zu MVD und VSA, erfasst durch CD 31. Dagegen konnte für dasselbe Patientenkollektiv unter Verwendung von CD 105 in einer parallelen Arbeit, welche nicht Gegenstand dieser Dissertation ist, eine statistisch signifikante prognostische Bedeutung sowohl für den Parameter VSA,

als auch MVD aufgezeigt werden. Sowohl das rezidivfreie Intervall, als auch das Gesamtüberleben unterschieden sich signifikant zwischen der Gruppe A und B. Für Faktor VIII als herangezogenen immunhistochemischen Marker ergab die statistische Auswertung eine Signifikanz für die Gefäßanzahl MVD hinsichtlich des rezidivfreien Intervalls (Gluz et al. 861-70). Die fehlende statistisch signifikante Korrelation der Angiogenesemarker zur Prognose der Patientinnen in unserer Arbeit lässt sich möglicherweise auf die geringere Spezifität des hier verwendeten panendothelialen Markers CD 31 zurückführen (Dallas et al. 1931-37). Untermauert werden unsere Ergebnisse durch eine vergleichende Studie von Dales et al. aus dem Jahr 2004, in welcher die Autoren in einem Kollektiv von 905 Brustkrebspatientinnen die prognostische Bedeutung von CD 105 im Vergleich zu CD 31 untersuchten. Hierbei wurde in multivariaten Analysen CD 105, nicht jedoch CD 31 als unabhängiger prognostischer Indikator identifiziert (Dales et al. 1197-204).

## ***6.6. Überlebensanalysen in Abhängigkeit von der chemothterapeutischen Behandlung***

Trotz Anwendung von effektiven Therapeutika bleibt die Prognose für Hochrisiko Patientinnen zum heutigen Zeitpunkt schlecht (Moebus et al. 2874-80). Nieto et al. beschreiben in ihrer Arbeit das Rezidivrisiko für Brustkrebspatientinnen mit einem Befall von mindestens 9 Lymphknoten als mindestens 50% (Nieto et al. 391-97).

Die Intensivierung einer chemotherapeutischen Behandlung bei Brustkrebspatientinnen bleibt bislang insbesondere durch die damit verbundenen höheren Toxizität und die entstehenden Kosten ein sehr kontrovers diskutiertes Thema. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist noch kein verlässlicher Parameter bekannt, welcher einen prognostischen Vorteil hierdurch aufzeigt. In der

Literaturdatenbank findet man bis dato nur wenige Arbeiten über den prognostischen Vorteil einer Hochdosis Chemotherapie im Vergleich zu einer konventionellen Chemotherapie. Die WSG AM-01 berichtete als erste Arbeitsgruppe von einer signifikanten Verbesserung des Gesamtüberlebens für Patientinnen mit mindestens 9 befallenen Lymphknoten durch eine Hochdosis Chemotherapie im Vergleich zu einem konventionellen Behandlungsregime (Nitz et al. 1935-44). Diallo-Danebrock et al. untersuchten im Vorfeld das Patientenkollektiv unserer Arbeit. Mittels Proteinexpressionsprofilen wurde die prognostische Bedeutung einer Hochdosis Chemotherapie im Vergleich zu einer konventionellen Chemotherapie evaluiert. Anhand von 24 Proteinen konnten 5 Subklassen differenziert werden. Die Patientinnen mit HER-2 Expression, sowie die basale Subgruppe profitierten von einer Hochdosistherapie im Vergleich zu den weiteren definierten Subklassen (Diallo-Danebrock et al. 488-97). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Resultaten von Rodenhuis et al. Hier stellten die Autoren eine Resistenz auf Chemotherapeutika für Patientinnen mit HER-2-Expression fest (Rodenhuis et al. 588-96). Frühere Studien liefern insgesamt sehr kontroverse Ergebnisse. So berichten einige Autoren wie Peters et al. (Peters et al. 2191-200) oder Tallmann et al. (Tallman et al. 17-26) von keinem Unterschied in der Prognose durch eine Intensivierung der Chemotherapie. Roche oder Tokuda et al. dagegen stellten in ihren Arbeiten einen prognostischen Vorteil durch eine aggressivere Therapie fest (Roche et al. 42-47). Insgesamt ist ein direkter Vergleich der einzelnen Studien aufgrund multipler Variablen sicher nur eingeschränkt möglich. Es werden unterschiedliche Kombinationen aus Chemotherapeutika verwendet und die Patientenkollektive weisen häufig eine erhebliche Heterogenität auf.

In unserer Arbeit wurden das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Intervall in einer multivariaten Analyse untersucht. Unter Verwendung von CD 31 konnte in unserer

Analyse keine signifikante prognostische Bedeutung des untersuchten Parameter VSA für eine Intensivierung der Chemotherapie erfasst werden. Die Gruppe B mit hoher Gefäßdichte und Gefäßanzahl zeigte einen Gesamtüberlebensvorteil in Abhängigkeit von MVD durch Anwendung einer Hochdosistherapie. Eine morphometrische Analyse mittels CD 105 in einer parallelen Dissertation dagegen zeigte einen signifikanten Benefit einer Hochdosistherapie für Patientinnen der Gruppe A mit geringer Gefäßfläche (Gluz et al. 861-70). Das mittlere Überleben der Brustkrebspatientinnen konnte hier durch eine intensivere Chemotherapie von 57 auf 99 Monate erhöht werden. In der Patientengruppe mit hoher Gefäßfläche konnte das Gesamt-, sowie rezidivfreie Überleben durch eine Hochdosistherapie im Vergleich zu der konventionellen Chemotherapie hingegen nicht verlängert werden. Folglich könnte eine hohe angiogene Aktivität eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika implizieren. Unter Verwendung des immunhistochemischen Markers CD 31 konnte diese These nicht bestätigt werden. Auch Dales et al. unterstützten mit ihrer Arbeit die Annahme einer Chemotherapieresistenz von Tumoren mit hoher angiogener Aktivität (Nieto et al. 391-97). Dagegen ließen ein höheres Tumorgrading, eine Expression von Ki-67 und die molekularen Klassen als Indikatoren für ein aggressiveres Tumorverhalten einen Benefit durch eine Therapieintensivierung erkennen (Gluz et al. 861-70). Die divergierenden Ergebnisse in Abhängigkeit des verwendeten Tumormarkers können aus der geringeren Spezifität von CD 31 resultieren (Dallas et al. 1931-37). Die prädiktive Bedeutung von CD 105 hinsichtlich der Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber Chemotherapeutika korreliert mit Daten von Beresford et al. Hierbei identifizierten die Autoren das YB-1 Protein als Marker für das Ansprechen von Hochrisiko Brustkrebspatientinnen auf eine neoadjuvante Chemotherapie, wobei eine starke Expression eine Resistenz aufzeigte. Danebem korrelierte YB-1 mit einem aggressiveren Tumorverhalten (Gluz et al. 6144-51). In dieser Analyse

profitierten Brustkrebspatientinnen mit niedrigerem CD105 positivem Expressionsmuster besser von einer intensivierten Chemotherapie im Vergleich zu Patientinnen mit hohem angiogenen Expressionsprofil. Ähnlich unserer Studie konnte in der morphometrischen Analyse mittels CD 31 Antikörper von Beresford et al. keine statistische Signifikanz erreicht werden (Gluz et al. 6144-51).

Neben einer stark gesteigerten Gefäßneubildung wird auch die Hypoxie in einem Tumorgewebe als Chemotherapie- Resistenz induzierender Faktor von einigen Autoren postuliert. Hypoxie wurde in einigen Untersuchungen als Mediator für eine gesteigerte Endoglin- Expression erkannt (Warrington et al. 1851-64;Zhu et al. 2483-88). Endoglin induziert in der Folge anti-apoptotische Signale in hypoxischen Zellen. In der hier vorliegenden Dissertation, als auch einer Vielzahl weiterer Studien konnte die Angiogenese als Indikator für ein aggressiveres Tumorverhalten identifiziert werden und könnte eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika implizieren (Lopes et al. 594-99). Somit könnte als therapeutischer Ansatzpunkt durch eine anti-angiogene Behandlung ein verbessertes Ansprechen auf Chemotherapeutika erreicht werden. Unterstützt wird diese These von Autoren wie Escoria et al. oder Drevs et al. (Escoria et al. 9277-86;Drevs et al. 4015-22). In unserem Patientenkollektiv konnte diese Behauptung nur unter Verwendung von CD 105 als immunhistochmischer Marker, nicht jedoch für CD 31 unterstützt werden. Die Untersuchung mittels CD 105 war Gegenstand einer weiteren Dissertation (Gluz et al. 861-70). Rodenhuis et al. konnten in ihrer Studie bereits eine reduzierte Sensibilität auf Chemotherapeutika für Patienten mit HER-2 Expression feststellen (Rodenhuis et al. 588-96). Der Einfluss der Angiogenese auf die Chemosensibilität wurde in dieser Arbeit erstmals evaluiert. Künftig sind sicher noch weitere Untersuchungen notwendig, um Aufschluss über die Chemotherapiesensitivität und die Optimierung der adjuvanten Behandlung zu gewinnen.

## 6.7. Ausblick

Auch in Zukunft wird die Angiogenese sicherlich noch Gegenstand intensiver Forschung bleiben, nicht zuletzt aufgrund der neuen therapeutischen Ansatzpunkte durch die anti- angiogene Behandlungsoption. Das Konzept der anti – angiogenen Therapie scheint aus mehreren Gründen überzeugend zu sein:

- 1) Da die Angiogenese in gesunden adulten Organen nicht vorkommt, sind durch eine anti-angiogene Therapie nur minimale Nebenwirkungen zu erwarten.
- 2) Da die Angiogenese eine physiologische Reaktion des Organismus ist, sollte es nicht zu einer Resistenzentwicklung durch pharmakologische Inhibitoren kommen.
- 3) Jede Tumorkapillare ist in der Lage mehrere hundert Tumorzellen zu versorgen; konsequenterweise müsste die Unterbindung der Angiogenese einen exponentiellen Effekt auf die Tumorentwicklung haben.
- 4) Der Kontakt der Endothelzellen mit der Zirkulation ermöglicht eine unmittelbare Interaktion mit pharmakologischen Inhibitoren (Eberhard et al. 1388-93).

Es sind bisher verschiedene Ansätze entwickelt worden, um das Ziel einer Anti - Angiogenese zu erreichen. Ein Meilenstein in der Etablierung einer anti – angiogenen Therapie stellt die Zulassung des Medikaments Avastin® (Bevacizumab) für die Therapie des metastasierten Kolonkarzinoms am 26. Februar 2004 dar. So etablierte sich dieses anti-angiogene Medikament in den USA bereits als Bestandteil der Standard „first-line Therapie“ für die Behandlung von Darmkrebspatienten (Hurwitz et al. 3502-08).

Gegenwärtig werden anti-angiogene Therapieansätze auch bei Brustkrebspatientinnen in einem fortgeschrittenen Tumorstadium beforscht und kommen in der neo-adjuvanten Therapie zur Anwendung. In der Literatur wird hierdurch von einem verlängerten rezidivfreien Intervall berichtet, während hingegen

das Gesamtüberleben nur gering verbessert werden kann (Liedtke et al. 1275-81).

Diese Ergebnisse illustrieren die verbesserten therapeutischen Optionen bei Hochrisiko Brustkrebspatientinnen durch eine Kombination der Chemotherapie mit einer anti-angiogenen Therapie.

Ein limitierender Faktor der hier vorliegenden Studie liegt in dem Studiendesign. Es handelt sich hierbei um eine randomisierte, retrospektive Studie archivierten Tumormaterials. Aufgrund mehrfach mangelnder Färbequalität mussten 107 Fälle von der Auswertung ausgeschlossen werden. Dieses drop-out lässt sich insbesondere durch die unterschiedlichen Färbeprotokolle der hier 50 beteiligten pathologischen Institute erklären.

Die hier aufgestellten Hypothesen einer erhöhten Chemoresistenz von Tumoren mit gesteigerter angiogener Aktivität bedürfen sicher noch weiterer Bestätigungen in künftigen Studien.

## **7. Anhang**

### **7.1. Tabellen**

**Tabelle 1** Korrelierende Analyse des Gefäßmarkers mit konventionellen Parametern

		CD 31	
		<b>MVC</b>	<b>VSA</b>
<b>Alter</b>	CC	0.133	0.093
	p	0.134	0.297
	N	128	128
<b>Größe</b>	CC	-0.095	-0.084
	p	0.288	0.345
	N	128	128
<b>LN (+)</b>	CC	-0.092	-0.103
	p	0.302	0.247
	N	128	128
<b>Grad</b>	CC	0.070	0.168
	p	0.432	<b>0.059</b>
	N	127	127
<b>ER (IHC)</b>	CC	-0.090	-0.110
	p	0.323	0.227
	N	122	122
<b>PR (IHC)</b>	CC	-0.024	-0.113
	p	0.794	0.210
	N	124	124
<b>HER2 IHC</b>	CC	-0.003	0.095
	p	0.969	0.285
	N	128	128
<b>Ki-67 IHC</b>	CC	0.128	0.247
	p	0.156	<b>0.006</b>
	N	124	124
<b>Mol. class.</b>	CC	0.131	0.208
	p	0.141	<b>0.018</b>
	N	128	128

MVC = Mikrogefäßdichte, VSA = Gefäßfläche, Mol. class. = molekulare Klassen, CC = Korrelationskoeffizient, p = zweiseitige Signifikanz (Spearman's rho Test)

**Tabelle 2** Korrelierende respektive Analyse von MVC und VSA gegenüber verschiedenen Gefäßmarkern

		CD 31	CD 105	Faktor VIII	CD 31	CD 105	Faktor VIII
		MVC / MVC			VSA / VSA		
CD 31	CC		0.355	0.202		0.457	0.200
	p		<0.001	0.045		<0.001	0.048
	N		108	99		106	99
CD 105	CC	0.355		0.138	0.457		0.148
	p	<0.001		0.162	<0.001		0.134
	N	108		104	106		103
Faktor VIII	CC	0.202	0.138		0.200	0.148	
	p	0.045	0.162		0.048	0.134	
	N	99	104		99	103	

MVC = Mikrogefäßdichte, VSA = Gefäßfläche, Mol. class. = molekulare Klassen, CC = Korrelationskoeffizient, p = zweiseitige Signifikanz (Spearman's rho Test)

**Tabelle 3**

			Ereignisfreies Überleben			Gesamtüberleben		
			MVC	Gruppe A	Gruppe B	p	Gruppe A	Gruppe B
				Zeit	60 ± 11.0	58 ± 17.6	0.667	87 ± 9.2
CD 31	MVC	N	Zeit	62	65		62	65
		Ereign.		38	36		26	28
				72 ± 13.3	58 ± 15.3	0.425	98	
	VSA	N	Zeit	61	66		61	66
		Ereign.		34	40		26	28
				60 ± 11.0	58 ± 17.6	0.667	87 ± 9.2	113 ± 25.9

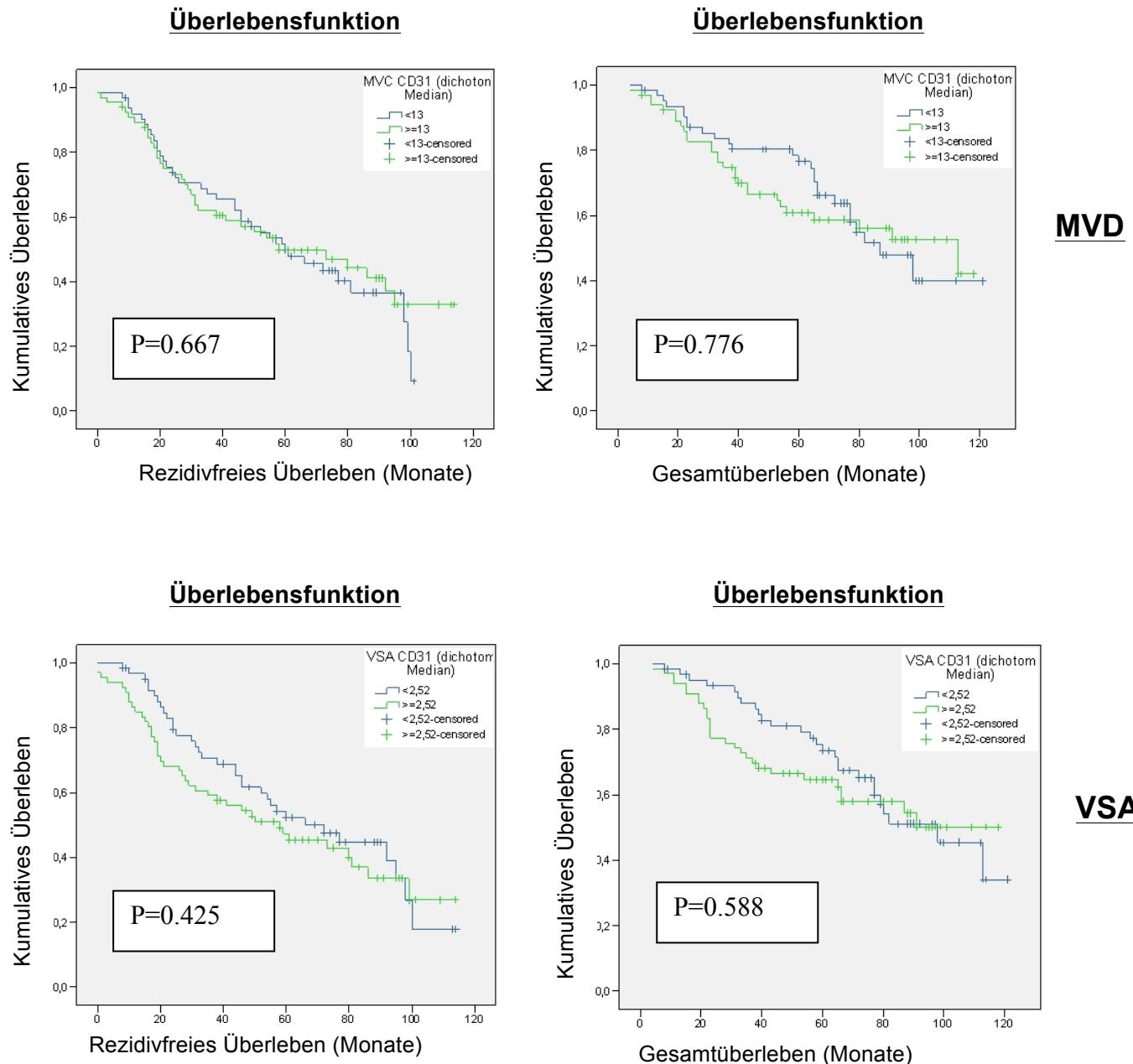
Gruppe A: Patientinnen mit niedriger Mikrogefäßzahl; Gruppe B mit hoher Gefäßzahl  
Zeit: mittlere Überlebenszeit in Monaten ausgedrückt

**Tabelle 4** Überlebensanalysen zwischen Hochdosis und Niedrigdosis Chemotherapiebehandlung.

				Ereignisfreies Überleben			Gesamtüberleben		
				HDCT	DDCT	p	HDCT	DDCT	p
CD 31	MVC	Gruppe A	Zeit	98 ± 19.2	46 ± 5.0	0.135	98 ± 27.4	77 ± 4.8	0.286
			N	31	31		31	31	
			Ereignis	16	22		11	15	
	VSA	Gruppe B	Zeit	86 ± 20.9	38 ± 12.8	0.127	113 ± 18.9	54 ± 9.6	<b>0.026</b>
			N	39	26		39	26	
			Ereignis	20	16		13	15	
	VSA	Gruppe A	Zeit	92 ± 11.1	46 ± 6.4	0.113	113 ± 13.8	77 ± 5.0	0.095
			N	33	28		33	28	
			Ereignis	16	18		11	15	
		Gruppe B	Zeit	73 ± 19.4	38 ± 13.1	0.103		66 ± 22.3	0.097
			N	37	29		37	29	
			Ereignis	20	20		13	15	

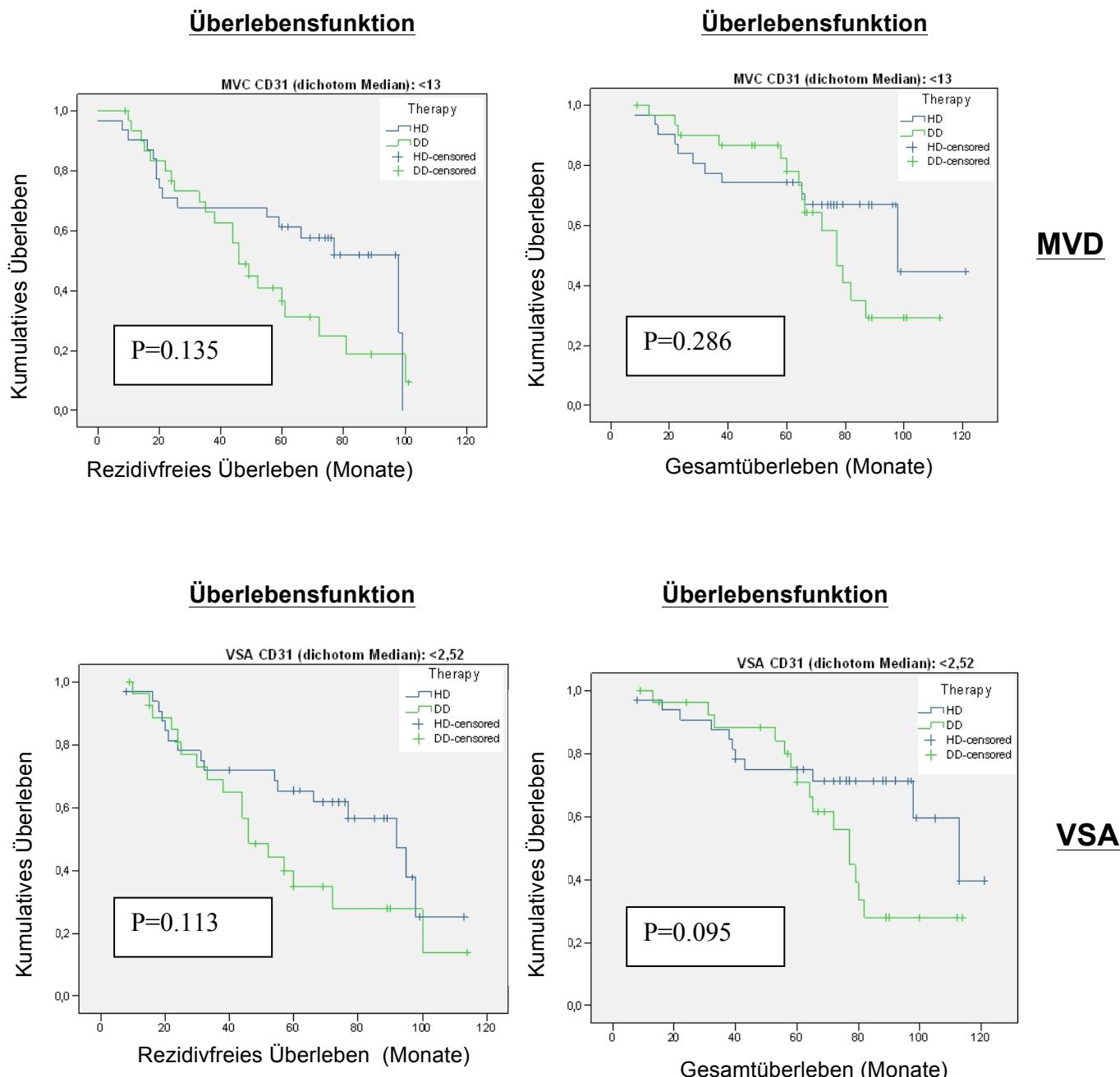
## 7.2. Abbildungen

**Abbildung 1**



**Legende:**

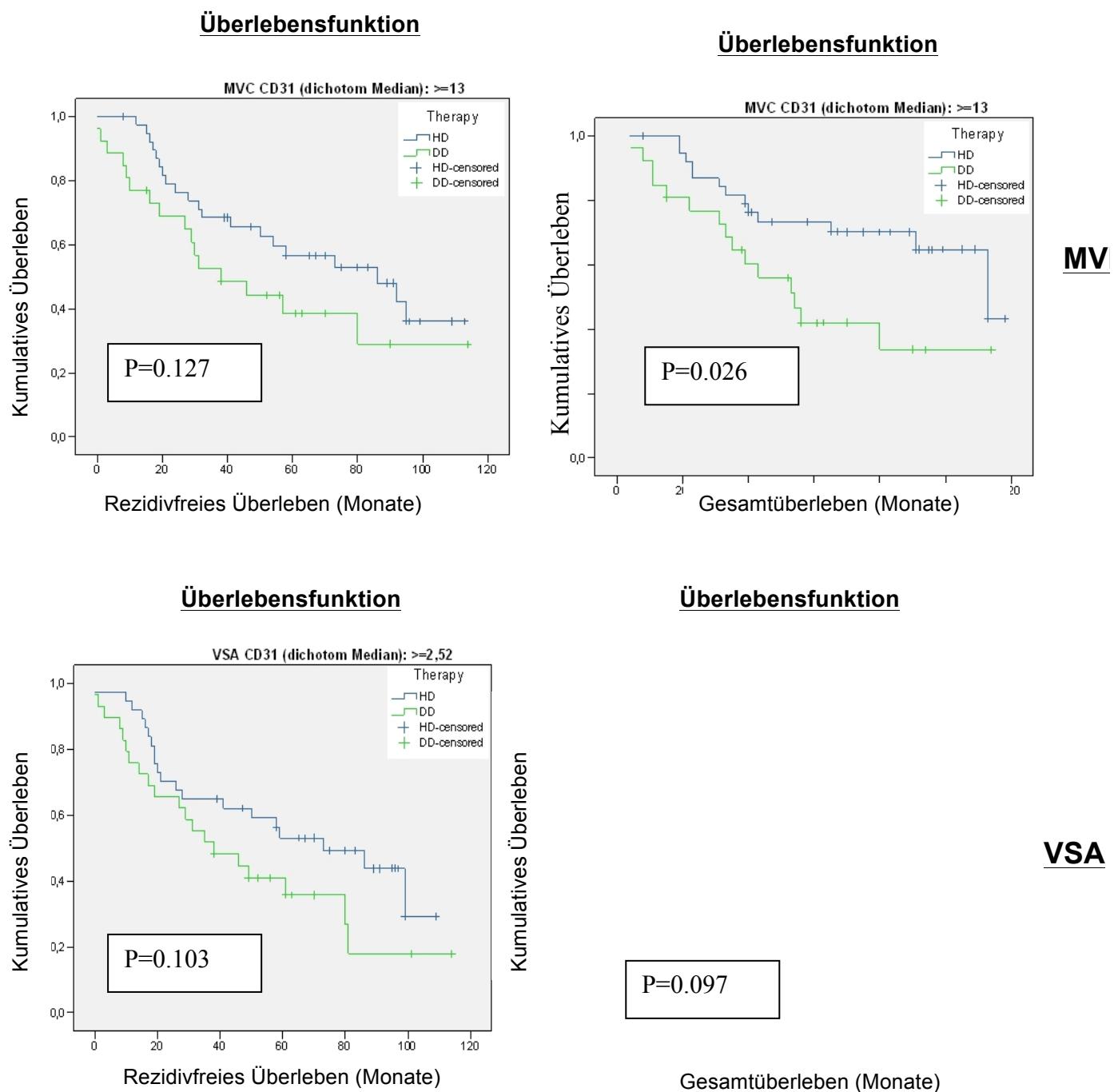
Die Überlebensanalyse ergab unabhängig von der durchgeföhrten Therapie weder für das rezidivfreie Überleben, noch für das Gesamtüberleben einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der beiden untersuchten Parameter VSA und MVC ( $p=0.425$  und  $p=0.588$ , bzw.  $p=0.776$  bzw.  $p=0.588$ ) für die beiden Subgruppen A und B.

**Abbildung 2****Legende:**

Bei der Analyse von Patienten mit geringer Gefäßdichte/Gefäßfläche (Gruppe A) ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied für den Parameter MVC [ $p=0.135$  bzw.  $p=0.286$ ] wie auch für den Parameter VSA [ $p=0.113$  bzw.  $p=0.095$ ] bezüglich

des rezidivfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens im Vergleich der unterschiedlichen Therapieregime (DDCT vs. HDCT).

**Abbildung 3**



**Legende:**

Bei der Auswertung von Patientinnen mit hoher Gefäßdichte (Gruppe B) ergab sich für den Parameter MVC ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens im Vergleich der unterschiedlichen Therapieregimes HDCT vs. DDCT mit  $p=0.026$ . Hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens (EFS) lieferte MVC keinen statistisch verwertbaren Unterschied ( $p=0.127$ ).

Für den Parameter VSA konnte in der Gruppe B weder für das EFS ( $p=0.103$ ), noch das OS ( $p=0.097$ ) als Endpunkte ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der einzelnen Therapieoptionen HDCT vs. DDCT festgestellt werden.

## **8. Literaturverzeichnis**

### **Reference List**

1. Pathologists' Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. Breast Care (Basel) 5.3 (2010): 185-87.
2. Abd El-Rehim, D. M. et al. "High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses." Int.J.Cancer 116.3 (2005): 340-50.
3. Ah-See, M. L. et al. "Early changes in functional dynamic magnetic resonance imaging predict for pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer." Clin.Cancer Res. 14.20 (2008): 6580-89.
4. Aranda, F. I. and J. B. Laforga. "Microvessel quantitation in breast ductal invasive carcinoma. Correlation with proliferative activity, hormonal receptors and lymph node metastases." Pathol.Res.Pract. 192.2 (1996): 124-29.
5. Axelsson, K. et al. "Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma." J.Natl.Cancer Inst. 87.13 (1995): 997-1008.
6. Bergh, J. et al. "A systematic overview of chemotherapy effects in breast cancer." Acta Oncol. 40.2-3 (2001): 253-81.
7. Bodey, B. et al. "Over-expression of endoglin (CD105): a marker of breast carcinoma-induced neo-vascularization." Anticancer Res. 18.5A (1998): 3621-28.
8. Brem, S. S., P. M. Gullino, and D. Medina. "Angiogenesis: a marker for neoplastic transformation of mammary papillary hyperplasia." Science 195.4281 (1977): 880-82.

9. Carmeliet, P. "Angiogenesis in life, disease and medicine." Nature 438.7070 (2005): 932-36.
10. Carter, C. L., C. Allen, and D. E. Henson. "Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases." Cancer 63.1 (1989): 181-87.
11. Dales, J. P. et al. "Prognostic significance of angiogenesis evaluated by CD105 expression compared to CD31 in 905 breast carcinomas: correlation with long-term patient outcome." Int.J.Oncol. 24.5 (2004): 1197-204.
12. Dallas, N. A. et al. "Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy." Clin.Cancer Res. 14.7 (2008): 1931-37.
13. Dalquen, P. et al. "MIB-1 (Ki-67) immunostaining of breast cancer cells in cytologic smears." Acta Cytol. 41.2 (1997): 229-37.
14. de Caestecker, M. P., E. Piek, and A. B. Roberts. "Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer." J.Natl.Cancer Inst. 92.17 (2000): 1388-402.
15. de Jong, J. S., P. J. van Diest, and J. P. Baak. "Hot spot microvessel density and the mitotic activity index are strong additional prognostic indicators in invasive breast cancer." Histopathology 36.4 (2000): 306-12.
16. Dhakal, H. P. et al. "Breast carcinoma vascularity: a comparison of manual microvessel count and Chalkley count." Histol.Histopathol. 24.8 (2009): 1049-59.
17. Diallo-Danebrock, R. et al. "Protein expression profiling in high-risk breast cancer patients treated with high-dose or conventional dose-dense chemotherapy." Clin.Cancer Res. 13.2 Pt 1 (2007): 488-97.
18. Dobbe, E. et al. "Gene-expression assays: new tools to individualize treatment of early-stage breast cancer." Am.J.Health Syst.Pharm. 65.1 (2008): 23-28.
19. Drehs, J. et al. "PTK787/ZK 222584, a specific vascular endothelial growth factor-receptor tyrosine kinase inhibitor, affects the anatomy of the tumor

- vascular bed and the functional vascular properties as detected by dynamic enhanced magnetic resonance imaging." Cancer Res. 62.14 (2002): 4015-22.
20. Eberhard, A. et al. "Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies." Cancer Res. 60.5 (2000): 1388-93.
21. Eberhard, A. et al. "Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies." Cancer Res. 60.5 (2000): 1388-93.
22. Ellis, L. M. and I. J. Fidler. "Angiogenesis and breast cancer metastasis." Lancet 346.8972 (1995): 388-90.
23. Elston, C. W. and I. O. Ellis. "Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up." Histopathology 19.5 (1991): 403-10.
24. Erdem, O. et al. "The prognostic value of p53 and c-erbB-2 expression, proliferative activity and angiogenesis in node-negative breast carcinoma." Tumori 91.1 (2005): 46-52.
25. Escoria, F. E. et al. "Selective killing of tumor neovasculature paradoxically improves chemotherapy delivery to tumors." Cancer Res. 70.22 (2010): 9277-86.
26. Ferrara, N., H. P. Gerber, and J. LeCouter. "The biology of VEGF and its receptors." Nat.Med. 9.6 (2003): 669-76.
27. Fisher, B. et al. "Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update." Cancer 52.9 (1983): 1551-57.
28. Folkman, J. "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." N Engl J Med. 285.21 (1971): 1182-86.
29. Folkman, J. "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." Nat.Med. 1.1 (1995): 27-31.

30. Folkman, J., P. Cole, and S. Zimmerman. "Tumor behavior in isolated perfused organs: in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment." Ann.Surg. 164.3 (1966): 491-502.
31. Fonsatti, E. et al. "Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies." J.Cell Physiol 188.1 (2001): 1-7.
32. Fox, S. B., D. G. Generali, and A. L. Harris. "Breast tumour angiogenesis." Breast Cancer Res. 9.6 (2007): 216.
33. Fox, S. B. et al. "Tumor angiogenesis in node-negative breast carcinomas--relationship with epidermal growth factor receptor, estrogen receptor, and survival." Breast Cancer Res.Treat. 29.1 (1994): 109-16.
34. Fox, S. B. et al. "Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis." J.Pathol. 177.3 (1995): 275-83.
35. Fujita, K. et al. "Endoglin (CD105) as a urinary and serum marker of prostate cancer." Int.J.Cancer 124.3 (2009): 664-69.
36. Gasparini, G. "Biological and clinical role of angiogenesis in breast cancer." Breast Cancer Res.Treat. 36.2 (1995): 103-07.
37. Gasparini, G. "Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer." Crit Rev.Oncol.Hematol. 37.2 (2001): 97-114.
38. Gasparini, G. and A. L. Harris. "Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool." J.Clin.Oncol. 13.3 (1995): 765-82.
39. Gasparini, G. et al. "Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma." J.Clin.Oncol. 12.3 (1994): 454-66.

- 
40. Gerdes, J. "Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies." Semin.Cancer Biol. 1.3 (1990): 199-206.
41. Gianni, A. M. et al. "Efficacy, toxicity, and applicability of high-dose sequential chemotherapy as adjuvant treatment in operable breast cancer with 10 or more involved axillary nodes: five-year results." J.Clin.Oncol. 15.6 (1997): 2312-21.
42. Gianni, L. et al. "Adjuvant and neoadjuvant treatment of breast cancer." Semin.Oncol. 28.1 (2001): 13-29.
43. Gimbrone, M. A., Jr. et al. "Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization." J.Exp.Med. 136.2 (1972): 261-76.
44. Gluz, O. et al. "Y-box-binding protein YB-1 identifies high-risk patients with primary breast cancer benefiting from rapidly cycled tandem high-dose adjuvant chemotherapy." J.Clin.Oncol. 27.36 (2009): 6144-51.
45. Gluz, O. et al. "Triple-negative high-risk breast cancer derives particular benefit from dose intensification of adjuvant chemotherapy: results of WSG AM-01 trial." Ann.Oncol. 19.5 (2008): 861-70.
46. Gluz, O. et al. "Tumor angiogenesis as prognostic and predictive marker for chemotherapy dose-intensification efficacy in high-risk breast cancer patients within the WSG AM-01 trial." Breast Cancer Res.Treat. (2011).
47. Grimshaw, M. J. "Endothelins and hypoxia-inducible factor in cancer." Endocr.Relat Cancer 14.2 (2007): 233-44.
48. Guidi, A. J. et al. "Association of angiogenesis and disease outcome in node-positive breast cancer patients treated with adjuvant cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil: a Cancer and Leukemia Group B correlative science study from protocols 8541/8869." J.Clin.Oncol. 20.3 (2002): 732-42.
49. Hall, N. R. et al. "Is the relationship between angiogenesis and metastasis in breast cancer real?" Surg.Oncol. 1.3 (1992): 223-29.

50. Hannemann, J. et al. "Molecular subtypes of breast cancer and amplification of topoisomerase II alpha: predictive role in dose intensive adjuvant chemotherapy." Br.J.Cancer 95.10 (2006): 1334-41.
51. Hansen, S. et al. "Microvessel density compared with the Chalkley count in a prognostic study of angiogenesis in breast cancer patients." Histopathology 44.5 (2004): 428-36.
52. Hayes, D. F., C. Isaacs, and V. Stearns. "Prognostic factors in breast cancer: current and new predictors of metastasis." J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia. 6.4 (2001): 375-92.
53. Heimann, R. et al. "Angiogenesis as a predictor of long-term survival for patients with node-negative breast cancer." J.Natl.Cancer Inst. 88.23 (1996): 1764-69.
54. Hicklin, D. J. and L. M. Ellis. "Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis." J.Clin.Oncol. 23.5 (2005): 1011-27.
55. Hlatky, L., P. Hahnfeldt, and J. Folkman. "Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us." J.Natl.Cancer Inst. 94.12 (2002): 883-93.
56. Horak, E. R. et al. "Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer." Lancet 340.8828 (1992): 1120-24.
57. Hurwitz, H. I. et al. "Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer." J.Clin.Oncol. 23.15 (2005): 3502-08.
58. Iwao, K. et al. "Molecular classification of primary breast tumors possessing distinct prognostic properties." Hum.Mol.Genet. 11.2 (2002): 199-206.
59. Jacquemier, J. et al. "Protein expression profiling identifies subclasses of breast cancer and predicts prognosis." Cancer Res. 65.3 (2005): 767-79.

60. Korschning, E. et al. "Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis." Lab Invest. 82.11 (2002): 1525-33.
61. Koukourakis, M. I. et al. "Angiogenesis relates to estrogen receptor negativity, c-erbB-2 overexpression and early relapse in node-negative ductal carcinoma of the breast." Int.J.Surg.Pathol. 11.1 (2003): 29-34.
62. Kumar, R. and R. Yarmand-Bagheri. "The role of HER2 in angiogenesis." Semin.Oncol. 28.5 Suppl 16 (2001): 27-32.
63. Kumar, S. et al. "Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis." Cancer Res. 59.4 (1999): 856-61.
64. Leek, R. D. "The prognostic role of angiogenesis in breast cancer." Anticancer Res. 21.6B (2001): 4325-31.
65. Lelle, R. J. "[In situ determination of the Ki-67 growth fraction (Ki-67 GF) in human tumors (studies in breast cancer)]." Acta Histochem.Suppl 39 (1990): 109-24.
66. Leonard, R. C. et al. "Conventional adjuvant chemotherapy versus single-cycle, autograft-supported, high-dose, late-intensification chemotherapy in high-risk breast cancer patients: a randomized trial." J.Natl.Cancer Inst. 96.14 (2004): 1076-83.
67. Li, H. J. et al. "[Tumor angiogenesis in node-negative breast carcinoma]." Ai.Zheng. 21.1 (2002): 75-78.
68. Liedtke, C. et al. "Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer." J.Clin.Oncol. 26.8 (2008): 1275-81.
69. Lopes, N. et al. "Vessel density assessed by endoglin expression in breast carcinomas with different expression profiles." Histopathology 55.5 (2009): 594-99.

70. Ludovini, V. et al. "Evaluation of the prognostic role of vascular endothelial growth factor and microvessel density in stages I and II breast cancer patients." Breast Cancer Res.Treat. 81.2 (2003): 159-68.
71. Ludovini, V. et al. "Evaluation of the prognostic role of vascular endothelial growth factor and microvessel density in stages I and II breast cancer patients." Breast Cancer Res.Treat. 81.2 (2003): 159-68.
72. Makretsov, N. A. et al. "Hierarchical clustering analysis of tissue microarray immunostaining data identifies prognostically significant groups of breast carcinoma." Clin.Cancer Res. 10.18 Pt 1 (2004): 6143-51.
73. Marme, D. "[Tumor angiogenesis: new approaches to cancer therapy]." Onkologie. 24 Suppl 1 (2001): 1-5.
74. Minhajat, R. et al. "Organ-specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancers." Pathol.Int. 56.12 (2006): 717-23.
75. Moebus, V. et al. "Intense dose-dense sequential chemotherapy with epirubicin, paclitaxel, and cyclophosphamide compared with conventionally scheduled chemotherapy in high-risk primary breast cancer: mature results of an AGO phase III study." J.Clin.Oncol. 28.17 (2010): 2874-80.
76. Montero, A. J. et al. "The natural history of breast carcinoma in patients with > or = 10 metastatic axillary lymph nodes before and after the advent of adjuvant therapy: a multiinstitutional retrospective study." Cancer 104.2 (2005): 229-35.
77. Newman, P. J. et al. "PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily." Science 247.4947 (1990): 1219-22.
78. Nieto, Y. et al. "Prognostic analysis of tumour angiogenesis, determined by microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor, in high-risk primary breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy." Br.J.Cancer 97.3 (2007): 391-97.
79. Nisato, R. E., J. C. Tille, and M. S. Pepper. "Lymphangiogenesis and tumor metastasis." Thromb.Haemost. 90.4 (2003): 591-97.

80. Nitz, U. A. et al. "Comparison of rapidly cycled tandem high-dose chemotherapy plus peripheral-blood stem-cell support versus dose-dense conventional chemotherapy for adjuvant treatment of high-risk breast cancer: results of a multicentre phase III trial." Lancet 366.9501 (2005): 1935-44.
81. Obermair, A. et al. "Vascular endothelial growth factor (VEGF) in human breast cancer: correlation with disease-free survival." Int.J.Cancer 74.4 (1997): 455-58.
82. Perou, C. M. et al. "Molecular portraits of human breast tumours." Nature 406.6797 (2000): 747-52.
83. Peters, W. P. et al. "Prospective, randomized comparison of high-dose chemotherapy with stem-cell support versus intermediate-dose chemotherapy after surgery and adjuvant chemotherapy in women with high-risk primary breast cancer: a report of CALGB 9082, SWOG 9114, and NCIC MA-13." J.Clin.Oncol. 23.10 (2005): 2191-200.
84. Roche, H. et al. "High-dose chemotherapy for breast cancer: the French PEGASE experience." Cancer Control 10.1 (2003): 42-47.
85. Rodenhuis, S. et al. "High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for high-risk breast cancer." N Engl J Med. 349.1 (2003): 7-16.
86. Rodenhuis, S. et al. "Efficacy of high-dose alkylating chemotherapy in HER2/neu-negative breast cancer." Ann.Oncol. 17.4 (2006): 588-96.
87. Rouzier, R. et al. "Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy." Clin.Cancer Res. 11.16 (2005): 5678-85.
88. Senger, D. R. et al. "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid." Science 219.4587 (1983): 983-85.
89. Smollich, M. and P. Wulffing. "The endothelin axis: a novel target for pharmacotherapy of female malignancies." Curr.Vasc.Pharmacol. 5.3 (2007): 239-48.

90. Somlo, G. et al. "Predictors of long-term outcome following high-dose chemotherapy in high-risk primary breast cancer." Br.J.Cancer 87.3 (2002): 281-88.
91. Sorlie, T. et al. "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98.19 (2001): 10869-74.
92. Sorlie, T. et al. "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98.19 (2001): 10869-74.
93. Sorlie, T. et al. "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98.19 (2001): 10869-74.
94. Sorlie, T. et al. "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98.19 (2001): 10869-74.
95. Sorlie, T. et al. "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98.19 (2001): 10869-74.
96. Spyros, F. et al. "Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications of the MIB-1 cutoff value." Cancer 94.8 (2002): 2151-59.
97. Tallman, M. S. et al. "Conventional adjuvant chemotherapy with or without high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation in high-risk breast cancer." N.Engl.J.Med. 349.1 (2003): 17-26.
98. Toi, M. et al. "Clinical significance of the determination of angiogenic factors." Eur.J.Cancer 32A.14 (1996): 2513-19.
99. Tomlinson, J. et al. "Different patterns of angiogenesis in sarcomas and carcinomas." Clin.Cancer Res. 5.11 (1999): 3516-22.

100. Tsutsui, S., M. Kume, and S. Era. "Prognostic value of microvessel density in invasive ductal carcinoma of the breast." Breast Cancer 10.4 (2003): 312-19.
101. Uzzan, B. et al. "Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis." Cancer Res. 64.9 (2004): 2941-55.
102. Vamesu, S. "Angiogenesis and ER/PR status in primary breast cancer patients: an analysis of 158 needle core biopsies." Rom.J.Morphol.Embryol. 48.1 (2007): 25-31.
103. Van Hoef, M. E. et al. "Assessment of tumour vascularity as a prognostic factor in lymph node negative invasive breast cancer." Eur.J.Cancer 29A.8 (1993): 1141-45.
104. Venkatasubramanian, R. et al. "Mechanistic modelling of dynamic MRI data predicts that tumour heterogeneity decreases therapeutic response." Br.J.Cancer 103.4 (2010): 486-97.
105. Vermeulen, P. B. et al. "Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours." Eur.J.Cancer 38.12 (2002): 1564-79.
106. Vermeulen, P. B. et al. "Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation." Eur.J.Cancer 32A.14 (1996): 2474-84.
107. Vogl, G. et al. "HER2 is unlikely to be involved in directly regulating angiogenesis in human breast cancer." Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol. 14.2 (2006): 138-45.
108. Vredenburgh, J. J. et al. "Detection of tumor cells in the bone marrow of stage IV breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy: the role of induction chemotherapy." Bone Marrow Transplant. 16.6 (1995): 815-21.
109. Warrington, K. et al. "Functional role of CD105 in TGF-beta1 signalling in murine and human endothelial cells." Anticancer Res. 25.3B (2005): 1851-64.

110. Weidner, N. et al. "Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma." J.Natl.Cancer Inst. 84.24 (1992): 1875-87.
111. Weidner, N. et al. "Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma." N Engl J Med. 324.1 (1991): 1-8.
112. Weinstat-Saslow, D. L. et al. "Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis." Cancer Res. 54.24 (1994): 6504-11.
113. Yao, Y. et al. "Prognostic significance of microvessel density determined by an anti-CD105/endoglin monoclonal antibody in astrocytic tumors: comparison with an anti-CD31 monoclonal antibody." Neuropathology. 25.3 (2005): 201-06.
114. Zhang, D. H. et al. "Tissue microarray study for classification of breast tumours." Ann.Acad.Med.Singapore 32.5 Suppl (2003): S75-S76.
115. Zhu, Y. et al. "Hypoxic induction of endoglin via mitogen-activated protein kinases in mouse brain microvascular endothelial cells." Stroke 34.10 (2003): 2483-88.

## **9. Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater PD Dr. Andreas Gaumann für die Überlassung des Themas meiner Arbeit und die stete Unterstützung und Betreuung. Ohne sein Engagement wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Vielen Dank an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, jedoch nicht namentlich erwähnt werden. Zu nennen sind hier meine Freunde, die mir zur Seite standen.

Herzlicher Dank gilt auch meiner Familie und meinem Freund für ihr Verständnis, ihre Aufmerksamkeit und die Aufmunterungen.

## **10. Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name	Verena Artinger
Geburtsdatum	07.02.1983
Geburtsort	Regensburg
Familienstand	ledig

### **Schulausbildung:**

1989- 2002	Grundschule und Gymnasium in Regensburg, Abschluss: Abitur, Note: 1,6
------------	--

### **Hochschulausbildung:**

2002 – 2008	Studium der Humanmedizin an der Universitätsklinik Regensburg
13. September 2004	Physikum, Gesamtnote: 2,6

### **Promotion:**

Thema	Angiogenese bei Brustkrebs,
Betreuer	Prof. Dr. Hofstätter in der Pathologie

### **Famulaturen:**

03.03	Prof. Dr. Wiedmann, Abteilung Innere Medizin, Barmherzige Brüder, Regensburg
10.05	Prof. Dr. Wirsching, Abteilung für Chirurgie, Caritas-Krankenhaus St. Josef, Regensburg
09. 05	Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin, Medizinische Universität Wien
03.06	Dr. Gräff, Facharzt für Orthopädie, Sportmedizin, Chirotherapie, Ambulante Operationen, Regensburg
04. 06	Dr. Koch, Facharzt für Gastroenterologie, Regensburg
03. 07	Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, Goldbergklinik Kehlheim

### **Praktisches Jahr:**

27. 08. 2008 - 26. 10. 2008	Prof. Dr. Bedu - Addo, Abteilung für Innere Medizin,
-----------------------------	--

	Ghana
27. 10. 2008 – 11. 11. 2008	Prof. Dr. Riegger, Abteilung für Nephrologie, Universitätsklinik Regensburg
12. 11. 2008 – 02. 12. 2008	Prof. Dr. Andreesen, Klinik für Hämatologie und Onkologie, Universität Regensburg
07. 04. 2008 – 04. 05. 2008	Prof. Dr. Hofmann, Klinik für Thoraxchirurgie, Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Regensburg
05. 05. – 25. 05. 2008	Prof. Dr. Neugebauer, Klinik für Unfallchirurgie, Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Regensburg
26. 05. 2008 – 08. 06. 2008	Prof. Dr. Steinbauer, Klinik für Gefäßchirurgie, Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Regensburg

## **Berufliche Tatigkeit:**

Seit 15. 12. 2008 Assistenzärztin in der Hals-Nasen-Ohrenklinik  
der Universitätsklinik Regensburg, Prof. Dr. Jürgen, Strutz

### **Besondere Kenntnisse:**

Sprachen Englisch und Französisch in Wort und Schrift

## Hobbys und Interessen:

Marathonlauf, Judo (14 Jahre Leistungssport; Mitglied des Nationalkaders), Radfahren  
Tätigkeiten als Klassensprecher in der Schulverwaltung

## **Erklärung zu den erbrachten Leistungen**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt".