

Aus der Universitäts-Frauenklinik mit Poliklinik Tübingen
Abteilung Allgemeine Geburtshilfe und Frauenheilkunde
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Wallwiener

**Prädiktiver Wert und Verlaufsbeobachtung
der Tumervaskularisierung
in der primär systemischen Therapie
des Mammakarzinoms**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Steffi Eckert, geb. Schmauszer
aus Schramberg

2011

Dekan

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter

Privatdozent Dr. N. Fersis

2. Berichterstatter

Privatdozent Dr. F. Mayer

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Das Mammakarzinom.....	6
1.1.1	Epidemiologische Bedeutung	6
1.1.2	Prognostische Faktoren	6
1.1.2.1	Prognostische Faktoren der St. Gallen Konsensuskonferenz ..	7
1.1.2.2	Weitere prognostische Faktoren	9
1.1.3	Prädiktive Faktoren.....	11
1.1.4	Medikamentöse Systemtherapie.....	12
1.1.4.1	Allgemeines zur medikamentösen Systemtherapie.....	12
1.1.4.2	Adjuvante Therapie	12
1.1.4.3	Primär systemische Therapie.....	13
1.2	Angiogenese	15
1.2.1	Begriffsdefinitionen	15
1.2.2	Ablauf der Angiogenese	15
1.2.3	Pathologische Angiogenese	16
1.2.3.1	Angiogenese im Rahmen benigner Erkrankungen.....	16
1.2.3.2	Angiogenese im Rahmen maligner Erkrankungen	16
1.2.4	Regulation der Angiogenese	17
1.2.4.1	Stimulatoren und Inhibitoren	17
1.2.4.2	Einflussfaktoren.....	20
1.2.4.2.1	Hypoxie und Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF)	20
1.2.4.2.2	Biomechanische Kräfte	21
1.2.4.2.3	Onkogene und Tumorsuppressorgene	21
1.2.4.2.4	Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM)	23
1.2.5	Tumorgefäßbett und Folgen der Tumor-induzierten Angiogenese	23
1.2.6	Angiogenese als Ansatzpunkt in der Malignomtherapie	24
1.2.7	Quantitative Erfassung der Angiogenese	25
1.3	Bedeutung der Angiogenese beim Mammakarzinom	26
1.4	Ziel der Arbeit.....	28
2	Material und Methoden	29
2.1	Patientinnenkollektiv und Therapie	29
2.2	Histologie der Tumoren	30
2.2.1	Histopathologische Befunde	30
2.2.2	Immunhistochemie.....	31
2.2.2.1	Allgemeines zur Immunhistochemie.....	31
2.2.2.2	Gewebe.....	32
2.2.2.3	Immunhistochemische Darstellung der Gefäße	33
2.2.2.4	Immunhistochemie der übrigen Parameter	34
2.3	Quantitative Auswertung der Anti-CD34-Färbung.....	35
2.3.1	Aufsuchen der „hot spots“	35

2.3.2	Computerassistierte Bildanalyse.....	35
2.3.2.1	Bildeinzug.....	35
2.3.2.2	Automatische Vormarkierung der Endothelzellen	36
2.3.2.3	Manuelle Nachbearbeitung der vormarkierten Gefäße	36
2.3.2.4	Markierung des Messareals	37
2.3.2.5	Automatische Auswertung der Gefäßparameter	37
2.4	Quantitative Auswertung der übrigen Färbungen	38
2.5	Pathologische Response.....	39
2.6	Statistische Auswertung	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Patienten- und Tumorcharakteristika	41
3.1.1	Altersverteilung im Patientenkollektiv	41
3.1.2	Prä- und posttherapeutische Tumorgröße und T-Stadium.....	41
3.1.3	Histologie und Grading	42
3.1.4	Prä- und posttherapeutischer Lymphknotenstatus.....	44
3.1.5	Prä- und posttherapeutischer Hormonrezeptorstatus	44
3.1.6	Übrige immunhistochemische Parameter	45
3.2	Primär systemische Therapie	46
3.2.1	Schemata der primär systemischen Therapie	46
3.2.2	Ansprechen auf die primär systemische Therapie	46
3.3	Gefäßparameter	48
3.3.1	Erhebung der Gefäßparameter.....	48
3.3.2	Ausprägung der Gefäßparameter	48
3.3.3	Verlauf der Gefäßparameter unter primär systemischer Therapie	49
3.3.3.1	Verlauf der Gefäßdichte	49
3.3.3.2	Verlauf des Gefäßflächenanteils	51
3.3.3.3	Vergleich des Verlaufs der beiden Gefäßparameter	52
3.3.4	Gefäßparameter und Therapieansprechen.....	52
3.3.4.1	Vorhersagewert der Gefäßparameter	52
3.3.4.2	Gefäßparameter in verschiedenen Response-Gruppen.....	56
3.3.4.2.1	Response-Gruppen der Chemotherapie	56
3.3.4.2.2	Response-Gruppen der Hormontherapie	56
3.3.5	Gefäßdichte und immunhistochemische Parameter	57
3.3.5.1	Gefäßdichte und MIB-1-Status.....	57
3.3.5.2	Gefäßdichte und p53-Status	59
3.3.5.3	Gefäßdichte und c-erbB-2-Status.....	60
4	Diskussion.....	62
4.1	Methodendiskussion.....	62
4.1.1	Allgemeines zur Quantifizierung der Angiogenese	62
4.1.2	Immunhistochemie der Gefäße.....	62
4.1.3	Quantitative Auswertung der Färbung	64
4.1.4	Repräsentativität der Stanzpräparate	68

4.2	Patientenkollektiv und Tumorcharakteristika.....	68
4.2.1	Altersverteilung der Patientinnen	68
4.2.2	Histologische Tumorcharakteristika	69
4.3	Ansprechen auf die primär systemische Therapie	73
4.3.1	Therapiegruppen	73
4.3.1.1	Chemotherapie.....	73
4.3.1.2	Hormontherapie	75
4.4	Ausprägung der Gefäßparameter.....	78
4.4.1	Gefäßdichte	78
4.4.2	Gefäßflächenanteil.....	78
4.5	Änderung der Vaskularisierung unter der Therapie	79
4.5.1	Verlauf der Gefäßdichte.....	79
4.5.1.1	Gefäßdichte und Chemotherapie	79
4.5.1.2	Gefäßdichte und Hormontherapie	81
4.5.2	Verlauf des Gefäßflächenanteils.....	82
4.6	Gefäßparameter und Therapieansprechen.....	85
4.7	Gefäßdichte und immunhistochemische Parameter	90
4.7.1	Gefäßdichte und MIB-1.....	90
4.7.2	Gefäßdichte und p53- bzw. c-erbB-2-Status.....	92
5	Zusammenfassung	95
6	Literaturverzeichnis.....	96
7	Anhang	126
7.1	Tabellen	126
7.2	Abbildungen	127
7.3	Abkürzungen	129
7.4	Danksagung.....	131

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologische Bedeutung

Mit über 57.000 Neuerkrankungen jährlich ist das Mammakarzinom die häufigste Krebserkrankung der Frau in Deutschland. Im Jahr 2004 entsprachen die Brustkrebsneuerkrankungen mehr als einem Viertel aller bösartigen Neuerkrankungen. 40% der neu aufgetretenen Mammakarzinome, somit knapp 23.900 Fälle, wurden schon vor dem 60. Lebensjahr der Patientinnen diagnostiziert (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, 2008; Robert Koch-Institut online: www.rki.de). Das mittlere Erkrankungsalter von 63 Jahren beim Mammakarzinom liegt um sechs Jahre niedriger als für Krebs insgesamt.

In Deutschland ist Brustkrebs die häufigste Krebstodesursache bei Frauen, wobei diese Erkrankung im Jahr 2004 mit rund 17.600 Sterbefällen für 17,9 % aller Krebssterbefälle in der weiblichen Bevölkerung verantwortlich war (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, 2008). Zwischen 35 und 45 Jahren stellt es bei Frauen die häufigste Todesursache überhaupt dar (Schmidt-Matthiesen, Wallwiener, 2005).

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt in Deutschland stadienunabhängig derzeit etwa 81 % (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, 2008). Nach Daten der American Cancer Society liegt die Überlebensrate in den USA nach fünf Jahren bei 89 % und nach 10 Jahren bei 81 % (American Cancer Society, 2007).

1.1.2 Prognostische Faktoren

Prognostische Faktoren erteilen bei Tumorpatienten Auskunft über die Wahrscheinlichkeit des Wiederauftretens einer Erkrankung sowie des Todes durch die Erkrankung und geben somit Hinweise auf den individuellen Krankheitsverlauf und das Risiko des einzelnen Patienten in der Zukunft. Patienten mit hohem Risiko sollen dadurch frühzeitig identifiziert und einer aggressiveren Therapie zugeführt werden können.

1.1.2.1 Prognostische Faktoren der St. Gallen Konsensuskonferenz

Beim nicht-metastasierten Mammakarzinom empfiehlt die St. Gallen Konsensuskonferenz, folgende prognostische Faktoren für die individuelle Risikoeinstufung bezüglich der adjuvanten Therapieempfehlung heranzuziehen (St. Gallen Konsensuskonferenz, 2007):

- Befall regionaler Lymphknoten
- Alter
- Tumorgroße
- Differenzierungsgrad des Tumors
- Hormonrezeptorstatus
- HER2/neu-Status
- Peritumorale Gefäßinvasion

Der axilläre Lymphknotenstatus gilt beim Mammakarzinom als aussagekräftigster prognostischer Einzelparameter (Donegan, 1997). Der Anzahl befallener Lymphknoten kommt ebenfalls eine prognostische Bedeutung zu (Nemoto et al., 1980; Carter et al., 1989; Fisher et al., 1993). Der Lymphknotenstatus ist jedoch kein perfekter Marker der systemischen Erkrankung: Etwa ein Viertel der lymphknotennegativen Patientinnen erleidet innerhalb von 10 Jahren ein Rezidiv, hingegen leben ca. 30 % der Patientinnen mit initial positivem Lymphknotenstatus nach 10 Jahren noch immer krankheitsfrei, sofern die befallenen Lymphknoten entfernt wurden (Gardner et Feldman, 1993). Des Weiteren weist ein Teil der bereits primär metastasierten Karzinome keinen Lymphknotenbefall auf (Leone et al., 1988).

Das Patientenalter gilt ebenfalls als prognostischer Faktor beim Mammakarzinom. Mehrere Studien wiesen für Patientinnen unter 35 Jahren schlechtere Heilungs- bzw. Überlebensraten nach als für Patientinnen über 35 Jahren (Nemoto et al., 1980; Høst et Lund, 1986; Winchester et al., 1996).

Die Größe des Primärtumors geht wie der axilläre Lymphknotenstatus in die Stadieneinteilung der TNM-Klassifikation ein. Mit zunehmender Größe des Primärtumors sinken Heilungs- bzw. Überlebensraten (Nemoto et al., 1980; Carter et al., 1989). Mit Einführung des flächendeckenden Mammographie-Screenings

in Deutschland ist auf eine Zunahme der prognostisch günstigen T1-Tumoren zu hoffen, welche insgesamt eine 5-Jahres-Überlebensrate von ~90% aufweisen, bzw. ~95%, sofern keine Lymphknoten befallen sind (Carter et al., 1989).

Ebenfalls zu den etablierten Prognosefaktoren des Mammakarzinoms zählt der histologische Differenzierungsgrad des Tumors, das sogenannte Grading, welches die drei morphologischen Merkmale Tubulusbildung, nukleäre Pleomorphie und Mitoserate berücksichtigt. Je schlechter die Differenzierung desto höher ist der Malignitätsgrad des Tumors (Bloom et Richardson, 1957; Elston et Ellis, 1991). Eine zunehmende Entdifferenzierung führt zu einer Abnahme der relativen Überlebensrate bei Patientinnen mit Mammakarzinom (Bloom et Richardson 1957; Davis et al., 1986; Henson et al., 1991; Elston et Ellis, 1991; Fisher et al., 1993; Pereira et al., 1995)

Der immunhistochemische Nachweis der nukleär exprimierten Hormonrezeptoren für Progesteron und Östrogen stellt ein Standardverfahren in der histologischen Aufarbeitung des Mammakarzinoms dar. Man fasst ihre Expression zum Hormonrezeptorstatus zusammen, wobei dieser auch als positiv gilt, wenn nur einer der beiden Rezeptoren nachweisbar ist. Der prognostisch günstige Einfluss eines positiven Hormonrezeptorstatus ist seit vielen Jahren anerkannt (Croton et al., 1981; Mason et al., 1983; Thorpe et al., 1987). Für eine trotz maligner Transformation weiterhin vorhandene Expression dieser Rezeptoren zeigte sich eine Assoziation mit geringerem Malignitätsgrad und langsamerem Tumorwachstum (Keen et Davidson, 2003).

Im Jahr 2005 wurde der HER2/neu-Status in die Liste der Prognosefaktoren der St. Gallen Konsensuskonferenz aufgenommen. Das Protoonkogen c-erbB-2 kodiert den transmembranären Glykoproteinrezeptor „human epidermal growth factor receptor-2“ (HER-2). Durch die Fähigkeit, Wachstumsfaktoren zu binden, ist dieser Rezeptor an der Regulation von Proliferation, Differenzierung und des Überlebens von Zellen beteiligt (Olayioye, 2001). Bei ca. 15-30% der Mammakarzinome ist eine Überexpression dieses Proteins bzw. Amplifikation dieses Protoonkogens nachweisbar. Dieser Nachweis geht mit einem aggressiveren

Phänotyp, einem höheren Rezidivrisiko und einer schlechteren Prognose einher (Slamon et al., 1987; Paterson et al., 1991; Joensuu et al., 2003).

Die Tumorzellinvasion in Blut- oder Lymphgefäße gilt als wichtiger Schritt im Metastasierungsprozess. Ebenfalls seit 2005 zählt dieses histopathologisch erfassbare Tumorcharakteristikum zu den Prognosefaktoren der Konferenz von St. Gallen. Es zeigte sich eine Assoziation mit schlechteren Überlebenskurven und einem höheren Risiko für die Entwicklung von Lymphknotenmetastasen (Bettelheim et al., 1984; Lauria et al., 1995; Schoppmann et al., 2004).

1.1.2.2 Weitere prognostische Faktoren

Der histologische Typ des Karzinoms zeigt ebenfalls prognostische Relevanz. Beispielsweise gelten invasiv tubuläre, invasiv papilläre und invasiv muzinöse Karzinome als prognostisch günstiger gegenüber dem invasiv duktalem Karzinom (Fisher et al., 1993; Donegan, 1997).

Der Nachweis disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark wird für Patientinnen mit Mammakarzinom als prognostisch ungünstig angesehen (Diel et al., 1996; Gebauer et al., 2001; Braun et al., 2001) und ist als fakultativer Faktor mit der Bezeichnung M1(i) mittlerweile im TNM-System repräsentiert. Momentan ist noch nicht geklärt, inwiefern hierdurch andere Prognosefaktoren wie Tumorgröße, Grading und Lymphknotenstatus wiedergespiegelt werden oder ob ein unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert wurde (Harris et al., 2007).

Die Faktoren uPA und PAI-1 gehören zum Plasminogen-Aktivierungs-System, welchem bei malignen Tumoren eine Bedeutung im Rahmen von Invasion, Angiogenese und Metastasierung zugeschrieben wird. Somit könnten sie erheblichen Einfluss auf die Prognose dieser Erkrankungen ausüben (Stephens et al., 1998). Unterschiedliche Nachweismethoden dieser Faktoren sowie deren prognostischer Wert für die Anwendung in der klinischen Praxis des Mammakarzinoms werden derzeit in Studien überprüft (Harris et al., 2007). Dem Nachweis mittels ELISA scheint eine prognostische Relevanz zuzukommen, und Patientinnen mit starker Expression dieser Faktoren sollen von einer Chemotherapie profitieren (Jänicke et al., 1993; Look et al., 2002; Jänicke et al., 2001).

Das bcl-2-Protoonkogen wurde zunächst im Kontext maligner Lymphome erforscht. Das auf der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Protein begünstigt als Apoptoseinhibitor das Überleben von Zellen (Hockenberry et al., 1990). Mittels bcl-2-Gentransfer konnte in T-Zelllinien eine bcl-2-induzierte Resistenz gegen verschiedene Chemotherapeutika gezeigt werden (Miyashita et al., 1992). Je nach Zell- oder Gewebeart scheint dieses Onkogen jedoch unterschiedliche biologische Funktionen zu haben: In verschiedenen Tumorzelllinien zeigte sich im Gegensatz zum erwarteten Wachstums- und Überlebensvorteil eine Wachstumshemmung unter bcl-2-Expression (Pietenpol et al., 1994). Beim Mammakarzinom konnte die Expression von bcl-2 ebenfalls mit einer besseren Prognose und mit prognostisch günstigen Faktoren assoziiert werden (van Slooten et al., 1996; Berardo et al., 1998; Callagy et al., 2006).

Das Tumorsuppressorgen p53 kodiert einen Transkriptionsfaktor, welcher im Falle einer Schädigung des Genoms die Zellteilung hemmen kann (Lane, 1992; Levine, 1997). Unter dessen Inaktivierung kommt es zu einer unkontrollierten Proliferation mit Anhäufung von DNA-Schäden. Die Folge ist eine zunehmende Entartung. Durch Mutation entsteht ein Protein mit längerer Halbwertszeit, welches akkumuliert und dadurch immunhistochemisch nachweisbar ist. Das „überexprimierte“ Genprodukt ist somit ein Surrogatparameter für die Mutation. Ca. 20% der p53-Deletionen können durch immunhistochemische Methoden nicht nachgewiesen werden, daher dürfte die Zukunft eher in Methoden mit direktem Nachweis der genetischen Veränderungen liegen (Pharoah et al., 1999). Die prognostische Bedeutung der p53-Mutation beim Mammakarzinom wird kontrovers diskutiert. Pharoah et al. wiesen in oben genannter Meta-Analyse jedoch ein verschlechtertes Gesamt- und krankheitsfreies Überleben nach.

Um die proliferative Aktivität eines Gewebes an Gefrier-/Paraffinschnitten zu untersuchen, werden die monoklonalen Antikörper Ki-67 bzw. MIB-1 eingesetzt (Cattoretti et al., 1992). Diese sind gegen ein nukleäres Antigen gerichtet, welches in den proliferativen Zellzyklusphasen, nicht jedoch in der G₀-Phase exprimiert wird. Die immunhistochemische Anfärbung dieses Antigens identifiziert also die Wachstumsfraktion eines Gewebes (Scholzen et al., 2000). Beim Mammakarzinom wurde eine Assoziation hoher Wachstumsfraktionen mit höhe-

rem Rezidivrisiko und kürzerem Gesamtüberleben, sowie mit prognostisch ungünstigen Faktoren (histologische Entdifferenzierung, Lymphknotenmetastasierung) beobachtet (Gasparini et al., 1991; Veronese et al., 1993; Thor et al., 1999; Trihia et al., 2003). Aufgrund der retrospektiven Datenerhebung dieser Studien und der mangelnden Standardisierung der Methode zählt der MIB-1-Status bisher nicht zu den etablierten Prognosefaktoren des Mammakarzinoms.

1.1.3 Prädiktive Faktoren

Prädiktive Faktoren dienen bei malignen Erkrankungen dazu, die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens eines Tumors auf eine bestimmte Therapie vorherzusagen. Sie sollen dadurch eine individualisierte und zielgerichtete Therapie ermöglichen, um die Effektivität der Behandlung zu steigern sowie Kosten und Nebenwirkungen zu senken. In der klinischen Praxis gelten beim Mammakarzinom derzeit zwei prädiktive Faktoren als relevant:

- Hormonrezeptorstatus
- HER2/neu-Status

Ein positiver Hormonrezeptorstatus korreliert mit dem Ansprechen auf eine anti-hormonelle Therapie und gilt als Voraussetzung für deren Anwendung (Pertschuk et al., 1990; Pertschuk et al., 1996; Harvey et al., 1999). Bei negativem Hormonrezeptorstatus hingegen wiesen mehrere neoadjuvante Therapiestudien ein verbessertes Ansprechen auf eine Chemotherapie nach (Colleoni et al., 2000; Faneyte et al., 2003; Bear et al., 2006).

Ein positiver HER2/neu-Status gilt als prädiktiv für das Ansprechen auf eine Therapie mit dem anti-HER2/neu-Antikörper Trastuzumab (Herceptin®). Die standardgemäße Erhebung des HER2/neu-Status ist hierbei die Grundlage der korrekten Identifikation HER2-positiver Patientinnen und somit des erfolgreichen therapeutischen Einsatzes des Antikörpers (Dinh et al., 2007; Wolff et al., 2007). Die prädiktive Wertigkeit des HER2/neu-Status hinsichtlich des Ansprechens auf verschiedene Chemotherapeutika wurde ebenfalls mehrfach untersucht. Verschiedene retrospektive Arbeiten zeigten bei HER2-positiven Tumoren ein besseres Ansprechen auf Anthrazyklin-haltige Kombinationen gegen-

über Anthrazyklin-freien Schemata wie etwa CMF, während dieser Unterschied bei HER2-negativen Tumoren nicht vorhanden war (Paik et al., 1998; Paik et al., 2000; Pritchard et al., 2006). Bei Taxanen wird eine prädiktive Aussagekraft des HER2-Status bisher kontrovers diskutiert (Harris et al., 2007).

Zahlreiche weitere Faktoren (Proliferationsmarker, Tumorsuppressor- bzw. Onkogene, Gen- und Proteinexpressionsmuster) sind derzeit Gegenstand der Forschung hinsichtlich ihres prädiktiven Werts in der Mammakarzinomtherapie. Bisher kann keiner dieser Faktoren für die Vorhersage des Therapieansprechens in der klinischen Routine zugelassen werden (Duffy, 2005; Colozza et al., 2005; Harris et al., 2007).

1.1.4 Medikamentöse Systemtherapie

1.1.4.1 Allgemeines zur medikamentösen Systemtherapie

Neben operativem Vorgehen und Bestrahlung stellen medikamentöse Therapieansätze die dritte Säule in der Behandlung des Mammakarzinoms dar. Die Heterogenität dieser Erkrankung sowie des Patientenspektrums erlaubt keine starren Therapieschemata. Die drei Therapiesäulen finden daher je nach Stadium und biologischen Eigenschaften des Tumors sowie je nach Menopausenstatus, Allgemeinzustand und Wunsch der Patientin in unterschiedlicher Kombination ihre Anwendung. Für die systemische Therapie stehen derzeit drei verschiedene medikamentöse Therapieformen zur Verfügung:

- Chemotherapie (Anthrazykline, Taxane, Alkylanzien, Antimetabolite)
- Hormontherapie (Tamoxifen, Aromatasehemmer, GnRH-Analoga)
- Antikörpertherapie (Trastuzumab, Bevacizumab)

1.1.4.2 Adjuvante Therapie

Die adjuvante Therapie, welche möglichst in klinischen Therapiestudien erfolgen sollte, zielt auf die Zerstörung eventueller Mikrometastasen. Hierdurch kann unabhängig vom Nodalstatus das Rezidivrisiko gesenkt und das Überleben verlängert werden (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2005). Je nach Tumorbiologie und Risikoeinstufung der Patientin können alle der drei

oben genannten medikamentösen Therapieformen in unterschiedlicher Kombination eingesetzt werden (St. Gallen Konsensuskonferenz, 2007).

Unter den Chemotherapeutika gelten Anthrazyklin-haltige Dreierkombinations-Schemata in der adjuvanten Therapie derzeit als überlegen (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2005). Bei Lymphknotenbefall profitieren die Patientinnen vom zusätzlichen Einsatz von Taxanen (Roché et al., 2006).

Die Hormontherapie kommt bei hormonrezeptorpositiven Karzinomen zum Einsatz. Bei der postmenopausalen Patientin zeigten sich Aromatasehemmer oder Aromatasehemmer im Wechsel mit bzw. im Anschluss an Tamoxifen zunehmend überlegen gegenüber der alleinigen Therapie mit Tamoxifen (Ellis et al., 2001; Goss et al., 2003; Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group, 2005). Prämenopausal ist der Einsatz von Tamoxifen oder die medikamentöse Ausschaltung der Ovarialfunktion möglich.

Durch die zusätzliche Behandlung mit dem Antikörper Trastuzumab (Herceptin[®]) bei Patientinnen mit c-erbB2-positiven Karzinomen in der adjuvanten Therapie konnte in mehreren voneinander unabhängigen Studien eine deutliche Reduktion von Rezidivrisiko und Mortalität gezeigt werden (Dinh et al., 2007).

1.1.4.3 Primär systemische Therapie

Die primär systemische Therapie wird vor allem bei Patientinnen mit großem Primärtumor oder lokal fortgeschrittenem Karzinom eingesetzt, um eine Operabilität bzw. eine höhere Rate brusterhaltender Operationen zu erreichen. Im Rahmen dieses Therapieansatzes kann außerdem das Ansprechen auf die jeweilige Medikation geprüft werden. Dies ist zum einen für die einzelne Patientin von Bedeutung, da durch eine „in-vivo-Testung“ der Chemosensitivität ihres Tumors die Anpassung der weiteren medikamentösen Therapie ermöglicht wird, sei es post- oder bereits präoperativ (Fisher et al., 1998; Kaufmann et al., 2003; von Minckwitz et al., 2005). Zum anderen bietet das klinisch oder histopathologisch erfassbare Ansprechen auf eine neoadjuvant verabreichte Therapie als ein innerhalb von Monaten messbarer morphologischer Parameter einen interessanten Ansatz in der klinischen Forschung, während adjuvante Thera-

piestudien erst nach Jahren mittels Analyse nicht-morphologischer Parameter (z.B. Überlebensraten) die Überlegenheit des einen oder anderen Schemas belegen können. Die Gleichwertigkeit einer präoperativ verabreichten Chemotherapie im Vergleich zur adjuvanten Therapieform hinsichtlich der Prognose beim primär operablen Mammakarzinom wurde durch eine der größten Studien zur neoadjuvanten Therapie bescheinigt, das National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) Protocol B-18. In dieser randomisierten Studie ergaben sich unter Doxorubicin plus Cyclophosphamid (AC) zwischen adjuvanten und neoadjuvanten Therapiearm keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich krankheitsfreiem Überleben, DDFS und Gesamtüberleben (Fisher et al., 1998). Eine Meta-Analyse von Mauri et al., welche neben dieser noch 8 weitere Studien einschloss, bestätigte diese Gleichwertigkeit (Mauri et al., 2005). Ein Überlebensvorteil gegenüber der adjuvanten Therapieform durch Bekämpfung eventuell vorhandener Mikrometastasen zu einem möglichst frühen Zeitpunkt konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (Mano et Awada, 2004).

Standard ist derzeit eine Chemotherapie mit einem Anthrazyklin-Taxan-haltigen Schema, wobei hormonrezeptornegative Tumoren im Vergleich zu hormonrezeptorpositiven ein signifikant besseres Ansprechen zeigten (Colleoni et al., 2000; Faneyte et al. 2003).

Eine primär systemische Hormontherapie wird derzeit nicht als Standardtherapie empfohlen und nur in besonderen Fällen durchgeführt, zum Beispiel wenn bei einer postmenopausalen Patientin weder Operation noch Chemotherapie möglich sind (Kaufmann et al., 2003).

Für die Antikörpertherapie mit Trastuzumab (Herceptin[®]) zeichnete sich in Studien in der präoperativen Therapiesituation eine erhöhte Rate pathologischer Komplettremissionen ab (Buzdar et al., 2005; Dawood et al., 2007; Gianni et al., 2007). Der VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin[®]) ist in Europa für die Erstlinienbehandlung des metastasierten Mammakarzinoms in Kombination mit Paclitaxel sowie mit Docetaxel zugelassen. Die Kombinationstherapie führte zu erhöhten Ansprechraten sowie zu einer Verlängerung des progressionsfreien, nicht jedoch des Gesamtüberlebens (Miller et al., 2007; Miles et al., 2008).

1.2 Angiogenese

1.2.1 Begriffsdefinitionen

Beim Wachstum von Gefäßstrukturen werden zwei Formen unterschieden: Vaskulogenese und Angiogenese. Bei ersterer entstehen Gefäße *de novo* durch Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen mesodermalen Ursprungs (Angioblasten), welche in der Embryonalzeit das primäre Gefäßsystem ausbilden (Risau et Flamme, 1995). Unter Angiogenese hingegen versteht man die Neubildung von Gefäßen aus einem präexistenten Gefäßbett heraus. Proliferation und Migration bereits vorhandener Endothelzellen unter der Wirkung proangiogener Faktoren stellen die Hauptcharakteristika dieses Vorgangs dar (Carmeliet, 2000). An der weiteren Reifung und Stabilisierung des entstehenden Gefäßnetzes sind extrazelluläre Matrix, Perizyten sowie glatte Muskelzellen beteiligt. Neben ihrer Bedeutung bei der Umgestaltung und Ausreifung des primären Gefäßsystems in der Embryonalperiode, spielt die Angiogenese bei physiologischen Prozessen wie Wundheilung oder Menstruationszyklus auch im ausgereiften Organismus eine Rolle (Folkman, 1995).

1.2.2 Ablauf der Angiogenese

Der Angiogeneseprozess lässt sich in folgende Teilschritte untergliedern (Bus-solino et al., 1997; Moses, 1997; Papetti et Herman, 2002):

- Gefäßdestabilisierung
- Aktivierung des Endothels mit Endothelzellproliferation und -migration
- Bildung eines Lumens
- funktionelle Reifung der neu entstandenen Gefäße.

Unter dem Einfluss angiogener Stimulatoren wird ein bestehendes Gefäß lokal destabilisiert: Die ummantelnden Perizyten lösen sich ab, und Proteasen werden freigesetzt, welche die Basalmembran und die extrazelluläre Matrix zersetzen. Die Endothelzellen wechseln von ihrem ruhenden zu einem aktiven Phänotyp. Unter Bildung einer „Gefäßknospe“ wandern sie von einem bereits bestehenden Gefäß aus in die umgebende Matrix. Anschließend proliferieren sie am distalen Ende und formen so einen neuen Endothelzellstrang, welcher letztlich ein Lumen ausbildet mit Anschluss an den bestehenden Blutfluss. Bei diesen

Vorgängen spielen wiederum proteolytische Vorgänge sowie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte eine wichtige Rolle. Schließlich wandern Mesenchymzellen entlang der neu gebildeten Gefäßstruktur und differenzieren zu reifen Perizyten, welche das Gefäß von außen umfassen. Der Aufbau neuer Zell-Zell-Kontakte und extrazellulärer Matrix stabilisiert das entstandene Gefäß zusätzlich. Gefäße, die nicht von Perizyten ummantelt werden bzw. durch welche kein Blut fließt, bilden sich zurück. Nach diesem Reifungsprozess befinden sich die Endothelzellen wieder in einem ruhenden Zustand.

1.2.3 Pathologische Angiogenese

1.2.3.1 Angiogenese im Rahmen benigner Erkrankungen

Eine anhaltende und überschießende Angiogenese wurde als wichtiges Charakteristikum einer Reihe von gutartigen Erkrankungen wie der Psoriasis, diabetischen Retinopathie, altersbedingten Makuladegeneration oder rheumatoiden Arthritis identifiziert (Folkman, 1995; Ferrara et Alitalo, 1999). Umgekehrt kann eine reduzierte Produktion pro-angiogener Faktoren mit verminderter Angiogenese zu Wundheilungsstörungen führen (Nissen et al., 1998).

1.2.3.2 Angiogenese im Rahmen maligner Erkrankungen

Bereits 1971 formulierte Judah Folkman die Hypothese, dass das Wachstum eines Tumors abhängig ist von der Fähigkeit, die Bildung neuer Blutgefäße zu induzieren (Folkman, 1971). Er beschreibt ein langsames, lineares Wachstum von Tumoren in der „prävasculären“ Phase bis zu einer Größe von maximal 1-2 mm³. Um diese Ausdehnung zu überschreiten, reicht die Diffusion für die metabolische Versorgung des Tumors nicht mehr aus. Proliferations- und Absterberate befinden sich in diesem Stadium im Gleichgewicht. Erst wenn eine Vaskularisierung des neu entstandenen Gewebes stattgefunden hat, geht dieses in ein schnelles, exponentielles Wachstum über (Folkman, 1990). Weitere Studien untermauerten die Hypothese des Angiogenese-abhängigen Tumorwachstums: Durch Angiogenesehemmung erhöhte sich die Nekrose- bzw. Apoptoserate in Tumoren, das Tumorwachstum zeigte sich begrenzt (Brem et al., 1976; Kim et al., 1993; Millauer et al., 1996; Parangi et al., 1996).

Vermutlich spielen genetische Veränderungen, lokale Stressfaktoren (beispielsweise Hypoxie) sowie veränderte hämodynamische Bedingungen eine entscheidende Rolle in der tumorinduzierten Angiogenese (Papetti et Herman, 2002). Verschiebt sich unter diesen Gegebenheiten das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren zugunsten der die Angiogenese fördernden, so nimmt der Tumor mit dem Einsprossen neuer Blutkapillaren einen angiogenen Phänotyp an. Diesen Punkt bezeichnet man als „angiogenic switch“ (Hanahan et Folkman, 1996). Ursache des Ungleichgewichts ist sowohl die gesteigerte Freisetzung pro-angiogener Faktoren, als auch die verminderte Expression anti-angiogen wirkender Substanzen (Rastinejad et al., 1989; Bouck et al., 1996; Hanahan et Weinberg, 2000). Die Einflüsse von Tumorentität, lokalen Gegebenheiten sowie des Entwicklungsstadiums des Tumors auf das Zusammenspiel der beteiligten Zellen und Faktoren scheinen enorm (Carmeliet et Jain, 2000), sodass die zur Tumorangiogenese führenden Prozesse sehr heterogen ablaufen. Das Überwiegen pro-angiogener Faktoren wird jedoch generell als Ursache für die anormalen Charakteristika eines Tumorgefäßbetts angesehen, da die Tumorangiogenese unkontrolliert und ohne den stabilisierenden Reifungsprozess der neuen Gefäße abläuft (Jain, 2003).

1.2.4 Regulation der Angiogenese

1.2.4.1 Stimulatoren und Inhibitoren

Eine zentrale Rolle in der Regulation der Angiogenese wird dem pro-angiogenen Faktor VEGF (vascular endothelial growth factor) sowie den beiden Angiopoietinen Ang-1 und Ang-2 zugeschrieben (Marmé, 2001). Letztere konkurrieren um den Endothelzell-spezifischen Rezeptor TIE-2. Das konstitutiv exprimierte Ang-1 bewirkt via TIE-2-Bindung eine verstärkte Interaktion von Endothel und extrazellulärer Matrix sowie umgebenden Zellen. Daraus resultiert unter physiologischen Bedingungen ein ruhender Zustand des Endothels mit geringer Gefäßpermeabilität (Suri et al., 1996; Thurston et al., 1999). Das von den Endothelzellen selbst sezernierte Ang-2 hingegen führt via autokriner Stimulation des TIE-2-Rezeptors zu einer Destabilisierung der Gefäße (Holash et al., 1999). Die tatsächlichen Auslöser dieser Ang-2-Produktion sind unbekannt, eine mögliche

Rolle kommt von Tumorzellen sezerniertem VEGF zu (Marmé, 2001). Durch weitere pro-angiogene Faktoren können die destabilisierten Gefäße dann in ein proliferatives Stadium übergehen, wodurch ein Remodellieren des bestehenden Gefäßbetts in Gang gesetzt wird (Yankopoulos et al., 2000).

VEGF ist der bekannteste und am besten erforschte pro-angiogene Faktor, der aufgrund seiner permeabilitätssteigernden Wirkung auch als „vascular permeability factor“ (VPF) bezeichnet wird (Dvorak, 2002). Die in der Literatur allgemein verwendete Bezeichnung VEGF bezieht sich auf den Wachstumsfaktor VEGF-A. Heute sind sechs Isoformen dieses Wachstumsfaktors (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆) bekannt, welche durch alternatives Splicing der mRNA des Genlocus 6p21 entstehen (Vincenti et al., 1996; Robinson et Stringer, 2001). Diese Isoformen unterscheiden sich hinsichtlich unterschiedlicher Expression je nach Gewebe sowie ihrer biologischen und biochemischen Eigenschaften, z.B. Bindung an verschiedene Rezeptoren. Zu diesen Rezeptoren gehören die Rezeptortyrosinkinasen der VEGFR-Familie (VEGFR-1, -2 und -3) sowie die nicht-Kinase-Rezeptoren Neuropilin-1 und -2 (Papetti et Hermann, 2002).

Die weiteren fünf Mitglieder der VEGF-Familie VEGF-B, -C, -D und -E sowie PlGF (Maglione et al., 1991; Li et Eriksson, 2001; Shibuya, 2003) haben unterschiedliche Prozentzahlen von Aminosäuren mit VEGF-A gemein und vermitteln ihre Funktion ebenfalls über die Rezeptortyrosinkinasen der VEGFR-Familie sowie zumindest PlGF und VEGF-B auch über Neuropilin-1 (Papetti et Hermann, 2002). Deren physiologische Bedeutung ist bisher weitgehend ungeklärt und könnte teils auch in einer anti-angiogenen Wirkung liegen (z.B. VEGFR-1), teils in einer Beteiligung an der Regulation der Lymphangiogenese (z.B. VEGF-C, VEGFR-3) (Yankopoulos et al., 2000).

Neben VEGF, Ang-1 und Ang-2 sowie deren Rezeptoren ist an der Regulation der Angiogenese eine Vielzahl weiterer Faktoren beteiligt. Nachfolgende Tabelle 1.1 stellt eine Auflistung von für die Angiogenese als relevant identifizierten Molekülen dar, wobei sie keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt, sondern vielmehr die Komplexität dieses Vorgangs verdeutlichen soll. Diese Erkenntnisse stammen größtenteils aus *in vitro*-Experimenten oder Tiermodellen. Eine

Übertragbarkeit auf orthotop wachsende, humane Tumoren bzw. auf sämtliche Tumorentitäten ist somit nicht sicher gewährleistet.

Pro-angiogene Faktoren	Anti-angiogene Faktoren
VEGF	TSP-1/-2
PIGF	Angiostatin
aFGF/bFGF	Endostatin
PDGF	IL-4/-12
SF/ HGF	IFN- α /- γ
TGF- α /- β	TGF- β (?)
EGF	Ang-2
IGF-1	TIMP-1/-2
TNF- α	
IL-3/-8	
Östrogen	
G-/GM-CSF	
Ang-1	
NO	
MMP	

Tabelle 1.1: Beispiele für Stimulatoren und Inhibitoren der Angiogenese (modifiziert nach Liekens et al., 2001 sowie Papetti et Hermann, 2002)

Nach derzeitigem Wissensstand ist des Weiteren von einer hormonellen Beeinflussung der Angiogenese auszugehen. Die Hinweise auf einen via VEGF-Induktion vermittelten pro-angiogenen Effekt von Östrogen decken sich mit Beobachtungen präklinischer und klinischer Studien, welche für das Anti-Östrogen Tamoxifen eine anti-angiogene Wirkung zeigten (Morales et al., 1995; Nakamura et al., 1996; Spyridopoulos et al., 1997; Lindner et Borden, 1997; Makris et al., 1999; Marson et al., 2001). Während für Östrogen also generell von einem Angiogenese-fördernden Einfluss ausgegangen wird, ist die Datenlage für Progesteron nicht so eindeutig (Hyder, 2006). Im Rahmen der benignen zyklischen

Angiogenese des Endometriums scheint Progesteron in Kombination mit TGF- β den pro-angiogenen Faktor PD-ECGF (=TP) zu induzieren (Zhang et al., 1997). Andererseits wurde im Endometrium unter Progesteron aber auch eine gesteigerte Produktion des anti-angiogenen Faktors TSP-1 nachgewiesen (Iruela-Arispe et al., 1996). Hyder et al. konnten in der humanen Brustkrebszelllinie T47-D eine VEGF-Induktion durch Progesteron sowie verschiedene synthetische Progesteronanaloga demonstrieren, andere Zelllinien (z. B. MCF-7) zeigten jedoch keine derartige Reaktion (Hyder et al., 1998).

1.2.4.2 Einflussfaktoren

1.2.4.2.1 Hypoxie und Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF)

Die rasche Tumorzellproliferation führt in soliden Tumoren häufig zur Entstehung hypoxischer Bezirke. Reaktiv steigern die Zellen betroffener Bereiche die Transkription Hypoxie-abhängiger Gene. Diese sind an der Regulation von Glukosemetabolismus, Proliferation und Zellüberleben sowie Angiogenese beteiligt (Guillemin et Krasnow, 1997; Dang et Semenza, 1999; Semenza, 2002). Verantwortlich für die gesteigerte Expression Hypoxie-abhängiger Gene sind Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF), von denen die Isoform HIF-1 am besten untersucht ist. Dessen Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β können nur unter hypoxischen Bedingungen dimerisieren (Sutter et al., 2000). Der so entstandene Transkriptionsfaktor bindet dann an das „hypoxia response element“ (HRE) in der Promotorregion Hypoxie-abhängiger Gene (Semenza et Wang, 1992; Kimura et al., 2001), zu welchen auch das Gen des pro-angiogenen Faktors VEGF-A zählt (Ryan et al., 1998). Während Hypoxie einen physiologischen Stimulus für eine gesteigerte Expression der HIF-1 α -Untereinheit darstellt, können auch Mutationen im HIF-1 α -Gen und aktivierte Onkogene wie Src oder inaktivierte Tumorsuppressorgene wie VHL und p53 zu einer gesteigerten Wirkung des HIF-1-Transkriptionsfaktors führen (Jiang et al., 1997; Maxwell et al., 1999; Ravi et al., 2000), was für die Angiogeneseinduktion via HIF-1 in Tumoren von zusätzlicher Bedeutung sein könnte. Beim Mammakarzinom (sowie bei anderen Tumoren) konnte eine erhöhte HIF-1 α -Expression nachgewiesen werden (Zhong et al., 1999). Mit zunehmend schlechterer histologischer Differenzierung steigen die

HIF-1 α -Level an, erhöhte HIF-1 α -Level sind mit einer erhöhten Proliferationsrate und VEGF-Expression vergesellschaftet (Bos et al., 2001). Eine prognostische und prädiktive Relevanz der HIF-1 α -Überexpression ist beim Mammakarzinom ebenfalls in Betracht zu ziehen (Bos et al., 2003; Trastour et al., 2007).

1.2.4.2.2 Biomechanische Kräfte

Biomechanische Kräfte sind am Remodellierungsprozess von Gefäßen im Rahmen der Angiogenese ebenfalls beteiligt. Endothelzellen sind in der Lage, veränderte hämodynamische Bedingungen wahrzunehmen und darauf zu reagieren. Verschiedene *in vitro*-Modelle konnten zeigen, wie hämodynamische Kräfte die Struktur, Funktion und Proliferation von Endothelzellen beeinflussen. So bewirkt eine laminare Strömung lediglich eine Längsausrichtung der Endothelzellen in Richtung des Blutflusses, während eine turbulente Strömung einen Proliferationsreiz für Endothelzellen darstellt (Davies et al., 1986). Weitere Studien wiesen je nach Blutfluss eine veränderte Sekretion verschiedener Faktoren wie tPA, bFGF, PDGF-B und TGF- β nach (Diamond et al., 1990; Malek et al., 1993; Resnick et Gimbrone, 1995). Resnick et Gimbrone konnten in der Promotorregion des PDGF-B-Gens ein „shear stress response element“ (SSRE) identifizieren, welches unter der Einwirkung von Scherkräften nach Binden von Transkriptionsfaktoren die Transkriptionsrate dieses Gens in Endothelzellen erhöht. Diese DNA-Sequenz bzw. deren komplementäre Basenfolge wurde auch in anderen Genen von Proteinen mit Scherkräfte-abhängiger Induktion nachgewiesen, welche wie PDGF-B eine Rolle in der Angiogeneseregulation spielen (Resnick et Gimbrone, 1995). So kann gerade der unregelmäßige Blutfluss im Tumorgefäßbett die Angiogenese beeinflussen und erneut antreiben.

1.2.4.2.3 Onkogene und Tumorsuppressorgene

Das Protein des p53-Tumorsuppressorgens ist an der Inaktivierung der α -Untereinheit des HIF-1-Transkriptionsfaktors beteiligt. Eine Inaktivierung von p53 führt über erhöhte HIF-1 α -Spiegel zu einer gesteigerten VEGF-Transkription (Ravi et al., 2000). Auch für die Wirkung des pro-angiogenen Faktors bFGF konnte eine Relevanz von p53 via Modulation der bFGF-Expression

selbst bzw. der Expression des bFGF-BP nachgewiesen werden (Galy et al., 2001; Sherif et al., 2001). Andererseits werden anti-angiogene Faktoren wie Tsp-1 und GD-AIF unter p53-Wirkung vermehrt transkribiert (Velculescu et El-Deiry, 1996). Des Weiteren verstärkt die p53-vermittelte Transkriptionssteigerung von Kollagenhydroxylasen die Freisetzung anti-angiogen wirkender Fragmente aus verschiedenen Kollagentypen (Teodoro et al., 2007).

Das Genprodukt des VHL-Tumorsuppressorgens ist wiederum am O₂-abhängigen Abbau von HIF-1 α und somit an der Transkriptionsregulation verschiedener pro-angiogener Faktoren beteiligt (Maxwell et al., 1999).

Das Protoonkogen c-ets1 konnte in Endothelzellen bei verschiedenen Formen humaner Angiogenese einschließlich Tumor-induzierter Angiogenese nachgewiesen werden. Es ist an der Transkriptionsaktivierung von uPA sowie verschiedener MMPs beteiligt (Wernert et al., 1992; Takai et al., 2000).

Das Protoonkogen c-met, welches die Rezeptortyrosinkinase des SF/HGF kodiert, ist an mehreren Schritten der Angiogeneseregulation beteiligt (Ding et al., 2003; Kuhnen et al., 2003). Dessen pro-angiogene Wirkung erwies sich als abhängig von der Aktivierung des ets-1-Protoonkogens (Tomita et al., 2003).

Als weiteres Protoonkogen mit pro-angiogener Wirkung gilt c-erbB-2 durch Steigerung der VEGF-Produktion. Beispielsweise führte die ansteigende Dosierung eines neutralisierenden anti-HER-2/neu-Antikörpers zu einer dosisabhängigen Senkung der VEGF-Produktion in einer humanen ErbB-2/neu-transformierten Brustkrebs-Zelllinie (SKBR-3) (Viloria-Petit et al., 1997). Yen et al. konnten in Tumormodellen zeigen, dass unter den verschiedenen ErbB-Heterodimeren die Rezeptorkombinationen aus EGFR/ErbB-2 und aus ErbB-2/ErbB-3 die stärksten Induktoren der VEGF-mRNA-Expression darstellen (Yen et al., 2002). In einem dieser Tumormodelle (MCF7-ErbB-2) konnte nicht nur eine VEGF-Erhöhung unter ErbB-2-Überexpression, sondern auch eine signifikant höhere Gefäßdichte gegenüber den Kontrollen (MCF7-AP2) nachgewiesen werden.

Zahlreiche Onkogene und Tumorsuppressorgene vermitteln ihre Wirkung über die ras-raf-MAP-Kinase-Signalkaskade. Veränderungen der ras- bzw. raf-Expression selbst zeigten ebenfalls Einflüsse auf die Angiogeneseregulation.

Für mehrere pro-angiogene Faktoren wie zum Beispiel VEGF, TGF- α und TGF- β wurde eine gesteigerte Expression in Zellen mit einer aktivierenden ras-Mutation festgestellt (Rak et al., 1995). Eine Hypoxie-bedingte VEGF-Induktion wird durch eine Überexpression dieses Onkogens ebenfalls verstärkt (Mazure et al., 1996). Des Weiteren wurde in Endothelzellen eine unterschiedliche Aktivierung des raf-Protoonkogens durch bFGF bzw. VEGF gezeigt mit in der Folge vermindertem Ansprechen auf intrinsische bzw. extrinsische apoptotische Stimuli und daher gesteigertem Überleben der Endothelzellen (Alavi et al., 2003).

1.2.4.2.4 Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM)

Eine Tumordinfiltration durch Makrophagen ist ein gängiges Phänomen, wofür eine Reihe von Chemokinen verantwortlich ist (Murdoch et al., 2004). Aufgrund verschiedener, vom Tumor freigesetzter Faktoren kommen diese Makrophagen nicht ihrer eigentlichen immunologischen Abwehrfunktion nach, sondern wirken vielmehr immunsuppressiv und unterstützen das Wachstum des Tumors sowie die Tumor-induzierte Angiogenese, indem sie Proteasen, Wachstumsfaktoren und Zytokine freisetzen (Sunderkötter et al., 1994; Elgert et al., 1998; Mantovani et al., 2002). Leek et al. wiesen beim Mammakarzinom eine Korrelation von ansteigender Infiltration durch Makrophagen und erhöhter Mikrogefäßdichte sowie kürzerem krankheitsfreien und Gesamtüberleben nach (Leek et al., 1996). In einer weiteren Studie zeigte sich beim nodalnegativen Mammakarzinom eine Assoziation zwischen erhöhter Makrophageninfiltration und prognostisch ungünstigen Faktoren wie schlechter histologischer Differenzierung, Hormonrezeptornegativität und hoher Mitoserate (Volodko et al., 1998).

1.2.5 Tumorgefäßbett und Folgen der Tumor-induzierten Angiogenese

Charakteristischerweise sind die durch Tumorangiogenese entstandenen Gefäße strukturell und funktionell verändert: Erhöhte Permeabilität aufgrund von Fenestrationen im Endothel und Unterbrechungen in der Basalmembran, sowie teils blind endende, stark gewundene und dilatierte Gefäße resultieren in chaotischem, heterogenen Blutfluss und Gewebeödem (Hobbs et al., 1998; Hashizume et al., 2000; Papetti et Hermann, 2002). Aus diesem Grund können

Durchblutung und Stoffaustausch in stark vaskularisierten Tumoren schlechter sein als in normalem Gewebe. Die Vorstellung, der Tumor profitiere durch die Induktion der Angiogenese allein von der neu entstandenen Blutversorgung, wurde daher längst verlassen. Eine Vielzahl anderer Aspekte der Angiogenese verschafft dem Tumor weitere Vorteile: Die Zellen der neu entstandenen Blutgefäße sezernieren Wachstumsfaktoren wie bFGF, IGF-1 und PDGF, welche die Tumorzellen in parakriner Weise stimulieren. Des Weiteren bietet die Freisetzung von Proteasen im Rahmen der Angiogenese den Tumorzellen die Möglichkeit, in das umliegende Gewebe sowie in Lymph- und Blutgefäße einzuwandern (Weidner, 1995a; Fox et al., 2001). Auch aus den strukturellen und funktionellen Veränderungen des Tumorgefäßbetts lassen sich Vorteile für den Tumor ableiten: Die Undichtigkeit der Gefäße und ein teils mosaikartiger Aufbau aus Endothel- und Tumorzellen erleichtern die Gefäßinvasion und somit die metastatische Streuung des Tumors (Hashizume et al., 2000; Chang et al., 2000). Erhöhter interstitieller Druck und heterogener Blutfluss führen zu einer verminderten Wirksamkeit verschiedener Behandlungsansätze (Fox et al., 2001; Sauer et Deissler, 2003). Chemotherapeutika verteilen sich inhomogen innerhalb des Tumors, weshalb der optimale Wirkspiegel teilweise nicht erreicht wird und es zum Überleben einer kleinen Fraktion von Zellen kommen kann, welche letztlich zum Rezidiv führt (Jain, 1999). Eine Radiotherapie sowie die meisten zytotoxischen Medikamente zeigen in hypoxischem Gewebe eine geringere Effizienz (Vaupel, 2004; Brown et Giaccia, 1998; Jain, 2005). Außerdem fördern die entstehenden hypoxischen Bezirke im Tumorgewebe die Selektion eines hypoxieresistenten Phänotyps mit aggressiverem Verhalten und erhöhtem metastatischem Potential (Graeber et al., 1996; Giaccia, 1996; Bottaro et Liotta, 2003).

1.2.6 Angiogenese als Ansatzpunkt in der Malignomtherapie

Basierend auf Folkman's These des Angiogenese-abhängigen Tumorwachstums wurden Eingriffe in die Angiogeneseregulation als theoretische Möglichkeit einer Malignomtherapie identifiziert. Das Konzept hat sich in den vergangenen Jahren jedoch gewandelt. Während man durch den Einsatz von anti-angiogen

wirkenden Substanzen ursprünglich auf eine Zerstörung der Gefäßversorgung des Tumors und ein „Verhungern“ desselben hoffte, sprechen heutige Konzepte von einer Normalisierung des Tumorgefäßnetzes. Dadurch sollen dem Tumor oben beschriebene Vorteile dieser pathologischen Vaskularisierung genommen werden sowie konventionelle Therapien besser wirken können (Jain, 2005).

Mittlerweile ist für zahlreiche Chemotherapeutika eine anti-angiogene Wirkkomponente bekannt. Inwiefern diese unter den gängigen Therapieschemata tatsächlich an der tumorzerstörenden Wirkung dieser Medikamente beteiligt ist, wird jedoch kontrovers diskutiert (Miller et al., 2001; Kerbel et Kamen, 2004).

Der VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin®) hingegen stellt eine spezifische anti-angiogene Therapie dar. Dieser wird in Kombination mit einer Chemotherapie beispielsweise beim metastasierten Mammakarzinom, kolorektalen Karzinom und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom bereits mit Erfolg eingesetzt (Miller et al., 2005; Hurwitz et al., 2004; Sandler et al., 2006; Miller et al., 2007). Weitere anti-angiogene Medikamente mit unterschiedlichen Ansatzpunkten in der Angiogeneseregulation stehen ebenfalls in der Erprobung (Fox et al., 2007).

1.2.7 Quantitative Erfassung der Angiogenese

Es gibt drei Hauptansätze, die Angiogenese in Tumoren zu quantifizieren:

- Erfassung der Vaskularisierung am histologischen Präparat
- Erfassung der Expression pro-angiogener Faktoren
- Erfassung der Vaskularisierung mittels nicht-invasiver Bildgebung

Während die ersten beiden Ansätze auf der Anwendung immunchemischer Methoden an Blutproben oder histologischen Schnitten und deren quantitativer Auswertung beruhen, kommen bei den bildgebenden Verfahren beispielsweise MRT und PET zum Einsatz, um die Vaskularisierung eines Tumors *in vivo* zu erfassen (Pollitt et al., 2003).

Im Weiteren soll nur auf die Erfassung der Vaskularisierung am histologischen Präparat, wie in der vorliegenden Arbeit vorgenommen, eingegangen werden. Hierbei werden zunächst die Endothelzellen immunhistochemisch angefärbt. Als gängige Panendothelmarker gelten Antikörper gegen CD31, CD34 oder gegen das von-Willebrand-Faktor assoziierte Antigen (fVIIIIRA/vWF), welche sich

in ihrer Spezifität und Sensitivität hinsichtlich der Detektion von Gefäßen sowie in der Reproduzierbarkeit der Färbeergebnisse unterscheiden (Weidner 1995b; Uzzan et al., 2004; Martin et al., 1997b). Ein „perfekter“ Marker konnte bisher nicht gefunden werden. Neuere Marker wie CD105 (Endoglin) werden spezifisch auf Endothelzellen neu gebildeter Blutgefäße exprimiert und sind den Panendothelmarkern daher in der Erforschung der Angiogenese möglicherweise überlegen (Kumar et al., 1999; Beresford et al., 2006).

Im Anschluss an die immunhistochemische Färbung erfolgt deren quantitative Auswertung am Mikroskop, wobei ebenfalls verschiedene Methoden zur Verfügung stehen. Nach den Kriterien von Weidner erfolgt diese Auswertung im Bereich der höchsten Gefäßdichte, dem sogenannten „hot spot“, wodurch eine Vergleichbarkeit trotz der heterogenen Gefäßverteilung innerhalb eines Tumors sowie die Auswertung gerade der neovaskulären Areale erreicht werden soll (Weidner, 1995b). Dabei erhält man durch Auszählen der angefärbten Strukturen in einem definierten Bereich die Anzahl der Gefäße pro Fläche.

Eine weitere Methode zur quantitativen Abschätzung der Mikrogefäßdichte bietet der „Chalkley count“. Hierbei werden ebenfalls im „hot spot“ die Schnittpunkte der angefärbten Endothelstrukturen mit einem Messraster ausgezählt.

Neuere Methoden nutzen eine computergestützte Auswertung der Färbung mittels Bildanalyse-Systemen (Uzzan et al., 2004; Pollitt et al., 2005). Hierdurch können Subjektivität und zeitlicher Aufwand reduziert werden und darüber hinaus auch Flächen- bzw. Flächenanteilsberechnung der Gefäße im entsprechenden Bildausschnitt durchgeführt werden.

1.3 Bedeutung der Angiogenese beim Mammakarzinom

Ein detaillierteres Verständnis der Entstehung maligner Tumoren kann eine bessere Einschätzung des Krankheitsverlaufs ermöglichen und neue Therapieoptionen eröffnen. Die Tumorigenese wird heute als schrittweise Aneignung neoplastischer Eigenschaften durch eine Zellpopulation verstanden, welche dadurch schließlich einen malignen Phänotyp annimmt (Hanahan et Weinberg, 2000). Hanahan und Weinberg charakterisierten die Fähigkeit, Angiogenese zu induzieren, als eine der sechs fundamentalen Eigenschaften eines bösartigen

Tumors, welche dieser im Laufe des Malignisierungsprozesses erworben hat. Diese Fähigkeiten können zu ganz unterschiedlichen Zeitpunkten in der Tumorentstehung auftreten. Zahlreiche Studien beschäftigten sich daher mit der Relevanz der Angiogenese im Rahmen der Entstehung des Mammakarzinoms und dessen weiterem Verlauf.

Bereits bei gutartigen und präinvasiven Läsionen der Brustdrüse scheint die Angiogenese eine Rolle zu spielen. In den 70er-Jahren konnten experimentelle Studien Hinweise erarbeiten, dass präneoplastische Läsionen mit hoher angiogener Aktivität eher zum Karzinom fortschreiten als Läsionen ohne Angiogeneseinduktion (Gimbrone et Gullino, 1976; Brem et al., 1978). Eine spätere klinische Studie wies für fibrozystische Erkrankungen mit hoher Gefäßdichte ein höheres Risiko für ein späteres Mammakarzinom auf (Guinebretière et al., 1994). Beim duktalem Carcinoma in situ zeigte sich in Karzinomzellen eine höhere VEGF-Expression als in angrenzendem benignem Epithel, wobei eine hohe VEGF-Expression mit einer hohen Gefäßdichte vergesellschaftet war (Guidi et al., 1997). Engels et al. konnten für high-grade DCIS-Läsionen ein spezielles Gefäßmuster identifizieren, welches auf ein erhöhtes Rezidivrisiko hinweist (Engels et al., 1997). Die Aktivierung der Angiogenese könnte der Entstehung eines Karzinoms also bereits vorausgehen oder diesen Prozess sogar unterstützen. Durch die Erhebung der angiogenen Aktivität prä maligner/-invasiver Läsionen könnte daher eine Risikogruppe unter Patientinnen mit bislang gutartiger oder noch präinvasiver Erkrankung identifiziert werden.

Beim invasiven Mammakarzinom wird die quantitative Erfassung der Angiogenese derzeit vor allem als prognostischer Faktor diskutiert. Bereits 1991 wiesen Weidner et al. beim Mammakarzinom mit ihrer Methode der Gefäßdichtebestimmung eine Korrelation zwischen erhöhter Gefäßdichte und Metastasierung nach (Weidner et al., 1991) und schlugen daher die Gefäßdichte als prognostischen Faktor des Mammakarzinoms vor. Weitere Studien befassten sich ebenfalls mit der prognostischen Bedeutung dieses Faktors beim Mammakarzinom. Es wurden allerdings unterschiedliche Methoden zur Quantifizierung der Angiogenese angewendet, und nur zum Teil konnte ein prognostischer Wert bestätigt werden (Weidner et al., 1992; Bosari et al., 1992; Horak et al., 1992; Lipponen

et al., 1994; Martin et al., 1997b; de Jong et al., 2000). Andere ließen diesen vermissen (Axelsson et al., 1995; van Hoef et al., 1993; Guidi et al., 2002).

Die Quantifizierung der Tumorangiogenese für den Einsatz als prädiktiver Faktor beim Mammakarzinom wird ebenfalls diskutiert. Trotz plausibler Theorien für eine Resistenz stark vaskularisierter Tumoren gegenüber den gängigen medikamentösen Therapieansätzen beispielsweise auf der Grundlage des chaotischen Gefäßnetzes oder genetischen Veränderungen der hoch angiogenen Karzinome (s. Kapitel 1.2.5) konnten bisher keine einheitlichen Aussagen über einen prädiktiven Einsatz der Bestimmung der Gefäßdichte getroffen werden (Marson et al., 2001; Guidi et al., 2002; Tynninen et al., 2002; Beresford et al., 2006). Ob Angiogenesemarker das Ansprechen auf anti-angiogene Therapieansätze vorhersagen können, ist derzeit ebenfalls offen.

1.4 Ziel der Arbeit

Aufgrund der epidemiologischen Bedeutung des Mammakarzinoms und gleichzeitigen Heterogenität dieser Erkrankung ist die Identifikation prognostischer und prädiktiver Faktoren unerlässlich, um für unterschiedlichste Patientinnen die jeweils richtige Therapieentscheidung treffen zu können. Wie bei anderen Krebserkrankungen wird auch beim Mammakarzinom eine Relevanz der Angiogenese bezüglich Pathogenese und Verlauf der Erkrankung als wahrscheinlich angesehen. Ebenso wird über eine Resistenz stark vaskularisierter Tumoren gegenüber konventionellen Therapien spekuliert. Das Verständnis Angiogenese-beeinflussender Vorgänge *in vivo* bleibt bis dato jedoch lückenhaft.

An einem Kollektiv von 94 primär systemisch behandelten Patientinnen mit Mammakarzinom stellte die vorliegende Arbeit daher zum einen die Frage nach einer möglichen prädiktiven Aussagekraft der Angiogenesemarker „Gefäßdichte“ sowie „Gefäßflächenanteil“ hinsichtlich des Ansprechens auf eine Chemo- bzw. Hormontherapie. Zum anderen erfolgte eine Verlaufsbeobachtung dieser Gefäßparameter unter den beiden Therapieansätzen. Als dritter Punkt wurde ein Zusammenhang des Parameters „Gefäßdichte“ mit den immunhistochemischen Faktoren MIB-1, p53 sowie c-erbB-2 beim Mammakarzinom untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Patientinnenkollektiv und Therapie

Die vorliegende Arbeit untersuchte Gewebeproben und Daten eines retrospektiv zusammengestellten Kollektivs von 94 Patientinnen des Brustzentrums der Universitätsfrauenklinik in Tübingen, bei denen zwischen Juli 1998 und Mai 2002 ein lokal fortgeschrittenes Mammakarzinom (T2-T4) diagnostiziert und nach histologischer Diagnosesicherung eine primär systemische Therapie durchgeführt wurde. Bei 62 Patientinnen des Kollektivs war diese in Form einer neoadjuvanten Chemotherapie (AT, ET oder EC; s. Tabelle 2.1) mit jeweils sechs Zyklen im Abstand von drei Wochen erfolgt, sofern ein Zyklus nicht wegen einer Leukopenie (<1000 Leukozyten/ μl) verschoben werden musste.

Abkürzung	Medikamente	Dosierung
AT	Adriamycin (Doxorubicin) Taxotere [®] (Docetaxel)	50 mg / m ² Körperoberfläche 75 mg / m ² Körperoberfläche
ET	Epirubicin Taxol [®] (Paclitaxel)	60 mg / m ² Körperoberfläche 175 mg / m ² Körperoberfläche
EC	Epirubicin Cyclophosphamid	60 mg / m ² Körperoberfläche 600 mg / m ² Körperoberfläche

Tabelle 2.1: Therapieschemata der primär systemischen Chemotherapie

Bei den übrigen 32 Patientinnen des Kollektivs waren Letrozol oder Exemestan (s. Tabelle 2.2) im Sinne einer neoadjuvanten Hormontherapie eingesetzt worden. Die Gabe dieser Aromataseinhibitoren erfolgte täglich für vier bzw. in Einzelfällen für bis zu sechs Monate. Voraussetzungen für die Hormontherapie waren Postmenopausen- und positiver Hormonrezeptorstatus.

Medikamente	Dosierung
Femara [®] (Letrozol)	2,5 mg täglich
Aromasin [®] (Exemestan)	25 mg täglich

Tabelle 2.2: Therapieschemata der primär systemischen Hormontherapie

Nach Abschluss der primär systemischen Therapie unterzogen sich die Patientinnen einer operativen Behandlung in Form einer brusterhaltenden Therapie mit anschließender Bestrahlung oder einer Mastektomie. Für die vorliegende Arbeit standen daher sowohl prätherapeutische Stanz- als auch posttherapeutische Operationspräparate zur Verfügung.

Anhand der Therapiemodalität konnten die Patientinnen in eine Chemo- und eine Hormontherapiegruppe eingeteilt werden.

Aus den zugehörigen Patientenakten und histopathologischen Befunden wurden das Patientenalter bei Diagnose, die Modalität der neoadjuvanten Therapie, die sonographisch bzw. histopathologisch bestimmte Tumorgöße, die histologische Tumorklassifikation, das Tumorstadium und -grading sowie die routinemäßig bestimmten immunhistochemischen Parameter entnommen. Diese Daten standen bereits aus der Dissertation von Anja Schönfelder zur Verfügung, welche am selben Kollektiv, mit Ausnahme einer zusätzlichen Patientin in der vorliegenden Arbeit, eine Untersuchung zur Expression der Carboanhydrase IX sowie der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF) 1 α und 2 α durchgeführt hatte (Schönfelder, 2007).

2.2 Histologie der Tumoren

2.2.1 Histopathologische Befunde

Für die Einteilung des histologischen Tumortyps nach der WHO-Nomenklatur wurde die Diagnose des OP-Präparats übernommen, da hier eine größere Tumorphäche für die Beurteilung zur Verfügung steht. Mit „invasiv duktulo-lobulär“ bezeichnete Karzinome im histopathologischen Befund wurden in die Kategorie der invasiv duktaalen Karzinome eingeordnet.

Die Stadieneinteilung der Tumoren erfolgte nach der TNM-Klassifikation der UICC (Union internationale contre le cancer), wobei die mit M bezeichneten Fernmetastasen in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt wurden. In die pTN-Klassifikation gingen die maximale Ausdehnung der invasiven Komponente im histologischen Operationspräparat sowie die histologische Untersuchung

von mindestens 10 axillären Lymphknoten ein. Die Bezeichnung ypTN steht für die histopathologische Einschätzung nach primär systemischer Therapie.

Um den histologischen Differenzierungsgrad der untersuchten Tumoren zu erfassen, wurde die von Elston und Ellis erarbeitete Modifikation des Gradings nach Bloom und Richardson angewendet (Bloom et Richardson, 1957; Elston et Ellis, 1991). Je nach Ausprägung werden hierbei den morphologischen Merkmalen Tubulusbildung, nukleäre Pleomorphie und Mitoserate Punktwerte von 1 bis 3 zugewiesen und diese anschließend addiert, sodass ein Gesamtscore mit Werten von 3 bis 9 möglich ist. Anhand dieses Scores wird das Grading folgendermaßen festgelegt (s. Tabelle 2.3):

Summe	Grading	Differenzierung
3 bis 5	G1	gut differenziert
6 oder 7	G2	mäßig differenziert
8 oder 9	G3	schlecht differenziert

Tabelle 2.3: Grading (Elston et Ellis, 1991)

G1-Karzinomen wird ein niedriger Malignitätsgrad zugeordnet, G3-Karzinome gelten als hoch maligne, dazwischen liegen die Karzinome der Kategorie G2.

Des Weiteren wurden den histopathologischen Befunden sowohl für das Stanz- als auch das OP-Präparat folgende routinemäßig bestimmten immunhistochemischen Parameter entnommen: ER, PgR, p53, bcl-2, MIB-1 und c-erbB2.

2.2.2 Immunhistochemie

2.2.2.1 Allgemeines zur Immunhistochemie

Die Färbemethoden der Immunhistochemie basieren auf der spezifischen Bindung von Antikörpern an ein nachzuweisendes Antigen im untersuchten Gewebe und anschließender Visualisierung dieser Bindung durch Farbreaktion eines Substrats mit einem an den Antikörper gebundenen Enzym. Prinzipiell ist eine direkte und eine indirekte Methode zu unterscheiden (Boenisch, 2003):

Bei der älteren direkten Methode ist bereits an den gegen das Gewebean-tigen gerichteten Antikörper selbst ein Enzym gekoppelt (enzymmarkierter Primär-

antikörper). Nach dessen Bindung an das nachzuweisende Antigen erfolgt die Zugabe eines spezifischen Substrats mit anschließender Enzym-Substrat-Reaktion, wodurch das zunächst farblose Chromogen in ein gefärbtes Endprodukt überführt wird. Abgesehen von der raschen Durchführung (nur eine Antikörper-Inkubation) liegt der Vorteil dieser Methode darin, dass selten unspezifische Reaktionen auftreten. Allerdings bindet pro darzustellendes Antigen nur ein Antikörper, sodass keine Amplifikation des Signals möglich ist.

Bei der indirekten Methode hingegen ist der Primärantikörper nicht mit einem Enzym markiert. Erst ein gegen den Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper trägt das entsprechende Enzym. Nach dessen Bindung an den Primärantikörper erfolgt wiederum durch Substratzugabe die erwünschte Farbreaktion. Diese kann im Vergleich zur direkten Methode verstärkt ausfallen, da mehrere enzymmarkierte Sekundärantikörper an verschiedene Epitope des Primärantikörpers binden und somit eine größere Anzahl von Enzymmolekülen pro Antigen gebunden werden kann. Hierdurch wird eine höhere Sensitivität erreicht, weshalb die indirekte Methode die direkte weitestgehend abgelöst hat.

In der vorliegenden Arbeit wurden die immunhistochemischen Färbungen nach der Avidin-Biotin-Enzymkomplex-Methode (ABC-Methode) durchgeführt, welche zu den indirekten Methoden zählt (Hsu et al., 1981). Grundlage dieser Färbemethode ist die hohe Affinität von Avidin (Hühnereiweiß) für Biotin. An einen gegen das darzustellende Antigen gerichteten unkonjugierten Primärantikörper bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper. Anschließend bindet ein Avidin-Biotin-Enzym-Komplex an das Biotin des Sekundärantikörpers. Durch Zugabe des Substrats entsteht an der Stelle des Enzym-Komplexes der farbliche Niederschlag. Als Enzym und Substrat dienten in der vorliegenden Arbeit Peroxidase und Diaminobenzidin (DAB). Dieses wird durch die Peroxidase gespalten, sodass sich ein bräunlicher Niederschlag ergibt, welcher anschließend lichtmikroskopisch ausgewertet werden kann.

2.2.2.2 Gewebe

Die Gewebeproben für die vorliegende Untersuchung entstammten dem Archiv des Instituts für Pathologie der Universität Tübingen. Ausgewählt wurden dieje-

nigen Paraffinblöcke, von denen bereits die Schnitte für die routinemäßige Bestimmung oben genannter immunhistochemischer Parameter angefertigt worden waren, um eine Vergleichbarkeit der erhobenen Daten zu erzielen. Von den ausgewählten Paraffinblöcken wurden circa 4 µm dicke Schnitte (Schlittenmikrotom Leica SM 2000R) angefertigt, auf Spezialobjektträger der Firma Sigma, USA (Silane Prep TM Slides, Best.-Nr. S4651) aufgebracht und bei 37°C über Nacht im Brutschrank getrocknet.

2.2.2.3 Immunhistochemische Darstellung der Gefäße

Für die immunhistochemische Darstellung der Blutgefäße wurde ein gegen das Oberflächenantigen CD34 gerichteter monoklonaler Mausantikörper der Firma Dako Deutschland GmbH (Isotyp: IgG1; Klon: QBEnd-10; Prod.-Code: M 7165) eingesetzt, welcher für die Markierung von Kapillarendothel als geeignet gilt.

Die Färbungen wurden im immunhistochemischen Labor des Instituts für Pathologie der Universität Tübingen vorgenommen, wobei der erste Durchgang von Färbungen mit Hilfe der halbautomatischen Immunfärbestation Genesis RSP 100 (Tecan Trading AG, Schweiz) erfolgte. Entparaffinierung (Xylol 2 x 10 min), Hydrierung in absteigender Alkoholreihe (je 2 x 5 min Ethanol 100%, 96%, 70%, dann Spülen in Aqua dest.), sowie die Antigendemaskierung in Citratpuffer (0,01-molar; pH=6,0; 4 min im Dampftopf) wurden außerhalb des Geräts vorgenommen. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur noch im Citratpuffer folgten Spülschritte mit Aqua dest. (5 min) und TRIS-Puffer (0,05-molar; pH=7,6; 2 x 5 min). Im Gerät selbst erfolgte dann die auf der ABC-Methode beruhende Färbung mittels der Reagenzien des ZytoChemPlus (HRP) Broad Spectrum Bulk Kit (Zytomed, Berlin), wobei als CD34-Primärantikörper (verdünnt 1:100 in Antikörper-Diluent der Firma Zytomed, Berlin; 1h bei Raumtemperatur) oben genanntes Produkt der Firma Dako eingesetzt wurde. Für die jeweils zwischengeschalteten Waschschrte wurde TRIS-Puffer mit 0,05% Tween[®] 20 (Sigma, USA) verwendet. Die anschließende Gegenfärbung (Hämatoxylin nach Harris; 25 sec) geschah wiederum außerhalb des Geräts. Danach wurden die Schnitte in Ammoniak-Alkohol gebläut (6 ml Ammoniak auf 200 ml Ethanol 70%), in auf-

steigender Alkoholreihe dehydriert, in Xylol gelagert und dann in Pertex[®] (Medite, Deutschland) eingedeckt.

Später durchgeführte Färbungen beispielsweise aufgrund abgeschwommener Schnitte im ersten Färbedurchgang der Präparate erfolgten voll automatisiert im Färbeautomaten BenchMark[®]XT (Ventana Medical Systems, USA) im Institut für Pathologie der Universität Tübingen. Das Färbeprotokoll ist maschinell vorgegeben und beruht ebenfalls auf der ABC-Methode. Für die Antigendemaskierung kam hierbei TBE-Puffer (pH=8,4; CC1 von Ventana Medical Systems, USA) zum Einsatz. Als Primärantikörper wurde wiederum oben beschriebenes Produkt von Dako verwendet, dessen Verdünnung (1:100 in Antikörper-Diluent der Fa. Zytomed, Berlin) im Institut für Pathologie selbst angesetzt und dann in gerätetypische Spender (prep-Kit) der Firma Ventana abgefüllt wurde. Im Rahmen des automatischen Färbelaufs dauerte die Inkubation mit dem Primärantikörper 32 min bei 37°C. Die Gegenfärbung (Hämatoxylin nach Gills) geschah noch im Gerät. Anschließend wurden die Objektträger herausgenommen und in warmem Wasser mit Pril vom Ölfilm befreit. Darauf folgten Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe, Lagerung in Xylol und Eindecken in Pertex[®] (Medite, Deutschland).

Nach den Erfahrungen des immunhistochemischen Labors des Instituts für Pathologie führen die beiden Färbeverfahren zu identischen Ergebnissen.

2.2.2.4 Immunhistochemie der übrigen Parameter

Die immunhistochemischen Färbungen der übrigen Parameter (ER, PgR, p53, bcl-2, Ki-67 und c-erbB2), deren Ergebnisse aus den histopathologischen Befunden entnommen wurden, waren ebenfalls nach oben beschriebener ABC-Methode auf der Immunfärbestation Genesis RSP 100 (Tecan Trading AG, Schweiz), aber unter Verwendung des VECTASTAIN[®] Universal Elite[®] ABC-Peroxidase Kit (Vector Laboratories, USA) durchgeführt worden. Die jeweiligen Antikörper sowie deren Verdünnungen sind aus Tabelle 2.4 ersichtlich:

Marker	Bezugsquelle	Produkt-Code	Verdünnung (in TRIS)
ER	Novocastra	NCL-ER-6F11	1:100
PgR	Novocastra	NCL-PgR-312	1:300
p53	Novocastra	NCL-p53-DO7	1:75
bcl-2	Dako	M 0887	1:200
Ki-67	Dako	M 7240	1:200
c-erbB-2	Dako	M 0485	1:1000

Tabelle 2.4: Verwendete Primärantikörper

2.3 Quantitative Auswertung der Anti-CD34-Färbung

2.3.1 Aufsuchen der „hot spots“

Die mit CD34-Antikörper angefärbten Schnitte wurden am Mikroskop zunächst bei 50-facher (5x Objektiv/ 10x Okular) und anschließend bei 100-facher (10x Objektiv/ 10x Okular) Vergrößerung durchgescannt, um innerhalb des invasiven Tumors den Bereich mit der höchsten Dichte von deutlich dargestellten Gefäßen („hot spot“) aufzufinden, welcher anschließend ausgewertet werden sollte. Wenn mehrere stark vaskularisierte Bereiche zur Verfügung standen, wurden diese wiederholt bei wechselnder Vergrößerung und eventuell unter Zuhilfenahme des Bildes am Monitor des Bildanalyse-Systems miteinander verglichen, bevor der auszuwertende „hot spot“ festgelegt wurde. Diese Festlegung fand ohne Wissen um die Zugehörigkeit zur Therapiegruppe sowie um die weiteren klinischen und immunhistochemischen Parameter der jeweiligen Patientin statt.

2.3.2 Computerassistierte Bildanalyse

2.3.2.1 Bildeinzug

Die Auswertung der angefärbten Schnitte erfolgte semiautomatisch mit Hilfe eines morphometrischen Bildanalyse-Systems (Firma Leica Microsystems: Leica Q550 IW), welches im Zentrum für medizinische Forschung (ZMF) der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt wurde. Aus dem wie oben beschrieben ausgewählten „hot spot“ wurden unter 200-facher (20x Objektiv/ 10x Okular)

Vergrößerung am Mikroskop mittels einer in das Mikroskop integrierten digitalen Kamera (Leica DC 300F) 3 aneinandergrenzende Ausschnitte mit einer Fläche von je $\sim 0,24 \text{ mm}^2$ aufgenommen und an die Analyse-Software (Leica QWin) gesendet, sodass insgesamt ein $\sim 0,71 \text{ mm}^2$ messender Tumorausschnitt für die Auswertung zur Verfügung stand (Weidner, 1995b).

2.3.2.2 Automatische Vormarkierung der Endothelzellen

Im Rahmen des Analyseprogramms war eine Farbschwelle (red/green/blue) so festzulegen, dass alle braun erscheinenden Strukturen des ausgewählten Tumorausschnitts im Programmablauf automatisch vormarkiert wurden. So stand für die weitere Auswertung eine nützliche Orientierungshilfe zur Verfügung.

2.3.2.3 Manuelle Nachbearbeitung der vormarkierten Gefäße

Im Anschluss an die automatische Vormarkierung aller bräunlichen Strukturen erfolgte deren manuelle Nachbearbeitung. Unter nochmaliger Betrachtung des Schnittes am Mikroskop wurden fälschlicherweise vormarkierte, nicht vaskuläre Strukturen demarkiert und dadurch von der Zählung und der Flächenberechnung ausgeschlossen. Dann folgte die manuelle Nachbearbeitung der vormarkierten Gefäßstrukturen. Nach den von Weidner et al. inaugurierten Kriterien für eine standardisierte quantitative Auswertung wurden Gefäße in sklerotischen, hypozellulären Bereichen innerhalb des Tumors sowie in unmittelbar benachbartem gesundem Brustgewebe nicht berücksichtigt (Weidner et al., 1991; Weidner, 1995b). Wiederum nach den Kriterien dieser Arbeitsgruppe galt jede braun erscheinende Endothelzelle beziehungsweise jeder Endothelzellhaufen, der sich eindeutig getrennt von benachbarten Gefäßen, Tumorzellen oder Bindegewebsstrukturen darstellte, als einzelnes zählbares Gefäß. Ebenso wurden einzeln gelegene Endothelzellhaufen, die mutmaßlich zum selben, sich mehrfach durch den Schnitt schlängelnden Gefäß gehörten, als einzelne und zählbare Gefäße markiert und als solche in die Berechnungen hinein genommen. Ein sichtbares Gefäßlumen oder das Vorhandensein von Erythrozyten waren für die Definition als Gefäß nicht notwendig.

Die mangels Färbung nicht vormarkierten Lumina der Gefäße wurden als zur Gefäßfläche gehörend nachmarkiert, um in die Flächenberechnung einzugehen, während die Erfassung der Anzahl der Gefäße hiervon unbeeinflusst blieb. Anhand der am Ende dieses Schrittes markierten einzelnen vaskulären Areale berechnete die Analyse-Software die Anzahl der Gefäße und erfasste deren Flächenverteilung. Dies geschah zunächst separat für jeden der drei Ausschnitte à $\sim 0,24 \text{ mm}^2$ und wurde anschließend für das gesamte Areal addiert.

2.3.2.4 Markierung des Messareals

Um die Anzahl der Gefäße sowie deren Gesamtfläche mit der tatsächlichen Tumorfläche des jeweiligen Bildausschnitts in Bezug setzen zu können, wurde in einem weiteren Schritt das Messareal (Areafeld) markiert, da nicht immer der gesamte Bildausschnitt von Tumorgewebe ausgefüllt war. Hierbei wurden nur zelluläre Anteile des Bildausschnitts berücksichtigt. Durch manuelle Demarkierung wurden Areale von Fettzellen sowie Bereiche, die durch das Schneiden Risse aufwiesen oder übereinanderlappten, vom Messareal ausgeschlossen. Ebenso gingen die Lumina großer Ductus, sowie bereits oben genannte sklerotische, hypozelluläre Bereiche innerhalb des Tumors bzw. Areale von angrenzendem, gutartigem Mammagewebe nicht in die Flächenberechnung des Messareals ein. Dies geschah wiederum zunächst für jeden der drei Ausschnitte separat, um anschließend addiert zu werden.

2.3.2.5 Automatische Auswertung der Gefäßparameter

Anhand der bereits berechneten Anzahl der Gefäße und deren Flächen sowie der nachfolgend definierten Fläche des Messareals lieferte das Analyseprogramm die Verteilung der Gefäßflächen sowie folgende Parameter als Summe der jeweiligen Werte aus den drei Bildausschnitten (s. Tabelle 2.5):

Parameter	Definition	Maßeinheit
Count	Gesamtanzahl der Gefäße	
Area	Gesamtfläche der Gefäße	µm ²
Areafield	Gesamtfläche der 3 Messareale	µm ²
MeanArea	Durchschnittliche Gefäßfläche (Area/Count)	µm ²
Area%	Prozentualer Anteil der Gesamtfläche der Gefäße (Area) am gesamten Messareal (Areafield)	%
xGefäß/mm ²	Anzahl der Gefäße pro mm ²	1/mm ²

Tabelle 2.5: Output des Analyseprogramms

Der Parameter xGefäß/mm² stellt eine fiktive Größe dar. Hierbei werden die gezählten Gefäße (Count) mit der Fläche des Messareals (Areafield), welche die tatsächliche Fläche des Tumors und nicht die Fläche des Bildausschnitts widerspiegelt, in Bezug gesetzt und die theoretische Anzahl von Gefäßen pro Quadratmillimeter der Tumorfäche nach folgender Formel berechnet:

$$xGefäß/mm^2 = \frac{Count \times 10^6}{Areafield}$$

In die Auswertung der vorliegenden Arbeit gingen die Gefäßdichte (xGefäß/mm²) sowie der prozentuale Anteil der Gesamtfläche aller Gefäße am Messareal (Area%) ein. Dieser Flächenparameter wurde für die Auswertung dem Mittelwert der Gefäßflächen (MeanArea) vorgezogen, da der Mittelwert sehr empfindlich ist gegen Ausreißer, welche durch die Flächenmessung längs angeschnittener Gefäße zustande kommen können, ohne das tatsächliche Kaliber des entsprechenden Gefäßes für die Mittelwertsberechnung zu berücksichtigen.

2.4 Quantitative Auswertung der übrigen Färbungen

Die übrigen immunhistochemischen Färbungen wurden dichotom als entweder positiv oder negativ bewertet.

Bei den Hormonrezeptoren ER und PgR wurde der Immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner eingesetzt (Remmele et Stegner, 1987). Für die Berechnung dieses Scores werden die Merkmale Prozentsatz der positiven Zel-

len sowie Färbeintensität mit Punkten bewertet. Der IRS ergibt sich als Produkt dieser Punktwerte. Ist mindestens einer der beiden Hormonrezeptoren positiv, so gilt auch der Hormonrezeptorstatus als positiv.

Bei den immunhistochemischen Parametern p53, bcl-2 und MIB-1 war allein der Prozentsatz positiver Zellen ausschlaggebend (s. Tabelle 2.6).

Um die Expression des Onkoproteins c-erbB-2 quantitativ zu erfassen, wurde wiederum ein Score, der HercepTest™-Score (Firma Dako Dänemark), herangezogen. In diesen Score geht neben dem Prozentsatz positiver Tumorzellen das Färbemuster der Membranfärbung hinsichtlich Intensität und Vollständigkeit ein.

Tabelle 2.6 zeigt die Schwellenwerte des jeweiligen Prozentsatzes/Scores zur Einteilung in die Kategorien „positiv“ bzw. „negativ“ (Colleoni et al., 1999; Briffod et al., 2000).

Faktor	ER	PgR	P53	bcl-2	MIB-1	c-erbB-2
positiv	≥ 3	≥ 3	> 10%	> 10%	> 20%	3+
negativ	< 3	< 3	≤ 10%	≤ 10%	≤ 20%	< 3+

Tabelle 2.6: Dichotome Bewertung der immunhistochemischen Routineparameter

2.5 Pathologische Response

Um das Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie quantitativ zu erfassen, wurde durch Vergleich von prä- und posttherapeutischer Tumorgroße die prozentuale Größenänderung des Primärtumors berechnet. Um die beiden Therapieformen hinsichtlich des Ansprechens besser vergleichen zu können, erfolgte je nach prozentualer Größenänderung eine Klassifizierung des Ansprechens in Gruppen, wie aus nachfolgender Tabelle 2.7 hervorgeht (modifiziert nach Kue-
rer et al., 2000).

Therapieansprechen	Abkürzung	Definition
Complete Remission	pCR	Kein Nachweis eines invasiven oder in situ-Karzinoms im OP-Präparat
Carcinoma in situ	T _{is}	Kein invasives, aber ein in situ-Karzinom im OP-Präparat nachweisbar
Partial response	PR	Verringerung der Tumorgroße um $\geq 50\%$
Minor response	MR	Verringerung der Tumorgroße um $> 10\%$, aber nicht um $\geq 50\%$
No change/ stable disease	NC/SD	Änderung der Tumorgroße um max. $\pm 10\%$
Progressive disease	PD	Zunahme der Tumorgroße um $> 10\%$

Tabelle 2.7: Therapieansprechen in modifizierter Form nach Kuerer et al., 2000

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm JMP[®] Version 7.0 der Firma SAS durchgeführt.

Der Vergleich des Verlaufs der Gefäßparameter in den beiden Therapiegruppen erfolgte anhand eines 2-Stichproben-T-Tests, welcher erlaubt, dass die Varianzen in den beiden Gruppen unterschiedlich sind.

Um eine mögliche prädiktive Wertigkeit der Gefäßparameter zu überprüfen, kam die Regressionsanalyse zum Einsatz, wobei die 95%-Konfidenzintervalle für die individuelle Vorhersage angegeben sind.

Die Ausprägung der Gefäßparameter in Abhängigkeit der immunhistochemischen Faktoren MIB-1, p53 und c-erbB-2 wurde mittels Rangsummentest nach Wilcoxon untersucht.

Als Signifikanzniveau galt bei allen Untersuchungen ein p-Wert $\leq 0,05$.

3 Ergebnisse

Die unter 3.1 und 3.2 dargestellten Daten standen - mit Ausnahme einer zusätzlichen Patientin in der vorliegenden Arbeit - aus der Dissertation von Anja Schönfelder zur Verfügung (Schönfelder, 2007).

3.1 Patienten- und Tumorcharakteristika

3.1.1 Altersverteilung im Patientenkollektiv

Insgesamt umfasste das Kollektiv der vorliegenden Arbeit 94 Patientinnen mit der Primärdiagnose eines lokal fortgeschrittenen Mammakarzinoms. Zum Zeitpunkt der Diagnose lag das Patientenalter durchschnittlich bei 56,5 Jahren (Median: 57,5 Jahre). Die jüngste Patientin erkrankte mit 27 Jahren, die älteste Patientin war 84 Jahre alt. Das Erkrankungsmaximum lag in der 7. Lebensdekade. 3 Patientinnen der Hormontherapiegruppe ließen keine Operation durchführen, daher bestand das posttherapeutische Kollektiv aus 91 Patientinnen.

3.1.2 Prä- und posttherapeutische Tumorgroße und T-Stadium

Die prätherapeutische Tumorgroße wurde sonographisch als größter Tumordurchmesser erfasst. Dabei ergaben sich Werte von 1,0 bis 11,0 cm mit dem Median bei 3,1 cm.

Das Stadium T2 konnte prätherapeutisch in 55 Fällen (58%) diagnostiziert werden, das Stadium T3 in 10 Fällen (11%) und das Stadium T4 in 29 Fällen (31%).

Für die posttherapeutische Tumorgroße war der größte Durchmesser des invasiven Tumors im histologischen OP-Präparat ausschlaggebend. 10 Patientinnen wiesen nach der primär systemischen Therapie keinen invasiven Tumor mehr auf (pCR, ypT_{is}). Ansonsten zeigten sich Werte zwischen 0,2 und 9,0 cm mit dem Median bei 2,2 cm.

Im Gegensatz zur prätherapeutischen Verteilung der T-Stadien wiesen nach der primär systemischen Therapie 28 Patientinnen (31%) einen T1-Tumor auf (s. Abbildung 3.1).

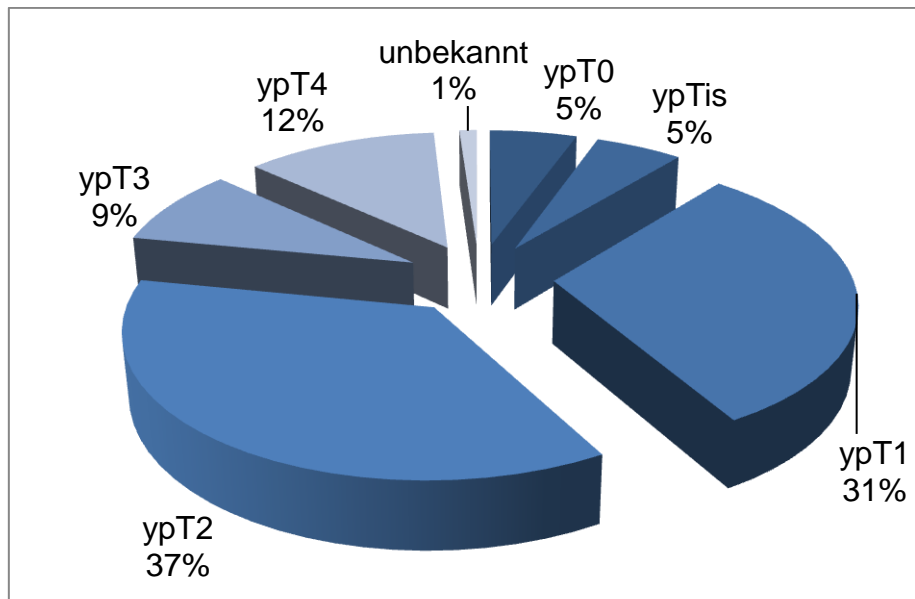


Abbildung 3.1: Verteilung des ypT-Stadiums (n=91)

3.1.3 Histologie und Grading

Die prätherapeutische Verteilung des histologischen Differenzierungsgrads der Karzinome geht aus Tabelle 3.1 hervor.

Grading	Häufigkeit	
	Absolut	Relativ
G1	1	1,1%
G2	65	69,1%
G3	20	21,3%
unbekannt	8	8,5%

Tabelle 3.1: Prätherapeutische Verteilung des histologischen Gratings (n=94)

Für die Erfassung des histologischen Tumortyps wurde die posttherapeutische Diagnose aus dem histopathologischen Befund des Operationspräparats übernommen, wobei sich die invasiv duktales Karzinome als häufigster histologischer Tumortyp erwiesen. Bei 10 Patientinnen (11%) konnte im OP-Präparat kein invasiver Tumor mehr nachgewiesen werden (pCR, ypT_{is}).

Das posttherapeutische Grading konnte bei 74 Tumoren bestimmt werden. Davon lagen in 64,9% (n=48) mäßig differenzierte, in 32,4% (n=24) der Fälle

schlecht differenzierte Karzinome vor. Lediglich 2 Karzinome wiesen eine gute Differenzierung auf (2,7%). In den 10 Fällen ohne invasives Karzinom im OP-Präparat (pCR, ypT_{is}) konnte kein histologischer Differenzierungsgrad bestimmt werden. In nachfolgender Tabelle 3.2 ist die Verteilung des posttherapeutischen Differenzierungsgrads auf die verschiedenen histologischen Tumortypen aufgeführt.

Histologie	Grading	Häufigkeit	
		Absolut	Relativ
invasiv duktales Karzinom (n=57)	G1	1	2%
	G2	36	63%
	G3	16	28%
	unbekannt	4	7%
invasiv lobuläres Karzinom (n=16)	G1	0	0%
	G2	10	62,5%
	G3	4	25%
	unbekannt	2	12,5%
invasiv tubuläres Karzinom (n=3)	G1	1	33,3%
	G2	1	33,3%
	G3	0	0%
	unbekannt	1	33,3%
invasiv medulläres Karzinom (n=2)	G3	2	100%
invasiv papilläres Karzinom (n=1)	G2	1	100%
unbekannt (n=2)	G3	2	100%

Tabelle 3.2: Verteilung des posttherapeutischen Differenzierungsgrads auf die histologischen Tumortypen (n=81)

3.1.4 Prä- und posttherapeutischer Lymphknotenstatus

Die Erfassung des prätherapeutischen axillären Lymphknotenstatus fand sonographisch statt mit anschließender Einteilung gemäß der cTNM-Klassifikation. Die überwiegende Anzahl der Patientinnen (n=57; 61%) wies vor Therapie das Stadium cN1 auf. Das Stadium cN0 wurde in 31 Fällen (33%) und das Stadium cN2 in 5 Fällen (5%) diagnostiziert. Bei einer Patientin (1%) ergab sich das Stadium cNx.

Der posttherapeutische Lymphknotenstatus wurde anhand der histopathologischen Untersuchung von mindestens 10 operativ entfernten Lymphknoten erhoben (s. Abbildung 3.2). Am häufigsten zeigte sich das Stadium ypN1 (n=49), wobei bei 5 Patientinnen nur Mikrometastasen (ypN1a) vorlagen. Bei 3 von 5 Patientinnen mit posttherapeutischer Diagnose eines Carcinoma in situ war ein positiver Lymphknotenstatus nach Therapie nachweisbar.

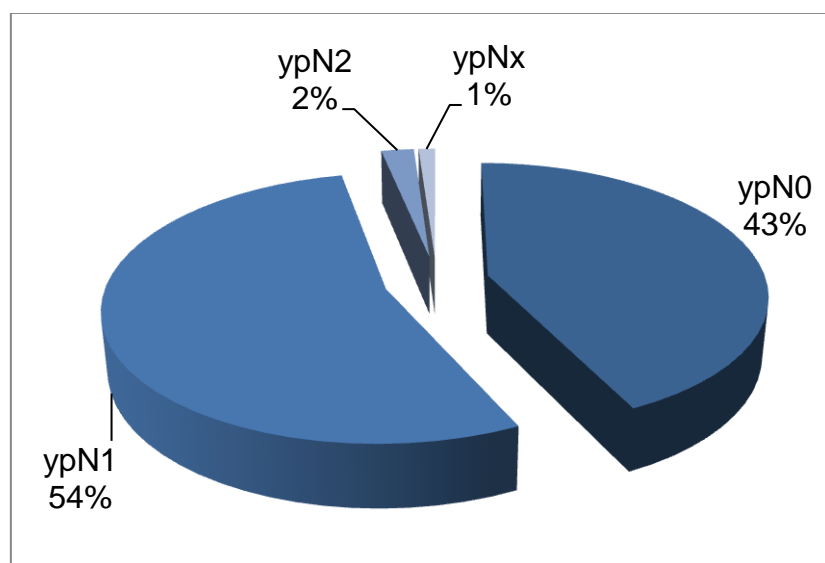


Abbildung 3.2: Verteilung des ypN-Stadiums (n=91)

3.1.5 Prä- und posttherapeutischer Hormonrezeptorstatus

Die prä- und posttherapeutische Verteilung der immunhistochemisch bestimmten Rezeptoren für Östrogen und Progesteron geht aus Tabelle 3.3 sowie Tabelle 3.4 hervor. Bei den pCR-/ypT_{is}-Fällen konnten keine Hormonrezeptoren nach Therapie bestimmt werden.

	ER	PgR	HR-Status
Positiv	70	42	71
Negativ	24	52	23
unbekannt	0	0	0

Tabelle 3.3: Prätherapeutische Verteilung der Hormonrezeptoren einzeln sowie zusammengefasst zum Hormonrezeptorstatus (n=94)

	ER	PgR	HR-Status
Positiv	56	25	57
Negativ	18	48	17
unbekannt	7	8	7

Tabelle 3.4: Posttherapeutische Verteilung der Hormonrezeptoren einzeln sowie zusammengefasst zum Hormonrezeptorstatus (n=81)

3.1.6 Übrige immunhistochemische Parameter

Die Verteilung der übrigen immunhistochemischen Faktoren in Stanz- und OP-Präparaten ist in Tabelle 3.5 und Tabelle 3.6 dargestellt. Bei den pCR-/ypT_{is}-Fällen konnten diese Faktoren wiederum nicht bestimmt werden.

Parameter	MIB-1	p53	bcl-2	c-erbB-2
positiv	58	35	68	23
negativ	36	59	26	70
unbekannt	0	0	0	1

Tabelle 3.5: Prätherapeutische Verteilung der immunhistochemischen Routineparameter (n=94)

Parameter	MIB-1	p53	bcl-2	c-erbB-2
positiv	17	17	53	14
negativ	56	55	19	59
unbekannt	8	9	9	8

Tabelle 3.6: Posttherapeutische Verteilung der immunhistochemischen Routineparameter (n=81)

3.2 Primär systemische Therapie

3.2.1 Schemata der primär systemischen Therapie

Im Rahmen der primär systemischen Therapie kamen im vorliegenden Kollektiv folgende chemotherapeutische bzw. antihormonelle Schemata zum Einsatz:

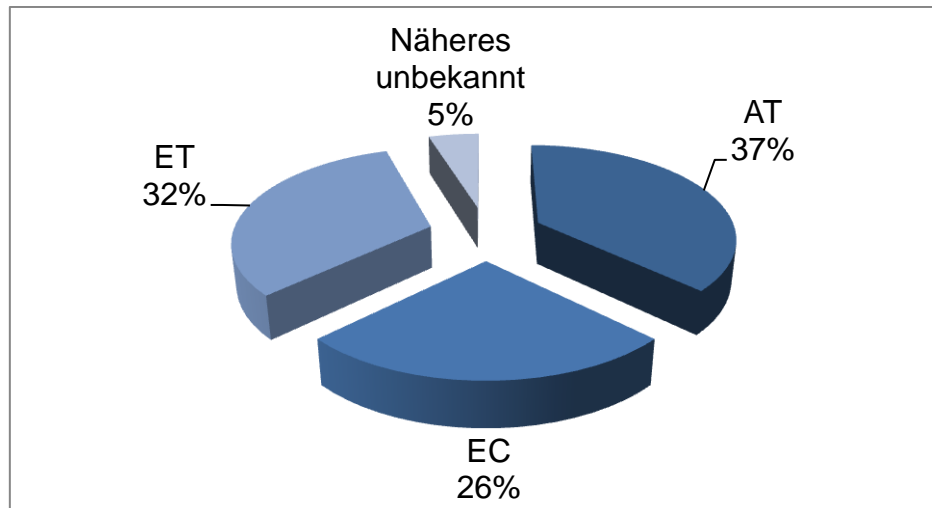


Abbildung 3.3: Verteilung der Schemata in der Chemotherapiegruppe (n=62)

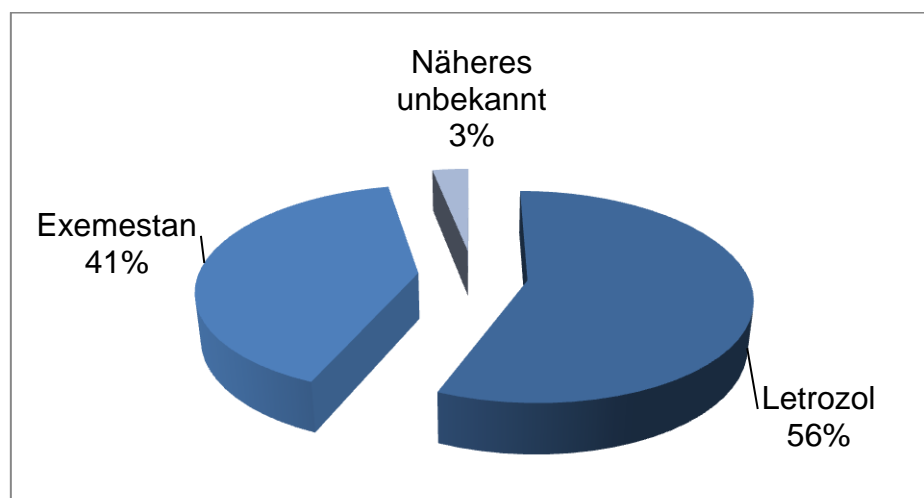


Abbildung 3.4: Verteilung der Schemata in der Hormontherapiegruppe (n=32)

3.2.2 Ansprechen auf die primär systemische Therapie

Die quantitative Erfassung des Ansprechens auf die neoadjuvante Therapie erfolgte durch Berechnung der prozentualen Größenänderung des Primärtumors. Bei den 3 nicht operierten Patientinnen der Hormontherapiegruppe sowie 8 weiteren Patientinnen der Chemotherapiegruppe mit fehlender prä- und/oder

posttherapeutischer Größenangabe in der Patientenakte konnte die Berechnung dieses Parameters nicht vorgenommen werden.

Anhand der prozentualen Größenänderung des Primärtumors erfolgte die Einteilung in mehrere Response-Klassen, wie unter 2.5 beschrieben. Im Gesamtkollektiv (n=94) war in 60,6% der Fälle irgendein Ansprechen zu verzeichnen, was einer Größenabnahme um mindestens 10% entspricht (Minor Response oder besser), während eine Zunahme um mehr als 10% (Progressive Disease) bei 16% der Tumoren zu beobachten war. In die Gruppe „Stable Disease“ fielen 11,7% der Karzinomerkrankungen. In weiteren 11,7% der Fälle war aufgrund fehlender Daten (s. oben) keine Erfassung des Ansprechens möglich.

Alle Patientinnen, bei denen nach Therapie kein invasiver Tumor mehr nachgewiesen werden konnte (pCR, ypT_{is}), stammten aus der Chemotherapiegruppe. Der Anteil der Tumoren mit noch vorhandener, aber um mindestens 50% zurückgegangener invasiver Komponente (Partial Response) lag in dieser Therapiegruppe ebenfalls höher als in der Gruppe der antihormonell behandelten Patientinnen (29,0% vs. 12,5%), während eine Größenzunahme des Tumors um mehr als 10% (Progressive Disease) in der Hormontherapiegruppe häufiger nachzuweisen war als unter der Chemotherapie (28,1% vs. 9,7%).

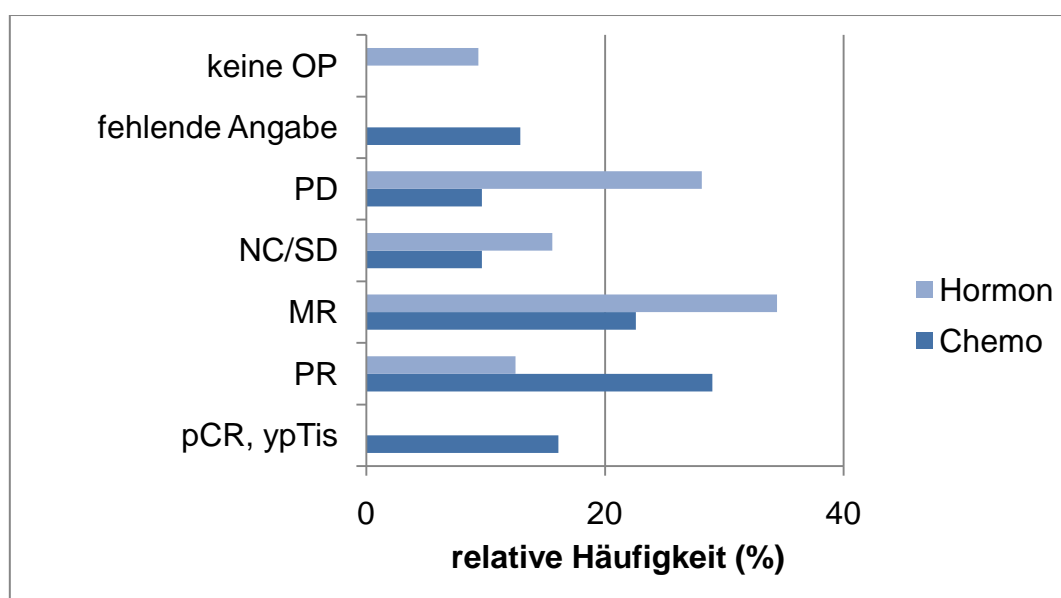


Abbildung 3.5: Ansprechen auf die primär systemische Therapie unter Chemotherapie (n=62) und Hormontherapie (n=32) unter Angabe der relativen Häufigkeit in der jeweiligen Therapiegruppe

3.3 Gefäßparameter

3.3.1 Erhebung der Gefäßparameter

Im Gesamtkollektiv war die Bestimmung der Gefäßparameter in 92 Stanz- und 74 OP-Präparaten möglich. Da diese Bestimmung nur in Bereichen des invasiven Karzinoms durchgeführt wird, erfolgte sie nicht bei den 10 Patientinnen mit pathologischer Komplettremission (n=5) bzw. ypT_{is} (n=5) im Operationspräparat. Weitere Gründe für fehlende Werte gehen aus Tabelle 3.7 hervor.

Erhebung der Gefäßparameter	Stanzpräparate		Operationspräparate	
	Chemo (n=62)	Hormon (n=32)	Chemo (n=62)	Hormon (n=32)
möglich	n=61	n=31	n=47	n=27
nicht möglich	n=1	n=1	n=15	n=5
➤ technisch nicht mgl.	n=0	n=0	n=2	n=1
➤ fehlende Blöcke	n=1	n=1	n=3	n=1
➤ keine OP	-	-	n=0	n=3
➤ ypT _{is}	-	-	n=5	n=0
➤ pCR	-	-	n=5	n=0

Tabelle 3.7: Durchführbarkeit der Gefäßparameterbestimmung in Stanz- und Operationspräparaten

3.3.2 Ausprägung der Gefäßparameter

Die nachfolgenden Tabellen (Tabelle 3.8 und Tabelle 3.9) zeigen die Ausprägung der im vorliegenden Patientengut erhobenen Gefäßparameter getrennt nach Stanz- und Operationspräparat.

	Stanzpräparate	OP-Präparate
Minimum	63	98
Maximum	2006	1110
Mittelwert	332	341

Tabelle 3.8: Ausprägung der Gefäßdichte (Gefäße pro mm²)

	Stanzpräparate	OP-Präparate
Minimum	0,56%	0,52%
Maximum	16,55%	8,54%
Mittelwert	2,83%	3,51%

Tabelle 3.9: Ausprägung des Gefäßflächenanteils

3.3.3 Verlauf der Gefäßparameter unter primär systemischer Therapie

Um einen möglicherweise unterschiedlichen Einfluss der beiden Therapieformen auf die Vaskularisierung zu untersuchen, wurde die Differenz aus prä- und posttherapeutischem Wert der erhobenen Gefäßparameter gebildet und anschließend die Verteilung dieser Differenzen in den beiden Behandlungsgruppen verglichen. Für die 10 Patientinnen ohne invasives Karzinom im OP-Präparat (pCR, ypT_{is}) sowie die 3 nicht operierten Patientinnen konnten keine posttherapeutischen Werte erhoben werden. Weitere Gründe für fehlende prä- oder posttherapeutische Werte gehen aus Tabelle 3.7 hervor. In der Chemotherapiegruppe waren somit 46 Wertepaare, in der Hormontherapiegruppe 26 Wertepaare für die Differenzbildung verfügbar.

3.3.3.1 Verlauf der Gefäßdichte

In der Chemotherapiegruppe zeigte sich bei 26 Tumoren (56,5%) eine Abnahme der Gefäßdichte, 20 Tumoren (43,5%) wiesen nach der Therapie eine höhere Gefäßdichte auf. Im Mittel sank in dieser Behandlungsgruppe die Gefäßdichte um 42 Gefäße pro mm². Bei den antihormonell behandelten Patientinnen nahm in 7 Fällen (26,9%) die Gefäßdichte ab, 19 Tumoren (73,1%) zeigten posttherapeutisch eine größere Anzahl von Gefäßen pro Fläche. Durchschnitt-

lich lag in dieser Gruppe eine Erhöhung der Gefäßdichte um 71 Gefäße pro mm² vor.

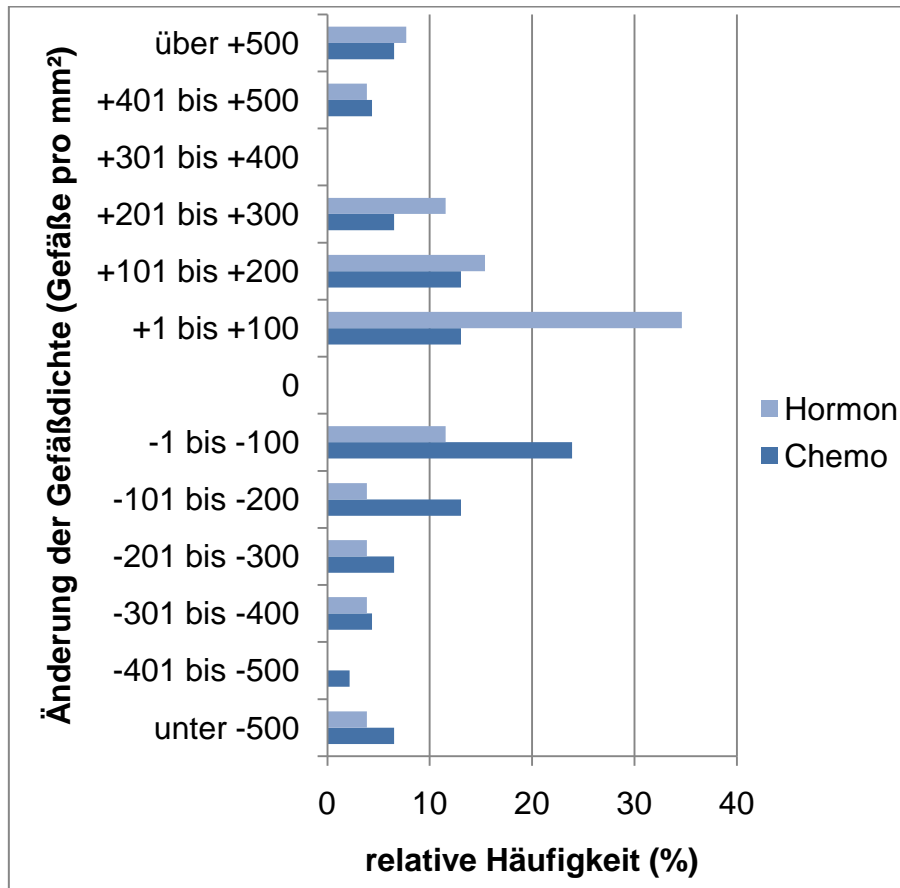


Abbildung 3.6: Änderung der Gefäßdichte unter der Therapie unter Angabe der relativen Häufigkeit der Änderungskategorie in der jeweiligen Behandlungsgruppe

Quantil	10%	25%	50%	75%	90%
Chemo	-353	-174	-27	141	407
Hormon	-315	-22	76	198	448

Tabelle 3.10: Quantile der Änderung der Gefäßdichte (Gefäße pro mm²) unter der Therapie getrennt nach Therapiegruppen

Die Differenz der Mittelwerte der Gefäßdichteänderung in den beiden Therapiegruppen wurde mittels 2-Stichproben-T-Tests untersucht, hierbei ergab sich ein p-Wert von 0,15. Somit ist der Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen statistisch nicht signifikant.

3.3.3.2 Verlauf des Gefäßflächenanteils

Für den prozentualen Anteil der Gefäß- an der Tumorfläche zeigte sich in beiden Therapiegruppen eine Zunahme dieses Gefäßparameters. Im Mittel lag diese Differenz in der Chemotherapiegruppe bei einem Wert von +0,46, in der Hormontherapiegruppe bei +1,16. Eine Abnahme dieses Gefäßparameters unter der Therapie konnte bei den Patientinnen der Chemotherapiegruppe in 20 Fällen (43,5%) und eine Zunahme in 26 Fällen (56,5%) nachgewiesen werden. Unter der Hormontherapie zeigt sich der prozentuale Anteil der Gefäß- an der Tumorfläche lediglich bei 8 Tumoren (30,8%) rückläufig, während er bei 18 Tumoren (69,2%) posttherapeutisch einen höheren Wert annahm.

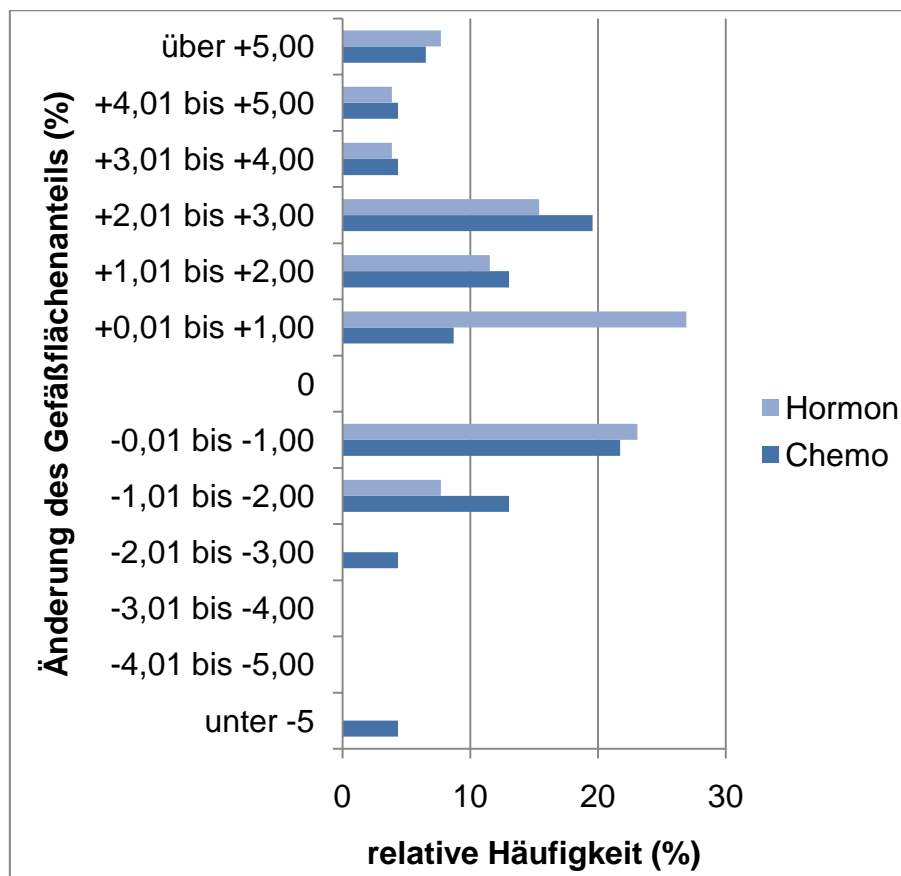


Abbildung 3.7: Änderung des prozentualen Anteils der Gefäß- an der Tumorfläche unter Angabe der relativen Häufigkeit der Änderungskategorie in der jeweiligen Behandlungsgruppe

Quantil	10%	25%	50%	75%	90%
Chemo	-1,98	-0,85	0,57	2,37	4,29
Hormon	-1,08	-0,50	0,62	2,25	4,88

Tabelle 3.11: Quantile der Änderung des prozentualen Anteils der Gefäß- an der Tumorfäche (%) unter der Therapie getrennt nach Therapiegruppen

Testet man die Differenz der Mittelwerte der Änderung des prozentualen Anteils der Gefäß- an der Tumorfäche in den beiden Behandlungsgruppen mittels 2-Stichproben-T-Test, wie unter 2.6 beschrieben, erhält man einen p-Wert von 0,28 (statistisch nicht signifikant).

3.3.3.3 Vergleich des Verlaufs der beiden Gefäßparameter

Beim Vergleich der Entwicklung der beiden Gefäßparameter unter der Chemotherapie zeigt sich in 35 Fällen (76,1%) ein gleichsinniger Verlauf, in 9 Fällen (19,6%) eine abnehmende Gefäßdicke bei zunehmendem Gefäßflächenanteil und in 2 Fällen (4,3%) eine zunehmende Gefäßdicke bei abnehmendem Gefäßflächenanteil. In der Hormontherapiegruppe lag eine gleichsinnige Entwicklung in 19 Fällen (73,1%) vor, eine niedrigere Gefäßdicke bei gestiegenem Gefäßflächenanteil wurde in 3 Fällen (11,5%) und der umgekehrte Fall in 4 Fällen (15,4%) beobachtet.

3.3.4 Gefäßparameter und Therapieansprechen

In diesen Teil der Arbeit gingen alle Patientinnen ein, für welche sowohl die prä- als auch die posttherapeutische Tumorgöße bekannt war, sowie die Erhebung der Gefäßparameter im Stanzpräparat erfolgen konnte. Daher standen für diese Untersuchung in der Chemotherapiegruppe 53 Patientinnen zur Verfügung, in der Hormontherapiegruppe 28 Patientinnen.

3.3.4.1 Vorhersagewert der Gefäßparameter

Mittels Regressionsanalyse wurde ein möglicher Vorhersagewert der Gefäßparameter für das Therapieansprechen untersucht. In den Abbildungen 3.8 bis 3.11 ist getrennt für die beiden Behandlungsgruppen die prozentuale Abnahme

der Größe des Primärtumors unter der Therapie (y-Wert) gegen den prätherapeutischen Wert des jeweiligen Gefäßparameters (x-Wert) aufgezeichnet mit den gestrichelten Linien als 95%-Konfidenzintervall für die individuelle Vorhersage.

Positive y-Werte bedeuten eine prozentuale Größenabnahme, negative y-Werte stehen für eine Größenzunahme. In den beiden Abbildungen der Chemotherapiegruppe bilden die 10 Punkte mit 100%-iger Abnahme der Tumorgroße (pCR, ypTis) daher den oberen Rand der Punktwolke.

Aufgrund der starken Streuung der y-Werte im unteren Bereich der x-Werte scheint für beide Behandlungsgruppen eine Vorhersage des Therapieansprechens aus dem prätherapeutischen Wert der Gefäßparameter praktisch unmöglich.

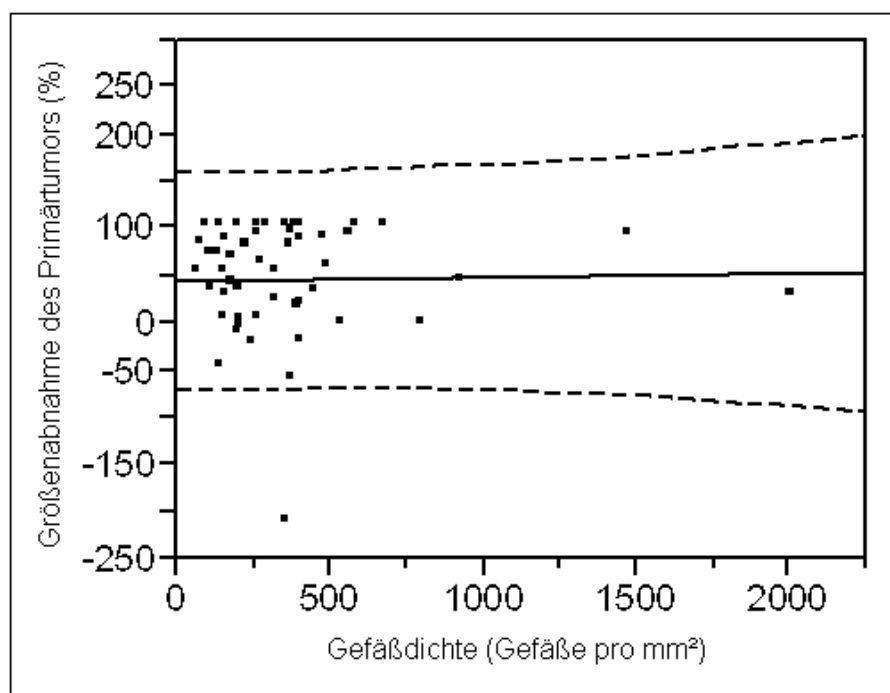


Abbildung 3.8: Prozentuale Größenabnahme des Primärtumors abhängig vom prätherapeutischen Gefäßdichtewert in der Chemotherapiegruppe (n=53)

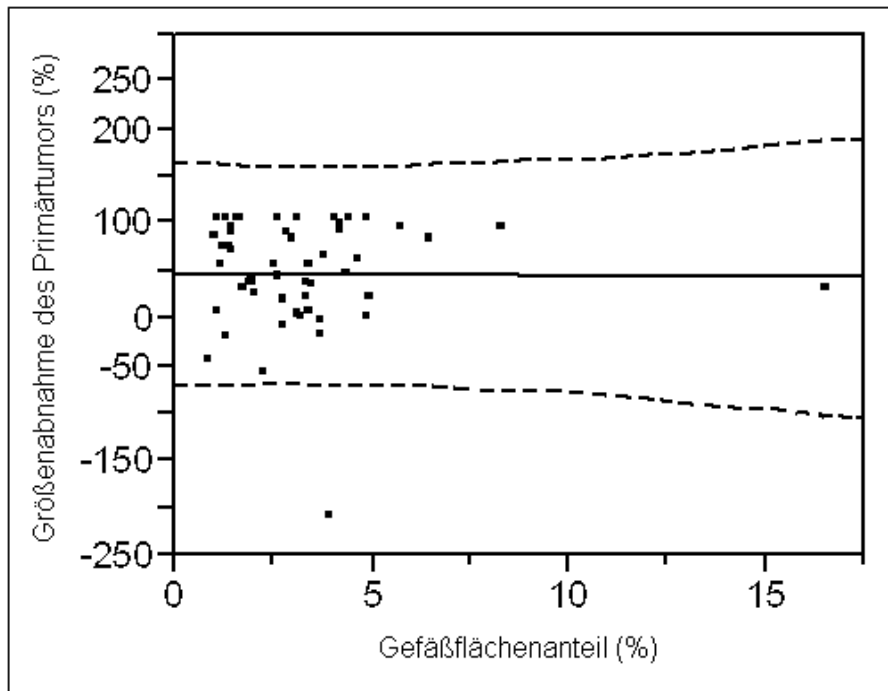


Abbildung 3.9: Prozentuale Größenabnahme des Primärtumors abhängig vom prätherapeutischen Gefäßflächenanteil in der Chemotherapiegruppe (n=53)

In den Grafiken der Chemotherapiegruppe liegt nahezu keine Geradensteigung vor (Abbildung 3.8: $\beta=0,004$, $p=0,87$; Abbildung 3.9: $\beta=-0,182$, $p=0,96$), sodass nicht von einem Effekt der prätherapeutischen Gefäßparameter auf das Therapieansprechen auszugehen ist.

Die negative Steigung der Ausgleichsgeraden in den nachfolgenden beiden Grafiken für die Hormontherapiegruppe (Abbildung 3.10: $\beta=-0,087$, $p=0,003$; Abbildung 3.11: $\beta=-12,947$, $p=0,011$) ist jeweils durch die beiden Tumoren im oberen Bereich der x-Werte (Gefäßdichte >750 Gefäße pro mm^2 bzw. Gefäßflächenanteil $>5\%$) bedingt, was durch Ausschluss dieser Tumoren nachweisbar war, sodass trotz signifikanter p-Werte auch in dieser Gruppe nicht ohne Weiteres auf eine Abhängigkeit geschlossen werden kann.

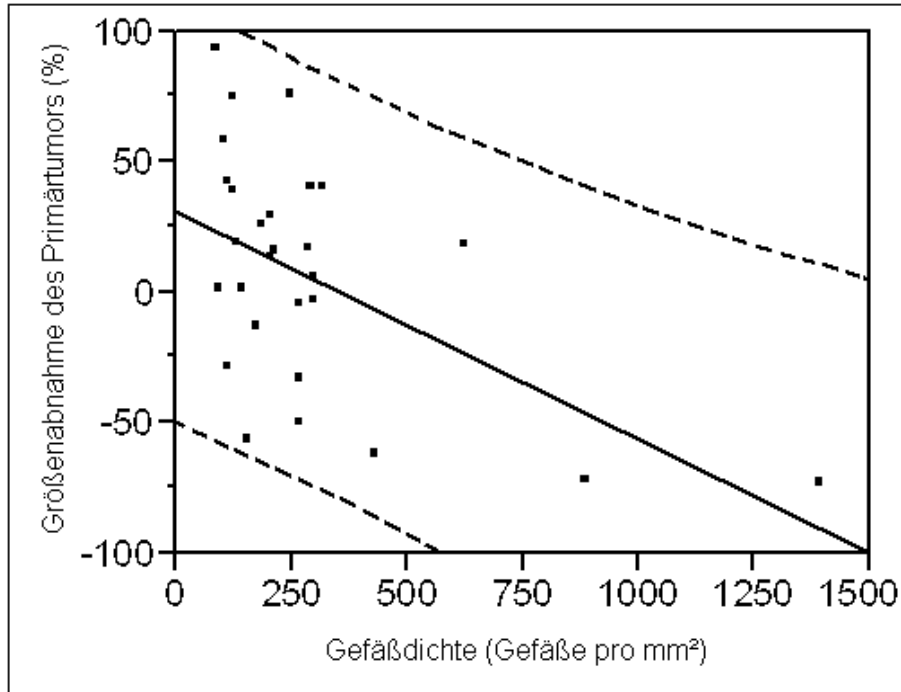


Abbildung 3.10: Prozentuale Größenabnahme des Primärtumors abhängig vom prätherapeutischen Gefäßdichtewert in der Hormontherapiegruppe (n=28)

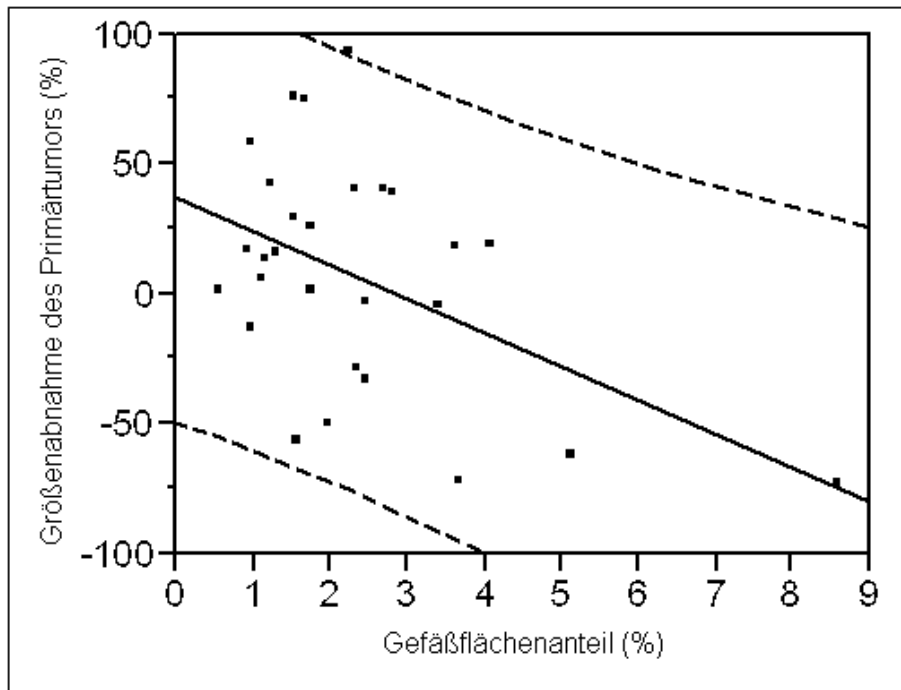


Abbildung 3.11: Prozentuale Größenabnahme des Primärtumors abhängig vom prätherapeutischen Gefäßflächenanteil in der Hormontherapiegruppe (n=28)

3.3.4.2 Gefäßparameter in verschiedenen Response-Gruppen

3.3.4.2.1 Response-Gruppen der Chemotherapie

Stellt man in der Chemotherapiegruppe die prätherapeutische Ausprägung der Gefäßparameter in der prognostisch günstigen Gruppe der 5 Patientinnen mit pathologischer Komplettremission allen übrigen Response-Gruppen (non-pCR; n=48) unter der Chemotherapie gegenüber, so ergeben sich folgende Tabellen:

Quantil	25%	50%	75%
pCR	145	197	294
non-pCR	178	296	405

Tabelle 3.12: Quantile der Gefäßdichtewerte in der Chemotherapiegruppe in den Response-Klassen pCR und non-pCR

Quantil	25%	50%	75%
pCR	1,28	2,66	4,02
non-pCR	1,65	2,93	3,88

Tabelle 3.13: Quantile des prozentualen Anteils der Gefäß- an der Tumorfläche in der Chemotherapiegruppe in den Response-Klassen pCR und non-pCR

Vor allem bei der Gefäßdichte scheinen in der pCR-Gruppe niedrigere Werte vorzuliegen als in der Gruppe non-pCR.

3.3.4.2.2 Response-Gruppen der Hormontherapie

Da unter der antihormonellen Therapie keine pathologischen Komplettremissionen zu beobachten waren, konnte in dieser Gruppe keine entsprechende Untersuchung wie unter der Chemotherapie durchgeführt werden. Betrachtet man in dieser Gruppe die prätherapeutischen Gefäßdichtewerte der 4 Patientinnen mit einer Größenreduktion des Tumors um mehr als 50% (Partial Response), so liegen diese mit 90, 106, 123 und 250 Gefäßen pro mm² abgesehen von einem Wert unterhalb des Medians der „less than PR“-Tumore innerhalb dieser Therapiegruppe (25%-Quantil: 141 Gefäße/mm², Median: 214 Gefäße/mm², 75%-Quantil: 297 Gefäße/mm²). Das gleiche Bild ergibt sich bei diesen 4 Tumoren bezüglich des Anteils der Gefäß- an der Tumorfläche mit den Werten 0,96%,

1,52%, 1,67% und 2,25% verglichen mit den Quantilen der übrigen Tumoren dieser Therapiegruppe (25%-Quantil: 1,23%, Median: 1,97%, 75%-Quantil: 2,81%).

3.3.5 Gefäßdichte und immunhistochemische Parameter

In diesem Teil der Arbeit wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen verschiedenen immunhistochemischen Faktoren (MIB-1, p53, c-erbB-2) und der Gefäßdichte beim Mammakarzinom untersucht.

Hierfür erfolgte ein Vergleich zwischen der Gefäßdichte in der für den jeweiligen Faktor positiven Gruppe mit der Gefäßdichte der Tumoren mit negativem Nachweis dieses Faktors. Ein etwaiger Gruppenunterschied wurde mittels Wilcoxon-Rangsummentest überprüft. Um einen möglicherweise vorhandenen Einfluss der Therapie auf die Gefäßdichte bzw. auf die immunhistochemischen Faktoren außen vor zu lassen, gingen in diese Analyse die prätherapeutischen Werte ein. Die Gefäßdichtebestimmung konnte bei 92 Stanzpräparaten erfolgen. Gründe für die fehlenden Werte gehen aus Tabelle 3.7 hervor. Die Ausprägung der immunhistochemischen Faktoren war bei allen Stanzpräparaten bekannt mit Ausnahme eines Tumors für c-erbB-2.

In den aufgeführten Boxplots sind nur die Tumoren mit bekannter prätherapeutischer Gefäßdichte sowie bekannter Ausprägung des jeweiligen Faktors dargestellt. Die horizontal durchgezogene Linie repräsentiert den Mittelwert aller Gefäßdichtewerte. Der relative Anteil der für den jeweiligen Faktor positiven bzw. negativen Tumore wird durch die vertikale Markierung zwischen den Gruppen signalisiert. In der jeweils darunter folgenden Tabelle werden die im Boxplot dargestellten Quantile genau beziffert.

3.3.5.1 Gefäßdichte und MIB-1-Status

Unter den Tumoren mit vorhandener Gefäßdichtebestimmung war der Nachweis des Proliferationsmarkers MIB-1 in 57 Fällen (62%) positiv, während 35 Tumoren (38%) einen negativen Nachweis dieses Faktors zeigten. Von den beiden Präparaten mit unbekannter Gefäßdichte stammte eines aus der Gruppe MIB-1-positiv und eines aus der Gruppe MIB-1-negativ.

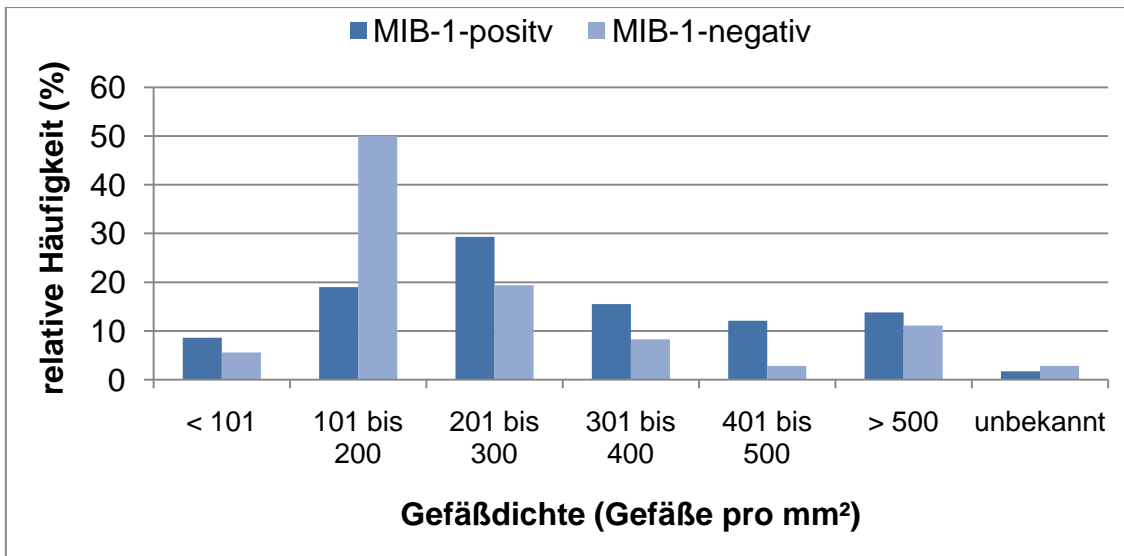
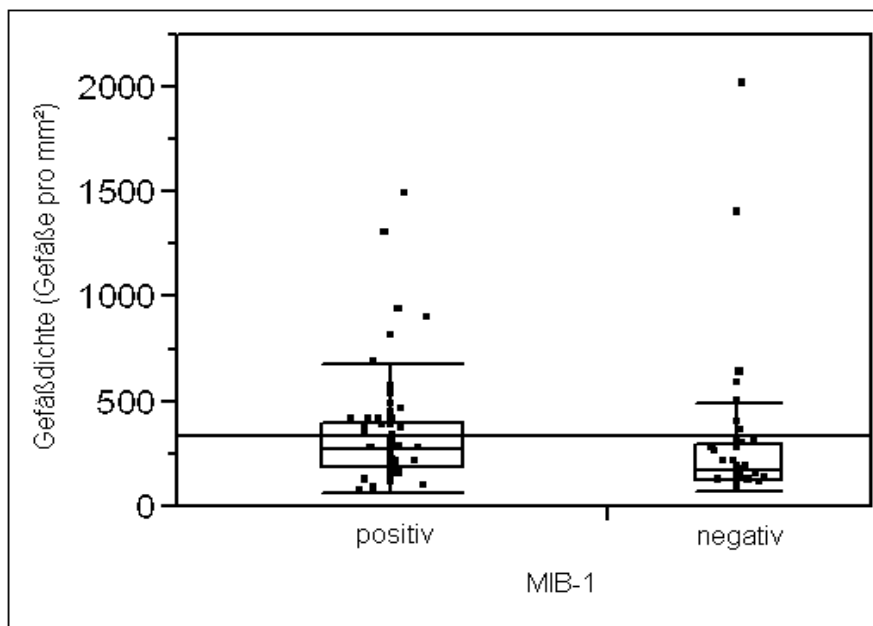


Abbildung 3.12: Verteilung der Gefäßdichte in den Gruppen MIB-1-positiv (n=58) und MIB-1-negativ (n=36) unter Angabe der relativen Häufigkeit in der jeweiligen Gruppe



Quantil	10%	25%	50%	75%	90%
MIB-1-positiv	108,8	191	269	403	702,4
MIB-1-negativ	108,4	129	173	299	597,6

Abbildung 3.13: Vergleich der Gefäßdichtewerte zwischen den Gruppen MIB-1-positiv und MIB-1-negativ

Die Werte des Medians sowie des 1. und 3. Quartils lassen bei MIB-1-positiven Tumoren eine höhere Gefäßdichte vermuten als bei MIB-1-negativen. Im Rangsummentest nach Wilcoxon erweist sich dieser Gruppenunterschied als statistisch signifikant ($p=0,02$).

3.3.5.2 Gefäßdichte und p53-Status

Ein positiver p53-Status im Stanzpräparat konnte bei 35 Tumoren (38%) der 92 Stanzpräparate mit bekannter Gefäßdichte festgestellt werden, während bei 57 Tumoren (62%) der immunhistochemische Nachweis negativ ausfiel. Die beiden Stanzpräparate mit unbekannter Gefäßdichte wiesen ebenfalls einen negativen p53-Status auf.

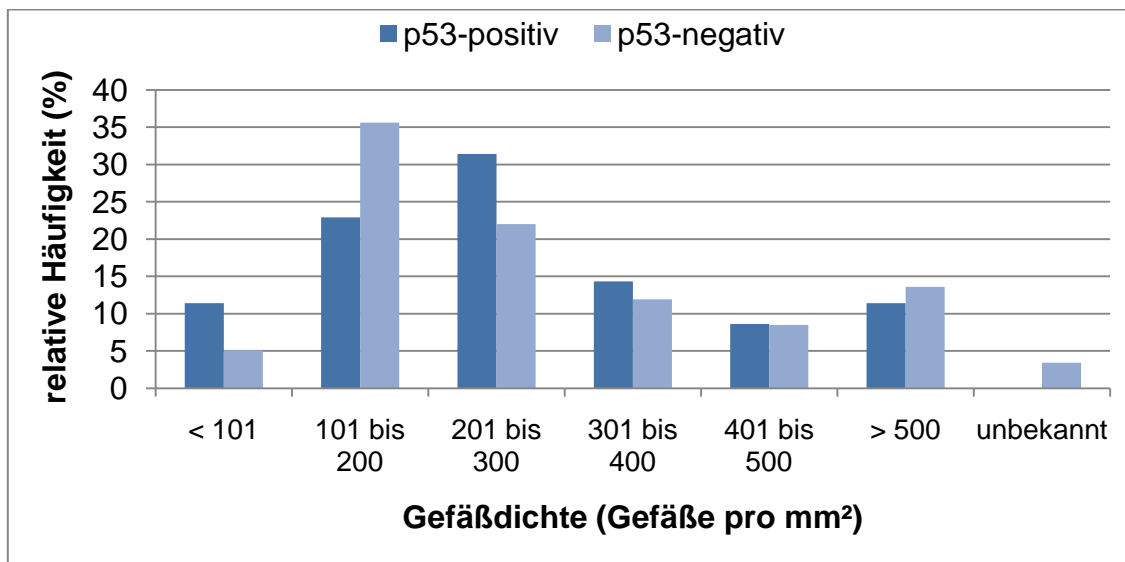
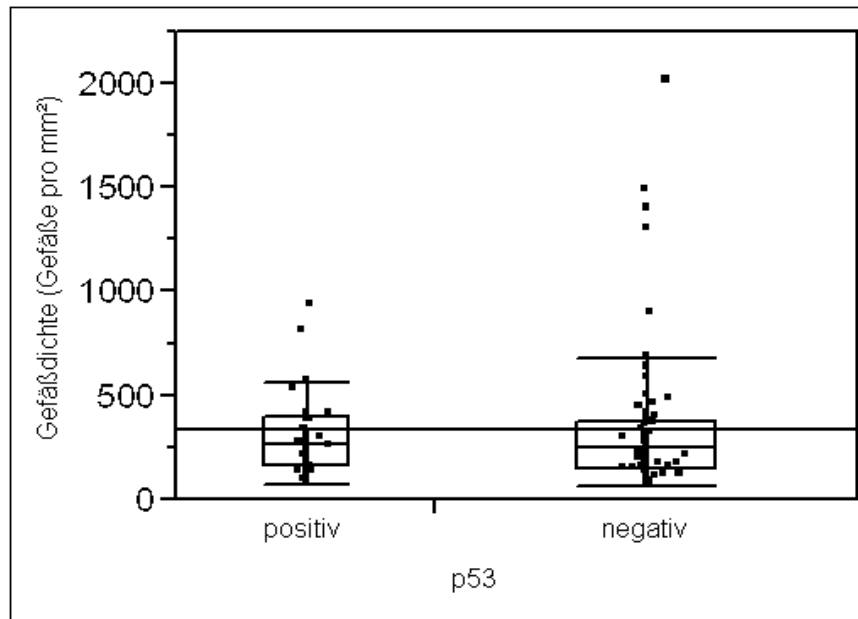


Abbildung 3.14: Verteilung der Gefäßdichte in den Gruppen p53-positiv ($n=35$) und p53-negativ ($n=59$) unter Angabe der relativen Häufigkeit in der jeweiligen Gruppe



Quantil	10%	25%	50%	75%	90%
p53-positiv	98,8	162	258	394	544,4
p53-negativ	110,8	148	250	380	719,6

Abbildung 3.15: Vergleich der Gefäßdichtewerte zwischen den Gruppen p53-positiv und p53-negativ

Ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist daraus nicht ersichtlich. Der Rangsummentest nach Wilcoxon bestätigt dies ($p=0,85$).

3.3.5.3 Gefäßdichte und c-erbB-2-Status

Bei den 92 Stanzpräparaten mit bekannter Gefäßdichte konnte in 23 Fällen (25%) eine Überexpression des Protoonkogens c-erbB-2 nachgewiesen werden, wohingegen 68 Tumoren (74%) c-erbB-2-negativ waren. Für eines dieser Präparate (1%) ist der c-erbB-2-Status unbekannt - dieses wies eine Gefäßdichte von 122 Gefäßen pro mm² auf. Die beiden Präparate mit unbekannter Gefäßdichte stammten aus der Gruppe c-erbB-2-negativ.

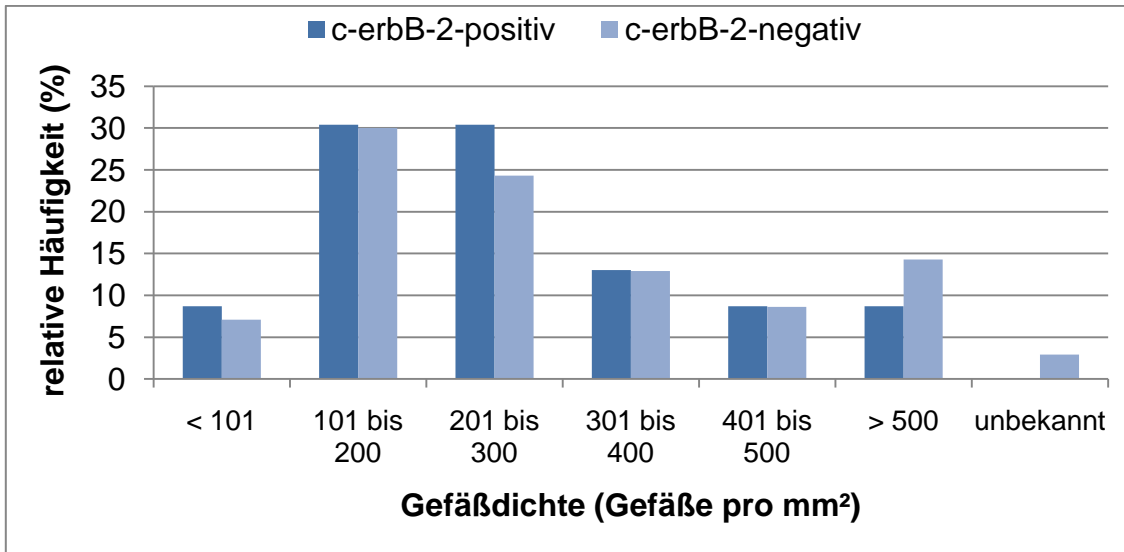
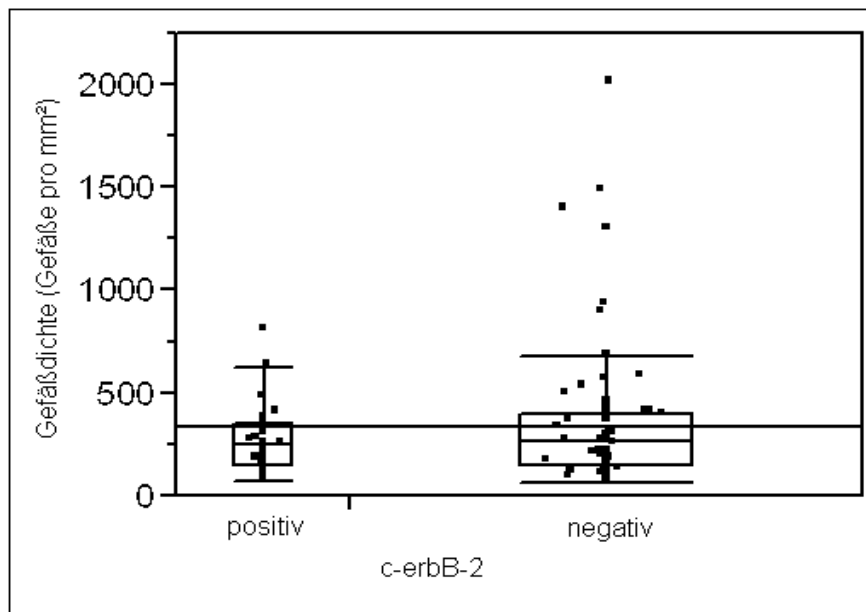


Abbildung 3.16: Verteilung der Gefäßdichte in den Gruppen c-erbB-2-positiv (n=23) und -negativ (n=70) unter Angabe der relativen Häufigkeit in der jeweiligen Gruppe



Quantil	10%	25%	50%	75%	90%
c-erbB-2-positiv	104,4	145	247	352	564
c-erbB-2-negativ	109,6	151,8	265	397,8	698,8

Abbildung 3.17: Vergleich der Gefäßdichtewerte zwischen den Gruppen c-erbB-2-positiv und c-erbB-2-negativ

Hinsichtlich der Gefäßdichtewerte ergibt sich im Wilcoxon-Rangsummentest kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen (p=0,61).

4 Diskussion

4.1 Methodendiskussion

4.1.1 Allgemeines zur Quantifizierung der Angiogenese

In der Literatur werden verschiedenste Verfahren aufgeführt, die durch Tumorzellen induzierte Angiogenese zu untersuchen und quantitativ zu erfassen. Ein Vergleich der zahlreichen Studien auf dem Gebiet der Angiogenese-Forschung wird somit durch diese unterschiedlichen methodischen Ansätze und mangelnde Standardisierung erschwert oder gar unmöglich.

Die intratumorale Gefäßdichte (Anzahl der Gefäße pro mm²) gilt mittlerweile als etablierter Parameter zur Quantifizierung der Angiogenese. Allerdings erfolgte die Etablierung dieses Parameters hauptsächlich im Rahmen von Untersuchungen zur prognostischen Relevanz einer erhöhten Gefäßdichte bei Krebserkrankungen. In der vorliegenden Arbeit hingegen wurde eine Verlaufsbeobachtung dieses Angiogenesemarkers unter verschiedenen Therapieformen des Mammakarzinoms durchgeführt, eine mögliche prädiktive Aussagekraft bei diesen Therapien sowie der Zusammenhang mit anderen immunhistochemischen Parametern untersucht. Des Weiteren wurde der Verlauf des Gefäßparameters „Anteil der Gefäß- an der Tumorfläche“, welcher so bisher nicht in anderen Studien eingesetzt wurde, sowie eine etwaige prädiktive Wertigkeit dieses Faktors analysiert.

4.1.2 Immunhistochemie der Gefäße

Für eine immunhistochemische Markierung des Gefäßendothels mit hoher Spezifität nutzten frühere Studien vor allem Antikörper gegen das von-Willebrand-Faktor assoziierte Antigen (fVIIIIRA/vWF), welches zu den Panendothelmarkern zählt. Als neuere Panendothelmarker gelten CD31 oder CD34 (Vermeulen et al., 1996). Der Vorteil dieser neueren Marker liegt in der höheren Sensitivität hinsichtlich der Detektion von Gefäßen in Tumoren, da sie bereits auf unreifen Blutgefäßen exprimiert werden, wie sie im Tumorgewebe häufig vorkommen (Horak et al., 1992; Martin et al., 1997a; Uzzan et al., 2004). Allerdings sind diese Antigene nicht spezifisch für Endothelzellen.

Das Oberflächenprotein CD31 gehört zu den „cell adhesion molecules“ (CAM) mit der Hauptaufgabe, Zell-Zell-Kontakte zu vermitteln (Sun et al., 1996). Neben Endothelzellen exprimieren vor allem Leukozyten und Plättchen dieses Oberflächenantigen. Es spielt eine wichtige Rolle in der Blutgefäßentwicklung und der Leukozytenextravasation (DeLisser et al., 1994). Aufgrund der zum Teil erheblichen Lymphozyteninfiltration in den Präparaten der vorliegenden Arbeit wäre der CD31-Antikörper für die immunhistochemische Färbung hier ungeeignet gewesen, da die Auswahl des „hot spots“ bei geringer Vergrößerung durch das Anfärben von Infiltratzellen deutlich erschwert worden wäre. Des Weiteren wurde die Zuverlässigkeit dieses Antikörpers aufgrund zu schwacher Expression des Antigens auf Endothelzellen und Färbeversageraten von bis zu 20% in Frage gestellt (Martin et al., 1997a; Uzzan et al., 2004).

CD34 ist ein Glykoprotein der Zelloberfläche, welches hauptsächlich von hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird. Außerhalb des hämatopoetischen Systems ist es auf Endothelzellen kleinerer Gefäße und auf Fibroblasten zu finden (Fina et al., 1990). Für Anti-CD34 kann außerdem eine Mitanfärbung von Lymphgefäßen in Tumoren als problematisch für die Erfassung der Gefäßdichte angesehen werden (Fiedler et al., 2006).

Ein „perfekter“ Antikörper für die Markierung von Gefäßen wurde also bisher nicht gefunden. In einer vergleichenden Studie konnten Martin et al. für Anti-CD34 die höchste Sensitivität unter den drei Panendothelmarkern hinsichtlich der Gefäßdarstellung in Mammakarzinompräparaten zeigen bei zuverlässiger Färbung und guter Reproduzierbarkeit (Martin et al., 1997a). Dieser Antikörper wurde in unserer Arbeit eingesetzt.

Im Gegensatz zu den Panendothelmarkern werden neue Marker wie CD105 (Endoglin) nur auf aktivierten Endothelzellen exprimiert. Die Erhebung der Gefäßdichte nach Färbung mit entsprechenden Antikörpern gegen diese neuen Marker könnte daher besser geeignet sein zur Erfassung des angiogenen Potentials eines Tumors, da spezifisch die durch Neoangiogenese entstandenen neuen und unreifen Gefäße gezählt werden können (Kumar et al., 1999; Beresford et al., 2006). Beispielsweise lässt sich die Frage stellen, ob die mit Panendothelmarkern dargestellten Gefäße eines „hot spots“ tatsächlich vom Tumor

induziert wurden oder ob der Tumor Gefäße in sich aufgenommen hat, die ursprünglich aus dem Gewebe stammen, welches durch den Tumor verdrängt bzw. durch dessen Expansion zerstört worden ist. Eine mögliche Überlegenheit dieser neuen Marker gegenüber den konventionellen hinsichtlich prädiktiver bzw. prognostischer Aussagekraft bei verschiedenen Krebserkrankungen ist derzeit Gegenstand der Forschung.

4.1.3 Quantitative Auswertung der Färbung

Hinsichtlich der Zählung der angefärbten Strukturen variieren die in der Literatur aufgeführten Methoden ebenfalls beträchtlich. Die Unterschiede zwischen den Untersuchungen liegen beispielsweise in der Größe des ausgewerteten Areals, in der Anzahl der untersuchten „hot spots“ pro Tumor und in der Anwendung oder Nichtanwendung der „hot spot“-Methode. Teils wird für die statistische Auswertung der höchste Gefäßdichtewert aus mehreren herangezogen, teils der Mittelwert verschiedener Bereiche (Uzzan et al., 2004). Die Auswertungsart variiert zwischen den Studien auch hinsichtlich manueller, semi-automatischer oder vollständig automatisierter Zählung der Gefäßstrukturen.

Weidner et al. legten in ihrer Arbeit von 1995 die Auswertung der Gefäßdichte in einem einzigen sogenannten neovaskulären „hot spot“ mit einer Größe des Messareals von $0,74 \text{ mm}^2$ als Standard fest (Weidner, 1995b). Die Wahl dieser am stärksten vaskularisierten Areale des invasiven Tumors begründet sich in der Annahme, dass in diesen Bezirken eine intensive reziproke Stimulation zwischen angiogenen Tumorzellklonen und der Endothelzellpopulation stattfindet, was zu einer erhöhten Mikrogefäßdichte führt und gleichzeitig aufgrund der Unreife dieser neuen Gefäße diesen Tumorzellklonen eine besonders günstige Eintrittspforte in die Blutbahn und somit die Möglichkeit zur Metastasierung bietet (Weidner et al., 1991; Weidner et al., 1992). Daher sollen diese Areale sowohl das angiogene als auch metastatische Potential des Tumors am besten widerspiegeln. Außerdem erhöht diese Methode die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit von Gefäßdichtewerten, welche durch die heterogene Verteilung der Gefäße innerhalb von Tumoren erschwert werden. Tatsächlich konnten Weidner und Mitarbeiter bereits 1991 mit dieser Methode eine Korrelation von

erhöhter Mikrogefäßdichte und Metastasierung beim Mammakarzinom nachweisen und schlugen die mit dieser Methode erhobene Gefäßdichte als prognostischen Faktor des Mammakarzinoms vor (Weidner et al., 1991). Eine Vielzahl weiterer Studien befasste sich in der Folgezeit mit der prognostischen Relevanz der Mikrogefäßdichte beim Mammakarzinom und anderen Krebsarten. Es wurden allerdings verschiedenste Methoden zur Bestimmung der Mikrogefäßdichte angewendet (Uzzan et al., 2004). Inwiefern diese Unterschiede in der Methodik zu den abweichenden Ergebnissen der Arbeiten geführt haben, bleibt offen. Wir orientierten uns an der von Weidner et al. vorgeschlagenen Methode.

Als generell problematisch wird des Weiteren die Auswahl des für die Bestimmung der Gefäßdichte am besten geeigneten Gewebeblocks und -schnitts angesehen, da sich die Frage stellt, ob ein einzelner Schnitt repräsentativ ist für die Vaskularisierung des gesamten Tumors. Beispielsweise wiesen de Jong et al. eine deutliche Heterogenität der Gefäßdichtewerte unter verschiedenen Gewebelöcken desselben Tumors, aber auch unter Schnitten desselben Blocks nach (de Jong et al., 1995). Die „hot spot“-Methode lieferte in deren Arbeit zwar innerhalb eines Blocks weniger abweichende Ergebnisse als die Zählung in systematisch ausgewählten Arealen. Von Block zu Block zeigten sich jedoch auch bei der „hot spot“-Methode deutliche Unterschiede mit einem Variationskoeffizienten von durchschnittlich 24,2%. Eine weitere Studie hatte mit dieser Methode bereits ebenfalls beträchtliche Abweichungen der Gefäßdichtewerte aus Schnitten von verschiedenen Gewebelöcken desselben Tumors gefunden, während die Werte aus Schnitten desselben Blocks eine gute Übereinstimmung zeigten (van Hoef et al., 1993). In der vorliegenden Arbeit wurden für die Erhebung der Gefäßparameter dieselben Blöcke ausgewählt, von denen bereits die Schnitte für die routinemäßige Bestimmung der immunhistochemischen Parameter stammten, um auch einen Vergleich mit diesen Faktoren durchführen zu können. Auch wenn diese Blöcke selbstverständlich einen repräsentativen Anteil des invasiven Karzinoms enthielten, stellt die fehlende Auswahl der Gewebelöcke speziell für die Erhebung der Gefäßparameter eine mögliche Schwachstelle der vorliegenden Untersuchung dar.

Die Größe des Messareals wurde von Weidner et al. mit einer optimalen Größe von 0,74 mm² ebenfalls als kritisch beschrieben, zumindest hinsichtlich der Erfassung einer prognostischen Relevanz der Gefäßdichte (Weidner, 1995b). Die oben erwähnte niederländische Arbeitsgruppe kam zu einem ähnlichen Ergebnis. Die Messung in einem zu kleinen Feld ergibt eher höhere Werte, da auf diese Weise der am stärksten vaskularisierte Bereich eines „hot spots“ ausgewertet wird, wodurch eventuell vorhandene Unterschiede zwischen verschiedenen Tumoren verwischt werden können. Entsprechend liefert ein größeres Areal eher niedrige Werte, da die Größe des „hot spots“ überschritten werden kann und umliegende weniger stark vaskularisierte Bereiche miteinbezogen werden, was zu einer Art „Verdünnung“ des Gefäßdichtewerts führt (de Jong et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswertung aus technischen Gründen auf einer nur minimal kleineren Fläche von ~0,71 mm² durchgeführt.

Die Anzahl der für die Auszählung herangezogenen Areale variiert in der Literatur zwischen eins und zehn. Während die Arbeitsgruppen von Weidner und de Jong mit der Auswertung in einem einzigen „hot spot“ signifikante Ergebnisse hinsichtlich der prognostischen Bedeutung erzielten (Weidner et al., 1992; de Jong et al., 2000), empfehlen Martin und Mitarbeiter trotz des hohen Arbeitsaufwands die Auszählung in 10 verschiedenen „hot spots“ mit anschließender Auswahl des höchsten Wertes für die statistische Auswertung, da das tatsächlich am stärksten vaskularisierte Areal bei der Wahl des „hot spots“ bei niedriger Vergrößerung eventuell übersehen wird (Martin et al., 1997b). In der vorliegenden Untersuchung wurde nach der Weidner-Methode mit nur einem „hot spot“ vorgegangen, wobei die Wahl des auszuwertenden Bereichs sorgfältigst unter mehrmaligem Wechsel der Vergrößerung getroffen wurde. Da sich der Bildausschnitt am Monitor des Bildanalyse-Systems noch größer darstellte als am Mikroskop, konnten die für die Analyse in Frage kommenden „hot spots“ gut verglichen und gegeneinander abgewogen werden. Dennoch ist die Auswertung in nur einem „hot spot“ als mögliche Fehlerquelle nicht ganz auszuschließen.

Die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung im Rahmen der Gefäßdichtebestimmung erfolgt in den meisten Studien durch manuelles Auszählen der angefärbten Strukturen. Während bei dieser Vorgehensweise

vor allem in Gefäßkonvoluten, welche in den „hot spots“ von Tumoren häufig vorkommen, die Abgrenzung und Zählung von einzelnen Gefäßen abhängig ist von der subjektiven Auffassung des Untersuchers, kann dieser Einfluss durch die semi-automatische Auswertung mittels Bildanalyseprogramm reduziert werden. So beschreiben Barbareschi et al. für die Auswertung gerade durch unerfahrene Untersucher eine Überlegenheit der Computer-gestützten Bildanalyse (Barbareschi et al., 1995). Des Weiteren kann durch diese Art der Auswertung über die Bestimmung der bloßen Anzahl von Gefäßen in einem definierten Bildausschnitt hinaus auch eine Erfassung der Größe der Gefäße sowie der Fläche des Tumors erfolgen. Die Bestimmung des Anteils der Gefäß- an der Tumorphäche könnte daher gegenüber der Gefäßdichteerhebung einen alternativen Ansatz darstellen, um den Vaskularisierungsgrad eines Karzinoms zu beschreiben. Durch das Miteinbeziehen der Fläche des Tumorgewebes, von welchem im Rahmen des Analyseprogramms azelluläre Areale wie beispielsweise große Ductuslumina ausgeschlossen wurden, wird das Gefäßbett im Verhältnis zum zu versorgenden, aber auch Gefäß-induzierenden Tumorgewebe erfasst. Durch derartige Methoden sollen vor allem in heterogenem Gewebe unsystematische Fehler reduziert werden (Barth et al., 1996). In unserer Arbeit wurde für die Erhebung sowohl der Gefäßdichte als auch des Gefäßflächenanteils die Tumorphäche und nicht die Fläche des Bildausschnitts herangezogen.

Die Zukunft könnte in voll-automatisierten Verfahren liegen, da hier bei geringem Zeitaufwand die Auswertung in einem kompletten Präparat erfolgen und der Bereich der höchsten Gefäßdichte automatisch identifiziert werden kann, was den subjektiven Untersuchereinfluss bei der Auswahl des auszuwertenden „hot spots“ als mögliche Fehlerquelle eliminiert (Barbareschi et al., 1995). Laut Vermeulen et al. ist dieser Schritt der Auswertung bei unerfahrenen Untersuchern problematischer als die Identifikation und Zählung von Gefäßen in einem prädefinierten „hot spot“ (Vermeulen et al., 1997). Eine Kontrolle durch den Anwender bleibt bei den vollständig automatisierten Verfahren allerdings dennoch erforderlich, um fälschlicherweise markierte Strukturen (beispielsweise aufgrund von Kreuzreaktionen des verwendeten Antikörpers) von der Auswertung auszuschließen (Barbareschi et al., 1995).

4.1.4 Repräsentativität der Stanzpräparate

Ein weiteres methodisches Problem der vorliegenden Arbeit liegt in der Repräsentativität von Stanzpräparaten eines Mammakarzinoms hinsichtlich der Erhebung von Gefäßparametern. Beispielsweise fanden Jacobs et al. für die dichotom klassifizierten Marker bcl-2, Östrogenrezeptor, c-erbB-2 und p53 eine 100%-ige Übereinstimmung zwischen Stanz- und OP-Präparaten, wobei zwischen der Entnahme dieser beiden Gewebeproben weder eine chemo- noch eine radiotherapeutische Behandlung stattgefunden hatte (Jacobs et al., 1998). Die als kontinuierliche Variable erfasste Gefäßdichte wies in dieser Arbeit jedoch deutliche Unterschiede mit relativen Werten zwischen 4,3% und 233,3% auf, wenn die Gefäßdichtewerte aus Stanz- und Operationspräparat desselben Tumors miteinander verglichen wurden. In einer weiteren Studie zur Repräsentativität von Stanzpräparaten erreichte die Korrelation der Gefäßdichtewerte in Stanz- und Operationspräparat keine statistische Signifikanz (Marson et al., 1999). Diese Studien stellen die vorliegende Arbeit erheblich in Frage. Eine neuere Untersuchung von 2004 konnte jedoch zeigen, dass die Repräsentativität des Stanzpräparates hinsichtlich der Bestimmung der Gefäßdichte mit zunehmender Tumorgröße ansteigt. In Tumoren mit einer Größe von über 2 cm korrelierten die Werte signifikant, wobei die Korrelation für Tumoren über 3 cm noch stärker ausgeprägt war (Ryden et al., 2004). Das Kollektiv der vorliegenden Arbeit mit Mammakarzinomen im Stadium T2 bis T4 wies größtenteils Tumoren mit einer Größe von über 2 cm auf. Etwa die Hälfte der Tumoren maß sogar mehr als 3 cm, nur etwa ein Zehntel lag unter 2 cm. Somit kann für diese Untersuchung im Allgemeinen von einer hohen Repräsentativität der Gefäßdichtewerte aus den Stanzpräparaten ausgegangen werden. Ein Ausschluss der Tumoren mit einer Größe unter 2 cm wäre allerdings erwäglich gewesen.

4.2 Patientenkollektiv und Tumorcharakteristika

4.2.1 Altersverteilung der Patientinnen

In der vorliegenden Untersuchung lag das mittlere Alter bei Diagnosestellung bei 56,5 Jahren und das Erkrankungsmaximum im 7. Lebensjahrzehnt. Somit ist das Kollektiv in etwa vergleichbar mit den Daten der Gesellschaft epidemio-

logischer Krebsregister in Deutschland, wo das mittlere Erkrankungsalter mit 63 Jahren angegeben wird und die Inzidenz ebenfalls zwischen 60 und 69 Jahren am höchsten liegt (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, 2008). Das etwas geringere Durchschnittsalter im Kollektiv könnte durch den erhöhten Anteil inflammatorischer Mammakarzinome bedingt sein, deren mittleres Erkrankungsalter niedriger liegt als für Brustkrebs insgesamt (Hance et al., 2005).

4.2.2 Histologische Tumorcharakteristika

Da für die am Universitätsklinikum Tübingen angewendeten Protokolle einer primär systemischen Therapie des Mammakarzinoms eine Tumorgöße von mindestens 2 cm bzw. die Diagnose eines inflammatorischen Mammakarzinoms (T4d) als Voraussetzung galten, liegen im Kollektiv prätherapeutisch keine Tumoren im Stadium T1 vor. Für die in Tabelle 4.1 aufgeführten Studien wurde zum Vergleich ebenfalls die Verteilung auf diese Stadien unter Ausschluss der T1-Tumoren berechnet.

T-Stadium	Eigene Ergebnisse (n=94)	Makris et al., 1997 (n=67)	von Minckwitz et al., 2005 (n=280)
T2	58%	86,5%	74,3%
T3	11%	7,5%	14,6%
T4	31%	6,0%	11,1%

Tabelle 4.1: Übersicht über die Verteilung der T-Stadien in verschiedenen Studien

T2-Tumoren zeigten sich in unserem Kollektiv eher unterrepräsentiert, während der Anteil der T4-Tumore höher liegt als in anderen Studien. Letzteres lässt sich durch die spezielle Indikation zur primär systemischen Therapie beim inflammatorischen Mammakarzinom (T4d) erklären. Da das vorliegende Kollektiv eine retrospektive Zusammenstellung von neoadjuvant behandelten Patientinnen darstellt, ist diese Sonderform des Mammakarzinoms gehäuft zu finden, während in den aufgeführten prospektiven Vergleichsstudien keine derartige Selektion vorliegt.

tion von Patientinnen stattgefunden hat. T2-Tumoren hingegen zeigten sich in unserer Untersuchung seltener, da diese häufiger primär operiert und die Patientinnen somit nicht neoadjuvant behandelt wurden, während beispielsweise bei Makris et al. sogar T1-Tumoren in die Studie zur primär systemischen Therapie mit eingeschlossen wurden.

Bezüglich der Häufigkeit der histologischen Tumortypen zeigt das vorliegende Kollektiv die erwartete Verteilung, wie aus Tabelle 4.2 ersichtlich ist.

Histologischer Typ	Eigene Ergebnisse (n=81)	Carter et al., 1989 (n=24.740)	v. Minckwitz et al., 2005 (n=285)	Janni et al., 2005
invasiv duktal	70%	83,4%	77,5%	65-80%
invasiv lobulär	20%	7,4%	15,1%	6-15%
andere	7,5%	9,3%	7,0%	5-15%
➤ <i>invasiv tubulär</i>	3,75%	<i>keine Angabe</i>	<i>keine Angabe</i>	1-15%
➤ <i>invasiv medullär</i>	2,5%	<i>keine Angabe</i>	<i>keine Angabe</i>	3%
➤ <i>invasiv papillär</i>	1,25%	<i>keine Angabe</i>	<i>keine Angabe</i>	1-7%
unbekannt	2,5%	0%	0,4%	0%

Tabelle 4.2: Übersicht über die Häufigkeit der histologischen Tumortypen in verschiedenen Studien

Tabelle 4.3 vergleicht die Verteilung der prätherapeutisch erhobenen histologischen Differenzierungsgrade G1 bis G3 mit den Ergebnissen anderer Studien.

Grading	Eigene Ergebnisse (n=94)	Jacquillat et al., 1990 (n=250)	Elston et Ellis, 1991 (n=1830)	v. Minckwitz et al., 2005 (n=285)
G1	1,1%	16%	19%	4,6%
G2	69,1%	43,6%	34%	50,5%
G3	21,3%	16%	47%	30,9%
unbekannt	8,5%	24,4%	0%	14%

Tabelle 4.3: Übersicht über die Verteilung der Differenzierungsgrade G1 bis G3 in verschiedenen Studien

Nur eine Patientin des vorliegenden Kollektivs wies prätherapeutisch ein gut differenziertes Karzinom auf, was in der Zusammensetzung des Kollektivs aus Patientinnen mit lokal fortgeschrittenem Tumorstadium begründet sein kann, sodass im Vergleich zu frühen Tumorstadien von aggressiveren Tumoren mit schlechterem Differenzierungsgrad auszugehen ist (Henson et al., 1991).

Hinsichtlich der Verteilung der histologischen Differenzierungsgrade G1 bis G3 auf die verschiedenen histologischen Tumortypen stimmte das vorliegende Kollektiv größtenteils mit den Angaben aus der Literatur überein (Elston et Ellis, 1991; Pereira et al., 1995). Während unter den speziellen Tumortypen die invasiv medullären Karzinome ausschließlich eine schlechte Differenzierung aufweisen, zählen die invasiv tubulären Karzinome generell zu den gut differenzierten Tumortypen, wobei im vorliegenden Kollektiv eines vom invasiv tubulären Typ als mäßig differenziert klassifiziert wurde.

Im Hinblick auf den positiven Nachweis der Hormonrezeptoren für Östrogen und Progesteron erwiesen sich die Tumoren des vorliegenden Kollektivs als vergleichbar mit Angaben aus der Literatur (Keen et Davidson, 2003).

Mit knapp zwei Drittel der Tumoren liegt in der vorliegenden Untersuchung im Vergleich zu anderen Studien (Jacquillat et al., 1990; Makris et al., 1997) prätherapeutisch recht häufig das Stadium N1 vor, nur ein Drittel wies vor der Therapie einen negativen Lymphknotenstatus auf. Der hohe Prozentsatz lymphknotenpositiver Karzinome kann wiederum mit der Zusammensetzung des Kollektivs

tivs aus Patientinnen mit fortgeschrittenem Tumorstadium in Zusammenhang gebracht werden. Mehrere Studien zeigten bei steigender Tumorgöße eine Zunahme des Lymphknotenbefalls (Nemoto et al., 1980; Carter et al., 1989; Janjan et al., 1992). Es gibt außerdem Hinweise für einen Zusammenhang zwischen histologischem Differenzierungsgrad und axillärem Lymphknotenbefall. So konnten beispielsweise Davis et al. an einem Kollektiv lymphknotenpositiver Patientinnen mit zunehmender Entdifferenzierung eine höhere Anzahl befallener Lymphknoten nachweisen (Davis et al., 1986). Daher passt auch die geringe Anzahl von G1-Tumoren im vorliegenden Kollektiv zur relativ hohen Rate von Patientinnen mit positivem Lymphknotenstatus.

Um die Ausprägung der immunhistochemischen Faktoren Mib-1, p53, bcl-2 und c-erbB-2 im vorliegenden Kollektiv mit den Daten aus der Literatur zu vergleichen, wurden die von der Therapie noch unbeeinflussten Parameter der Stanzpräparate herangezogen.

In den Studien von Colleoni et al. sowie Briffod et al., welche ebenfalls den Wert von 20% MIB-1-positiven Zellen als Schwelle zwischen den Kategorien MIB-1-negativ und -positiv wählten, wird die Häufigkeit einer MIB-1-Positivität mit 51% bzw. 71% angegeben (Colleoni et al., 1999; Briffod et al., 2000). Bei Veronese et al. lag der Ki-67-Proliferationsindex lediglich bei einem Viertel der Karzinome über 20% (Veronese et al., 1993). In der unserer Untersuchung galten 61,7% der Mammakarzinome als MIB-1-positiv.

Je nach Krankheitsstadium und Nachweismethode wird das Auftreten einer p53-Mutation beim Mammakarzinom allgemein sehr unterschiedlich mit 15-50% der Karzinome beschrieben (Elledge et Allred, 1994). Keen und Davidson geben in ihrem Review eine Spanne von 20-30% für die p53-Positivität an (Keen et Davidson, 2003). Im vorliegenden Kollektiv wurde der immunhistochemische Nachweis einer nukleären p53-Akkumulation in 37,2% der Fälle erbracht.

Während Krajewski et al. einen immunhistochemischen bcl-2-Nachweis bei etwa 80% der Mammakarzinome berichten, liegt dieser Wert bei Colleoni et al. bei 63% (Krajewski et al., 1999; Colleoni et al., 1999), sodass das vorliegende Kollektiv mit 72,3% ebenfalls als repräsentativ betrachtet werden kann.

Die Angaben zur immunhistochemisch nachgewiesenen Überexpression von c-erbB-2 beim Mammakarzinom schwanken in der Literatur zwischen 9 und 38% (Press et al., 1994). In unserem Kollektiv fiel dieser Nachweis in 24,5% der Fälle positiv aus. Allerdings wurden hier lediglich die Karzinome mit einem Hercep-Test™-Score 3+ als c-erbB-2-positiv gewertet, während andere Studien zum Teil bereits Karzinome mit einem Score von 2+ als positiv einstufen.

Mit Ausnahme von bcl-2, dessen positiver Nachweis beim Mammakarzinom mit prognostisch günstigen Faktoren assoziiert werden konnte, spricht eine positive Ausprägung dieser immunhistochemischen Faktoren für eine schlechtere Prognose (s. Einleitung). Ihre Ausprägung bewegte sich im vorliegenden Kollektiv zwar im Rahmen der Werte aus der Literatur, siedelte sich jedoch eher im oberen Bereich der allgemeinen Datenlage an. Dies könnte wiederum als Hinweis darauf verstanden werden, dass bei lokal fortgeschrittenen Tumorstadien wie in unserem Kollektiv von einem aggressiveren Verhalten der Karzinome im Vergleich zu frühen Tumorstadien auszugehen ist.

4.3 Ansprechen auf die primär systemische Therapie

4.3.1 Therapiegruppen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Patientinnen in eine Chemo- und eine Hormontherapiegruppe eingeteilt. Die Gruppenzusammensetzung ist jedoch sehr unterschiedlich, da die antihormonelle Therapie mit Aromatasehemmern nur bei positivem Hormonrezeptorstatus des Karzinoms und bei Postmenopausalität der Patientin durchgeführt wurde. In der Chemotherapiegruppe waren hingegen sowohl prä- als auch postmenopausale Patientinnen sowie hormonrezeptorpositive und -negative Karzinome vertreten. Ein direkter Vergleich der beiden Gruppen hinsichtlich der Effektivität der beiden Therapieformen ist daher nur eingeschränkt möglich.

4.3.1.1 Chemotherapie

Unter den 62 Patientinnen der Chemotherapiegruppe erreichten 5 Patientinnen (8%) eine pathologische Komplettremission, weitere 5 Patientinnen (8%) wiesen nach primär systemischer Chemotherapie lediglich ein in situ-Karzinom auf.

Die Rate an partiellen Remissionen lag in dieser Gruppe bei 29%, nur 9,7% der Tumoren wiesen posttherapeutisch eine Größenzunahme um mehr als 10% auf (Progressive Disease). Zum Einsatz gekommen waren drei verschiedene Therapieschemata, wobei jeweils ein Anthrazyklin (Doxorubicin oder Epirubicin) in Kombination mit einem Taxan (Docetaxel oder Paclitaxel) bzw. das Anthrazyklin Epirubicin kombiniert mit dem Alkylanz Cyclophosphamid verabreicht wurden.

Die Bedeutung des Ansprechens auf die primär systemische Therapie wurde in der Literatur in vielerlei Hinsicht untersucht. Die NSABP B-18-Studie (s. Kapitel 1.1.4.3) wies dem Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie einen prognostischen Wert zu. Unter den 743 präoperativ behandelten Patientinnen dieser Untersuchung erreichten 36% eine klinische und 13% eine pathologische Komplettremission, wobei hier die in situ-Karzinome in die Gruppe der pCR mit eingeschlossen wurden. Damit sind die Ergebnisse unserer Untersuchung in etwa vergleichbar (pCR + pT_{is}: 16%). Beim Vergleich der verschiedenen Response-Gruppen des NSABP B-18 untereinander konnten für Patientinnen mit klinischer und/oder pathologischer Komplettremission höhere Raten des DFS, RFS und DDFS gezeigt werden als für Patientinnen ohne Komplettremission und in der jeweils besseren Response-Gruppe ergaben sich höhere Raten der genannten prognostischen Endpunkte. Hinsichtlich des Gesamtüberlebens deutete jedoch lediglich die pathologische Komplettremission auf einen Vorteil hin, nicht jedoch die klinische Komplettremission ($p=0,06$ vs. $p=0,19$). Weitere Studien kamen zu ähnlichen Ergebnissen (Mano et Awada, 2004; Bear et al., 2006). Daher liegt die Vermutung nahe, dass das Ansprechen des Primärtumors auch die Wirksamkeit der jeweiligen Therapie auf etwaige Mikrometastasen widerspiegelt (Fisher et al., 1998; Bear et al., 2006).

Andererseits darf nicht außer Acht gelassen werden, dass auch Patientinnen ohne pCR vom Einsatz der primär systemischen Chemotherapie profitieren, da hierdurch oft das Ausmaß der anschließend durchgeführten Operation verringert werden kann (Mano et Awada, 2004). Im vorliegenden Kollektiv konnte in der Chemotherapiegruppe in knapp der Hälfte der Fälle eine Reduktion der Tumorgöße um mehr als 50% erreicht werden, wodurch bei einer Vielzahl von Patientinnen auf eine Mastektomie verzichtet werden konnte. Inwiefern solch

ein weniger radikales operatives Vorgehen zu einem höheren Lokalrezidivrisiko führt, kann derzeit nicht abschließend beurteilt werden, wobei Mauri et al. das höhere Risiko eines lokoregionären Rezidivs in neoadjuvanten Therapiearmen auf den bloßen Einsatz einer Strahlentherapie unter Verzicht auf einen chirurgischen Eingriff bei den Fällen mit klinischer Komplettremission zurückführten (Mauri et al., 2005). Daher wird nach primär systemischer Therapie unabhängig vom klinischen Therapieansprechen stets ein operatives Vorgehen empfohlen. Ein weiterer interessanter Gesichtspunkt der primär systemischen Therapie liegt in der raschen Messbarkeit eines Therapieerfolges bzw. -misserfolges. Dies ist im Sinne einer „in-vivo-Testung“ der Chemosensitivität des Tumors zum einen für die einzelne Patientin von Bedeutung, zum anderen kann die primär systemische Therapie hilfreich sein in der klinischen Forschung (Fisher et al., 1998; Kaufmann et al., 2003; von Minckwitz et al., 2005). Neben der Erprobung von Medikamenten kann die primär systemische Therapie auch bei der Untersuchung prädiktiver Faktoren schneller Ergebnisse liefern (Bear et al., 2006), was wir uns in der vorliegenden Arbeit bei der Frage nach einer prädiktiven Wertigkeit zweier Angiogenesemarker ebenfalls zunutze machten.

4.3.1.2 Hormontherapie

Generell war unter präoperativer antihormoneller Therapie ein schwächeres Ansprechen zu verzeichnen als unter der Chemotherapie. Allerdings gilt es die ungleiche Zusammensetzung der beiden Gruppen zu beachten. Lediglich vier Karzinome (12,5%) zeigten eine Verkleinerung um mehr als 50% (Partial Response). Pathologische Komplettremissionen bzw. residuale in situ-Karzinome waren in dieser Gruppe nicht zu beobachten. Andererseits war bei 9 Tumoren (28,1%) eine Größenzunahme um mehr als 10% (Progressive Disease) zu verzeichnen. In dieser Therapiegruppe waren Letrozol bzw. Exemestan, welche neben Anastrozol zu den Aromatasehemmern der 3. Generation zählen, für 4 bis 6 Monate verabreicht worden.

Da pathologische Komplettremissionen unter primär systemischer Hormontherapie selten zu erreichen und die Ansprechraten generell niedriger sind als unter neoadjuvanter Chemotherapie, werden antihormonelle Behandlungsansätze

in der primär systemischen Therapiesituation nicht als Standard empfohlen (Kaufmann et al., 2003). Allerdings forderten Ellis et al. bereits vor einigen Jahren, den Wert der primär systemischen Hormontherapie bei korrekter Selektion der Patientinnen nicht zu unterschätzen, vor allem unter Verwendung effektiverer Medikamente als Tamoxifen (Ellis et al., 2001).

Bereits mehrere Studien konnten bei postmenopausalen Patientinnen eine bessere Wirkung von Aromatasehemmern in der neoadjuvanten Therapie verglichen mit Tamoxifen nachweisen (Macaskill et al., 2006). Dieser Nachweis deckt sich auch mit Erfahrungen aus der adjuvanten Therapie (Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group, 2005). Für eine antihormonelle Behandlung vor der Menopause gibt es im Rahmen der neoadjuvanten Therapiesituation allerdings keine vergleichbaren Studien (Kaufmann et al., 2003).

Eiermann et al. beobachteten unter präoperativ verabreichter Letrozoltherapie signifikant höhere klinische und radiologische Ansprechraten sowie eine höhere Rate nachfolgend durchgeführter brusterhaltender Operationen gegenüber der Gruppe mit Tamoxifen behandelte Patientinnen (Eiermann et al., 2001). Abgesehen von der Rate an pathologischen Komplettremissionen erfolgten in dieser Untersuchung keine Angaben zum histopathologisch erfassten Ansprechen, sodass ein Vergleich mit den Daten der vorliegenden Arbeit schwierig ist: Bereits die durch Palpation, Ultraschall oder Mammographie erhobenen Ansprechraten zeigen beträchtliche Abweichungen untereinander. Inwiefern diese Untersuchungsmethoden die tatsächliche histopathologische Größe des Tumors widerspiegeln, ist zudem umstritten (Chagpar et al., 2006). Je nach Untersuchungsmethode werden in der Studie von Eiermann et al. partielle Remissionen bei 30 bis 45% der mit Aromataseinhibitoren behandelten Patientinnen angegeben. Ähnlich hohe klinisch erfasste PR-Raten (37-55%) unter neoadjuvanter Therapie mit Aromatasehemmern finden sich in Semiglazov's Untersuchung (Semiglazov et al., 2007). Diese im Vergleich zu unseren Ergebnissen (PR in 12,5% der Fälle) recht hohen Raten an partiellen Remissionen sind eventuell durch eine mittels klinischer Untersuchungsmethoden tendenziell eher unterschätzte Tumorgöße bedingt. In der vorliegenden Arbeit hingegen war für die Tumorgöße nach Therapie der Durchmesser im histologischen Präparat aus-

schlaggebend, welcher zu einer vergleichsweise geringeren PR-Rate geführt haben könnte. Posttherapeutisch ist zudem von einer noch größeren Ungenauigkeit der klinischen Untersuchungsmethoden im Vergleich zur histologischen Erfassung auszugehen (Chagpar et al., 2006). Dies weist auch auf die Problematik der korrekten Überwachung des Tumoransprechens unter primär systemischer Hormontherapie hin, zumal die optimale Dauer dieser Therapieform bisher nicht festzulegen war. Daher wird momentan ein multimodales Monitoring empfohlen (Macaskill et al., 2006).

Die Studie von Semiglazov et al. verglich den präoperativen Einsatz von Aromataseinhibitoren (Anastrozol bzw. Exemestan) mit dem Schema Doxorubicin plus Paclitaxel bei postmenopausalen Patientinnen mit positivem Hormonrezeptorstatus (Semiglazov et al., 2007). In dieser Patientengruppe konnte eine Gleichwertigkeit dieser beiden Ansätze hinsichtlich der klinischen Ansprechraten nachgewiesen werden sowie ein nicht-signifikanter Vorteil bezüglich der Rate an brusterhaltenden Operationen unter der Hormontherapie, und dies bei einem weit harmloseren Nebenwirkungsprofil der Hormon- verglichen mit der Chemotherapie. Die gute Wirksamkeit von Aromatasehemmern im Vergleich zur Chemotherapie in dieser speziellen Patientengruppe könnte in der in mehreren Studien aufgezeigten schlechteren Wirksamkeit einer Anthrazyklin- bzw. Taxan-haltigen primär systemischen Chemotherapie bei Karzinomen mit positivem Hormonrezeptorstatus verglichen mit hormonrezeptornegativen begründet sein (Colleoni et al., 2000; Faneyte et al., 2003). Daher kann gerade bei älteren Patientinnen, welche für eine Chemotherapie aufgrund weiterer medizinischer Probleme häufig ohnehin nicht in Frage kommen, eine neoadjuvante Hormontherapie eine Alternative darstellen, sofern ein hormonrezeptorpositives Karzinom vorliegt. Angesichts dieser Erkenntnisse wäre in unserer Untersuchung in der Chemotherapiegruppe mit einem schlechteren Ansprechen zu rechnen gewesen, wenn wie in der Hormontherapiegruppe nur Patientinnen mit positivem Hormonrezeptorstatus zugeteilt worden wären. Dies verweist auf die Problematik eines direkten Vergleichs der beiden Gruppen im vorliegenden Kollektiv.

4.4 Ausprägung der Gefäßparameter

4.4.1 Gefäßdichte

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Gefäßdichtewerte liegen vergleichsweise hoch (Fox et al., 1995; Martin et al., 1997), was sehr unterschiedliche Gründe haben kann. Beim Vergleich von Studien ist zunächst darauf zu achten, ob die Gefäßdichte als absoluter Wert für den jeweiligen Bildausschnitt (zumeist $<1 \text{ mm}^2$) angegeben ist oder sie auf 1 mm^2 umgerechnet wurde. Dies allein erklärt allerdings die erheblich größeren Werte der vorliegenden Arbeit nicht. Der Grund dürfte vielmehr darin liegen, dass hier nicht die Größe des Bildausschnitts sondern die Größe der Tumorfläche für die Berechnung des relativen Werts „Gefäßdichte“ herangezogen wurde. Da die Tumorfläche zum Teil deutlich kleiner ist als die Fläche des Bildausschnitts, ergeben sich für die Anzahl von Gefäßen bezogen auf 1 mm^2 der Tumorfläche sehr viel größere Werte.

4.4.2 Gefäßflächenanteil

In der Literatur ist die Berechnung der Gefäßfläche bzw. deren Anteil an der Bild- oder Tumorfläche nur vereinzelt zu finden, da sich die Mehrzahl der Arbeiten auf die Bestimmung der Gefäßdichte beschränkt. Die in unserer Arbeit bestimmte Gefäßfläche ist in etwa vergleichbar mit dem Parameter „luminal area“ in der Arbeit von Fox et al. (Fox et al., 1995) bzw. „total endothelial area“ in der Arbeit von Simpson et al. (Simpson et al., 1996). Der Hauptgrund für die vergleichsweise hohen Werte in der vorliegenden Untersuchung dürfte wiederum darin liegen, dass die Tumorfläche und nicht die Fläche des Bildausschnitts als Bezugsgröße für die Berechnung des Flächenanteils herangezogen wurde, wodurch sich, wie bereits unter 4.4.1 für die Gefäßdichte beschrieben, höhere Werte als in den Vergleichsstudien ergeben. Die noch geringeren Werte bei Simpson et al. resultieren daraus, dass bei deren Methode nur die Endothelflächen im Bildausschnitt, nicht aber die Lumina der Gefäße erfasst wurden.

Eine einheitliche Methode zur Bestimmung der Gefäßdichte bzw. von Gefäßflächenparametern wurde bis dato nicht eingeführt, wodurch ein Vergleich der Studien untereinander erheblich erschwert wird.

4.5 Änderung der Vaskularisierung unter der Therapie

4.5.1 Verlauf der Gefäßdichte

Um einen möglichen Einfluss der beiden Therapieformen auf die Gefäßdichte zu untersuchen, wurde für jede Patientin die Differenz aus prä- und posttherapeutischer Gefäßdichte gebildet. Im vorliegenden Kollektiv lag diese Differenz unter der Chemotherapie im Durchschnitt bei -42 Gefäßen pro mm², während in der Hormontherapiegruppe im Mittel eine Gefäßdichteänderung um +71 Gefäße pro mm² beobachtet wurde. Bei Durchführung des 2-Stichproben-T-Tests erreichte der Unterschied zwischen den beiden Therapiegruppen keine statistische Signifikanz ($p=0,15$). Es gilt allerdings zu beachten, dass in der Chemotherapiegruppe die 10 Tumoren mit dem besten Ansprechen (pCR, ypT_{is}) von diesem Vergleich ausgeschlossen wurden, da hier die posttherapeutische Erhebung der Gefäßparameter nicht erfolgen konnte. Möglicherweise wurde dadurch die durchschnittliche Gefäßdichte nach Chemotherapie zu hoch eingeschätzt und eine Verringerung der Differenz mit Verlust einer möglichen statistischen Signifikanz herbeigeführt.

4.5.1.1 Gefäßdichte und Chemotherapie

Zahlreiche Studien haben den Einfluss verschiedener Chemotherapeutika auf die Angiogenese und die Gefäßdichte in Tumoren untersucht. In einer randomisierten Studie zur chemoendokrinen Therapie zeigte sich bei Mammakarzinompatientinnen aus dem neoadjuvanten Therapiearm im Operationspräparat eine signifikant niedrigere Gefäßdichte als bei Patientinnen aus dem adjuvanten Therapiearm, welche sich erst postoperativ der chemoendokrinen Therapie unterzogen (Makris et al., 1999). Bottini et al. beobachteten ebenfalls eine Abnahme der Gefäßdichte bei Patientinnen mit Mammakarzinom unter verschiedenen neoadjuvanten Therapieschemata, wobei diese Abnahme nicht mit einer besseren Response assoziiert war (Bottini et al., 2002). Auch zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen konnten einen anti-angiogenen Effekt nahezu aller Klassen von Chemotherapeutika demonstrieren, sodass möglicherweise ein Teil ihrer Wirksamkeit in der Krebstherapie auf eine anti-angiogene Wirkkomponente zurückzuführen ist (Miller et al., 2001). Beispielsweise wurde für

Paclitaxel, welches einem Teil der Patientinnen aus unserem Kollektiv verabreicht wurde, eine Hemmung der Motilität und Chemotaxis von Endothelzellen beschrieben (Belotti et al., 1996). In einer anderen Studie zeigten sich die Endothelzellen neu gebildeter Tumorgefäße apoptotisch unter dem Alkylanz Cyclophosphamid (Browder et al., 2000), welches ebenfalls ein Teil unserer Patientinnen erhielt. Die im Durchschnitt von uns beobachtete Abnahme der Gefäßdichte in der Chemotherapiegruppe scheint daher den bisherigen Ergebnissen in der Literatur zu entsprechen.

Andererseits wurde in der vorliegenden Untersuchung aber trotz der im Mittel beobachteten Reduktion der Gefäßdichte bei 20 von 46 Karzinomen (43,5%) nach der Chemotherapie eine höhere Gefäßdichte festgestellt als im prätherapeutischen Stanzpräparat. Diese Beobachtung könnte die Hypothese bestätigen, dass sich der anti-angiogene Effekt der eingesetzten Substanzen unter den gängigen Schemata mit einer bis zu 3-wöchigen Pause zwischen den Zyklen nicht unbedingt in einer Reduktion der Vaskularisierung und anti-angiogen bedingten Reduktion des Tumorzustands auswirkt, da sich das Tumorgefäßbett in dieser Zeit wieder erholen kann (Kerbel et Kamen, 2004). Die initiale Zerstörung des Tumorgefäßbetts unter der Therapie könnte sogar eine überschießende Ausschüttung pro-angiogener Faktoren auslösen, sodass deshalb bei einem Teil der Tumoren posttherapeutisch eine höhere Gefäßdichte gemessen wird als vor der Therapie. Auf der Grundlage oben genannter Hypothese entstand die Theorie eines „metronomischen“ Verabreichungsschemas mit täglicher oder wöchentlicher Gabe entsprechend kleinerer Dosen derselben Chemotherapeutika. Tatsächlich konnten damit in präklinischen Studien beachtliche Erfolge erzielt werden bis hin zum kompletten Verschwinden eines zuvor gegen dasselbe Medikament resistenten Tumors (Kerbel et Kamen 2004; Browder et al., 2000). Zugrunde liegt die Annahme, dass die eingesetzten Chemotherapeutika auf die aktivierten Endothelzellen neu gebildeter Blutgefäße bereits in weit geringeren Dosen wirken, als sie für die Tumorzellen notwendig wären (Belotti et al., 1996; Bocci et al., 2002). Aufgrund der geringeren Dosierungen sind keine langen Pausen zwischen den einzelnen Gaben nötig, sodass das Tumorgefäßbett dauerhaft geschädigt werden kann und sich sekundär ein

Schrumpfen des Tumors einstellt, ohne für die Tumorzellen zytotoxische Dosen einzusetzen. Ob derartige Schemata für den klinischen Alltag relevant werden könnten, bleibt abzuwarten (Kerbel et Kamen 2004; Schneider et Miller, 2005). Der Einfluss der Chemotherapie auf die Gefäßdichte wird derzeit also sehr kontrovers diskutiert. Je nach Therapieschema und Reaktion der Tumorzellen auf die Therapie scheint die Angiogenese durch unterschiedliche Mechanismen in die eine oder andere Richtung beeinflusst zu werden. Dies spiegelt sich in der starken Streuung der Änderung der Gefäßdichte in der Chemotherapiegruppe des vorliegenden Kollektivs wieder.

4.5.1.2 Gefäßdichte und Hormontherapie

In der Gruppe der antihormonell behandelten Patientinnen zeigten lediglich 7 Tumoren (26,9%) eine Abnahme der Gefäßdichte unter der Therapie, während fast drei Viertel der Tumoren posttherapeutisch eine höhere Anzahl von Gefäßen pro mm² aufwiesen. Im Durchschnitt lag die Gefäßdichte posttherapeutisch um 71 Gefäße pro mm² höher als vor der Therapie.

Zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Modelle konnten eine Angiogenese stimulierende Wirkung von Östrogen nachweisen, sei es durch eine direkte Wirkung auf die Endothelzellen oder durch Induktion des pro-angiogenen Faktors VEGF (Morales et al., 1995; Hyder, 2006). Daher ist auf molekularer Grundlage von einem pro-angiogenen Effekt dieses Steroidhormons auszugehen. Unter Östrogen-entziehender Therapie wie der Behandlung mit Aromataseinhibitoren in unserer Arbeit würde man also eine Abnahme der Gefäßdichte erwarten.

Dennoch ist die hohe Anzahl von Tumoren mit posttherapeutisch erhöhter Gefäßdichte in der vorliegenden Arbeit nicht als Widerspruch zu den Erfahrungen aus der Literatur zu sehen. Aufgrund der äußerst komplexen Regulation der Angiogenese ist bei Entzug einer einzelnen pro-angiogenen Komponente nicht unausweichlich mit einer Reduktion der Gefäßdichte zu rechnen. Die Rolle der Hypoxie in der Angiogeneseregulation kann gerade in großen Tumoren wie in unserem Kollektiv von enormer Bedeutung sein, sodass beispielsweise via HIF-1 α eine Imbalance zugunsten pro-angiogener Faktoren aufrecht erhalten wird und der Östrogenentzug nicht ins Gewicht fällt (Semenza, 2002). Marson et al.

wiesen unter primär systemischer Therapie mit dem Anti-Östrogen Tamoxifen eine Assoziation zwischen abnehmender Gefäßdichte und Größenreduktion des Tumors nach. Umgekehrt wurde in deren Studie bei einer Vielzahl der Tumoren aber auch eine Zunahme der Gefäßdichte beobachtet, wobei diese Entwicklung vor allem in nicht-ansprechenden Tumoren zu verzeichnen war (Marson et al., 2001). Dies könnte bedeuten, dass sich unter der Therapie in einem Teil der Tumoren Tamoxifen-resistente Zellklone mit starkem angiogenem Potential bildeten. Analog könnte sich aufgrund des Selektionsdrucks unter der Therapie auch im vorliegenden Kollektiv teilweise eine Hormon-unabhängige Form der Angiogenese herausgebildet haben. Eine ähnliche Schlussfolgerung zogen Jain et al. in ihrem Androgen-abhängigen Tumormodell (Jain et al., 1998). Dort zeigten sich nach Hormonentzug durch Kastration zunächst eine Regression des Tumors sowie ein Rückgang der Vaskularisierung und der VEGF-Expression. Nach zwei Wochen konnte jedoch eine „zweite Welle“ der Gefäßneubildung und ein erneutes Tumorwachstum unter ansteigender VEGF-Produktion beobachtet werden, was für eine Hormon-unabhängige Stimulation der Angiogenese in dieser Phase spricht. Diese Erkenntnisse bilden im Übrigen die Grundlage neuer Therapiestudien wie etwa CALGB (Cancer and Leukemia Group B) 40503, welche einen eventuellen Vorteil des kombinierten Einsatzes von antihormoneller und anti-angiogener Behandlung im Vergleich zur rein antihormonellen Therapie untersuchen (Carlson, 2007).

Die Entwicklung der Gefäßdichte unter primär systemischer Hormontherapie wird also ebenfalls kontrovers diskutiert. Die prinzipiell anti-angiogene Wirkung eines Östrogenentzugs wird möglicherweise in einem Teil der Tumoren durch Entwicklung einer Hormon-unabhängigen Form der Angiogenese maskiert, was die so unterschiedlichen Ergebnissen unter Hormontherapie erklären könnte.

4.5.2 Verlauf des Gefäßflächenanteils

Als zweiter Gefäßparameter wurde prä- und posttherapeutisch der prozentuale Anteil der Gefäß- an der Tumorfläche erfasst. Im Vergleich zur Methode der Gefäßdichtemessung stellt dies durch zusätzliches Einbeziehen der Größe der Gefäße einen anderen Ansatz dar, den Vaskularisierungsgrad eines Tumors zu

beschreiben. Unter primär systemischer Therapie zeigte sich in beiden Behandlungsgruppen durchschnittlich eine Zunahme dieses Parameters, welche in der Chemotherapiegruppe im Mittel bei einem Wert von +0,46 und in der antihormonellen Therapiegruppe bei einem Wert von +1,16 lag. Der 2-Stichproben-T-Tests stellte keinen signifikanten Gruppenunterschied fest ($p=0,28$).

Nach Literaturdurchsicht hat bisher keine andere Studie die Entwicklung dieses Gefäßparameters unter primär systemischer Chemo- oder Hormontherapie untersucht. Dieser Parameter wird sowohl durch die Anzahl als auch durch die Größe der erfassten Gefäße beeinflusst. Eine Zunahme unter der Therapie kann daher zum einen durch eine größere Anzahl von Gefäßen bedingt sein, zum anderen durch an sich größere Gefäße. Interessanterweise entwickelte sich der Anteil der Gefäßfläche an der Fläche des Tumors in der Gruppe der antihormonell behandelten Patientinnen im Mittel in die gleiche Richtung wie die Gefäßdichte, während in der Chemotherapiegruppe eine entgegengesetzte Entwicklung dieser beiden Gefäßparameter zu beobachten war. Betrachtet man die zusammengehörigen Werte der einzelnen Patientinnen, so zeigt sich in der Chemotherapiegruppe bei mehreren Patientinnen trotz abnehmender Gefäßdichte ein höherer Anteil der Gefäß- an der Tumorphäche, sodass in diesen Fällen posttherapeutisch von weniger, aber dafür größeren Gefäßen auszugehen ist. Unter den 72 Patientinnen des Gesamtkollektivs, für welche sowohl prä- als auch posttherapeutisch die Gefäßparameter ermittelt werden konnten, wurde in 18 Fällen (25%) eine gegensätzliche Entwicklung der beiden Gefäßparameter beobachtet. Dies verdeutlicht, dass diese Marker der Angiogenese unterschiedliche Aspekte der Vaskularisierung wiedergeben.

Wie oben bereits beschrieben, spricht eine Zunahme des Gefäßflächenanteils bei abnehmender Gefäßdichte für eine größere Querschnittsfläche der Gefäße. Diese könnte zum Beispiel durch Dilatation bedingt sein. Im Rahmen der Tumorangiogenese werden dilatierte Gefäße bzw. Gefäße wechselnden Durchmessers häufig beschrieben, sei es aufgrund des Überwiegens von proangiogenen Faktoren wie VEGF oder aufgrund der fehlenden Stabilisierung der unreifen Gefäße durch Perizyten (Papetti et Hermann, 2002; Jain, 2005). Ein derartiger „Gefäßphänotyp“ von dilatierten und mangelhaft ausgereiften Gefä-

ßen könnte also Folge einer überstürzten und unkoordiniert ablaufenden Angiogenese sein, welche wie oben beschrieben während der Pause zwischen Chemotherapiezyklen durchaus denkbar ist, auch wenn nicht unbedingt eine größere Anzahl von Gefäßen aus diesem Vorgang resultieren muss.

Eine Abnahme des Gefäßflächenanteils trotz steigender Gefäßdichte bedeutet umgekehrt eine kleinere Querschnittsfläche der Gefäße. Eine derartige Entwicklung konnte in der Chemotherapiegruppe in 2 Fällen und in der Hormontherapiegruppe in 4 Fällen beobachtet werden. Dieser Gefäßphänotyp würde den Gefäßen nach physiologisch abgelaufener Angiogenese entsprechen (Jain, 2005) und könnte für eine bessere Differenzierung der Karzinome oder eine geringere Aggressivität sprechen, da diese noch den physiologischen Stimuli zu gehorchen scheinen. Diese Zusammenhänge müssten jedoch an einem größeren Kollektiv untersucht werden. Die These der Entwicklung eines therapieresistenten Zellklons mit hohem angiogenem Potential unter antihormoneller Behandlung wie unter 4.5.1.2 beschrieben würde allerdings nur bedingt zu dieser Überlegung passen.

Aus diesen Erkenntnissen geht hervor, dass das Zusammenfließen der Größe der Gefäße sowie deren Anzahl in einem Parameter die Interpretation der Vorgänge bei der Tumorangiogenese unter den beiden Therapieformen erschwert. Der relative Anteil der Gefäß- an der Tumorfläche vermischt zwei Merkmale des angiogenen Phänotyps eines Tumors derart, dass ein Rückschluss auf die eine oder andere Komponente nicht mehr möglich ist. Andererseits unterstreichen die angestellten Überlegungen zur Größe der Gefäße deren Bedeutung für die Interpretation des scheinbar unterschiedlich koordiniert ablaufenden Prozesses der Tumorangiogenese, sodass sie angesichts der Komplexität dieses Vorgangs nicht außer Acht gelassen werden kann. Möglicherweise wird diese Komplexität durch die Gefäßdichte als alleiniges Maß der Vaskularisierung zu sehr vereinfacht. Somit ist fraglich, inwiefern die Entwicklung dieser Parameter in die eine oder andere Richtung tatsächlich eine Zu- bzw. Abnahme der angiogenen Aktivität eines Tumors beschreibt.

4.6 Gefäßparameter und Therapieansprechen

Eine These, welche auf verschiedenen Überlegungen basiert, postuliert eine Resistenz von Tumoren mit hohem Vaskularisierungsgrad gegenüber konventionellen Therapien bzw. umgekehrt ein besseres Ansprechen von gering vaskularisierten Tumoren.

Aufgrund der chaotischen Struktur des durch Tumorangiogenese induzierten Gefäßbetts mit ungleichmäßigem Blutfluss und aufgrund des erhöhten interstiellen Drucks infolge der Gefäßhyperpermeabilität wird in stark vaskularisierten Tumoren von einer inhomogenen Versorgung mit Sauerstoff und Medikamenten ausgegangen, wodurch eine erhöhte Therapieresistenz bedingt wird (Brown et Giaccia, 1998; Fox et al., 2001). Die in adjuvanten Therapiestudien beobachtete Assoziation zwischen hoher Gefäßdichte und schlechter Prognose spricht daher möglicherweise für eine Resistenz dieser hoch angiogenen Tumoren gegen die entsprechenden Medikamente bedingt durch das pathologische Tumorgefäßbett (Gasparini et al., 1996; Jacquemier et al., 1998; Nieto et al., 2007). Andererseits könnte aber sowohl das hohe angiogene Potential als auch die Resistenz gegen bestimmte Chemotherapeutika durch die Aktivierung von Onkogenen und/oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen bedingt sein, sodass aus diesen genetischen Veränderungen ein in mehreren Aspekten aggressiver Tumor resultiert (Hanahan et Weinberg, 2000).

Als Ursache einer trotz Östrogenrezeptorpositivität vorliegenden Resistenz gegen Tamoxifen bei Tumoren mit hoher Gefäßdichte ist eine parakrine Stimulation der Tumorzellen durch die Vielzahl von Endothelzellen vorstellbar, sodass der fehlende mitogene Stimulus durch Östrogen infolge der Tamoxifen-Therapie umgangen wird (Gasparini et al., 1996). Dieser Resistenzmechanismus wäre bei Tumoren mit hoher Gefäßdichte auch auf die Therapie mit Aromataseinhibitoren übertragbar. Ebenso besteht die Möglichkeit einer Wachstumsstimulation beider Zellpopulationen durch dieselben Wachstumsfaktoren, welche zum Beispiel von Tumor-assoziierten Makrophagen stammen (Mantovani 2002).

Falls überhaupt ein Zusammenhang zwischen der Tumorangiogenese und der Resistenz gegen verschiedene Therapieformen besteht, ist es folglich nicht klar, ob die gesteigerte Angiogenese tatsächlich die Ursache der Resistenz darstellt

oder ob diese beiden Phänomene nur gleichzeitige Folgen derselben pathobiologischen Vorgänge im Tumorgewebe sind.

Es gibt zwei verschiedene Ansätze, einen möglichen Zusammenhang zwischen den prätherapeutischen Gefäßparametern und dem Therapieansprechen der Mammakarzinome zu untersuchen, welche sich grundsätzlich unterscheiden: Zum einen kann geprüft werden, ob durch die im Stanzpräparat erhobenen Gefäßparameter das Therapieansprechen vorhersagbar ist. Dies würde bedeuten, dass über die prätherapeutische Bestimmung dieser Parameter Patientinnen herausgefiltert werden können, deren Tumoren gut oder schlecht ansprechen werden (prädiktiver Faktor). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit im Rahmen einer Regressionsanalyse mit den prätherapeutischen Gefäßparametern als Prädiktor (unabhängige Variable) und der prozentualen Größenänderung des Tumors als abhängige Variable untersucht.

Untersucht man hingegen, ob sich in einer Response-Gruppe eine bestimmte prätherapeutische Ausprägung der Gefäßparameter abzeichnet, nähert man sich einem eventuell vorhandenen Zusammenhang von der anderen Seite. Dadurch kann das Vorhandensein eines Vaskularisierungstyps als eine mögliche Voraussetzung (von vermutlich mehreren) für das Ansprechen erkannt und dies als Hinweis auf biologische Zusammenhänge gewertet werden. Das Vorhandensein dieses Vaskularisierungstyps erlaubt dann jedoch nicht die Selektion von Patientinnen für eine bestimmte Therapie, solange die Ausprägung der Gefäßparameter eine große Überschneidung zwischen den verschiedenen Response-Gruppen dieser Therapie aufweist. Da die Untersuchung einer prädiktiven Wertigkeit der Gefäßparameter in der primär systemischen Therapie des Mammakarzinoms ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit darstellte, wurden die erhobenen Daten nur in dieser Fragestellung einem statistischen Test unterzogen, während die weiteren Beobachtungen lediglich deskriptiv aufgeführt sind. Die Relevanz der Unterscheidung oben aufgeführter Denkansätze lässt sich anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit veranschaulichen:

In der Chemotherapiegruppe deutete sich unter den Patientinnen mit pathologischer Komplettremission eine niedrigere Gefäßdichte an verglichen mit allen übrigen Patientinnen dieser Behandlungsgruppe. Betrachtet man jedoch insge-

samt das Ansprechen der Tumoren unter dieser Therapieform, welche prätherapeutisch eine Gefäßdichte unterhalb des Medians des Gesamtkollektivs aufwiesen, zeigt sich eine weit gestreute Veränderung der Tumorgöße von totaler Eradikation bis hin zu fast 50%-iger Größenzunahme. Ein Gefäßdichtewert im unteren Bereich ließ daher nicht unmittelbar auf einen gut auf die Chemotherapie ansprechenden Tumor schließen und konnte nicht als prädiktiver Faktor identifiziert werden, auch wenn gut ansprechende Tumoren eher eine niedrige Gefäßdichte aufzuweisen schienen.

Analog wiesen in der Gruppe der antihormonell behandelten Patientinnen 3 von 4 Tumoren der Partial Response-Gruppe für beide Gefäßparameter Werte unterhalb des Medians der übrigen Tumoren dieser Therapiegruppe auf. Umgekehrt zeigten die Tumoren mit einer Gefäßparameterausprägung in diesem unteren Bereich jedoch eine ähnlich weit verteilte Streuung des Therapieansprechens wie unter der Chemotherapie (abgesehen von der totalen Tumoreradikation, welche in dieser Gruppe nicht beobachtet werden konnte). Die beiden Gefäßparameter erwiesen sich also auch für die Therapie mit Aromataseinhibitoren nicht als geeignete prädiktive Faktoren. Andererseits schienen extrem hohe Werte der Gefäßparameter (Gefäßdichte >750 Gefäße pro mm^2 bzw. Gefäßflächenanteil $>5\%$) Tumoren mit starker Größenzunahme ($>50\%$) unter antihormoneller Therapie zu identifizieren, wodurch die negative Geradensteigung bei der Regressionsanalyse in dieser Therapiegruppe vermeintlicherweise statistische Signifikanz erlangte. Ob es sich hier um zufällige Ausreißer oder tatsächlich relevante Ergebnisse handelt, ist wegen der geringen Anzahl jedoch nicht beurteilbar, sodass eine Untersuchung an einem größeren Kollektiv nötig wäre. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist also auf individueller Basis anhand der prätherapeutischen Gefäßparameter weder für die Chemo- noch für die Hormontherapie eine Unterscheidung zwischen Tumoren, die ansprechen, und Tumoren, die nicht ansprechen, möglich.

In den nachfolgend dargelegten klinischen Studien wurde zumeist nach dem zweiten oben aufgeführten Ansätze vorgegangen, um nach Hinweisen auf einen Zusammenhang von Angiogenesemarkern und dem Ansprechen auf verschiedene Therapieformen beim Mammakarzinom zu suchen. Sofern sich unter die-

sem Ansatz ein Zusammenhang ergab, ist es als kritisch anzusehen, daraus einen tatsächlichen Vorhersagewert des Markers bezüglich des Therapieansprechens abzuleiten.

Paulsen et al. konnten beim lokal fortgeschrittenen Mammakarzinom keine Unterschiede der Gefäßdichtewerte für die verschiedenen Response-Gruppen bei primär systemischer Doxorubicin-Therapie feststellen (Paulsen et al., 1997).

Eine andere Studie mit den neoadjuvanten Schemata Epirubicin-Monotherapie bzw. CMF ± Tamoxifen kam zu einem ähnlichen Ergebnis (Bottini et al., 2002).

Für die neoadjuvante Monotherapie mit Tamoxifen waren ebenfalls keine Unterschiede zwischen der prätherapeutischen Gefäßdichte in Tumoren, die ansprachen, verglichen mit Tumoren, die nicht ansprachen, nachweisbar (Marson et al., 2001).

Eine multizentrische Studie verglich beim rezidierten Mammakarzinom (Fernmetastasen) eine Docetaxel-Monotherapie mit dem Schema Methotrexat + 5-Fluorouracil und konnte keinen signifikanten Zusammenhang der Gefäßdichte mit dem klinischen Therapieansprechen nachweisen (Tynninen et al., 2002). Nur im Docetaxel-Arm zeichnete sich für Tumoren mit niedriger Gefäßdichte ein Trend zu besserer Response ab verglichen mit Tumoren mit hoher Gefäßdichte. Allerdings erfasste diese Untersuchung die Gefäßdichte im Primärtumor, während für die Erfassung der Response die Metastasen ausschlaggebend waren, welche sich in ihren biologischen Eigenschaften vom Primärtumor unterscheiden können.

In einer Untersuchung mit dem Marker CD105 (Endoglin), welcher eine Anfärbung aktivierter Endothelzellen ermöglicht, wiesen Tumoren, welche unter neoadjuvanter Chemotherapie (FEC) klinisch einen Rückgang um mehr als 50% aufwiesen, prätherapeutisch eine signifikant niedrigere Dichte dieser Angiogenese-spezifischen Gefäße auf als Tumoren, die nicht auf die Therapie ansprachen (Beresford et al., 2006). Aus diesen Ergebnissen für die mittels CD105 bestimmte Gefäßdichte einen Vorhersagewert bezüglich der klinischen Response unter FEC-Therapie abzuleiten, bleibt fraglich, da die Datenaufbereitung dem zweiten der oben erläuterten Ansätze entspricht.

Foekens et al. bestimmten nicht die Gefäßdichte im Tumor, sondern zytosolische Level des pro-angiogenen Faktors VEGF. Sie konnten in der multivariaten Analyse für steigende Levels dieses Faktors im primären Operationspräparat signifikant schlechtere Ansprechraten sowohl für eine Therapie mit Tamoxifen als auch für verschiedene Chemotherapieschemata (CMF bzw. FAC) in der systemischen Therapie des rezidivierten Mammakarzinoms (Fernmetastasen) nachweisen. Der zytosolische VEGF-Level im Primärtumor kommt daher als prädiktiver Faktor in Frage (Foekens et al., 2001). Darüber hinaus konnte auch eine prognostische Relevanz dieses Parameters in einem solch fortgeschrittenen Krankheitsstadium gezeigt werden. Obwohl wie in oben genannter Studie von Tynninen et al. der Angiogenesemarker im Primärtumor bestimmt und das Therapieansprechen anhand der Metastasen erfasst wurde, deutete sich hier ein Vorhersagewert des Markers an. Inwiefern eine Anwendung auf frühere Stadien möglich ist, kann nur in Studien mit entsprechendem Patientengut geklärt werden.

Insgesamt wird derzeit für die verschiedenen Marker der Angiogenese nicht von einem für den klinischen Einsatz nützlichen Vorhersagewert bezüglich des Therapieansprechens ausgegangen. Auch in unserer Untersuchung konnte unter dem Einsatz eines Panendothelmarkers (CD34) kein prädiktiver Wert nachgewiesen werden. Es deutete sich jedoch in beiden Therapiegruppen für die am besten ansprechenden Tumoren eine niedrigere Ausprägung der Gefäßparameter an im Vergleich zu den übrigen Tumoren der jeweiligen Therapiegruppe, sodass ein Zusammenhang zwischen angiogener Aktivität und Therapieresistenz weiterhin denkbar bleibt. Neuere Methoden wie die Darstellung neu gebildeter Gefäße durch den Marker CD105 oder die Messung der Expression pro-angiogener Faktoren wie VEGF könnten als Prädiktivmarker besser geeignet sein, bedürfen aber erst der Validierung.

In Anlehnung an die prognostische Relevanz konventioneller Angiogenesemarker schlagen allerdings mehrere Studien vor, bei hoher Ausprägung dieser Parameter den entsprechenden Patientinnen zusätzlich eine anti-angiogene Therapie zukommen zu lassen (Gasparini et al., 1996; Jacquemier et al., 1998; Nieto et al., 2007). Deren Kombination mit konventionellen Therapieformen in der

adjuvanten Situation ist dem Einsatz in Studien vorbehalten, wobei sich bislang vielversprechende Erfolge zeigten (Fox et al., 2007).

4.7 Gefäßdichte und immunhistochemische Parameter

4.7.1 Gefäßdichte und MIB-1

Durch den Antikörper MIB-1 (Ki-67) kann die Wachstumsfraktion eines Gewebes identifiziert werden, da das Ki-67-Protein in allen aktiven Phasen des Zellzyklus, nicht jedoch in der G_0 -Phase exprimiert wird (Scholzen et Gerdes, 2000). Bei MIB-1-positiven Mammakarzinomen (>20% MIB-1-positive Zellen) zeigte sich im vorliegenden Kollektiv eine signifikant höhere Gefäßdichte als bei MIB-1-negativen Tumoren ($p=0,02$).

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit zahlreichen Studien. Bereits 1991 wiesen Monschke et al. beim Mammakarzinom auf eine enge Beziehung zwischen dem Vaskularisierungsgrad und dem Prozentsatz Ki-67-positiver Zellen hin, wobei unter 3-dimensionaler Beurteilung die proliferierenden Zellen höchstens 130 μm vom nächsten Blutgefäß entfernt lagen (Monschke et al., 1991). Beliën et al. zeigten ebenfalls eine enge topographische Beziehung zwischen Gefäß-„hot spots“ und Mitose-„hot spots“ der Tumorzellen (Beliën et al., 1999). Mitosen fanden sich hier vorwiegend zwischen 50 und 150 μm entfernt von Blutgefäßen, während Nekroseareale zumeist jenseits 150 μm vom nächsten Gefäß lokalisiert waren. In einigen weiteren Studien erwies sich der Zusammenhang zwischen hoher Gefäßdichte und hoher Proliferationsrate der Tumorzellen beim Mammakarzinom als statistisch signifikant (Lipponen et al., 1994; Koukourakis et al., 2003; Erdem et al., 2005).

Von pathophysiologischer Seite gesehen lässt sich dieser Zusammenhang dadurch erklären, dass eine neu entstehende Blutversorgung in einem proliferierenden Tumorgewebe durch die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie durch den Abtransport von Stoffwechselprodukten die weitere Tumorzellproliferation überhaupt erst ermöglicht, da die Diffusion für eine größere Zellpopulation nicht ausreichen würde (Weidner, 1995a). Zum anderen konnte in vielen Tumormodellen der Nachweis einer reziproken Stimulation zwischen Tumor- und Endothelzellen durch parakrine Sekretion von Wachstumsfaktoren

erbracht werden. Hierbei können nicht nur Tumorzellen selbst das Wachstum von Endothelzellen stimulieren, indem sie Faktoren wie beispielsweise VEGF sezernieren (Mazure et al., 1996; Okada et al., 1998). Es wurde darüber hinaus auch eine tumorinduzierte Rekrutierung von Immunzellen beschrieben, welche ihrerseits ebenfalls pro-angiogene Faktoren freisetzen (Lewis et Pollard, 2006). Umgekehrt ist ebenso von einer Wachstumsstimulation der Tumorzellen durch die Endothelzellen über Faktoren wie bFGF, IGF oder PDGF auszugehen (Bouck et al., 1996).

Angesichts dieser Ergebnisse erscheinen die höheren Gefäßdichtewerte in MIB-1-positiven Mammakarzinomen des vorliegenden Kollektivs plausibel.

Der „Zusammenarbeit“ zwischen Tumor- und Endothelzellen wird über diese Zusammenhänge hinaus aber auch eine Bedeutung hinsichtlich der Invasion und Metastasierung von Tumoren beigemessen, was sich letztlich auf die Prognose maligner Erkrankungen auswirkt. Die neu entstandenen Gefäße bieten den Tumorzellen eine Eintrittspforte in die Blutbahn, zumal diese Gefäße häufig undicht und zum Teil nur unvollständig von Endothelzellen ausgekleidet sind, sodass Tumorzellen in direktem Kontakt zur Blutbahn stehen können (Liotta et al., 1974; Hashizume et al., 2000; Chang et al., 2000). Zum anderen ermöglichen die von Endothelzellen im Rahmen der Angiogenese freigesetzten Proteasen den Tumorzellen eine Invasion ins umliegende Gewebe und letztlich auch in Blutgefäße (Gross et al., 1982; Weidner, 1995a). Einen dritten Ansatz zur Kooperation von Tumor- und Endothelzellen bei der Metastasierung stellt die von Sugino et al. aufgestellte These einer Invasions-unabhängigen Tumoraussaat dar. Hierbei gelangen vor allem in Tumoren mit sinusoidal umgewandelte Gefäßarchitektur von Endothelzellen ummantelte Tumorzellnester in die Blutbahn, was beim Mammakarzinom sowie bei weiteren Tumorentitäten nachgewiesen werden konnte (Sugino et al., 2002; Sugino et al., 2004).

Dem Zusammenhang zwischen Gefäß- und Tumorzellproliferation beim Mammakarzinom dürfte somit eine Bedeutung hinsichtlich der Aggressivität des Tumors zukommen. Mehrere Studien zeigten für den Nachweis einer hohen Gefäßdichte bzw. einer großen Wachstumsfraktion beim Mammakarzinom eine prognostische Relevanz auf (Weidner et al., 1992; de Jong et al., 2000; Vero-

nese et al., 1993; Trihia et al., 2003). Dennoch gilt es für beide Faktoren, eine standardisierte Methode einzuführen und die prognostische Relevanz beim Mammakarzinom auch in prospektiven Studien nachzuweisen, bevor diese zu den etablierten Prognosefaktoren gezählt werden können.

Aus therapeutischer Sicht ist der Zusammenhang zwischen Vaskularisierung und Proliferation ebenfalls interessant, da durch die Entwicklung anti-angiogener Medikamente eine neue Form der Bekämpfung des Tumorwachstums mit eventuell synergistischen Effekten im kombinierten Einsatz mit konventionellen Krebstherapeutika möglich erscheint.

4.7.2 Gefäßdichte und p53- bzw. c-erbB-2-Status

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte in Mammakarzinompräparaten und dem p53- bzw. dem c-erbB-2-Status gefunden werden.

Aufgrund der Ergebnisse verschiedener *in vitro*-Studien wird derzeit von mindestens 3 Mechanismen ausgegangen, über welche das Tumorsuppressorgen p53 anti-angiogene Effekte vermittelt (Teodoro et al., 2007). Aus diesen Studien ging hervor, dass das p53-Protein neben seiner HIF-1 α -inhibierenden Wirkung sowohl die Bildung pro-angiogener Faktoren hemmen als auch die Bildung anti-angiogener Faktoren fördern kann. Des Weiteren stützen zum Teil auch klinische Studien die These einer inhibierenden Funktion von p53 bei der Angiogeneseregulation. So konnten diese Untersuchungen bei verschiedenen Krebsarten wie dem Prostata- und dem Kolonkarzinom eine signifikant höhere Gefäßdichte bei p53-positiven verglichen mit p53-negativen Tumoren demonstrieren, wodurch eine Angiogenese-hemmende Funktion dieses Tumorsuppressorgens nahegelegt wird (Yu et al., 1997; Takahashi et al., 1998).

Die Beteiligung von c-erbB-2 an der Angiogeneseregulation wird bis dato in dessen Einfluss auf die Expression des pro-angiogenen Faktors VEGF gesehen, wobei in Tumormodellen unter Einfluss dieses Onkogens neben einer Erhöhung der VEGF-Level auch eine erhöhte Gefäßdichte vorlag (Viloria-Petit et al., 1997; Yen et al., 2002). In einer klinischen Studie zeigten sich bei der Untersuchung von Tumorgewebelysat signifikant höhere VEGF-Level in HER-

2/neu-überexprimierenden Mammakarzinomen gegenüber Tumoren ohne HER-2/neu-Überexpression (Konecny et al., 2004). Linderholm et al. konnten trotz einer großen Streuung ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von c-erbB-2 und VEGF nachweisen (Linderholm et al., 2004). In einer weiteren klinischen Studie an 77 lymphknotennegativen Patientinnen konnte sogar direkt eine Beziehung zwischen hoher Gefäßdichte und HER-2/neu-Überexpression aufgezeigt werden (Koukourakis et al., 2003).

Aufgrund dieser Ergebnisse würde man auch in der vorliegenden Arbeit einen Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und dem p53- bzw. c-erbB-2-Status erwarten. Tatsächlich lassen jedoch viele Studien diese Zusammenhänge beim Mammakarzinom vermissen. So wiesen Kato et al. an einem Kollektiv von 109 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom lediglich eine Beziehung der Gefäßdichte mit der peritumoralen Blutgefäßinvasion nach, nicht jedoch mit den immunhistochemischen Faktoren p53 und c-erbB-2 (Kato et al., 1999). Eine weitere Studie an 120 Mammakarzinompräparaten konnte ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und dem p53-Status belegen (Tas et al., 2000). Bei 215 Brustkrebspatientinnen mit ausgedehntem Lymphknotenbefall stellten Nieto et al. für c-erbB-2-positive Tumoren zwar signifikant häufiger eine VEGF-Überexpression fest als für c-erbB-2-negative; jedoch wies in diesem Kollektiv weder die HER2/neu- noch die VEGF-Überexpression eine Assoziation mit der Gefäßdichte auf (Nieto et al., 2007). Diese Ergebnisse legen nahe, dass sich der angiogene Phänotyp eines Tumors nicht aus dem bloßen „Ein- oder Ausschalten“ eines einzelnen Regulators ergibt und singuläre Regulationsmechanismen somit nicht 1:1 auf die Vorgänge *in vivo* übertragbar sind.

Das Mammakarzinom stellt eine überaus heterogene Erkrankung dar. Abhängig vom Stadium oder vom histologischen Tumortyp können ganz unterschiedliche Mechanismen für die Tumor-induzierte Angiogenese verantwortlich sein. In einer Arbeit von Yoshiji et al. konnte in einem *in vivo*-Tumormodell mit humanen Mammakarzinomzellen (T-47D) für VEGF lediglich eine Bedeutung in anfänglichen Tumorstadien nachgewiesen werden, während in größeren Tumoren die pro-angiogenen Faktoren bFGF und TGF- α den Verlust der VEGF-Expression zu kompensieren schienen (Yoshiji et al., 1997). Daher könnte das Ergebnis

oben genannter Studie von Nieto und Mitarbeitern so interpretiert werden, dass die c-erbB-2-Amplifikation zwar zur Erhöhung des pro-angiogenen Faktors VEGF geführt hat, dieser Faktor aber in einem solch fortgeschrittenen Krankheitsstadium nicht mehr oder zumindest nicht alleine für den Vaskularisierungsgrad des Tumors verantwortlich ist, und dass daneben andere Faktoren eine Rolle spielen, welche wiederum durch andere Mechanismen aktiviert bzw. deaktiviert werden (Nieto et al., 2007). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass abhängig vom histologischen Tumortyp unterschiedliche Faktoren für die Induktion der Angiogenese herangezogen werden. Bereits 1995 beschrieben Goulding et al. Zusammenhänge zwischen intratumoraler Gefäßdichte bzw. Endothelfläche und dem histologischen Tumortyp (Goulding et al., 1995). Eine weitere Untersuchung wies in invasiv duktalem Mammakarzinomen signifikant höhere Levels an VEGF-mRNA und -Protein nach als in invasiv lobulären Karzinomen (Lee et al., 1998). Coradini et al. bestätigten einen solchen Unterschied (Coradini et al., 2002). Darüber hinaus konnte in oben genannter Studie von Lee et al. bei Karzinomen vom invasiv duktalem Typ ein positiver Zusammenhang zwischen VEGF-Expression und Gefäßdichte aufgezeigt werden, während dieser Zusammenhang bei den invasiv lobulären Karzinomen fehlte. So ist zu vermuten, dass der pro-angiogene Faktor VEGF beim invasiv duktalem Mammakarzinom eine wichtige Rolle für die Tumorangiogenese spielt, wohingegen beim invasiv lobulären Mammakarzinom andere Faktoren entscheidend sind.

Angesichts der Heterogenität des vorliegenden Kollektivs hinsichtlich Krankheitsstadien und Tumorcharakteristika ist es daher tatsächlich nachvollziehbar, dass ein Zusammenhang zwischen Gefäßdichtewerten und p53- bzw. HER-2/neu-Status nicht nachzuweisen war.

5 Zusammenfassung

Beim Mammakarzinom wird wie bei anderen Tumorentitäten eine Relevanz der Tumorangiogenese bezüglich Pathogenese, Erkrankungsverlauf und Therapieresistenz diskutiert. Aufgrund komplexer Regulationsmechanismen erweist sich das Verständnis beeinflussender Faktoren *in vivo* bislang jedoch als lückenhaft.

An einem Kollektiv von 94 primär systemisch behandelten Mammakarzinompatientinnen untersuchte die vorliegende Arbeit, ob die Angiogenesemarker „Gefäßdichte“ und „Anteil der Gefäß- an der Tumorfläche“ einen prädiktiven Wert bezüglich des Ansprechens auf eine Chemo- oder Hormontherapie aufweisen und wie sich die Vaskularisierung unter der Therapie verändert. Des Weiteren wurde ein möglicher Zusammenhang der Gefäßdichte mit den immunhistochemischen Faktoren MIB-1, p53 sowie c-erbB-2 überprüft.

Der Verlauf der Gefäßdichte zeigte unter Chemotherapie im Mittel eine Abnahme, unter Hormontherapie hingegen eine Zunahme, während sich der Anteil der Gefäß- an der Tumorfläche in beiden Gruppen erhöhte. Ein Viertel der Patientinnen zeigte einen gegensätzlichen Verlauf der beiden Gefäßparameter. Diese erfassen die Tumovaskularisierung somit unterschiedlich und geben eine Zu- bzw. Abnahme der angiogenen Aktivität nicht einheitlich wieder.

Eine prädiktive Aussagekraft der Gefäßparameter war in der Regressionsanalyse nicht nachweisbar. Unter beiden Therapieformen deuteten sich bei den am besten ansprechenden Tumoren jedoch niedrigere Werte der Gefäßparameter an als bei den übrigen Tumoren der jeweiligen Gruppe. Eine hohe Ausprägung der Gefäßparameter schien, in der Hormontherapiegruppe Tumoren mit starker Größenzunahme unter der Therapie zu identifizieren. Diese Zusammenhänge müssten jedoch an einem größeren Kollektiv untersucht werden.

Eine Beziehung zwischen den immunhistochemischen Faktoren und der Gefäßdichte zeigte sich nur für den Proliferationsmarker MIB-1, sodass eine p53-Mutation bzw. c-erbB-2-Amplifikation *in vivo* keinen eindeutigen Einfluss auf die Gefäßdichte nimmt. Die Assoziation von MIB-1-Positivität und hoher Gefäßdichte hingegen bekräftigt die These eines Zusammenhangs zwischen angiogener und proliferativer Aktivität beim Mammakarzinom.

6 Literaturverzeichnis

1. Alavi A, Hood JD, Frausto R, Stupack DG, Cheresch DA (2003): *Role of Raf in vascular protection from distinct apoptotic stimuli.* Science 301: 94-96
2. American Cancer Society (2007): *Breast Cancer Facts & Figures 2007-2008.* Atlanta, Georgia
3. Axelsson K, Ljung BM, Moore DH 2nd, Thor AD, Chew KL, Edgerton SM, Smith HS, Mayall BH (1995): *Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma.* J Natl Cancer Inst 87: 997-1008
4. Barbareschi M, Weidner N, Gasparini G, Morelli L, Forti S, Eccher C, Finna P, Caffo O, Leonardi E, Mauri F, Bevilacqua P, Dalla Palma P (1995): *Microvessel density quantification in breast carcinomas. Assessment by light microscopy vs. a computer-aided image analysis system.* Appl Immunohistochem 3: 75-84
5. Barth PJ, Weingärtner K, Köhler HH, Bittinger A (1996): *Assessment of the vascularization in prostatic carcinoma: a morphometric investigation.* Hum Pathol 27: 1306-1310
6. Bear HD, Anderson S, Smith RE, Geyer CE, Mamounas EP, Fisher B, Brown AM, Robidoux A, Margolese R, Kahlenberg MS, Paik S, Soran A, Wickerham DL, Wolmark N (2006): *Sequential preoperative or postoperative Docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27.* J Clin Oncol 24: 2019-2027
7. Beliën JA, van Diest PJ, Baak JP (1999): *Relationships between vascularization and proliferation in invasive breast cancer.* J Pathol 189: 309-318
8. Belotti D, Vergani V, Drudis T, Borsotti P, Pitelli MR, Viale G, Giavazzi R, Taraboletti G (1996): *The microtubule-affecting drug paclitaxel has anti-angiogenic activity.* Clin Cancer Res 2: 1843-1849
9. Berardo MD, Elledge RM, de Moor C, Clark GM, Osborne CK, Allred DC (1998): *bcl-2 and apoptosis in lymph node positive breast carcinoma.* Cancer 82: 1296-1302

10. Beresford MJ, Harris AL, Ah-See M, Daley F, Padhani AR, Makris A (2006): *The relationship of the neo-angiogenic marker, endoglin, with response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.*
Br J Cancer 95: 1683-1688
11. Bettelheim R, Penman HG, Thornton-Jones H, Neville AM (1984): *Prognostic significance of peritumoral vascular invasion in breast cancer.*
Br J Cancer 50: 771-777
12. Bloom HJ, Richardson WW (1957): *Histological grading and prognosis in breast cancer: a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years.*
Br J Cancer 11: 359-377
13. Bocci G, Nicolaou KC, Kerbel RS (2002): *Protracted low-dose effects on human endothelial cell proliferation and survival in vitro reveal a selective antiangiogenic window for various chemotherapeutic drugs.*
Cancer Res 62: 6938-6943
14. Boenisch T (2003): *Färbemethoden-Detektionssysteme.*
Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden; 3. Auflage 2003: 34-42; DakoCytomation Corp., Carpinteria, CA, USA
15. Bonadonna G, Valagussa P, Brambilla C, Ferrari L, Moliterni A, Terenziani M, Zambetti M (1998): *Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight-year experience at the Milan Cancer Institute.*
J Clin Oncol 16: 93-100
16. Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, Semenza GL, van Diest PJ, van der Wall E (2003): *Levels of hypoxia-inducible factor-1 α independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma.*
Cancer 97: 1573-1581
17. Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM, Abeloff MD, Simons JW, van Diest PJ, van der Wall E (2001): *Levels of hypoxia-inducible factor-1 α during breast carcinogenesis.*
J Natl Cancer Inst 93: 309-314
18. Bosari S, Lee AK, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML (1992): *Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma.*
Hum Pathol 23: 755-761
19. Bottaro DP, Liotta LA (2003): *Cancer: Out of air is not out of action.*
Nature 423: 593-595

20. Bottini A, Berruti A, Bersiga A, Brizzi MP, Allevi G, Bolsi G, Aguggini S, Brunelli A, Betri E, Generali D, Scaratti L, Bertoli G, Alquarti P, Dogliotti L (2002): *Changes in microvessel density as assessed by CD34 antibodies after primary chemotherapy in human breast cancer.*
Clin Cancer Res 8: 1816-1821
21. Bouck N, Stellmach V, Hsu SC (1996): *How tumors become angiogenic.*
Adv Cancer Res 69: 135-174
22. Braun SB, Cevatli BS, Assemi C, Janni W, Kantenich CR, Schindlbeck C, Rjosk D, Hepp F (2001): *Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy.*
J Clin Oncol 19: 1468-1475
23. Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group, Thürlimann B, Keshaviah A, Coates AS, Mouridsen H, Mauriac L, Forbes JF, Paridaens R, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Rabaglio M, Smith I, Wardley A, Price KN, Goldhirsch A (2005): *A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer.*
N Engl J Med 353: 2747-2757
24. Brem S, Brem H, Folkman J, Finkelstein D, Patz A (1976): *Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous.*
Cancer Res 36: 2807-2812
25. Brem SS, Jensen HM, Gullino PM (1978): *Angiogenesis as a marker of preneoplastic lesions of the human breast.*
Cancer 41: 239-244
26. Briffod M, Hacène K, Le Doussal V (2000): *Immunohistochemistry on cell blocks from fine-needle cytopunctures of primary breast carcinomas and lymph node metastases.*
Mod Pathol 13: 841-850
27. Browder T, Butterfield CE, Kräling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, Folkman J (2000): *Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer.*
Cancer Res 60: 1878-1886
28. Brown JM, Giaccia AJ (1998): *The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy.*
Cancer Res 58: 1408-1416
29. Buchholz TA, Hunt KK, Whitman GJ, Sahin AA, Hortobagyi GN (2003): *Neoadjuvant chemotherapy for breast carcinoma: multidisciplinary considerations of benefits and risks.*
Cancer 98: 1150-1160

30. Bussolino F, Mantovani A, Persico G (1997): *Molecular mechanisms of blood vessel formation.*
Trends Biochem Sci 22: 251-256
31. Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, Booser DJ, Thomas ES, Theriault RL, Puztai L, Green MC, Arun BK, Giordano SH, Cristofanilli M, Frye DK, Smith TL, Hunt KK, Singletary SE, Sahin AA, Ewer MS, Buchholz TA, Berry D, Hortobagyi GN (2005): *Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer.*
J Clin Oncol 23: 3676-3685
32. Callagy GM, Pharoah PD, Pinder SE, Hsu FD, Nielsen TO, Ragaz J, Ellis IO, Huntsman D, Caldas C (2006): *Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index.*
Clin Cancer Res 12: 2468-2475
33. Carlson RH (2007): *Targeting estrogen to modulate angiogenesis.*
Oncology Times 29: 56
34. Carmeliet P (2000): *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis.*
Nat Med 6: 389-395
35. Carmeliet P, Jain RK (2000): *Angiogenesis in cancer and other diseases.*
Nature 407: 249-257
36. Carter CL, Allen C, Henson DE (1989): *Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases.*
Cancer 63: 181-187
37. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J (1992): *Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections.*
J Pathol 168: 357-363
38. Chagpar AB, Middleton LP, Sahin AA, Dempsey P, Buzdar AU, Mirza AN, Ames FC, Babiera GV, Feig BW, Hunt KK, Kuerer HM, Meric-Bernstam F, Ross MI, Singletary SE (2006): *Accuracy of physical examination, ultrasonography, and mammography in predicting residual pathologic tumor size in patients with neoadjuvant chemotherapy.*
Ann Surg 243: 257-264

39. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL (2000): *Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood.*
Proc Natl Acad Sci U S A 97: 14608-14613
40. Colleoni M, Minchella I, Mazzarol G, Nolè F, Peruzzotti G, Rocca A, Viale G, Orlando L, Ferretti G, Curigliano G, Veronesi P, Intra M, Goldhirsch A (2000): *Response to primary chemotherapy in breast cancer patients with tumors not expressing estrogen and progesterone receptors.*
Ann Oncol 11: 1057-1059
41. Colleoni M, Orvieto E, Nolè F, Orlando L, Minchella I, Viale G, Peruzzotti G, Robertson C, Noberasco C, Galimberti V, Sacchini V, Veronesi P, Zurrada S, Orecchia R, Goldhirsch A (1999): *Prediction of response to primary chemotherapy for operable breast cancer.*
Eur J Cancer 35: 574-579
42. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ (2005): *Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now?*
Ann Oncol 16: 1723-1739
43. Coradini D, Pellizzaro C, Veneroni S, Ventura L, Daidone MG (2002): *Infiltrating ductal and lobular breast carcinomas are characterised by different interrelationships among markers related to angiogenesis and hormone dependence.*
Br J Cancer 87: 1105-1111
44. Croton R, Cooke T, Holt S, George WD, Nicolson R, Griffiths K (1981): *Oestrogen receptors and survival in early breast cancer.*
BMJ 283: 1289-91
45. Dang CV, Semenza GL (1999): *Oncogenic alterations of metabolism.*
Trends Biochem Sci 24: 68-72
46. Davies PF, Remuzzi A, Gordon EJ, Dewey CF Jr., Gimbrone MA Jr. (1986): *Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro.*
Proc Natl Acad Sci U S A 83: 2114-2117
47. Davis BW, Gelber RD, Goldhirsch A, Hartmann WH, Locher GW, Reed R, Golouh R, Säve-Söderbergh J, Holloway L, Russell I, Rudenstam CM (1986): *Prognostic significance of tumor grade in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis.*
Cancer 58: 2662-2670

48. Dawood S, Gonzalez-Angulo AM, Peintinger F, Broglio K, Symmans WF, Kau SW, Islam R, Hortobagyi GN, Buzdar AU (2007): *Efficacy and safety of neoadjuvant trastuzumab combined with paclitaxel and epirubicin.* Cancer 110: 1195-1200
49. de Jong JS, van Diest PJ, Baak JP (1995): *Heterogeneity and reproducibility of microvessel counts in breast cancer.* Lab Invest 73: 922-926
50. de Jong JS, van Diest PJ, Baak JP (2000): *Hot spot microvessel density and the mitotic activity index are strong additional prognostic indicators in invasive breast cancer.* Histopathology 36: 306-312
51. DeLisser HM, Newman PJ, Albelda SM (1994): *Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31.* Immunol Today 15: 490-495
52. Diamond SL, Sharefkin JB, Dieffenbach C, Frasier-Scott K, McIntire LV, Eskin SG (1990): *Tissue plasminogen activator messenger RNA levels increase in cultured human endothelial cells exposed to laminar shear stress.* J Cell Physiol 143: 364-371
53. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, Kaul S, Bastert G (1996): *Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: Prognostic value in comparison with nodal status.* J Natl Cancer Inst 88: 1652-1664
54. Ding S, Merkulova-Rainon T, Han ZC, Tobelem G (2003): *HGF receptor up-regulation contributes to the angiogenic phenotype of human endothelial cells and promotes angiogenesis in vitro.* Blood 101: 4816-4822
55. Dinh P, de Azambuja E, Piccart-Gebhart MJ (2007): *Trastuzumab for early breast cancer: current status and future directions.* Clin Adv Hematol Oncol 5: 707-717
56. Donegan WL (1997): *Tumor-related prognostic factors for breast cancer.* CA Cancer J Clin 47: 28-51
57. Duffy MJ (2005): *Predictive markers in breast and other cancers: a review.* Clin Chem 51: 494-503

58. Dvorak HF (2002): *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy.*
J Clin Oncol 20: 4368-4380
59. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (2005): *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials.*
Lancet 365: 1687-1717
60. Eiermann W, Paepke S, Appfelstaedt J, Llombart-Cussac A, Eremin J, Vinholes J, Mauriac L, Ellis M, Lassus M, Chaudri-Ross HA, Dugan M, Borgs M, Semiglazov V (2001): *Preoperative treatment of postmenopausal breast cancer patients with letrozole: a randomized double-blind multicenter study.*
Ann Oncol 12: 1527-1532
61. Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW (1998): *Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection.*
J Leukoc Biol 64: 275-290
62. Elledge RM, Allred DC (1994): *The p53 tumor suppressor gene in breast cancer.*
Breast Cancer Res Treat 32: 39-47
63. Ellis MJ, Coop A, Singh B, Mauriac L, Llombert-Cussac A, Jänicke F, Miller WR, Evans DB, Dugan M, Brady C, Quebe-Fehling E, Borgs M (2001): *Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial.*
J Clin Oncol 19: 3808-3816
64. Elston CW, Ellis IO (1991): *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: 403-410
65. Engels K, Fox SB, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL (1997): *Distinct angiogenic patterns are associated with high-grade in situ ductal carcinomas of the breast.*
J Pathol 181: 207-212
66. Erdem Ö, Dursun A, Coşkun U, Günel N (2005): *The prognostic value of p53 and c-erbB-2 expression, proliferative activity and angiogenesis in node-negative breast carcinoma.*
Tumori 91: 46-52

67. Faneyte IF, Schrama JG, Peterse JL, Remijnse PL, Rodenhuis S, van de Vijver MJ (2003): *Breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: predictive markers and relation with outcome.*
Br J Cancer 88: 406-412
68. Ferrara N, Alitalo K (1999): *Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors.*
Nat Med 5: 1359-1364
69. Fiedler U, Christian S, Koidl S, Kerjaschki D, Emmett MS, Bates DO, Christofori G, Augustin HG (2006): *The sialomucin CD34 is a marker of lymphatic endothelial cells in human tumors.*
Am J Pathol 168: 1045-1053
70. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF (1990): *Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells.*
Blood 75: 2417-2426
71. Fisher B, Bryant J, Wolmark N, Mamounas E, Brown A, Fisher ER, Wickerham DL, Begovic M, DeCillis A, Robidoux A, Margolese RG, Cruz AB Jr., Hoehn JL, Lees AW, Dimitrov NV, Bear HD (1998): *Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer.*
J Clin Oncol 16: 2672-2685
72. Fisher ER, Anderson S, Redmond C, Fisher B (1993): *Pathologic findings from the National Surgical Breast Project Protocol B-06.*
Cancer 71: 2507-2514
73. Foekens JA, Peters HA, Grebenchtchikov N, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Geurts-Moespot A, van der Kwast TH, Sweep CG, Klijn JG (2001): *High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer.*
Cancer Res 61: 5407-5414
74. Folkman J (1971): *Tumor angiogenesis: therapeutic implications.*
N Engl J Med 18: 1182-1186
75. Folkman J (1990): *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?*
J Natl Cancer Inst 83: 4-6
76. Folkman J (1995): *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease.*
Nat Med 1: 27-31

77. Folkman J, D'Amore PA (1996): *Blood vessel formation: what is its molecular basis?*
Cell 87: 1153-1155
78. Fox SB, Gasparini G, Harris AL (2001): *Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs.*
Lancet Oncol 2: 278-289
79. Fox SB, Generali DG, Harris AL (2007): *Breast tumor angiogenesis.*
Breast Cancer Res 9: 216
80. Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL (1995): *Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis.*
J Pathol 177: 275-283
81. Galy B, Créancier L, Prado-Lourenço L, Prats AC, Prats H (2001): *p53 directs conformational change and translation initiation blockade of human fibroblast growth factor 2 mRNA.*
Oncogene 20: 4613-4620
82. Gardner B, Feldman J (1993): *Are positive axillary nodes in breast cancer markers for incurable disease?*
Ann Surg 218: 270-278
83. Gasparini G, Fox SB, Verderio P, Bonoldi E, Bevilacqua P, Boracchi P, Dante S, Marubini E, Harris AL (1996): *Determination of angiogenesis adds information to estrogen receptor status in predicting the efficacy of adjuvant tamoxifen in node-positive breast cancer patients.*
Clin Cancer Res 2: 1191-1198
84. Gasparini G, Pozza F, Meli S, Reitano M, Santini G, Bevilacqua P (1991): *Breast cancer cell kinetics: Immunocytochemical determination of growth fractions by monoclonal antibody Ki-67 and correlation with flow cytometric S-phase and with some features of tumor aggressiveness.*
Anticancer Res 11: 2015-2022
85. Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jäger W (2001): *Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: Clinical outcome during long-term follow-up.*
J Clin Oncol 19: 3669-3674
86. Giaccia AJ (1996): *Hypoxic stress proteins: survival of the fittest.*
Semin Radiat Oncol 6: 46-58

87. Gianni L, Semiglazov V, Manikhas GM, Eiermann W, Lluch a, Tjulandin S, Feyereislova A, Vanhauwere B, Valagussa P, Baselga J (2007): *Neoadjuvant trastuzumab in locally advanced breast cancer (NOAH): anti-tumour and safety analysis.*
J Clin Oncol 25 (18 Suppl): 532
88. Gimbrone MA, Gullino PM (1976): *Angiogenic capacity of preneoplastic lesions of the murine mammary gland as a marker of neoplastic transformation.*
Cancer Res 36: 2611-2620
89. Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ, Castiglione M, Tu D, Shepherd LE, Pritchard KI, Livingston RB, Davidson NE, Norton L, Perez EA, Abrams JS, Therasse P, Palmer MJ, Pater JL (2003): *A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer.*
N Engl J Med 349: 1793-1802
90. Goulding H, Abdul Rashid NF, Robertson JF, Bell JA, Elston CW, Blamey RW, Ellis IO (1995): *Assessment of angiogenesis in breast cancer: an important factor in prognosis?*
Hum Pathol 26: 1196-1200
91. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ (1996): *Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours.*
Nature 379: 88-91
92. Gross JL, Moscatelli D, Jaffe EA, Rifkin DB (1982): *Plasminogen activator and collagenase production by cultured capillary endothelial cells.*
J Cell Biol 95: 974-981
93. Guidi AJ, Berry DA, Broadwater G, Helmchen B, Bleiweiss IJ, Budman DR, Henderson IC, Norton L, Hayes DF (2002): *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: 732-742
94. Guidi AJ, Schnitt SJ, Fischer L, Tognazzi K, Harris JR, Dvorak HF, Brown LF (1997): *Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in patients with ductal carcinoma in situ of the breast.*
Cancer 80: 1945-1953

95. Guillemin K, Krasnow MA (1997): *The hypoxic response: huffing and HIFing.*
Cell 89: 9-12
96. Guinebretière JM, Lê Monique G, Gavaille A, Bahi J, Contesso G (1994) : *Angiogenesis and risk of breast cancer in women with fibrocystic disease.*
J Natl Cancer Inst 86: 635-636
97. Hanahan D, Folkman J (1996): *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.*
Cell 86: 353-364
98. Hanahan D, Weinberg RA (2000): *The hallmarks of cancer.*
Cell 100: 57-70
99. Hance KW, Anderson WF, Devesa SS, Young HA, Levine PH (2005): *Trends in inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program at the National Cancer Institute.*
J Natl Cancer Inst 97: 966-975
100. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr. (2007): *American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer.*
J Clin Oncol 25: 5287-5312
101. Harvey JM, Clark GM, Osborne K, Allred DC (1999): *Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer.*
J Clin Oncol 17: 1474-1481
102. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM (2000): *Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness.*
Am J Pathol 156: 1363-1380
103. Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriaga M (1991): *Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic index.*
Cancer 68: 2142-2149

104. Herrada J, Iyer RB, Atkinson EN, Sneige N, Buzdar AU, Hortobagyi GN (1997): *Relative value of physical examination, mammography, and breast sonography in evaluating the size of the primary tumor and regional lymph node metastases in women receiving neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast carcinoma.*
Clin Cancer Res 3: 1565-1569
105. Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, Jain RK (1998): *Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment.*
Proc Natl Acad Sci U S A 95: 4607-4612
106. Hobson B, Denekamp J (1984): *Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labeling studies.*
Br J Cancer 49: 405-413
107. Hockenberry D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1990): *Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death.*
Nature 348: 334-336
108. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ (1999): *Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF.*
Science 284: 1994-1998
109. Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniowska K, Harris AL (1992): *Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer.*
Lancet 340: 1120-1124
110. Høst H, Lund E (1986): *Age as a prognostic factor in breast cancer.*
Cancer 57: 2217-2221
111. Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981): *Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.*
J Histochem Cytochem 29: 577-580
112. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F (2004): *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer.*
N Engl J Med 350: 2335-2342

113. Hyder SM (2006): *Sex-steroid regulation of vascular endothelial growth factor in breast cancer.*
Endocr Relat Cancer 13: 667-687
114. Hyder SM, Murthy L, Stancel GM (1998): *Progestin regulation of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells.*
Cancer Res 58: 392-395
115. Iruela-Arispe ML, Porter P, Bornstein P, Sage EH (1996): *Thrombospondin-1, an inhibitor of angiogenesis, is regulated by progesterone in the human endometrium.*
J Clin Invest 97: 403-412
116. Jacobs TW, Siziopikou KP, Prioleau JE, Raza S, Baum JK, Hayes DF, Schnitt SJ (1998): *Do prognostic marker studies on core needle biopsy specimens of breast carcinoma accurately reflect the marker status of the tumor?*
Mod Pathol 11: 259-264
117. Jacquemier JD, Penault-Llorca FM, Bertucci F, Sun ZZ, Houvenaeghel GF, Geneix JA, Puig BD, Bardou VJ, Hassoun JA, Birnbaum D, Viens PJ (1998): *Angiogenesis as a prognostic marker in breast carcinoma with conventional adjuvant chemotherapy: a multiparametric and immunohistochemical analysis.*
J Pathol 184: 130-135
118. Jacquillat C, Weil M, Baillet F, Borel C, Auclerc G, de Maublanc MA, Housset M, Forget G, Thill L, Soubrane C, Khayat D (1990): *Results of neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy in the breast-conserving treatment of 250 patients with all stages of infiltrative breast cancer.*
Cancer 66: 119-129
119. Jain RK (1999): *Understanding barriers to drug delivery: high resolution in vivo imaging is key.*
Clin Cancer Res 5: 1605-1606
120. Jain RK (2003): *Molecular regulation of vessel maturation.*
Nature Med 9: 685-693
121. Jain RK (2005): *Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy.*
Science 307: 58-62

122. Jain RK, Safabakhsh N, Sckell A, Chen Y, Jiang P, Benjamin L, Yuan F, Keshet E (1998): *Endothelial cell death, angiogenesis, and microvascular function after castration in an androgen-dependent tumor: role of vascular endothelial growth factor.*
Proc Natl Acad Sci U S A 95: 10820-10825
123. Jänicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Höfler H, Graeff H (1993): *Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer.*
Breast Cancer Res Treat 24: 195-208
124. Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CGJF, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M (2001): *Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1.*
J Natl Cancer Inst 93: 913-920
125. Janjan NA, Murray KJ, Conway P, Walker A, Wilson JF (1992): *Prognosis for breast cancer surgery and radiation therapy compared with mastectomy alone.*
Cancer 69: 2842-2848
126. Janni W, Gerber B, Sommer H, Untch M, Krause A, Dian D, Runnebaum I, Rack B, Friese K (2005): *Therapie des primären, invasiven Mammakarzinoms.*
Dtsch Arztebl 102: A 2795-2804 [Heft 41]
127. Jiang BH, Agani F, Passaniti A, Semenza GL (1997): *V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression.*
Cancer Res 57: 5328-5335
128. Joensuu H, Isola J, Lundin M, Salminen T, Holli K, Kataja V, Pylkkänen L, Turpeenniemi-Hujanen T, von Smitten K, Lundin J (2003): *Amplification of erbB2 and erbB2 expression are superior to estrogen receptor status as risk factors for distant recurrence in pT1N0M0 breast cancer: A nationwide population-based study.*
Clin Cancer Res 9: 923-930
129. Kato T, Kameoka S, Kimura T, Nishikawa T, Kobayashi M (2003): *The combination of angiogenesis and blood vessel invasion as a prognostic indicator in primary breast cancer.*
Br J Cancer 88: 1900-1908

130. Kato T, Kimura T, Ishii N, Fujii A, Yamamoto K, Kameoka S, Nishikawa T, Kasajima T (1999): *The methodology of quantitation of microvessel density and prognostic value of neovascularization associated with long-term survival in Japanese patients with breast cancer.*
Breast Cancer Res Treat 53: 19-31
131. Kaufmann M, von Minckwitz G, Smith R, Valero V, Gianni L, Eiermann W, Howell A, Costa SD, Beuzebac P, Untch M, Blohmer JU, Sinn HP, Sittek R, Souchon R, Tulusan AH, Volm T, Senn HJ (2003): *International expert panel on the use of primary (preoperative) systemic treatment of operable breast cancer: review and recommendations.*
J Clin Oncol 21: 2600-2608
132. Keen JC, Davidson NE (2003): *The biology of breast carcinoma.*
Cancer 97 (3 Suppl): 825-833
133. Kerbel RS, Kamen BA (2004): *The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy.*
Nat Rev Cancer 4: 423-436
134. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N (1993): *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo.*
Nature 362: 841-844
135. Kimura H, Weisz A, Ogura T, Hitomi Y, Kurashima Y, Hashimoto K, D'Acquisto F, Makuuchi M, Esumi H (2001): *Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide.*
J Biol Chem 276: 2292-2298
136. Konecny GE, Meng YG, Untch M, Wang HJ, Bauerfeind I, Epstein M, Stieber P, Vernes JM, Gutierrez J, Hong K, Beryt M, Hepp H, Slamon DJ, Pegram MD (2004): *Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients.*
Clin Cancer Res 10: 1706-1716
137. Koukourakis MI, Manolas C, Minopoulos G, Giatromanolaki A, Sivridis E (2003): *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: 29-34

138. Krajewski S, Krajewska M, Turner BC, Pratt C, Howard B, Zapata JM, Frenkel V, Robertson S, Ionov Y, Yamamoto H, Perucho M, Takayama S, Reed JC (1999): *Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer.*
Endocr Relat Cancer 6: 29-40
139. Kuerer HM, Hunt KK, Newman LA, Ross MI, Ames FC, Singletary SE (2000): *Neoadjuvant chemotherapy in women with invasive breast carcinoma: conceptual basis and fundamental surgical issues.*
J Am Coll Surg 190: 350-363
140. Kuhnen C, Muehlberger T, Honsel M, Tolnay E, Steinau HU, Müller KM (2003): *Impact of c-Met expression on angiogenesis in soft tissue sarcomas: correlation to microvessel-density.*
J Cancer Res Clin Oncol 129: 415-422
141. Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, Bundred N (1999): *Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis.*
Cancer Res 59: 856-861
142. Lane DP (1992): *p53, guardian of the genome.*
Nature 358: 15-16
143. Lauria R, Perrone F, Carlomagno C, De Laurentiis M, Morabito A, Gallo C, Varriale E, Pettinato G, Panico L, Petrella G, Bianco AR, De Placido S (1995): *The prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in operable breast cancer.*
Cancer 76: 1772-1778
144. Lee AH, Dublin EA, Bobrow LG, Poulson R (1998): *Invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast show distinct patterns of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis.*
J Pathol 185: 394-401
145. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL (1996): *Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma.*
Cancer Res 56: 4625-4629
146. Leone BA, Romero A, Rabinovich MG, Vallejo CT, Bianco A, Perez JE, Machiavelli M, Rodriguez R, Alvarez LA (1988): *Stage IV breast cancer: Clinical course and survival of patients with osseous versus extraosseous metastases at initial diagnosis.*
Am J Clin Oncol 11: 618-22
147. Levine AJ: *p53, the cellular gatekeeper for growth and division.*
Cell 88: 323-331

148. Lewis CE, Pollard JW (2006): *Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments.*
Cancer Res 66: 605-612
149. Li X, Eriksson U (2001): *Novel VEGF family members: VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D.*
Int J Biochem Cell Biol 33: 421-426
150. Liekens S, De Clercq E, Neyts J (2001): *Angiogenesis: regulators and clinical applications.*
Biochem Pharmacol 61: 253-270
151. Linderholm B, Andersson J, Lindh B, Beckman L, Erlanson M, Edin K, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R (2004): *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
152. Lindner DJ, Borden EC (1997): *Effects of tamoxifen and interferon- β or the combination on tumor-induced angiogenesis.*
Int J Cancer 71: 456-461
153. Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM (1974): *Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation.*
Cancer Res 34: 997-1004
154. Lipponen P, Ji H, Aaltomaa S, Syrjänen K (1994): *Tumour vascularity and basement membrane structure in breast cancer as related to tumour histology and prognosis.*
J Cancer Res Clin Oncol 120: 645-650
155. Look M, van Putten W, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtos F, Fernö M, Eppenberger-Castori S, Sweep CGJF, Ulm K, Peyrat JP, Martin PM, Magdelenat H, Brünner N, Duggan C, Lisboa BW, Bendahl PO, Quillien V, Daver A, Ricolleau G, Meijer-van Gelder ME, Manders P, Fiets WE, Blankenstein MA, Broët P, Romain S, Daxenbichler G, Windbichler G, Cufer T, Borstnar S, Kueng W, Beex LV, Klijn JG, O'Higgins N, Eppenberger U, Jänicke F, Schmitt M, Foekens JA (2002): *Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients.*
J Natl Cancer Inst 94: 116-128

156. Macaskill EJ, Renshaw L, Dixon JM (2006): *Neoadjuvant use of hormonal therapy in elderly patients with early or locally advanced hormone receptor-positive breast cancer.*
Oncologist 11: 1081-1088
157. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG (1991): *Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor.*
Proc Natl Acad Sci U S A 88: 9267-9271
158. Makris A, Powles TJ, Dowsett M, Osborne CK, Trott PA, Fernando IN, Ashley SE, Ormerod MG, Titley JC, Gregory RK, Allred DC (1997): *Prediction of response to neoadjuvant chemoendocrine therapy in primary breast carcinomas.*
Clin Cancer Res 3: 593-600
159. Makris A, Powles TJ, Kakolyris S, Dowsett M, Ashley SE, Harris AL (1999): *Reduction in angiogenesis after neoadjuvant chemoendocrine therapy in patients with operable breast carcinoma.*
Cancer 85: 1996-2000
160. Malek AM, Gibbons GH, Dzau VJ, Izumo S (1993): *Fluid shear stress differentially modulates expression of genes encoding basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor B chain in vascular endothelium.*
J Clin Invest 92: 2013-2021
161. Mano MS, Awada A (2004): *Primary chemotherapy for breast cancer: the evidence and the future.*
Ann Oncol 15: 1161-1171
162. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002): *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes.*
Trends Immunol 23: 549-555
163. Marmé D (2001): *Tumorangiogenese: Neue Ansätze zur Krebstherapie.*
Onkologie 24 (Suppl 1): 1-5
164. Marson LP, Kurian KM, Miller WR, Dixon JM (1999): *Reproducibility of microvessel counts in breast cancer specimens.*
Br J Cancer 81: 1088-1093
165. Marson LP, Kurian KM, Miller WR, Dixon JM (2001): *The effect of tamoxifen on breast tumor vascularity.*
Breast Cancer Res Treat 66: 9-15

166. Martin L, Holcombe C, Green B, Leinster SJ, Winstanley J (1997a): *Is a histological section representative of whole tumour vascularity in breast cancer.*
Br J Cancer 76: 40-43
167. Martin L, Green B, Renshaw C, Lowe D, Rudland P, Leinster SJ, Winstanley J (1997b): *Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer.*
Br J Cancer 76: 1046-1054
168. Mason BH, Holdaway IM, Mullins PR, Yee LH, Kay RG (1983): *Progesterone and estrogen receptors as prognostic variables in breast cancer.*
Cancer Res 43: 2985-2990
169. Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JP (2005): *Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis.*
J Natl Cancer Inst 97: 188-194
170. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999): *The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.*
Nature 399: 271-275
171. Mazure NM, Chen EY, Yeh P, Laderoute KR, Giaccia AJ (1996): *Oncogenic transformation and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression.*
Cancer Res 56: 3436-3440
172. Miles D, Chan A, Romieu G, Dirix LY, Cortes J, Pivot X, Tomczak P, Taran T, Harbeck N, Steger GG (2008): *Randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III study of bevacizumab with docetaxel or docetaxel with placebo as first-line therapy for patients with locally recurrent or metastatic breast cancer (mBC): AVADO.*
J Clin Oncol 26 (15 Suppl): LBA1011
173. Millauer B, Longhi MP, Plate KH, Shawver LK, Risau W, Ullrich A, Strawn LM (1996): *Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of man tumor types in vivo.*
Cancer Res 56: 1615-1620
174. Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, Shenkier T, Cella D, Davidson NE (2007): *Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer.*
N Engl J Med 357: 2666-2676

175. Miller KD, Chap LI, Holmes FA, Cobleigh MA, Marcom PK, Fehrenbacher L, Dickler M, Overmoyer BA, Reimann JD, Sing AP, Langmuir V, Rugo HS (2005): *Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer.*
J Clin Oncol 23: 792-799
176. Miller KD, Sweeney CJ, Sledge GW Jr. (2001): *Redefining the target: chemotherapeutics as antiangiogenics.*
J Clin Oncol 19: 1195-1206
177. Miyashita T, Reed JC (1992): *bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI7.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs.*
Cancer Res 52: 5407-5411
178. Monschke F, Müller WU, Winkler U, Streffer C (1991): *Cell proliferation and vascularization in human breast carcinomas.*
Int J Cancer 49: 812-815
179. Morales DE, McGowan KA, Grant DS, Maheshwari S, Bhartiya D, Cid MC, Kleinman HK, Schnaper HW (1995): *Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model.*
Circulation 91: 755-763
180. Moses MA (1997): *The regulation of neovascularization by matrix metalloproteinases and their inhibitors.*
Stem cells 15: 180-189
181. Murasawa S, Asahara T (2005): *Endothelial progenitor cells for vasculogenesis.*
Physiology 20: 36-42
182. Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE (2004): *Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues.*
Blood 104: 2224-2234
183. Nakamura J, Savinov A, Lu Q, Brodie A (1996): *Estrogen regulates vascular endothelial growth/permeability factor expression in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced rat mammary tumors.*
Endocrinology 137: 5589-5596

184. Nemoto T, Vana J, Bedwani RN, Baker HW, McGregor FH, Murphy GP (1980): *Management and survival of female breast cancer: Results of a national survey by the American College of Surgeons.*
Cancer 45: 2917-2924
185. Nieto Y, Woods J, Nawaz F, Baron A, Jones RB, Shpall EJ, Nawaz S (2007): *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: 391-397
186. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA (1998): *Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing.*
Am J Pathol 152: 1445-1452
187. Okada F, Rak JW, St. Croix B, Lieubeau B, Kaya M, Roncari L, Shirasawa S, Sasazuki T, Kerbel RS (1998): *Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells.*
Proc Natl Acad Sci U S A 95: 3609-3614
188. Olayioye MA (2001): *Update on HER-2 as a target for cancer therapy. Intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members.*
Breast Cancer Res 3: 385-389
189. Paik S, Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, Hyams D, Fisher ER, Lippman ME, Wickerham DL, Wolmark N (1998): *erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer.*
J Natl Cancer Inst 90: 1361-1370
190. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Yothers G, Park C, Wickerham DL, Wolmark N (2000): *HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15.*
J Natl Cancer Inst 92: 1991-1998
191. Papetti M, Hermann IM (2002): *Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis.*
Am J Physiol Cell Physiol 282: C749-C970
192. Parangi S, O'Reilly M, Christofori G, Holmgren L, Grosfeld J, Folkman J, Hanahan D (1996): *Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth.*
Proc Natl Acad Sci U S A 93: 2002-2007

193. Paterson MC, Dietrich KD, Danyluk J, Paterson AHG, Lees AW, Jamil N, Hanson J, Jenkins H, Krause BE, McBlain WA, Slamon DJ, Fourny RM (1991): *Correlation between c-erbB-2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer.*
Cancer Res 51: 556-567
194. Paulsen T, Aas T, Børresen AL, Varhaug JE, Lønning PE, Akslen LA (1997): *Angiogenesis does not predict clinical response to doxorubicin monotherapy in patients with locally advanced breast cancer.*
Int J Cancer 74: 138-140
195. Pereira H, Pinder SE, Sibbering DM, Galea MH, Elston CW, Blamey RW, Robertson JFR, Ellis IO (1995): *Pathological prognostic factors in breast cancer, IV. Should you be a typer or a grader? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma.*
Histopathology 27: 219-226
196. Pertschuk LP, Feldman JG, Kim YD, Braithwaite L, Schneider F, Braverman AS, Axiotis C (1996): *Estrogen receptor immunocytochemistry in paraffin embedded tissues with ER1D5 predicts breast cancer endocrine response more accurately than H222Spy in frozen sections or cytosol-based ligand-binding assays.*
Cancer 77: 2514-2519
197. Pertschuk LP, Kim DS, Nayer K, Feldman JG, Eisenberg KB, Carter AC, Rong ZT, Thelmo WL, Fleisher J, Greene GL (1990): *Immunocytochemical estrogen and progestin receptor assays in breast cancer with monoclonal antibodies. Histopathologic, demographic, and biochemical correlations and relationship to endocrine response and survival.*
Cancer 66: 1663-1670
198. Pharoah PD, Day NE, Caldas C (1999): *Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis.*
Br J Cancer 80: 1968-1973
199. Pietenpol JA, Papadopoulos N, Markowitz S, Willson JKV, Kinzler KW, Vogelstein B (1994): *Paradoxical inhibition of solid tumor cell growth by bcl2.*
Cancer Res 54: 3714-3717
200. Pollitt MJ, Hanby AM, Horgan K, Murphy CE, Jones PF, Speirs V (2005): *Angiogenesis in breast cancer: how should we measure this? (Review)*
Oncol Rep 13: 931-936
201. Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ (1994): *Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression.*
Cancer Res 54: 2771-2777

202. Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP, Andrulis IL, Tu D, Bramwell VH, Levine MN (2006): *HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy.*
N Engl J Med 354: 2103-2111
203. Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, Grugel S, Marmé D, Kerbel RS (1995): *Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis.*
Cancer Metastasis Rev 14: 263-277
204. Rastinejad F, Polverini PJ, Bouck NP (1989): *Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene.*
Cell 56: 345-355
205. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A (2000): *Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α .*
Genes Dev 14: 34-44
206. Remmele W, Stegner HE (1987): *Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe.*
Pathologe 8: 138-140
207. Resnick N, Gimbrone MA (1995): *Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression.*
FASEB J 9: 874-882
208. Risau W, Flamme I (1995): *Vasculogenesis.*
Annu Rev Cell Dev Biol 11: 73-91
209. Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.) (2008): *Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends.*
6. überarbeitete Auflage; Berlin
210. Robinson CJ, Stringer SE (2001): *The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors.*
J Cell Sci 114: 853-865
211. Roché H, Fumoleau P, Spielmann M, Canon JL, Delozier T, Serin D, Symann M, Kerbrat P, Soulié P, Eichler F, Viens P, Monnier A, Vindevoghel A, Campone M, Goudier MJ, Bonnetterre J, Ferrero JM, Martin AL, Genève J, Asselain B (2006): *Sequential adjuvant epirubicin-based docetaxel chemotherapy for node-positive breast cancer patients: the FNCLCC PACS 01 trial.*
J Clin Oncol 24: 5664-5671

212. Ryan HE, Lo J, Johnson RS (1998): *HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization.* EMBO J 17: 3005-3015
213. Ryden L, Boiesen P, Jönsson PE (2004): *Assessment of microvessel density in core needle biopsy specimen in breast cancer.* Anticancer Res 24: 371-376
214. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilienbaum R, Johnson DH (2006): Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 355: 2542-2550
215. Sauer G, Deissler H (2003): *Angiogenesis: prognostic and therapeutic implications in gynecologic and breast malignancies.* Curr Opin Obstet Gynecol 15: 45-49
216. Schmidt-Matthiesen H, Wallwiener D (Hrsg.) (2005): *Gynäkologie und Geburtshilfe.* 10. Auflage 2005; Schattauer Verlag
217. Schneider BP, Miller KD (2005): *Angiogenesis of breast cancer.* J Clin Oncol 23: 1782-1790
218. Scholzen T, Gerdes J (2000): *The Ki-67 protein: From the known and the unknown.* J Cell Physiol 182: 311-322
219. Schönfelder A (2007): Expression der Carboanhydrase IX und der Hypoxie-Induzierbaren Faktoren 1 α und 2 α - Verlaufsbeobachtung unter primär systemischer Therapie.
Dissertation online unter :
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:21-opus-29174>
220. Schoppmann SF, Bayer G, Aumayr K, Taucher S, Geleff S, Rudas M, Kubista E, Hausmaninger H, Samonigg H, Gnant M, Jakesz R, Horvat R (2004): *Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer.* Ann Surg 240: 306-312
221. Semenza GL, Wang GL (1992): *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation.* Mol Cell Biol 12: 5447-5454
222. Semenza GL (2002): *Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer.* Intern Med 41: 79-83

223. Semiglazov VF, Semiglazov VV, Dashyan GA, Ziltsova EK, Ivanov VG, Bozhok AA, Melnikova OA, Paltuev RM, Kletzel A, Berstein LM (2007): *Phase 2 randomized trial of primary endocrine therapy versus chemotherapy in postmenopausal patients with estrogen receptor-positive breast cancer.*
Cancer 110: 244-254
224. Sherif ZA, Nakai S, Pirollo KF, Rait A, Chang EH (2001): *Downmodulation of bFGF-binding protein expression following restoration of p53 function.*
Cancer Gene Ther 8: 771-782
225. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP (1998): *Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells.*
Blood 92: 362-367
226. Shibuya M (2003): *Vascular endothelial growth factor receptor-2: its unique signaling and specific ligand, VEGF-E.*
Cancer Sci 94: 751-756
227. Simpson JF, Ahn C, Battifora H, Esteban JM (1996): *Endothelial area as a prognostic indicator for invasive breast carcinoma.*
Cancer 77: 2077-2085
228. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987): *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.*
Science 235: 177-182
229. Spyridopoulos I, Sullivan AB, Kearney M, Isner JM, Losordo DW (1997): *Estrogen-receptor-mediated inhibition of human endothelial cell apoptosis. Estradiol as a survival factor.*
Circulation 95: 1505-1514
230. St. Gallen Konsensuskonferenz (2007): *Kongressbericht.*
Im Focus Onkologie 5: 48-50
231. Stephens RW, Brünner N, Jänicke F, Schmitt M (1998): *The urokinase plasminogen activator system as a target for prognostic studies in breast cancer.*
Breast Cancer Res Treat 52: 99-111
232. Sugino T, Kusakabe T, Hoshi N, Yamaguchi T, Kawaguchi T, Goodison S, Sekimata M, Homma Y, Suzuki T (2002): *An invasion-independent pathway of blood-borne metastasis: a new murine mammary tumor model.*
Am J Pathol 160: 1973-1980

233. Sugino T, Yamaguchi T, Ogura G, Saito A, Hashimoto T, Hoshi N, Yoshida S, Goodison S, Suzuki T (2004): *Morphological evidence for an invasion-independent metastasis pathway exists in multiple human cancers.*
BMC Med 2: 9
234. Sun QH, DeLisser HM, Zukowski MM, Paddock C, Albelda SM, Newman PJ (1996): *Individually distinct Ig homology domains in PECAM-1 regulate homophilic binding and modulate receptor affinity.*
J Biol Chem 271: 11090-11098
235. Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C (1994): *Macrophages and angiogenesis.*
J Leukoc Biol 55: 410-422
236. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD (1996): *Requisite role of Angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryogenesis.*
Cell 87: 1171-1180
237. Sutter CH, Laughner E, Semenza GL (2000): *Hypoxia-inducible factor 1 α protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations.*
Proc Natl Acad Sci U S A 97: 4748-4753
238. Takahashi Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM (1998): *p53, vessel count, and vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer.*
Int J Cancer 79: 34-38
239. Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Miyakawa I (2000): *Expression of c-Ets1 is associated with malignant potential in endometrial carcinoma.*
Cancer 89: 2059-2067
240. Tas F, Yavuz E, Aydiner A, Saip P, Disci R, Iplikci A, Topuz E (2000): *Angiogenesis and p53 protein expression in breast cancer: prognostic roles and interrelationships.*
Am J Clin Oncol 23: 546-553
241. Teodoro JG, Evans SK, Green MR (2007): *Inhibition of tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome.*
J Mol Med 85: 1175-1186
242. Thor AD, Liu S, Moore DH 2nd, Edgerton SM (1999): *Comparison of mitotic index, in vitro bromodeoxyuridine labeling, and MIB-1 assays to quantitate proliferation in breast cancer.*
J Clin Oncol 17: 470-477

243. Thorpe SM, Rose C, Rasmussen BB, Mouridsen HT, Bayer T, Keiding N (1987): *Prognostic value of steroid hormone receptors: multivariate analysis of systemically untreated patients with node negative primary breast cancer.*
Cancer Res 47: 6126-6133
244. Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM (1999): *Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1.*
Science 286: 2511-2514
245. Tomita N, Morishita R, Taniyama Y, Koike H, Aoki M, Shimizu H, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T (2003): *Angiogenic property of hepatocyte growth factor is dependent on upregulation of essential transcription factor for angiogenesis, ets-1.*
Circulation 107: 1411-1417
246. Trastour C, Benizri E, Ettore F, Ramaioli A, Chamorey E, Pouysségur J, Berra E (2007): *HIF-1 α and CA IX staining in invasive breast carcinomas: prognosis and treatment outcome.*
Int J Cancer 120: 1451-1458
247. Trihia H, Murray S, Price K, Gelber RD, Golouh R, Goldhirsch A, Coates AS, Collins J, Castiglione-Gertsch M, Gusterson BA (2003): *Ki-67 expression in breast carcinoma. Its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors-a surrogate marker?*
Cancer 97: 1321-1331
248. Tynninen O, Sjöström J, von Boguslawski K, Bengtsson NO, Heikkilä R, Malmström P, Østenstad B, Wist E, Valvere V, Saksela E, Paavonen T, Blomqvist C (2002): *Tumour microvessel density as predictor of chemotherapy response in breast cancer patients.*
Br J Cancer 86: 1905-1908
249. Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY (2004): *Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis.*
Cancer Res 64: 2941-2955
250. van Hoef ME, Knox WF, Dhesi SS, Howell A, Schor AM (1993): *Assessment of tumour vascularity as a prognostic factor in lymph node negative invasive breast cancer.*
Eur J Cancer 29A: 1141-1145

251. van Slooten HJ, Clahsen PC, van Dierendonck JH, Duval C, Pallud C, Mandard AM, Delobelle-Deroide A, van de Velde CJ, van de Vijver MJ (1996): *Expression of Bcl-2 in node-negative breast cancer is associated with various prognostic factors, but does not predict response to one course of perioperative chemotherapy.*
Br J Cancer 74: 78-85
252. Vaupel P (2004): *Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology.*
Semin Radiat Oncol 14: 198-206
253. Velculescu VE, El-Deiry WS (1996): *Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene.*
Clin Chem 42: 858-868
254. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dirix LY (1996): *Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation.*
Eur J Cancer 32A: 2474-2484
255. Vermeulen PB, Libura M, Libura J, O'Neill PJ, van Dam P, Van Marck E, Van Oosterom AT, Dirix LY (1997): *Influence of investigator experience and microscopic field size on microvessel density in node-negative breast carcinoma.*
Breast Cancer Res Treat 42: 165-172
256. Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O, Scanzi F, Ferrari M, Lampertico P (1993): *Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer.*
Cancer 71: 3926-3931
257. Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Viale G (2005): *Breast cancer.*
Lancet 365: 1727-41
258. Vilorio-Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, Kerbel RS (1997): *Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors.*
Am J Pathol 151: 1523-1530
259. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico MG (1996): *Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3.*
Circulation 93: 1493-1495

260. Volodko N, Reiner A, Rudas M, Jakesz R (1998): *Tumour-associated macrophages in breast cancer and their prognostic correlations.* Breast 7: 99-105
261. von Minckwitz G, Blohmer JU, Raab G, Löhner A, Gerber B, Heinrich G, Eidtmann H, Kaufmann M, Hilfrich J, Jackisch C, Zuna I, Costa SD (2005): *In vivo chemosensitivity-adapted preoperative chemotherapy in patients with early-stage breast cancer: the GEPARTRIO pilot study.* Ann Oncol 16: 56-63
262. Weidner N (1995a): *Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer.* Am J Pathol 147: 9-19
263. Weidner N (1995b): *Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors.* Breast Cancer Res Treat 36: 169-180
264. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G (1992): *Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma.* J Natl Cancer Inst 84: 1875-1887
265. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J (1991): *Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma.* N Engl J Med 324: 1-8
266. Wernert N, Raes MB, Lassalle P, Dehouck MP, Gosselin B, Vandembuer B, Stehelin D (1992): *c-ets1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in humans.* Am J Pathol 140: 119-127
267. Winchester DP, Osteen RT, Menck HR (1996): *The National Cancer Data Base report on breast carcinoma characteristics and outcome in relation to age.* Cancer 78: 1838-1843
268. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF (2007): *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer.* J Clin Oncol 25: 118-145

269. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J (2000): *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. Nature 407: 242-248
270. Yen L, Benlimame N, Nie ZR, Xiao D, Wang T, Al Moustafa AE, Esumi H, Milanini J, Hynes NE, Pages G, Alaoui-Jamali MA (2002): *Differential regulation of tumor angiogenesis by distinct ErbB homo- and heterodimers*. Mol Biol Cell 13: 4029-4044
271. Yoshiji H, Harris SR, Thorgeirsson UP (1997): *Vascular endothelial growth factor is essential for initial but not continued in vivo growth of human breast carcinoma cells*. Cancer Res 57: 3924-3928
272. Yu EY, Yu E, Meyer GE, Brawer MK (1997): *The relation of p53 protein nuclear accumulation and angiogenesis in human prostatic carcinoma*. Prostate Cancer Prostatic Dis 1: 39-44.
273. Zhang L, Mackenzie IZ, Rees MC, Bicknell R (1997): *Regulation of the expression of the angiogenic enzyme platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in endometrial isolates by ovarian steroids and cytokines*. Endocrinology 138: 4921-4930
274. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buchler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW (1999): *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastasis*. Cancer Res 59: 5830-5835

7 Anhang

7.1 Tabellen

Tabelle 1.1: Beispiele für Stimulatoren und Inhibitoren der Angiogenese (modifiziert nach Liekens et al., 2001 sowie Papetti et Hermann, 2002)	19
Tabelle 2.1: Therapieschemata der primär systemischen Chemotherapie	29
Tabelle 2.2: Therapieschemata der primär systemischen Hormontherapie	29
Tabelle 2.3: Grading (Elston et Ellis, 1991)	31
Tabelle 2.4: Verwendete Primärantikörper	35
Tabelle 2.5: Output des Analyseprogramms	38
Tabelle 2.6: Dichotome Bewertung der immunhistochemischen Routineparameter	39
Tabelle 2.7: Therapieansprechen in modifizierter Form nach Kuerer et al., 2000	40
Tabelle 3.1: Prätherapeutische Verteilung des histologischen Gradings (n=94).....	42
Tabelle 3.2: Verteilung des posttherapeutischen Differenzierungsgrads auf die histologischen Tumortypen (n=81)	43
Tabelle 3.3: Prätherapeutische Verteilung der Hormonrezeptoren einzeln sowie zusammengefasst zum Hormonrezeptorstatus (n=94)	45
Tabelle 3.4: Posttherapeutische Verteilung der Hormonrezeptoren einzeln sowie zusammengefasst zum Hormonrezeptorstatus (n=81)	45
Tabelle 3.5: Prätherapeutische Verteilung der immunhistochemischen Routineparameter (n=94).....	45
Tabelle 3.6: Posttherapeutische Verteilung der immunhistochemischen Routineparameter (n=81)	45
Tabelle 3.7: Durchführbarkeit der Gefäßparameterbestimmung in Stanz- und Operationspräparaten	48
Tabelle 3.8: Ausprägung der Gefäßdichte (Gefäße pro mm ²)	49
Tabelle 3.9: Ausprägung des Gefäßflächenanteils.....	49
Tabelle 3.10: Quantile der Änderung der Gefäßdichte (Gefäße pro mm ²) unter der Therapie getrennt nach Therapiegruppen.....	50
Tabelle 3.11: Quantile der Änderung des prozentualen Anteils der Gefäß- an der Tumorfläche (%) unter der Therapie getrennt nach Therapiegruppen.....	52
Tabelle 3.12: Quantile der Gefäßdichtewerte in der Chemotherapiegruppe in den Response-Klassen pCR und non-pCR.....	56

Tabelle 3.13: Quantile des prozentualen Anteils der Gefäß- an der Tumorfläche in der Chemotherapiegruppe in den Response-Klassen pCR und non-pCR.....	56
Tabelle 4.1: Übersicht über die Verteilung der T-Stadien in verschiedenen Studien.....	69
Tabelle 4.2: Übersicht über die Häufigkeit der histologischen Tumortypen in verschiedenen Studien.....	70
Tabelle 4.3: Übersicht über die Verteilung der Differenzierungsgrade G1 bis G3 in verschiedenen Studien.....	71

7.2 Abbildungen

Abbildung 3.1: Verteilung des ypT-Stadiums (n=91)	42
Abbildung 3.4: Verteilung des ypN-Stadiums (n=91).....	44
Abbildung 3.5: Verteilung der Schemata in der Chemotherapiegruppe (n=62).....	46
Abbildung 3.6: Verteilung der Schemata in der Hormontherapiegruppe (n=32).....	46
Abbildung 3.7: Ansprechen auf die primär systemische Therapie unter Chemotherapie (n=62) und Hormontherapie (n=32) unter Angabe der relativen Häufigkeit in der jeweiligen Therapiegruppe.....	47
Abbildung 3.12: Änderung der Gefäßdichte unter der Therapie unter Angabe der relativen Häufigkeit der Änderungskategorie in der jeweiligen Behandlungsgruppe	50
Abbildung 3.13: Änderung des prozentualen Anteils der Gefäß- an der Tumorfläche unter Angabe der relativen Häufigkeit der Änderungskategorie in der jeweiligen Behandlungsgruppe	51
Abbildung 3.14: Prozentuale Größenabnahme des Primärtumors abhängig vom prätherapeutischen Gefäßdichtewert in der Chemotherapiegruppe (n=53).....	53
Abbildung 3.15: Prozentuale Größenabnahme des Primärtumors abhängig vom prätherapeutischen Gefäßflächenanteil in der Chemotherapiegruppe (n=53)	54
Abbildung 3.16: Prozentuale Größenabnahme des Primärtumors abhängig vom prätherapeutischen Gefäßdichtewert in der Hormontherapiegruppe (n=28).....	55
Abbildung 3.17: Prozentuale Größenabnahme des Primärtumors abhängig vom prätherapeutischen Gefäßflächenanteil in der Hormontherapiegruppe (n=28)	55
Abbildung 3.18: Verteilung der Gefäßdichte in den Gruppen MIB-1-positiv (n=58) und MIB-1-negativ (n=36) unter Angabe der relativen Häufigkeit in der jeweiligen Gruppe	58

Abbildung 3.19: Vergleich der Gefäßdichtewerte zwischen den Gruppen MIB-1-positiv und MIB-1-negativ	58
Abbildung 3.20: Verteilung der Gefäßdichte in den Gruppen p53-positiv (n=35) und p53-negativ (n=59) unter Angabe der relativen Häufigkeit in der jeweiligen Gruppe	59
Abbildung 3.21: Vergleich der Gefäßdichtewerte zwischen den Gruppen p53-positiv und p53-negativ	60
Abbildung 3.22: Verteilung der Gefäßdichte in den Gruppen c-erbB-2-positiv (n=23) und -negativ (n=70) unter Angabe der relativen Häufigkeit in der jeweiligen Gruppe	61
Abbildung 3.23: Vergleich der Gefäßdichtewerte zwischen den Gruppen c-erbB-2-positiv und c-erbB-2-negativ.....	61

7.3 Abkürzungen

a/bFGF	Acidic/basic fibroblast growth factor
Ang	Angiopoietin
AT	Adriamycin, Taxotere® (Docetaxel)
Bcl	B-cell lymphoma
bFGF-BP	Basic fibroblast growth factor binding protein
CD	Cluster of differentiation
(c-)erbB	Erythroblastosis oncogene B
(c-)ets	E26 transformation-specific transcription factors
(c-)met	Mesenchymal-epithelial transition factor
CMF	Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluorouracil
DAB	Diaminobenzidin
DDFS	Distant disease free survival
DFS	Disease free survival
EC	Epirubicin, Cyclophosphamid
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Östrogenrezeptor
ET	Epirubicin, Taxol® (Paclitaxel)
fVIIIIRA/vWF	Factor-VIII related antigen/von-Willebrand-factor
G-/GM-CSF	Granulocyte/Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GD-AIF	Glioblastoma derived angiogenesis inhibitory factor
HER2/neu	Human epidermal growth factor receptor-2/neu
HGF/SF	Hepatocyte growth factor/ Scatter factor
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
IFN	Interferon
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
MAP	Mitogen activated protein
mgl.	möglich
MIB	Molecular immunology Borstel
MMP	Matrixmetalloproteinase

MR	Minor response
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
NC/SD	No change/ stable disease
NO	Nitric oxide
PAI	Plasminogenaktivator-Inhibitor
pCR	pathologische Komplettremission
PCR	Polymerase chain reaction
PD	Progressive disease
PD-ECGF	Platelet derived endothelial cell growth factor
PDGF	Platelet derived growth factor
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PgR	Progesteronrezeptor
PIGF	Placental growth factor
PR	Partial response
raf /ras	Rat fibrosarcoma/sarcoma protooncogene
RFS	Relapse free survival
TGF	Transforming growth factor
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
T _{is}	Carcinoma in situ
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor-nodes-metastasis
TP	Thymidine phosphorylase
tPA	Tissue-type plasminogen activator
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TSP	Thrombospondin
uPA	Urokinase-type plasminogen activator
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
VHL	Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorgen

7.4 Danksagung

Ich möchte mich bei allen, die mich bei der Durchführung und beim Schreiben dieser Arbeit unterstützt haben, ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt

meiner Betreuerin Frau Dr. med. Brigitte Smyczek-Gargya für die stetige Unterstützung und Motivation.

meinem Doktorvater Herrn PD. Dr. med. Nikos Fersis für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die Korrektur der Arbeit.

Herrn Dr. med. Ulrich Vogel für die kompetente und geduldige Einführung in die Pathologie des Mammakarzinoms, seine Hilfe bei den Färbungen sowie technischen Problemen und nicht zuletzt für seine Kritik und Anregungen.

den Medizinisch-technischen Assistentinnen im immunhistochemischen Labor des Instituts für Pathologie für die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

der früheren Mitarbeiterin des Zentrums für medizinische Forschung Frau Jutta Hahn für die Einführung in das Bildanalyse-System Leica Q 550 IW sowie für die Hilfe bei dessen Programmierung.

Herrn Prof. Dr. Martin Eichner aus dem Institut für medizinische Biometrie für die sorgfältige Beratung und Hilfe bei den statistischen Auswertungen.

Frau Dr. med. Anja Schönfelder für die Überlassung der Daten des Kollektivs ihrer Dissertation.

schließlich meiner lieben Familie für die großartige Unterstützung, die sie mir während all der Zeit mit großem Verständnis gewährte. Ohne ihre unermüdliche Motivation sowie die Hilfe bei der Betreuung meines kleinen Sohnes wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.