

Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Großhadern
der Universität München
(Komm. Direktor: Prof. Dr. med. H. Hepp)

**Untersuchung des Zusammenhangs zwischen
VEGF Gewebsexpression und des
Sauerstoffpartialdrucks in primären
Mammakarzinomen am Modell der primär
systemischen Chemotherapie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwigs-
Maximilians-Universität, München

vorgelegt von

Salvatore Massimo Lombardo

München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
Der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. E.R. Weissenbacher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H.L. Sommer

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. W. Eiermann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2004

1	Einleitung	5
1.1	Epidemiologie, Inzidenz und Mortalität des Mammakarzinom	5
1.2	Therapiemöglichkeiten beim primären Mammakarzinom.....	6
1.3	Primär systemische Therapie	7
1.4	Prognostische und prädiktive Faktoren.....	8
1.5	Gewebeoxygenierung.....	9
1.5.1	Oxygenierung im gesunden Gewebe	9
1.5.2	Oxygenierung in malignen Tumoren	11
1.5.3	Oxygenierung des Mammakarzinoms.....	14
1.5.4	Gewebeoxygenierung und Tumor-Neoangiogenese.....	15
1.5.5	Gewebehypoxie und Radiosensitivität	16
1.5.6	Gewebshypoxie und Wirksamkeit von Zytostatika	18
1.6	VEGF.....	20
1.6.1	VEGF und Biochemie	20
1.6.2	Aktivierung und Regulierung von VEGF.....	21
1.6.3	VEGF-Rezeptoren.....	23
1.6.4	VEGF bei malignen Tumoren.....	25
1.6.5	VEGF beim Mammakarzinom.....	26
2	Ziel	27
2.1	Ziel des Gesamtprojekts	27
2.2	Ziel der vorliegenden Arbeit.....	27
3	Methodik	28
3.1	Patientinnen	28
3.2	pO ₂ -Messung im Tumorgewebe	29
3.3	Stanzbiopsie.....	30
3.4	Histopathologische Aufbearbeitung.....	30
3.5	VEGF-Messung im Tumorgewebe	31
3.5.1	Immunhistochemie	31
3.5.2	Immunhistochemisches Verfahren zur VEGF-Messung.....	32
3.5.3	Interpretation der Präparate	33
4	Statistische Aufbearbeitung aller Daten	34
5	Ergebnisse	35
5.1	Patientinnen	35
5.1.1	Altersverteilung.....	35
5.1.2	Verteilung nach histopathologischen Kriterien	37
5.2	VEGF im Tumorgewebe.....	39
5.2.1	VEGF und Alter der Patientinnen.....	39
5.2.2	VEGF und Histopathologische Unterteilung.....	40
5.2.3	VEGF und TumorgroÙe.....	41
5.2.4	VEGF und Nodalstatus.....	42
5.2.5	VEGF und Grading	42
5.2.6	VEGF und Hormonrezeptoren.....	43

5.3	pO₂ im Tumorgewebe	45
5.3.1	Verteilung der pO ₂ -Werte.....	45
5.3.2	Verteilung von pO ₂ auf das Alter der Patienten	46
5.3.3	pO ₂ und TumorgroÙe.....	47
5.3.4	Verteilung von pO ₂ auf die histologischen Typen.....	47
5.3.5	Verteilung von pO ₂ und Grading	48
5.3.6	PO ₂ und Hormonrezeptorstatus.....	49
5.4	VEGF und Gewebeoxygenierung	50
5.5	VEGF und Ansprechen auf primär systemische Therapie	51
5.6	pO₂ und Ansprechen auf primär systemische Therapie.....	52
6	<i>Diskussion</i>	54
6.1	Bewertung und Ausblick	60
7	<i>Zusammenfassung</i>.....	62
8	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	63
9	<i>Tabellenverzeichnis</i>	64
10	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	65
11	<i>Danksagung</i>.....	66
12	<i>Literaturverzeichnis</i>	67
13	<i>Lebenslauf</i>	73

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie, Inzidenz und Mortalität des Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist der häufigste bösartige Tumor der Frau in der Welt mit über einer Million Neuerkrankungen pro Jahr. Bezüglich der Inzidenz und somit auch der Mortalität bestehen weltweit erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Kontinenten. Vor allem an den altersstandardisierten Raten (ASR) ist der große Unterschied zwischen den so genannten „more developed countries“ und den „less developed countries“ zu erkennen.

Die altersstandardisierte Mortalitätsrate in Deutschland ist mit anderen europäischen Ländern vergleichbar, auch wenn Inzidenz- und Mortalitätsraten innerhalb Europas in der Literatur z.T. etwas unterschiedlich angegeben werden(13). In Deutschland erkrankt etwa jede zehnte Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mamma-karzinom. Innerhalb Deutschlands steht das Mammakarzinom nach wie vor an erster Stelle in der Rangfolge der Krebsinzidenz (vor Darmkrebs, Leukämien und Lymphomen, Tumoren des Gebärmutterkörpers, Magenkrebs, Bronchialkarzinom und Ovarialkarzinom). Die Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister und das Robert-Koch-Institut geben 46 295 Neuerkrankungsfälle für das Jahr 1998 an, das sind 25,9% aller weiblichen Krebserkrankungen. Auch bezüglich der Mortalität ist das Mammakarzinom in Deutschland die häufigste Krebstodesursache (vor Darmkrebs, Bronchialkarzinom, Magenkarzinom, Leukämien und Lymphomen, Pankreaskarzinom, Ovarialkarzinom und Tumoren der Gallenblase/-gänge). Für das Jahr 1999 wird von 17 616 Sterbefällen aufgrund eines Mammakarzinoms berichtet. Der Anteil an der tumorbedingten Mortalität beträgt 17,1%.

Die Brustkrebsinzidenz stieg in Deutschland bis zum Ende der 1980er Jahre deutlich an, in geringerem Maße auch die Sterblichkeit. Für die Aussage, dass von diesem Trend mehr die jüngeren Frauen betroffen seien, gibt es keine schlüssigen Daten. Zudem scheinen die altersstandardisierten Raten von Inzidenz und Mortalität in den letzten zehn Jahren weitgehend stabil zu sein.

Bis zum 55. Lebensjahr sind keine Unterschiede in den sechs Zeitperioden erkennbar. Der Anstieg der altersspezifischen Mortalität liegt ausschließlich in der Postmenopause und hier v.a. in der Altersgruppe der über 70-jährigen Frauen.

Gründe hierfür sind zur Zeit Gegenstand der Forschung.

1.2 Therapiemöglichkeiten beim primären Mammakarzinom

Die therapeutischen Ansätze beim primären Mammakarzinom stützen sich auf Chirurgie, Strahlentherapie und systemische Therapie. Als Standardverfahren versteht sich heute das brusterhaltende Vorgehen. Dieses sieht die Entfernung des Primärtumors und der dazugehörigen axillären Lymphknoten mit anschließender Bestrahlung des Restdrüsenkörpers vor. Bei zu großen Tumoren, wobei sich die Größe nicht absolut, sondern in Relation zum gesamten Brustvolumen versteht, und bei nicht möglicher vollständiger Entfernung des Primärtumors, muss die erweiterte Mastektomie durchgeführt werden.

Je nach Lymphknotenstatus, histologischem Typ, Hormonrezeptorstatus, Alter der Patientin und der Tumorgröße ist noch eine systemische Therapie notwendig. Diese ist meist eine Chemotherapie, welche je nach Gewebe-Rezeptor-Status durch eine endokrine Therapie ergänzt werden kann.

1.3 Primär systemische Therapie

Die primär systemische Therapie bezeichnet alle Therapien, die nach entsprechender histologischer Sicherung eines Mammakarzinoms, vor einer operativen Therapie durchgeführt werden. Als Synonym werden hierbei Begriffe wie „neoadjuvante“, „präoperative“ oder „Induktions“-Therapie verwendet. Bereits seit vielen Jahren wird beim inflammatorischen Mammakarzinom eine primäre Chemotherapie mit 4 Zyklen Adriamycin und Cyclophosphamid empfohlen. Viele jüngere Studienprotokolle (ECTO, GeparDuo und GeparTrio) haben es sich zur Aufgabe gemacht, auch andere Tumorstadien dieser Therapieform zuzuführen. Als Grundlage konnte eine große prospektive Studie mit 1523 Patientinnen, das NSABP-B18 Studienprotokoll (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project), ein vergleichbares Absenken des Rezidiv- und Sterberisikos in adjuvant und neoadjuvant therapierten Patienten aufzeigen. Ein besonders gutes Ergebnis konnte bei Patientinnen mit Tumoren über 5cm erzielt werden. Hier konnte eine Erhöhung der brusterhaltenden Operationen von 8% auf 22% verzeichnet werden.

Die Ziele der primär systemischen Therapie sind im Einzelnen:

- Die Erhöhung der Rate an brusterhaltenen Operationen
- Die Visualisierung des Therapieeffektes und damit verbundener höherer Compliance
- Die Evaluation neuer Medikamente in kurzer Zeit, da durch den direkt messbaren Tumor im Gegensatz zur adjuvant durchgeführten Chemotherapie ein effektiver Messparameter für das Ansprechen vorliegt (In-vivo-Chemo-Sensitivitäts-Test)
- Die Testung und Bestimmung neuer prädiktiver und prognostischer Faktoren

Der Nachweis einer histopathologischen Komplettremission (pCR) korreliert signifikant mit einer günstigen Prognose. Somit ist es das oberste Ziel der primär systemischen Therapie eine vollständige Tumorregression zu erreichen.

1.4 Prognostische und prädiktive Faktoren

Die Bestimmung von Prognosefaktoren beim Mammakarzinom hat zum Ziel, den Krankheitsverlauf für die individuelle Patientin prospektiv möglichst genau abzuschätzen. Zu den hierfür in Frage kommenden Faktoren gehören das Ausbreitungsstadium des Tumors (pTNM-Status), sein Wachstumsmuster (histo-pathologischer Typ, Grading) und weitere biologische Kriterien (Steroidhormonrezeptoren, Proliferationskinetik, Expressionsmuster tumor-assoziiertes Antigen etc.). Zu unterscheiden ist hierbei zwischen den gesicherten, „klassischen“ Faktoren, deren Bedeutung überwiegend in unabhängigen Studien auch mit multivariaten Analyseverfahren belegt ist, und den sogenannten „neueren“ Faktoren, deren Bedeutung im Hinblick auf einen Einfluss auf das rezidivfreie und Gesamtüberleben der Patientinnen bisher noch nicht gleichwertig belegt werden konnte.

Bis heute ist der axilläre Lymphknotenstatus beim Mammakarzinom der stärkste Prognosefaktor für Rezidiv und Überleben. Hierbei korreliert die Anzahl der befallenen Lymphknoten direkt mit dem Risiko des Rezidivs und des Todes. Es besteht eine positive Korrelation zwischen der Größe des Primärtumors und dem axillären Lymphknotenbefall. Für nodal-negative Karzinome ist die Tumorgöße ein wichtiger prognostischer Indikator, während bei den nodal-positiven Patientinnen in der multivariaten Analyse die Tumorgöße vom Lymphknotenbefall „überdeckt“ wird.

Auch morphologische Kriterien sind von hoher prognostischer Bedeutung. Definierte Sonderformen, wie z.B. tubuläre, papilläre und muzinöse Karzinome, haben eine signifikant bessere Prognose als ductale. Ein Tumoreinbruch in die Lymph- oder Blutgefäße weist auf eine schlechte Prognose hin. Weiterhin besteht eine eindeutige Abhängigkeit zwischen dem histologischen Grading und dem rezidivfreien Überleben.

Die Bestimmung der Steroidhormonrezeptoren hat eine breite klinische Bedeutung erlangt und gilt zur Zeit als einziger anerkannter prädiktiver Faktor, der zur Planung und Wirksamkeit der antihormonellen Therapie bestimmt wird. Bei nodal-negativen Patientinnen scheint dem Östrogenrezeptorstatus, bei nodal-positiven Patientinnen dem Progesteronrezeptorstatus die größere prognostische Bedeutung zuzukommen, wenngleich die prognostische Vorhersagekraft mit der Dauer der Nachbeobachtungszeit abnimmt. Weiterhin ist der Steroidhormonrezeptorstatus ein wichtiger therapierelevanter Faktor. Anerkannte Prognosefaktoren sind aktuell Tumorgöße, Nodalstatus, histologischer Typ, Grading und Steroidhormonrezeptorstatus.

1.5 Gewebeoxygenierung

1.5.1 Oxygenierung im gesunden Gewebe

Unter Gewebsatmung versteht man den Atemgaswechsel innerhalb eines Zellverbandes bei der biologischen Oxidation der Nährstoffe. Der Sauerstoff wird von den Zellen aus dem Kapillarblut aufgenommen und im oxidativen Stoffwechsel verbraucht, während gleichzeitig das als Stoffwechselendprodukt freigesetzte Kohlendioxid an das Kapillarblut abgegeben wird. Neben der Höhe des Partialdruckes für Sauerstoff im Kapillarblut ist eine der Einflussgrößen auf den Gasaustausch die Kapillarisation und die Mikrozirkulation in der terminalen Strombahn. Sowohl die Austauschfläche der Atemwege für die Diffusion zwischen dem Blut und dem Gewebe als auch die Diffusionsstrecken innerhalb des Gewebes sind abhängig von der Anzahl der unmittelbar durchströmten Kapillaren, ihrer Länge und ihrem Abstand.

Unter Bedingungen, die zu einer Einschränkung der O₂-Versorgung führen, kann der Energiebedarf der Gewebe nur zum Teil und nur für kurze Zeit durch anaeroben Metabolismus aufrecht erhalten werden. Eine längere Zeitspanne führt zur Azidose, Auslenkung der Homöostase und schließlich zur Nekrose des betroffenen Gewebsabschnittes. (51)

Unter den verschiedenen Modellen, mit deren Hilfe versucht wurde, die Bedingungen für den Atemgasaustausch in den Geweben zu beschreiben, ist das bekannteste und am häufigsten angewandte der Gewebszylinder nach Krogh.

Abbildung I zeigt die O₂ Partialdruckverteilung im Versorgungszylinder einer Kapillare nach Krogh. Anhand dieser Abbildung lässt sich der Abfall des pO₂ Wertes entlang einer Kapillare darstellen. Dies zeigt den Einfluss der Diffusionsstrecke auf die Sauerstoffversorgung des Gewebes. Unter den möglichen weiteren Ursachen einer O₂-Mangelversorgung stehen drei im Vordergrund. Die Erniedrigung des O₂-Partialdruckes im arteriellen Blut (arterielle Hypoxie), die Herabsetzung der O₂-Kapazität des Blutes (Anämie) und die Einschränkung der Organdurchblutung (Ischämie).

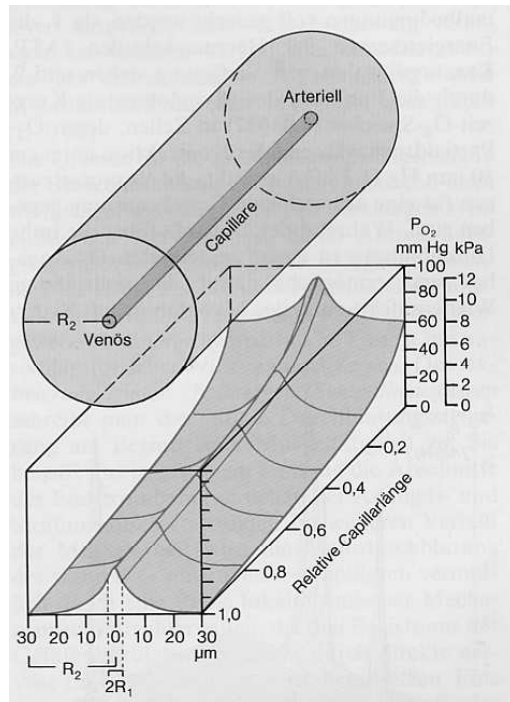


Abbildung 1(51) Gewebeoxygenierung

1.5.2 Oxygenierung in malignen Tumoren

Bei stetig wachsenden Zellverbänden vergrößern sich auch zunehmend die Diffusionsstrecken. Die Folge ist eine relative Ischämie. Ab einem Abstand von $100\mu\text{m}$ zwischen Kapillare und Zelle kommt es zur Gewebshypoxie (Sauerstoffpartialdruck unter Normwert). Diese Entfernung ist ab einer Tumorausdehnung über 3mm^3 bereits erreicht. (Abbildung II)

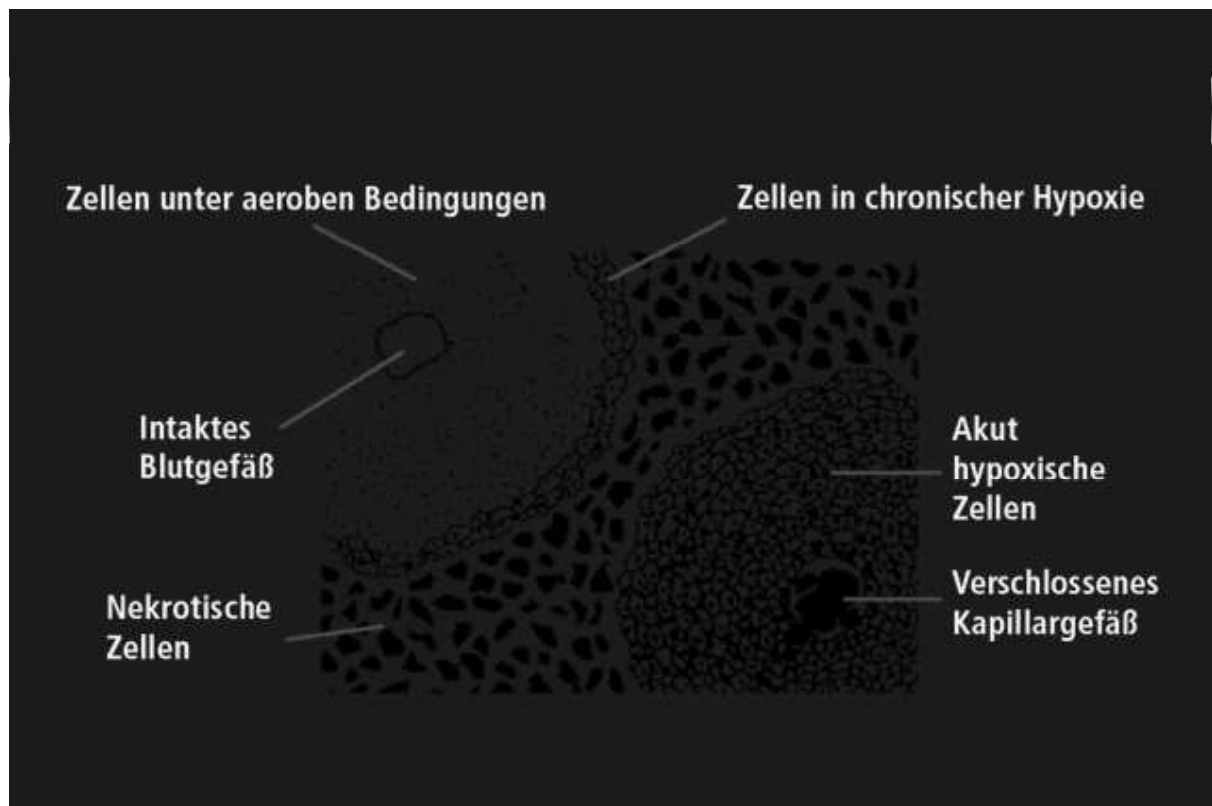


Abbildung 2 Hypoxische Regionen des Tumorgewebes(57)

Vaupel et al.(24,69) konnten in einer Reihe von Untersuchungen zeigen, dass der Sauerstoffpartialdruck in den Primärtumoren, Metastasen und Rezidivtumoren niedriger ist, als in den umliegenden Normalgeweben. Somit liegt der normale $p\text{O}_2$ -Wert im Gewebe zwischen 24-66 mmHg, wohingegen die meisten Tumore weniger als 20mmHg aufweisen. Vaupel et al.(24,68,69) definierten eine Gewebeoxygenierung von unter 10mmHg als Hypoxie und eine Gewebeoxygenierung von unter 2,5mmHg als Anoxie. Obwohl der in der Literatur beschriebene Mindestpartialdruck (kritischer Sauerstoffpartialdruck der

Mitochondrien) zur Aufrechterhaltung der normalen oxidativen Stoffwechsellage bei 1 mmHg liegt(51), kann angenommen werden, dass im Abfall des Sauerstoffpartialdrucks die Ursache für das schlechtere Gesamtüberleben der Patientinnen liegt, verglichen mit Tumoren mit höherer Gewebeoxygenierung. Eine O_2 -Bedarfssteigerung kann nicht durch Steigerung der O_2 -

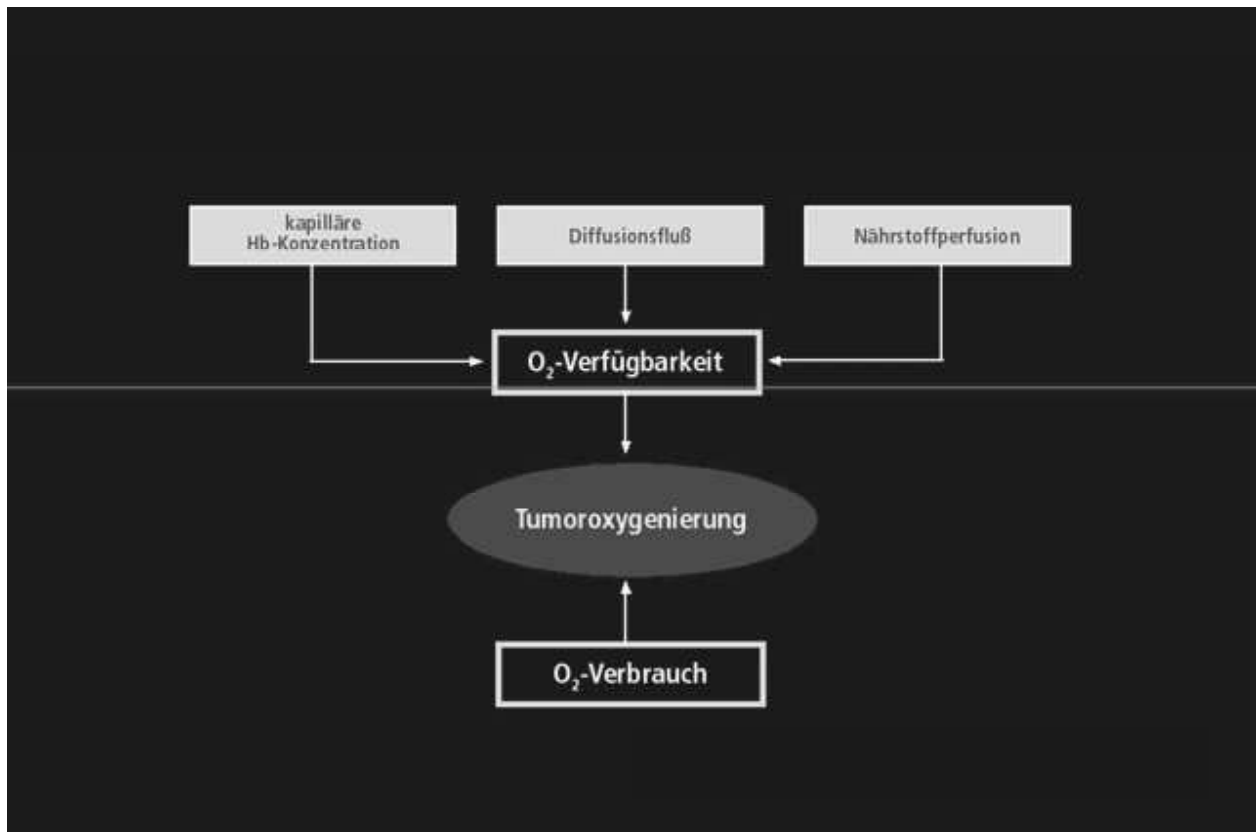


Abbildung 3 Physiologie der Tumorgewebe(64,68)

Konzentration im Blut erzielt werden. Eine Steigerung des O_2 -Bedarfs muss also zwangsläufig über die Zunahme der Durchblutungsgröße erfolgen, damit, wie hier in der Abbildung dargestellt, die O_2 -Verfügbarkeit gesteigert werden kann (Abbildung III). Es wird somit die Neubildung von Blutgefäßen (Neoangiogenese) erforderlich. Das VEGF, als Sauerstoff regulierendes Protein, gilt nach Höckel et al. zu den Zeichen einer erhöhten Tumoraggressivität in hypoxischen Tumoren. Dies äußert sich durch häufigere Mutationsraten, durch erhöhte Therapieresistenz und malignere Tumorstadiumsmuster. Reynolds et al. (48) (Abbildung 4) konnten in vitro 1996 zeigen, dass eine hypoxische

Atmosphäre die Mutationsraten deutlich erhöht waren. Im Vergleich zur Normoxie waren die Mutationsraten um das 13-fache erhöht. In der zitierten Studie wurden die Zellen einem hypoxischen Wert von <math><1\text{mmHg}</math> ausgesetzt, um sie als hypoxisch zu definieren.

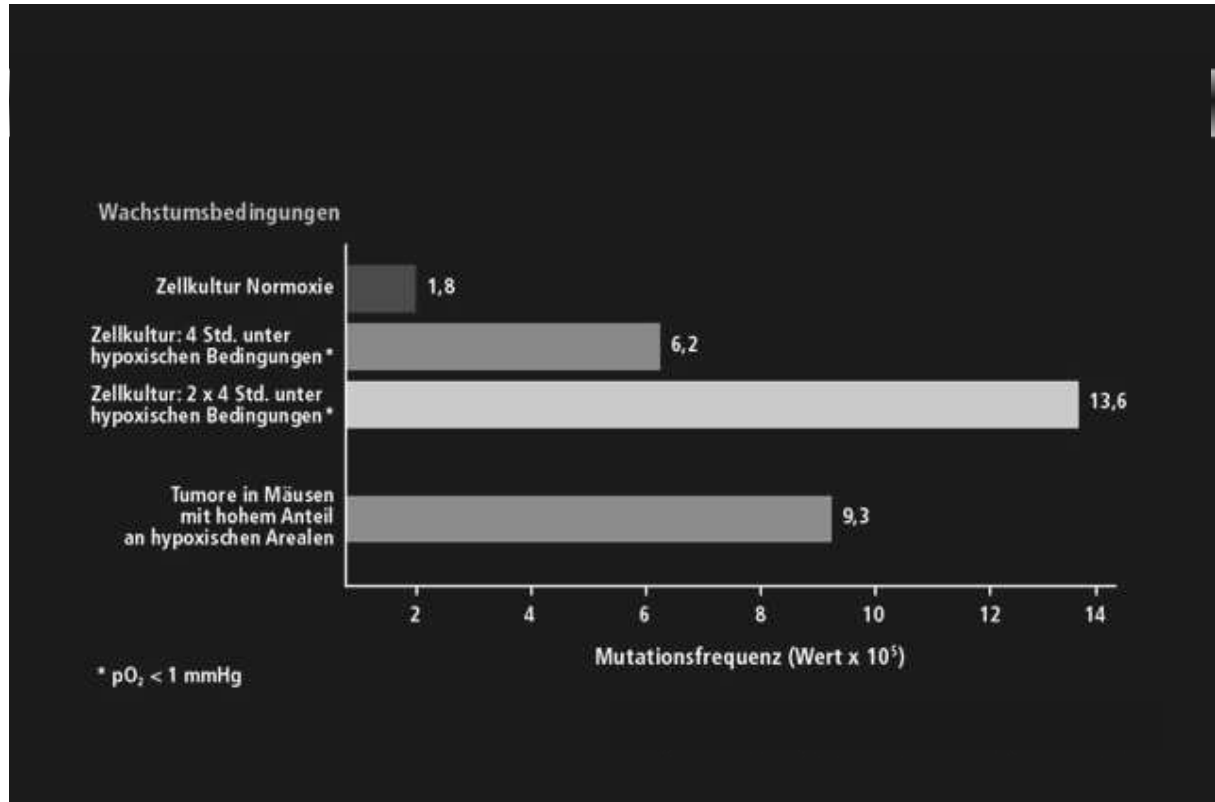


Abbildung 4 Auswirkungen der Hypoxie auf die genetische Stabilität

1.5.3 Oxygenierung des Mammakarzinoms

Bereits 1987 wurden von Vaupel et al.(69) Untersuchungen zur Oxygenierung maligner Tumore durchgeführt. Greaber et al.(20) zeigten eine hypoxieabhängige Selektion von apoptotischen Zellen in soliden Tumoren. Die Apoptose ist ein physiologisch stimulierbarer Zelltod, der unter bestimmten Bedingungen (Hypoxie) ein Wachstum verhindern kann. Greaber et al. beobachteten nicht nur unter hypoxischen Bedingungen ein Rückgang des p53-Suppressor gens, sondern auch eine übermäßige Expression des Apoptose-Inhibitionsgens. Hiermit konnte gezeigt werden, dass Hypoxie Tumorwachstum unterstützt. (Abbildung 5)

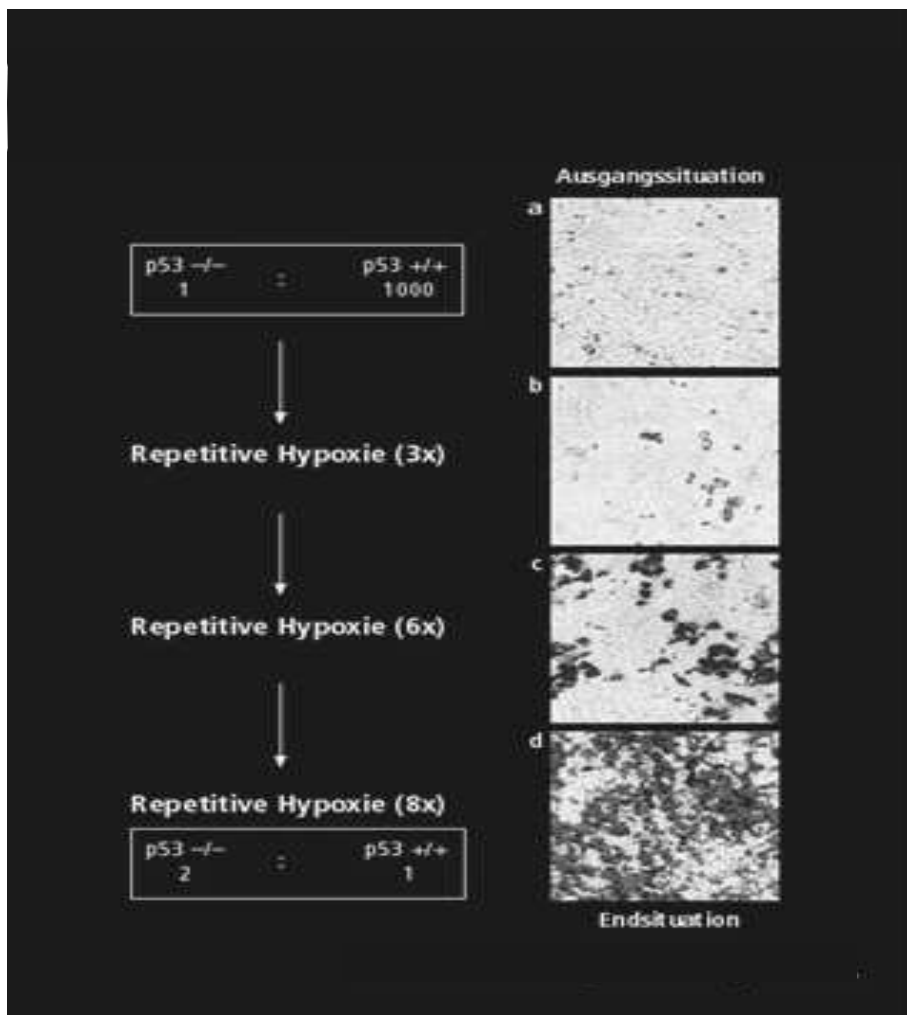


Abbildung 5 Hypoxie abhängige Selektion bestimmter Zellen

An 15 Mammakarzinom-Patientinnen wurde eine Studie durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Mammakarzinome einen niedrigeren Sauerstoffpartialdruck aufwiesen als benignes Gewebe.

Nach diesen Messungen betrug der Median im benignen Gewebe 65mmHg und im malignen Gewebe 28mmHg(69). Somit konnte eine unterschiedliche Gewebeoxygenierung zwischen gutartigen und bösartigen Brustgewebe Veränderungen nachgewiesen werden.

1.5.4 Gewebeoxygenierung und Tumor-Neoangiogenese

Angiogenese ist die Neuf ormation von Blutgefä ßen ausgehend aus der bereits existierenden Vaskularisation. Präklinische Studien konnten im Bereich maligner Melanome bereits die entscheidende Beteiligung der Neoangiogenese im Tumorwachstum und Metastasenformation belegen.(19). Die parakrine Stimulation der Tumorzellen selbst, wie die Abbildung 6 zeigt, ist der Hauptantriebsmechanismus der Neoangiogenese. Nach der Stimulation kommt es zur Proliferation und Migration von Endothelzellen mit anschließender Neuf ormation von Blutgefä ßen. Zhang et al.(49) konnten bereits die Beteiligung des VEGF's bei der Neovaskularisation der Mammakarzinomzellen in vitro nachweisen. In einer 49 Patientinnen umfassenden klinischen Studien konnten Weidner et al. eine signifikante Korrelation zwischen der Dichte von intratumoralen Mikrogefä ßformationen und den darunter befindlichen metastasierten Mammakarzinomen aufzeigen(71). Im Anschluss konnten zwei weitere Studien von Weidner et al.(71) und Horak et al.(25) die Dichte der Mikrogefä ße intratumoral als unabhängigen und signifikanten prognostischen Faktor beim Mammakarzinom nachweisen. Die Bedeutung des VEGF's im Bereich der Tumorneoangiogenese wird verdeutlicht, wenn man die Ergebnisse von Kim et al. (29) betrachtet. Hier wurde tierexperimentell die Neoangiogenese in Tumorzellen durch Anti-VEGF Substanzen unterdrückt. Somit konnte eine ursächliche Beteiligung des VEGF's an der Neoangiogenese in Tumorzellen nachgewiesen werden.

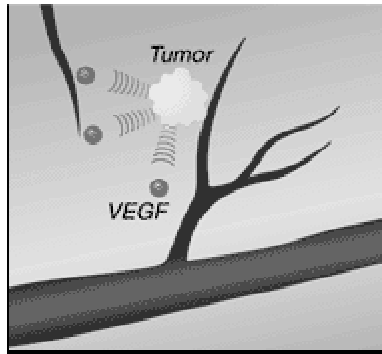


Abbildung 6 VEGF Aktivierung

1.5.5 Gewebehypoxie und Radiosensitivität

Voraussetzung für den Erfolg einer Radiotherapie ist eine effiziente Sauerstoffversorgung. Bei einem geringen pO_2 im Tumorgewebe (Kopf-/Halstumore und Zervixkarzinome) muss eine höhere Strahlendosis eingesetzt werden, um die gleiche Menge an Tumorzellen abzutöten wie sonst unter normoxischen Bedingungen. Diese Relation ist formelhaft in der "oxygen enhancement ratio" (OER) festgehalten. Strahlung wirkt auf die DNA durch die Bildung von Radikalen, die strukturelle Schäden an der Erbsubstanz der Tumorzellen hervorrufen. Werden unter hypoxischen Bedingungen vor allem OH-Radikale gebildet, so entstehen im normoxischen Milieu vorwiegend die aggressiveren Peroxy-Radikale, deren DNA-Addukte die Zelle nur unvollständig reparieren können.

Für die klinische Relevanz der Tumoroxygenierung für den Erfolg einer Strahlentherapie gibt es eine Reihe von Hinweisen. Verschiedene Studien(26,27) zeigen, dass eine mangelhafte Tumoroxygenierung mit einer schlechteren lokoregionären Tumorkontrolle, einem kürzeren

krankheitsfreien Überleben und mit höherer Fernmetastasierungsrate einhergeht und somit die Prognose insgesamt verschlechtert. Unter hypoxischen Bedingungen kommt es zu einer deutlich höheren Überlebensquote bestrahlter Zellen als bei normoxischen Zellen. (Abbildung 7)

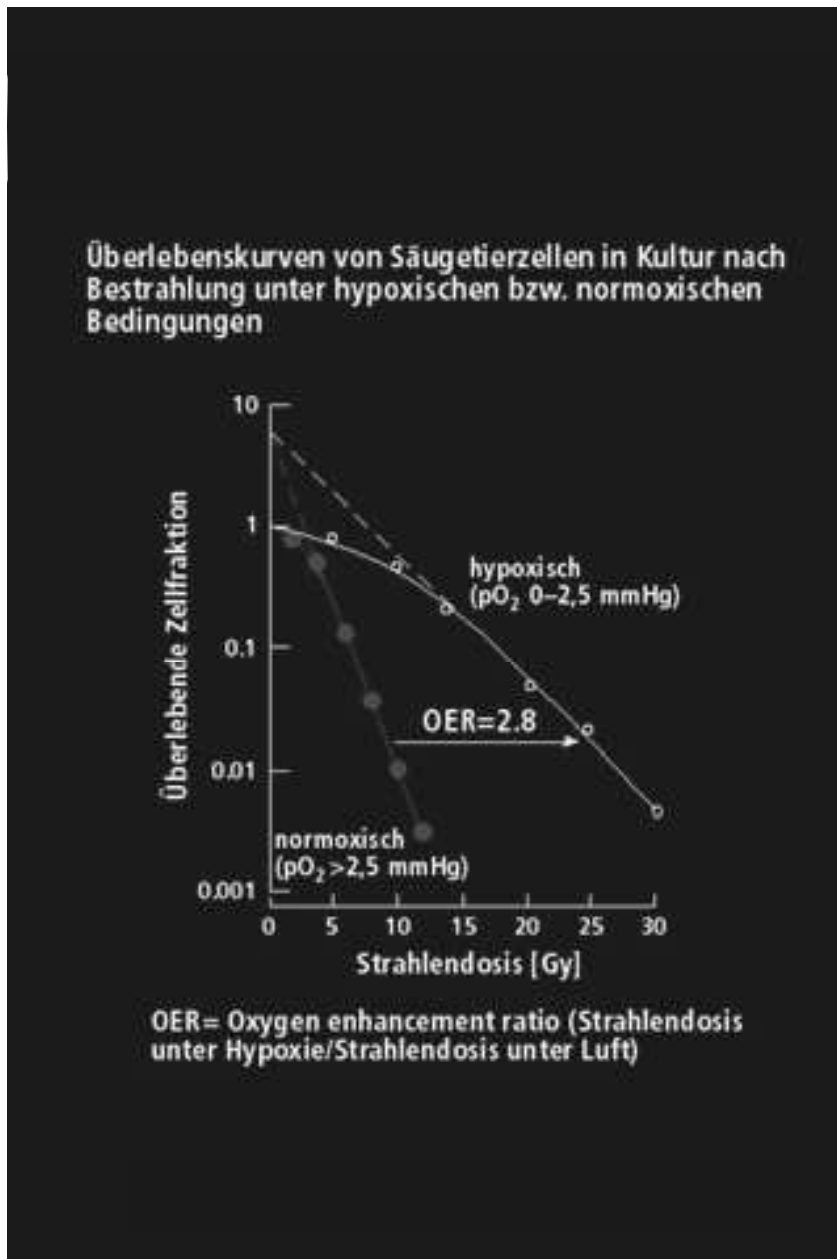


Abbildung 7 Einfluss der Gewebeoxygenierung auf die Radiosensitivität(26)

Beim Mammakarzinom, bei dem die Strahlentherapie einen festen Platz einnimmt, sind bis heute zu diesem Thema keine Daten in der Literatur zu finden. Desweiteren muß auch hier bedacht werden, dass bei Brustershaltender Therapie lediglich das Brustdrüsengewebe bestrahlt wird und nicht der eigentliche Tumor.

1.5.6 Gewebshypoxie und Wirksamkeit von Zytostatika

Zytostatika machen sich die schnelle Teilungsrate einer Zelle zu Nutze, um diese zu schädigen (Abbildung 8).

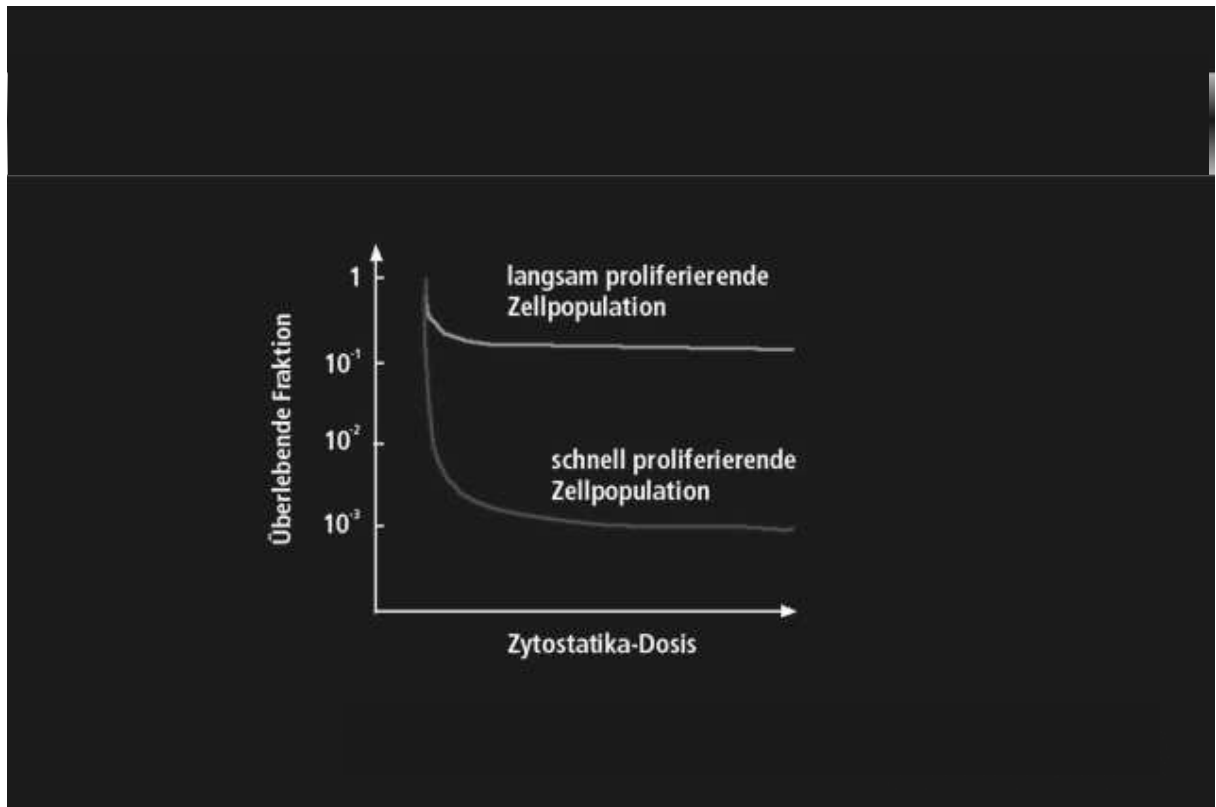


Abbildung 8 Dosis-Wirkungsbeziehung von langsam vs. schnell proliferierenden Zellen(73)

Bei Sauerstoffmangel ist die Zellteilungsrate und somit auch die Wirksamkeit einer Chemotherapie vermindert. Für eines der gängigsten Chemotherapeutika, das Cyclophosphamid, wurde eine direkte Sauerstoffabhängigkeit in bezug auf die Wirksamkeit gezeigt.(59) Spiro et al.(56) konnten eine klare Korrelation zwischen Hypoxie und langsamerem Zellwachstum belegen.

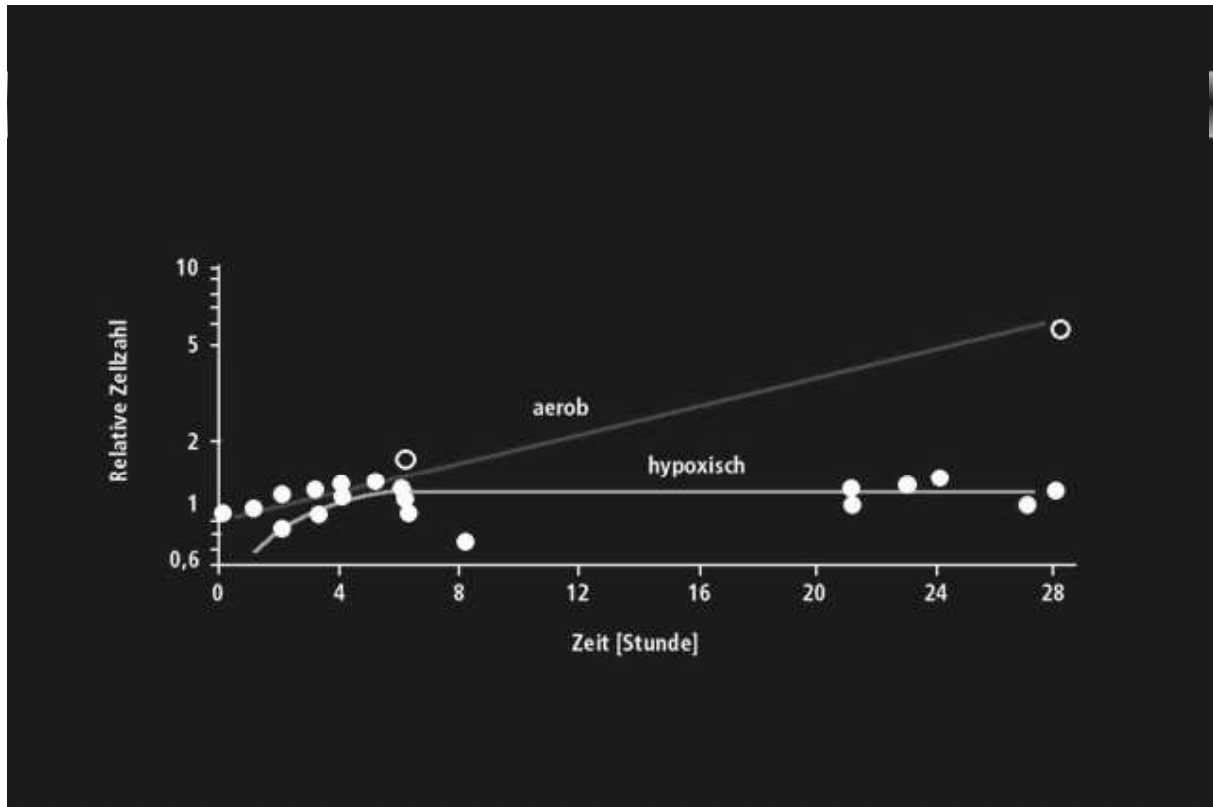


Abbildung 9 Zusammenhang zwischen Hypoxie und Zellproliferation

Hieraus wird klar, warum der Erfolg der Chemotherapie, welcher auf der Hemmung des Tumorwachstums basiert, in hypoxischen Geweben gemindert wird. Teicher et al.(60) konnten durch Anheben der Hb-Konzentration in Patienten mit Chemotherapie mit den Substanzen Cyclophosphamid, Melphalan und Isofosfamid einen Therapieerfolg von 30-50% verzeichnen.

1.6 VEGF

1.6.1 VEGF und Biochemie

Eine große Anzahl von Angiogenese-Faktoren und ihrer Rezeptoren sind bereits in der Literatur beschrieben. Der am besten charakterisierte Faktor ist das VEGF, welches auch als vascular permeability factor bekannt wurde. Als nahezu einziger Faktor kann es spezifisch am Endothel angreifen(14-17).

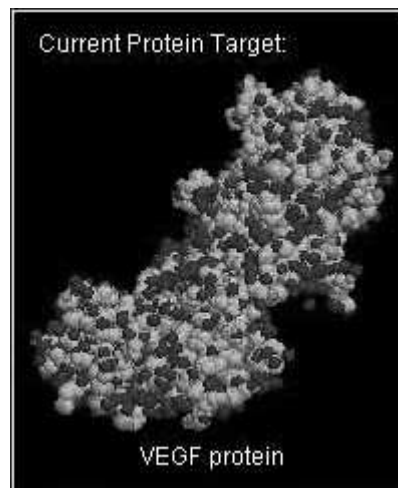


Abbildung 10 VEGF-Protein

Die Familie der VEGF's beinhaltet 6 Geschwister. Das VEGF (Abbildung 10), Plazenta-Wachstumsfaktor, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E(46). Die Unterscheidung liegt in ihrer biochemischen Struktur. VEGF, das stärkste direkt wirkende Angiogeneseprotein, ist für die Permeabilitätssteigerung an Gefäßwänden mitverantwortlich. VEGF wurde als Hauptagens der pathologischen Angiogenese bei Erkrankungen wie Psoriasis und im Tumorwachstum identifiziert.

1.6.2 Aktivierung und Regulierung von VEGF

Hypoxie scheint ein wichtiger Stimulus für die VEGF Genexpression zu sein. Dieser Stimulus scheint im Normalgewebe und im malignen Gewebe gleichermaßen zu wirken. Hypoxie und ein verändertes Tumorsuppressorgen (p53)(31) wurden unter anderem als mögliche „Aktivatoren“ des VEGF-Proteins identifiziert. Die gesteigerte Rate an ausgeschütteten VEGF-Protein in hypoxischem Gewebe kann teilweise über eine erhöhte Transkription des Proteins erklärt werden, welche durch das Anbinden des “hypoxia-inducible factor-1” (HIF1) an das entsprechende Gen verursacht wird. Die HIF1 m-RNA korreliert direkt proportional mit der VEGF m-RNA. Die starke Expression von HIF1 m-RNA in der Embryonalentwicklung und in sauerstoffabhängigen Organen lässt vermuten, dass in normoxygenierten Geweben, HIF1 die Gen Expression von VEGF und verschiedene Glykolyse Enzyme reguliert. Desweiteren lässt sich vermuten, dass HIF1 in der Entwicklung des Gefäßsystems beteiligt ist und in der Ausbildung der Lunge.(5,10,44) Shweiki et al(55). konnten bereits 1995 eine Verstärkte VEGF-Gewebeexpression nachweisen (siehe Abbildung 11).

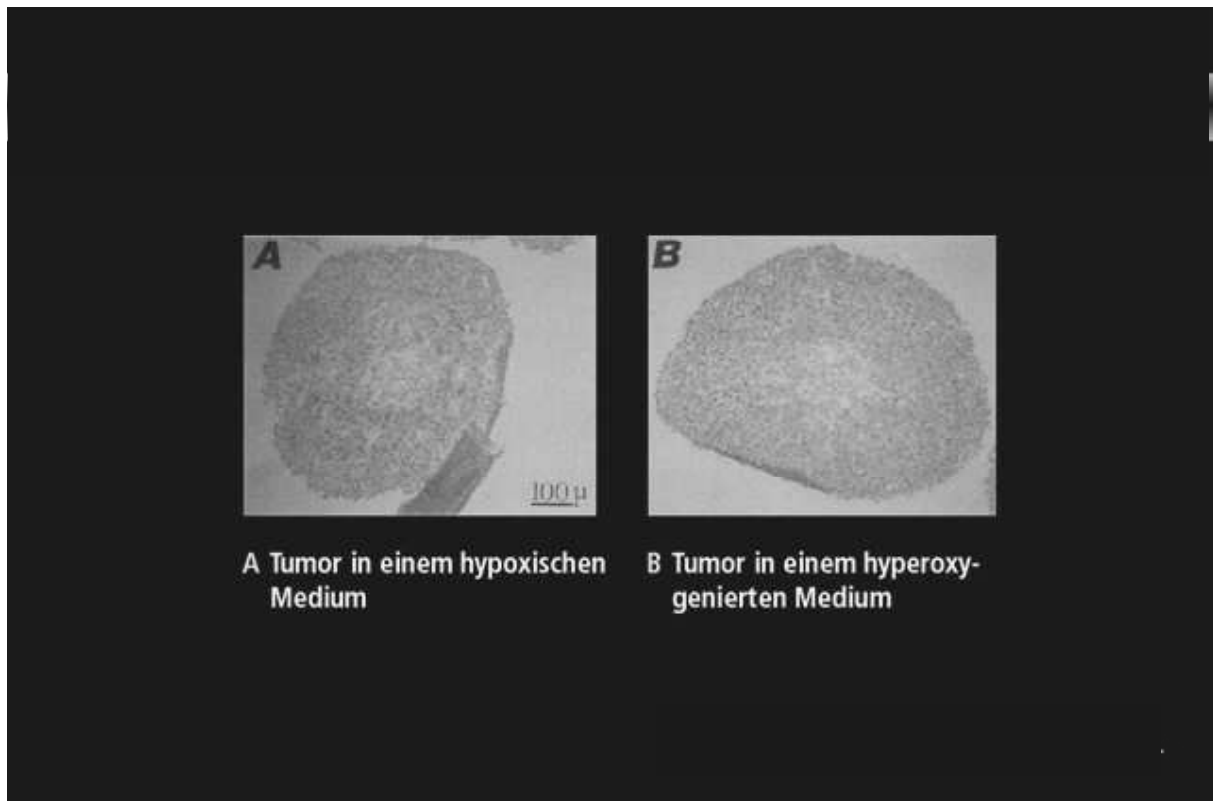


Abbildung 11 Hypoxie stimuliert die Produktion des Wachstumsfaktors VEGF(54)

Nachdem Shweiki et al. zeigen konnten, dass das VEGF vom Tumorgewebe selbst sezerniert wurde, beschrieben sie, dass es durch Anbinden an einen entsprechenden Rezeptor an der Endothelwand zur Signaltransduktion und schließlich zur Proteintranslation kommt. Das hieraus resultierende und im Anschluss sezernierte VEGF ist der Haupt-Angiogenesefaktor, welches die endothelialen Zellfunktionen, inklusive der Mitose, reguliert. Zelluläres und zirkulierendes VEGF ist in hämatoonkologischen Erkrankungen erhöht und wird als ein Zeichen für eine schlechte Prognose angesehen(58).

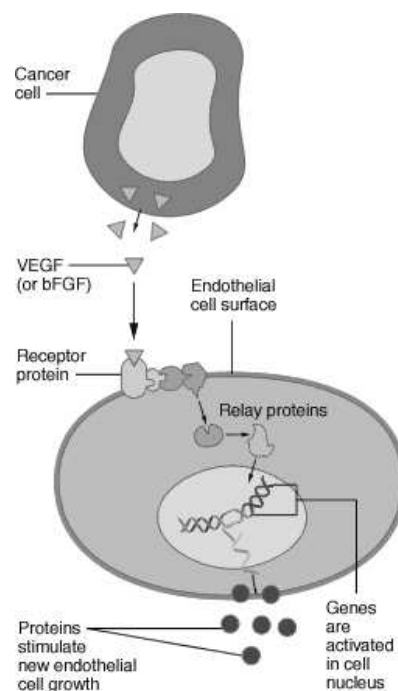


Abbildung 12 VEGF Stimulationsmechanismus

Die biomolekulare Funktion von HIF1 ist das Auslösen der Transkription bestimmter Gene, so zum Beispiel von Transferrin oder VEGF, beides Substanzen, die in der Neovaskularisation und der Tumormetastasierung eine entscheidende Rolle spielen. Die Aktivierung des HIF1 erfolgt zum Einen durch direkte Rezeptorgesteuerte Aktivierung und zum Anderen wird die Transkription von HIF1 durch Hypoxie induziert(5,6,12,44). Der Zusammenhang zwischen Hypoxie, HIF1 und VEGF könnte somit einen neuen Ansatz bei der Therapieentscheidung liefern. Ein hypoxisches Gewebe könnte somit in Zukunft als aggressiver und deshalb als Therapieintensiver eingestuft werden.

Nachdem die Therapie des Mammakarzinoms in der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts durch radikale Operationen geprägt war, sind aktuelle Therapiestandards durch die Einbettung der operativen Therapie in ein Gesamtkonzept aus chirurgischen, strahlentherapeutischen und medikamentösen Maßnahmen gekennzeichnet. Durch den Einsatz der adjuvanten endokrinen und zytostatischen Therapie, die Entwicklung neuer Zytostatika und deren Applikationsschemata hat sich die Prognose des Mammakarzinoms so deutlich gebessert, dass die Indikation zur adjuvanten Brustkrebstherapie mittlerweile (Konsensustreffen St. Gallen 2001) auf alle Patientinnen mit einem Rezidivrisiko von über 5-10% erweitert wurde. Da die Empfehlungen dazu übergehen ein noch größeres Patienten Kollektiv mit Chemotherapien zu behandeln als bisher, bekommt die Aussage über die Wirksamkeit der angestrebten zytostatischen Therapie eine noch größere Bedeutung.

1.6.3 VEGF-Rezeptoren

Es wurden bis heute 3 verschiedene VEGF-Rezeptoren in der Literatur beschrieben. VEGFR-1/FLT-1, VEGFR2/FLK-1/KDR und VEGFR-3/FLT-4. VEGFR-1 und VEGFR-2 sind Thyrosin-Kinase Rezeptoren.

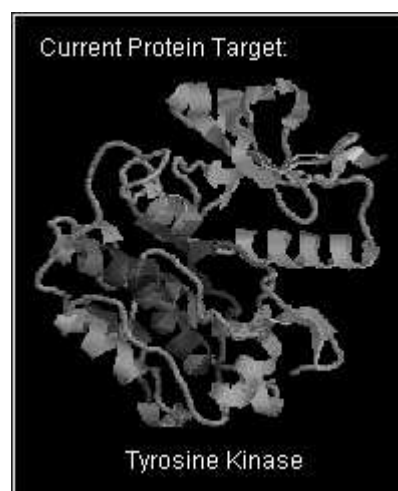


Abbildung 13 Thyrosin Kinase Rezeptor

Diese befinden sich während der Embryonalentwicklung auf den Endothelzellen. Hieraus entstand die Theorie, dass VEGF an der Vaskularisation während der Embryogenese beteiligt ist (7,17,50).

Auf molekularer Ebene handelt es sich beim Thyrosin-Kinase-Rezeptor um einen Signaltransduktor. Ein second-messenger (ATP) wird im Inneren der Zelle als Signal eingesetzt und die gewünschte Enzymaktivität induziert.

Durch "andocken" von VEGF am passenden TKR wird über Phosphorylierung auf der Innenseite der Zellmembran ein Signalprotein erzeugt.(Abbildung 14)

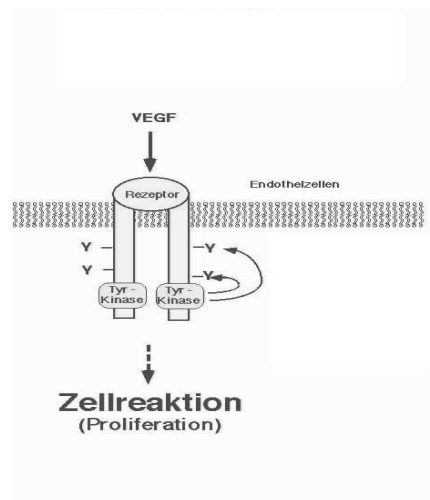


Abbildung 14 Rezeptor Mechanismus

Dieses führt die entsprechenden Induktionen auf Enzymebene durch.

Thyrosin-Kinase Rezeptoren sind wichtiger Bestandteil bei der Regulierung von Wachstum, Differenzierung, Migration und im Metabolismus.

VEGFR-2 ist der Rezeptor, der sich hauptsächlich auf den Endothelzellen befindet und der hauptsächlich an der Vaskularisation beteiligt ist.

Viele Studien haben die Bedeutung von VEGFR-2 bereits für das Tumorwachstum gezeigt. So zum Beispiel Milauer et al.(45). Er benutzte einen Retrovirus, um in das bestehende Genom einen Rezeptornegatives Gen einzufügen. Er konnte tierexperimentell das Wachstum von transplantierten Glioblastomazellen verhindern.

Bernathchez et al.(3) benutzen gegenläufige Oligomere gegen FLK-1 und FLT-1. Hiermit gelang ihnen der Beweis, dass FLK-1 durch VEGF Stimulation endotheliale Proliferation, Migration und die Produktion von platlet activating factor hervorruft. Das Blockieren von FLT-1 ist hingegen nicht fähig, diese Aktivitäten zu beeinflussen. Aus diesen Studien lassen sich Anhaltspunkte für mögliche antiangiogenetische Therapien gewinnen.

1.6.4 VEGF bei malignen Tumoren

Die anfängliche Beschreibung von VEGF beschränkte sich auf seine Fähigkeit, die Gefäßpermeabilität und somit das physiologische Zellwachstum zu stimulieren. Erst langsam realisierte man die pathologische Potenz im Zusammenhang mit onkologischen Krankheitsbildern. Diese Aussage wird durch die Erkenntnis gestützt, dass die meisten Tumorzellen VEGF produzieren und ein Inhibieren dieses Faktors auch zu einer bedeutenden Reduktion des Wachstums führt. Auch beim Mammakarzinom konnte unter anderem bewiesen werden, dass VEGF die Mikrozirkulation steigert und somit Wachstum und Ausdehnung fördert und schließlich die Mortalität deutlich beeinflusst(37-40).

Es zeigte sich, dass die Reduktion von angiogenetischen Faktoren bei Lunge, Prostata und Colon-Ca eine deutliche Tumorregression nach sich zieht.

Bei Patienten mit bösartigen Erkrankung konnten Antiangiogenesefaktoren, alleine oder in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika, das Tumorwachstum hemmen, Metastasierung reduzieren und somit Lebenserwartung und Lebensqualität verbessern.(11,52).

1.6.5 VEGF beim Mammakarzinom

In einer 46 Patientinnen umfassenden Studie wurde die Gewebeexpression von VEGF B (lokalisiert auf Endothelzellen) und VEGF C (lokalisiert auf Lymphgefäßen) beim Mammakarzinom beschrieben.(50). Hier wurde beim Carcinoma in situ (DCIS) Gewebe eine signifikante Assoziation zwischen VEGF mRNA-Expression und der Angiogenese festgestellt(9). Dieselbe Studiengruppe fand eine hohe VEGF Zellexpression bei der Hälfte der DCIS-Fälle und eine mittlere bis hohe VEGF-Zellexpression bei den meisten invasiven Mammakarzinomen heraus.(9). In einer retrospektiven Studie von Toi et al.(63) (Abbildung 15) wurden 103 Patientinnen mit Mammakarzinom erweitert mastektomiert. Toi et al. konnten eine statistische Signifikanz zwischen der 5-Jahres-Überlebensrate und der VEGF-Minderexpression aufweisen ($p=0,01$).

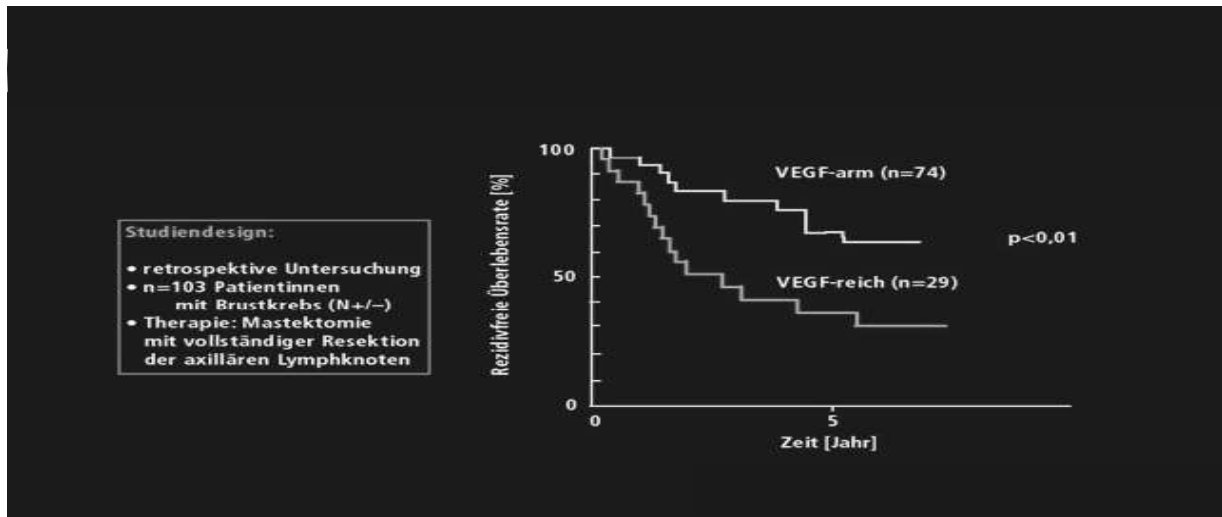


Abbildung 15 Rezidivfreie Überlebensrate in Abhängigkeit von VEGF-Status

Desweiteren konnten Anan et al.(1,2) in einer 230 Patientinnen umfassenden Studie eine signifikante Korrelation zwischen nodal-positiven Mammakarzinomen und einer VEGF-Gewebeexpression nachweisen. Aus diesen Daten lässt sich eine Assoziation von VEGF-Expression und Mammakarzinom ersehen und eine prognostische Bedeutung dieses Faktors vermuten.

2 Ziel

2.1 Ziel des Gesamtprojekts

An der Frauenklinik vom Roten Kreuz in München wurde in Zusammenarbeit mit der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München zwischen 1999 und 2001 ein interdisziplinäres Forschungsprojekt durchgeführt, in welchem herausgefunden werden sollte, ob der Sauerstoffpartialdruck in malignen Mammatumoren als prädiktiver Faktor für die primär systemische Therapie herangezogen werden kann und ob er andere prognostische oder prädiktive Faktoren beeinflusst.

2.2 Ziel der vorliegenden Arbeit

Es ist das Ziel dieser Arbeit den Zusammenhang zwischen der VEGF-Gewebeexpression und dem Sauerstoffpartialdruck beim primären Mammakarzinom am Modell der primär systemischen Therapie zu untersuchen.

3 Methodik

3.1 Patientinnen

Im Zeitraum von Oktober 1999 bis November 2000 wurde bei 192 Patientinnen mit Mammatumoren über 2 cm Durchmesser eine Studie zur Messung des intratumoralen Sauerstoffpartialdruckes durchgeführt. Im Falle der Malignität wurde eine immunhistochemische Fixierung des Gewebes vorgenommen, um die VEGF-Expression darzustellen.

Die Studie erfolgte unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. W. Eiermann und Dr.med. G. Raab von der Frauenklinik vom Roten Kreuz in München, sowie Herrn Prof. Dr. med. M. Molls und Herrn Dr. med. F. Auer von der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München. Die Stanzbiopsien wurden in der Abteilung für Radiologie der Frauenklinik vom Roten Kreuz in München durch Herrn Dr. med. Schmidt und Herrn Dr. med. D. Scheich durchgeführt. Die Messungen wurden von Herrn Dr. med. Auer vor der diagnostischen Stanzbiopsie bei den Mammakarzinom Patientinnen durchgeführt. Anschließend wurde das gewonnene Gewebe in der pathologischen Abteilung des Krankenhauses vom Roten Kreuz in München, unter der Leitung von Herrn Dr. med. Högel, histologisch aufgearbeitet. Alle Patientinnen wurden über den wissenschaftlichen Charakter der Untersuchung aufgeklärt. Bei Malignität erfolgte nach unauffälligen Staginguntersuchungen die Behandlung im Rahmen von Studienprotokollen. Hierzu wurde von allen Patientinnen ein schriftliches Einverständnis eingeholt.

3.2 pO_2 -Messung im Tumorgewebe

Zuerst wurde die zu untersuchende Brustveränderung bildlich dargestellt. Je nach Art der Läsion konnte dies mittels Ultraschall, Röntgen (= Mammographie) oder MRT (= Magnetresonanztomographie) erfolgen. Nach Desinfektion der Einstichstelle und einer lokalen Betäubung (ca. 5-10ml Xylocain) wurde ein langer Metalltrokar als Führungszylinder für die Messsonde verwendet. Die Sauerstoffmessung erfolgte unter ständiger Sichtkontrolle mit Hilfe des diagnostischen Ultraschalls.

Die Messung erfolgte mit dem Eppendorf Histographen, bestehend aus einer Messsonde (Nadelelektrode), die über Kabelverbindungen die Werte an einen Rechner weiter gab. Die Nadelelektrode, welche aus einer Gold- bzw. Platinelektrode besteht, hat einen Durchmesser von 300 μ m und ist mit einer sauerstoffdurchlässigen Membran überzogen. Die Gegenelektrode (Ag/AgCl) wurde in einem Abstand von etwa 50mm von der Einstichstelle platziert. Nach Anlegen einer Polarisierungsspannung von -0,6 bis -1,0 V, kam es an der Kathode zur Reduktion von molekularem Sauerstoff und somit zu einem Stromfluss zwischen den Elektroden. Diese Strommessungen wurden durch den Histographen direkt proportional in Werte des Sauerstoffpartialdrucks umgerechnet.

Die Elektrode hat nach theoretischen Berechnungen ein halbkugelförmiges Messvolumen mit einem Durchmesser von 25 bis 50 μ m. Um größere Gewebsareale messen zu können, wurde die Messelektrode mit Hilfe eines Schrittmotors in Schritten von 0,4 bis 1,0 mm durch das Gewebe bewegt. Um Kompressionsartefakte durch die Nadel zu vermeiden, wurde automatisch nach einer Vorwärtsbewegung eine Rückwärtsbewegung um ca. 0,3 mm durchgeführt, so dass das Gewebe mechanisch entlastet werden kann. Es wurden auf diese Weise mehrere hundert pO_2 -Werte pro Messstrecke, den sogenannten Messtracks, erfasst und vom Computer zur weiteren Auswertung gespeichert. Pro Tumor erfolgten 4-6 Messtracks.

3.3 Stanzbiopsie

Über dieselbe Einstichstelle wurde eine ca. 2-4 mm dicke Nadel in die Brust vorgeschoben und durch fünf- bis sechsfaches Stanzen Gewebe entnommen. Das gewonnene Material wurde anschließend in Formalin eingelegt und in die Pathologie zur weiteren histologischen Untersuchung verschickt.

3.4 Histopathologische Aufbearbeitung

Nach Erhalt der Gewebezylinder aus der Radiologie wurde das Gewebe zur histologischen Aufbearbeitung in diverse ansteigende Alkoholreihen und schließlich in Xylol gelegt und über Nacht darin belassen. Am nächsten Tag erfolgte die Einbettung in Paraffin. Hieraus wurden Blöcke geformt und Schnittpräparate für die Mikroskopische Begutachtung angefertigt. Diese Aufarbeitung erfolgte mechanisch durch das Gerät „Hyper-Center“ der Firma Shandon. Im Anschluss wurden die routinemäßigen Untersuchungen, wie die Bestimmung von Tumorart, Grading, Rezeptorstatus Her2/neu Status, p53 und die VEGF Gewebe Expression durchgeführt.

3.5 VEGF-Messung im Tumorgewebe

3.5.1 Immunhistochemie

Die Darstellung der VEGF-Expression im Gewebe erfolgte immunhistochemisch.

Durch die Entwicklung monoklonaler Antikörper hat der Antigennachweis mit Hilfe markierter Antikörper einen enormen Aufschwung erfahren. Im Prinzip beruhen die verschiedenen Verfahren darauf, dass man zu einem Gemisch, welches das fragliche Antigen enthält, einen monoklonalen Antikörper gibt (siehe Abbildung VIII/ links) und den resultierenden Antigen-Antikörper-Komplex von der flüssigen Phase abtrennt. Anschließend wird der Komplex mit einem empfindlichen Nachweissystem identifiziert (anfügen eines Chromogens) und, falls erwünscht, quantitativ erfasst. Obwohl man hierbei den Indikator direkt an den monoklonalen Antikörper (Primärantikörper) koppeln könnte, bedient man sich bevorzugt indirekter Verfahren. Dabei werden meist polyklonale Antikörper (sekundäre Antikörper) verwendet, die den ersten Antikörper erkennen (Abbildung VIII/ rechts). Dies hat zwei Vorteile: Zum einen kann man für monoklonale Antikörper aller Spezifitäten das gleiche Indikator-Serum benutzen. Zum anderen reagieren mehrere Moleküle des sekundären Antikörpers mit einem einzigen Molekül des primären Antikörpers und führen somit zu einer Verstärkung des Signals.(22).

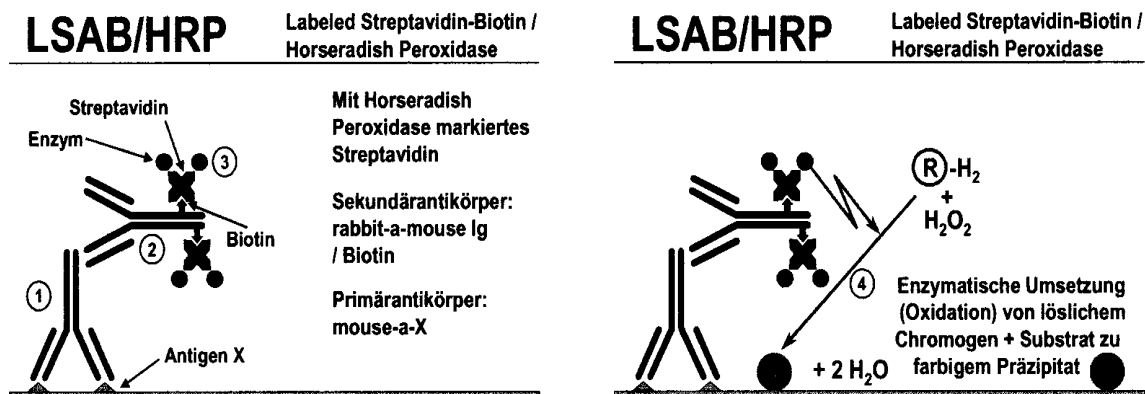


Abbildung 16 Nachweis der VEGF-Proteine(34)

3.5.2 Immunhistochemisches Verfahren zur VEGF-Messung

Die Darstellung der VEGF-Expression im Tumorgewebe erfolgte ebenfalls in unserem pathologischen Institut mit immunhistochemischen Verfahren unter Verwendung eines polyklonalen Kaninchen VEGF – Antikörpers (Anti-VEGF – Zytomed Nr. 18-0254, Zytomed GmbH, Berlin).

Die Schnittpräparate des in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Tumorgewebes wurde in üblicher Weise entparaffiniert und rehydriert.

Die Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte mit 3% H₂O₂ (10 Minuten). Durch zweimalige mikrowelleninduzierte Erhitzung auf 100 Grad Celsius und anschließender Abkühlung für 20 Minuten, erfolgte eine Demaskierung von Antigenen (Antigen-Retrieval).

Nach Inkubation in Vectastain Normalserum (20 Minuten) erfolgten die Immunschritte mit anti-VEGF (60 Minuten), anti-Rabbit Sekundärantikörper (20 Minuten) und mit Vectastain ABC Reagenz (20 Minuten). Nicht gebundener Antikörper wurde in den Zwischenschritten zwischen den Antikörperinkubationen durch Spülung der Schnittpräparate mit PBS entfernt. Die VEGF-gebundenen Antigen-Antikörperkomplexe wurden durch DAB markiert (7 Minuten), die Schnittpräparate in Hämatoxylin gegengefärbt. Alle Immunreaktionen erfolgten bei Raumtemperatur in Coverslips (Fa. Shandon).

VEGF war durch ein braunes Reaktionsprodukt markiert, die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch mit einem Mikroskop BX (Fa. Olympus).

In Anlehnung an die Literatur wurde bei einer Farbreaktion in mehr als 30% der Zellen das Gewebe als VEGF-positiv bewertet, Werte unter 30% als negativ.

3.5.3 Interpretation der Präparate

Toi et al.(63) führten eine Studie an 103 Patientinnen mit Mammakarzinom durch. Auch hier kamen immunhistochemische Verfahren zum Einsatz, um eine Evaluierung der VEGF Gewebe-Expression zu ermöglichen. Dabei wurde eine negative, moderate oder hohe Gewebe Expression bestimmt. Gunningham et al.(21) stellten in ihrer Studie zum Thema VEGF und metastasiertes Mammakarzinom zur Evaluierung der VEGF-Gewebeexpression prozentuale Abstufungen fest. Hierbei wurde bei weniger als 30% auf den benutzten Farbstoff reagierenden Zellen das Präparat als geringfügig-, bei 30-70% als mittelmäßig- und bei über 70% als starkpositiv gewertet. Hierbei wurde definiert, dass jede Ausprägung über 30% als eindeutig positiv gewertet werden kann.

In Anlehnung an die Literatur bewerteten wir bei einer farblichen Reaktion auf den Antikörper von weniger als 30% der Zellen das Gewebe als VEGF negativ. Bei allen übrigen Ergebnissen gingen wir von einer positiven VEGF-Expression aus.

Das Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie haben wir in Responder (Komplette Remission und Partial Remission) und Non Responder (Stabile Disease und Progressiv Disease) unterteilt. Somit konnten wir zwei Gruppen fassen um eine bessere Auswertung zu erreichen.

Die Daten wurden dann zur weiteren Auswertung in das onkologische Dokumentationssystem eingefügt und mit weiteren Daten verglichen.

4 Statistische Aufbearbeitung aller Daten

Wir verwendeten zur statistischen Auswertung unserer Daten den Chi- (x^2) -Quadrat Test. Dieser wird zur Überprüfung von Häufigkeitsverteilungen eingesetzt, also bei Variablen mit nominalem Skalenniveau. Die beobachteten Häufigkeiten unserer Merkmale wurden in Kreuztabellen eingetragen, und daraus eine Signifikanz errechnet.

Allgemein üblich ist es, einen p-Wert (Signifikanz Wert) von weniger als 0,05 mit „signifikant“ und von weniger als 0,01 mit „sehr signifikant“ zu bezeichnen. In einigen Fällen ist ein Wert von weniger als 0,10 darüber hinaus als „grenzwertig signifikant“ anzusehen, zumindest kann in diesen Fällen von einer Tendenz gesprochen werden.

5 Ergebnisse

5.1 Patientinnen

Die Grundgesamtheit der vorliegenden Arbeit stellen nun 192 untersuchte Patientinnen dar. Bei 92 dieser Patientinnen bestätigte sich ein primäres Mammakarzinom. Letztendlich konnten bei 85 Patientinnen Sauerstoffdruckmessungen im Gewebe vorgenommen und ausgewertet werden. Eine VEGF Gewebeexpression konnte bei 95 Patientinnen erhoben werden. Hierbei wurde 65 (72%) als VEGF-Negativ und 30 (28%) als VEGF-Positiv gewertet. Bei 51 folgte eine primär systemische Chemotherapie.

5.1.1 Altersverteilung

Der Altersmedian der Patientinnen zum Zeitpunkt der Stanzbiopsie lag bei 53 Jahren. Die jüngste Patientin erkrankte mit 29 Jahren, die älteste war 81 Jahre alt.

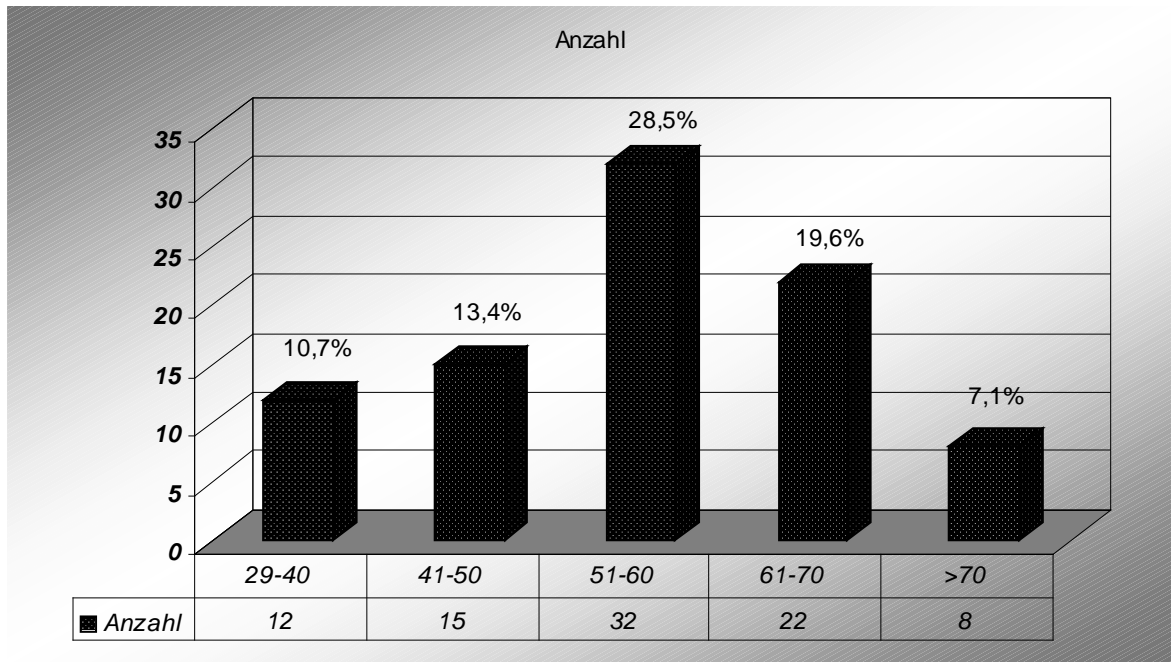


Tabelle 1 Altersverteilung

5.1.2 Verteilung nach histopathologischen Kriterien

5.1.2.1 Verteilung der Tumoren nach histopathologischen Wachstumsmuster

67 Fälle mit invasiv ductalem Mammakarzinom, 18 Sonstige Mammakarzinomtypen.

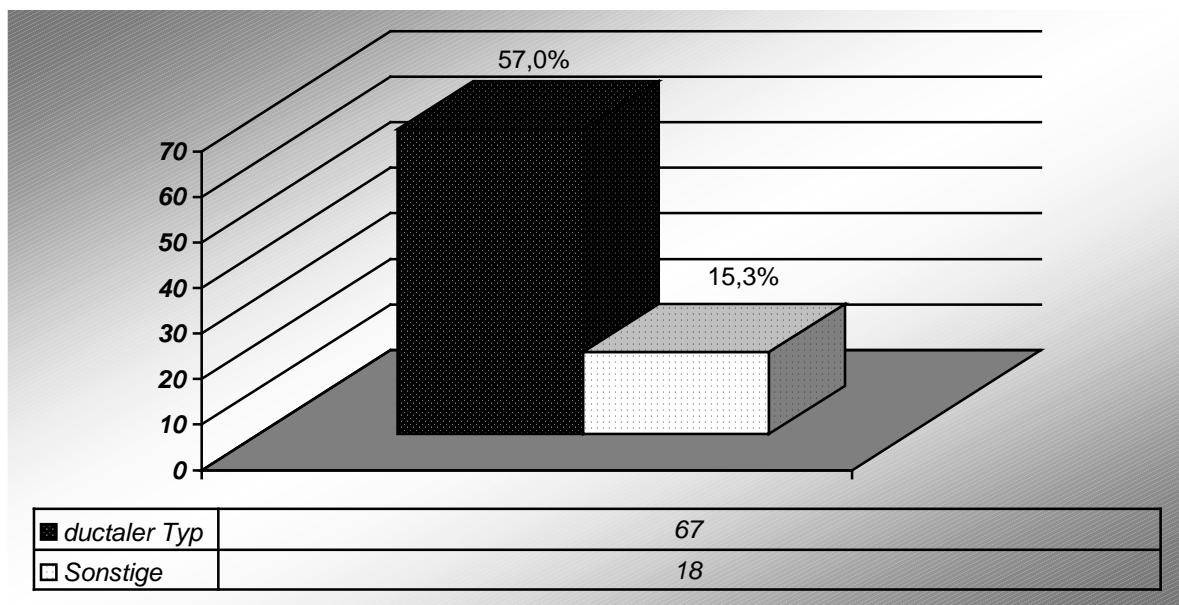


Tabelle 2 Verteilung nach Histologischen Kriterien

5.1.2.2 Verteilung der Tumoren nach Grading

Es zeigte sich bei den Grading eine nahezu gleich häufige Anzahl von G2 (38Fälle/38,0%) und G3 (34 Fälle/29,2%). G1 Tumore wurden in 14 Fällen(12,0%) nachgewiesen.

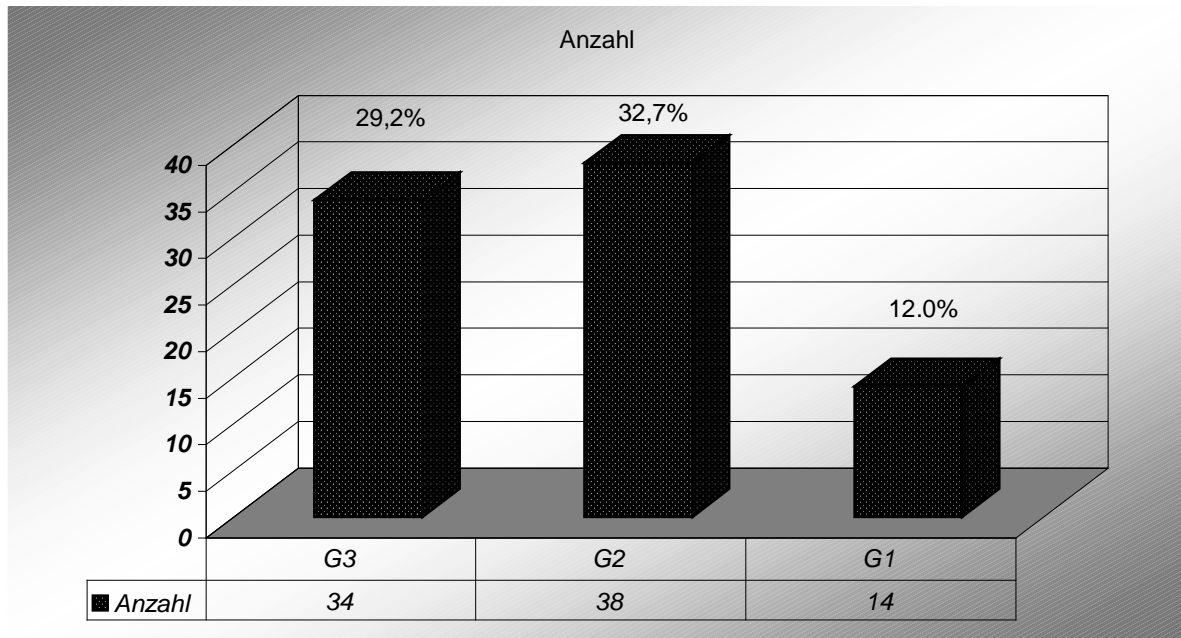


Tabelle 3 Verteilung nach Grading

5.1.2.3 Verteilung der Tumore nach Tumorgroße

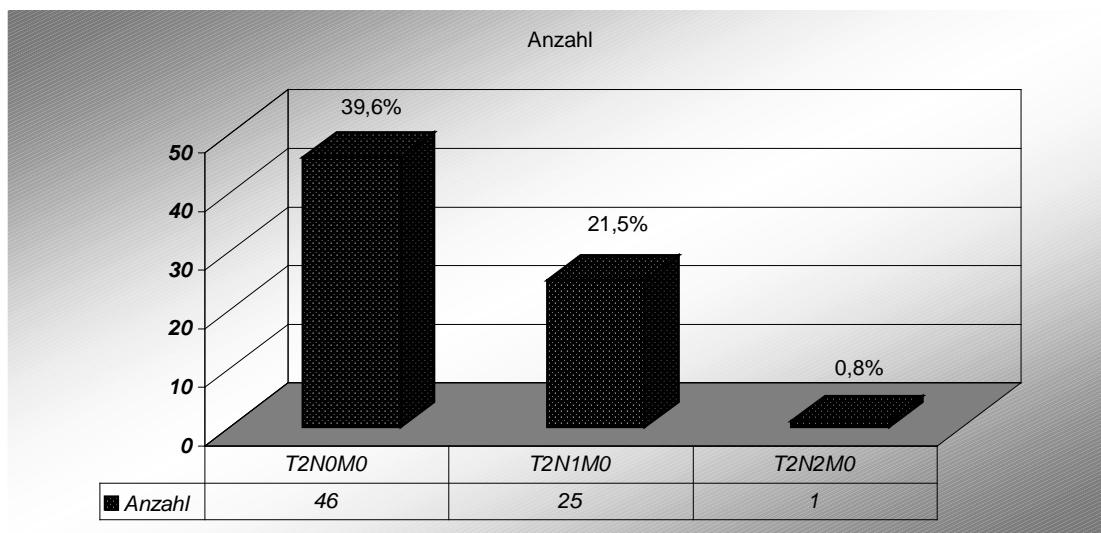


Tabelle 4 Verteilung nach Tumorgroße

5.2 VEGF im Tumorgewebe

5.2.1 VEGF und Alter der Patientinnen

Wir konnten in unseren Messungen feststellen, dass VEGF lediglich bei den über 50-jährigen mit 70,6% ($p=0,816$) vermehrt war. Ansonsten gab es keine Korrelation zwischen dem Alter der Patientin und der VEGF Gewebe Expression.

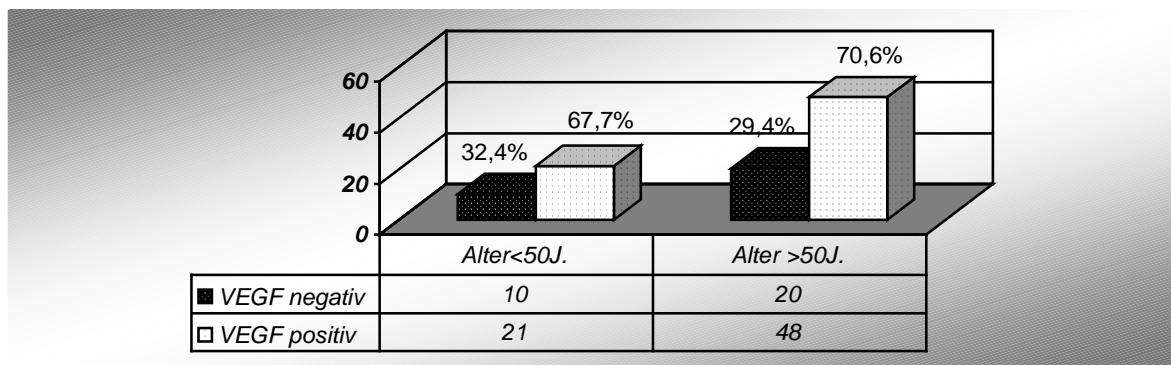


Tabelle 5 VEGF Altersverteilung

5.2.2 VEGF und Histopathologische Unterteilung

Bei den verschiedenen histologischen Subtypen beim Mammakarzinom haben wir drei Gruppen, invasiv ductal und invasiv lobulär, und zusätzlich eine Gruppe unter Sonstiges gewertet. Diese letzte Gruppe enthielt alle anderen histologischen Subtypen.

Hier konnte ebenfalls keine signifikante Korrelation zur VEGF-Ausprägung festgestellt werden. ($p=0,907$)

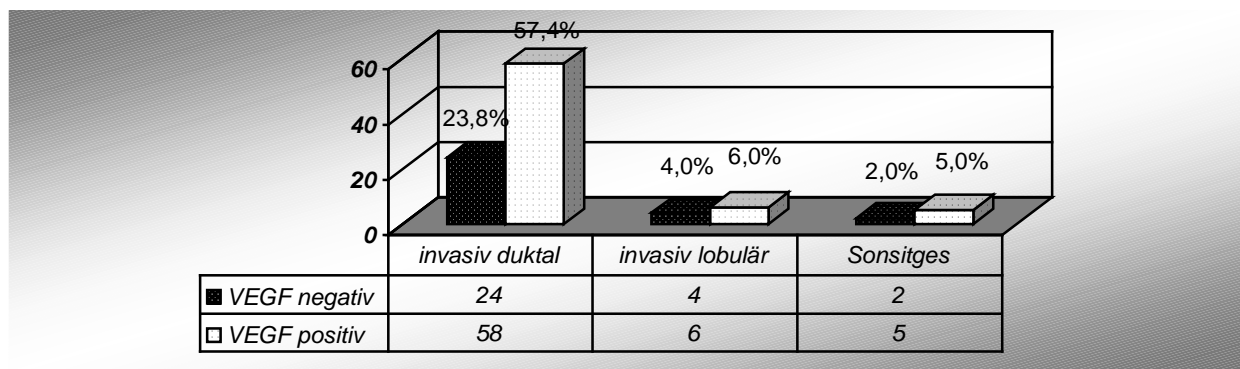


Tabelle 6 VEGF und histopathologische Unterteilung

5.2.3 VEGF und Tumorgröße

In den untersuchten Tumoren über 5cm, zeigte sich eine positive VEGF-Gewebeexpression ($p=0,496$).

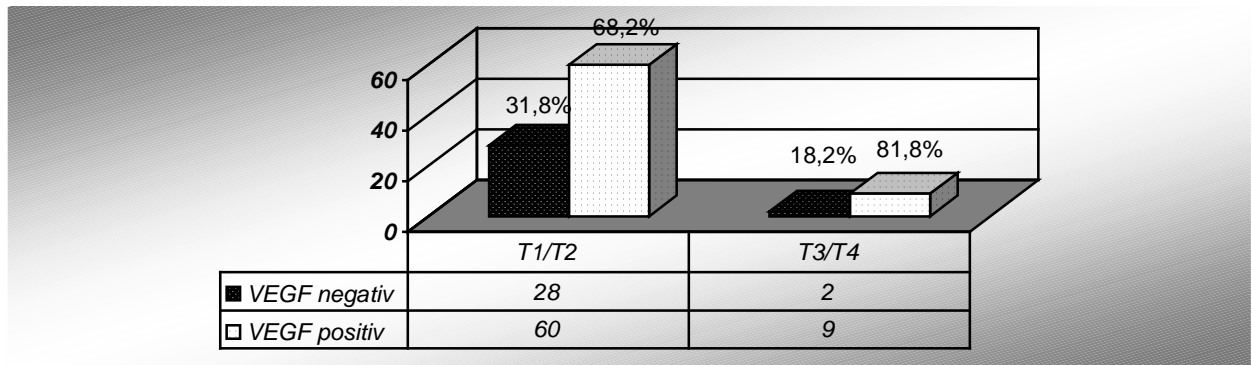


Tabelle 7 VEGF und Tumorgröße

5.2.4 VEGF und Nodalstatus

Es zeigten sich keine signifikanten Korrelationen. Sowohl die nodal-negativen als auch die nodal-positiven zeigten eine nahezu 2/3-Mehrheit der VEGF-Positivität ($p=0,276$).

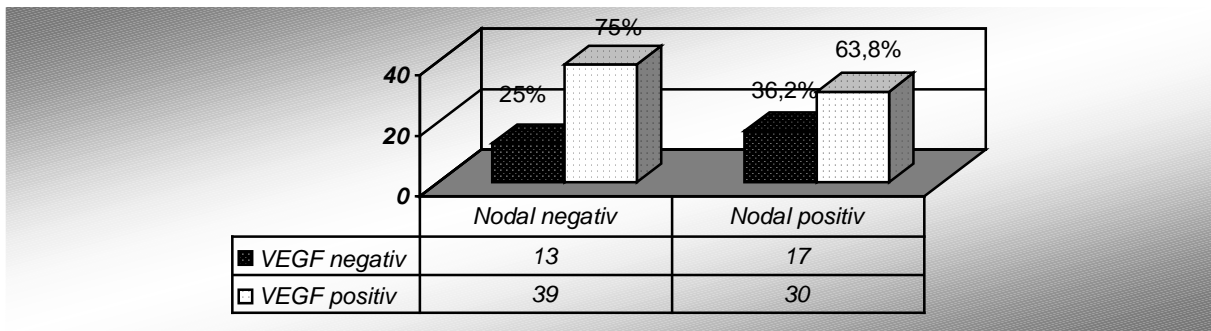


Tabelle 8 VEGF und Nodalstatus

5.2.5 VEGF und Grading

Zwischen VEGF und dem Grading bei den untersuchten Geweben konnte keine Korrelation gefunden werden ($p=0,473$). Zwar zeigten die Grading Stufen zwei und drei auch höhere Raten an VEGF-Positiven an, jedoch konnte auch hier keine statistische Signifikanz gefunden werden.

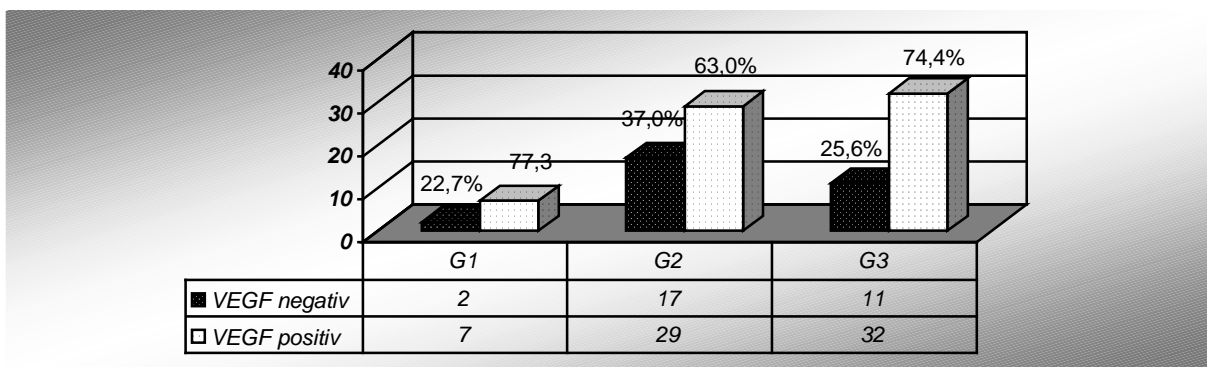


Tabelle 9 VEGF und Grading

5.2.6 VEGF und Hormonrezeptoren

Es zeigte sich bei Hormonrezeptor-Positivität eine verstärkte Ausprägung von VEGF im Gewebe (72,5%), und bei Hormonrezeptor-Negativität eine deutliche Minderausprägung des selbigen Faktors (16,7%) ($p=0,313$). Jedoch ließ sich auch hier keine statistische Signifikanz verzeichnen. Bei der Auswertung des Her2/neu Status war keine Korrelation mit der VEGF-Gewebeexpression zu verzeichnen ($p= 0,285$).

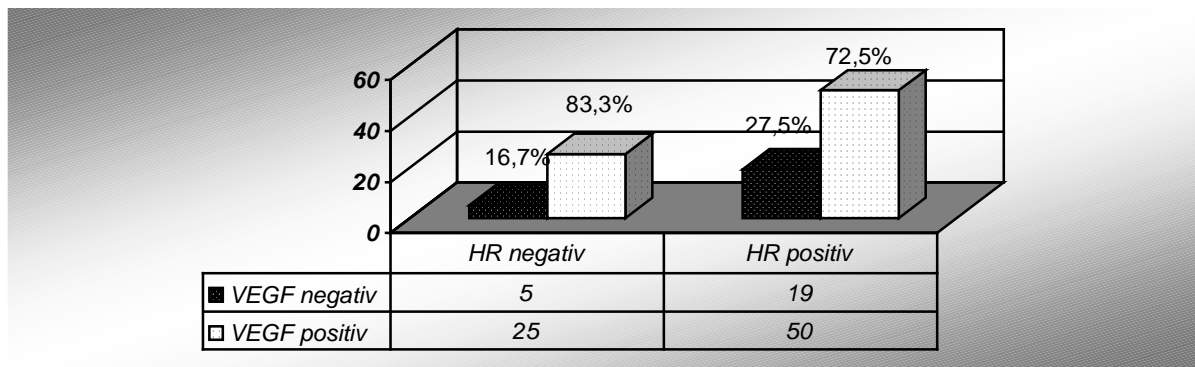


Tabelle 10 VEGF und Hormonrezeptoren

80% der VEGF-negativen Gewebe waren ebenfalls Her/2 neu negativ.

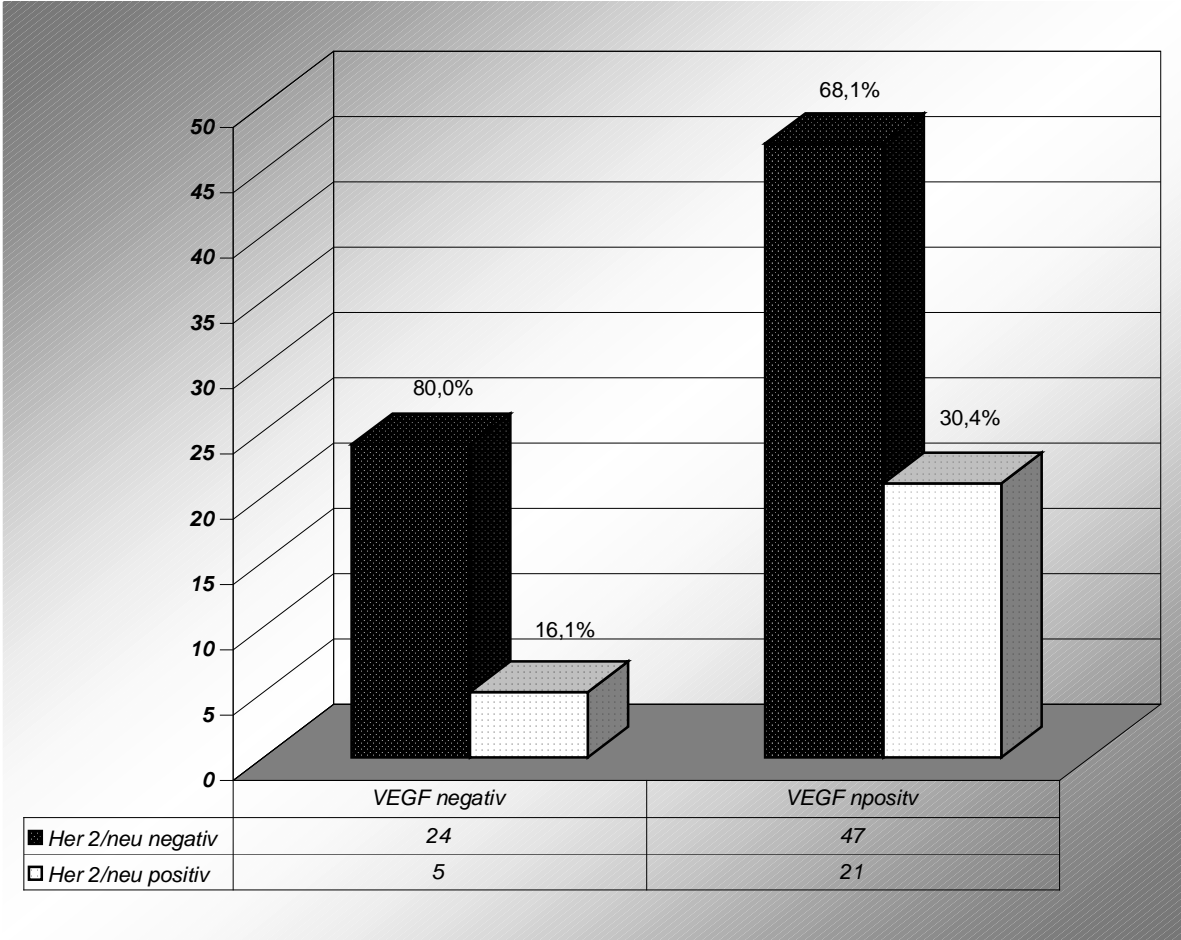


Tabelle 11 VEGF und Her2/neu

5.3 pO_2 im Tumorgewebe

5.3.1 Verteilung der pO_2 -Werte

Die gemessenen pO_2 -Werte lagen zwischen 0 und 35,2 mmHg mit einem Median von 1,7 mmHg. Der Mittelwert lag bei 5,1 mmHg \pm 8,6mmHg. Für die Berechnungen wurde der Median herangezogen. Wir haben hierbei eine Unterteilung von Anoxie zu nicht Anoxie getroffen. Jeder Wert unter 2,5mmHg wurde als anoxisch betrachtet.

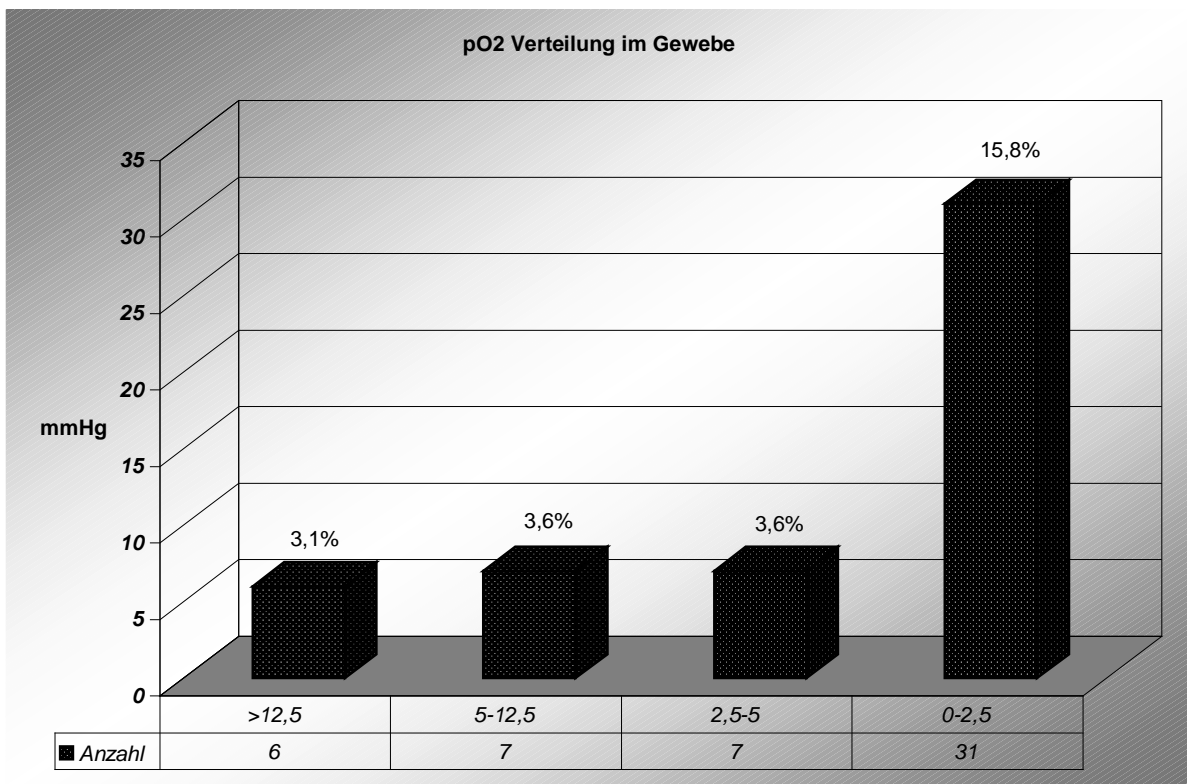


Tabelle 12 pO_2 Werteverteilung

5.3.2 Verteilung von pO₂ auf das Alter der Patienten

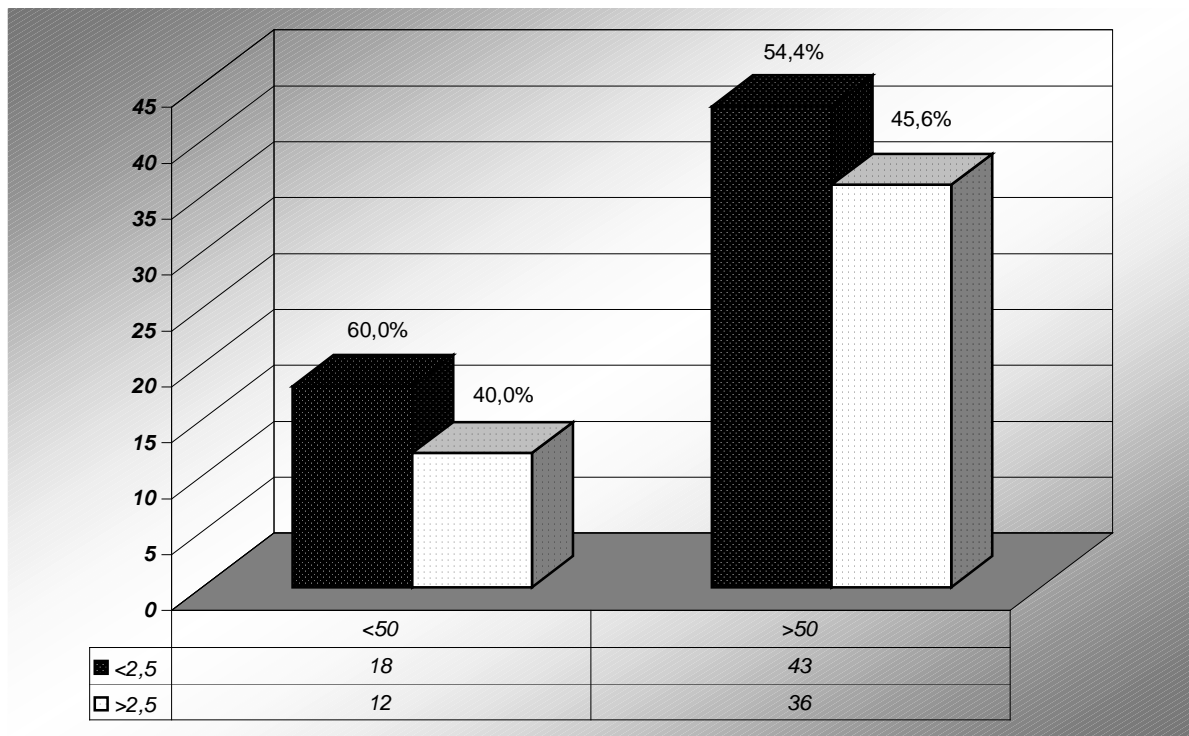


Tabelle 13 Altersverteilung im Alter

Wie aus der Tabelle Nummer 14 hervorgeht, konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem Alter der Patientin und der Gewebeoxygenierung aufgezeigt werden ($p= 0,669$).

5.3.3 pO₂ und Tumorgröße

Entsprechend der Literatur zeigten unsere Ergebnisse bei zunehmender Tumorgröße eine zunehmende Anoxie. Hier ergaben 72,70% der Messungen in Tumoren über 5cm eine Gewebeoxygenierung unter 2,5mmHg (p=0,341).

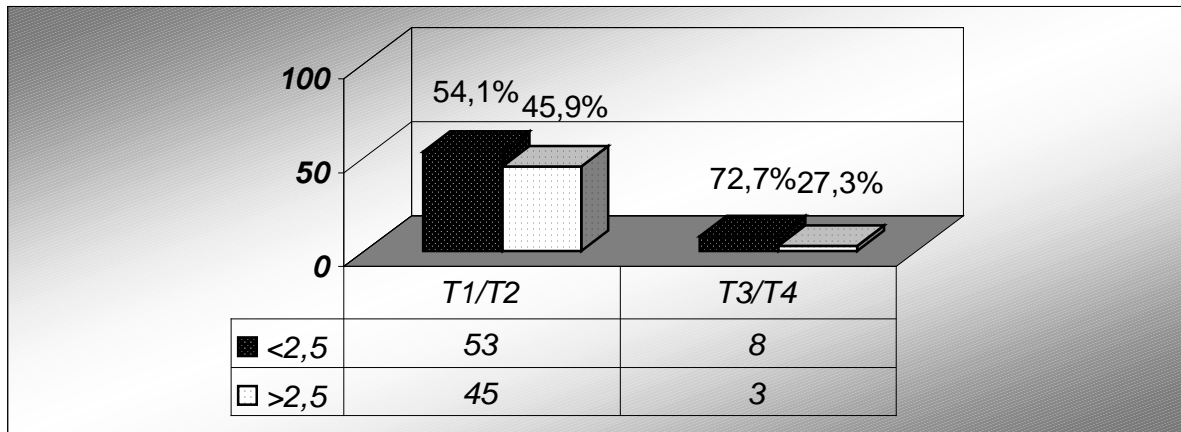


Tabelle 14 pO₂ und Tumorgröße

5.3.4 Verteilung von pO₂ auf die histologischen Typen

Wir konnten keine Signifikanz bei der Gewebeoxygenierung der unterschiedlichen Formen der untersuchten Mammakarzinome feststellen (p=0,939).

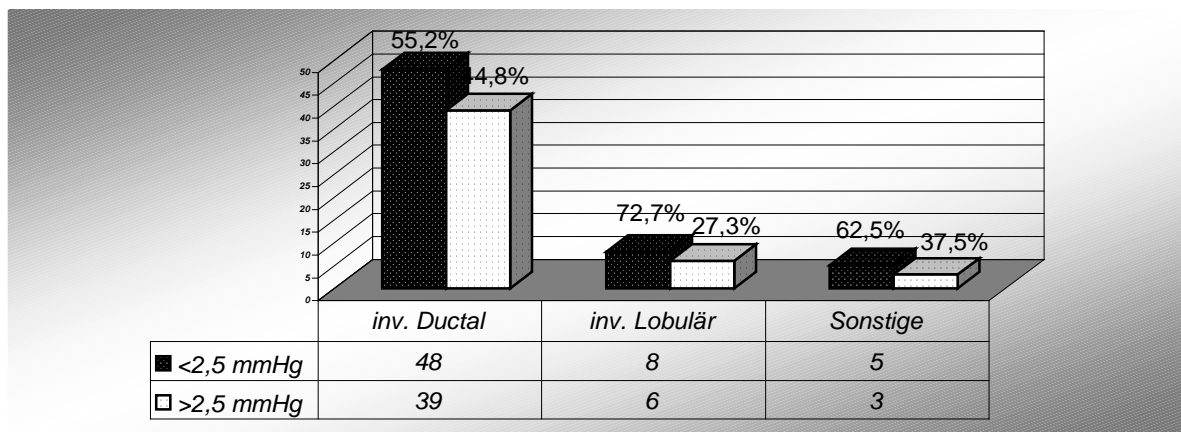


Tabelle 15 pO₂ und histopathologische Verteilung

5.3.5 Verteilung von pO₂ und Grading

Ein Grading von 3 wurde in 67,5% der untersuchten Fälle mit Anoxie beobachtet. Somit liess sich eine statistisch relevante Signifikanz ($p=0,049$) zwischen dem Tumorgrading und der Gewebeoxygenierung feststellen..

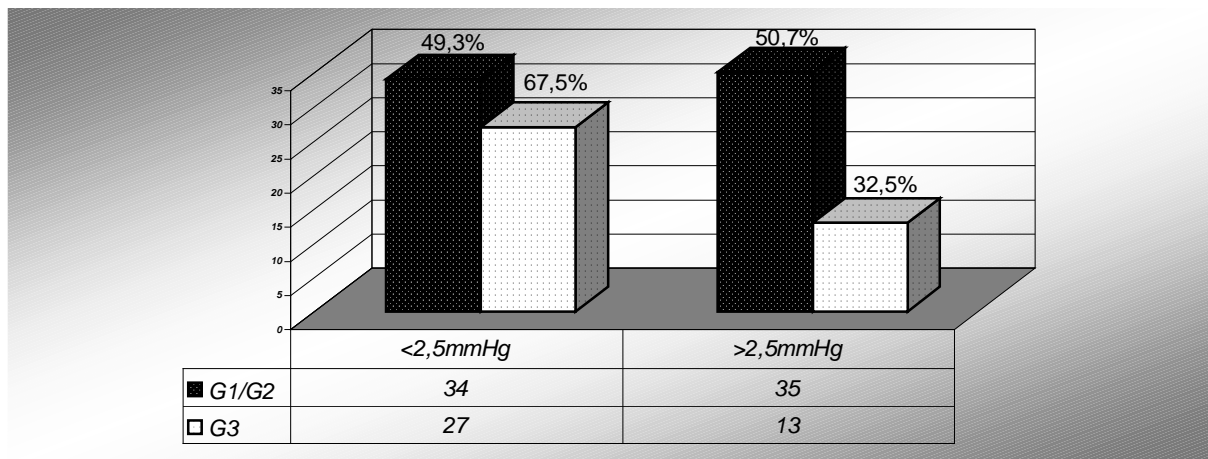


Tabelle 16 pO₂ und Grading

5.3.6 PO₂ und Hormonrezeptorstatus

Bei der Untersuchung des Hormonrezeptorstatus und der Gewebeoxygenierung konnte in über 69% der Hormonrezeptor negativen Tumore eine Anoxie nachgewiesen werden. Wohingegen sich die Hormonrezeptor positiven Gewebe fast gleichmäßig verteilen ($p=0,162$).

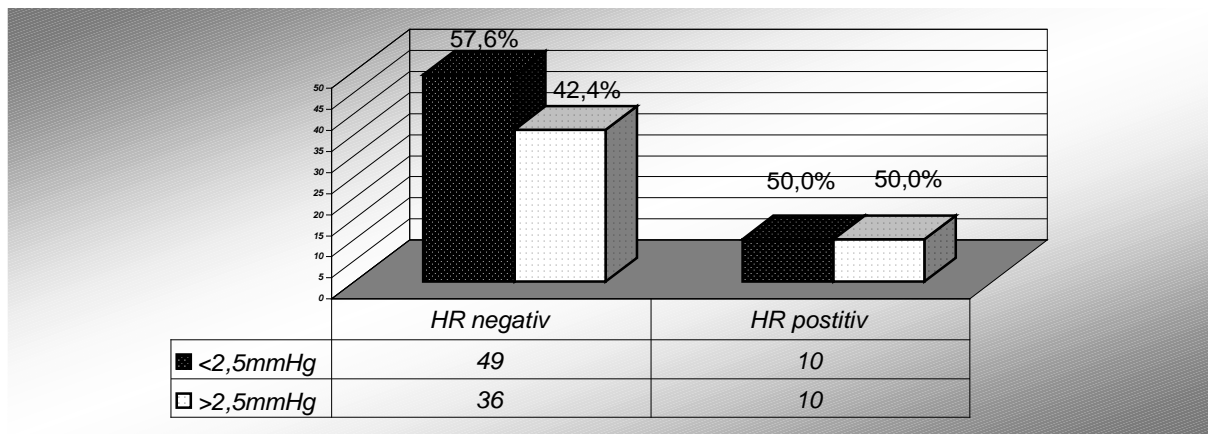


Tabelle 17 pO₂ und Hormonrezeptorstatus

Bei dem Her2/neu Status zeigte sich bei den Geweben mit fehlender Rezeptorenausprägung mit 57,6% ein leichtes Übergewicht für die Anoxie. Hier bestand keine signifikante Korrelation ($p=0,813$).

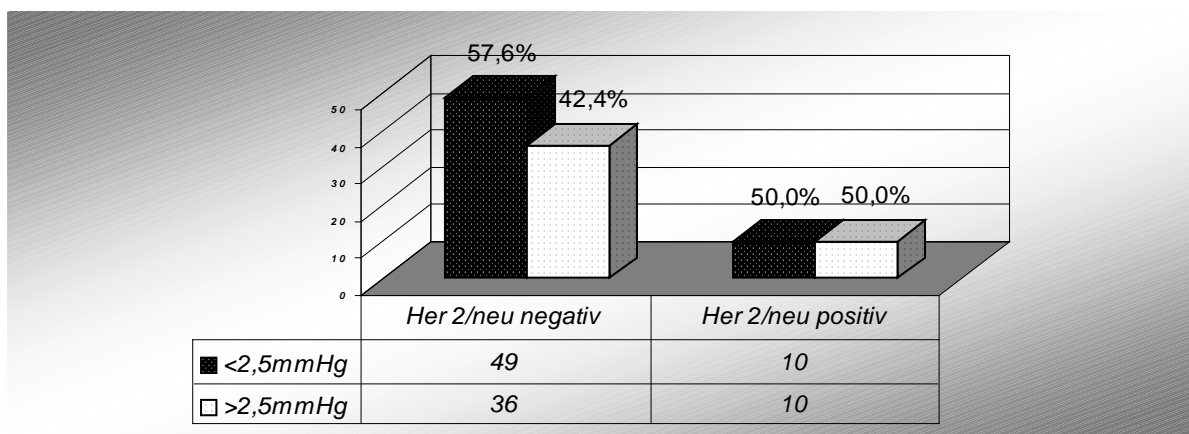


Tabelle 18 pO₂ und Her2/neu

5.4 VEGF und Gewebeoxygenierung

Bei den insgesamt untersuchten 77 Patientinnen konnten bei 51 Patientinnen (65,4%/ p=0,332) eine Anoxie und eine negative VEGF Gewebeexpression nachgewiesen werden (s.h. Tabelle 19). Obwohl hier keine statische Signifikanz besteht fällt doch auf, dass bei den VEGF-positiven Geweben eine nahezu ausgeglichene Verteilung zwischen anoxischen und Geweben über 2,5mmHg besteht.

		PO2		Gesamt
		<=2,5	>2,5	
VEGF	Negativ	17	9	26
		65,4%	34,6%	
	Positiv	26	25	51
		51%	49%	

Tabelle 19 VEGF und Gewebeoxygenierung

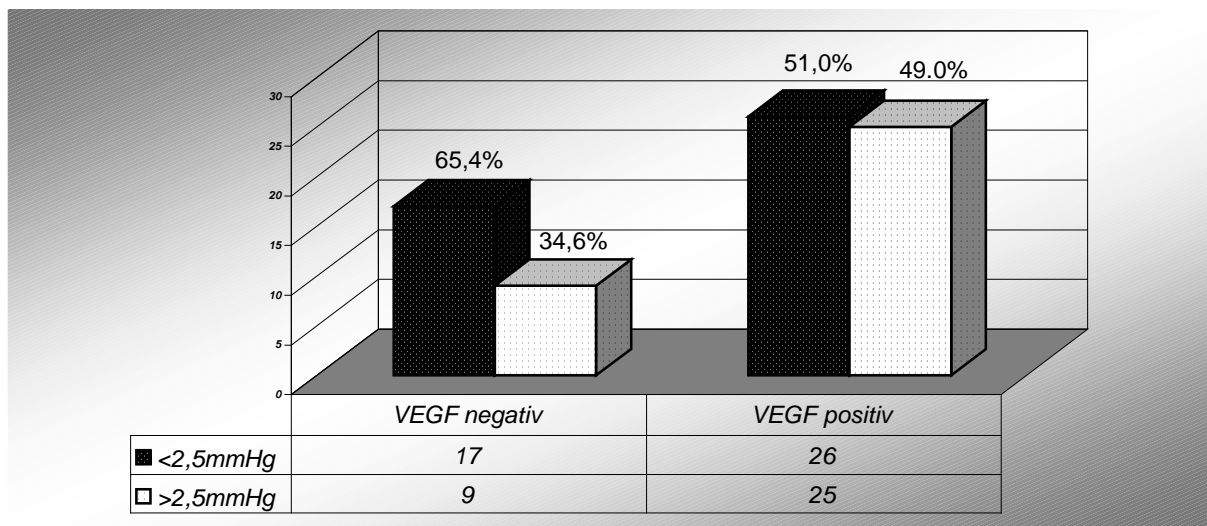


Abbildung 20 VEGF und pO2

5.5 VEGF und Ansprechen auf primär systemische Therapie

Hier ergab sich keine Korrelation zwischen der VEGF-Expression und dem Verlauf.
(p=1,000)

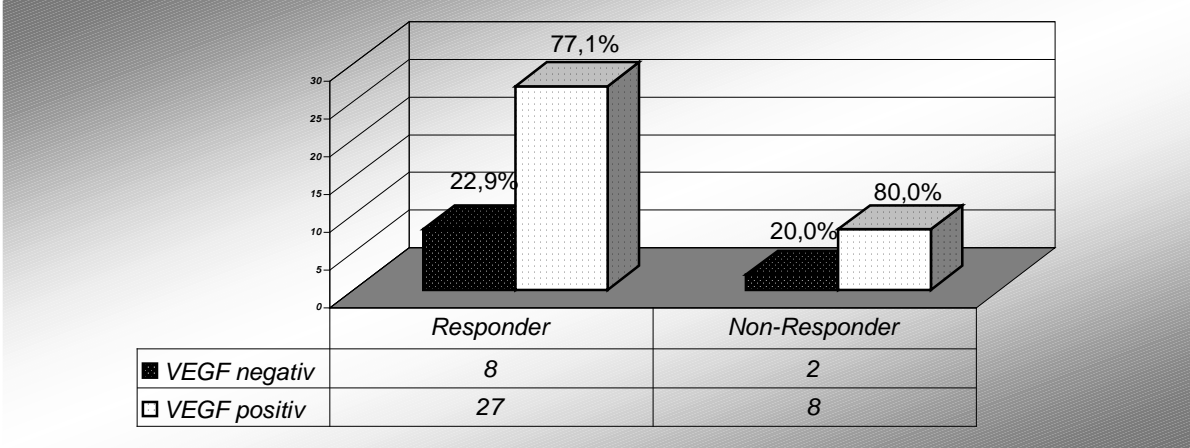


Tabelle 19 VEGF und primär systemische Therapie

5.6 pO₂ und Ansprechen auf primär systemische Therapie

Es zeigte sich in der Anoxie eine gleichmäßige Verteilung der Responder bzw. Non-Responder. Lediglich in der Nicht Anoxie konnte ein leichtes Übergewicht auf der Seite der Non-Responder mit 61,8% verzeichnet werden.(p=0,754)

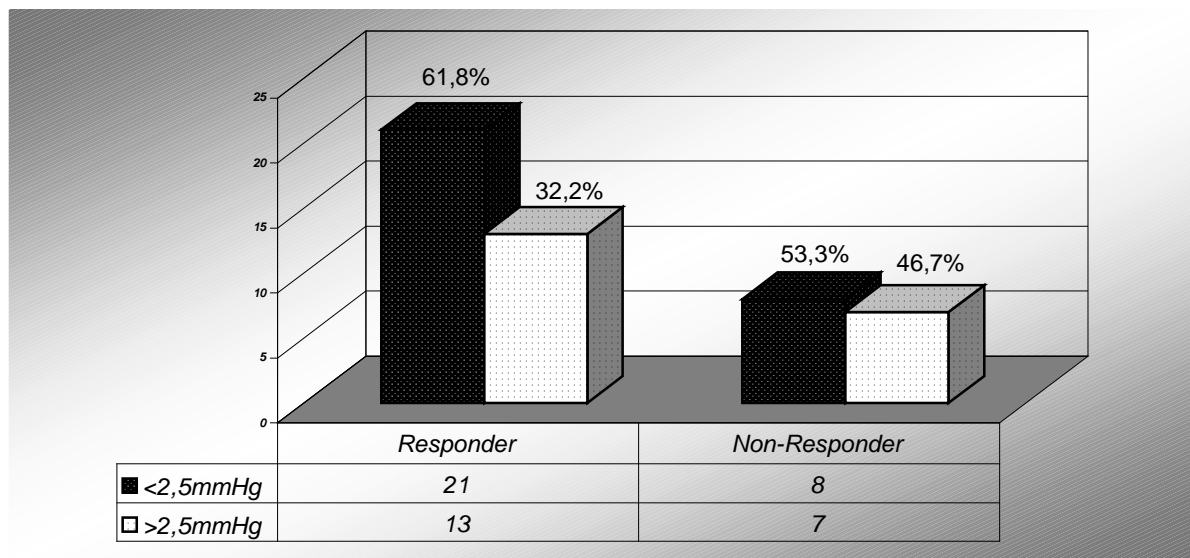


Tabelle 20 pO₂ und primär systemische Therapie

Der Aktuelle Stand der Wissenschaft beschreibt den Nodalstatus als wichtigsten prognostischen Faktor für das Mammakarzinom (level of evidenz (LOE) 1). Beim Vergleich unserer Daten von VEGF und dem Nodalstatus konnte eine signifikante Korrelation zwischen nodal-positiven Ergebnissen und anoxischem Gewebe festgestellt werden. 67,9% aller nodal-positiven Patienten hatten eine gemessene Tumor-Anoxie von unter 2,5mmHg.(p=0,02)

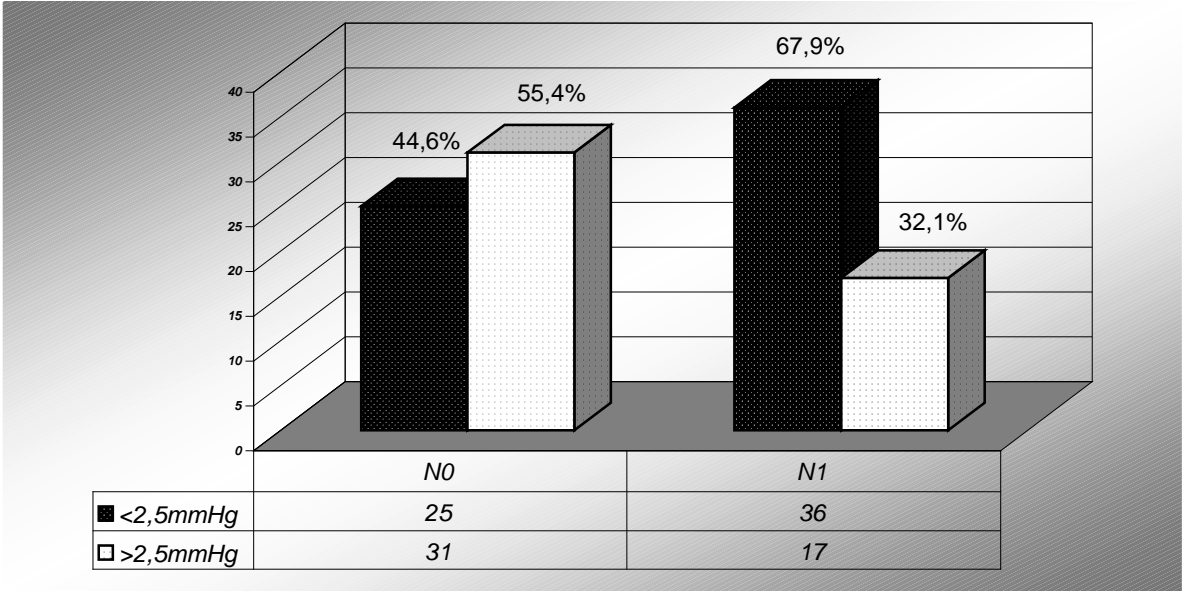


Tabelle 21 pO₂ und Nodalstatus

6 Diskussion

Im Rahmen des zwischen der Frauenklinik vom Roten Kreuz und der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München durchgeführten Kooperationsprojektes zur Untersuchung der prädiktiven Bedeutung des intratumoralen Sauerstoffpartialdruckes in primären Mammakarzinomen auf das Ansprechen auf primär systemische Chemotherapie, war es das Ziel dieser Arbeit, den Zusammenhang zwischen der VEGF-Gewebeexpression und der Tumoroxygenierung klinisch zu untersuchen. Die Rationale hierfür liefern Ergebnissen der Grundlagenforschung, die auf molekularer Ebene einen engen Zusammenhang zwischen dem durch Hypoxie exprimierten HIF-1 und der VEGF-Expression nachweisen konnten(6,10,44).

Ein typisches Charakteristikum des Mammakarzinoms ist, wie bei anderen soliden Tumoren auch, die Neovaskularisation. Diese stellt die Möglichkeit des Gewebes dar, sich auf hypoxische Situationen einstellen zu können. Die Hypoxie zeigt sich vornehmlich beim schnellen Tumorwachstum, der Tumordinvasion und der Tumormetastasierung. Alles samt Kriterien der Malignität.

Huang Zong et al.(28) konnten in einer 179 Patienten umfassenden Studie aufzeigen, dass eine HIF-Überexpression in malignen humanen Tumoren im Vergleich zum normalen Gewebe statistisch signifikant vermehrt vorhanden ist. Im Speziellen gab es bei benignen Mammatumoren keine Überexpression, wohingegen bei 29 % der untersuchten primären Mammakarzinome eine HIF -1 Überexpression nachweisbar war. In Metastasen von Mammakarzinomen ließ sich hingegen zu über 69% eine HIF-Überexpression nachweisen. Diese Daten weisen auf eine mögliche klinische Bedeutung von VEGF in der Onkologie hin. Da Zong et al. folgern, dass HIF-1 bereits sehr früh in der Karzinogenese nachweisbar ist, kann angenommen werden, dass sich dies auch in einer vermehrten VEGF-Gewebeexpression bei Tumorphypoxie klinisch nachweisen lassen müsste.

Dass die VEGF-Gewebeexpression im Tumorgewebe eine wichtige Rolle bei der Prognoseentstehung spielt, zeigten Toi et al.(63) an einem Patientenkollektiv von 103 Patienten mit primärem Mammakarzinom. Hier konnte gezeigt werden, dass VEGF-positive Patienten ein deutlich kürzeres Rezidivfreiesintervall aufzeigten als die Patienten mit einer

negativen VEGF-Gewebeexpression. ($p=0,01$). In einer Folgestudie wurden die Ergebnisse durch die selben Autoren erneut bestätigt(61,62). Hierbei wurde die prognostische Bedeutung von VEGF in 230 Patienten mit nodal-negativem und nodal-positivem Status nachgewiesen. Jedoch konnte in einer multifaktoriellen Untersuchung unter Berücksichtigung von Vascularisation, Nodalstatus und VEGF-Expression kein statistisch Signifikanz Wert festgestellt werden.

Die retrospektiven Studien, die eine prognostische Bedeutung des VEGF-Proteins untersucht hatten, konnten allesamt aufzeigen, dass Brustkrebs ein Angiogeneseabhängiger Tumor ist(42). Obwohl die bekannten prospektiven Studien die anerkannten Angiogenese-Faktoren nicht systematisch verglichen haben, wird allgemein unterstellt, dass VEGF eine bedeutende Rolle in der Entwicklung des Mammakarzinoms hat. Das VEGF wurde durch verschiedenste Techniken bestimmt und nach verschiedenen Mustern interpretiert. Wir haben nach gängigen immunhistochemischen Maßnahmen das VEGF bestimmt. Auch sie führten immunhistochemische Verfahren durch, um eine Evaluierung der VEGF-Gewebeexpression zu ermöglichen. Toi et al. bestimmten eine negative, moderate oder hohe Gewebeexpression. Gunningham et al.(21) stellten in ihrer Studie zum Thema VEGF und metastasiertes Mammakarzinom zur Evaluierung der VEGF-Gewebeexpression prozentuale Abstufungen fest. Hierbei wurde bei weniger als 30% auf den benutzten Farbstoff reagierenden Zellen das Präparat als geringfügig-, bei 30-70% als mittelmäßig- und bei über 70% als starkpositiv gewertet. Hierbei wurde definiert, dass jede Ausprägung über 30% als eindeutig positiv gewertet werden kann.

In Anlehnung an die Literatur bewerteten wir bei einer farblichen Reaktion auf den Antikörper von weniger als 30% der Zellen das Gewebe als VEGF-negativ. Bei allen übrigen Ergebnissen gingen wir von einer positiven VEGF-Expression aus. Hierbei konnten wir 28 (26,9%) VEGF-Positive und 68 (65,3%) VEGF-Negative Gewebe evaluieren. Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse differieren deutlich. So beschreibt Linderholm et al.(35) in seiner 656 Patientinnen umfassenden Studie die VEGF-Positiven Gewebe in 22% und die VEGF-Negativen Gewebe in 9 Prozent der Fälle. Hieraus wird ersichtlich welchen Einfluss Patientenkollektiv, Messmethodik und Auswertung auf das Ergebnis zu haben scheinen.

Eine besondere Rolle in der Therapie des Mammakarzinoms nimmt die primär systemische Chemotherapie ein. Sie bietet dem Therapeuten die Möglichkeit, die Wirksamkeit der verabreichten Substanzen direkt am klinischen Ansprechen zu evaluieren. Aus

tumorbiologischer Sicht stellt die primär systemische Therapie ebenfalls ein vielversprechendes Verfahren dar. Um das Auftreten Zytostatika-resistenter Zellklone in einer wachsenden Tumorzellpopulation zu begrenzen, erscheint eine frühestmögliche Zerstörung vorhandener Tumorzellen durch eine präoperative Systemtherapie sinnvoll. Klinische Studien (z.B. NSABP) konnten belegen, dass sich die chemotherapeutische Behandlung vor der operativen Sanierung eines Karzinoms auf das Überleben positiv auswirkte(70). Anhand des Tumoransprechens kann die Effektivität der Chemotherapie im Sinne eines „In-vivo-Chemo-Sensitivitäts-Test“ beurteilt werden(4,23,30,47).

Aufgrund einer veränderten und gestörten Mikrozirkulation, weisen viele Mammakarzinome hypoxische Areale innerhalb des Tumors auf. Die medianen pO_2 -Werte, die bislang nur an kleinen Patientenkollektiven mit primären Mammakarzinomen ermittelt wurden, liegen dementsprechend deutlich unter denen von normalem Mammagewebe.(65,67).

Vaupel et al.(69) zeigten an Patientinnen mit Mammakarzinom im T1b bis T4, dass der mediane pO_2 im Tumorgewebe 28mmHg betrug und im gesunden Gewebe bei 65mmHg lag. Es fand sich ein Anteil von 40% anoxischen Tumoren, die definiert waren durch einen medianen pO_2 von unter 2,5 mmHg(69). Im unveränderten Brustdrüsengewebe wurden Werte unter 12,5mmHg nicht nachgewiesen(65).

In den von uns durchgeführten Messungen waren jedoch 56% der gemessenen pO_2 -Werte unter oder gleich 2,5mmHg.

Die Unterschiede der gemessenen Tumoroxygenierung zwischen den in der Literatur beschriebenen und unseren pO_2 -Messwerten, ergaben sich, ähnlich wie bei der VEGF-Messung, nebst dem Patientenkollektiv am ehesten durch eine von Raab und Auer veränderte Methodik der Sauerstoffmessung. Um einen genaueren Wert mitten aus dem Tumor zu erlangen, haben Raab und Auer zusätzlich zu der bei Vaupel beschriebenen Sonokontrolle zur Tumorkontrolle noch weitere Sonokontrollen zur Verifizierung der Nadelposition durchgeführt. Diese sollten die Treffgenauigkeit in den Tumor erhöhen und dokumentieren. Ein weiterer Unterschied ergab sich in der Wahl des Materials beim Trokar. Hier wurde bei uns ein Metall-Trokar verwendet, wohingegen bei Vaupel et al. ein Plastik-Trokar zum Einsatz kam.

Die weiteren Unterschiede ergaben sich aus dem bereits erwähnten Patientenkollektiv. In der von uns durchgeführten Studie wurden vornehmlich T₂-Tumore rekrutiert. Diese Patienten wurden ohne chirurgische oder systemische Vorbehandlung untersucht. Hierbei konnte eine

Patientenzahl von über 100 erreicht werden, während bei Vaupel et al. Kollektivstärken zwischen 5 und 32 Patientinnen(69) untersucht wurden.

Ein weiterer Grund für die abweichenden Ergebnisse ist, dass es sich bei der in der Literatur(24,67) beschriebenen Karzinome oft um Plattenepithelkarzinome handelt. Was die Übertragung der Ergebnisse auf das Mammakarzinom zusätzlich erschwert.

Daten zum Thema Prognosefähigkeit von Gewebeoxygenierung bei der primär systemischen Therapie sind noch nicht in standardisierten Studien untersucht worden. Dass die Gewebeoxygenierung auf eine durchgeführte Therapie Einfluss nehmen kann, ist spätestens seit den veröffentlichten Daten von Höckel et al.(24,66) bekannt. Hier wurde bewiesen, dass hypoxische Tumoren auf die Strahlentherapie schlechter ansprechen. Ursache dafür ist der strahlenbiologische Mechanismus. Aufgrund der Hypoxie steigt die Strahlenresistenz der Tumore. So war das 3 Jahre rezidivfreie Überleben für bestrahlte Patientinnen mit einem medianen $pO_2 > 10$ mmHg mit 75% gegenüber 40% für Patientinnen mit einem medianen $pO_2 < 10$ mmHg statistisch signifikant besser(32).

Eine erhöhte Therapieresistenz von hypoxischen Mammakarzinomen auf Chemotherapien und Antihormonellen Therapien wurde in der Literatur immer wieder vermutet(33,53,72). Die bisherigen Daten stützen sich auf tierexperimentelle Untersuchungen oder betreffen wie zum Beispiel bei JM Brown et al.(8) die Grundlagenforschung.

Um in Zukunft eine wahre Bedeutung der Prognosefähigkeit des VEGF zu erhalten, wird es nötig sein, prospektive Studien anhand vergleichbarer und standardisierter Verfahren durchzuführen. Deshalb ist die Bestimmung der VEGF-Gewebeexpression im Moment eine vielversprechende, aber rein akademische Vorgehensweise, die noch keinen Platz im klinischen Alltag finden wird.

In den meisten Studien korreliert VEGF nicht mit den konventionellen Prognose-Faktoren.

Linderholm und Kollegen(36,38,41) haben die zytosolische VEGF-Konzentration bei 525 nodal-negativen Patientinnen mit primären Mammakarzinom bestimmt. Die Anwesenheit von VEGF war positiv vergesellschaftet mit Tumorgröße, histologischem Grad und umgekehrt proportional zum positiven Östrogenrezeptorstatus. Erhöhte Werte des VEGF korrelierten mit geringeren Überlebensraten. In deren multivarianten Analyse konnte gezeigt werden, dass VEGF und der histologische Grad unabhängige Prognosefaktoren sind, während die Östrogenrezeptordichte nur geringe Korrelation zur Überlebensrate zeigte.

In unseren Messungen beobachteten wir beim Vergleich von anerkannten Prognosefaktoren wie den Lymphknotenstaus bei 52 nodal-negativen Patientinnen, davon waren 39 VEGF-positiv und 13 VEGF-negativ, keine statistisch relevante Korrelation ($p= 0,276$). Beim Vergleich von VEGF und Grading konnten wir bei 98 Patientinnen, wovon 55 (56,1%) G1 oder G2 waren und 43 (43,9%) G3, keine statistische Korrelation beobachten.

Gasparini und Kollegen(18) untersuchten in einer 301 Patientinnen umfassenden prospektiven Studie die prognostische Aussagekraft von VEGF und Tyrosinphosphorylase. Das Patientenkollektiv rekrutierte sich ausschließlich aus nodal-positiven primären Mammakarzinomen, die adjuvant mit dem CMF-Schema oder antihormonell mit Tamoxifen behandelt wurden. Beide wurden mit einem medianen Follow-up von 72 Monaten nachbeobachtet. Hierbei zeigte sich in der CMF-Gruppe eine signifikante Korrelation zwischen VEGF-Positivität und kürzeren Rezidivintervallen als auch schlechteren Gesamtüberlebensraten. In der Tamoxifen-Gruppe konnte VEGF und die Anzahl der befallenen Lymphknoten als prognostischer Faktor für das rezidivfreie Intervall gewertet werden.

In der Literatur finden sich weitere Hinweise auf die prognostische Aussagekraft von VEGF beim Mammakarzinom, so bei Linderholm und Kollegen(37). Hier wurden in einer 833 Patienten umfassenden Studie nodal-positive und nodal-negative Patientinnen mit adjuvanter Chemotherapie nach dem CMF-Schema oder antihormonell mit Tamoxifen über 2 bzw. 5 Jahre behandelt und in einem medianen Follow-up von 56 Monaten beobachtet. Hierbei zeigte sich VEGF als prognostischer Faktor für das rezidivfreie Intervall und das Gesamtüberleben.

Aber hier ließ sich nur ein Trend ($p=0,08$) erreichen.

Ähnlich wie bei unseren Ergebnissen zeigte VEGF keine statistische Relevanz mit den anerkannten Prognosefaktoren Östrogen-Rezeptorstatus, positiver Nodalstatus und Tumorgröße.

Wir bestimmten das Ansprechen auf die primär systemische Therapie aufgrund der zeitlichen Nähe zwischen Chemotherapie und Operation mit der Reduktion des Tumorgröße. Das Ansprechen haben wir in Responder (Complettemission und partial Remission) und Non-Responder (Stabel Disease und Progressiv Disease) unterteilt. Hierbei ergab sich keine Korrelation zwischen der VEGF-Expression und dem Verlauf. Natürlich gelten auch hier die Schwierigkeiten bei der Übertragung auf die in der Literatur veröffentlichten Daten, da diese sich auf die adjuvante Situation beziehen.

In der Literatur ist die wichtige Rolle des VEGFs für die Tumorangiogenese bereits beschrieben. Durch das Absinken des Gewebesauerstoffpartialdrucks kommt es über die Aktivierung des Hif-1 zur Überexpression der VEGF m-RNA. Da in Tumorzellen die VEGF mRNA konstant erhöht ist, führten bereits Marxsen et al. (43) Untersuchungen am Tumorgewebe durch. Hierbei zeigte sich eine VEGF Gewebeexpression Erhöhung sowohl in primär normooxischen Geweben, welche im Laufe der Versuchsanordnung in ein hypoxisches Milieu gehalten wurden, als auch für primär hypoxische Gewebe.

Wir führten am primären, unbehandelten Mammakarzinom-Gewebe Sauerstoff- und VEGF-Messungen gleichermaßen durch. Unsere Ergebnisse ergaben ein gemeinsames Auftreten von VEGF-negativen- und hypoxischen Gewebe in 65,4% (17Fälle) der Fälle. Eine positive VEGF-Gewebeexpression und ein hypoxisches Gewebe konnten wir in 51% der Fälle nachweisen. Somit ließ sich keine statistischen Relevanz ($p=0,332$) zwischen diesen beiden Parametern bestätigen. Hier bestätigen sich erneut die Gründe für mögliche Diskrepanzen zwischen den Angaben in der Literatur und den von uns gewonnenen Ergebnissen, wie im vorangegangenen Teil der Diskussion bereits erläutert.

6.1 Bewertung und Ausblick

Genauso wie in den meisten in der Literatur beschriebenen Studien sehen auch wir keine Korrelation zwischen VEGF und den anerkannten Prognosefaktoren. Obwohl die Ergebnisse in der Grundlagenforschung einen Zusammenhang zwischen VEGF und schlechterer Prognose erwarten lassen würden, konnten wir dies mit unseren Daten nicht belegen. Auch der Vergleich zwischen VEGF und der Gewebeoxygenierung ergab keine statistisch relevanten Daten.

Es besteht die Notwendigkeit weiterer, groß angelegter prospektiver Studien zur Überprüfung einer möglichen klinischen Relevanz von VEGF und pO_2 im Gewebe. Aufgrund der fehlenden standardisierten Vorgehensweisen ist eine Interpretation veröffentlichter Daten nur bedingt möglich. Auch die Standards bei der pO_2 -Messung und der Evaluierung der immunhistochemischen Ergebnisse bei der VEGF-Bestimmung müssen noch weiter vorangetrieben werden.

Dennoch handelt es sich hierbei um die erste Studie die Gewebeoxygenierung und VEGF-Expression in der primär systemischen Therapiesituation prospektiv untersucht. Zum ersten Mal wurde ein derart homogenes Patientenkollektiv mit zu über 80% T2-Tumoren prospektiv untersucht.

Es fällt auf, dass die Ergebnisse sich mit den in der Literatur veröffentlichten Daten vereinbaren lassen, obwohl diese sich auf adjuvante Therapieansätze stützen.

Die weitere Verfeinerung von Untersuchungsergebnissen und -methoden werden in Zukunft eine große klinische Relevanz für Therapieansätze haben. So könnte eine Übertherapie mit Chemotherapie vermieden werden, indem man die prädiktive Bedeutung von VEGF für die angestrebte Therapie weiter steigert. Auch stellt eine in diversen Studien bereits in Tierexperimenten erprobte Anti-VEGF (z.b. SU5416) Therapie zur Unterbindung der Neoangiogenese im Tumorbett einen interessanten weiteren Therapieansatz dar.

Zur Fortführung der Anti-VEGF-Therapiestudien der Phasen I/II/III muss ein passender Surrogatmarker zur Angiogenesefähigkeit des Tumors bestimmt werden. Auch zu diesem Zweck ist die weitere Standardisierung der VEGF-Bestimmung und Evaluierung sinnvoll.

Wir werden das von uns untersuchte Patientenkollektiv weiter beobachten, um weitere prognostische Bedeutungen von pO₂ bzw. VEGF zu dokumentieren. Auch wird es in unserem weiteren Interesse sein, die von uns angewandten Mess- und Evaluierungsmethoden weiter zu verfeinern und mit in der Literatur angewandten Verfahren zu vergleichen. Hiermit werden wir an der Entwicklung weiterer Standards hoffentlich beitragen können.

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines wissenschaftlichen Kooperationsprojektes zwischen der Frauenklinik vom Roten Kreuz in München und der Klinik für Strahlentherapie und radiologische Onkologie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München. Ziel des Gesamtprojektes ist es den prädiktiven Wert für das Tumoransprechen auf primär systemische Chemotherapie von pO₂ in malignen Mammatumoren zu bestimmen und seine Abhängigkeit von Serumhämoglobin, dem p53-Status und dem VEGF-Status zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen dem intratumoralen Sauerstoffpartialdruck und dem VEGF-Status untersucht.

Hierzu wurde das von 95 primären Mammakarzinomen stanzbiobtisch gewonnene Gewebe immunhistochemisch untersucht und die VEGF-Gewebeexpression bestimmt. Schließlich konnte, aus 109 ausgewerteten Sauerstoffmessungen und aus 95 bestimmten VEGF-Gewebeexpression, bei 77 Patientinnen sowohl Ergebnisse der Sauerstoffmessungen als auch der VEGF-Bestimmung zueinander in Beziehung gesetzt und statistisch ausgewertet werden. Zusätzlich wurden sowohl die pO₂-Werte als auch der VEGF-Status mit den sog. klassischen Prognosefaktoren des Mammakarzinoms in Relation gesetzt. Hier wurden die gewonnenen Werte mit dem Alter, der Tumorgroße, dem Nodalstatus, dem Grading und dem Hormonrezeptorstatus des untersuchten Patientinnenkollektivs zu einander in Beziehung gesetzt.

Die der Arbeit zugrunde liegende Annahme war, dass, durch die Gewebhypoxie induzierte Hif-1 alpha Protein-Ausschüttung bedingte Steigerung der VEGF-Gewebeexpression, hypoxische Tumore einen gegenüber normoxischen Geweben erhöhten VEGF-Status haben müssten.

Es konnte jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Oxygenierungsstatus und der VEGF-Gewebeexpression bei primären Mammakarzinomen nachgewiesen werden. Lediglich wurde eine statistisch nicht signifikante Verminderung in anoxischen Geweben von VEGF-positiven Tumoren nachgewiesen.

Die erzielten Ergebnisse entsprechen zwar nicht den Erwartungen, dennoch kann gefolgert werden, dass der intratumorale pO₂ und die VEGF-Gewebeexpression voneinander unabhängige Faktoren sind, von denen jeder für sich, wie aus der Literatur bekannt ist, mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet ist. Auch konnte keine Assoziation mit den klassischen Prognosefaktoren nachgewiesen werden.

8 Abkürzungsverzeichnis

X ²	=	Chi Quadrat Test
ASR	=	Altersstandardisierte Raten
ATP	=	Adenosin Tri Phosphat
CMF	=	Cyclophosphamid, Methotrexat und Fluoruracil
CR	=	Komplett Remission
DCIS	=	Duktales Carzinoma in situ
DNA	=	Desoxy-Ribonuklein Acid
ECTO	=	European Cancer Treatment Organisation
H ₂ O ₂	=	Wasserstoff Peroxyd
HIF	=	hypoxia inducible factor
ICD	=	Internationaler Codierungs Diagnosen
MRT	=	Magnet Resonanztomographie
NSABP	=	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
ODS	=	Onkologisches Dokumentation System
OER	=	Oxygen enhancement ratio
pCR	=	Histopathologische Komplettremission
PD	=	Progressivdisease
pO ₂	=	Sauerstoff Partial Druck
PR	=	Partial Remission
p-Wert	=	Signifikanz Wert
RNA	=	Ribonuklein Acid
SD	=	Stabledisease
VEGF	=	Vascular endothelial growth factor

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Altersverteilung	36
Tabelle 2 Verteilung nach Histologischen Kriterien.....	37
Tabelle 3 Verteilung nach Grading	38
Tabelle 4 Verteilung nach TumorgroÙe	38
Tabelle 5 VEGF Altersverteilung	39
Tabelle 6 VEGF und histopathologische Unterteilung	40
Tabelle 7 VEGF und TumorgroÙe	41
Tabelle 8 VEGF und Nodalstatus	42
Tabelle 9 VEGF und Grading	42
Tabelle 10 VEGF und Hormonrezeptoren.....	43
Tabelle 11 VEGF und Her2/neu	44
Tabelle 12 pO ₂ Werteverteilung	45
Tabelle 13 Altersverteilung im Alter	46
Tabelle 14 pO ₂ und TumorgroÙe	47
Tabelle 15 pO ₂ und histopathologische Verteilung	47
Tabelle 16 pO ₂ und Grading	48
Tabelle 17 pO ₂ und Hormonrezeptorstatus	49
Tabelle 18 pO ₂ und Her2/neu	49
Tabelle 19 VEGF und primär systemische Therapie	51
Tabelle 20 pO ₂ und primär systemische Therapie	52
Tabelle 21 pO ₂ und Nodalstatus	53

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1(52) Gewebeoxygenierung	10
Abbildung 2 Hypoxische Regionen des Tumorgewebes(58)	11
Abbildung 3 Physiologie der Tumorgewebe(65,69)	12
Abbildung 4 Auswirkungen der Hypoxie auf die genetische Stabilität	13
Abbildung 5 Hypoxie abhängige Selektion bestimmter Zellen.....	14
Abbildung 6 VEGF Aktivierung.....	16
Abbildung 7 Einfluss der Gewebeoxygenierung auf die Radiosensitivität(26)	17
Abbildung 8 Dosis-Wirkungsbeziehung von langsam vs. schnell proliferierenden Zellen(75)	18
Abbildung 9 Zusammenhang zwischen Hypoxie und Zellproliferation	19
Abbildung 10 VEGF-Protein	20
Abbildung 11 Hypoxie stimuliert die Produktion des Wachstumsfaktors VEGF(55).....	22
Abbildung 12 VEGF Stimulationsmechanismus	22
Abbildung 13 Thyrosin Kinase Rezeptor	23
Abbildung 14 Rezeptor Mechanismus	24
Abbildung 15 Rezidivfreie Überlebensrate in Abhängigkeit von VEGF-Status.....	26
Abbildung 16 Nachweis der VEGF-Proteine(35).....	32

11 Danksagung

Mein Dank gilt an dieser Stelle Herrn Professor Dr. med W. Eiermann für die Überlassung des Themas.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. med. G. Raab, leitender Oberarzt der Frauenklinik vom Roten Kreuz, für die fürsorgliche und überaus freundliche Betreuung mit außerordentlich viel Geduld und einem offenem Ohr für alle Probleme und Fragen danken.

Auch gilt mein Dank Herrn Dr. med D. Scheich, Chefarzt der Radiologischen Abteilung in der Frauenklinik vom Roten Kreuz und Herrn Dr. G. Auer, die durch die Durchführungen der Messungen diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. Högel, Abteilung für Pathologie des Krankenhauses vom Roten Kreuz in München, und seinem Team für die Aufbearbeitung und Evaluierung der histopathologischen Präparate und die zudem immer freundliche und hilfsbereite Kooperation.

Ein weiterer Dank auch an Prof. Dr. med. Dipl.-Psych. Karl Überla, Leiter des Instituts für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Medizinischen Fakultät der LMU, München und seinem Team für die freundliche Unterstützung bei der statistischen Aufbearbeitung unserer Daten.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester Patrizia Lombardo und meiner Freundin Kirstin Fahr für die liebevolle Förderung und Unterstützung während dieser Arbeit und des gesamten Studiums.

12 Literaturverzeichnis

Reference List

1. Anan K, Morisaki T, Katano M, et al. Vascular endothelial growth factor and platelet derived growth factor are potential angiogenic and metastatic factors in human breast cancer. *Surgery* 119: 333-9, 1996.
2. Anan K, Morisaki T, Katano M, Ikubo A, Tsukahara Y, Kojima M, Uchiyama A, Kuroki S, Torisu M, Tanaka M. Assessment of c-erbB2 and vascular endothelial growth factor mRNA expression in fine-needle aspirates from early breast carcinomas: pre-operative determination of malignant potential. *Eur J Surg Oncol* 24: 28-33, 1998.
3. Bernatchez PN, Soker S, Sirois MG. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem* 274: 31047-54, 1999.
4. Billgren AM, Rutqvist LE, Tani E, Wilking N, Fornander T, Skoog L. Proliferating fraction during neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer in relation to objective local response and relapse-free survival. *Acta Oncol* 38: 597-601, 1999.
5. Bilton RL, Booker GW. The subtle side to hypoxia inducible factor (HIF α) regulation. *Eur J Biochem* 270: 791-8, 2003.
6. Blancher C, Moore JW, Talks KL, Houlbrook S, Harris AL. Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 60: 7106-13, 2000.
7. Breier G, Albrecht U, Storrer S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 90: 649-52, 1992.
8. Brown JM, Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res* 58: 1408-16, 1999.
9. Brown LF, Guidi AJ, Schnitt SJ, Van De Water L, Iruela-Arispe ML, Yeo TK, Tognazzi K, Dvorak HF. Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res* 5: 1041-56, 1999.
10. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E, Keshet E. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394: 485-90, 1998.
11. Ellis LM, Liu W, Fan F, Reinmuth N, Shaheen RM, Jung YD, Ahmad S. Role of angiogenesis inhibitors in cancer treatment. *Oncology (Huntingt)* 15: 39-46, 2001.

12. Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L, Fujii-Kuriyama Y. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J* 18: 1905-14, 1999.

13. Engel D HJKG. Tumormanual Mammakarzinom. *Epidemiologie*. 2003.

Ref Type: Generic

14. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 29: 10-4, 2002.

15. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2: 795-803, 2002.

16. Ferrara N, Alitalo K. Clinical application of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 5: 1359-64, 1999.

17. Ferrara N, Gerber HP, Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669-76, 2003.

18. Gasparini G, Toi M, Miceli R, Vermeulen PB, Dittadi R, Biganzoli E, Morabito A, Fanelli M, Gatti C, Suzuki H, Tominaga T, Dirix LY, Gion M. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in patients with node-positive breast cancer treated with either adjuvant chemotherapy or hormone therapy. *Cancer J Sci Am* 5: 101-11, 1999.

19. Grahma CH, Rivers J, Kerbel RS, et al. Etend of vascularization as a prognostic indicator in thin malignat melanomas. *Am J Pathol* 1994.

20. Greaber TG et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors. *Nature* 379, 88-91. 1996.

Ref Type: Magazine Article

21. Gunningham SP, Currie MJ, Han C, Robinson BA, Scott PA, Harris AL, Fox SB. The short form of the alternatively spliced flt-4 but not its ligand vascular endothelial growth factor C is related to lymph node metastasis in human breast cancers. *Clin Cancer Res* 6: 4278-86, 2000.

22. Hahn, Klein, Lake. *Medizinische Mikrobiologie*. 2 ed. p. 45-49, 1994.

23. Heys SD. Evolution of breast cancer management: focus on neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer* 8: 339-50, 2001.

24. Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 93: 266-76, 2001.

25. Horak ER, Leek R, Klenk N, et al. Angiogenesis, assesed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastasis and survival in breast cancer. *Lancet Oncol* 340: 1120-4, 1992.

26. Horsman MR, et al. *Basic Clinical Radiobiology*. Oxford university press, New York . 1997.

Ref Type: In Press

27. Horsman MR, Nordmark M, Overgaard J. Techniques to assess the oxygenation of human tumors. State of the art. *Strahlenther Onkol* 174 Suppl 4: 2-5, 1998.
28. Huang Zong, et al. Overexpression of Hypoxia inducible Factor 1alpha in common Human Cancer and their Metastasis. *Cancer Res* 59: 5830-5, 1999.
29. Hur E, Kim HH, Choi SM, Kim JH, Yim S, Kwon HJ, Choi Y, Kim DK, Lee MO, Park H. Reduction of hypoxia-induced transcription through the repression of hypoxia-inducible factor-1alpha/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator DNA binding by the 90-kDa heat-shock protein inhibitor radicicol. *Mol Pharmacol* 62: 975-82, 2002.
30. Ikeda T, Jinno H, Matsu A, Masamura S, Kitajima M. The role of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer treatment. *Breast Cancer* 9: 8-4, 2002.
31. Kieser A, Weich HA, Brandner G, et al. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 9: 963-9, 1994.
32. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Fezoulidis I. Cancer vascularization: implications in radiotherapy? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48: 545-53, 2000.
33. Kurebayashi J, Otsuki T, Moriya T, Sonoo H. Hypoxia reduces hormone responsiveness of human breast cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 92: 1093-101, 2001.
34. Leong AS, Wick M R, Swanson P E. Immunohistology and electron microscopy of anaplastic and pleomorphic tumors. cambridge university press . 1997.
Ref Type: In Press
35. Lee JS, Kim HS, Jung JJ, Kim YB, Lee MC, Park CS, Expression of vascular endothelial growth factor in invasiv ductal carcinoma of the breast and the relation to angiogenesis and p53 and Her-2/neu protein expression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 10:289-95,2002.
35. Linderholm B, Andersson J, Lindh B, Beckman L, Erlanson M, Edin K, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. Overexpression of c-erbB-2 is related to a higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and constitutes an independent prognostic factor in primary node-positive breast cancer after adjuvant systemic treatment. *Eur J Cancer* 40: 33-42, 2004.
36. Linderholm B, Grankvist K, Wilking N, Johansson M, Tavelin B, Henriksson R. Correlation of vascular endothelial growth factor content with recurrences, survival, and first relapse site in primary node-positive breast carcinoma after adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 18: 1423-31, 2000.
37. Linderholm B, Lindh B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. p53 and vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) expression predicts outcome in 833 patients with primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 89: 51-62, 2000.
38. Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 16: 3121-8, 1998.

39. Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. Does vascular endothelial growth factor (VEGF) predict local relapse and survival in radiotherapy-treated node-negative breast cancer? *Br J Cancer* 81: 727-32, 1999.
40. Linderholm BK, Lindahl T, Holmberg L, Klaar S, Lennerstrand J, Henriksson R, Bergh J. The expression of vascular endothelial growth factor correlates with mutant p53 and poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Res* 61: 2256-60, 2001.
41. Linderholm BK, Lindh B, Beckman L, Erlanson M, Edin K, Travelin B, Bergh J, Grankvist K, Henriksson R. Prognostic correlation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in 1307 primary breast cancers [In Process Citation]. *Clin Breast Cancer* 4: 340-37, 2003.
42. Locopo N, Fanelli M, Gasparini G. Clinical significance of angiogenic factors in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 52: 159-73, 1998.
43. Marxsen JH, Schmitt O, Metzen E, Jelkmann W, Hellwig-Burgel T. Vascular endothelial growth factor gene expression in the human breast cancer cell line MX-1 is controlled by O₂ availability in vitro and in vivo. *Ann Anat* 183: 243-9, 2001.
44. Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 11: 293-9, 2001.
45. Milauer B, SLPKeal. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 367: 576-9, 1994.
46. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13: 9-2, 1999.
47. Pierga JY, Mouret E, Dieras V, Laurence V, Beuzeboc P, Dorval T, Palangie T, Jouve M, Vincent-Salomon A, Scholl S, Extra JM, Asselain B, Pouillart P. Prognostic value of persistent node involvement after neoadjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer. *Br J Cancer* 83: 1480-7, 2000.
48. Reynolds TY et al. *Cancer Res* 56: 5754-7, 1996.
49. Rozen F, Zhang J, Pollak M. Antiproliferative action of tumor necrosis factor-alpha on MCF-7 breastcancer cells is associated with increased insulin-like growth factor binding protein-3 accumulation. *Int J Oncol* 13: 865-9, 1998.
50. Salven P, Lymboussaki A, Heikkila P, Jaaskela-Saari H, Enholm B, Aase K, von Euler G, Eriksson U, Alitalo K, Joensuu H. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol* 153: 103-8, 1998.
51. Schmidt T. *Physiologie des Menschen*. Springer Verlag Berlin, 24. Auflage ed. 1990.
52. Shaheen RM, Davis DW, Liu W, Zebrowski BK, Wilson MR, Bucana CD, McConkey DJ, McMahon G, Ellis LM. Antiangiogenic therapy targeting the tyrosine kinase receptor for vascular endothelial growth factor receptor inhibits the growth of colon cancer liver metastasis and induces tumor and endothelial cell apoptosis. *Cancer Res* 59: 5412-6, 1999.

53. Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condron CM, Toomey D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev* 29: 297-307, 2003.
54. Shweiki D, et al. *Proc Nat Acad Sci* 92: 768-72, 1995.
55. Shweiki D, Itin A, Soffer D, et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843-5, 1992.
56. Spiro IJ, et al. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 10: 1275-80, 1984.
57. Steel GG et al. *Basic Clinical Radiobiology*. Oxford university press . 1997.
Ref Type: In Press
58. Stein I, Itin A, Einat P, Skaliter R, Grossman Z, Keshet E. Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Mol Cell Biol* 18: 3112-9, 1998.
59. Teicher BA, et al. *Clin Cancer Res* 118, 123-128. 1992.
Ref Type: Abstract
60. Teicher BA, et al. *Cancer Chemother Pharmacol* 33: 57-62, 1993.
61. Toi M, Bando H, Ogawa T, Muta M, Hornig C, Weich HA. Significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)/soluble VEGF receptor-1 relationship in breast cancer. *Int J Cancer* 98: 14-8, 2002.
62. Toi M, et al. Tumor angiogenesis in breast cancer: its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. *Breast Cancer Res Treat* 36: 193-204, 1995.
63. Toi M, Hoshina S, Takayanagi T, et al. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 85: 1045-9, 1994.
64. Vaupel P. *Strahlenther Onkol* 6-12, 1998.
65. Vaupel P. Oxygenation of human tumors: Evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancer by computerized O₂ tension measurement. *Cancer Res* 51: 3316-22, 1999.
66. Vaupel P, Briest S, Hockel M. Hypoxia in breast cancer: pathogenesis, characterization and biological/therapeutic implications. *Wien Med Wochenschr* 152: 334-42, 2002.
67. Vaupel P, Kelleher DK, Hockel M. Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol* 28: 29-35, 2001.
68. Vaupel P, Kelleher DK, Thews O. Modulation of tumor oxygenation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42: 843-8, 1998.
69. Vaupel P, Thews O, Kelleher DK, Hoeckel M. Oxygenation of human tumors: the Mainz experience. *Strahlenther Onkol* 174 Suppl 4: 6-2, 1998.

70. Wallwiener D. Moderne Mamma-Diagnostik und -Therapie: Prinzipien und Indikation der Neoadjuvanten Therapie. Universität Frauenklinik Tübingen . 1996.

Ref Type: Internet Communication

71. Weidner N, Folkmann J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. J Natl Cancer Inst 84: 1875-87, 1992.

72. Williams KJ, Cowen RL, Stratford IJ. Hypoxia and oxidative stress. Tumour hypoxia-therapeutic considerations. Breast Cancer Res 3: 328-31, 2001.

73. Zeller WJ, Zur Hausen H. Onkologie: Grundlagen, Diagnostik, Therapie, Entwicklung. Ecomed . 1995.

Ref Type: Internet Communication

13 Lebenslauf

Name : Lombardo
Vorname : S. Massimo

Geburtsdatum : 15.08.1971
Geburtsort : München

Eltern : Vater: Agatino Lombardo, Kaufmann
Mutter: Santa-Grazia Lombardo, geb. Astorino, Lehrerin
Schwester: Patrizia Laura Lombardo, Heilpraktikerin

Nationalität: Italienisch

Schulausbildung:

1978 – 1982 Grundschule an der Sambergerstraße, München

1982 – 1991 Gymnasium Thomas-Mann, München
Abschluß : Abitur

Berufsausbildung:

1991 – 2001 Ludwig-Maximilians-Universität, München
Studium der Humanmedizin

2001 – 2002 Frauenklinik vom Roten Kreuz, München
AiP-Tätigkeit

Mai bis September 2003 Frauenklinik der Maria Hilf Kliniken, Mönchengladbach
Assistenzarzt

Seit Oktober 2003 Frauenklinik des Klinikum Starnberg, Starnberg
Assistenzarzt

