

Aus der Abteilung
für Allgemein- Viszeral- und Gefäßchirurgie
der chirurgischen Klinik und Poliklinik des Universitätskrankenhauses Düsseldorf

Direktor Prof. Dr. med. W. T. Knoefel

CHARAKTERISIERUNG DES ÖSOPHAGUSKARZINOMS BEZÜGLICH DER
EXPRESSION DES GEFÄSSWACHSTUMSFAKTORS VEGF UND
KORRELATION DER WIRKUNG AUF DIE GEFÄSSNEUBILDUNG UND
EINZELZELLDISSEMINATION IN LYMPHKNOTEN UND KNOCHENMARK

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Jana-Christiane Koseki

2006

**Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Gez: Prof. Dr. Nürnberg

Dekan

Referent: PD Dr. med. Hosch

Korreferent: PD Dr. med. Erhardt

Inhaltsübersicht

1. Einleitung	6
1.1. Anatomie des Ösophagus	6
1.2. Physiologie des Ösophagus	7
1.3. Das Ösophaguskarzinom	8
1.3.1. <i>Klassifikation und Staging des Ösophaguskarzinoms</i>	11
1.3.2. <i>Therapie des Ösophaguskarzinoms</i>	14
1.4. Aufbau und Funktion der Blutgefäße	16
1.5. Die Angiogenese	17
1.6. Die Tumorangiogenese	22
1.7. Die Struktur und Funktion der VEGF-Familie	23
1.8. Die Metastasierung und Einzelzelldissemination	25
1.9. Ziel der Arbeit	27
 2. Material und Methoden	 28
2.1. Charakterisierung der Patienten und der Ösophaguskarzinome	28
2.2. Gewebeprobengewinnung und Asservierung	32
2.3. Immunhistochemische Färbemethoden	33
2.3.1. <i>ABC-Färbemethode für VEGF-A</i>	34
2.3.2. <i>APAAP-Färbung für CD31</i>	35
2.3.3. <i>APAAP-Färbung für Ber-Ep4</i>	35
2.3.4. <i>APAAP-Färbung für A45-B/B4</i>	36
2.4. Herstellung von Puffern und Levamisolsubstrat	36
2.5. Primärantikörper	37
2.5.1. <i>VEGF</i>	37
2.5.2. <i>CD31</i>	37

2.5.3. <i>Ber-Ep4</i>	38
2.5.4. <i>A45-B/B4</i>	38
2.6. Auswertungskriterien	39
2.6.1. <i>VEGF</i>	39
2.6.2. <i>Gefäßzählung [microvesseldensity(MVD), vesselcount (VC)]</i>	41
2.6.3. <i>Nachweis der disseminierten Einzelzellen in Lymphknoten</i>	42
2.6.4. <i>Einzelzelldissemination ins Knochenmark</i>	43
2.6.5. <i>Statistische Auswertung</i>	43
3. Ergebnisse	44
3.1. Numerische Datenzusammenstellung	44
3.1.1. <i>VEGF-Färbung</i>	44
3.1.2. <i>Gefäßzählung</i>	46
3.1.3. <i>Einzelzelldissemination</i>	46
3.2. Statistische Auswertung	48
3.2.1. <i>VEGF-Expression in Korrelation zu Tumor spezifischen Daten</i>	48
3.2.2. <i>VEGF-Expression in Korrelation zur Gefäßdichte</i>	50
3.2.3. <i>VEGF-Expression in Korrelation zur Einzelzelldissemination</i>	51
3.3 <i>Prognostische Daten</i>	52
4. Diskussion	53
4.1. Bedeutung der VEGF-A-Expression und der Gefäßdichte beim Ösophaguskarzinom	54
4.2. Therapeutische Ansätze von Anti-VEGF-Präparaten	59
4.3. Metastasierung und Einzelzelldissemination	61

5. Zusammenfassung	64
6. Literaturverzeichnis	66
7. Danksagung	80
8. Lebenslauf	81
9. Erklärung	82

1. Einleitung

Das Ösophaguskarzinom hat in Deutschland eine Inzidenz von vier bis fünf Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Es reiht sich an die 11. Stelle der Krebstodesfälle ein. In der Verbesserung der Prognose ist auch durch viele therapeutische Versuche noch kein entscheidender Durchbruch erzielt worden. Diese Arbeit beschäftigt sich mit biologischen Eigenschaften der Tumorzellen und versucht, einen Zusammenhang von Gefäßneubildung mit der Metastasierung des Ösophaguskarzinoms herzustellen. Im Folgenden werde ich zunächst einige Grundlagen zum Ösophaguskarzinom und seiner Therapie erläutern, bevor ich mich der Gefäßneubildung widme und den untersuchten Gefäßwachstumsfaktor VEGF (vascular endothelial growth factor) vorstelle.

1.1. Anatomie des Ösophagus

Der Ösophagus ist ein 25 bis 30 cm langer Muskelschlauch, der den Speisebrei durch Peristaltik aus dem Pharynx in den Magen transportiert. Es wird ein kurzer Halsteil, Pars cervicalis, von einem längeren Brustteil, Pars thoracalis, und dem sehr kurzen Bauchteil, Pars abdominalis unterschieden. Der Ösophagus weist drei physiologische Engen auf. Diese werden gebildet durch den Kehlkopf, durch den Aortenbogen und als unterstes durch den Hiatus oesophageus, der den Durchtritt in die Bauchhöhle markiert.

Der Wandbau des Ösophagus unterscheidet sich von dem der intraabdominalen Organe des Gastrointestinaltrakts nur durch das Fehlen eines Serosaüberzugs. Von intraluminal beginnend bestehen die Schichten erstens aus der Tunica mucosa mit einem mehrschichtigen, unverhornten Plattenepithel sowie der Lamina muscularis mucosae und zweitens aus der Tela submucosa, die die Glandulae oesophagae beinhaltet. Die Tunica muscularis als dritte Schicht ist für die peristaltischen Bewegungen des Ösophagus zuständig und wird durch den Plexus oesophageus des Nervus vagus innerviert. Die Pars cervicalis der Tunica muscularis wird überdies durch Äste aus dem Nervus laryngeus recurrens willkürlich innerviert. Im proximalen Viertel besteht die Muskelschicht aus quergestreiften, im zweiten Viertel aus glatten

und quergestreiften, während die distalen zwei Viertel ausschließlich aus glatten Muskelzellen aufgebaut sind. Die Tunica adventitia, welche die äußere Wandschicht bildet, besteht aus lockerem Bindegewebe, an welches die Lymphgefäße und Nervenfasern direkt angrenzen (Drenckhahn und Zenker 1994).

Der Lymphabfluß ist auf Grund der zwei unterschiedlichen embryonalen Ursprünge in einen kranialen und einen distalen Abschnitt unterteilt und erfolgt nicht segmental wie in den übrigen gastrointestinalen Organen, sondern, wie Sakata im Jahre 1903 herausfand, longitudinal (Sakata 1903). Dieses führt früh zu einer weiten Streuung der Lymphknotenmetastasen. Die Lymphbahnen des zervikalen, mittleren und thorakalen Ösophagus verlaufen nach kranial und ziehen in die tiefen zervikalen Lymphknoten entlang des Nervus laryngeus recurrens. Der thorakale untere Abschnitt des Ösophagus wird in die perigastralen Lymphknotenstationen drainiert. Im Bereich der Trachealbifurkation erfolgt der Lymphabfluß sowohl nach kranial als auch nach kaudal.

Die arterielle Versorgung des zervikalen Ösophagus erfolgt in der Regel über die Arteria thyroidea inferior. Die Pars thoracalis des Ösophagus wird über Äste direkt aus der Aorta versorgt. Die Arteria gastrica sinistra und Arteriae phrenicae übernehmen die Versorgung des abdominalen Ösophagus.

1.2. Physiologie des Ösophagus

Die Aufgabe der Speiseröhre ist es, den Speisebrei vom Rachen in den Magen zu transportieren. Diese Aufgabe wird auch gegen die Schwerkraft geleistet.

Im Zungengrund liegende Mechanosensoren des Nervus glossopharyngeus und des Nervus vagus lösen den unwillkürlichen Schluckreflex aus, mit dem der Speisebrei über den geöffneten oberen Ösophagussphinkter in die Speiseröhre transportiert wird. Der untere Ösophagussphinkter öffnet sich kurzzeitig für den Durchtritt des Speisebreies und erlangt dann seinen Ruhetonus wieder. Bei Dysfunktion spielt der untere Ösophagussphinkter die entscheidende Rolle für die Entstehung der Refluxerkrankung (Schmidt und Thews 1997).

Exogene Faktoren beeinflussen die Funktion des Sphinktertonus steigend oder senkend. Ein erhöhter (weniger saurer) Magen-pH, proteinreiche Mahlzeiten sowie

einige intestinale Hormone und Peptide wie Gastrin, Motilin und Substanz P wirken tonussteigernd. Eine Verminderung des Sphinktertonus wird durch Nahrungsbestandteile wie Fett, Schokolade, Pfefferminzöl, Alkohol, Nikotin und Kaffee erreicht. Durch Hormone wie Cholezystokinin (CCK), Glukagon, VIP und Progesteron (häufiger Reflux in der Schwangerschaft) wird der Tonus ebenfalls gesenkt.

1.3. Das Ösophaguskarzinom

Das Ösophaguskarzinom kann histologisch in zwei Ätiologien unterteilt werden, das Plattenepithel- und das Adenokarzinom. Während noch vor rund zehn Jahren das Ösophaguskarzinom zu über 90 % plattenepithelialen Ursprungs war und das Adenokarzinom weniger als 10 % ausmachte, ist die Verteilung der Karzinome auf die beiden Zelltypen heutzutage im westlichen Europa und Nordamerika nahezu ausgeglichen (Daly et al. 1996, Devesa et al. 1998). Die Inzidenz des Adenokarzinoms hat sich in der westlichen Hemisphäre rasant erhöht, während das Plattenepithelkarzinom in unveränderter Häufigkeit auftritt. In Japan dagegen ist das Verhältnis von Plattenepithelkarzinom zu Adenokarzinom fast unverändert geblieben (Coia et Sauter 1994). Durch ein anderes Vorsorgeprogramm in Japan werden dort die Ösophaguskarzinome deutlich früher erkannt, welches sich in einer Überlebensrate von ca. 30 % im Gegensatz zu einer Überlebensrate von ca. 10 % im westlichen Europa auswirkt (Schlemper et al. 2000). Das Plattenepithelkarzinom unterscheidet sich, abgesehen von der Histologie, klinisch relevant in der Ätiologie von dem Adenokarzinom.

Das Plattenepithelkarzinom entsteht häufig bei Patienten mit langjährigem Nikotin- und Alkohol-Abusus. Eine Leberfunktionsstörung und Malnutrition, vor allem ein Vitaminmangel, begleiten das Plattenepithelkarzinom nicht selten (Blot 1994, Steinmetz et al. 1991). Die kanzerogene Ursache wird unter anderem auf die Induktion eines Isoenzyms des Zytochrom P450 zurückgeführt (Irland et al. 1996, Coia et Sauter 1994). Aber auch diätetische Faktoren spielen eine wichtige Rolle. Das Essen von salzig eingelegtem Gemüse und nitrosaminhaltigen Lebensmitteln, wie gepökeltem Fleisch/Fisch (Räucherwaren), erhöhen das Risiko, ein Ösophaguskarzinom zu

entwickeln (Cheng et al. 1992, Mervish 1992). Da vor allem diätetisch exogene Faktoren in der Genese eine Rolle spielen, ist die Inzidenz weltweit gesehen regional sehr unterschiedlich. In westeuropäischen Ländern liegt sie mit 2,3 - 10,3 pro 100.000 Einwohner verhältnismäßig niedrig im Gegensatz zu 240-310 pro 100.000 in einigen Provinzen Nord Chinas und Kasachstans (Li et al. 1989). Neben diesen diätetischen Faktoren kommen auch Verätzungsstrikturen und das Vorkommen einer Achalasie zum Tragen.

Das Plattenepithelkarzinom kommt in allen Abschnitten der Speiseröhre vor (9 % zervikal, 45 % suprabifurkal, 46 % infrabifurkal; Klinikum Rechts der Isar, TU-München 1982 - 2000). In den meisten Fällen werden die Tumore als polypös (60 %) oder ulcerierend (25 %) beschrieben. Als Sonderform gelten verrukös oder papillär wachsende Tumoren.

Das Adenokarzinom steht dem Plattenepithelkarzinom gegenüber. Die Ätiologie ist grundsätzlich eine andere und beruht auf der malignen Entartung einer Refluxösophagitis. Der duodeno-gastrale Reflux in den Ösophagus wird durch eine Sphinkterinsuffizienz, Ösophagusmotilitätsstörungen, Übergewicht, Alkohol oder Nikotinkonsum gefördert (Patti et Owen 1997). Entscheidend für die Entstehung eines Adenokarzinoms ist nach einer Studie von Irland der alkalische (duodenale, gallische) Reflux, nicht der saure Magensaft-Reflux (Irland et al. 1996). Allerdings ist klinisch für die Beschwerden der letztere verantwortlich. In einer landesweiten Studie in Schweden konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Schwere der Refluxbeschwerden und dem Fortschreiten zu einer Barrett-Metaplasie (Norman Barrett, britischer Chirurg) aus der Refluxösophagitis dargestellt werden (Lagergren et al. 1999). Ein Barrett-Ösophagus zeigt ein 100fach erhöhtes Risiko, ein Adenokarzinom zu entwickeln (Spechler et Goyal 1996). Somit kann davon ausgegangen werden, daß auch der saure Reflux seinen Anteil an der Entstehung des Adenokarzinoms hat.

Ein Erklärungsansatz für die steigende Inzidenz des Adenokarzinoms der letzten Jahrzehnte könnte der bessere Ernährungszustand und die damit erhöhte Fettdigestion mit Folge einer Adipositas sein.

Gastroduodenaler Reflux ist, unabhängig von seiner Ursache, der Entstehungsgrund für eine Refluxösophagitis und damit Grundlage für die Entstehung eines Adenokarzinoms. Ein geringes Maß an nächtlichem Reflux ist physiologisch. Besteht jedoch

bspw. eine Sphinkterinsuffizienz, so ist die Refluxzeit besonders nachts deutlich verlängert, die Folge dieses chronisch vermehrten Refluxes ist die Refluxösophagitis. Die Diagnose wird endoskopisch gestellt. Bei Fortbestehen des Refluxes und der Entzündung kann es zu einer Barrett-Metaplasie kommen, die bereits als Präkanzerose für ein Adenokarzinom angesehen wird. Im weiteren Verlauf der Erkrankung können sich dysplastische Veränderungen bilden, die über Stufenbiopsien diagnostiziert werden. In einem schleichenden Übergang wird aus der Dysplasie durch weitere Einwirkung der Noxen das Adenokarzinom (Huang et al. 1992, Patti et Owen 1997). Die Refluxösophagitis ist endoskopisch regelmäßig zu kontrollieren, da nur durch eine regelmäßige Überwachung die Entstehung von Dysplasien registriert und therapeutisch frühzeitig vor Entstehung eines Karzinoms behandelt werden kann. In der Ausbildung des Karzinoms aus der Dysplasie spielen unter anderem Mutationen im p53 und p16 Gen eine Rolle (Schneider et al. 1996). Der Ätiologie entsprechend, tritt das Adenokarzinom meist im distalen Ösophagus am Übergang zum Magen auf. Es wächst vor allem ulcerierend mit knotiger Vorwölbung in das Lumen.

Für beide Ösophaguskarzinome gilt, daß sie erst in einem fortgeschrittenen Stadium zu klinisch spezifischen Beschwerden führen. Zu diesen Beschwerden gehört die Dysphagie, Schluckstörungen mit Fremdkörpergefühl sowie retrosternales Brennen. Der Ösophagus hat eine hohe Dehnungskapazität, so daß Einschränkungen erst bemerkt werden, wenn zwei Drittel des Lumens verengt sind. In vielen Fällen ist auch ein Gewichtsverlust oder Nachtschweiß das erste Symptom, welche zu den Kriterien der B-Symptomatik gehören und ein fortgeschrittenes Tumorleiden andeuten. Zu Beginn der Schluckbeschwerden bereitet die Stenose nur festen Speisen wie Fleisch und Vollkornbrot o.ä. ein Passagehindernis, im weiteren Verlauf wird auch der Transport von Brei und Getränken erschwert.

Eine kurative Therapie des Ösophaguskarzinoms ist derzeit durch Exstirpation des Tumors im Gesunden möglich (Lerut et al. 1992, Enzinger et Mayer 2003). Selten kann auch durch eine Radiochemotherapie eine Kuration erzielt werden. Der Nutzen einer neoadjuvanten Chemo- oder Radiochemotherapie wird kontrovers diskutiert. Es hat sich in einigen Studien gezeigt, daß eine Tumorverkleinerung in einigen Fällen auch ein „Downstaging“, durch präoperative Radiochemotherapie möglich war, daß jedoch nur ein geringer Anteil der Patienten auf diese Therapie anspricht (Slater et al. 2001). Insgesamt konnte die Fünf-Jahres-Überlebensrate durch Fortschritte in der operativen Therapie und peri-operativen Betreuung der Patienten

von 12,6 % 1980 auf Werte über 30 % angehoben werden (Isono et al. 1991b, Forastiere et al. 1993).

Ist der Tumor jedoch fortgeschritten und sind bereits Fernmetastasen in anderen Organen diagnostiziert, kommen nur palliative Therapieverfahren zur Anwendung. Sie bestehen aus der limitierten Operation, der Radio- und / oder Chemotherapie. In einer amerikanischen Studie an 838 Patienten über die wichtigsten Prädilektionsstellen von Fernmetastasen im prä-operativen Staging waren die distalen intraabdominalen Lymphknoten mit einer Inzidenz von 45 %, gefolgt von der Leber mit 35 %, der Lunge mit 20 %, den zervikalen und supraklavikulären Lymphknoten mit 18 % und den Knochen mit 9 % am häufigsten betroffen (Daly et al. 1996).

Bei einem großen Teil der Patienten kommt es bereits vor oder im Anschluß an die Diagnose des Ösophaguskarzinoms zur Entstehung eines Zweitkarzinoms. Besonders häufig handelt es sich hierbei um Hypopharynxkarzinome oder Magenkarzinome, die durch ähnliche pathophysiologische Prozesse induziert werden wie das Ösophaguskarzinom (Isono et al. 1991b).

1.3.1. Klassifikation und Staging des Ösophaguskarzinoms

Das Ösophaguskarzinom wird nach dem klassischen TNM-System des American Joint Committee on Cancer (AJCC) und der Union Internationale Contre Cancer (UICC) in die Stadien 0 - IV eingeteilt. Die Prognose ist stark von den Stadien abhängig (Japanese committee 1985). (Siehe nachfolgende Tabelle)

Stadieneinteilung /TNM (UICC 1997)

Stadium 0	T _{is}	N ₀	M ₀	T/pT _x Primärtumor kann nicht beurteilt werden T/pT ₀ Es besteht kein Verdacht auf Primärtumor T/pT _{is} Carcinoma in situ ohne Infiltration der Lamina propria muscularis mucosae
Stadium I	T ₁	N ₀	M ₀	T/pT _{1a} Infiltration der Lamina muscularis propria T/pT _{1b} Infiltration der Submucosa
Stadium IIA	T ₂ T ₃	N ₀ N ₀	M ₀ M ₀	T/pT ₂ Infiltration der Muscularis propria T/pT ₃ Infiltration der Adventitia
Stadium IIB	T ₁ T ₂	N ₁ N ₁	M ₀ M ₀	s.o.
Stadium III	T ₃ T ₄	N ₁ jedes N	M ₀ M ₀	T/pT ₄ Infiltration von Nachbarstrukturen
Stadium IV	jedes T	jedes N	M ₁	M1a zervikaler LK Befall bei Tu oberhalb der Trachealbifurkation zöliakaler LK Befall bei Tu unterhalb der Trachealbifurkation M1b andere Fernmetastasen

Tabelle 1: TNM-Stadieneinteilung des Ösophaguskarzinoms

Die histopathologische Klassifizierung der Tumore nach den pT Stadien 1 bis 3 ist nur unter der Bedingung eines makroskopisch in sano resizierten Tumors möglich. Bei pT₄ klassifizierten Tumoren ist es notwendig, die Infiltration in die Nachbarorgane nachzuweisen.

Das Plattenepithel- sowie Adenokarzinom werden in drei Differenzierungsgrade im Vergleich zum Normalgewebe eingeteilt.

-
- G1 gut differenziert
 - G2 mäßiggradig differenziert
 - G3 schlecht differenziert

Die Lymphknoten sind gemäß der UICC in zervikale, thorakale und abdominale Lymphknotenstationen getrennt. Die Einteilung der Lymphknotenstationen beim Ösophagus erfolgt nach der American Thoracic Society (Casson et al. 1994). Zusammengefaßt gehören die regionalen Lymphknoten eines zervikal gelegenen Karzinoms zu den lateral-zervikal, zervikal-paraösophageal, tief-zervikal, retropharyngeal und supraclaviculären Stationen. Zu den regionalen Lymphknoten eines intrathorakal gelegenen Ösophaguskarzinoms gehören sowohl die mediastinalen als auch die porigastralen Lymphknotenstationen. Zu den intrathorakalen Lymphknotenstationen gehören die oberen thorakal paraösophagealen, die thorakal paratrachealen, solche an der Trachealbifurkation, die mittleren thorakal paraösophagealen, jene am Hilus, untere thorakal paraösophageale, diaphragmale sowie im hinteren Mediastinum gelegene Lymphknoten. Zu den porigastralen Lymphknotenstationen zählt man die kardialen Lymphknoten (rechts und links) entlang der großen und kleinen Kurvatur, die am Pylorus (supra- und infrapyloridal) sowie die entlang der Arteria gastrica sinistra gelegenen Lymphknoten.

Für das Verständnis der lymphogenen Metastasierung ist die Entdeckung Sakatas von 1903, daß der Lymphabfluß nicht segmental, sondern longitudinal entlang des Ösophagus verläuft, von großer Bedeutung gewesen (Sakata 1903). Der embryonalen Herkunft entsprechend gibt es einen nach kranial und einen nach kaudal gerichteten Lymphstrom. Die Metastasierung eines infrabifurkal gelegenen Tumors in die Halslymphknoten oder eines zervikal gelegenen Primärherdes in porigastralen Lymphknotenstationen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. So wiesen 29,4 % der Patienten mit Tumor im distalen Ösophagus einen Befall der cervicalen Lymphknoten auf (Akiyama et al. 1993).

Beim Plattenepithelkarzinom treten schon im pT1 Stadium in 50 % der Fälle Lymphknotenmetastasen bzw. Mikrometastasen auf, während im T1a Stadium des Adenokarzinoms praktisch nie eine Lymphknotenmetastasierung nachzuweisen ist (Natsugoe et al. 1998).

Das präoperative Staging ist für die Behandlung des Ösophaguskarzinoms von entscheidender Bedeutung. Es beinhaltet eine Ösophagoduodenoskopie mit Entnahme

von Biopsien zur Dignitätsbestimmung, eine Computer-Tomographie von Thorax und oberem Abdomen zum Lymphknoten Staging sowie eine Endosonographie des Ösophagus zur Beurteilung der Infiltrationstiefe und Größe des Tumors. Das CT zusammen mit der Endosonographie haben eine 86 %ige Übereinstimmung des Staging im Vergleich zum postoperativ, pathologischen Befund (Lightdale 1992). Wenn der Verdacht auf eine tracheale Infiltration oder eine tracheale Fistelung besteht, sollte das präoperative Staging um eine Bronchoskopie erweitert werden. Für das pathologische Staging ist neben der Infiltrationstiefe vor allem die Lokalisation und die Anzahl der befallenen Lymphknoten wichtig (Ellis et al. 1993, Junginger et Dutowski 1996). Nach WHO-Richtlinien müssen mindestens sechs Lymphknoten entnommen und histologisch untersucht werden, um die pathologische Tumorstadien-Einteilung (pN) vergeben zu können.

1.3.2. Therapie des Ösophaguskarzinoms

Die Resektion des Ösophaguskarzinoms im Gesunden (R0) ist die häufigste Therapie in kurativer Absicht. Für das operative Vorgehen müssen verschiedene Voraussetzungen bei den Patienten beachtet werden. Wichtig ist der Allgemeinzustand und das Alter der Patienten, denn der Eingriff, auch wenn transhiatal operiert wird, ist sehr belastend und mit einer hohen Morbidität behaftet. Beim Plattenepithelkarzinom ist vor allem der Ernährungszustand und die Leberfunktion zu berücksichtigen; beim Adenokarzinom sind sogenannte Wohlstandskrankheiten wie Arteriosklerose, Koronare Herzkrankheit und Diabetes Mellitus gehäuft zu finden (Siewert 2001).

Es stehen verschiedene operative Methoden zur Verfügung. Die radikalste Behandlung ist die thoraco-abdominale En-Bloc-Resektion nach Skinner (Skinner 1983). Der zwei Höhleneingriff erlaubt eine radikale Lymphknoten Dissektion im Mediastinum. Alternativ dazu wurde von Orringer die transhiatale Ösophagektomie ohne Eröffnung des Thorax beschrieben. Der Ösophagus wird stumpf durch den Hiatus aus dem Mediastinum herausgelöst und zervikal anastomosiert (Orringer 1984, Orringer et al. 1999).

Die komplexen Lymphabflußwege und frühe Metastasierung haben Isono 1991 in Japan dazu veranlaßt, die „Drei-Felder-Lymphadenektomie“ zu entwickeln. Durch das

Entnehmen von Lymphknoten aus allen drei Lymphknotenstationen, also auch aus den zervikalen, verspricht man sich ein zuverlässigeres Staging und ein längeres Überleben zu erreichen (Isono et al. 1991a). Wenn die Lymphknotenratio aus befallenen zu entfernten Lymphknoten unter 0,2 liegt, soll eine bessere Prognose abzugeben sein (Roder et al. 1994). Trotz dieser radikalen Verfahren konnte keine signifikante Verbesserung der Prognose oder Überlebenszeit erreicht werden, da die operative Morbidität entsprechend höher war. Damit bleibt die „Drei-Felder-Lymphadenektomie“ weiterhin umstritten.

Bei allen Verfahren erfolgt die Rekonstruktion durch die Bildung eines schlanken Magenschlauches, der an den proximalen Ösophagusstumpf anastomosiert wird. Alternativ kann die Rekonstruktion mit einem Koloninterponat erfolgen.

Neben dem Versuch, die Operationsmethoden und die perioperative Betreuung des Patienten zu verbessern, wurden adjuvante und neoadjuvante Chemo- und / oder Radiotherapien untersucht. Von neoadjuvanten Chemo- / Radiotherapien verspricht man sich eine Verkleinerung oder auch ein Downstaging des Tumors, welcher dann besser operiert werden könnte. Es hat sich in einigen Studien gezeigt, daß ein Downsizing oder auch -staging möglich ist, jedoch nur eine Subgruppe von Patienten auf die Therapie anspricht (Slater et al. 2001).

Es bleibt eine kontroverse Diskussion, ob ein multimodales Vorgehen beim Ösophaguskarzinom einen Langzeitüberlebensvorteil oder positiven Einfluß auf die Prognose gegenüber der R0 Resektion ohne Zusatztherapie bringt.

Die Prognose und der Verlauf von Patienten mit einem in kurativer Intention resizierten Ösophaguskarzinom wurden von Isono zusammengestellt. Bei 13 % der Patienten wurde ein Lokalrezidiv als tumorbedingte Todesursache gefunden. Bei 8,7 % der Patienten führte ein Rezidiv im Bereich des residualen Ösophagusabschnitts zum Tode. Bei 43 % der Patienten fanden sich Lymphknotenmetastasen. Die Lokalisation dieser Lymphknotenmetastasen war abhängig von der Lage des Primärtumors. Diese Beobachtung wurde von Akiyama bestätigt (Akiyama et al. 1993). Fernmetastasen konnten in 28,3 % der Fälle verifiziert werden. In 6,5 % der Patienten fand sich eine Pleura- oder Peritonealkarzinose (Isono et al. 1991b). Prädilektionsstellen der präoperativ festgestellten Fernmetastasen sind die abdominalen Lymphknoten mit 45 %, die Leber mit 35 % und die Lunge mit 20 % (Daly et al. 1996).

Durch Fortschritte in der operativen Therapie des Ösophaguskarzinoms und der peri-operativen Betreuung der Patienten ist es gelungen, die Fünf-Jahres-Überlebensrate von 12,6 % im Jahre 1980 auf Werte von über 30 % anzuheben (Forastiere et al. 1993).

1.4. Aufbau und Funktion der Blutgefäße

Das Blutgefäßsystem kann in drei funktionelle Einheiten gegliedert werden:

- Das arterielle Hochdrucksystem, welches zur Aufrechterhaltung des Blutdrucks und zum Transport des Bluts benötigt wird;
- die terminale Strombahn, in der vor allem der Austausch von Nährstoffen und Sauerstoff geschieht
sowie
- das venöse Niederdrucksystem, welches als „Blutdepot“ genutzt wird.

Für die Versorgung der Organe und entsprechend auch für die Versorgung des Tumorgewebes ist die terminale Strombahn und damit die Mikrozirkulation von ausschlaggebender Wichtigkeit. Im Folgenden soll der Aufbau der Kapillaren und Venolen besprochen werden, der für die Angiogenese von elementarer Bedeutung ist.

Die Wand der Kapillaren besteht aus drei Schichten. Das Lumen wird von Endothelzellen ausgekleidet. Diese werden nach außen von einer Basalmembran umhüllt, daran schließt sich zur Stabilisierung meist eine Schicht Perizyten an. Je nach Gewebetyp können Kapillaren mit geschlossenen, fenestrierten und Poren enthaltenden Endothelzellen ausgekleidet sein. Die Wand der Kapillaren der terminalen Strombahn enthält meist flache, fenestrierte Endothelzellen. Vereinzelt können Perizyten nachgewiesen werden. Die daran anschließenden postkapillaren Venolen werden von einer kontinuierlichen Endothelschicht ausgekleidet, sind in der Regel jedoch nur sternförmig von Perizyten umgeben. Von Ihnen geht die Angiogenese aus (Hanahan et Folkman 1996).

Die Endothelzellen decken einen Großteil der metabolischen Funktionen der Gefäße ab. Der Aufgabenbereich betrifft die Blutgerinnung, die Aufnahme und den Abbau der Blutfette, die Regulierung der Permeabilität und die Synthese von Faser- und Proteoglykankomponenten des umgebenden Bindegewebes. Im Weiteren exprimieren sie eine Vielzahl von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1 und E-Selektin. Ebenfalls in den Aufgabenbereich der Endothelzellen fällt die Beeinflussung der Dilatationsweite durch Synthese von NO und Angiotensinase. Die Gefäßverengung wird durch die Proteine Endothelin und Angiotensin Converting Enzym (ACE) gesteuert. Die wichtigste Aufgabe im Zusammenhang mit der hier vorliegenden Arbeit ist die Synthese von Angiogenesefaktoren und deren Rezeptoren (Drenckhahn 1994). Die Fähigkeit der Endothelzellen zur Proliferation und Migration ermöglicht die Aussprossung neuer Gefäße (Senger et al. 1996).

Die Basalmembran bildet die Grenzschicht zum Bindegewebe. Sie bildet eine Trennschicht und Barriere für Zellen und Botenstoffe ins umgebende Gewebe, hat aber keine metabolische Funktion.

Perizyten sind als Stützzellen der Gefäße zu betrachten und umgeben die Kapillaren in unterschiedlicher Dichte. Übergänge zu glatten Muskelzellen sind möglich (Nehls et al. 1990).

1.5. Die Angiogenese

Die Angiogenese ist die Aussprossung neuer Gefäße aus präexistierenden Kapillaren/Venolen (Folkman 1971). Sie ist grundlegend von der Vaskulogenese zu unterscheiden, welche die Neubildung der Gefäße im Embryo ist. Im Erwachsenen findet keine Vaskulogenese mehr statt, sondern es handelt sich immer um Angiogenese. Sie hat eine große Bedeutung, nicht nur für die Tumorentwicklung, sondern auch bei der Wundheilung (Sandison 1932, Folkman et al. 1995b), der Ovulation (Folkman et al. 1992a) und der diabetischen Retinopathie (Miller 1994) sowie der rheumatischen Arthritis (Folkman 1995a).

Unter physiologischen Bedingungen ist nur jede 10.000ste, also 0,01 % der Endothelzellen, im Zellteilungszyklus (Hobson et Denekamp 1984, Hanahan et Folkman 1996). Die Gefäße haben einen ausgeprägten Schutz vor Neubildung, der

durch vielfältige Mechanismen scharf kontrolliert wird und nur unter besonderen Bedingungen durchbrochen wird.

Um den Organismus vor ungehemmter Angiogenese zu schützen, gibt es drei grundlegende Mechanismen, die Endothelzelle in ihrer ruhenden Position zu halten.

Die extrazelluläre Matrix spielt durch Abfangen angiogenetischer Wachstumsfaktoren eine Rolle und stabilisiert damit die Gefäße in Ihrer Umgebung (Vlodansky et al. 1990). Die Perizyten bilden einen stabilisierenden Wall um die Gefäße und halten die Endothelzellen durch Zell-Zell Kontakte in einem nicht-proliferativen Stadium (Folkman et Shing 1992b). Auf molekularer Ebene wirkt Angiostatin am stärksten gefäßwachstumshemmend (O'Reilly et al. 1994), daneben wirken jedoch auch Thrombospondin (Dameron et al. 1994) und das Tumorsuppresorgen p53 (Kang et al. 1997, Takahashi et al. 1998b) als antiangiogenetische Faktoren.

Die obengenannten Barrieren können unter besonderen Bedingungen durchbrochen werden. Während der Wundheilung kommt es bspw. zu einer Erhöhung der Zellteilungsrate der Endothelzellen, die jene der Knochenmarkszellen erreichen kann (Folkman 1995b).

Die Angiogenese beginnt mit einer Vasodilatation, durch welche die Endothelzellen empfindlicher für Wachstumsfaktoren werden (Folkman et Shing 1992b, Folkman et al. 1995b). 1932 entdeckte Sandison, daß die Zellform mit dem Aktivitätszustand der Zellen zusammenhängt (Sandison 1932). Auf dieser Idee aufbauend fand 1990 Ingberg heraus, daß durch Dehnung von Endothelzellen die DNA-Synthese deutlich erhöht werden konnte. Bei Zugabe von basischem Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF) wuchsen die Endothelzellen in ein wesentlich größeres Gewebeareal ein (Ingberg 1990). Hypoxie ist ein weiterer aktivierender Parameter für die Angiogenese. Bei diesem Weg der Aktivierung spielt vor allem VEGF als Mediator eine wichtige Rolle (Keshet in Ischemia driven Angiogenese).

Die aufeinanderfolgenden Schritte der Angiogenese werden von verschiedenen Wachstumsfaktoren gesteuert. Die VEGF-Proteinfamilie kann jedoch alle Schritte der Angiogenese induzieren (Dvorak et al. 1995, Ergün 1998, Millauer et al. 1993).

Wenn der angiogenetische Anstoß gegeben wird, löst sich die Integrität der Basallamina auf. Der Kontaktverlust zur Umgebung wirkt auf die Endothelzellen als Proliferationsreiz. Verstärkt wird dieser Einfluß durch Gefäßwachstumsfaktoren, z.B. bFGF und VEGF. Ebenfalls über diesen Weg wird die Migration der Endothelzellen

angeregt (siehe Abb.: 1 S.18). Wenn die entsprechenden angiogenetischen Faktoren auf die Zellen einwirken, sprossen die Zellen aus und bilden eine Röhre. Die Fähigkeit dazu ist genetisch determiniert (Folkman et Shing 1992b). Die Spitzen zweier Rohre verbinden sich zu einer Gefäßschleife. Die Schleife ist für die Durchblutung und die Bildung eines neuen Gefäßnetzes von Bedeutung (siehe Abb.: 2 S.19). Wenn die Gefäßschleife entstanden ist, bildet sich die Basalmembran um das Endothel, und Perizyten wandern ein (Hanahan et Folkman 1996, Folkman 1986). Teile der VEGF-Proteinfamilie sind an diesem Reifungsprozeß maßgeblich beteiligt.

Abbildung 1

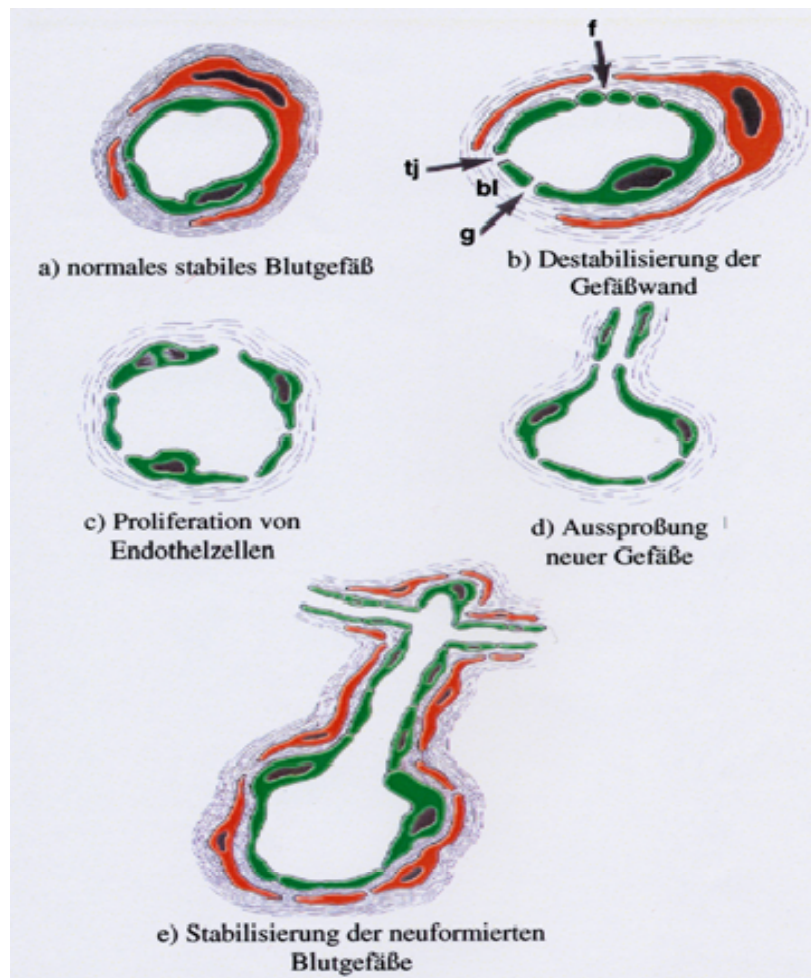
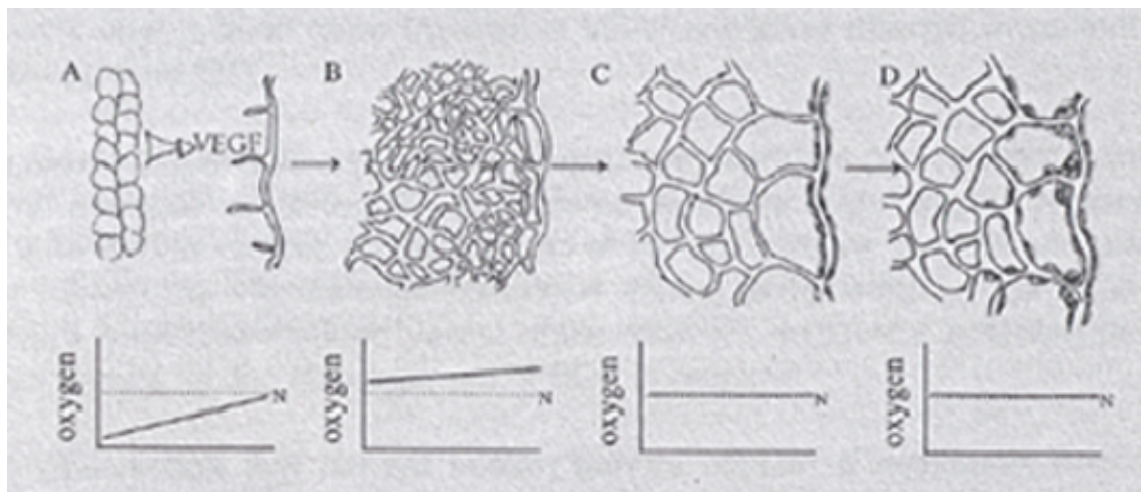


Abb. 1: Normales Blutgefäß mit Endothel und einer dichten, das Endothel und die Perizyten einschließenden Basallamina. Dieses zeigt einen stabilen Wandaufbau (a). Wandaufbau mit der Destabilisierung der Gefäßwand in Form von Fenestrierung (f), Öffnung der Tight junctions (tj) und Induzierung von transendothelialen Gaps (g) sowie Lockerung der Basallamina (bl) mit der Folge von Kontaktverlust zwischen dem Endothel und seiner Umgebung. Hiermit wird die Angiogenese eingeleitet (b). In diesen Prozeß ist die Interaktion von VEGF mit seinem Rezeptor KDR maßgeblich beteiligt. Es ist zu vermuten, daß Endothelzellen, die nun keinen Zellverband mehr darstellen, sich wie Einzelzellen verhalten. Durch die zusätzliche Stimulation von angiogenetischen Faktoren (z.B. VEGF) werden sie zur Mitose, also zur Endothelzellproliferation angeregt (c). Die neu entstandenen Endothelzellen werden ebenfalls unter Wirkung von angiogenetischen Faktoren zur Migration angeregt, so daß die ersten Schritte zu Formierung neuer Lumina erfolgen. Hierin ist wahrscheinlich die Interaktion von VEGF mit seinem Rezeptor Flt-1 involviert (d). Als letzter Schritt setzt die Stabilisierung der neuformierten Blutgefäße ein, an der offensichtlich Angiogeneseinhibitoren, hier Endostatin, maßgeblich beteiligt sind (e) (Ergün 1998).

Habilitation von Prof. Dr. S. Ergün am Institut für Anatomie Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf

Abbildung 2



„Ischemia driven Angiogenesis“, Keshet 2000

Abb. 2: Durch Hypoxie initiierte Angiogenese

A: durch Hypoxie angestoßene Neoangiogenese

B: neugebildeter Gefäßplexus

C: durch Hyperoxie bedingte Reduktion der Gefäßplexus

D: Gefäßreifung

Das Schaubild zeigt die positive und negative Rückkopplung in der Feinabstimmung der Gefäßneubildung durch die Sauerstoffmenge im Gewebe. Ebenfalls werden die Reifungsprozesse durch die Perizyten gezeigt, welche bei gleichbleibendem Sauerstoffniveau beginnen (Keshet 2000).

1.6. Die Tumorangiogenese

Für Tumoren ist es von besonderer Bedeutung, die Endothelzellen aus ihrer ruhenden Position zur Proliferation anstoßen zu können, da ihre Progression ab einer Größe von zwei bis vier Millimeter abhängig ist von der Einsprossung neuer Gefäße. Die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen ist sonst nicht mehr gewährleistet (Folkman 1971, Hanahan et Folkman 1996). Um den Transport von Nährstoffen zu optimieren, sind die Tumorgefäße besonders permeabel (Dvorak et al 1979, Senger et al. 1986). In β -Zelltumoren des Pankreas bei Ratten konnte zum Beispiel Folkman 1989 nachweisen, daß die gleichmäßige Gefäßwandstruktur aufgehoben war. Die Basalmembran war unterbrochen und der Durchmesser des Lumens variierte stark. Die Bildung dieser abnormen Gefäße konnte mit dem Übergang von Hyperplasie zu Neoplasie in Verbindung gebracht werden (Folkman et al. 1989). Die Stabilisierung ist bei Tumorgefäßen nicht von ausschlaggebender Bedeutung. So konnten sich in Tumorgewebe nur vereinzelt Perizyten nachweisen lassen (Ergün 1998). Die Hypothese ist, daß, je schneller der Tumor wächst, desto unreifer und damit permeabler bleiben die Gefäße. Von innen nach außen verringert sich die Schutzfunktion. Die Endothelzellen sind kurz nach dem neugebildeten Lumen noch nicht so fest miteinander verbunden. Die Basalmembran weist noch keine geschlossene Schicht auf und die Perizyten sind noch nicht in ausreichender Zahl vorhanden, um Ihre Schutzfunktion in vollem Umfang wahrnehmen zu können. Die Hypothese ist, daß einer Tumorzellabsiedlung durch neugebildete Tumorgefäße Vorschub geleistet werden könnte.

Tumore haben zum ersten Mal auf nicht vaskularisierter Kornea von Kaninchen gezeigt, daß sie in der Lage dazu sind, Gefäße aussprossen zu lassen (Folkman 1986). Als angiogenetisches Mitogen wurde der basische Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF) nachgewiesen (Shing et al. 1984). Kurz darauf wurde der saure Fibroblasten Wachstumsfaktor (aFGF) entdeckt. Beide gehören zu einer Familie von Heparin bindenden Faktoren ebenso wie VEGF, welches zunächst durch seine permeabilitätssteigernde Funktion auf sich aufmerksam machte. Alle drei Faktoren kommen in normalem sowie in Tumorgewebe vor und haben eine starke angiogenetische Potenz. Die VEGF-Proteinfamilie ist jedoch die einzige, welche eine vollständige Gefäßneubildung induzieren kann. Dieses ist für den Progress maligner Tumore von besonderer Bedeutung.

Für die Steuerung der Neoangiogenese ist neben der Steigerung der proangiogenetischen Faktoren die Unterdrückung der inhibitorischen Seite wichtig.

α -Interferon war die erste Substanz, bei der festgestellt wurde, daß sie die Zellmigration hemmt und so hemmenden Einfluß auf die Angiogenese hat (Brouty-Boye et Zetter 1980). Unter einer Vielzahl von inhibitorischen Proteinen ist Angiostatin eines der am stärksten wirksamen Proteine (O'Reilly et al. 1994).

Die biologische Relevanz der Neoangiogenese bei malignen Tumoren wird durch die signifikante Korrelation der Gefäßdichte mit klinisch pathologischen Parametern wie dem Tumorstadium und der Prognose verdeutlicht (Weidner et al. 1991, Horak et al. 1992, Macchiarini et al. 1992, Takahashi et al. 1997).

Für viele Karzinome konnte bereits ein Zusammenhang von der Gefäßdichte mit dem Fortschreiten der Erkrankung dargelegt werden. Sie korreliert mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium bspw. in Lungenzellkarzinomen (Macchiarini et al. 1992). Ebenso konnte bei Mamma-Karzinomen die Gefäßdichte als unabhängiges Kriterium bezüglich des Lymphknotenstatus sowie der Mikrometastasierung ins Knochenmark beschrieben werden (Horak et al. 1992). Bei Ösophaguskarzinomen korrelierte eine vermehrte Infiltrationstiefe mit einer erhöhten Gefäßzahl (Tanigawa et al. 1997).

1.7. Die Struktur und Funktion der VEGF-Familie

VEGF ist eine Familie von endothelspezifischen Wachstumsfaktoren und hat eine Schlüsselposition in angiogenetischen Prozessen (Ferarra et Davis-Smith 1997). 1979 wurde von Dvorak eine Hyperpermeabilität von Tumorgefäßen für Albumin nachgewiesen, nachdem Fibrin außerhalb des Gefäßlumens, also im Tumorgewebe, gefunden worden war (Dvorak et al. 1979). Aus Zellen eines hepatozellulären Karzinoms konnte Senger 1983 den Gefäß-Permeabilitäts-Faktor VPF (vascular permeability factor) isolieren, welchen man für die Hyperpermeabilität verantwortlich machte (Senger et al. 1983).

1989 wurde von Leung erstmals VEGF (vascular endothelial growth factor) als endothelspezifischer Wachstumsfaktor beschrieben und aus bovinen pituitär

follikulären Zellen isoliert. Durch die parallele Veröffentlichung der Aminosäuresequenz von VPF (Keck et al. 1989) und VEGF (Leung et al. 1989) stellte sich heraus, daß beide von demselben Gen kodiert werden. Im Folgenden werde ich nur noch von VEGF schreiben. In der weiteren Forschung fand sich eine ganze VEGF-Proteinfamilie. Sie umfaßt bis heute eine Anzahl von fünf Proteinen, die mit den Buchstaben A-E versehen wurden.

VEGF-A ist ein ca. 46 kDa großes homodimeres Glykoprotein, welches sich durch alternatives Splicing in sechs Isoformen mit unterschiedlicher Wirkung und Funktion aufteilt. Die kurzen Splicingvarianten VEGF_{121, 145, 165} sind löslich, werden von den Zellen sezerniert und binden Heparinsulfate weniger fest, während die längeren Formen VEGF_{183,189,206} fester an die extrazelluläre Matrix gebunden sind und nicht als freie Mitogene wirken können (Ferrara 1999).

VEGF-B hat ein Molekulargewicht von 23 und 34 kDa. Es kann mit VEGF-A ein Heterodimer bilden und wird in Herz- und Skelettmuskulatur, Pankreas- und Prostatagewebe exprimiert. Beide kommen häufig gemeinsam vor und sind endothelzellspezifisch (Salven 1998).

VEGF-C bildet aus seinen Polypeptiden von 29 und 31 kDa ein Homodimer, welches die Endothelzellmigration der Lymphgefäße veranlaßt. Über den VEGF-Rezeptor 3 (FLT-4) wirkt es lymphgefäßspezifisch (Salven et al. 1998, Jeltsch et al. 1997).

Die Funktion des VEGF-D wird ähnlich der von VEGF-C auf die Lymphangiogenese gesehen, von dieser aber als unabhängig bewertet (Onogawa et al. 2004).

VEGF-E hat seine angiogenetische Wirkung über den VEGF-Rezeptor 2. Die Forschungen zeigen eine hohe Potenz und lassen auf einen guten klinischen Einsatz hoffen (Shibuya 2003).

VEGF-A und B wirken über die Rezeptoren VEGFR-1 (Flt-1, fms like tyrosinkinase) und VEGFR-2 (Flk-1, fetal liver kinase, KDR) spezifisch auf Endothelzellen (Millauer et al. 1993). Es handelt sich um Rezeptoren mit einer sieben Immunglobulin Domäne extrazellulär und einer tyrosinkinase Domäne intrazellulär zur Signaltransduktion (DeVries et al. 1992, Kanno et al. 2000).

In den meisten Tumoren konnte in Studien mit In-situ-Hybridisierung eine Hochregulierung von VEGF mRNA gezeigt werden. Dazu gehören beispielsweise Brust-, Blasen-, Nieren- und Ovarial-Karzinome sowie Tumore des Gastro-

intestinaltrakts (Ferrara et Keyt 1997). In allen Fällen war die mRNA von VEGF nur in Tumorzellen, nicht jedoch in Endothelzellen nachweisbar. Das VEGF-Protein dagegen ist als Ligand gebunden auf Endothelzellen detektierbar (Plate et al. 1992). Dieses läßt den Schluß nach einer parakrinen Wirkung von VEGF zu (Ferrara et al. 1992).

Bei vielen Tumoren kann eine erhöhte Expression von VEGF detektiert werden. Beispiele dafür sind die oralen Plattenepithelzell-Karzinome (Maeda et al. 1998, Eisma et al. 1997), das Ösophaguskarzinom (Uchida et al. 1998, Inoue et al. 1997), das Magen- (Takahashi et al. 1996, Saito et al. 1999) und Colon- bzw. Colorektale-Karzinom

(Takahashi et al. 1997, Landriscina et al. 1998). Im Weiteren ist das Glioblastom (Kim et al. 1993, Moriyama et al. 1998), das Mammakarzinom (Anan et al. 1998), Lindholm et al. 1998), das hepatozelluläre Karzinom (Yamaguchi et al. 1998), das Prostata- (Ferrer et al. 1998) und Lungenkarzinom (Ohta et al. 2000) zu erwähnen, die in der Literatur als VEGF positiv beschrieben werden. Die Expression von VEGF hat jeweils eine prognostische Relevanz.

1.8. Die Metastasierung und Einzelzelldissemination

Die Idee der Einzelzelldissemination wurde 1889 von Paget aufgebracht (Paget 1889). Die Theorie war, daß sich einzelne Zellen aus dem Tumorverband lösen und an anderer Stelle einnisten. Es sind verschiedene Verfahren entwickelt worden, in Lymphknoten oder im Knochenmark einzelne Tumorzellen nachzuweisen (Pantel et al. 1993a, Torban et al. 1996, Izbicki et al. 1997).

Trotz operativer Therapie maligner Tumore in kurativer Intention muß davon ausgegangen werden, daß es in vielen Fällen bereits zum OP-Zeitpunkt zu einer Tumorzelldissemination gekommen ist, die mit den konventionellen Staging Verfahren jedoch nicht nachweisbar ist. Die Entwicklung immunhistochemischer Detektionsverfahren mit monoklonalen Antikörpern hat in jüngster Zeit den Nachweis isolierter Tumorzellen in mesenchymalen Geweben ermöglicht (Pantel et al. 1993b, Fidler et Ellis 1994, Izbicki et al. 1997).

In der hier vorliegenden Studie wurde der monoklonale Antikörper Ber-EP4 verwendet, um die Einzelzelldissemination in Lymphknoten zu erfassen (Gaffey et al. 1992, Izbicki et al. 1997). Für die Detektion von Einzelzellen im Knochenmark wurde der panzytokeratin Antikörper A45 von Micromet München verwendet (Thorban et al. 1996). In einer früheren Studie dieses Instituts korrelierte die Einzelzelldissemination signifikant mit einer verringerten Überlebensrate und einem verkürzten rezidivfreien Intervall (Izbicki et al. 1997).

Bei Patienten mit Mammakarzinomen wurde von der Ludwig-Breast-Cancer-Study-Group gezeigt, daß sich die Prognose bei Patientinnen mit einem pN₀ eingestuften Tumor deutlich verschlechterte und das rezidivfreie Intervall wesentlich verkürzt war, wenn immunhistochemisch einzelne Tumorzellen in Lymphknoten gefunden werden konnten (Ludwig-Breast-Cancer-Study-Group 1990). Bei Patienten mit Ösophaguskarzinomen und Bronchialkarzinomen konnte die prognostische Bedeutung von Mikrometastasen in regionalen Lymphknoten von Izbicki 1997 nachgewiesen werden (Pantel et al. 1993a, Izbicki et al. 1997). Eine Verschlechterung der Prognose konnte bei einer zusätzlich hohen VEGF-Expression festgestellt werden (Ohta et al. 2000).

In das Knochenmark disseminierte Tumorzellen wurden unter anderem von Thorban 1996 detektiert und konnten wie die disseminierten Einzelzellen in Lymphknoten, mit einem früheren Rezidiv und einer verkürzten Überlebenszeit korreliert werden (Thorban et al. 1996).

Bezüglich der Einzelzelldissemination maligner Tumore wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen postuliert, daß zwischen der Neoangiogenese maligner Tumore und der Tumorzelldissemination ein Zusammenhang besteht. Inhibierende VEGF-Antikörper konnten an einem Maus-Modell zeigen, daß die Tumorzelldissemination verringert war. Nacktmäusen wurden Zellen eines Epidermoidzellkarzinoms subkutan gespritzt und die Einzelzelldissemination in den inneren Organen immunhistochemisch nach sechs Wochen beurteilt. Mäuse, die mit Anti-VEGF-Antikörpern behandelt wurden, hatten deutlich kleinere Tumoren und signifikant weniger Metastasen (Melnik et al. 1996).

Im Umkehrschluß haben wir die Hypothese aufgestellt, daß mit einer vermehrten VEGF-Expression im Tumor nicht nur die Angiogenese angeregt, sondern auch die Permeabilität der Gefäße erhöht sein könnte und damit die Dissemination der Tumorzellen in das Gefäßsystem erleichtert sein könnte. Um dieses experimentell nachweisen zu können, haben wir in unserem Institut ein immunhistochemisches

Verfahren etabliert, um die VEGF Expression auf Ösophagus Primärtumoren darzustellen. Diese Ergebnisse wurden dann mit dem immunhistochemischen Nachweis von Einzelzellen in Lymphknoten und Knochenmark korreliert. Des Weiteren haben wir durch immunhistochemische Gefäßmarkierung den Zusammenhang der Gefäßdichte mit der VEGF-Expression und der Einzelzell-dissemination analysiert. Eine Arbeit von Ohta aus dem Jahre 2000 bestätigte unser Interesse, denn er konnte den Zusammenhang der VEGF-Expression mit nodaler Mikrometastasierung am Bronchialkarzinom nachweisen (Ohta et al. 2000).

1.9. Ziel der Arbeit

Die Prognose des Ösophaguskarzinoms ist trotz verbesserter Operationstechniken und intensiver peri-operativer Betreuung der Patienten weiterhin schlecht. Auch durch adjuvante und neoadjuvante Therapien konnte die Fünf-Jahres-Überlebens-Rate in den vergangenen Jahrzehnten nicht entscheidend verbessert werden. In diesem Zusammenhang hat uns die okkulte Einzelzelldissemination von Tumorzellen in Lymphknoten und Knochenmark interessiert. Bereits zum Zeitpunkt der Operation finden sich bei einer Gruppe von Patienten einzelne Tumorzellen, die nicht mit den konventionellen histopathologischen Methoden detektiert werden können. Um der Genese dieser Frühdissemination nachzugehen, haben wir neben der Detektion der Tumoreinzelzellen in Lymphknoten und im Knochenmark, das angiogenetisch hochpotente Protein VEGF untersucht. Die Protein-Familie, als deren erstes Protein VEGF-A entdeckt wurde, initiiert die Angiogenese und ist für den Abschluß der Gefäßbildung verantwortlich. Die neu gebildeten Gefäße sind noch unreif und die Permeabilität ist erhöht. Dieses könnte einer Tumoreinzelzelldissemination Vorschub leisten. Es soll in dieser Arbeit der Frage nachgegangen werden, welcher Zusammenhang zwischen der VEGF-Expression und der Gefäßneubildung besteht sowie die Auswirkung auf den Tumorprogress beurteilt werden. Ebenfalls wird die Frage erörtert, ob der Gefäßneubildung ein direkter Einfluß auf die Einzelzelldissemination nachzuweisen ist.

2. Material und Methoden

2.1. Charakterisierung der Patienten und der Ösophaguskarzinome

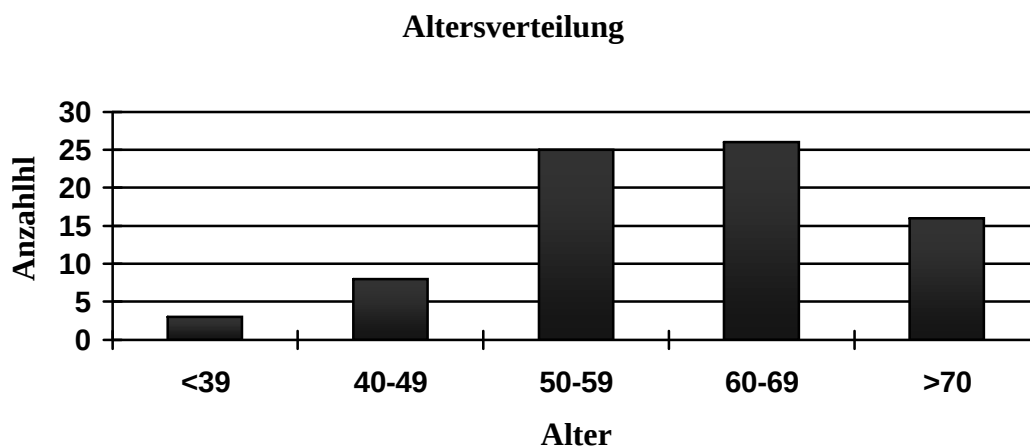
Im Zeitraum von 1992 bis 1999 wurden 183 Patienten mit Ösophaguskarzinom im Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf operiert. Wie von der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt, wurden bei allen Patienten, die nach ausführlicher Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis gegeben hatten, systematisch intraoperativ Gewebeproben asserviert. Von diesen war bei 78 Patienten ausreichendes Gewebe vorhanden, um in die Studie eingeschlossen zu werden. Die Primärtumoren wurden bezüglich ihrer VEGF-Expression und der Gefäßdichte in „Hot-Spot“-Regionen immunhistochemisch untersucht.

Im Rahmen der Lymphadenektomie wurden insgesamt 1428 Lymphknoten zur konventionellen histopathologischen Untersuchung entnommen und eingeschickt. Dieses entspricht im Mittel ca. 18 Lymphknoten pro Patient. 437 Lymphknoten wurden histopathologisch tumorfrei eingestuft. Diese wurden in unserem Labor unter Verwendung eines verfeinerten immunhistochemischen Verfahrens mit dem monoklonalen Antikörper BerEP-4 auf das Vorhandensein disseminierter epithelialer Tumorzellen analysiert. Von 62 Patienten wurde ein Knochenmarkaspirat entnommen, welches immunhistochemisch mit dem Panzytokeratin Antikörper A45 (Micromet, München) auf Tumoreinzellen untersucht wurde.

Über die Operationsmethode zur Resektion des Ösophaguskarzinoms wurde individuell entschieden. Insgesamt erhielten 28 Patienten (36,8%) eine En-bloc-Resektion nach Skinner und 50 (63,2 %) wurden transhiatal nach Orringer reseziert (Skinner 1983, Orringer 1984).

An der Studie nahmen 78 Patienten teil. Davon waren 22 (28,2 %) Frauen und 56 (71,8 %) Männer. Das entspricht einem Verhältnis Frauen zu Männer von 1 : 2,5 .

Zum Zeitpunkt der Operation lag das Alter der Patienten zwischen 34 und 77 Jahren. das mittlere Alter betrug 60,6 Jahre (Grafik 1 Seite 27).



Grafik 1: Altersverteilung

Patientencharakteristika (n = 78)		
Geschlecht	Patientenzahl gesamt (n = 78)	Prozent (%)
Männlich	50	71,8 %
Weiblich	22	28,2 %
Zelltyp		
Plattenepithelkarzinom	50	64,1 %
Adenokarzinom	28	35,9 %
Differenzierungsgrad		
G I	0	0,0 %
G II	47	60,3 %
G III	31	39,7 %
Tumorlokalisation		
oberes Drittel	10	12,8 %
mittleres Drittel	27	34,6 %
unteres Drittel	41	52,6 %

Tabelle 1: Patientencharakteristika

Einen plattenepithelialen Ursprung wiesen 50 (64,1 %) der Karzinome auf, während es sich bei 28 (35,9 %) um Adenokarzinome handelte. Im oberen Drittel der Speiseröhre waren 12,8 % (10/78) lokalisiert, 34,6 % (27/78) saßen im mittleren Drittel während 52,6 % (41/78) im unteren Drittel des Ösophagus lokalisiert waren.

Die Patienten wurden postoperativ gemäß der 5. Auflage der TNM-Klassifikation und der „Union International Contre Cancer (UICC)“ eingestuft. 12 Patienten (15,4 %) hatten ein T₁ gestagten Tumor, bei 18 (23,1 %) Patienten wurde der Tumor T₂ eingestuft; während 47 (60,3 %) Tumore als T₃ beschrieben wurden. 1 Patient (1,3 %) hatte ein T₄ eingestuftes Ösophaguskarzinom. 49 (62,8 %) der Karzinome hatten histopathologisch eine regionale Lymphknoten-Metastasierung, 29 (37,2 %) der Tumore wurden als N₀ eingestuft.

TNM-Stadien

TNM-Stadium	Patienten gesamt 78 (100 %)
pT₁	12 (15,4 %)
pT₂	18 (23,1 %)
pT₃	47 (60,3 %)
pT₄	1 (1,3 %)
N₀	29 (37,2 %)
N₁	49 (62,8 %)

Tabelle 2: TNM-Stadien

UICC-Stadien		
Tumorstadium	Patientenzahl	Prozent
Stadium I	9	11,5 %
Stadium IIa	20	25,6 %
Stadium IIb	15	19,2 %
Stadium III	34	43,7 %
	78	100,0 %

Tabelle 3: UICC-Stadien

Einen mäßiggradig differenzierten Tumor (G2) hatten 47 Patienten (60,3 %), während sich bei 31 Patienten (39,7 %) ein gering differenzierter Tumor (G₃) zeigte.

Peri-operativ, d.h. innerhalb der ersten 30 Tage postoperativ, verstarben auf der Intensivstation 7 Patienten (9 %).

Die Nachuntersuchung der operierten Patienten erfolgte regelmäßig alle drei Monate in den ersten zwei Jahren, wobei sie im ersten Jahr vom Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf und im weiteren Verlauf von den behandelnden Hausärzten durchgeführt wurde. Nach dem dritten Jahr verlängerte sich das Intervall auf sechs Monate. Die Befunde wurden in regelmäßigen Abständen schriftlich von unserem Labor bei den Hausärzten erfragt, soweit die Untersuchung nicht im Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf durchgeführt wurde. Die Nachuntersuchung beinhaltete eine körperliche Untersuchung, eine Röntgenuntersuchung des Thorax, eine Ösophagogastroskopie mit Endosonographie, eine abdominelle Ultraschalluntersuchung, eine Computertomographie des Thorax und Abdomen sowie eine Knochenszintigraphie. Zudem wurden die Serumspiegel der Tumormarker CEA, SCC, CA-19-9 bei den Patienten, bei denen diese präoperativ erhöht waren, bei jeder Nachuntersuchung kontrolliert.

Die mittlere Beobachtungszeit betrug 17,4 Monate (1 bis 101). Tumorbedingt starben 25 Patienten (34,7 %), während 13 Patienten (16,7 %) nicht-tumor-bedingt im Beobachtungszeitraum verstarben. Bei 30 Patienten (38,4 %) wurde ein Rezidiv nachgewiesen, wovon 21 Patienten ein Lokalrezidiv hatten, während 22 Patienten (28,20 %) eine Fernmetastase im Laufe der Beobachtungszeit entwickelten. Das

Auftreten von einem Lokalrezidiv mit Fernmetastasen wurde in 12,8 % (10/78) der Fälle festgestellt.

2.2. Gewebeprobengewinnung und Asservierung

Intraoperativ wurden repräsentative Proben des Primärtumors entnommen, in Tissue Tek (Miles Inc. Code 4583) gebettet und vor Ort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die anschließende Lagerung bis zum Schneiden der Präparate im Kryotom erfolgte bei -80°C . Geschnittene Präparate wurden kurzzeitig bei -20°C bis zur immunhistochemischen Untersuchung verwahrt.

Mindestens ein Lymphknoten wurde aus jeder der sechs definierten Lymphknotenstationen vom Operateur entnommen und geteilt. Die Lymphknoten wurden nach dem von Casson modifizierten Schema der „American Thoracic Society“ den anatomischen Regionen zugeordnet (Casson et al.1994). Die eine Hälfte des Lymphknotens wurde in flüssigem Stickstoff für die immunhistochemische Analyse schockgefroren, während die andere Hälfte auf Formalin der konventionellen histopathologischen Untersuchung zugeführt wurde.

Folgende Lymphknotenstationen wurden definiert :

- mediastinal: Tumor nah, cranial und distal des Tumors,
- abdominell: perigastral, an der Arteria hepatica communis sowie am Truncus coeliacus.

Für die immunhistochemische Verarbeitung wurden die Gewebeblöcke in einem Kryotom ca. 5-7 mm dick geschnitten und auf Haftobjektträger (Histobond Marienfeld Cat. No. 901236) aufgetragen. Von den Lymphknoten wurden 6 Serienschnitte in der Dicke 6-8 μm in je drei Ebenen angefertigt und auf die Haftobjektträger aufgebracht.

Zur Beurteilung des Knochenmarks wurde intraoperativ ein Knochenmarkaspirat (10mL) aus dem Beckenkamm (Spina iliaca anterior superior) entnommen.

Das Knochenmark wurde mit 1mL Heparin versetzt und unmittelbar im chirurgischen Forschungslabor weiter bearbeitet.

Zunächst folgte eine Entfettung mit Hanks Solution (1:1). Nach 10 Minuten zentrifugieren bei 850n wurde der Überstand sorgfältig abpipettiert und verworfen.

Das Zellpellet wurde mit 20mL PBS Puffer aufgeschwemmt und mit 20mL Ficoll überschichtet. Nach 35 Minuten zentrifugieren bei 1500n wurde die mittlere Phase abpipettiert und in ein sauberes 50mL Röhrchen überführt.

Die obere Phase ist fettig, die mittlere und gewünschte Phase enthält die Leukozyten, während die untere Phase vor allem aus Erythrozyten und größeren korpuskulären Anteilen besteht.

Das Zellpellet der mittleren Phase wurde dreimalig mit 20mL PBS Puffer gewaschen (Zentrifugation jeweils 10 Minuten bei 680n).

Der letzte Überstand wurde dekantiert und 10 L Zellsuspension wurden mit 10 L Trypanblau gemischt. In der Neubauer-Zählkammer wurde die Anzahl der Leukozyten bestimmt.

Die Zellsuspension wurde auf 100.000 Zellen/100 L verdünnt. Pro Zytospine-Objektträger wurden 500.000 Zellen zentrifugiert (2x250.000). Der Objektträger wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend bei -20°C bis zur immunhistochemischen Färbung gelagert.

2.3. Immunhistochemische Färbemethoden

Für die Färbung des VEGF-Antigens wurde die Avidin-Biotinkomplex-Methode gewählt, da sie ein sehr sensitives und gewebeschonendes Verfahren ist. Es besteht kaum eine Gefahr der Denaturierung durch Enzymreaktion, da es nicht zu einer kovalenten Bindung kommt, sondern sich ein Komplex zwischen Avidin bzw. Streptavidin und Biotin ausbildet. Auf Grund der hohen Affinität von Avidin zu Biotin eignete sich dieses Verfahren besonders gut für den Nachweis von gering exprimierten Antigenen.

Demgegenüber war die bessere Detektierbarkeit der Gefäße ausschlaggebend für die Entscheidung, die APAAP-Methode für CD31 als Gefäßmarker zu nutzen. Die leuchtend rote Farbe des verwendeten Neufuchsin konnte auch in niedrigeren

Intensitäten noch eindeutig erkannt werden. Es ist ebenfalls ein schonendes Färbeverfahren, da es auf die chemische Konjugation verzichtet und allein auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruht.

2.3.1. ABC-Färbung für VEGF-A

Für die immunhistochemische Darstellung wurde ein aufeinander abgestimmtes Komplettoprotokoll von Dako (Dako detection kit; Code Nr. K5001) verwendet.

Die Präparate wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend für 10 Sekunden in Aceton fixiert.

Ein dreimaliges Waschen erfolgte mit PBS-Puffer bei pH 7,4.

Zur Reduzierung von unspezifischen Peroxidasen des Gewebes wurden die Schnitte in 4°C kaltem, 1,2 %igem H₂O₂ (Merk)/Methanol (Merk)-Gemisch 5 Minuten oxidiert. Das folgende Waschen wurde mit einmaligem Spülen in destilliertem Wasser begonnen. Die weiteren Spülungen wurden mit dem PBS-Puffer durchgeführt, um das Ausgangsmilieu von pH 7,4 wieder zu erreichen.

Die Antikörper-Inkubationen erfolgten immer in einer feuchten Kammer.

Mit Avidin und Biotin (blocking kit; Dako) wurde jeweils für 20 Minuten inkubiert, um eine Absättigung der endogenen Biotine zu erreichen. Zwischen diesen beiden Schritten wurde nur einmalig gewaschen.

Zur Senkung der Hintergrundfärbung wurden die Proben 30 Minuten mit 1:10 verdünntem AB-Serum (Biotest, Cat. No. 805135, Germany) behandelt. Nach diesem Schritt wurde nicht gewaschen, sondern nach dem Abklopfen des Objektträgers direkt der VEGF Primärantikörper (Santa Cruz Biothechnology cat#sc 507, polyklonal) mit einer Verdünnung 1:125 (1,6 µg/mL) in PBS aufgetragen und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Es folgte die Anwendung des Dako Detection Kit's, welches aus einem biotinylierten Sekundärantikörper gegen Maus und Kaninchen, Streptavidin sowie einem DAB Substrat und der entsprechenden Verdünnungsflüssigkeit besteht. Der Sekundärantikörper sowie das Streptavidin hatten eine Einwirkzeit von 30 Minuten mit jeweils dreimaligem Waschen in PBS zwischen den Arbeitsschritten.

Die Reaktionszeit für das DAB betrug 5 Minuten. An diese Prozedur schloß sich die Kerngegenfärbung mit Meyer's Hämalaun und das Eindeckeln mit Deckgläsern an.

2.3.2. APAAP-Färbung für CD31

Die Objektträger wurden 30 Minuten luftgetrocknet und 10 Sekunden in Aceton fixiert. Ein dreimaliger Waschvorgang erfolgte mit Tris-Puffer bei einem pH von 7,4.

Zur Reduktion des Hintergrundes wurden die Präparate mit verdünntem AB-Serum (Biotest, 1:10 in Tris-Puffer) für 30 Minuten unspezifisch geblockt.

Nach Abklopfen des AB-Serums von den Objektträgern wurde der Primärantikörper CD31 (DAKO Code M 0823, clone JC70A) in einer Verdünnung 1:1500 (0,27µg/mL) in Tris-Puffer für 75 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit Tris-Puffer (pH 7,4) wurde mit dem Kaninchen-Anti-Maus Brückenantikörper (Dako Code Z 259) in einer Verdünnung 1:50 (64µg/mL) für 30 Minuten inkubiert. Es folgte ein einmaliger Waschgang.

Anschließend wurde das APAAP-Substrat (Dako Code D 651 Clone AP7/6/7) in einer Verdünnung 1:100 (1µg/mL) für 30 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Farbentwicklung mit Levamisol (Sigma-Aldrich Chemie L-9756) Neufuchsin-Substrat (Sigma N 0638, 5g in 100mL 2N HCl) bei Raumtemperatur für 30 Minuten im Dunkeln.

2.3.3. APAAP-Färbung für Ber-Ep4

Es wurde das gleiche Protokoll wie für CD31 verwendet. Die Inkubationszeit für den Primärantikörper betrug jedoch nur 45 Minuten. Der Ber-Ep4 Antikörper (DAKO Code M 804) wurde mit einer Verdünnung von 1:400 (0,625µg/mL) eingesetzt.

Als Positivkontrolle zum Ausschluß falsch negativer Ergebnisse diente Kolonmukosa, welche Ber-Ep4 positiv ist. Bei jedem Färbedurchgang wurde deshalb ein Kolonmukosa Präparat mitgeführt. Alle Primärtumoren wurden auf Ber-EP4 Positivität kontrolliert (Latz et al. 1990).

2.3.4. APAAP-Färbung für A45-B/B4

Der verwendete panzytokeratin Antikörper A45-B/B3 von Micromet München, Deutschland, ist ein IgG1 Immunglobulin. Es wurde in einer Konzentration von (5µg/mL) verwendet. Die Primärantikörper-Inkubationszeit betrug 45 Minuten bei Raumtemperatur (Thorban et al. 1996).

Bei allen Färbemethoden, die für diese Arbeit durchgeführt wurden, verwendeten wir als Kern-Gegenfärbung Meyer's Hämalun für 5-10 Minuten. Es wurde dreimalig mit destilliertem Wasser gewaschen, ehe die Bläuung durch Einwirkung von fließendem Leitungswasser nach ca. 10 Minuten erreicht wurde.

Alle Präparate wurden mit Kaisers Glyceringelatine (Merck) eingedeckelt.

2.4. Herstellung von den Puffern und Levamisol-Substrat

PBS-Puffer

17,8g Na_2HPO_4 (Binatriumhydrigenphosphat) und 16,0g NaCl (Natriumchlorid) werden in 2L Aqua dest. aufgelöst und der pH auf 7,4 mit verdünnter HCl (Salzsäure) bzw. NaOH (Natronlauge) eingestellt.

Tris-Puffer

12,1g Tris und 17,0g NaCl werden in 2L Aqua dest. aufgelöst, anschließend wird der pH-Wert mit verdünnter HCl auf 7,4 eingestellt.

Levamisol/Neufuchsin-Substrat

Für die Herstellung des Substrats für eine Küvette werden 150mL Tris-Puffer (1,21g Tris, 1,70g NaCl in 200mL Aqua dest.) mit einem pH 8,24 benötigt. In diesem Puffer werden 0,06g Levamisol gelöst. Parallel dazu werden 0,025g Naphthol-bi-Phosphat (Sigma N 2250) in 0,75mL Dimethylformamid (Sigma D 4254) gelöst. In einem weiteren Gefäß wurden 0,3g Natriumnitrit (Sigma S 2252) in 7,5mL Aqua dest. gelöst. Zu dieser Lösung wurden 300 µL Neufuchsin-Lösung (5g Neufuchsin in 100mL 2N HCl gelöst) gegeben. Alle drei Lösungen werden zusammengegeben und im Dunkeln durch einen Papierfilter filtriert. Anschließend werden die Präparate für 30 Minuten in einer Küvette im Dunkeln inkubiert.

Zur lichtmikroskopischen Auswertung der Präparate und zur Erstellung der histologischen Fotos wurde ein Mikroskop der Firma Olympus (BH₂) verwendet.

2.5. Primärantikörper

2.5.1. VEGF

Für die Darstellung von VEGF wurde der polyklonale Kaninchen-Antikörper VEGF (147) (Santa Cruz Biotechnologie Code SC 507) verwendet. Die Aminosäuren 1-140 des menschlichen Proteins werden erkannt, so daß auch die Splicing-Varianten mit einer Länge von 121, 165 und 189 Aminosäuren erkannt werden. Es handelt sich um einen IgG Antikörper. Die Splicing Varianten 121, 147, 165 und 189 gehören der Familie des VEGF-A an.

Die Verdünnung von 1:125 (1,6 g/mL) wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe an 15 Ösophagus-Primärtumoren in einer Verdünnung von 1:10-1:300 ermittelt. Als interne Positivkontrolle wurde endogene glatte Muskulatur verwendet. Als Negativkontrolle wurde die Färbung ohne Verwendung des Primärantikörpers durchgeführt.

2.5.2. CD31

Zur Darstellung der Gefäße wurde der monoklonale CD31-Antikörper von DAKO Dänemark (Code M 0823 clone JC/70A) verwendet.

CD31 ist mit PECAM-1 sowie dem JC70-Antikörper identisch (Parums et al. 1990, Buckley et al. 1996, Horak et al. 1992). Es gehört zur Superfamilie der Immunglobuline mit Zelladhäsionseigenschaften. Es handelt sich um ein transmembranes Glykoprotein des Isotypen IgG₁ kappa, mit einem Molekulgewicht von 130kDa, welches spezifisch auf Endothelzellen exprimiert wird. CD31 ist ein Adhäsionsmolekül, welches aus drei funktionell wichtigen Untereinheiten besteht. Diese sind aufgeteilt in einen cytoplasmatischen, transmembranösen und extrazellulären Anteil. Nur gemeinsam haben sie eine Signalwirkung (Sun et al. 2000). Sowohl in normalen als auch tumorassoziierten Gefäßen ist es mit Beginn der

Neoangiogenese repräsentiert. Neben der Endothelzell-Adhäsion spielt CD31 eine wichtige Rolle bei Leukozyten-Endothel-Adhäsion und daraus folgend der transendothelialen Migration (Buckley et al. 1996).

Für die Gefäßdichtezählung wurde eine Verdünnung von 1:1500 (0,27µg/mL) durch eine Verdünnungsreihe mit einer Spanne von 1:50-1:2000 an 5 Kolonmukosapräparaten ermittelt.

2.5.3. *Ber-Ep4*

Ber-Ep4 ist ein monoklonaler Antikörper (DAKO M 0804) gegen ein epitheliales Glykoprotein von 34 und 49 kD (Kato et al. 1991). Er gehört zu der IgG₁ kappa Immunglobulinfamilie. Das Glykoprotein ist repräsentiert auf der Oberfläche und im Zytoplasma aller Zellen epithelialen Ursprungs, mit Ausnahme von Parietalzellen, Hepatozyten und epidermalen Keratinozyten der apikalen Plattenepithelschicht (Latza et al. 1990, Kato et al. 1991). Die Funktion ist bis jetzt noch nicht geklärt. Das ubiquitäre Vorkommen auf epithelialen Zellen, auch bei entdifferenzierten Karzinomen, macht das Glykoprotein für die Detektion von Mikrometastasen in Lymphknoten besonders geeignet (Pantel et al. 1995, Latza et al. 1990). Erkannt werden von BER-Ep4 auch Zellen von Adenokarzinomen und teilweise malignen Melanomen (Gaffey et al. 1992), nicht jedoch das lymphatische Gewebe (Pantel et al. 1993b, Passlick et al. 1994).

2.5.4. *A45-B/B4*

Der Antikörper A45-B/B3 von Micromet München, Deutschland ist ein IgG1 Immunglobulin, welches die Zytokeratine 8, 18 und 19 erkennt. Es reagiert mit 56000 kD großen Panzytokeratin-Komponenten (Thorban et al. 1996). Keratin ist nur auf Zellen exprimiert, welche epithelialen Ursprungs sind. Es treten keine Wechselwirkungen mit blutbildenden Stammzellen des Knochenmarkes auf, wie dieses in Versuchen mit Ber-EP4 Antikörper festzustellen war.

2.6 Auswertungskriterien

2.6.1. VEGF

Die Expression von VEGF wurde im Hinblick auf drei verschiedene Expressionscharakteristika untersucht. Dazu gehörte der Prozentsatz der VEGF exprimierenden Zellen im Tumorstroma, die Intensität der VEGF-Expression und die sich durch starke VEGF-Expression demarkierende Invasionszone. Der prozentuale Anteil der VEGF positiven Zellen wurde als Grundlage für die Bewertung verwendet. Der Anteil der VEGF positiv gefärbten Zellen wurde in 10 %-Schritten erfaßt (0 %-10 %-20 %...100 %). Gemäß dem ermittelten Verteilungsmuster erfolgte zunächst eine grobe Einteilung in drei Gruppen (0-33 %, 34-66 %, 67-100 %). Weitere Kriterien, die für die Bewertung herangezogen wurden, waren die Färbeintensität im Vergleich zur glatten Muskulatur, die auf allen Tumorproben mit angeschnitten war, sowie das Vorhandensein einer stark VEGF gefärbten Invasionszone an der Grenze zu noch nicht infiltriertem Gewebe. Die beiden zuletzt genannten Kriterien wurden nur gewichtend in die Beurteilung aufgenommen. Bei Tumorproben, deren prozentualer Anteil an VEGF positiven Zellen eine Zuordnung in eine der jeweiligen Gruppen nicht eindeutig zuließ, wurden die Kriterien Intensität und Invasionszone als Gewichtungsfaktor miteinbezogen.

Abbildung 3

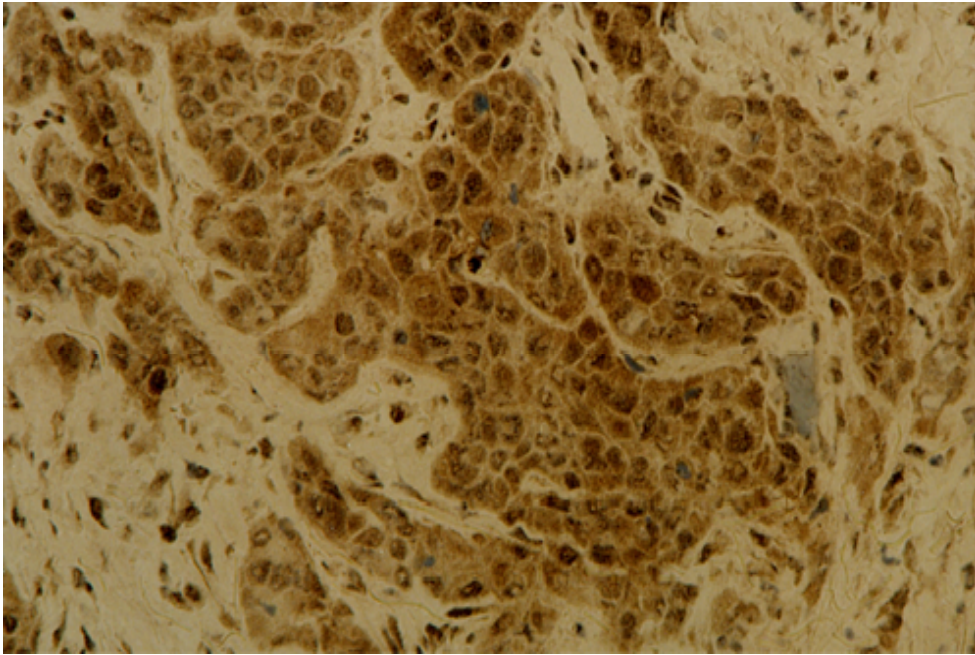


Abb. 3: VEGF-Expressions Gruppe 3 (90 % positive Zellen, Intensität Gruppe 3, Invasionszone negativ)

Abbildung 4

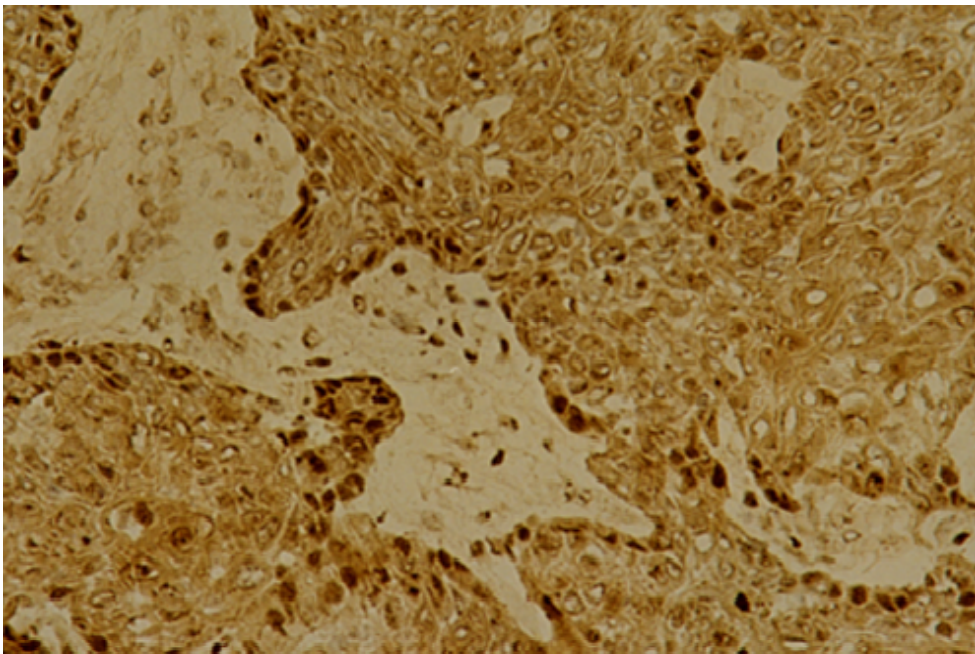


Abb. 4: VEGF-Expressions Gruppe 3 (90 % positive Zellen, Intensitätsgruppe 2, Invasionszone positiv)

2.6.2. Gefäßzählung [mikrovesseldensity (MVD), vessel count (VC)]

Die Gefäßzählung erfolgte in Anlehnung an das von Vermeulen 1996 publizierte System zur Auszählung von Gefäßen (Vermeulen et al. 1996). Mit einer 100fachen Vergrößerung wurden die Regionen mit der größten Gefäßdichte ermittelt. Die Gefäße dieser „Hot-Spot“-Regionen wurden dann bei einer 200fachen Vergrößerung in einem Blickfeld des Mikroskops ($0,7386 \text{ mm}^2$ Gesamtfläche) ausgezählt. Jede Anfärbung, soweit nicht aus der Morphologie geschlossen werden konnte, das es sich um Makrophagen oder Artefakte handelte, wurde als eigenes Gefäß gezählt. Gefäßlumen oder das Vorhandensein von Erythrozyten ist auf Grund der Spezifität der Färbung zur Definition eines Mikrogefäßes nicht von Nöten (Macchiarini et al. 1992, Vermeulen et al. 1996).

Eine „Hot-Spot“-Region wird definiert als ein Ort an der Invasionsfront des Tumors oder einiger Tumorzapfen mit einer intensiven Neovaskularisation (Vermeulen et al. 1996) (Abbildung 5 Seite 40). Die Gefäße müssen in dem Tumorgewebe selbst lokalisiert sein. Bei Gefäßen, die einen Durchmesser von mehr als acht Erythrozyten aufweisen und eine dicke Wandschichtung haben, kann davon ausgegangen werden, daß sie schon vor dem Tumor existierten und von daher nicht durch Neovaskularisation des Tumors entstanden sind (Weidner et al. 1991).

Die Gefäßzählung wurde doppelblind von zwei unabhängigen Untersuchern durchgeführt. Pro Präparat wurden drei „Hot-Spot“-Regionen ausgezählt. Die Region mit den meisten Gefäßen gab dann den Ausschlag.

Abbildung 5

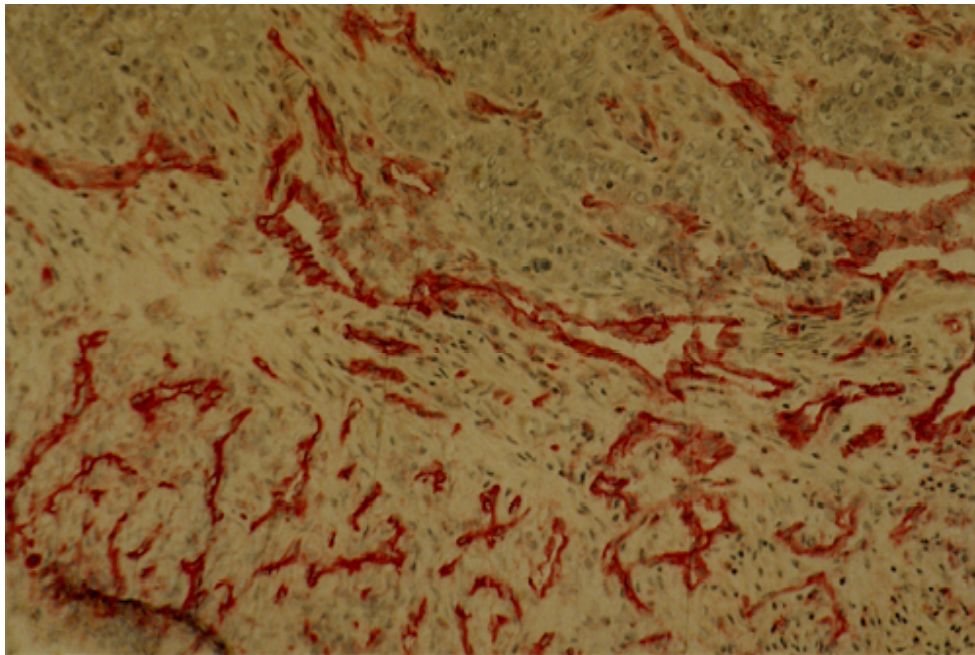


Abb. 5: Darstellung einer „Hot-Spot“-Region mit CD31 (Gruppe3 >99 Gefäße)

2.6.3. Nachweis der disseminierten Einzelzellen in Lymphknoten

Histopathologisch tumorfreie Lymphknoten wurden unter Verwendung der APAAP-Methode und dem Ber-Ep4-Antikörper auf Tumoreinzelzellen untersucht. Die kryo-asservierten Lymphknoten wurden mit drei seriellen Schnitten mit einer Dicke von 6-8µm in drei Ebenen gefärbt.

Mikrometastasen wurden als einzelne Zellen oder als eine kleine Gruppe von nicht mehr als 3 Ber-Ep4-positiven Zellen definiert. Die Morphologie und die Kern-Plasma-Relation sowie die Lokalisation waren weitere Kriterien, die bei der Bewertung eine Rolle spielten. Bevorzugte Orte der lymphogen disseminierten Einzelzellen sind der Randsinus und von Lymphkapillaren gebildete Intermediärsinus (Allison et al. 1994).

Zum Ausschluß unspezifischer Färbungen wurde zu jedem Präparat eine Negativkontrolle mitgeführt. Dabei wurde statt des Primärantikörpers, der Maus-Antikörper MOPC-21 (Sigma, Code M-9269) verwendet, welcher ein Non-Immunserum ist. Dieses Immunserum weist keine spezifische Reaktion mit Antigenen auf. Es gehört der IgG₁ Subklasse an und wurde jeweils in der Verdünnung des spezifischen Primär-antikörpers verwendet.

Die Auswertung erfolgte doppelblind von zwei unabhängigen Beobachtern ohne Kenntnis der Patientendaten. Bei nicht übereinstimmenden Ergebnissen erfolgte eine erneute Begutachtung der Präparate, und ein Konsens wurde hergestellt.

2.6.4. Einzelzelldissemination ins Knochenmark

Auf den Objektträgern waren 500.000 Zellen zytogespinn. Diese Zellen wurden immunhistochemisch mit dem A45 Zytokeratin Antikörper gefärbt und nachfolgend auf positive Einzelzellen untersucht. Die Negativkontrolle erfolgte wie bei der Lymphknoten Beurteilung. Die Auswertung erfolgte doppelblind von zwei unabhängigen Untersuchern ohne Kenntnis der Patientendaten.

2.6.5. Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen wurden die nominalen und ordinalen Parameter mit Hilfe von Kontingenztafeln beschrieben und anhand des Chi-Quadrat-Tests bzw. mit dem Fisher's Exakt Test auf Abhängigkeiten geprüft.

Das lokalrezidivfreie Intervall, das fernmetastasenfreie Intervall und die Gesamtüberlebenszeit sowie der Zeitraum des rezidivfreien Überlebens wurden zur Berücksichtigung von Zensierungen nach der Methode von Kaplan und Meier berechnet.

Die statistische Signifikanz wurde mit dem Logrank-Test ermittelt. Das Signifikanzniveau wurde auf den Korrelationskoeffizienten (p) $p=0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Numerische Datenzusammenstellung

3.1.1. VEGF-Färbung

Es wurden 78 Tumoren mit dem polyklonalen VEGF-Antikörper 147 untersucht. Das VEGF-Antigen war in/auf den Tumorzellen deutlich darstellbar und mit wenig Hintergrundfärbung möglich. Die einzeln aufgeschlüsselten Bewertungskriterien der VEGF-Färbung wurden zu VEGF-Expressions-Gruppen zusammengefaßt. Drei Stärkegrade wurden unterschieden:

(1) geringe Expression, (2) mäßige Expression und (3) starke VEGF-Expression.

Zu den Einzelauswertungskriterien gehören der prozentuale Anteil der VEGF exprimierenden Zellen im Tumorstroma, die Intensität der Expression im Vergleich zur endogenen, glatten Muskulatur und die Abgrenzbarkeit einer Invasionszone durch demarkierende VEGF-Expression.

Bei 60,3 % der Tumoren waren 70 % bis 100 % der Tumorzellen im Stroma VEGF positiv gefärbt, während sich bei nur knapp 17,9 % die Expression VEGF auf weniger als 30 % der Zellen erstreckte. Eine positive Invasionszone zeigte sich bei einem Drittel der untersuchten Tumoren. Die Färbeintensität von VEGF im Tumorstroma im Vergleich zur endogenen Muskulatur war bei 61,5 % der Tumore schwächer (siehe Tabelle 4 Seite 43).

Ein Tumor zeigte keine VEGF-Expression während 50 Ösophaguskarzinome (64,1 %) eine starke VEGF-Expression aufwiesen. 16 der Tumore (20,5 %) exprimierten VEGF in geringem Maße (siehe Tabelle 5 Seite 43).

Auswertungskriterien

	Anzahl	Prozent	gesamt
Prozent der VEGF positiven Zellen :			
0 - 30 %	14	17,9 %	78 (100 %)
40 - 60 %	17	21,8 %	
70 - 100 %	47	60,3 %	
Intensität im Verhältnis zur endogenen Muskulatur			
1 (schwächer)	48	61,5 %	78 (100 %)
2 (vergleichbar)	14	18,0 %	
3 (stärker)	6	7,7 %	
nicht bestimmbar	10	12,8 %	
Invasionszone			
positiv	26	33,3 %	78 (100 %)
negativ	52	66,7 %	

Tabelle 4: VEGF-Einzelbewertungskriterien

Expressionsgruppen

Expressionsgruppen	1	2	3	gesamt
Anzahl	16	12	50	78
Prozentzahl	20,5 %	15,4 %	64,1 %	100 %

Tabelle 5: VEGF-Expressions-Gruppen

3.1.2. Gefäßzählung

Die Gefäße wurden mit dem monoklonalen CD31 Antikörper dargestellt. Bei 78 Tumoren wurde die Gefäßzählung durchgeführt. Hierbei wurden zunächst bei jedem Tumor drei „Hot-Spot“-Regionen bestimmt. Innerhalb dieser Regionen wurde in einem definierten Gesichtsfeld eine Gefäßzählung durchgeführt und für jeden Patienten ein Mittelwert gebildet. Die Mittelwerte wurden zu vier Gruppen zusammengefaßt, damit eine statistische Bearbeitung möglich war. Gruppe 1 erhielt Tumore mit 0-49 Gefäßen pro „Hot-Spot“-Region. Gruppe 2 wurde definiert als ein Tumor der zwischen 50-74 Gefäße pro „Hot-Spot“-Region aufwies. Mit 75 bis 99 Gefäßen wurden die Tumoren in Gruppe 3 und mit 100 oder mehr Gefäßen wurde der Tumor in die Gruppe 4 eingeteilt.

CD 31-Gruppeneinteilung

CD31-Gruppen	1	2	3	4	gesamt
Anzahl der Gefäße	0 - 49	50 - 74	75 - 99	≥ 100	
Zahl der Patienten	16 (20,5 %)	23 (29,5 %)	26 (33,3 %)	13 (16,7 %)	78 (100 %)

Tabelle 6: Gruppeneinteilung der Gefäßzählung in den „Hot-Spot“-Regionen

3.1.3. Einzelzelldissemination

Für die Beurteilung der Einzelzelldissemination in Lymphknoten wurden je drei Serienschnitte von jedem der pathologisch als tumorfrei beurteilten Lymphknoten angefertigt und immunhistochemisch mit Ber-EP4 gefärbt.

Von 78 untersuchten Tumoren wiesen 52 eine Tumoreinzelzelldissemination in Lymphknoten auf. Das entspricht 66,6 %.

Die Untersuchung wurde doppelblind von zwei unabhängigen Untersuchern durchgeführt.

Lymphknotenbefunde

T-Stadium	positiver LK Befund	negativer LK Befund	Anzahl gesamt
pT 1	6	6	12
pT 2	11	7	18
pT 3	34	13	47
pT 4	1	0	1
	52 (66,7 %)	26 (33,3 %)	78 (100 %)

Tabelle 7: Lymphknoten Einzelzelldissemination

Die Beurteilung der Knochenmarkaspirate erfolgte anhand von 500.000 Lymphozyten, die sich auf zwei zellzentrifugierten Arealen des Objektträgers befanden (s.o.Kap.2). Die Färbung mit dem Antikörper A45B/B3 war spezifisch für die epithelialen Ursprungszellen der Karzinome und wurde von zwei unabhängigen Untersuchern durchgeführt. Knochenmarkaspirate von 60 Patienten wurden auf Einzelzelldissemination untersucht. Bei 24 Patienten wurde eine positive Knochenmark Einzelzelldissemination nachgewiesen, während sich bei 36 Patienten keine Tumorzellen im Knochenmarkaspirat zeigten.

Knochenmarksbefunde

T-Stadium	Nachweis epithelialer Zellen	kein Nachweis epithelialer Zellen	Anzahl gesamt
pT 1	1	6	7
pT 2	5	10	15
pT 3	19	18	37
pT 4	1	0	1
	26 (43,3 %)	34 (56,7 %)	60 (100 %)

Tabelle 8: Tumoreinzelzelldissemination ins Knochenmark

3.2. Statistische Auswertung der Daten

3.2.1. VEGF-Expression in Korrelation zu den Tumor spezifischen Daten

Die VEGF-Expressionsgruppen konnten mit dem T-Stadium der Tumore signifikant korreliert werden. Die Chi-Quadrat-Analyse ergab einen Wert von $p=0,004$.

In der folgenden Tabelle ist die Anzahl der VEGF-Gruppen gegen das T-Stadium aufgetragen.

VEGF-Expressionsgruppen / TNM

VEGF- Expressions Gruppe	pT 1	pT 2	pT 3	pT 4	Gesamtzahl der Patienten
1	1	6	9	0	16
2	6	2	4	0	12
3	5	10	34	1	50
Gesamt	12	18	47	1	78

Tabelle 9: VEGF-Expressionsgruppe / T-Stadium

Neben dem TNM-Stadium konnte auch das UICC-Stadium mit der VEGF-Intensitätsgruppierung signifikant korreliert werden ($p=0,034$). Einzelaufstellung der Daten erfolgt in der nachfolgenden Tabelle 10.

VEGF-Expressionsgruppen / UICC

	UICC Stadien				gesamt
VEGF-ExpressionsGruppe	I	II a	II b	III	
1	0	3	5	8	16
2	5	2	2	3	12
3	4	16	7	23	50
gesamt	9	21	14	34	78

Tabelle 10: VEGF-Expressionsgruppe / UICC-Stadien

Das Plattenepithelkarzinom exprimiert VEGF signifikant stärker als das Adenokarzinom. Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson ergibt $p=0,019$.

VEGF-Expressionsgruppen / Zelltyp

VEGF-Expressions-Gruppe	Plattenepithelkarzinom	Adenokarzinom	Anzahl
1	7 (13,7 %)	9 (33,3 %)	16
2	6 (11,8 %)	6 (22,2 %)	12
3	38 (74,5 %)	12 (44,5 %)	50
gesamt	51 (65,4 %)	27 (34,6 %)	78 (100 %)

Tabelle 11: VEGF-Expressionsgruppen / Zelltyp des Karzinoms

3.2.2. VEGF-Expression in Korrelation zur Gefäßdichte

Eine stärkere VEGF-Expression konnte mit der durch CD31-Markierung bestimmten Gefäßdichte signifikant korreliert werden, $p=0,001$.

VEGF-Expressionsgruppen / Mikrogefäßdichte

CD31 Gruppierung	Expression Gruppen VEGF-			
	1	2	3	gesamt
1	7	2	7	16
2	7	6	10	23
3	2	3	21	26
4	0	1	13	13
gesamt	16	12	50	78

Tabelle 12: VEGF-Expressionsgruppen / Mikrogefäßdichte

3.2.3. VEGF-Expression in Korrelation zur Einzelzelldissemination

In der statistischen Auswertung der VEGF-Expressionsstärke zur Einzelzelldissemination ins Knochenmark konnte keine Signifikanz, aber eine statistische Tendenz erkannt werden. Der Chi-Quadrat-Test ergab einen Wert von $p=0,064$.

VEGF-Expressionsgruppen / Tumoreinzelzelldissemination ins Knochenmark

VEGF-Expressions-Gruppen	Tumor Einzelzellen im KM positiv (%) von + KM	Tumor Einzelzellen im KM negativ (%) von - KM	gesamt
1	7 (27,0 %)	5 (14,7 %)	12
2	7 (27,0 %)	15 (44,1 %)	22
3	12 (46,0 %)	14 (41,2 %)	26
gesamt	26 (43,3 %)	34 (56,7 %)	60 (100 %)

Tabelle 13: VEGF-Expressionsgruppen / Tumoreinzelzelldissemination ins Knochenmark

Weitere Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern fanden sich nicht. Zu der Stärke der VEGF-Expression korrelierte weder das Grading der Tumore noch die Überlebenszeit. Ebenfalls konnte die Gefäßdichte nicht in einen Zusammenhang mit dem Überleben oder der Metastasierungsrate gebracht werden. Die VEGF-Einzelauswertungen mit den Tumorparametern oder der Gefäßdichte zu korrelieren, was jedoch zu keinem statistisch signifikanten Ergebnis führte. In der qualitativen Auswertung der VEGF-Färbung zeigte sich bei 26 Tumoren eine positive Invasionszone (siehe Tabelle 4). Von diesen Patienten wiesen 18 einen histopathologisch positiven Lymphknotenstatus auf. Es konnte jedoch keine signifikante Korrelation gezeigt werden.

pN- Stadium / Invasionszone

pN-Stadium	positive Invasionzone	negative Invasionzone	Anzahl gesamt
pN 1	18 (69,2 %)	31 (59,6 %)	49
pN 0	8 (30,8 %)	21 (40,4 %)	29
	26	52	78

Tabelle 14: pN-Stadium / Invasionszone

3.3. Prognostische Daten

Der mittlere Beobachtungszeitraum des in dieser Studie untersuchten Patientenkollektivs betrug 17,4 Monate (3 bis 101 Monate). Ein Lokalrezidiv bekamen 52,3 % Patienten in einem mittleren Zeitraum von 9 Monaten. Im selben Zeitraum (9 Monate) wurde bei 37 Patienten ein Rezidiv-Tumor mit anderer Lokalisation festgestellt. Bei 35 Patienten fand sich eine Lymphknoten- oder Fernmetastasierung im Zeitraum von 9 Monaten. Die mittlere Überlebenszeit verkürzte sich mit vermehrter VEGF-Expression. Es konnte jedoch keine signifikante Korrelation berechnet werden.

mittlere Überlebenszeit nach VEGF-Expressionsgruppen

VEGF-Expressions-Gruppe	mittlere Überlebenszeit (Monate)	mittlere Überlebenszeit gesamt (Monate)
1	19,6	17,2
2	17,4	
3	14,5	

Tabelle 15: mittlere Überlebenszeit nach VEGF-Expressionsgruppen aufgeteilt

4. Diskussion

Die hier vorgelegte Arbeit behandelt die VEGF-Expression auf primären Ösophaguskarzinomen in Hinblick auf den Tumorprogress, insbesondere unter Berücksichtigung der Tumoreinzelzelldissemination und der Gefäßneubildung.

Das Ösophaguskarzinom ist, unabhängig von seiner Ätiologie, ein aggressiv wachsender Tumor, der frühzeitig lymphogen metastasiert. Verbesserte perioperative Betreuung der Patienten und chirurgische Operationstechniken brachten nur einen geringen Fortschritt für das Überleben der Patienten. In klinischen Studien konnte trotz vielfältiger Behandlungsansätze mit adjuvanten und neoadjuvanten Radio- und Radiochemotherapieverfahren keine signifikante Verbesserung der Prognose herbeigeführt werden (McConnel et al. 2003, Rice et al. 2003, Enzinger et Mayer 2003).

In die hier vorliegende Studie wurden nur Patienten eingeschlossen, die keine adjuvante oder neoadjuvante Therapie erhalten haben, da die biologischen Eigenschaften der Tumore durch neoadjuvante Therapie verändert werden (McConnel et al. 2003). Wir hatten so die Chance, an einem homogenen Patientenkontinuum die unbeeinflussten Tumore zu untersuchen.

Die VEGF-Expression ist Ausdruck der Kapazität des Tumors, die Gefäßneubildung zu initiieren und voranzutreiben. Des Weiteren entstehen durch die Überexpression von VEGF Gefäße, welche eine deutlich porösere und permeablere Gefäßwand aufweisen. Neben der semiquantitativen Bestimmung der VEGF-Expression sollte die Gefäßdichtebestimmung einen Rückschluß auf die tatsächliche biologische Wirkung von VEGF zulassen.

Abhängig vom Zelltyp kommt es bereits im T1 Stadium bei einem kleinen Teil der Patienten zum Auftreten von Lymphknotenmetastasen (Siewert 2001). Bei Patienten mit einem T1 Tumor, stellen wir in dieser Arbeit eine lymphogene Metastasierung von 25 % (3/12) fest. Es zeigte sich zudem, daß bei 30 % der histopathologisch N0 eingestuften Patienten mit der immunhistochemischen Methode eine nodale Einzelzelldissemination nachgewiesen werden konnte. Dieser Befund erwies sich in einer früheren Studie aus unserem Forschungslabor als unabhängiger Parameter für eine signifikant schlechtere Prognose (Izbicki et al. 1997).

Die Einzelzelldissemination ist ein wichtiger Faktor in der Erforschung des Metastasierungsverhaltens des Ösophaguskarzinoms und vieler anderer maligner Tumoren. In Zusammenarbeit und aufbauend auf Arbeiten von Professor Pantel aus Hamburg wurden in unserem Labor ein immunhistochemisches Verfahren zum Screening von epithelialen Einzelzellen im Knochenmark und Lymphknoten etabliert. Die Fragestellung und Untersuchungskriterien der vorliegenden Studie wurden in Anlehnung an die Publikation von Ohta aus dem Jahre 2000 entwickelt. Hierin zeigte Ohta bei nicht-kleinzelligen Bronchial Karzinomen einen Zusammenhang zwischen der VEGF-Expression und der Tumoreinzelzelldissemination in Lymphknoten (Ohta et al. 2000). Wir haben neben der VEGF-Expression und der Gefäßdichte auf den Ösophagus Primärtumoren, die Einzelzelldissemination in Lymphknoten und das Knochenmark untersucht.

Mit dieser Arbeit möchten wir die tumorbiologischen Ursachen für die frühe Metastasierung bzw. die Einzelzelldissemination näher untersuchen. Eine entscheidende Grundlage dieser Arbeit bildeten dabei die Erkenntnisse über den Gefäßwachstums- und Permeabilitätsfaktor VEGF. Eine gesteigerte Permeabilität von Gefäßen und deren vermehrte Neubildung könnte die Durchwanderung der Gefäßwand durch Tumorzellen erleichtern und so einer Tumorzelldissemination Vorschub leisten. Beim Magenkarzinom konnte der Nachweis von Mikrometastasen mit einer erhöhten Expression von VEGF signifikant korreliert werden und gleichzeitig eine Bedeutung für die Prognose gezeigt werden (Kakeji et al. 1999). Eine Untersuchung zur nodalen Mikrodissemination beim Ösophaguskarzinom in Abhängigkeit von der VEGF-Expression liegt bislang nicht vor, so daß wir unter Verwendung eines polyklonalen VEGF-Antikörpers die Primärtumoren von 78 Patienten mit Ösophaguskarzinom charakterisiert, die Gefäßdichte bestimmt und mit der Tumoreinzelzelldissemination in Lymphknoten und im Knochenmark korreliert haben.

4.1. Bedeutung der VEGF-Expression und der Gefäßdichte beim Ösophaguskarzinom
Die VEGF-Expression konnte auf vielen Tumoren als ein Prognose beeinflussender Faktor identifiziert werden (s.o. Kap.1.7). Es zeigte sich, daß nahezu alle Ösophagus

Primärtumore (98,7 %) in unserem Patientenkollektiv eine Positivität für VEGF aufwiesen. Es fielen jedoch signifikante Unterschiede der VEGF-Expression im Hinblick auf den Zelltyp auf. Die statistische Analyse ergab, daß im Vergleich zum Adenokarzinom VEGF vermehrt auf Plattenepithelkarzinomen exprimiert wurde ($p < 0,019$). Dies könnte eine prognostische Bedeutung haben. Dem Plattenepithelkarzinom wird ein aggressiveres Wachstums- und Metastasierungsverhalten zugeschrieben, so daß die vermehrte Expression einen Hinweis auf die höhere Aggressivität des Tumors liefern könnte. Die VEGF-Expression korreliert signifikant mit dem Fortschreiten des Ösophaguskarzinoms.

Da das VEGF-Expressionsmuster auf den Kryostatschnitten der einzelnen Tumore sehr stark variierte, wurde neben der semiquantitativen Auswertung auch eine qualitative Beurteilung durchgeführt. In der Literatur variiert die Beurteilung des Färbeergebnisses auf den histologischen Schnitten stark. Wir sind hierbei nach der Methode von Takahashi vorgegangen (Takahashi et al. 1997). Ein deutliches und zellspezifisches VEGF-Färbesignal wurde von uns als positiv interpretiert, auch wenn die Intensität geringer war als die der endogenen glatten Muskulatur desselben Präparats. Die endogene glatte Muskulatur diente uns als interne Positivkontrolle. Auf diese Weise zeigte sich eine VEGF-Positivität von 98,7 % (77/78). In der Literatur finden sich jedoch auch andere Auswertungskriterien. Inoue kam nach seinen Kriterien 1997 auf eine Rate von 46,6 % VEGF positiver Ösophaguskarzinome (Inoue et al. 1997). Er konnte die VEGF-Expression jedoch nicht signifikant mit klinisch pathologischen Parametern korrelieren.

In der qualitativen Betrachtung der VEGF-Expression konnten wir bei 26 von 78 Tumoren (33,3 %) eine verstärkte Expression im Randzonenbereich des Tumors feststellen. Die aufgefallene erhöhte Expressionsdichte des VEGF in der Invasionszone, könnte verschiedene Gründe bzw. Ursachen haben. So wird VEGF betont in Zellen produziert, die vital und beispielsweise im Randgebiet einer Nekrose liegen (Weidner et al. 1991, Plate et al. 1992, Yamaguchi et al. 1998). Dieses könnte auch für den Tumor gelten, da sein Zentrum die geringste Sauerstoffversorgung zeigt. Die vitalen Zellen könnten eine erhöhte Fähigkeit haben, VEGF zu produzieren oder aber durch besondere Umstände stärker stimuliert werden. Die Gefäße des sie umgebenden Stromas werden besser und über kürzere Wege erreicht. Hierdurch könnte dem Tumor, durch eine bessere Gefäßversorgung ein schnelleres Wachstum ermöglicht werden. Die „Hot-Spot“-Regionen liegen ebenfalls betont in der Peripherie

des Tumors, so daß sich ein Zusammenhang der VEGF-Expression mit der Gefäßneubildung erklären könnte.

Die statistische Auswertung unserer Daten zeigte, daß die VEGF-Expression signifikant mit einem höheren T-Stadium korrelierte ($p < 0,004$). In gleicher Weise konnte das UICC-Stadium positiv mit der Expression des VEGF ($p < 0,034$) korreliert werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten von Takahashi aus dem Jahre 1996 und Saito von 1999 und unterstützen die Hypothese, daß VEGF ein Marker für den Tumor-Progress ist (Takahashi et al. 1996, Saito et al. 1999). Die Notwendigkeit der Neoangiogenese scheint mit dem Fortschreiten der Erkrankung zuzunehmen. Mit der Größenzunahme des Tumors steigt das Sauerstoff- und Nährstoffdefizit, so daß es nötig wird, mit einer erhöhten VEGF-Expression und damit verbundener Gefäßneubildung dem Absterben der Zellen entgegenzuwirken. Je größer der Tumor wird, desto stärker ist er von einem intakten eigenen Gefäßnetz abhängig, welches unter anderem durch die VEGF-Proteinfamilie initiiert und erhalten wird.

Die VEGF-Expression konnte nicht nur mit dem Stadium der Ösophagus Primärtumore korreliert werden, sondern zeigte auch eine hochsignifikante Korrelation zur Mikrogefäßdichte der Tumoren.

Wie in Kapitel 2 erwähnt und beschrieben, stellten wir mit dem spezifischen Endothelmarker CD31 immunhistochemisch die Mikrogefäße im Tumorstroma dar. Durch Auszählung von drei „Hot-Spot“-Regionen erfolgte die Beurteilung nach der von Weidner 1991 etablierten Methode. Hierbei wird das angiogenetische Potential des Tumors repräsentativ widerspiegelt (Weidner et al. 1991). Die „Hot-Spot“-Regionen sind häufig in der Peripherie, der Invasionszone des Tumors lokalisiert (Kilic et al. 1997, Connolly et Rose 1998, Takahashi et al. 1998a). Die Auszählung der „Hot-Spot“-Regionen erfolgte doppelblind von zwei unabhängigen Untersuchern ohne Wissen um das Tumorstadium oder anderer Daten der Patienten. Der von uns erwartete Zusammenhang der VEGF-Expression mit der Gefäßdichte konnte durch die hoch signifikante Korrelation der beiden Parameter dargestellt werden. Die Chi-Quadrat Analyse ergab ein $p < 0,001$. In der Literatur finden sich Studien, die zeigen, daß auch bei anderen Tumorentitäten ein Zusammenhang der VEGF-Expression mit der Gefäßdichte besteht (Takahashi et al. 1996, Kang et al. 1997, Ohta et al. 1997, Nakata et al. 1998).

Durch schnelles Tumorwachstum entsteht im Zentrum ein Sauerstoffmangel, durch welchen eine VEGF-Expression angeregt wird. Vorhandene Gefäße werden permeabler für Nährstoffe und Sauerstoff, neues Gefäßwachstum wird initiiert. Die VEGF-Proteinfamilie besetzt eine Schlüsselposition in der Gefäßneubildung und besitzt damit eine der strategisch wichtigsten Fähigkeiten für die Ausbreitung des Tumors auf lokaler, aber auch metastatischer Ebene. Die Mikrogefäßdichte konnte mit dem Fortschreiten des Tumors und einer tieferen Invasion sowie einer Lymphknotenmetastasierung bei Zervixkarzinomen und dem Ösophaguskarzinom signifikant korreliert werden (Smith-McCune et Weidner 1994, Tanigawa et al. 1997).

Trotz einer Korrelation zwischen der VEGF-Expression, der Gefäßdichte und dem T-Stadium fand sich kein Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Parametern wie der Entstehung von Fernmetastasen. Ebenfalls ließen unsere Ergebnisse keinen Zusammenhang zwischen der VEGF-Expression und dem Ausmaß der Tumoreinzelzelldissemination erkennen. Wir haben daher den Einfluß typischer Merkmale des VEGF-Expressionsmusters auf den histopathologischen Lymphknotenbefall untersucht. Hierbei berücksichtigten wir insbesondere das Vorhandensein einer besonders hohen Färbeintensität bzw. einer deutlich durch VEGF demarkierten Tumorinvasionszone in das umgebende Bindegewebe. So wiesen Tumore mit einer positiven Invasionszone zu fast 70 % (18/26) eine positive Lymphknoten Metastasierung (pN1) auf. Die oben genannte These, daß VEGF über eine vermehrte Gefäßpermeabilität die Metastasierung erleichtern könnte, findet in diesem Befund eine Bestätigung. Es ergab sich statistisch jedoch keine signifikante Korrelation mit dem immunhistochemischen Nachweis einzelner nodaler Tumorzellen. Prognostische Einflüsse waren nicht erkennbar.

Zusammenfassend kann über die hier erarbeiteten Ergebnisse der VEGF-Expression auf Ösophaguskarzinomen gesagt werden, daß VEGF eine tragende Bedeutung für die Entwicklung und Progredienz des Tumorwachstums des Ösophaguskarzinoms hat. Es korreliert signifikant mit den Tumorstadien und weist einen signifikanten Zusammenhang mit der Gefäßdichte auf. Der Einfluß auf die Metastasierung muß in weiteren

Arbeiten verstärkt untersucht werden, um eine klarere Aussage treffen zu können. Nach den Ergebnissen dieser Untersuchung scheint die VEGF-Expression, trotz der damit verbundenen Permeabilitätssteigerung und vermehrte Gefäßbildung, keinen ausgeprägten Einfluß auf die Dissemination einzelner Tumorzellen zu haben. Es

scheint sich eher um einen Parameter des lokalen Tumorprogresses zu handeln. Die VEGF-Expression scheint einen geringen Einfluß auf die lymphogene Metastasierung zu haben. In wie weit eine Fernmetastasenbildung durch die Expression von VEGF beeinflusst wird, ist nicht abschließend zu beurteilen. Sicher ist VEGF jedoch ein Protein/Faktor mit viel-versprechendem Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer individualisierter Strategien in der Krebstherapie.

Die Gefäßdichte kann unabhängig von der VEGF-Expression betrachtet werden. Sie stellt einen Prognose beeinflussenden Faktor in der Literatur dar. 1996 veröffentlichte Tanigawa eine Studie, die die Invasionstiefe des Ösophaguskarzinoms mit der Anzahl der Gefäße in den „Hot-Spot“-Regionen signifikant korrelieren konnte (Tanigawa et al. 1997). Es finden sich mehrere Studien, die die Gefäßdichte als Parameter für den Tumorprogress sehen (Anan et al. 1998, Otha et al. 1997). Es gibt aber auch ein Gegenbeispiel von Lindmark aus dem Jahre 1996, in welchem eine vermehrte Gefäßdichte mit einem längeren Überleben signifikant korreliert werden konnte. Es wird darin argumentiert, daß durch eine bessere Blutversorgung des Tumors die körpereigene Immunabwehr das Gewebe besser erreichen und so das Tumorstadium besser bekämpfen könnte (Lindmark et al. 1996). In der Literatur findet sich jedoch keine Bestätigung dieser Studie.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir keine signifikante Korrelation der Gefäßdichte zu klinisch-pathologischen Parametern des Tumors feststellen. Die geringen Fallzahlen dieser Studie könnten ein Grund für das Ausbleiben einer statistischen Signifikanz sein. Ein anderer Grund könnte in der Tatsache liegen, dass das von uns untersuchte Ösophaguskarzinom klinisch relevant vor allen Dingen lymphogen metastasiert und das Gefäßwachstum nur einen lokalen Einfluß auf den Tumorprogress hat. Die Gefäßdichte scheint damit eher Ausdruck des lokalen Wachstums zu sein, als dass sie sich statistisch signifikant auf die Prognose auswirkt.

Im Folgenden möchte ich einen Ausblick über die therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten und ersten Studien in der klinischen Testphase von Anti-VEGF-Präparaten und anderen anti-angiogenetisch wirksamen Therapieansätzen geben.

4.2. Therapeutische Ansätze von Anti-VEGF-Präparaten

Die therapeutischen Ansätze im Wirkungsbereich des VEGF sind sehr vielseitig. Die Wirkung des VEGF-Proteins kann über Antikörper neutralisiert werden. Lösliche, genetisch veränderte Rezeptoren können über kompetitive Bindung die Wirkung des exprimierten VEGF-Proteins herabsetzen. Neue Moleküle als Inhibitoren für die Rezeptoren werden kreiert und es wird versucht, die Gen-Expression von antiangiogenetischen Molekülen zu beeinflussen (Machein et al. 2000, Oehler et al. 2000, Ponnazhagen et al. 2004, Underinger et al. 2004).

1995 beschrieb Asano, daß in einer Zellkultur durch Zugabe von Anti-VEGF-Antikörpern das Wachstum der Endothelzellen verlangsamt bzw. gestoppt werden konnte (Asano et al. 1995). Von Kanai wurden 1998 humane Tumoren orthotop in Nacktmäuse implantiert und vergleichend mit und ohne Anti-VEGF-Antikörper behandelt. Das Ergebnis bei unbehandelten Tieren war ein deutlich höheres Tumorgewicht und eine signifikant höhere Lebermetastasierung (Kanai et al. 1998). Ähnliche Daten konnte Melnyk 1996 an Nacktmäusen zeigen, bei denen sich eine geringere Metastasierungsrate nach Gabe von Anti-VEGF-Antikörper zeigte (Melnyk et al. 1996).

Auf diesen Ergebnissen aufbauend, gingen im Jahr 2000 Anti-VEGF-Antikörper in die Phase II/III der klinischen Testung (Kirsch et al. 2000, Harris 1998). Bei 25 in Houston/Texas (USA) getesteten Patienten führte das Anti-VEGF-Protein, in einem Fall zu einer Verringerung des Tumorumfanges und bei 13 zu einem Erhalt des Tumorstadiums, bei den restlichen 11 Patienten zeigte sich kein Unterschied zur Kontrollgruppe.

Es wird an vielen von der VEGF-Protein-Familie initiierten Zwischenschritten der Kaskade der Blut- und Lymphgefäßneubildung gearbeitet, um Erkenntnisse über den Mechanismus des Fortschreitens der Tumorerkrankungen zu erlangen. Im Besonderen geht es dabei um die Frage nach gezielten Therapien, die das Wachstum verlangsamen bzw. stoppen (Underinger et al. 2004). Verstärkt wird an der exakten Wirkweise und Struktur der VEGF-Familien-Mitglieder geforscht, da es sich um eine Proteinfamilie handelt welche auf verschiedenen Ebenen und dadurch sehr effektiv sowohl die Blut als auch die Lymphgefäßneubildung beeinflusst. Versuche mit Substanzen, die die Signaltransduktion von VEGF reduzieren, sind von Kirsch beschrieben worden. In seinem Rattenmodell verlängerte sich die Überlebenszeit bei multiblen Gliomen

signifikant, wenn der Gentransfer erfolgreich war (Kirsch et al. 2000). Weitere klinische Studien mit therapeutischen Ansätzen am Patienten sind jedoch noch nicht veröffentlicht worden.

Neben den therapeutischen Möglichkeiten könnte sich auch eine diagnostische Anwendbarkeit für die VEGF-Proteinfamilie ergeben, denn das im Blut befindliche VEGF (Serum-VEGF) konnte von Shimada im Jahr 2001 mit der Gefäßdichte des Tumors korreliert werden (Shimada et al. 2001). Patienten, bei denen sich eine erhöhte VEGF-Proteinkonzentration im Blut nachweisen ließe, könnten besonders von einer Anti-VEGF-Therapie profitieren oder einer anderen adjuvanten Therapie zugeführt werden.

Neben VEGF gibt es diverse Angiogenese Faktoren bzw. Angiogenese Inhibitoren, welche in der Forschung untersucht werden, um eine gezielte Therapie gegen das Wachstum von malignen Tumoren zu finden. Die Forschung im Bereich der Angiogenese und Inhibition der Gefäßneubildung verlief parallel. Denn nur über eine Verbindung beider Wissensgebiete ergibt sich das Verständnis für die Steuerung der Gefäßneubildung (Oehler et al. 2000).

Angiostatin wurde als erstes als Gefäßwachstum hemmendes beziehungsweise Metastasen- und Tumorwachstum hemmendes Substrat von O'Reilly 1994 beschrieben. Seine Erkenntnisse basieren auf der Hemmung von Tumorwachstum und Metastasenbildung beim Lewis-Lungen-Karzinom durch Angiostatin im Tiermodell (O'Reilly et al. 1994).

Im Laufe der Forschungen an der Angiogenese sind verschiedenste proangiogenetische sowie antiangiogenetische Faktoren entdeckt worden (Folkman et al. 1995b). Zu einem durchschlagenden Erfolg in der tatsächlichen klinischen Anwendung ist es jedoch noch nicht gekommen. Dieses könnte an den sehr vielfältigen Faktoren der Angiogenese liegen, was bei Verhinderung der einen Kaskade, zu einer Gefäßneubildung über einen anderen Faktor und Kaskadeweg führt. Von Folkman veröffentlichte Daten bezüglich der antiangiogenetischen Wirkung von Endostatin erzeugten in der Öffentlichkeit, vor allem in Amerika, eine Euphorie bezüglich der Heilbarkeit von Tumoren (Wadman 1998, Harris 1998). Leider mußten diese Hoffnungen gedämpft werden, denn es bestehen noch erhebliche Probleme bei der Anwendung auf den Menschen und die Umsetzung als Medikament (Drixler et al. 2000, Barinaga 1999, Philips 1998).

In den Veröffentlichungen von Harris und Philips aus dem Jahr 1998 sind diverse Proteine für die Inhibition der Angiogenese beschrieben worden. Im Prinzip kann man sich bei jedem dieser Proteine theoretische Therapieansätze vorstellen (Harris 1998, Philips 1998). Hierbei ist vor allem die Potenz und Position des Proteins in der Angiogenesekaskade zu beachten, um eine therapeutische Relevanz abschätzen zu können. Aus diesem Grund wurden Endostatin, Angiostatin und VEGF bevorzugt in die Forschung aufgenommen. Sie besetzen Schlüsselpositionen in der Angiogenesekaskade bzw. beeinflussen diese auf mehreren Ebenen gleichzeitig.

Im Allgemeinen sind die Forschungsergebnisse im Bereich der Angio- und Antiangiogenese vielversprechend. Bis sie jedoch in der klinischen Therapie Anwendung finden können, wird noch einige Zeit vergehen.

4.3 Metastasierung und Einzelzelldissemination beim Ösophaguskarzinom

Die Metastasierung in Lymphknoten und/oder andere Organe ist von fundamentaler Bedeutung für die Prognose jedes malignen Tumors. Das Ösophaguskarzinom, sowohl das Adeno- als auch das Plattenepithelkarzinom metastasieren sehr frühzeitig und bevorzugt lymphogen. Durch verfeinerte Detektionsmethoden konnten einzelnen Tumorzellen in Lymphknoten, Knochenmark und im Blut nachgewiesen werden, bevor sie histopathologisch auffällig wurden.

Eine signifikante Korrelation der Tumoreinzelzelldissemination in Lymphknoten bezogen auf den Tumorprogress konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Die Einzelzelldissemination korrelierte weder mit einer erhöhten VEGF-Expression noch mit der Gefäßdichte. Nun metastasiert das Ösophaguskarzinom primär lymphogen, so dass es sein könnte, dass wir zwar eine erhöhte Tumoreinzelzelldissemination in das Blutgefäßsystem haben, diese sich jedoch nicht in einer vermehrten lymphogenen Metastasierung nieder schlägt. Bei anderen Tumoren wie beispielsweise dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom konnte eine lymphogene Einzelzelldissemination mit der VEGF-Expression signifikant korreliert werden (Ohta et al. 2000). Das in dieser Arbeit untersuchte VEGF ist betont für die Blutgefäßneubildung verantwortlich, was sich in der Korrelation mit erhöhter Gefäßdichte nachweisen lässt. In einer Studie von

1997 zeigte Jeltsch, dass eine genetische Überexpression von VEGF-C mit einer Hyperplasie von Lymphgefäßen bei Mäusen einherging, allerdings beinhaltete die Studie keine Untersuchung zur Metastasierung (Jeltsch et al. 1997). Uchida korrelierte 1998 die vermehrte VEGF-Expression beim Ösophaguskarzinom mit einer vermehrten Lymphknoten-metastasierung sowie einer tieferen Invasion (Uchida et al. 1998). Es wird nicht spezifiziert um welchen polyklonalen VEGF-Antikörper es sich handelt, so dass es möglich wäre, dass auch teilweise das VEGF-C Protein erkannt wird und sich damit ein Einfluß auf die lymphogene Metastasierung erklären könnte.

Im Knochenmark zeigte sich bei VEGF-Überexpression eine vermehrte Rate disseminierter Tumorzellen. Eine statistische Signifikanz gab es nicht, jedoch zeigte sich eine Tendenz ($p < 0,06$). Die oben aufgestellte Hypothese, daß es unter VEGF Einfluß zu einer Erleichterung der hämatogenen Tumorzell dissemination kommt, findet hierin Unterstützung. In einer Studie am Magenkarzinom wurde das Phänomen der hämatogenen aber nicht lymphogenen Metastasierung bei vermehrter VEGF-Expression 1999 von Saito beschrieben (Saito et al. 1999). Der hämatogenen Zelldissemination wird, bei vermehrter VEGF-Expression, Vorschub geleistet, so dass vermehrt endotheliale Zellen im Knochenmark gefunden werden können. Welches metastatische Potenzial diese Zellen aufweisen, ist damit nicht geklärt, aber mit erhöhter Anzahl an Zellen, steigt potenziell auch das Risiko, dass sich hieraus manifeste Metastasen bilden. Für das Ösophaguskarzinom wird eine hämatogene Metastasierung erst in einem späten Stadium klinisch relevant, häufig erst mit Ausbildung von Fernmetastasen. Es liegt dann in der Regel keine Operabilität mehr vor, so dass dieser Umstand den geringen Einfluß der Tumoreinzelzelldissemination bezogen auf die VEGF-Expression in dieser Studie erklären könnte. Wenn das Ösophaguskarzinom noch eine Operabilität aufweist, metastasiert es vor allem lymphogen. Damit könnte der geringe Einfluß der VEGF-Expression bei unserem Patientenkollektiv erklärt werden. Welche klinisch, prognostische Bedeutung die hämatogene Einzelzelldissemination ins Knochenmark für das Ösophaguskarzinom hat, kann im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit nicht endgültig geklärt werden, denn TNM und UICC-Stadien korrelieren nicht signifikant mit der Einzelzelldissemination ins Knochenmark.

Im Laufe der Forschungen an VEGF haben sich die verschiedenen Proteine der Familie heraus kristallisiert. Insgesamt scheinen sich die Daten zu verdichten, daß VEGF-A spezifisch über seine Rezeptoren Wirkung für die Blutgefäßneubildung hat

(Kanno et al. 2000), während VEGF-C direkt im Zusammenhang mit der Lymphgefäßneubildung steht (Jeltsch et al. 1997, Mandriota et al. 2001, Onogawa et al. 2004). Mit diesem Unterschied der VEGF-Proteine könnten sich die divergierenden Ergebnisse bezüglich der VEGF-Expression und der Tumoreinzelzelldissemination erklären lassen.

Es wäre für zukünftige Studien am Ösophaguskarzinom interessant zu untersuchen, ob die Expression des Subtypen VEGF-C mit einer vermehrten Dissemination in die Lymphknoten einher geht und ob sich eine Korrelation zu klinisch pathologischen Parametern wie den TNM- und UICC-Stadien nachweisen läßt.

Des Weiteren ist es von Interesse, ob eine Co-Expression der beiden VEGF Subtypen A und C existiert und welche Bedeutung dies für den Tumorprogress hat. Besonders relevant wird dieser Aspekt vor dem Hintergrund möglicher neuer individualisierter Therapieansätze im Bereich der Anti-VEGF-Antikörper, welche ja spezifisch für die einzelnen Subgruppen sein werden.

5. Zusammenfassung

Das Ösophaguskarzinom ist ein früh lymphogen und hämatogen metastasierendes Karzinom, welches trotz intensiver perioperativer Therapie sowie adjuvanter und neoadjuvanter Therapienversuche weiterhin eine schlechte Prognose hat. Es ist daher davon auszugehen, dass sich bei vielen Patienten bereits bei Diagnosestellung eine okkulte Tumorzell dissemination ereignet hat. Mittlerweile ist es möglich diese minimale Tumorzell dissemination mit immunhistochemischen Methoden nachzuweisen. Beim Ösophaguskarzinom ist die lymphogene Dissemination von Tumoreinzellen signifikant mit einer schlechteren Prognose korreliert. Die biologischen Veränderungen im Primärtumor, die zur Tumorzell dissemination führen sind dagegen weiterhin unklar. Die VEGF vermittelte Einsprossung von neuen Gefäßen in das Tumorstroma ist ein zentraler Punkt im Fortschreiten der Erkrankung. Die neu gebildeten Gefäße weisen eine vermehrte Fenestrierung und porösere Basallamina auf, die einer Durchwanderung des Endothels von Tumorzellen Vorschub leisten könnte.

Wir haben die Expression des Gefäßwachstumsfaktors VEGF mit dem polyklonalen VEGF-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, CA USA) immunhistochemisch auf 78 Primärkarzinomen untersucht. Auf den mit VEGF-charakterisierten Tumoren haben wir die Mikrogefäßdichte immunhistochemisch mit dem monoklonalen Antikörper CD31 bestimmt und nach der von Weidner 1991 etablierten Methode ausgezählt. Die Einzelzell dissemination wurde in allen histopathologisch negativen Lymphknoten sowie in Knochenmarksaspiraten untersucht. Für die immunhistochemische Darstellung der epithelialen Zellen in Lymphknoten wurde der spezifische Marker Ber-EP4 (Dako, Hamburg) verwendet, während das Knochenmark mit dem Panzytokeratinantikörper A45 (Micromet, München) auf epitheliale Tumoreinzellen gescreent wurde.

Es zeigte sich, dass das Plattenepithelkarzinom eine signifikant höhere Expressionsintensität des VEGF-Proteins aufwies als das Adenokarzinom. Im Weiteren korrelierte die VEGF-Expression mit dem T-Stadium und der Gefäßdichte signifikant. In den Untersuchungen zur Tumoreinzell dissemination konnte keine signifikante Korrelation einer vermehrten VEGF-Expression mit der lymphogenen Dissemination festgestellt werden, während der Nachweis epithelialer Zellen im Knochenmark bei vermehrter VEGF-Expression gehäuft festgestellt wurde. Dies war jedoch lediglich ein

Trend und nicht statistisch signifikant. Wir folgern daraus, dass die VEGF-Expression als Marker für den lokalen Tumorprogress und eine aggressivere Tumorentität angesehen werden kann. Der Einfluß auf die vermehrte Gefäßneubildung zeigt sich ebenfalls eindeutig. Im Zusammenhang mit der Metastasierung bzw. Einzelzell-dissemination bleibt die Wirkung des VEGF-Proteins noch uneindeutig. Hier sollte differenziert werden zwischen dem lymphogenen und hämatogenen Metastasierungsweg. Verschiedene VEGF-Proteine, die entweder die Proliferation von Blut- oder Lymphkapillaren stimulieren, könnten abhängig von Ihrem Wirkungsfeld die unterschiedlichen Metastasierungswege beeinflussen. Dies stellt möglicherweise einen versprechenden Ansatzpunkt für neue individualisierte Strategien in der Krebstherapie dar.

6. Literaturverzeichnis

- Akiyama H., Tsurumaru M., Ono Y., Udagaw H. (1993) Background of lymph node dissection for squamous cell carcinoma of the esophagus. Colour Atlas of Surgical anatomy for Esophageal Cancer. Springer, Berlin Heidelberg New York pp 9-24 Sato T., Ilizuka T. (eds)
- Allison R.T., Baron S., Peckitt N. (1994) Lymph node micrometastasis: An investigation, including three-dimensional reconstruction. British Journal of Biomed. Science, 51: 109-113
- Anan K., Morisaki T., Katano M., Ikubo A., Tsukahara Y., Kojima M., Uchiyama A., Kuroki S., Torisu M., Tanaka M. (1998) Assessment of cerB2 and VEGF mRNA expression in fineneedle aspirates from early breast carcinomas: pre-operative determination of malignant potential. European Journal of Surgical Oncology, 24: 28-33
- Asano M., Yukita A., Matsumoto T., Kondo S., Suzuki H. (1995) Inhibition of tumor growth and metastasis by an Immoneutralizing monoclonal Antibody to human vascular endothelial growth factor /vascular permeability factor. Cancer Research, 55: 5296-5301
- Barinaga M. (1999) A surprising partner for angiostatin. Science; 283(19):1831
- Blot W.J. (1994) Esophageal cancer trends and riskfactors. Semin. Oncol 21:403-410
- Brouty-Boyen D., Zetter B.R. (1980) Inhibiton of cell motility by interferon. Science, 208: 516-518
- Buckley C.D., Doyonnais R., Newton J.P., Blystone S.D., Brown E.J., Watt S.M. (1996) Identification of $\alpha_v\beta_3$ as a heterotypic ligand for CD31/PECAM-1. Journal of cell science, 109: 437-445
- Casson A.G., Rusch V.W., Ginsberg R.J., Zankowicz N., Finley R.J. (1994) Lymphnode mapping of esophageal cancer (letter). Annual Thoracic Surgery, 58: 1569-1570
- Cheng K.K., Day N.E., Duffy S.W. (1992) Pickled vegetables in the ethiology of oesophageal canceer in Hong Kong. Lancet, 339: 1314-1318

-
- Coia L.R., Sauter E.R. (1994) Esophageal Cancer. In: Ozols R.F., Eisenberg B., Kinsella T.J. (eds) Current Problems in Cancer. Mosby St. Luis 18 (4): 191-247
- Connolly J. M., Rose D.P. (1998) Angiogenesis in two human Prostate cancer cell lines with differing metastatic potential when growing as solid tumors in nude mice. *Journal of Urology*, 160: 932-936
- Daly J. M., Karnell L.H., Menck H. R. (1996) National Cancer Data Base Report on Esophageal Carcinoma. *Cancer*, 78(8): 1820-1828
- Dameron K.M., Volpert O.V., Tainsky M.A., Bouck N. (1994) Control of Angiogenesis in Fibroblasts by p53 Regulation of Thrombospondin-1 *Science*, 265: 1582-1584
- De Vries C., Escobedo J.A., Ueno H., Houck K., Ferrara N., Williams L.T. (1992) The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, 255: 989-991
- Devesa S. S., Blot W. J., Fraumeni J. F. jr. (1998) Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric cancer in the United States. *Cancer*, 83: 2049-2053
- Drenckhahn D., Zenker W. (1994) Anatomie Band 1, Benninghoff 15. völlig neu bearbeitete Auflage
- Drixler T.A., Borel Rinkes I.H.M., Ritchie E.D., van Vroonhoven T.J.M.V., Gebbink M.F.B.G., Voest E.E. (2000) Continuous administration of angiostatin inhibits accelerated growth of colorectal liver metastasis after partial hepatectomy. *Cancer Research*, 60: 1761-1765
- Dvorak H. F., Orenstein N.S., Carvalho A.C., Churchill W. H., Dvorak A. M., Galli S.J., Feder J., Bitzer A.M., Rypysc J., Giovenco (1979) Induction of a fibrin-gel investment An early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor-secreted products. *Journal of Immunology*, 122: 166-174
- Dvorak H.F., Brown L.F., Detmar M., Dvorak A.M. (1995) Review: VPF / VEGF, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am. Journal of Pathology* 146(5): 1029-1039
- Eisma R.J., Spiro J.D., Kreutzer L.D. (1997) Vascular endothelial growth factor expression in head and neck squamous cell carcinoma. *American Journal of Surgery*, 174: 513-517

-
- Ellis F.H., Watkins E., Krasna M.J., (1993) Staging of oesophageal cancer. A comparison of different staging criteria. *Journal of Surg. Oncology*, 55: 231-235
- Enzinger P.C., Mayer R.J. (2003) Review: Oesophageal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 349 (23): 2241-2252
- Ergün S. Organisation und Regulation der Mikrovaskularisierung des menschlichen Hodens (1998) Habilitation
- Ferrara N. (1999) Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *Journal of Molecular Medizin*, 77: 527-543
- Ferrara N., Davis-Smyth T. (1997) The Biology of VEGF. *Endocrine Review*, 18(1): 4-25
- Ferrara N., Houck K., Jakeman L., Leung D. W. (1992) Molecular and Biological properties of the VEGF family proteins. *Endocrinology Review*, 13(1): 18-32
- Ferrara N., Keyt B. (1997) Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications "Regulation of Angiogenesis" Goldberg I.D., Rosen E.M. (eds)
- Ferrer F.A., Miller L.J., Andrewis R.I., Kurtzman S.H., Albertsen P.C., Laudone V.P., Kreutzer LD. (1998) Angiogenesis and prostate cancer in vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells. *Urology*, 51: 161-167
- Fiedler I.J., Ellis L.M. (1994) The implications of Angiogenesis for the biology and Therapy of Cancer metastasis. *Cell*, 79: 185-188
- Folkman J., (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications *New England Journal of Medicine*, 18: 1182-86
- Folkman J., (1986) How is Blood Vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? *Cancer Research*, 46(2): 467-473
- Folkman J., Watson K., Ingber D., Hanahan D. (1989) Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature*, 339: 58-61
- Folkman J., Alexander N.J., d'Arcangues C (1992a) Angiogenesis in female reproductive organs in Steroid hormones and Uterine Bleeding. *Am. Ass. for Advance Science Press Washington DC*, 144-158
- Folkman J., Shing Y. (1992b) Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 10931-10934

-
- Folkman J. (1995a) Angiogenesis in cancer, vascular rheumatoid and other disease. *Nature Medicine*, 1: 27-31
- Folkman J., Flier J.S., Underhill L.H., (1995b) Clinical applications of Research on Angiogenesis. *New England Journal of Medicine*, 333(26): 1757-1763
- Forastiere A., Orringer M., Perez-Tamayo C., Urba S.G. (1993) Preoperative chemoradiation followed by transhiatal esophagectomy for carcinoma of the esophagus. *Journal of Clinical Oncology*, 11: 1118-1123
- Gaffey M.J., Mills S.M., Swanson P.E., Zarbo R.J., Shah A.R., Wick M.R. (1992) Immunoreactive for BER-EP4 in adenocarcinomas, adenomatoid tumors, and malignant mesothelioma. *American Journal of Surgical Pathology*, 16(6): 593-599
- Hanahan D., Folkman J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86: 353-364
- Harris A.L. (1998) Commentary: Are angiostatin and endostatin cures for cancer? *Lancet*, 351: 1598-1599
- Hobson B., Denekamp J. (1984) Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continue labelling studies. *British Journal of Cancer*, 49(4): 405-413
- Horak E. R., Leek R., Klenk N., LeJeune S., Smith K., Stuart N., Greenall M., Stepniewska N., Harris A.L. (1992) Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet*, 340(7): 1120-1124
- Huang Y., Boynton R.F., Blount P.L., Silverstein R.J., Yin J., Tong Y., McDaniel T.K., Newkirk C., Resau J.H., Sridhara R. (1992) Loss of heterozygosity involves multiple tumor suppressor genes in human oesophageal cancers. *Cancer Research*, 52 (23): 6525-6530
- Ingberg D.E. (1990) Fibronectin controls capillary endothelial cell growth by modulating cell shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 3579-3583
- Inoue K., Ozeki Y., Suganuma T., Sugiura Y., Tanaka S. (1997) VEGF expression in primary oesophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*, 79(2): 206-213

-
- Irland A.P., Peters J.H., Smyrk T.C., DeMester T., Clark G.W.B., Mirvish S.S., Adrian E. (1996) Gastric juice protects against the development of Oesophageal adenocarcinoma in the Rat. *Annals of Surgery* 224(3): 358-371
- Isono K., Sato H., Nakayama K. (1991a) Results of Nation wide Study on threefield Lymphnode Dissection of oesophageal Cancer. *Oncology*, 48: 411-420
- Isono K., Onoda S., Ishikawa T., Sato H., Nakayama K. (1991b) Studies on the cause of death from oesophageal cancer. *Cancer*, 49: 2173-2179
- Izbicki J.R., Hosch S., Pichelmaier U., Rehders A., Busch C., Niendorf A., Passlick B., Broelsch C.E., Pantel K. (1997) Prognostic value of immunohistchemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected oesophageal cancer. *New England Journal of Medicine*, 337(17): 1188-1194
- Japanese Committee for Registration of Oesophageal carcinoma (1985) A proposal for a new TNM classification of Oesophageal cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 14: 625-636
- Jeltsch M., Kaipainen A., Joukov V., Meng X., Lasko M., Rauvala H., Swartz M., Fukurama D., Jain R.K., Alitalo K., (1997) Hyperplasia of Lymphatic Vessel in VEGF-C Transgenic Mice. *Science*, 276: 1423-1425
- Junginger T., Dutowski P. (1996) Selectiv approach to the treatment of oesophageal cancer. *British Journal of Surgery*, 83: 1473-1477
- Takeji Y., Maehara Y., Shibahara K., Hasuda S., Tokunaga E., Oki E., Sugimachi K. (1999) Clinical significance of micrometastasis in bone marrow of patients with gastric cancer and its relation to angiogenesis. *Gastric Cancer*, 21(1): 46-51
- Kanai T, Konno H., Tanaka T., Baba M., Matsumoto K., Nakamura S., Yukita A. - (1998) Anti-tumor and anti-metastatic effects of human vascular-endothelial-growth factor-neutralizing antibody on human colon and gastric carcinoma xenotransplanted orthotopically into nude mice. *Int. Journal of Cancer*, 77: 933-936
- Kang S.-M., Maeda K., Onoda N., Chung Y.-S., Nakata B., Nishiguchi N., Sowa M. (1997) Combined analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in colorectal carcinoma for determination of tumor vascularity and liver metastasis. *Int. Journal of Cancer*, 74: 502-507

-
- Kanno S., Oda N., Abe M., Terai Y., Ito M., Shitara K., Tabayashi K., Shibuya M., Sato Y.(2000) Roles of VEGF receptors FLT-1 and KDR, in signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene*, 19: 2138-2146
- Kato H., Tachimori Y., Watamabe H., Iizuka T., Terui S., Tabashi M., Hirota T. (1991) Lymphnode metastasis in thoracic oesophageal carcinoma. *Journal of Surgery Oncol.*, 48: 106-111
- Keck .P.J., Hauser S.D., Krivi G., Feder J., Connolly D.T. (1989) VPF an endothelial cell mitogene related to PDGF. *Science*, 249: 1309-1312
- Keshet E. (2000) Ischemia driven Angiogenesis
- Kilic N., Fiedler W., Holstein A.F., Ergün S. (1997) Expression of VEGF and its receptors and capillarydensity in Leydig cell tumors of the human testis. *Adv. Exp. Med. Biology*, 424: 181-182
- Kim K.J., Li B., Winer J., Armanini M., Gillett D., Phillips H.S., Ferrara N., (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, 362(29): 841-844
- Kirsch M., Schackert G., McL.Black P. (2000) Anti-angiogenic treatment strategies for malignant brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology*, 50:148-163
- Lagergren J., Bergström R., Lindgren A., Nyrén O., (1999) Symptomatic gastro-oesophageal reflux as a risk factor of oesophageal adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine*, 340(18): 825-831
- Landriscina M., Cassano A., Ratto C., Longo R., Ippoliti M., Palazzotti B., Crucitti F., Barone C. (1998) Quantitative analysis of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in human colorectal. *British Journal of Cancer*, 78 (6): 765-770
- Latza U., Niedobitek G., Schwarting R., Nekarada H., Stein H., (1990) BER-EP4: new monoclonal antibody which distiguishes epithelia from mesothelia. *Journal of Clin. Pathology*, 43: 213-219
- Lerut T., De Leyn P., Coosemans W., van Raemdonck D., Scheys I., Le Saffre E. (1992) Surgical strategies in oesophageal carcinoma with emphasis on radical lymphadenectomy. *Annual Surgery*, 216: 583-590

-
- Leung D.W., Cachianes G., Kuang W.-J., Goeddel D.V., Ferrara N. (1989) VEGF is a secreted angiogenetic mitogen. *Science*, 249: 1306-1309
- Li J.Y., Chen Z.J., Wacholder S., Gou W., Li B., Blot W (1989) A case control study of cancer of the esophageus and gastric cardia in Linxian. *International Journal of Cancer*, 43: 755-761
- Lightdale C. J., (1992) Endoscopic Ultrasonography. *Gastro intest. Endoscopy Clin. of North Amerika* 2: 557-769
- Lindholm B., Tavelin B., Grankvist K., Henriksson R. (1998) Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 16(9): 3121-3128
- Lindmark G., Gerdin B., Sundberg G., Pahlman L., Bergström L., Glimelius B. (1996) Prognostic Significance of the Microvascular Count in Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 14(2): 461-466
- Ludwig breast cancer study group International breast cancer study group Ludwig (1990) Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastasis from breast cancers. *Lancet*, 335: 1565-1568
- Macchiarini P., Fontanini G., Hardin M.J., Squartini F., Angeletti C.A., (1992) Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet*, 340: 145-146
- Machein M.R Plate K.H. (2000) VEGF in brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology*, 50: 109-120
- Maeda T., Matsumura S., Hiranuma H., Jikko A., Furukawa S., Ishida T., Fuchihata H., (1998) Expression of vascular endothelial growth factor in human oral squamous cell carcinoma: its association with tumour progression and p53 gene status. *Journal of Clinical Pathology*, 51: 771-775
- Mandriota S.J., Jussila L., Jeltsch M., Compagni A., Beatens D., Prevo R., Banej S., Huarte J., Montesano R., Jackson D.G., Orci L., Alitalo K., Christofori G., Pepper M.S. (2001) Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO*, 20(4): 672-682

-
- McConnel C.O., Bouchier-Hayes D.J., Toomey D., Foley D., Kay E.W. (2003) Effect of neoadjuvant chemoradiotherapy on angiogenesis in oesophageal cancer. *British Journal of Surgery*, 90(11): 1373-1378
- Melnyk O., Shuman M. A., Kim K.J. (1996) Vascular endothelial growth factor promotes tumor dissemination by a mechanism distinct from its effect on primary tumor growth. *Cancer Research*, 56 (15): 921-924
- Mervish S. (1992) Nitrosamine action and metabolism in the rat and human oesophagus in relation to the aetiology of squamous and adenocarcinoma of the oesophagus. *Internat. Congress of Esophageus St. Margherita Liguria Italy*
- Millauer B., Witzigmann-Voss S., Schnürc H., Martinez R., Moller N. P. H., Risau W., Ullrich A. (1993) High Affinity VEGF binding and Developmental expression suggest flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*, 72(26): 835-846
- Miller J.W., Adamis A. P., Shima D.T., D'Amor P. A., Moulton R.S., O'Reilly M.S., Folkman J., Dvorak H.F., Brown L.F., Berse B., Yeo T.-K. (1994) Vascular endothelial growth factor /Vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am. Journal of Pathology*, 145: 574-584
- Moriyama T., Kataoka H., Hamasuna R., Yokogami K., Uehara H., Kawano H., Goya T., Tsubouchi H., Kono M., Wakisaka S. (1998) Up-regulation of VEGF induced by hepatocyte Growth factor/ Scatter factor Stimulation in human glioma cells. *Biochemistry and Biophysics Research Communication*, 249: 73-77
- Nakata S., Ito K., Fujimori M., Shingu K., Kajikawa S., Adachi W., Matsuyama I., Tsuchiyas., Kuwano M., Amano J. (1998) Involvement of Vascular endothelial growth factor and urokinase-type Plasminogen activator Receptor in microvessel invasion in human colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 79: 179-186
- Natsugoe S., Mueller J., Stein H.J., Feith M., Höfler H., Siewert J.R. (1998) Micrometastasis and tumor cell microinvolvement of lymph nodes from oesophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*, 83(5): 858-866

-
- Nehls V., Drenckhahn D. (1990) Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type α -actin. *Journal of Cell Biology*, 113: 147-154
- O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y, Chen C., Rosenthal R.A., Moses M., Lane W.S., Cao Y., Sage E.H., Folkman J. (1994) Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 79: 315-328
- Oehler M. K., Bicknell R. (2000) The promise of anti-angiogenic cancer therapy. *British Journal of Cancer* 82 (4): 749-752
- Ohta Y., Nozawa H., Tanaka Y., Oda M., Watanabe Y. (2000) Increase VEGF and VEGF-C and decreased NM23 expression associated with microdissemination in the lymph nodes in stage 1 non-small lung cancer. *Journal for Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 119(4): 804-813
- Ohta Y., Watanabe Y., Murakami S, Oda M., Hayashi Y., Nonomura A., Endo Y., Sasaki T. (1997) Vascular endothelial growth factor and lymph node metastasis in primary lung cancer. *British Journal of Cancer*, 76(8): 1041-1045
- Onogawa S., Kitadai Y., Tanaka S., Kuwai T., Kimura S., Chayama K. (2004) Expression of VEGF-C and VEGF-D at the invasive edge correlates with lymph node metastasis and prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Science*, 95(1): 32-39
- Orringer M.B. (1984) Transhiatal oesophagectomy without thoracotomy for carcinoma of the thoracic oesophagus. *Am. Surgery*, 200: 282-288
- Orringer M.B., Marshall B., Iannettoni M.D. (1999) Transhiatal oesophagectomy: clinical experience and refinements. *Annals of Surgery*, 230(3): 392-403
- Paget S., (1889) Distribution of secondary growth in Cancer of the Breast. *Lancet*, 23: 571-57
- Pantel K., Izbicki J.R., Angstwurm M., Braun S., Passlick B., Kargo O., Thetter O., Riethmüller G. (1993a) Immunocytochemical detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer. *Cancer Research*, 53: 1027-1031

-
- Pantel K., Schlimok G., Braun S. (1993b) Differential expression of proliferation associated molecules in individual carcinoma cells. *Journal of Natl. Cancer Institute*, 85: 1419-1423
- Pantel K., Dickmanns A., Zippelius A., Klein S., Shi J., Hechtlen-Vollmar W., Schlimock G., Weckerman D., Oberneder R., Fanning E., Riethmüller G. (1995) Establishment of micrometastatic carcinoma cell lines: a novel source of tumor cell vaccines. *J. Natl. Cancer Inst*, 85: 1419-1423
- Parums D.V., Cordell J.L., Micklem K., Heryet A.R., Gatter K.C., Mason D.Y. (1990) JC70: An new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *Journal of Clinical Pathology*, 43: 752-757
- Passlick B., Izbicki J.R., Kubuschok B., Nathrath W. (1994) Immunohistochemical assessment of individual tumor cells in lymph nodes of patients with non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 12: 1827-1832
- Patti M.G., Owen D. (1997) Prognostic factors in oesophageal cancer. *Surgery Oncol. Clinics of North America*, 6(3): 515-531
- Philips P. (1998) Cancer experts offer healthy dose of scepticism toward hype over Antiangiogenes agents. *JAMA*, 279 (24): 1936-1937
- Plate K.H., Breier G., Weich H.A., Risau W. (1992) VEGF: is a potential tumor angiogenesis factor in vivo. *Nature*, 359: 845-847
- Ponnazhagan S., Mahendra G., Kumar S., Shaw D.R., Stockard C.R., Meleth S. (2004) Adeno-Associated Virus 2-mediated antiangiogenic Cancer Long Term Efficacy of a Vector Encoding Angiostatin a single Factor. *Cancer Research*, 64(5): 1781-1787
- Rice T.W., Adelstein D.J., Chidel M.A., Rybicki L.A., DeCamp M.M., Blackstone E.H. (2003) Benefit of postoperative adjuvant chemoradiotherapy in local advanced esophageal carcinoma. *Journal of Thorac. Cardiovascular Surgery*, 126(5): 1590-1596
- Roder J.D., Busch R., Stein H.J., Fink U., Siewert J.R. (1994) Ratio of invaded to removed lymphnodes as a predictor of survival in squamous cell carcinoma of the esophagus. *British Journal of Surgery*, 81: 410-413

-
- Saito H., Tsumjitami S., Kondo A., Ikeguchi M., Maeta M., Kaibara N. (1999) Expression of vascular endothelial growth factor correlates with haematogenous recurrence in gastric carcinoma. *Surgery*, 125: 195-201
- Sakata K (1903) Über die Lymphhgefäße des Ösophagus und über seine regionären Lymphdrüsen mit Berücksichtigung der Verbreitung des Karzinom's. *Mitt. Grenzgeb. Med. Chirurgie*, 11: 634-636
- Salven P., Lymboussaki A., Heikkila P., Jääskela-Saari H., Enholm B., Aase K., von Euler G, ErikssonU., Alitalo K., Joensuu H. (1998) Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *American Journal of Pathol*, 153(1): 103-108
- Sandison J. C. (1932) Contraction of blood vessels and observations on the circulation in the transparent chamber in the rabbit's ear. *Anatomical Record*, 54(1): 105-127
- Schlemper R.J., Dawsey M. S., Itabashi M., Iwashita A., Kato Y., Koike M., Lewin K.J., Riddell R.H., Shimoda T., Sipponen P., Stolte M., Watanabe H. (2000) Differences in diagnostic criteria for oesophageal squamous cell carcinoma between japanese and western pathologists. *Cancer*, 88(5): 996-1006
- Schmidt R., Thews G. (1997) *Physiologie des Menschen*. 27.Auflage Springer
- Schneider P.M., Casson A. G., Levin B., Garewal H.S., Hoelscher A.H., Becker K., Dittler H.J., Cleary K. R., Troster M., Siewert J.R., Roth J.A. (1996) Mutation of p53 in Barrett's esophagus and Barrett's cancer a prospective study of ninety-eight cases. *Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery*, 111: 323-333
- Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M., Perruzzi C.A., Harvey V.S., Dvorak H.F (1983) Tumor cells secrete a Vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219: 983-985
- Senger D.R., Perruzzi C.A., Feder J., Dvorak H.F. (1986) A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Research*, 46: 5629-5632
- Senger D.R., Ledbetter S.R., Claffey K.P., Papadopoulos-Sergiou A., Perruzzi C.A., Detmar M. (1996) Stimulation of Endothelial Cell Migration by Vascular Permeability Factor /Vascular Endothelial Growth Factor through Cooperative

-
- Mechanisms Involving the $\alpha_v\beta_3$ Integrin, Osteopoetin and Thrombin. *American Journal of Pathology*, 149(1): 293-305
- Shibuya M. (2003) Vascular endothelial growth factor receptor –2: its unique signaling and specific ligand VEGF-E. *Cancer Science*, 94(9): 751-756
- Shimada H., Takeda A., Nabeya Y., Okazumi S., Matsubara H., Funami Y., Hayashi H., Gunji Y., Kobayashi S., Suzuki T., Ochiai T. (2001) Clinical significance of serum VEGF in oesophageal Squamous cell carcinoma. *Cancer*, 92(3): 663-668
- Shing Y., Folkman J., Sullivan R., Butterfield C., Murray J., Klagsburn M. (1984) Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science*, 223: 1296-1299
- Siewert J.R., Harder F., Rothmund M. (2001) *Praxis der Visceral Chirurgie, Onkologische Chirurgie* Springer 2001
- Skinner D.B. (1983) En bloc resection for neoplasm of oesophagus und cardia.. *Journal of Thorac. Cardiovasc. Surgery*, 85: 59-71
- Slater M.S., Holland J., Faigel D.O., Sheppard B.C., Deveny C.W. (2001) Does neoadjuvant chemoradiation downstage oesophageal cacinoma?. *The American Journal of Surgery* 181: 440-444
- Smith-McCune K.K., Weidner N. (1994) Demonstration and Characterization of the Angiogenetic Properties of Cervical Dysplasia. *Cancer Research*, 54(1): 800-804
- Spechler S.J., Goya R.K. (1996) The columnar-lined esophagus, intestinal metaplasia and Norman Barrett. *Gastroenterology*, 110: 614-621
- Steinmetz K.A., Potter J.D. (1991) Vegetables, Fruits and Cancer. *Cancer Causes Control*, 2: 325-357
- Sun J., Paddock C., Shubert J., Zhang H.B., Amin K., Newman P.J., Albelda S.M. (2000) Contributons of the extracellular and cytoplasmic domains of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) in regulation cell-cell localization. *Journal of Cell Science*, 113: 1459-1469
- Takahashi Y., Cleary K.R., Mai M., Kitadai Y., Bucana C.D., Ellis L.M. (1996) Significance of Vessel Count and Vascular Endothelial Growth Factor and its Receptor (KDR) in Intestinal-type Gastric Cancer. *Clinical Cancer Research*, 2: 16679-1684

-
- Takahashi Y., Tucker S. L., Kitadai Y., Koura A.N., Bucana C.D., Cleary K.R., Ellis L.M. (1997) Vessel counts and Expression of Vascular Endothelial Growth Factor as Prognostic Factors in Node-Negative Colon Cancer. *Archiv of Surgery*, 132: 541-546
- Takahashi Y., Bucana C.D., Akagi y., Liu W., Cleary K.R., Mai M., Ellis L.M., (1998a) Significance of Platelet-derived Endothelial Cell Growth Factor in the Angiogenesis of Human Gastric Cancer. *Clinical Cancer Research* 4: 429-434
- Takahashi Y., Bucana C.D., Cleary K.R., Ellis L.M., (1998b) P53, Vessel count, and vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer. *International Journal of Cancer* 79: 34-38
- Tanigawa N., Matsumura M., Amaya H., Kitaoka A., Shimomatsuya T., Lu C., Muraoka R., Tanaka T. (1997) Tumor vascularity correlates with the prognosis of patients with oesophagus squamous cell carcinoma. *Cancer*, 79(2): 220-225
- Thorban S., Roder J.D., Nekarda H., Funk A., SiewertJ.R., Pantel K., (1996) Immunocytochemical detection of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with oesophageal carcinoma. *Journal of National Cancer Institute*, 88(17): 1222-1227
- Uchida S., Shimada Y., Watanabe G., Tanaka H., Shibagaki I., Miyahara T., Ishigami,S., Arii S., Imamura M., (1998) In oesophageal squamous cell carcinoma vascular endothelial growth factor is associated with p53 mutation, advanced stage and poor prognosis. *British Journal of Cancer*, 77 (10): 1704-1709
- Underinger T.L., Ruggeri B., Gingrich D.E. (2004) Development of vascularendotheleial greowth factor receptor (VEGFR) kinase inhibitors as anti-anigosgenic agents in cancer therapy. *Current medical Chemistry*, 11(6): 731-745
- Vermeulen P.B., Roland L., Mertens V., Van Marck E., DeBruijn E.A., Van Oosterom A.T., Dirix L.Y. (1996) Correlation of Intramural -microvessel Density and p53 Protein Overexpression in Human Colorectal Adenocarcinoma. *Microvascular Research*, 51: 164-174

-
- Vlodavsky I., Bahkin P., Korner G., Bar-Shavit R., Fuks Z., (1990) Extracellular matrixresident growth factors and enzymes: relevance to angiogenesis and metastasis. Proc. Am. Ass. Cancer Res., 31: 491-493
- Wadman M. (1998) Cancer cure article stirs up hot debate. Nature 393: 104-105
- Weidner N.,Semple J.P., Welch W.R., Folkman J. (1991) Tumor angiogenesis an metastasis – Correlation in invasive breast carcinoma. New England Journal of Medicine, 324(3): 1-8
- Yamaguchi R., Yano H., Iemura A., Ogasawara S., Haramaki M., Kojiro M. (1998) Expression of VEGF in Human hepatocellular Carcinoma. Hepatology, 28: 68-77

7. Danksagung

An Herrn Prof. Dr. med. W.T. Knoefel geht mein ergebener Dank für die Ermöglichung dieser Arbeit durch Bereitstellung der Materialien und Nutzung der Möglichkeiten des Instituts.

Herr PD Dr. med. S. B. Hosch möchte ich für die konstruktive Begleitung und Hilfe bei der Erstellung der Arbeit danken.

Bei Herrn Dr. med. Alexander Rehders möchte ich mich für die geduldige, lang währende Betreuung und konstruktive Kritik bei der technischen Arbeit und Hilfe in der Ausarbeit/Auswertung recht herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. S. Ergün vom Anatomischen Institut Hamburg möchte ich danken für die freundliche Hilfe und Abteilung übergreifender Zusammenarbeit besonders im Bereich der Immunhistochemie.

Frau Franziska Stern und Silke Behrens möchte ich für die technische Hilfe und Unterstützung in allen Fragen der Arbeit im Labor und Ihrer Geduld danken.

Meiner Mutter Frau Veronika Diercks möchte ich ganz herzlich für Korrektur und konstruktive Kritik im Erstellen der schriftlichen Arbeit danken. Meinen Eltern gemeinsam möchte ich danken für eine immerwährende Unterstützung in meinem Studium und Leben.

Meinem Ehemann Herrn Noaya Koseki möchte ich für die Bereitstellung von Hart- und Software sowie eine immerwährende liebevolle Unterstützung bedanken.

Bei meinen Freunden Ute Sachse, Heiko Zade möchte ich Dank aussprechen für Korrektur, EDV-Support und die seelische Unterstützung während der langwierigen Zeit.

8. Lebenslauf

Jana-Christiane Koseki geb. Diercks

5. August 1975	in Hamburg geboren.
1982-1986	Besuch der Grundschule Wolfgang Borchert, Hamburg
1986-1995	Besuch des Heilwig Gymnasiums, Hamburg
1992-1996	Ausbildung zur Chemisch Technischen Assistentin (Altonaer Gymnasium/Berufsschule Bergedorf, Hamburg)
1996-2002	Medizinstudium in Hamburg
04/1998	Physikum
04/1999	1. Staatsexamen
09/2001	2. Staatsexamen
10/2002	3. Staatsexamen
10/2001-10/2002	Absolvierung meines praktischen Jahres Hals-Nasen-Ohren Heilkunde (Allgemeines Krankenhaus Altona, Hamburg), Inneren Medizin (Israelitischen Krankenhaus, Hamburg), Chirurgie (Stadtspital Triemli, Schweiz)
11/2002-11/2003	Forschung an der Harvard Medical School (Boston, MA USA)
15. Juli 2005	geheiratet in Hamburg
03/2004-08/2005	Ärztin im Praktikum / Assistenzärztin Chirurgie (Paracelsusklinik Kaltenkirchen, Schleswig-Holstein)
Seit 01/2006	Assistenzärztin in Weiterbildung in der Klinik für Phoniatrie und Pädaudiologie am Klinikum der Johann-Wolfgang Goethe Univeristät Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, den 01. Januar 2007

9. Erklärung

Diese Arbeit wurde von Mai 1998 bis September 2005 in der Abteilung für Allgemeinchirurgie an der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf und der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. W.T. Knoefel und Herrn PD Dr. med. S. Hosch durchgeführt.

Ich versichere ausdrücklich, dass die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlichen oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erschienenes) Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Frankfurt am Main, den 01. Januar 2007