

**Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. H. Riedmiller**

**Prognostische Bedeutung der  
Vascular Endothelial Cell Growth Factor (VEGF)-  
Immunreaktivität beim Nierenzell-Carcinom**

**Inaugural-Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von**

**Birgit Kruchten**

**aus**

**Idar-Oberstein**

**Würzburg, im September 2001**

Referent: Prof. Dr. med. Hubertus Riedmiller  
Korreferent: Prof. Dr. med. Alexander Marx  
Dekan: Prof. Dr. med. Volker ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 11.01.2001

Die Promovendin ist Ärztin

für Henny und Roman

Die Wissenschaft, richtig verstanden, heilt den Menschen von seinem Stolz;  
denn sie zeigt ihm seine Grenzen. (Albert Schweitzer 1875 - 1965)

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1	Nierenzellkarzinom	7
1.2	Angiogenese und Tumorangiogenese	10
1.3	VEGF- ein multifunktionales angiogenetisches Cytokin	13
1.4	Die Rolle von VEGF außerhalb von Neoplasien	16
<b>2.</b>	<b>Fragestellung und Ziel der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
3.1	Patienten	21
3.2	Statistische Analyse	21
3.2.1	Univariate Prognoseanalyse:	23
3.2.2	Bivariate Statistik von VEGF	24
3.2.3	Grundlagen der multivariaten Prognoseanalyse	24
3.2.4	Prognoseindizes	25
3.3	Follow-up	28
3.4	Klinische Stadieneinteilung und Histopathologie	29
3.5	Herstellung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte	34
3.5.1	Allgemeines über Antikörper	34
3.5.2	Avidin-Biotin-Methode	34
3.5.3	Technik der Antikörpermarkierung	36
3.5.4	Mikroskopisches Auszählen der Präparate	37
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
4.1	Statistische Analyse	39
4.1.1	Univariate Analyse	39
4.1.1.1	T-Stadium	39
4.1.1.2	Malignitätsgrad (Grading)	41
4.1.1.3	VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	43
4.1.2	Bivariate Prognose	46
4.1.3	Multivariate Prognoseanalyse	49
4.1.3.1	T-Stadium und Grading	49
4.1.3.2	T-Stadium und VEGF	50
4.1.3.3	Grading und VEGF	51
4.1.3.4	T-Stadium, Grading und VEGF	53
4.1.4	Prognoseindizes für Überleben und Rezidiv	54
4.1.4.1	Überlebensprognose-Index T-Stadium / Grading	55
4.1.4.2	Überlebensprognose-Index T-Stadium / Grading / VEGF	56

4.1.4.3	Rezidiv-Prognose-Index T-Stadium / Grading	57
4.1.4.4	Rezidiv-Prognose-Index T-Stadium / Grading / VEGF	58
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
5.1	Tumorstadium als Prognosefaktor	59
5.2	Grading als Prognosefaktor	61
5.3	VEGF als Prognosefaktor	62
5.4	Klinische Relevanz verbesserter Prognosekriterien	68
5.5	Therapeutische Ansätze	68
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<b>7.</b>	<b>Literatur</b>	<b>72</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Typen des Nierenzellkarzinoms und des Onkozytom in phänotypischer Beziehung zum Nephron/Sammelrohr-System _____	8
Abb. 2: Einflussfaktoren auf die Expression von VEGF _____	12
Abb. 3: VEGF und VEGF-Rezeptoren Flt-1 (VEGFR-1) und Flk-1/KDR (VEGFR-2) _____	15
Abb. 4: Altersverteilung der Patienten, die zwischen Februar 1985 und Dezember 1994 an der Urologischen Klinik der Universität Würzburg tumornephrektomiert wurden. _____	23
Abb. 5: ROC Kurven Überlebenszeiten _____	26
Abb. 6: ROC Kurven Rezidiv _____	27
Abb. 7: Verteilung der Nachbeobachtungszeiten nach vorangegangener Tumornephrektomie _____	28
Abb. 8: Zeitintervall bis zum Auftreten eines Rezidives. _____	29
Abb. 9: Schematische Darstellung der unterschiedlichen T-Stadien gemäß der UICC-Klassifikation von 1990, die Einteilung der pT-Stadien erfolgt analog der Einteilung der T-Stadien (Spiessl 1990). _____	30
Abb. 10: Schematische Darstellung der unterschiedlichen N-Stadien gemäß der UICC-Klassifikation von 1990, die Einteilung der pN-Stadien erfolgt analog der Einteilung der N-Stadien (Spiessl 1990). _____	31
Abb. 11: Schematische Darstellung der Avidin/Biotin-Methoden: vorgeformte Avidin-Biotin-Enzymkomplexe (ABC) oder enzymmarkiertes Avidin (LAB) reagieren mit biotinylierten Sekundärantikörpern. (Naish 1989). _____	35
Abb. 12: Representatives Tumorareal bei 375-facher Vergrößerung, im gekennzeichneten Bereich zeigt sich eine hohe VEGF-Expression im Cytoplasma. _____	38
Abb. 13: Verteilung der Tumorstadien gemäß der Klassifikation der UICC von 1990 (Spiessl 1990). _____	39
Abb. 14: Überlebensrate als Funktion der Zeit, bezogen auf das T-Stadium gemäß UICC von 1990, Tarone Test $p = 0,0026^{**}$ _____	40
Abb. 15: Rezidivfreie Patienten als Funktion der Zeit ,bezogen auf T-Stadium. Tarone Test $p = 0,000010^{***}$ _____	41
Abb. 16: Überlebensrate als Funktion der Zeit, bezogen auf Grading. Tarone Test $p = 0,0039^{**}$ _____	42
Abb. 17: Rezidivfreie Patienten als Funktion der Zeit ,bezogen auf Grading. Tarone Test $p = 0,000018^{***}$ _____	42
Abb. 18: Überlebensrate als Funktion der Zeit, bezogen auf VEGF Klassen mit point of cut = 20 Log rank Test $p = 0,0039^{**}$ _____	44
Abb. 19: Rezidivfreie Patienten als Funktion der Zeit, bezogen auf VEGF-Klassen mit point of cut = 20, Log rank Test $p = 0,000070^{***}$ _____	44
Abb. 20: VEGF und Tumorstadium gemäß UICC; Kruskal-Wallis Test: $p < 0,05$ _____	47

Abb. 21: VEGF und Grading; Kruskal-Wallis Test: $p < 0,05$	47
Abb. 22: VEGF und TumorgroÙe; Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,01$	48
Abb. 23: VEGF und Auftreten eines Tumorrezidives im Verlauf; Mann-Whitney Test: $p < 0,01$	48
Abb. 24: VEGF und Todesursache; Mann-Whitney-Test: $p < 0,05$	49
Abb. 25: Überlebensrate als Funktion der Zeit, bezogen auf den Überlebens-Prognose-Index von T-Stadium und Grading	55
Abb. 26: Überlebensrate als Funktion der Zeit, bezogen auf den Überlebens-Prognose-Index von T-Stadium Grading und VEGF	56
Abb. 27: Überlebensrate als Funktion der Zeit, bezogen auf den Rezidiv-Prognose-Index von T-Stadium und Grading	57
Abb. 28: Überlebensrate als Funktion der Zeit, bezogen auf den Rezidiv-Prognose-Index von T-Stadium, Grading und VEGF	58

# 1. Einleitung

Einen Großteil der Arbeiten über das Nierenzellkarzinom stellen Studien über neue prognostische Daten und neue mögliche Therapieansätze neben den bisher standardisierten Behandlungsmöglichkeiten dar.

Anhand der etablierten Parameter Tumorstadium und Malignitätsgrad des Tumors läßt sich die Prognose des erkrankten Patienten nicht ausreichend genau abschätzen. Vielfach treten Fälle mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen bei identischem Tumorstadium und identischem Malignitätsgrad aus bislang nicht geklärten Gründen auf. Es gilt abzuwägen, welchen Patienten beispielsweise die relevanten Nebenwirkungen adjuvanter Therapien zugemutet werden muß und welchen Patienten dies möglicherweise erspart werden kann.

## **1.1 Nierenzellkarzinom**

Das Nierenzellkarzinom stellt mit 85% die häufigste primär renale Neoplasie dar. Sein Anteil an allen bösartigen Erkrankungen des Menschen beträgt 3%. Die höchste Inzidenz liegt zwischen dem 55. und 60. Lebensjahr. Männer und Frauen sind im Verhältnis 2:1 betroffen (Rübben 1994).

Histomorphologisch lassen sich die epithelialen Tumore des Nierenparenchyms in mehrere Untergruppen einteilen. Das klarzellige Nierenzellkarzinom stellt mit einer relativen Häufigkeit von 79% den häufigsten Phänotyp dar. Ihm folgen das chromophile Nierenzellkarzinom mit 10%, das chromophobe Nierenzellkarzinom und das Onkozytom mit je 5% sowie das Duct-Bellini-Karzinom mit einer Häufigkeit von 1%. Entstehungsort der Nierenzellkarzinome sind die Epithelien des proximalen Konvolutes für klarzellige und chromophile Karzinome, die distalen Tubuli für die chromophoben Karzinome. Das relativ seltene Duct-Bellini-Karzinom und das Onkozytom entstehen im Sammelrohrsystem (Thoenes 1986).

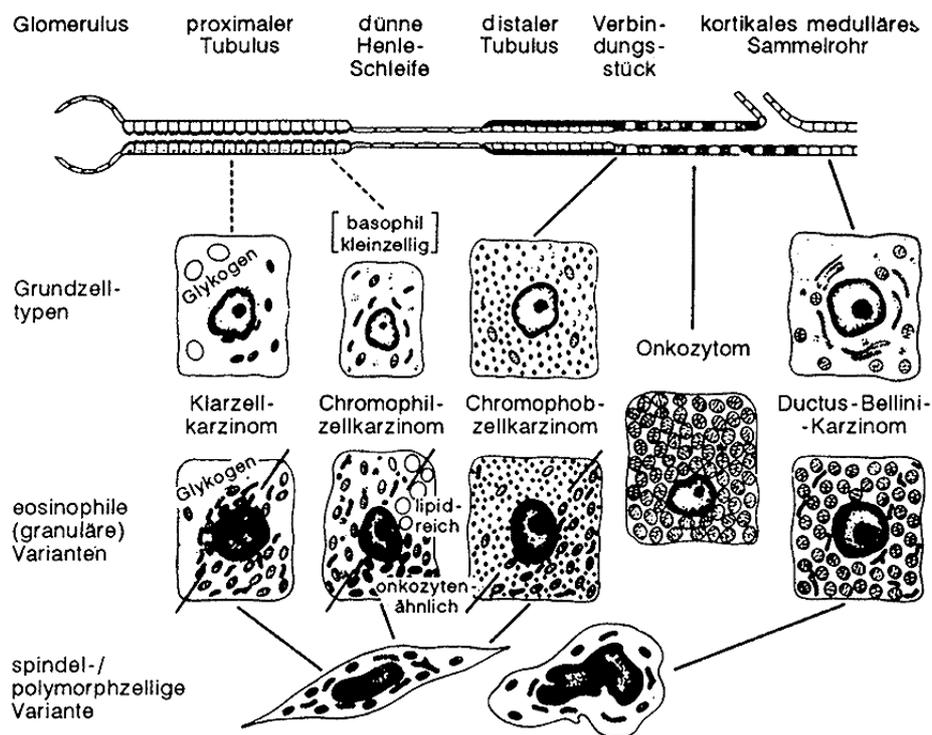


Abb. 1: Typen des Nierenzellkarzinoms und das Onkozytom in phänotypischer Beziehung zum Nephron/Sammelrohr-System (Thoenes and S.T. 1991).

Hereditäre Formen des Nierenzellkarzinoms treten beim von Hippel-Lindau-Syndrom zu einem hohen Prozentsatz auf (Hämangiome der Retina und des ZNS, autosomal dominant). Diese Nierenzellkarzinome sind im allgemeinen multifokal und bilateral. Der verantwortliche genetische Defekt stellt eine zyto-genetische Translokation der Chromosomen 3 und 8 sowie 3 und 11 dar (Malek and Omess 1987).

Die anatomische Ausdehnung eines Nierenzellkarzinoms wird nach den Krite-rien des TNM-Atlas der UICC (Union Internationale Contre le Cancer / Internati-onal Union Against Cancer) aus dem Jahr 1990 klassifiziert (Spiessl 1990). Diese ältere Klassifikation wurde verwendet, da eine direkte Überführung der bereits klassifizierten Tumore in das ab 1997 geänderte System nicht ohne Re-klassifikation am Originalpräparat möglich ist. Die Organpräparate standen je-

doch nicht mehr zur Verfügung, lediglich auf bereits zugeschnittene histologische Blockpräparate konnte zugegriffen werden.

In der Ära des diagnostischen Ultraschall werden die meisten Nierentumore in einem asymptomatischen Stadium als Zufallsbefunde entdeckt. Eine Diagnosestellung an Hand der klassischen Trias von Spätsymptomen, wie tastbarer Raumforderung, Hämaturie und Flankenschmerz erfolgt nur noch in 10% der Erkrankungsfälle. Unspezifische Symptome wie Gewichtsverlust und sub- bzw. febrile Temperaturen sollten ebenso wie tuberöse Sklerose und die von Hippel-Lindau-Erkrankung entsprechend abgeklärt werden.

Laborchemisches Leitsymptom in etwa 60% der Fälle ist die schmerzlose Makro- bzw. Mikrohämaturie. Zusätzlich ist die Blutkörperchengeschwindigkeit in etwa 50% der Erkrankungsfälle erhöht.

Infolge endokrinologischer Aktivität des Nierenzellkarzinoms können paraneoplastische Syndrome auftreten, wie Hypercalciämie, Erhöhung der alkalischen Phosphatase, der Glucagonkonzentration, des Parathormons, des Prolactins, des Alphafoetoprotein und des humanen Choriongonadotropin. Ein typischer Tumormarker für das Nierenzellkarzinom ist bisher nicht bekannt.

Die führende Untersuchung im Bereich der bildgebenden Verfahren stellt die Sonographie dar. Sie ist in der Lage Tumorgößen ab 2-3 cm Durchmesser zu verifizieren. Bis zu 85% können Tumore von zystischen Raumforderungen unterschieden werden. Ebenso können Metastasen ab 2,5 cm nachgewiesen werden, ferner Tumorthromben in der V. cava inferior bzw. in einer Nierenvene.

Das Ausscheidungsurogramm ist in seiner Sensibilität bei der Diagnosestellung einer parenchymatösen Raumforderung gering.

Die Computertomographie zeigt zusammen mit der Kernspintomographie die größte differentialdiagnostische Treffsicherheit der bildgebenden Verfahren. Ebenso können räumliche Tumorgöße, organübergreifendes Wachstum und die Beurteilung bezüglich der Metastasierung getroffen werden.

Die einzige kurative Therapie stellt die radikale Tumornephrektomie beim nicht metastasierenden Nierenzellkarzinom dar. Die Therapieergebnisse sind abhängig von der Ausdehnung des Primärtumors. Sicherheitsmaßnahmen zur Reduktion von Tumormaterialstreuung durch Manipulation am Tumor während der Op (Non-touch-Technik) stellen die frühzeitige Ligatur der A. u. V. renalis und die Entfernung des Präparates en block mit Tumorniere, Nebenniere und anhaftender Fettkapsel (Robson 1969) dar.

Sind Fernmetastasen nachgewiesen, ist die alleinige Tumornephrektomie nicht mehr grundsätzlich indiziert, außer bei vollständig resektabler Solitärmetastase und bei Patienten in gutem Allgemeinzustand (Dineen 1988).

In anderen Fällen stellt sich die Frage nach einer Kombination aus operativer Therapie mit einer adjuvanten Behandlungsform. Adjuvante Therapieversuche wurden mit Chemotherapie, Hormontherapie, in der Regel ein Antiöstrogenpräparat, und Immuntherapie geführt. Ausreichend etablierte und nebenwirkungsarme adjuvante Therapien des Nierenzellkarzinoms stehen zur Zeit nicht zur Verfügung (Goepel and Rübben 1991).

Aktuelle Berichte über eine Vaccination mit autologem Tumormaterial (Hybridzellen aus autologen Tumorzellen und allogenen Monozyten) zeigen allerdings ermutigende Kurzeitergebnisse. Diese müssen jedoch durch multizentrische Studien noch bestätigt werden. So konnten Kugler et al. bei metastasiertem Tumorleiden eine komplette Remission bei 23% der Patienten über einen Zeitraum von 13 Monaten erreichen, während 17% der Patienten im gleichen Zeitraum eine partielle Remission zeigen (Kugler 2000).

## **1.2 Angiogenese und Tumorangiogenese**

Das Wachstum aller solider Tumore und Metastasen ist abhängig von einer ausreichenden Versorgung mit Blutgefäßen. Ohne ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Metaboliten kann, ungeachtet der Heterogenität der unterschiedlichen Tumore, das Wachstum nicht mit der bekannten Geschwindigkeit erfolgen, da ausschließlich eine Versorgung über die langsame Diffusion im

Gewebe möglich ist. Folkman hat diese These bereits 1971 aufgestellt und sie wurde zwischenzeitlich mehrfach untermauert (Folkman 1971).

Die Tumorangiogenese ist ein multifaktoriell bedingter Prozeß, bei dem neben Angiogenesefaktoren auch andere Faktoren, wie extrazelluläre Matrixproteine und Zelladhäsionsmoleküle beteiligt sind.

Die Gefäßneubildung verläuft in mehreren Schritten, die über ein komplexes Wechselspiel Angiogenese stimulierender und Angiogenese inhibierender Faktoren gesteuert wird.

Zunächst erfolgt eine Aktivierung der dem Tumor benachbarten Endothelzellen. Dieses führt zur Gefäßdilataion und Permeabilitätserhöhung der betroffenen Gefäße (Folkman 1989).

Proteolytische Enzyme, teils vom Tumor, teils von Fibroblasten synthetisiert, verursachen die Zerstörung der kapillaren bzw. stromalen Basalmembran. Dies ermöglicht die Migration der Endothelzellen in Richtung des von den Tumorzellen induzierten angiogenen Stimulus. Es erfolgt dann eine 30 bis 40 fach erhöhte Proliferation gegenüber normalen Endothelien, gefolgt von der Bildung von Kapillaren zwischen benachbarten Migrationsgebieten (Folkman 1995).

In zahlreichen Studien wurde der Versuch unternommen den Zusammenhang zwischen Angiogenese, Tumorgröße und Metastasen bei menschlichen Karzinomen zu klären. Weidner zeigte die statistisch signifikante Korrelation zwischen der Inzidenz von Metastasen und der Gefäßdichte beim primären Mammakarzinom (Weidner 1992). Grischke konnte dopplersonographisch beim Mammakarzinom zeigen, daß der Blutfluß im Areal, das den malignen Tumor umgibt, signifikant höher war als in benignen Arealen (Grischke 1994). Die Quantifizierung der Mikrogefäße offenbarte, daß die Mikrogefäßdichte mit der Tumorgröße korreliert. Auch für das Prostatakarzinom konnte der gleiche Autor die Verbindung von Angiogenese zur Tumorgröße und zur Metastasierung aufzeigen (Weidner and Carroll 1993).

Unter den angiogenen Faktoren nimmt VEGF (**V**ascular **E**pithelial **G**rowth **F**actor) eine besondere Stellung ein, VEGF wird in nahezu allen soliden Tumoren gebildet. Neben einer Reihe von Faktoren, die die VEGF-Expression in kultivierten Zellen stimulieren, spielt die Hypoxie in den Tumorarealen eine herausragende Rolle bei der erhöhten VEGF-Expression (Marme 1996).

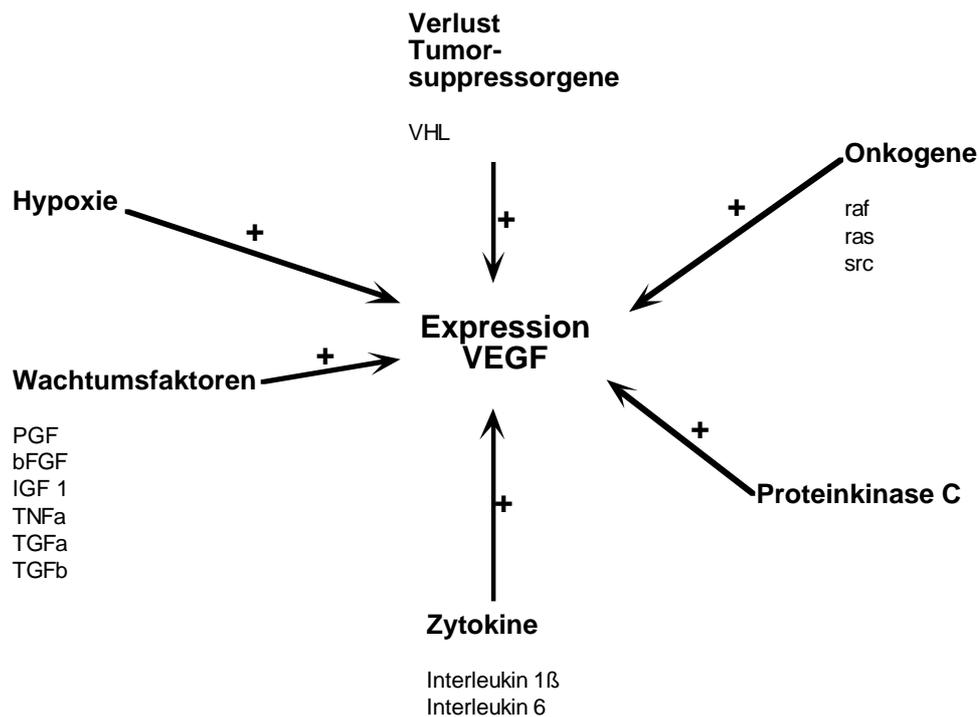


Abb. 2: Einflussfaktoren auf die Expression von VEGF

VEGF induziert das Sprossen von neuen Blutgefäßen und wirkt ausschließlich auf Gefäßendothelzellen. Die Rezeptoren für VEGF liegen in den Endothelzellen des normalen Gefäßsystems in niedriger Anzahl vor. Hingegen liegt eine Überexpression von VEGF-Rezeptoren in den penetrierenden Gefäßen von neoplastischem Gewebe vor. Eine Übersicht maligner Tumore, mit Überexpression von VEGF und seinen Rezeptoren sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Tumor	Quelle
Adenokarzinome des Gastrointestinaltrakts	Brown et al., 1993
Adenokarzinome des Pankreas	Brown et al., 1993
Mammakarzinome	Brown et al., 1993
Cervixkarzinome	(Guidi 1995)
Blasenkarzinome	Brown et al., 1993
Nierenzellkarzinome	Brown et al., 1993; Sato et al., 1994; Takahashi et al., 1994
Ovarialkarzinome	Olson et al., 1994
Hämangioblastome assoziiert mit von Hippel-Lindau-Syndrom	(Berkman 1993); (Morii 1993); (Brown 1995); (Wizigmann-Voos 1995)
Astrozytome	Plate et al., 1992, 1993, 1994; (Senger 1993); (Weindel 1994); (Samoto 1995)
Meningiome	(Berkman 1993);
Chorionkarzinome	(Charnok Jones 1993)
Maligne Melanome	(Vinores 1995)

Tab. 1: Maligne Tumore, mit Überexpression von VEGF und seinen Rezeptoren modifiziert n. Brown, 1997

### **1.3 VEGF - ein multifunktionales angiogenetisches Cytokin**

Die Entdeckung von VEGF im Jahr 1979 geht auf Dvorak (Dvorak 1995) und seine Mitarbeiter zurück, die mittels immunhistochemischen Untersuchungen eine hohe Fibrinkonzentration in Tumorgeweben außerhalb des Blutgefäßsystems feststellten.

Basierend auf seinen Ergebnissen postulierte er, daß Tumorzellen einen Faktor produzieren, welcher eine Hyperpermeabilität der Tumormikrogefäße z.B. für Fibrin, Albumin und andere Plasmaproteine verursacht. Ferner wurde nachgewiesen, daß VEGF nicht dialysierbar ist. Er wird nicht von Inhibitoren des Histamins, des Serotonins, und allgemeinen inflammatorischen Mediatoren beeinflusst, welche ebenso die Mikrogefäße bezüglich ihrer Permeabilität verändern.

VEGF wurde erstmalig in Tumorzellen des Guinea-schweines nachgewiesen. Beruhend auf den Ergebnissen der untersuchten DNA-Sequenzen von VEGF des Rindes, des Guinea-schweines, der Maus und des Menschen zeigt sich, daß VEGF ein disulfidgebundenen Dimer-Glykoprotein von MW 34 - 45 kD ist. Nach Reduktion zerfällt es in eine Bande von 17-23 kD und verliert seine gesamte biologische Aktivität. Es besitzt einen einzigen Ort der N-Glycosylierung, behält seine volle Aktivität jedoch nur ohne Glycosylierung (Brown and Detmar 1997).

Es existieren fünf verschiedene Isomere in den menschlichen Zellen. Die Polypeptide unterscheiden sich durch die Anzahl ihrer Aminosäuren: VEGF<sub>206</sub>, 189, 165, 145, 121. VEGF<sub>165</sub> ist die überwiegende Isoform in den meisten Systemen. Er ist zum Teil zellgebunden, zum Teil wird er sezerniert. Der zellgebundene Anteil kann durch Heparin freigegeben werden. Die Formen 189 und 165 von VEGF können ebenso durch Plasmin aus dem gebundenen Status in das biologisch aktive 34 kD Dimer freigegeben werden (Houck 1992). VEGF konnte ursprünglich aufgrund seiner Affinität zu Heparin gereinigt werden. Jedoch ist die Affinität deutlich geringer als zu den anderen typischen Heparin bindenden Wachstumsfaktoren wie z.B. FGF (Fibroblastenwachstumsfaktor). Schließlich haben Antikörper für die repräsentierenden Peptide des definierten Segmentes von VEGF zusätzliche Merkmale der VEGF-Struktur enthüllt (Sioussat 1993). Trotz signifikanter physikalischer Unterschiede besitzen die verschiedenen VEGF-Isoformen die gleiche biologische Aktivität. Der Anteil des Moleküls, welcher an den entsprechenden Rezeptor bindet ist bei allen Isoformen gleich. Sie sind daher alle in der Lage Endothelien anzuregen, unterscheiden sich jedoch in vivo hinsichtlich der Bioverfügbarkeit.

In vitro wurde die selektive Bindung von VEGF zu Endothelzellen 1991 von Olander demonstriert (Olander 1991). Der in vivo Nachweis bei Ratten erfolgte 1992 durch Jakeman (Jakeman 1992). Es existieren zwei Tyrosinkinase-Rezeptoren flt-1 und flk-1 für VEGF, welche selektiv von den Gefäßendothelien exprimiert werden. Die Rezeptoren sind charakterisiert durch eine extrazelluläre

Domäne (TM) mit sieben immunoglobulin-ähnlichen Domänen(Ig) und einer Kinase, die an dieser Sequenz ansetzt (De Vries 1992).

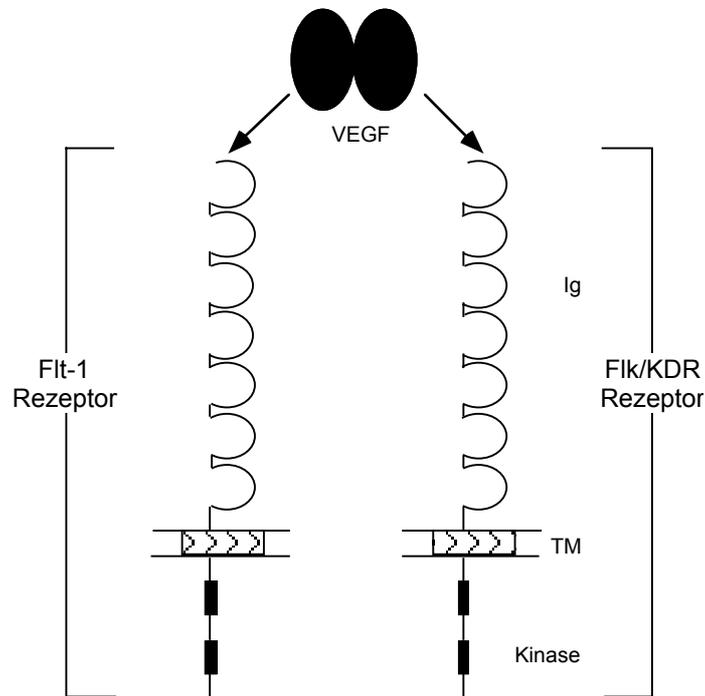


Abb. 3: VEGF und VEGF-Rezeptoren Flt-1 (VEGFR-1) und Fik-1/KDR (VEGFR-2)

Zelloberflächenassoziierte, mit Heparin verbundene Proteoglykane dürften die Bindung von VEGF an Endothelzellen unterstützen. Ebenso fördert exogenes Heparin eine solche Bindung. Auf der anderen Seite bindet der Serumprotease-Inhibitor Alpha-2-Makroglobulin an VEGF und inaktiviert ihn, ebenso wie andere Wachstumsfaktoren es auch tun.

Ein dritter, neu beschriebener VEGF-Rezeptor (VEGF-R3) wird verstärkt in Lymphgefäßen gebildet und scheint eine wesentliche Rolle bei der Lymphangiogenese zu spielen (Dreys 2000).

VEGF ist ein multifunktionales Cytokin, das eine Anzahl von direkten Effekten auf die Gefäßendothelzellen besitzt. VEGF induziert eine Sequenz von Proteinkinosphorilierungen, beginnend mit der Autophosphorilierung seiner beiden eigenen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Ionisiertes Calcium beginnt nach einer Ver-

zögerungsphase von ca. 15 Sekunden anzusteigen. Der VEGF-Effekt auf das Calcium in den Endothelzellen zeigt sich in einem nahezu 4-fachen Anstieg und ist mit anderen Endothelzellagonisten wie Thrombin und Histamin vergleichbar. Wie diese Agonisten induziert VEGF ebenfalls eine erhöhte Freigabe des von Willebrand-Faktors aus der Endothelzelle. VEGF wurde erstmalig durch seine Fähigkeit, die Permeabilität für Mikrogefäße zu erhöhen und somit Makromoleküle zirkulieren zu lassen, entdeckt. Es ist eine der wirksamsten gefäßpermeabilisierenden Substanzen, agierend in Konzentrationen unterhalb 1 nM mit einer mehr als 50.000 fach höheren Potenz, als die von Histamin. VEGF permeabilisiert eine Anzahl von Gefäßbetten, einschließlich das der Haut, des subcutanen Gewebes, der Peritonealwand, des Mesenteriums und des Diaphragmas. Der Gefäß-permeabilisierende Effekt ereignet sich rasch und wirkt offensichtlich in den wenigen Minuten der VEGF-Injektion. Die VEGF-Gefäßpermeabilisierung ist nicht durch Antihistaminika oder durch eine entzündungshemmende Substanz blockierbar. Neuere Studien haben gezeigt, daß VEGF die Gefäßpermeabilität in Tumorgefäßen primär durch eine Steigerung der Funktionsaktivität einer Organelle, der vesiko-vakuolären Organelle bzw. VVO, ansteigen läßt (Feng 1996).

#### ***1.4 Die Rolle von VEGF außerhalb von Neoplasien***

VEGF und seine Rezeptoren sind in einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Vorgängen involviert, wie Wundheilung, hypersensitive Reaktionen, rheumatoide Arthritis, Psoriasis, diabetische und andere Retinopathien sowie Reparatur von Ischämie- und Infarktgewebe.

Hierbei ist die Überexpression von VEGF und seinen Rezeptoren von einem Anstieg der mikrovaskulären Hyperpermeabilität begleitet. Folge ist eine Leckage für Plasmaproteine und eine Ablagerung von extravaskulärem Fibrinogen.

Die Wundheilung illustriert die geregelte Überexpression von VEGF (Brown 1992). So steigt innerhalb von 24 Stunden die VEGF mRNA Expression dramatisch in den Epidermalkeratozyten am Wundrand und in den verbliebenen

Haarfollikeln am Wundgrund. Die VEGF-Expression erreicht ihre Spitze am 2. – 3. Tag und persistiert auf einem erhöhtem Level für circa eine Woche. Diese Zeit wird für die Bildung von Granulationsgewebe und die Keratozytenmigration zur Wunddefektdeckung benötigt. Mononukleoläre Zellen, eine Subpopulation von Makrophagen, infiltrieren die Haut und bewirken einen VEGF-Anstieg. Der Anstieg von VEGF-Rezeptoren-mRNA wurde in den Endothelzellen der neuen Blutgefäße festgestellt, die einen Entwicklungsschritt zum Granulationsgewebe im Prozeß der Wundheilung darstellen (Li 1996).

Bei kongenital an Diabetes mellituserkrankten Mäusen stellte man nach Verletzung der Haut einen erhöhten Spiegel von VEGF-mRNA fest, der jedoch nicht bis zum Abschluß der Wundheilung anhält. Die VEGF-Expression fällt verfrüht stark ab. Folge hiervon ist eine gestörte Wundheilung bei diesen Mäusen (Frank 1995).

Im Herzen ist ein Anstieg von VEGF nach einer Ischämie oder einem Infarkt in den Herzmyozyten nachweisbar. Die normalen Herzmyozyten eines Erwachsenen exprimieren einen schwach meßbaren VEGF-Spiegel. Dieser VEGF-Spiegel steigt innerhalb einer 30 minütigen transienten ischämischen Perfusion dramatisch an. Eine durch Hypoxie induzierte Überexpression von VEGF-mRNA ist in vivo und in Kultur nachweisbar (Ladoux and Frelin 1993), (Banai 1994 b). VEGF und seine Rezeptoren flt-1 und flk-1-mRNA waren schon eine Stunde nach der Ligatur einer Koronararterie bei einer Maus angestiegen. Sie verblieben für mindestens eine Woche auf diesem Niveau und kehrten während der nächsten sechs Wochen in ihren Normalzustand zurück (Li 1996).

In der Retina wurde ein VEGF-Anstieg ebenfalls festgestellt. Einige Zelltypen der Retina sind befähigt VEGF bei verschiedenen durch eine Ischämie bedingte Erkrankungen zu produzieren. Immunoassays der Glaskörperflüssigkeit zeigten eine starke Korrelation zwischen dem VEGF-Gehalt und der Expression der proliferativen Retinopathie. Der VEGF-Spiegel in den Augen war sehr niedrig bei Patienten, die nicht an Störungen der vaskulären Proliferation litten oder bei Patienten mit inaktivier, d.h. ruhender Gefäßproliferation. Hingegen fand sich bei diabetischen Ratten in der Retina, immunhistochemisch nachgewiesen, ein

starker Anstieg von VEGF in allen Zellschichten. Die RetinagefäÙe waren hyperpermeabel und mit VEGF anfärbbar (Murata 1995), so wie es bereits Dvorak für die Tumor-BlutgefäÙe beschrieben hat (Dvorak 1991)

Ein Anstieg von VEGF-mRNA wurde desweiteren in Keratozyten und infiltrierenden Monozyten bei hypersensitiven Reaktionen vom Typ der Kontaktallergien beim Nagetier und beim Menschen beobachtet (Brown and Detmar 1997). VEGF-mRNA und Proteine werden vermehrt von den Synovialmakrophagen exprimiert und verursachen eine akute Entzündungsreaktion. Zusammen mit den VEGF-Rezeptoren in den MikrogefäÙen wird die Pannusbildung gefördert.

Ein Anstieg von VEGF und seinen Rezeptoren wurde bei einer Vielzahl von entzündlichen Hauterkrankungen gefunden z.B. Psoriasis, bullöses Pemphigoid, herpitiforme Dermatitis und multiformen Erythem (Brown 1995, Detmar 1994).

Die Regulation von VEGF und seine Rezeptorexpression ist abhängig von der Proteinkinase C und dem cAMP abhängigen Kinasestoffwechsel, ferner durch Mechanismen, die Veränderungen in der mRNA Transcription und der Stabilität bewirken (Brown and Detmar 1997), (Finkenzeller 1992).

Weitere Faktoren, die die VEGF Expression regulieren können, sind der Grad der Zelldifferenzierung, die lokale Konzentration von Sauerstoff, sowie Zytokine, Hormone, Prostaglandine, Modulatoren der Proteinkinase C, der Calciueinstrom, die Elektronentransportkette, depolarisierende Agenzien, Angiotensin II, Stimulatoren der Adenylatcyclase und bestimmte Onkogene (Levy 1995).

Viele Zellverbände zeigen einen VEGF-mRNA-Anstieg bei Hypoxie. Weitere Anstiege der VEGF-mRNA-Expression wurden durch in-situ-Hybridisierung in hypoxischen Tumorzonen, die unmittelbar an einer Zone mit Tumornekrose angrenzen, nachgewiesen (Plate 1992) .

Ferner wird VEGF von Zellen, die steroidale Hormone produzieren, exprimiert z.B. in der Nierenrinde, im Corpus luteum und den Leydigschen Zellen. Östrogen und Progesteron fördern den Anstieg von VEGF (Berse 1992). Koos konnte nachweisen, daß die Follikelreifung bei Ratten einen markanten Anstieg von

VEGF induziert. Seine Studien zeigten, daß VEGF eine entscheidende Rolle bei der Follikelruptur/ Ovulation besitzt (Koos 1995).

## **2. Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Ziel der vorgelegten Arbeit war die Etablierung eines weiteren Prognoseparameters der zum Zeitpunkt der Operation bzw. der pathologischen Beurteilung eine präzisere Aussage zum weiteren klinischen Verlauf erlaubt. Verlässliche Indizes über das Tumorstadium und –grading hinaus fehlen, sind aber klinisch zur Planung einer eventuellen adjuvanten Therapie dringend erforderlich. Unter Umständen können Patienten von einer belastenden und kostenintensiven Therapie ausgespart bleiben, da ihr Risiko zum Rezidiv und tumorassoziierten Tod sehr gering ist.

Zahlreiche Versuche weitere Parameter, wie Microvessel Density (MVD), Kernmorphometrie und DNA-Ploidie zu etablieren, haben bislang nur geringe Relevanz erlangt.

Der gewählte Ansatz war anhand der VEGF-Proteinexpression durch immunhistochemische Färbung im Gewebe des Primärtumors, unter Umständen in Kombination mit bereits etablierten Parametern, die Prognose eines Patienten abzuschätzen.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Patienten**

Das untersuchte Patientenkollektiv rekrutiert sich aus 200 Patienten, die aufgrund ihres Nierenzellkarzinoms im Zeitraum von Februar 1985 bis Dezember 1994 an der Urologischen Universitätsklinik Würzburg tumornephrektomiert wurden. Bestandteil der Tumornephrektomie war in der Regel die unilaterale Adrenalektomie. Keiner der ausgewählten Patienten hatte zum Zeitpunkt der Operation eine Lymphknoten- oder Fernmetastasierung, Patienten mit Metastasen wurden ausgeschlossen.

### **3.2 Statistische Analyse**

Zusammenstellung der erhobenen Parameter:

- 1 Maß der Prognose dieser Studie (Zielparameter=abhängige Variable)
  - 1a Überlebenszeit nach Nephrektomie
  - 1b Rezidivfreie Zeit nach Nephrektomie
  
- 2 Prognostische Parameter (unabhängige Variable) dieser Studie
  - 2a Etablierte Parameter: Tumor Stadium (TNM), Malignitätsgrad (Grading)
  - 2b Potentielle Parameter: VEGF

Die Bedeutung der verschiedenen Parameter im Hinblick auf die postoperative Lebenszeit und die rezidivfreie Zeit wurde nach der Kaplan-Meier Methode mit log-rank Test (paarweiser Gruppenvergleich n. Cox) und dem Test auf einen Trend in Gruppen nach Tarone (Tarone 1975) bestimmt.

Die paarweise Prüfung der Abhängigkeit der Parameter wurde mit dem Chi-Square Test und der Kendall's -Korrelation durchgeführt.

Bei erwiesener Abhängigkeit zweier Parameter wurde mit dem Korrelationskoeffizient der Grad der Abhängigkeit festgestellt und somit die Abhängigkeit der beiden Parameter untereinander bestimmt. Waren zwei Parameter untereinander abhängig, konnten sie nicht direkt in den dritten Test, die multivariaten Prognoseanalyse aufgenommen werden. Mittels der multiplen Regression nach dem „Proportional Harzards“ Modell von Cox (Cox, 1972) waren Aussagen über die Gewichtung der einzelnen Parameter in Bezug auf Überlebenszeitraum und rezidivfreie Zeit zu treffen. Für die Parameter mit den höchsten Beta-Gewichten wurden Prognoseindizes berechnet und ihre Qualität (Sensitivität und Spezifität) mittels einer „Receiver Operating Characteristic (ROC)“ verglichen.

Bei allen statistischen Tests galt ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ . Alle statistischen Berechnungen erfolgten unter Zuhilfenahme der „PC MEDAS“-Software (System zur statistischen und graphischen Datenverarbeitung, Fa. Ch. Grund, Würzburg)

In die Studie aufgenommen wurden 119 männliche Patienten und 81 Patientinnen. Das Durchschnittsalter betrug 59,4 Jahre (Minimum 29 Jahre, Maximum 83 Jahre).

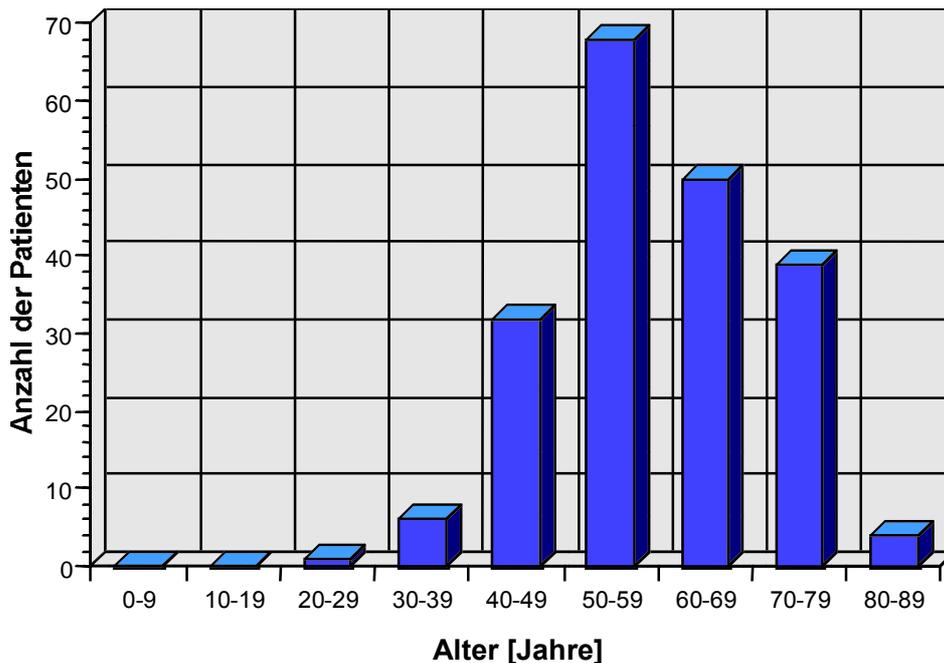


Abb. 4: Altersverteilung der Patienten, die zwischen Februar 1985 und Dezember 1994 an der Urologischen Klinik der Universität Würzburg tumornephrektomiert wurden

### 3.2.1 Univariate Prognoseanalyse

Unter einem univariaten statistischen Verfahren zur Überprüfung einzelner Prognosefaktoren versteht man ein statistisches Verfahren, das die Signifikanz eines potentiellen prognostischen Parameters überprüft, ohne mögliche Abhängigkeiten bzw. Korrelationen zu anderen prognostischen Parametern zu berücksichtigen. Das am häufigsten angewandte univariate Verfahren zur Signifikanzüberprüfung ist der Vergleich von Graphiken nach Kaplan-Meier, auch bekannt als „product limit method“ oder „life table analysis“. Dazu werden, je nach Fragestellung zwei statistische Tests benutzt. Der log-rank-Test, auch bekannt als paarweiser Gruppenvergleich nach Cox (Cox 1972), wird angewandt um eine Aussage über die Unterteilung einer Grundgesamtheit in zwei Gruppen bezüglich eines potentiellen prognostischen Parameters treffen zu können.

Der Tarone-Test wird dagegen angewandt, wenn die Grundgesamtheit der zu untersuchenden Patienten nach der Ausprägung des Schweregrades eines Parameters in mehrere Gruppen unterteilt werden soll und ein Trend in diesen

Gruppen in Bezug auf den postoperativen Verlauf untersucht werden soll. Dabei wird überprüft, ob die Zunahme oder Abnahme der Ausprägung mit einer Verschlechterung oder eine Verbesserung des postoperativen Verlaufs einhergeht. Im Folgenden werden die einzelnen Faktoren in Bezug auf ihre prognostische Wertigkeit mit den oben genannten Verfahren überprüft.

### 3.2.2 Bivariate Statistik von VEGF

Untersucht wurde ein potentieller Zusammenhang zwischen VEGF und Alter, Geschlecht, Tumorstadium, Tumorgröße, Grading, Auftreten eines Rezidiv und Venenbefall im Stadium pT<sub>3</sub>.

Für zwei unverbundene Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test (Weiß 1999) verwendet. Bei einer Stichprobengröße  $> 2$  wurde hingegen der Kruskal-Wallis-Test (Weiß 1999) angewendet. p-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant, p-Werte kleiner 0,001 als hochsignifikant bewertet.

### 3.2.3 Grundlagen der multivariaten Prognoseanalyse

Die multivariate Prognoseanalyse ist als Erweiterung der univariaten Analyse zu verstehen. Auch hier werden potentielle Prognoseparameter auf ihre Aussagekraft hinsichtlich der Kriterien Überlebenszeit und rezidivfreie Zeit überprüft. Der Unterschied liegt darin begründet, daß bei der multiplen Regression nach dem Proportional Hazard's Modell (Cox 1972) nicht nur eine Variable, sondern mehrere Variablen gleichzeitig in diesem Testverfahren betrachtet werden können. Weist ein Faktor in der univariaten Statistik eine Signifikanz auf, so kann er weiterhin in Kombination mit anderen aussagekräftigen Faktoren die Prognosefähigkeit der Signifikanz dieser Faktoren verbessern. Läßt der potentiell neue Faktor in Kombination mit den etablierten Prognosefaktoren eine genauere Aussage über die zu betrachtenden Kriterien zu, so kann man von einer Verfeinerung der Aussagekraft dieser Kriterien sprechen. Das Hazard's-Modell von Cox wurde für die multivariate Prognoseanalyse deshalb gewählt, da es gegenseitige Abhängigkeiten der einzelnen Prognose-Indizes berücksichtigt. Somit

wird Information, die bei korrelierenden Variablen mehrfach Berücksichtigung finden würde, nur einmal in die Berechnung mit aufgenommen.

In der vorliegenden Arbeit diente die multivariate Prognoseanalyse dazu, nachzuweisen, ob der Faktor VEGF, der sich in der univariaten Statistik als signifikanter Prognosefaktor für Überlebenszeitraum und rezidivfreie Zeit erwiesen hat, auch in Verbindung mit den etablierten Vorhersagefaktoren T-Stadium und Grading eine noch genauere Aussage in Hinblick auf Überlebenszeit und rezidivfreie Zeit zulässt. Dazu wurden in die multiple Regression das T-Stadium, der Malignitätsgrad und der Faktor VEGF aufgenommen.

#### 3.2.4 Prognoseindizes

Statistisch signifikante Parameter der univariaten Statistik, die in der multivariaten Statistik nicht an Aussagekraft verlieren, können mit Hilfe von Prognoseindizes weiter auf ihre statistische Aussagekraft überprüft werden. Somit ist eine bessere Abschätzung eines größeren Teils des Gesamtrisikos eines jeden Patienten möglich, indem man die Einzelinformation der aufgeführten Prognostikatoren miteinander kombiniert darstellt. Einer solchen kombinierten Darstellung entspricht der Prognoseindex  $I_j$ . Der jeweilige Indexwert für jeden Patienten wird unter Anwendung folgender Gleichung berechnet.

$$I_j = \exp \left( \sum_{i=1}^n b_i * Z_{ij} \right)$$

$b_i$  = Wert von beta des Parameters  $i$  aus der multiplen Regression

$Z_{ij}$  = Wert des Parameters  $i$  für den jeweiligen Patienten  $j$

$n$  = Anzahl der Parameter

Es werden jeweils zwei Prognose-Indizes für jedes der beiden Kriterien der multiplen Regression (Überlebensrate und Rezidiv) berechnet. Anschließend

wird mit Hilfe der „life table analysis“ nach Kaplan-Meier Schema (Kaplan and Meier 1958) überprüft, ob anhand des Prognose-Index des einzelnen Patienten statistisch signifikante Aussagen über den postoperativen Verlauf seiner Erkrankung möglich sind. Die Patienten müssen in zwei Gruppen für jedes untersuchte Modell aufgeteilt werden. Um den besten Trennwert hinsichtlich Spezifität und Sensivität zu finden, wurden die berechneten receiver operating characteristics (ROC)-Kurven verwendet. Die Index-Qualität dieser vier berechneten Prognose-Indizes, ihre Sensivität und ihre Spezifität wurde anhand der Methode der errechneten ROC-Kurven beurteilt (siehe Abb. 5 und Abb.6)

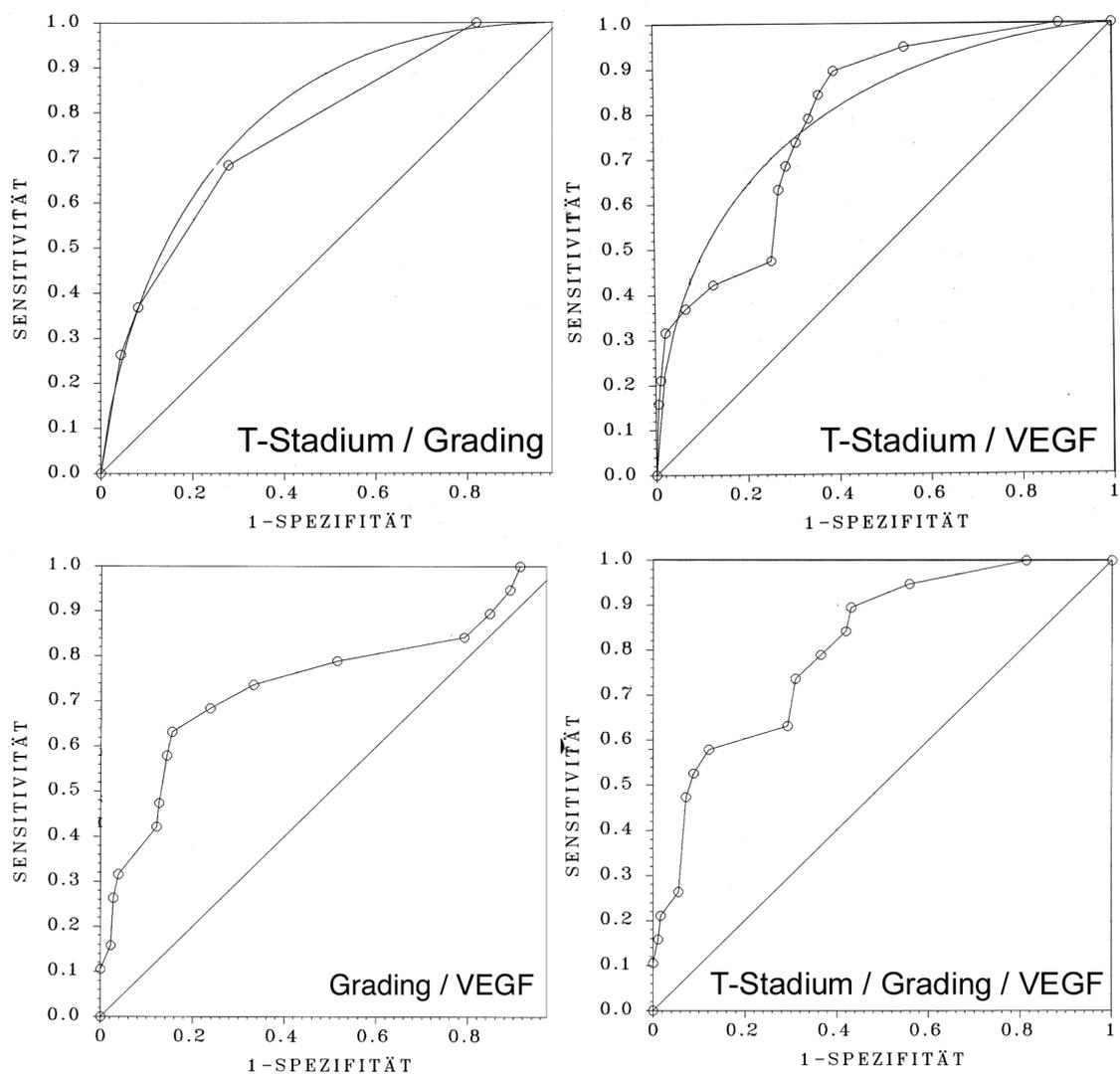


Abb. 5: ROC Kurven Überlebenszeiten

Dabei stellt der Flächenwert der Indizes (Fläche unter der gekrümmten Linie) die Qualität des jeweiligen Index dar. Je größer die Annäherung des Flächenwertes des jeweiligen Index unter der Kurve an den Gesamtwert 1 ist, desto höher ist seine Qualität. Dem entsprechend folgt auch eine präzisere Aussage auf die Überlebensrate sowie auf die Rezidivfreiheit, die man unter Gebrauch dieses Index treffen kann. Man erhält das bestmögliche Gleichgewicht zwischen Sensivität und Spezifität.

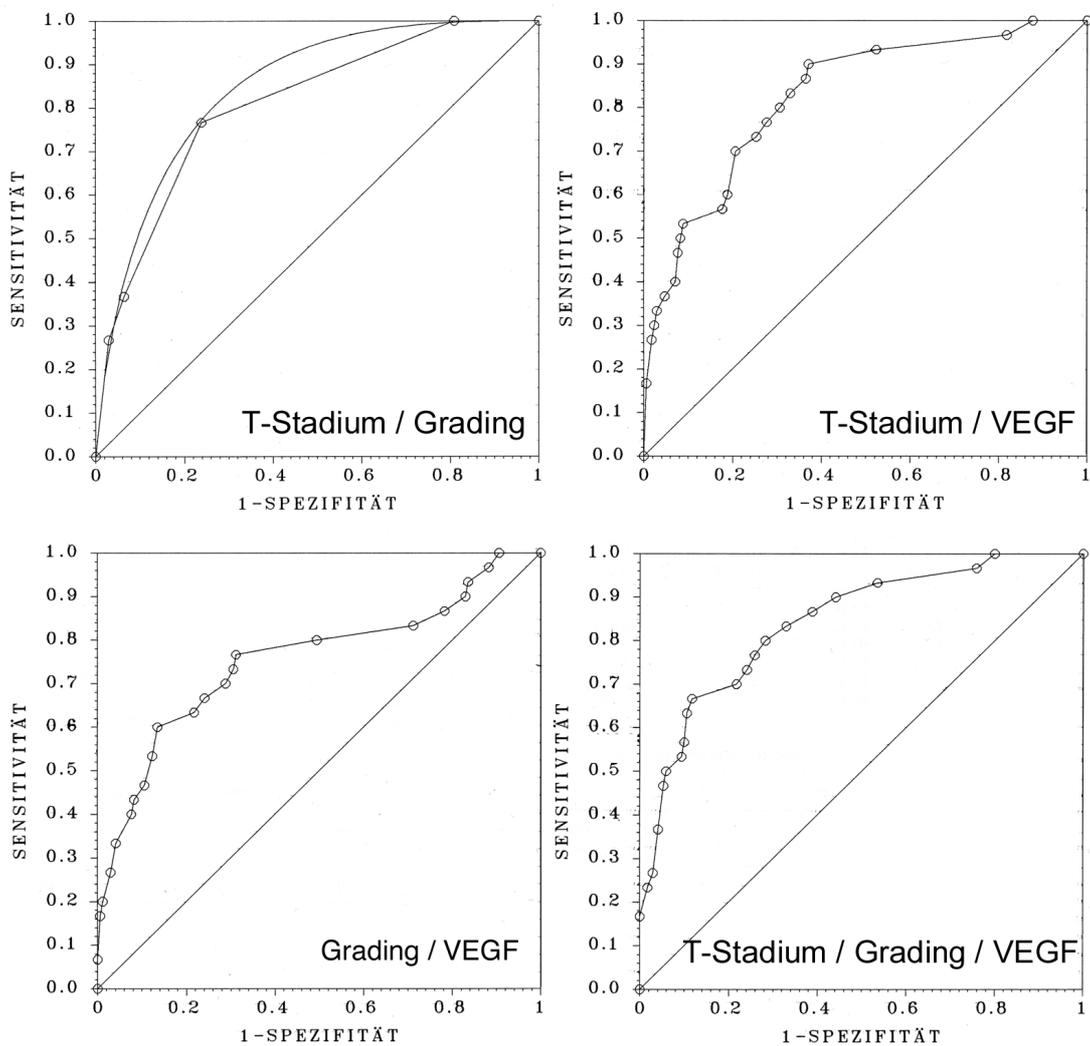


Abb. 6: ROC Kurven Rezidiv

### 3.3 Follow-up

Um Aussagen über den postoperativen Verlauf und insbesondere die Überlebenszeit der Patienten treffen zu können, wurden die Hausärzte und betreuenden Urologen der Patienten angeschrieben, welche nicht durch die Urologische Poliklinik der Universität Würzburg betreut wurden.

Als rezidivfreie Zeit wurde das Zeitintervall definiert, in welchem mit den etablierten bildgebenden Verfahren der Sonographie, Computertomographie und/oder Skelettszintigraphie keine nachweisbaren Rezidive oder Metastasen nach dem Zeitpunkt der Operation festgestellt wurden. Die mittlere Beobachtungszeit betrug fünf Jahre zum Zeitpunkt des Abschluss der optischen Auswertung der Präparate im Juli 1999.

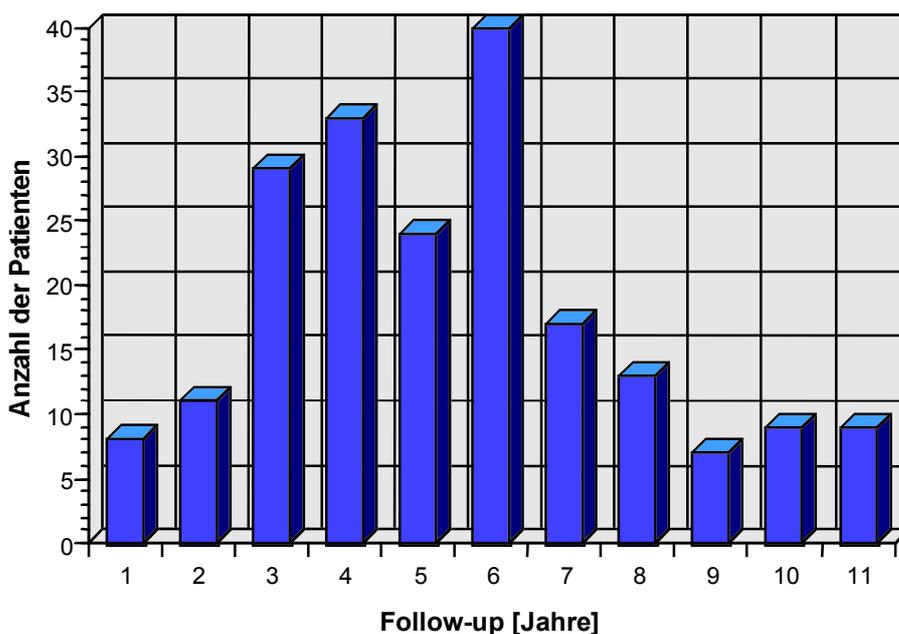


Abb. 7: Verteilung der Nachbeobachtungszeiten nach vorangegangener Tumornephrektomie

Bis Juli 1999 entwickelten 30 Patienten (15%) ein Tumorrezidiv, 19 Patienten (9,5%) verstarben hieran. 13 weitere Tumorpatienten (6,5%) verstarben im gleichen Zeitraum an einer anderen, nicht mit ihrem Nierenkarzinom in kausalem Zusammenhang stehenden Erkrankung.

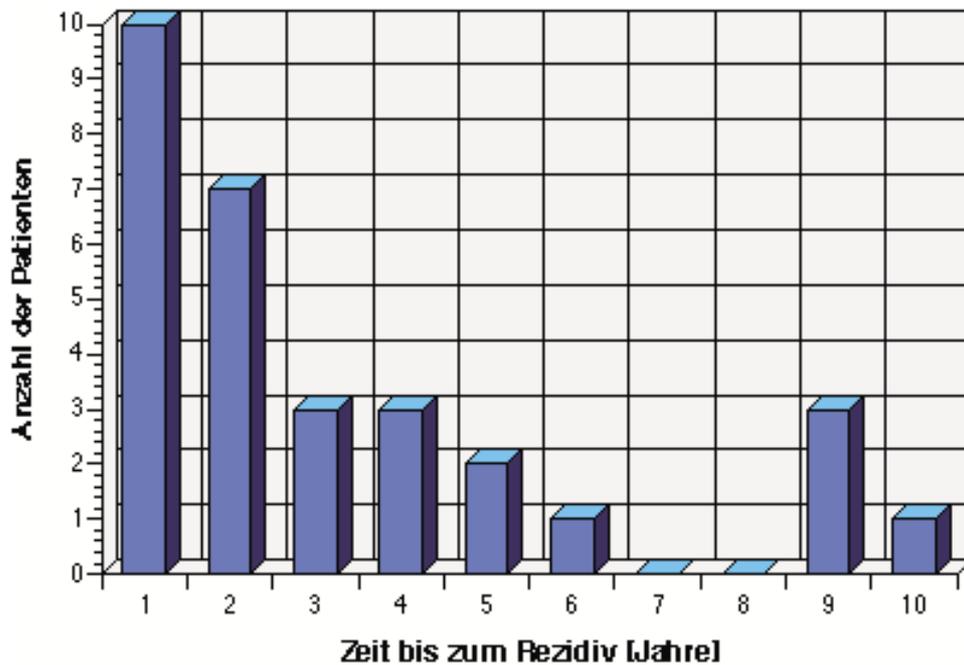


Abb. 8: Zeitintervall bis zum Auftreten eines Rezidiv

### 3.4 Klinische Stadieneinteilung und Histopathologie

Die Einteilung des Tumorstadiums erfolgte entsprechend der TNM-Klassifikation der UICC in der Fassung von 1990 (Spiessl 1990).

T: Primärtumor

T<sub>1</sub>: Tumor 2,5 cm oder weniger in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere

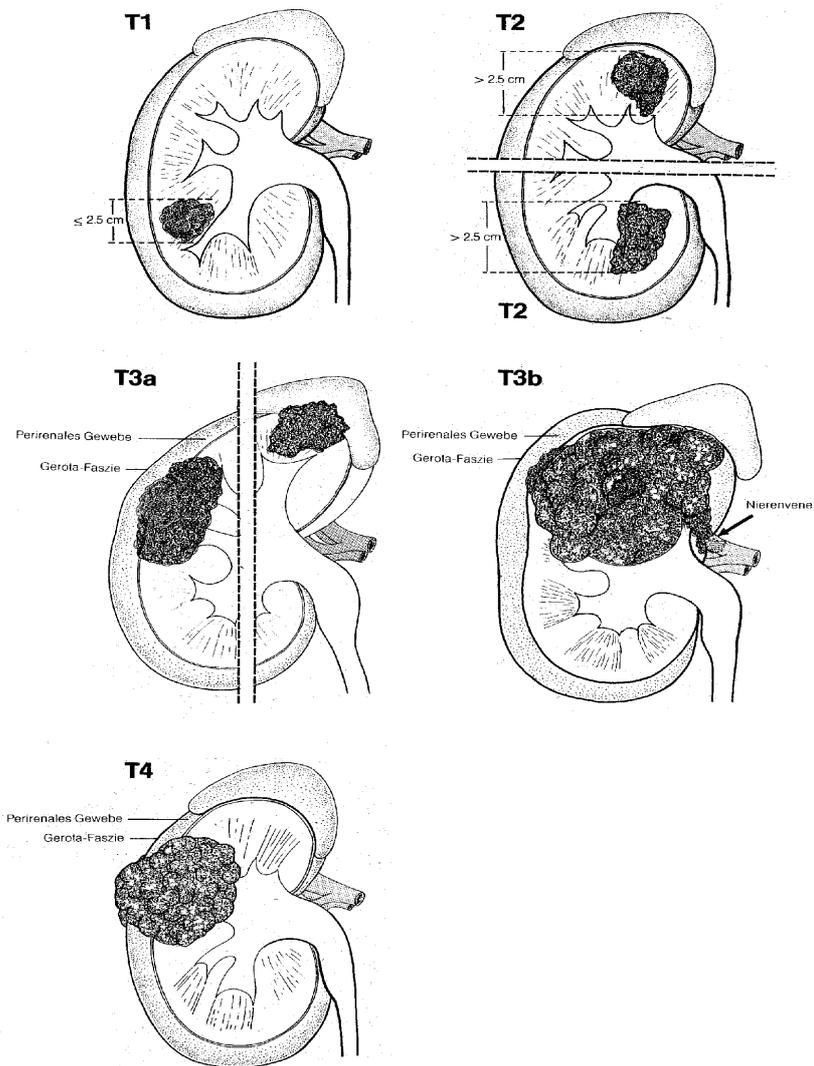
T<sub>2</sub>: Tumor mehr als 2,5 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere

T<sub>3</sub>: Tumor breitet sich in größeren Venen aus und infiltriert Nebenniere und perirenales Gewebe, jedoch nicht jenseits der Gerotafascie

T<sub>3a</sub>: Tumor infiltriert Nebenniere oder perirenales Gewebe, aber nicht jenseits der Gerota-Fascie

T<sub>3b</sub>: Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Nierenvene(n) oder V. cava

T<sub>4</sub>: Tumor infiltriert über die Gerotafascie hinaus



**Abb. 9:** Schematische Darstellung der unterschiedlichen T-Stadien gemäß der UICC-Klassifikation von 1990, die Einteilung der pT-Stadien erfolgt analog der Einteilung der T-Stadien (Spiessl 1990).

N : Regionäre Lymphknoten

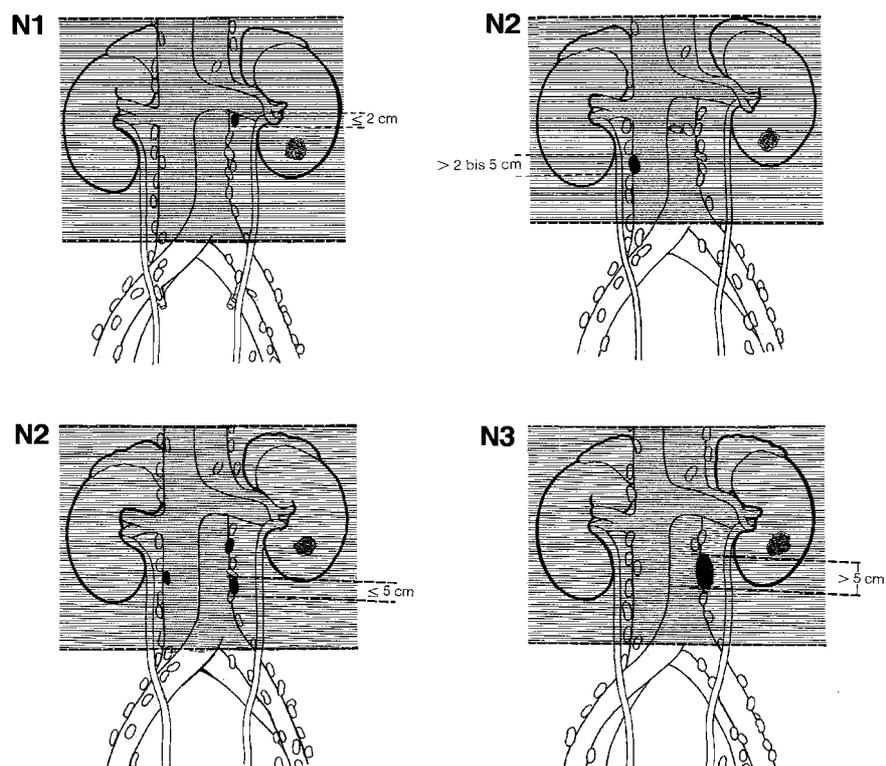
N<sub>x</sub>: Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden

N<sub>0</sub>: Keine regionäre Lymphknotenmetastasen

N<sub>1</sub>: Metastase in solitärem Lymphknoten, 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung

N<sub>2</sub>: Metastase(n) in solitärem Lymphknoten > 2 cm, aber nicht > 5 cm in größter Ausdehnung, oder in multiplen Lymphknoten, keine > 5 cm in größter Ausdehnung

N<sub>3</sub>: Metastasen in Lymphknoten, > 5 cm in größter Ausdehnung



**Abb. 10:** Schematische Darstellung der unterschiedlichen N-Stadien gemäß der UICC-Klassifikation von 1990, die Einteilung der pN-Stadien erfolgt analog der Einteilung der N-Stadien (Spiessl 1990).

M : Fernmetastasen

M<sub>x</sub>: Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden

M<sub>0</sub>: Keine Fernmetastasen

M<sub>1</sub>: Fernmetastasen

Im anglo-amerikanischen Sprachraum ist alternativ zur TNM-Klassifikation die Stadieneinteilung nach Robson (Robson 1969) gebräuchlich. In der durchgeführten Studie wurde jedoch ausschließlich die Klassifikation der UICC verwendet.

#### **Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms nach Robson:**

Stadium I      Auf die Niere beschränkter Tumor

Stadium II     Tumorinfiltration in das pararenale oder peripelvine Fettgewebe innerhalb der Gerotafascie

Stadium III    Makroskopische Veneninvasion und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen

Stadium IIIa   Makroskopische Veneninvasion

Stadium IIIb   Regionäre Lymphknotenmetastasen

Stadium IIIc   Makroskopische Veneninvasion gemeinsam mit regionären Lymphknotenmetastasen

Stadium IV     Infiltration von Nachbarorganen oder Fernmetastasen

Robson	TNM		
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3a	N0, N1	M0
	T3b	N0, N1	M0
	T3c	N0, N1	M0
Stadium IV	T4	jedes N	M0
	jedes T	N2, N3	M0
	jedes T	jedes N	M1

**Tab. 2:** Vergleichbarkeit der Robson-Klassifikation und des TNM-Systems

Die histopathologische Bestimmung der Tumorpräparate erfolgte post-operativ im Pathologischen Institut der Universität Würzburg. Gemäß den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation WHO wurde der Malignitätsgrad bestimmt (Helpap 1992).

G I hochdifferenzierte Tumore

G II mäßig differenzierte Tumore

G III schlecht differenzierte / undifferenzierte Tumore

### **3.5 Herstellung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte**

#### 3.5.1 Allgemeines über Antikörper

Grundsätzlich unterscheidet man monoklonale und polyklonale Antikörper. Zur Gewinnung monoklonaler Antikörper werden fast ausschließlich Mäuse, zur Herstellung polyklonaler Antikörper werden vor allem Kaninchen herangezogen. Polyklonale Antikörper stammen von verschiedenen Plasmazellen ab. Daher sind sie auch nicht nur gegen ein einziges Epitop eines Antigen gerichtet, sondern reagieren mit unterschiedlichen Epitopen des Antigens.

Gepoolte Antikörper aus vielen Kaninchen geben kaum Anlaß zu qualitativen Chargenvarianzen im Gegensatz zu Pools, die durch nur wenig große Tiere gewonnen werden.

Monoklonale Antikörper hingegen werden von einem einzigen Plasmazellklon gebildet und sind spezifisch gegen ein Epitop gerichtet. Hieraus resultiert ihr Vorteil gegenüber polyklonalen Antikörpern: ihre hohe Spezifität.

Die Spezifität kann jedoch verloren gehen, wenn der Antikörper gegen eine Struktur gerichtet ist, die sich bei verschiedenen Antigenen findet (Kreuzreaktivität). Die Kreuzreaktivität eines polyklonalen Antiserums kann durch Absorption vermieden werden, nicht jedoch die Kreuzreaktivität eines monoklonalen Antikörpers.

#### 3.5.2 Avidin-Biotin-Methode

Zum sichtbaren Nachweis eines definierten Zellbestandteiles bedient man sich immunhistochemischer Färbemethoden. In der vorliegenden Arbeit findet die Avidin-Biotin-Methode Anwendung.

Diese Technik nutzt die starke Affinität von Avidin oder Streptavidin für Biotin. Zur Zeit finden zwei verschiedene Avidin-Biotin-Färbungen Anwendung: die Avidin-Biotin-Komplexmethode = ABC sowie die markierte Avidin-Biotintechnik = labelled avidin-biotin technique = LAB.

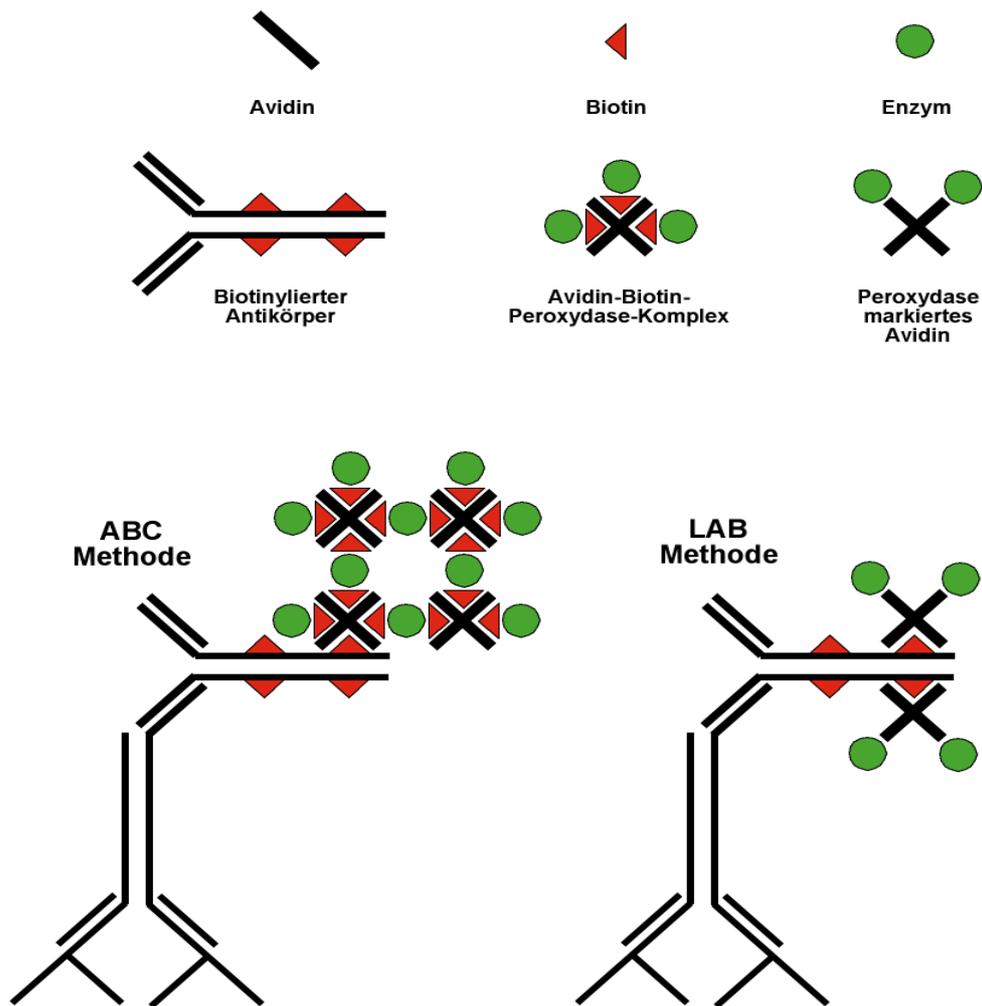


Abb. 11: Schematische Darstellung der Avidin/Biotin-Methoden: vorgeformte Avidin-Biotin-Enzymkomplexe (ABC) oder enzymmarkiertes Avidin (LAB) reagieren mit biotinylierten Sekundärantikörpern. (Naish 1989).

Als erstes wird der Primärantikörper auf den Gewebeschnitt inkubiert. Dieser Primärantikörper ist gegen das Gewebsantigen, welches nachgewiesen werden soll, gerichtet und bildet mit diesem einen AG-AK-Komplex. Dann wird ein biotinylierter Zweitantikörper (= Brücken- oder Linkantikörper) zugefügt. Die Biotinylierung ist ein schonender Vorgang, wobei Biotin kovalent an den Antikörper gebunden wird. Der Sekundärantikörper reagiert mit dem Primärantikörper, welcher nun das korrespondierende Antigen darstellt. Im nächsten Schritt wird ein vorgeformter Avidin-Biotin-Enzymkomplex (ABC) bzw. enzymmarkiertes Avidin

(LAB) appliziert. Freie Bindungsstellen am Avidin des Avidin-Biotin-Komplexes oder des enzymgekoppelten Avidins binden an das Biotin des Brückenantikörpers an. Dieser muß nicht im Überschuß zugesetzt werden, da freie Fab-Arme zur Bindung nicht benötigt werden. Im letzten Schritt wird eine chromogene Substratlösung solange inkubiert bis die gewünschte Farbintensität erreicht ist.

Vorteile dieser Methode sind eine höhere Sensitivität im Vergleich zu den direkten Färbemethoden und eine Signalverstärkung, da mehrere Antikörper sowohl am Primär-, als auch am Sekundärantikörper gebunden werden (Naish 1989).

### 3.5.3 Technik der Antikörpermarkierung

Zu Beginn wurden von den in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Nierentumorgewebe mittels Mircrotom 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf die Objektträger gezogen. Zum Entparaffinieren wurden die Präparate je 15 Minuten in Xylol, Aceton und in einem Aceton/Trispuffergemisch, Verhältnis 1: 2 gelegt. Im Anschluß erfolgte eine kurze Spülung mit TrisHCL-Puffer.

Das Tris-HCL-Pufferrezept: 4,5 g Tris, 34,25 g Tris-HCL und 43,9 g NaCl auf 5 l Aqua dest. aufgefüllt und auf einen pH von 5,6 eingestellt.

Danach wurden die Präparate für 10 Minuten in eine 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Lösung gestellt und anschließend in der Mikrowelle bei 600 Watt in einem Citratpuffer (pH 6) 20 Minuten gekocht. Der Citratpuffer besteht aus zwei Stammlösungen, der Stammlösung A aus 21,01 g (0,1 M) Zitronensäure in 1000 ml Aqua dest., und der Stammlösung B aus 28,41 g (0,1 M) Natriumcitrat in 1000 ml Aqua dest.. Der angewandte Puffer enthält 9 ml Stammlösung A und 41 ml Stammlösung B, aufgefüllt auf 500 ml Aqua dest..

Anschließend erfolgte die Antikörperbehandlung. Der Primärantikörper VEGF (A 20): cat# sc-152, Hersteller Santa Cruz Biotechnology, CA, USA, Inc. (von Kaninchen) wurde mit der RPMI- Lösung 1:300 verdünnt und 60 Minuten in eine

feuchte Kammer bei 20 Grad Celsius inkubiert. Die RPMI 1640 Lösung setzt sich aus 5 ml RPMI 1640, 5 ml fetalem Kälber-/ Rinderserum (Seromed Biochrom KG, Berlin) und 45 ml Aqua dest. Zusammen. Jetzt wurde mit Tris-HCL-Puffer gespült, und nach Applikation des mit RPMI 1: 25 verdünnten Brückenantikörper, 30 Minuten inkubiert. Nach einem erneuten Spülvorgang mit Trispuffer wurde der Avidin/Streptavidin-Komplex (strept ABComplex/HRP, Dako) als Fertigkit auf die Gewebeproben mit einer 30 minütigen Inkubationszeit aufgetragen. Nach erneuter gründlicher Spülung mit Trispuffer inkubierten wir das Substrat-Chromogen-Reagenz DAB (bernsteinfarben) für 5 Minuten.

Eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer erfolgte nach einem letzten Spülvorgang um die Zellkerne farblich übersichtlich hervorzuheben.

Die Eindeckung der Gewebsschnitte in Glyceringelatine stellte den letzten Zubereitungsschritt der Proben dar.

#### 3.5.4 Mikroskopisches Auszählen der Präparate

Die Präparate der Nierenzellkarzinome wurden durch zwei unabhängige Untersucher (MTA und Verfasserin) unter gleichen Bedingungen ausgewertet.

Das Mikroskop Leica Orthoplan der Firma Leitz wurde bei den Untersuchungen eingesetzt.

Mittels eines 10 x 10 Feldrasters mit einer Gesamtfläche von 0,9 mm<sup>2</sup> erfolgte das Auszählen. Ausgewertet wurden 50 Gesichtsfelder an drei verschiedenen Lokalisationen des Nierenzellkarzinoms. Innerhalb des Gesichtsfeldes wurden die VEGF-positiven Zellen (bernsteinfarbenenens Cytoplasma) und Tumorzellen auf den Schnittpunkten der Rasterachsen ausgezählt. Die Auswahl der Tumoreale erfolgte zufällig. Mit dem 1:25 Objektiv wurden die Präparate ausgewertet. Die Vergrößerung entsprach 10 (Okular) x 1,5 (Tubus) x 25 (Objektiv) d.h. einer 375-fachen Vergrößerung.

Schließlich wurde das prozentuale Verhältnis der VEGF-positiven Zellen zu der Gesamtzahl der Tumorzellen berechnet. Dieses Verhältnis erklärt die Höhe der Expression von VEGF im vorliegenden Tumorgewebe.

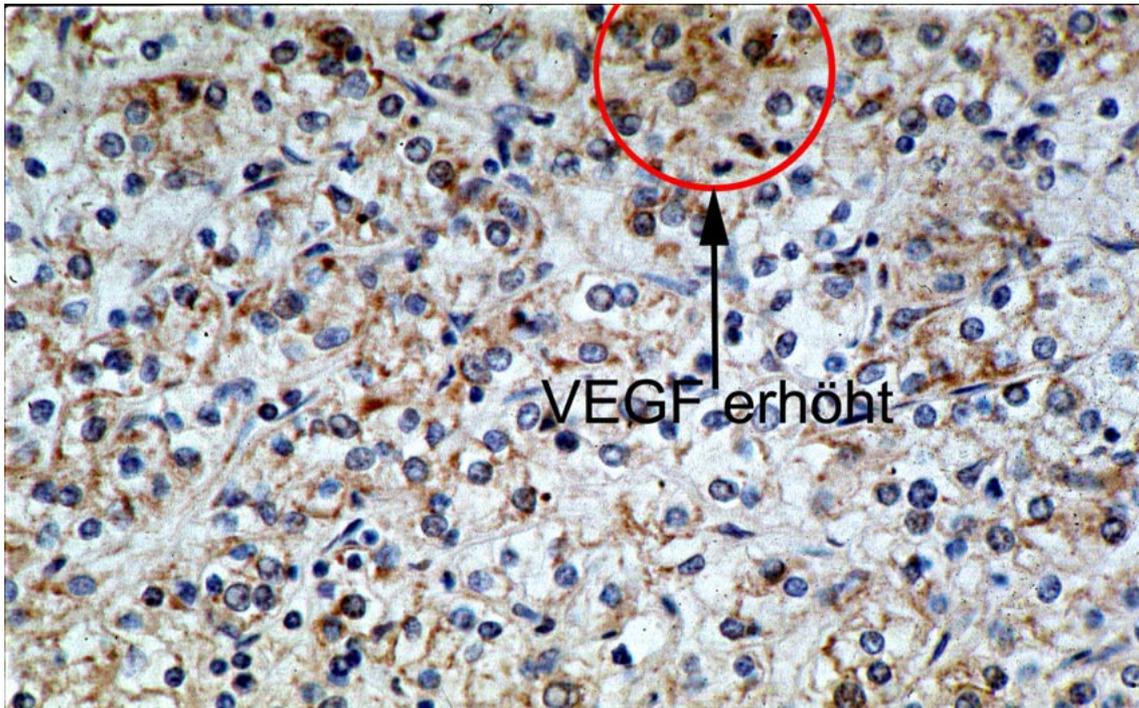


Abb. 12: Representatives Tumorareal bei 375-facher Vergrößerung, im gekennzeichneten Bereich zeigt sich eine hohe VEGF-Expression im Cytoplasma.

## 4. Ergebnisse

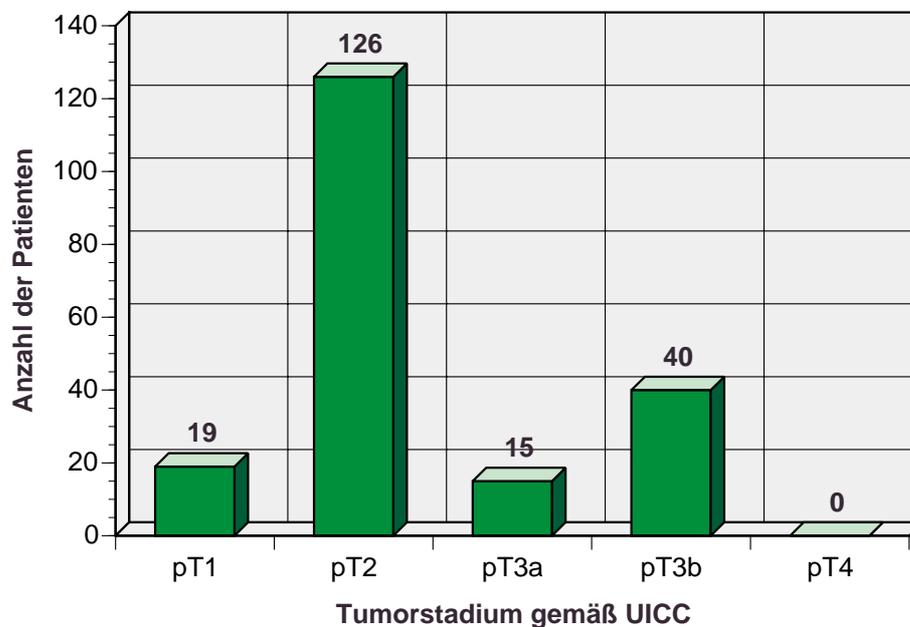
### 4.1 Statistische Analyse

#### 4.1.1 Univariate Analyse

##### 4.1.1.1 T-Stadium

Von den 200 Patienten dieser Studie wurden nach der TNM Stadien-Klassifizierung gemäß UICC (1990) 19 Patienten (9,5%) dem Stadium pT<sub>1</sub>, 126 Patienten (63%) dem Stadium pT<sub>2</sub> und 55 Patienten (27,5%) dem Stadium pT<sub>3</sub> zugeordnet.

Die 55 Patienten des Stadium pT<sub>3</sub> gliederten sich in die Unterklassen pT<sub>3a</sub> (15 Patienten (27%)) und pT<sub>3b</sub> (40 Patienten (73%)) auf. Im angegebenen Zeitraum ging kein Patient mit einem pT<sub>4</sub>-Tumor in die Studie ein.



Das T-Stadium erwies sich als statistisch signifikanter Parameter in Bezug auf die Prognose sowohl für die Überlebenszeit ( $p = 0,0026^{**}$ ), als auch für die rezidivfreie Zeit ( $p = 0,00001^{***}$ ) nach OP der Patienten. Das Kaplan-Meier Verfahren ergab 10 Jahres-Überlebensraten für das Stadium  $pT_1$  von 100%. Patienten im Stadium  $pT_2$  überlebten 10 Jahre zu 91,8%, während Patienten im Stadium  $pT_3$  zu 67,7% überlebten.

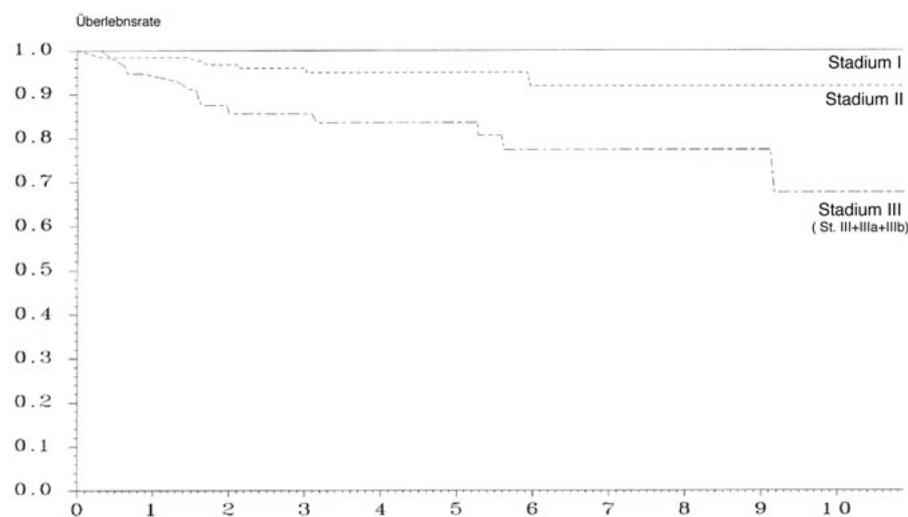


Abb. 14: Überlebensrate als Funktion der Zeit bezogen auf das T-Stadium gemäß UICC von 1990, Tarone Test  $p = 0,0026^{**}$

Durch das gleiche Verfahren konnte auch ein hochsignifikanter Zusammenhang ( $p=0,00001^{***}$ ) zwischen rezidivfreier Zeit und Tumorstadium gezeigt werden.

Im Stadium  $pT_1$  zeigte kein Patient nach 10 Jahren ein Rezidiv, im Stadium  $pT_2$  zeigte sich eine Rate für Rezidivfreiheit zu 91,6% während im Stadium  $pT_3$  nur 21,4% der Patienten ohne Rezidiv blieben.

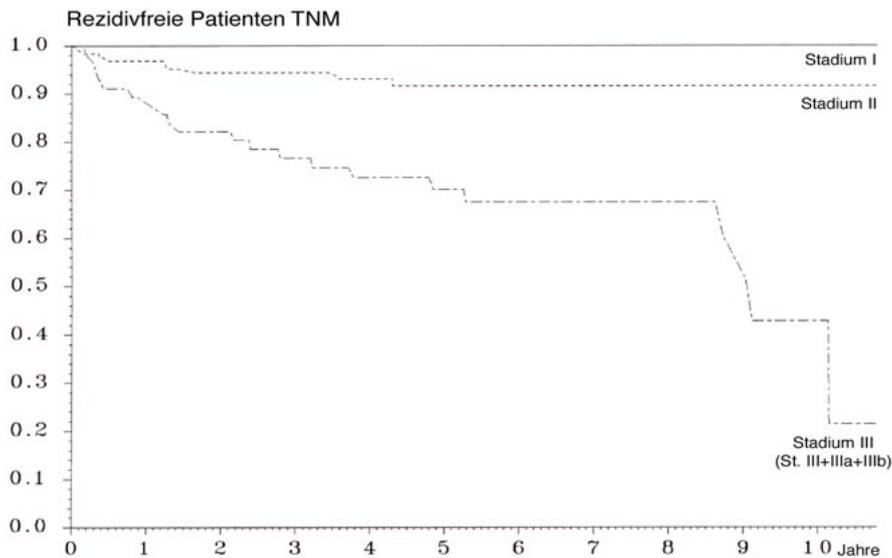


Abb. 15: Rezidivfreie Patienten als Funktion der Zeit bezogen auf T-Stadium. Tarone Test  $p = 0,000010^{***}$

#### 4.1.1.2 Malignitätsgrad (Grading)

Nach der histologischen Malignitätsgrad-Bestimmung ( $n = 200$ ) fanden sich 18 Patienten (9%) mit G I Tumoren. 160 Patienten (80%) wiesen einen G II Tumor auf, G III Tumore wurden bei 22 Patienten (11%) diagnostiziert. Der Malignitätsgrad stellte sich als prognostischer Parameter statistisch signifikant heraus, sowohl für den betrachteten Überlebenszeitraum von 10 Jahren ( $p = 0,0039^{**}$ ), als auch für die rezidivfreie Zeit der Patienten nach Operation ( $p = 0,000018^{***}$ ). Das Kaplan-Meier Verfahren ergab 10 Jahresüberlebensraten von 94,1% für Patienten mit einem G I Tumor, 84,8% für Patienten mit einem G II Tumor und 53.3% für Probanden der Studie mit einem G III Tumor. Analog ließ sich zeigen, daß 94,1% der Patienten mit einem G I Tumor, 64,0% der Patienten mit einem G II Tumor und 0% der Tumor G III Patienten nach 10 Jahren nach der Operation noch rezidivfrei waren.

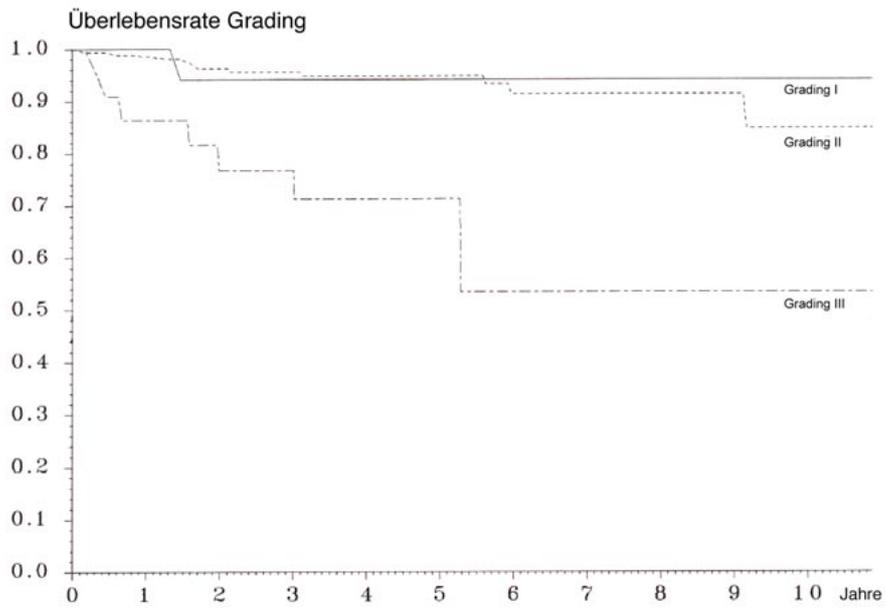


Abb. 16: Überlebensrate als Funktion der Zeit, bezogen auf Grading. Tarone Test  $p = 0,0039^{**}$

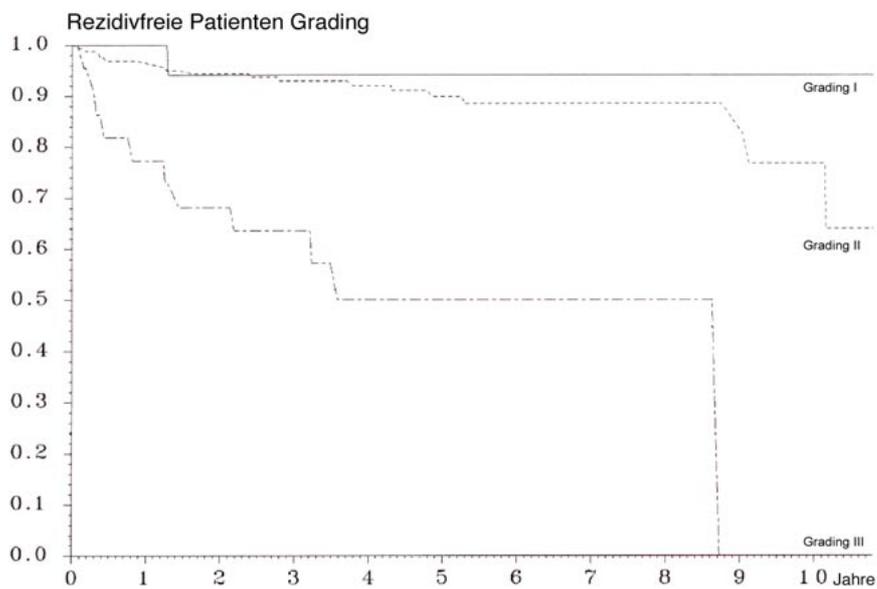


Abb.17: Rezidivfreie Patienten als Funktion der Zeit, bezogen auf Grading. Tarone Test  $p = 0,000018^{***}$

#### 4.1.1.3 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

Um VEGF auf eine statistische Prognose hin zu bewerten, wurde der Parameter anhand des Medianwertes untersucht. Dieser ergab einen Wert von 15 als Trennwert der beiden Klassen für VEGF. Die Klassifizierung erwies sich aber weder für die Überlebensrate ( $p = 0,078$ ), noch für die rezidivfreie Zeit ( $p = 0,010^*$ ) als statistisch signifikanter Prognoseparameter. Weiterhin wurde für VEGF eine Receiver-Operating-Charakteristik (ROC) durchgeführt. Hierbei wird beurteilt, ob ein negativer Befund als solcher erkannt wird (Spezifität) und wie häufig falsch positive Ergebnisse auftreten (Sensivität). Das beste Verhältnis zwischen Spezifität und Sensivität, der point of cut = 20, wurde bei VEGF als Grenze zwischen den zwei Klassen eingesetzt und hierbei eine Überlebenstafel in Abhängigkeit der VEGF-Konzentration im Tumorgewebe mit dem log-rank-Test errechnet. Klasse I (VEGF point of cut  $\leq 20$ ) und Klasse II (VEGF point of cut  $> 20$ ). Somit konnten 128 Patienten (63,3%) der VEGF Klasse I und 72 Patienten (35,6%) der VEGF Klasse II zugeordnet und in Bezug auf ihre postoperative Überlebens-Prognose sowie auf die rezidivfreie Zeit post operationem verglichen werden. VEGF erwies sich hier als signifikanter Prognoseparameter für die Überlebenszeit ( $p = 0,0039^{**}$ ), als auch als hochsignifikanter Prognoseparameter für die rezidivfreie Zeit ( $p = 0,00007^{***}$ ). Mit der Kaplan-Meier Methode (Kaplan and Meier 1958) konnten für den Untersuchungszeitraum der Studie von 10 Jahren nach der Operation ermittelt werden, daß 91,4% der Patienten der VEGF Klasse I und 71,5% der Patienten der VEGF Klasse II noch am Leben waren. Rezidivfrei waren zehn Jahre nach der Operation in der VEGF Klasse I noch 73,7% und in der VEGF Klasse II 45,4% der Patienten.

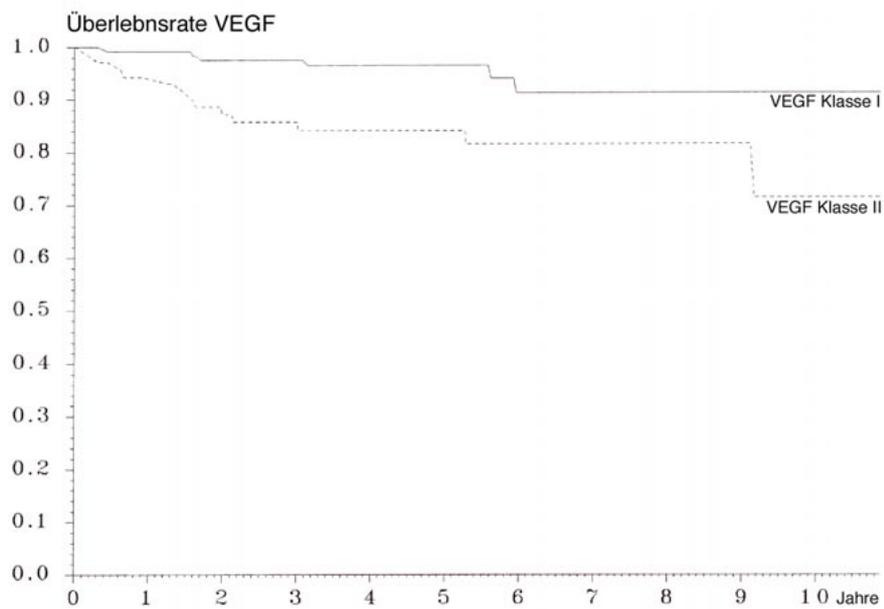


Abb. 18: Überlebensrate als Funktion der Zeit, bezogen auf VEGF Klassen mit point of cut = 20  
Log rank Test  $p = 0,0039^{**}$

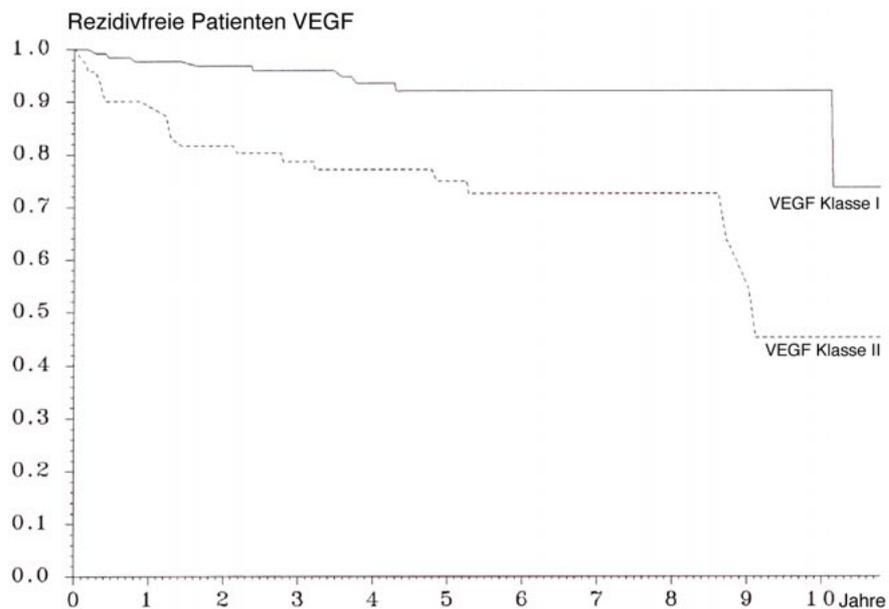


Abb. 19: Rezidivfreie Patienten als Funktion der Zeit, bezogen auf VEGF-Klassen mit point of cut = 20, Log rank Test  $p = 0,000070^{***}$

Prognoseparameter	Gruppen-trennung	Anzahl der Fälle pro Gruppe	Überlebenszeit (p-Wert)	Rezidiv-freie Zeit (p-Wert)
T-Stadium	pT <sub>1</sub> -pT <sub>2</sub> -pT <sub>3</sub>	19/126/55	0,0026**	0,00001***
Grading	I-II-III	18/160/22	0,0039**	0,000018***
VEGF	<=15	96	0,078	0,010*
	>15<100	104		
VEGF	<=20	129	0,0039**	0,00007***
	>20	71		

Tab. 3: p ermittelt aus Kaplan-Meier-plots (log-rank-Test bzw. Test auf einen Trend in Gruppen nach Tarone) \*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ , \*\*\*= $p < 0,001$

VEGF	Wert
Mittelwert	19,73
Standardabweichung	18,57
Standardfehler	1,31
Anzahl	200
Minimum	,00
Maximum	93,20
Fehlende Daten	0
Varianz	344,91
Range	93,20
Summe	3946,01
Quadratsumme	146492,10
Skewness	1,62
Kurtosis	2,99
Median	15,65
Modus	,20

Tab. 4: Statistische Basiswerte der Variable VEGF

#### 4.1.2 Bivariate Prognose

Untersucht wurde ein potentieller Zusammenhang zwischen VEGF und Alter, Geschlecht Tumorstadium, Tumorgröße, Grading, Auftreten eines Rezidiv und Venenbefall im Stadium pT<sub>3</sub>.

Für zwei unverbundene Stichproben wurde der Mann-Withney-U-Test (Weiß 1999) verwendet. Bei einer Stichprobengröße > 2 wurde hingegen der Kruskal-Wallis-Test (Weiß 1999) angewendet. p-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant, p-Werte kleiner 0,001 als hochsignifikant bewertet. Im Folgenden werden die einzelnen Testergebnisse tabellarisch und graphisch dargestellt.

<b>VEGF versus</b>	<b>Test</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Alter</b>	Kuskal-Wallis	0,6161
<b>Geschlecht</b>	Mann-Withney	0,0451
<b>pT</b>	Kuskal-Wallis	0,0115
<b>Grading</b>	Kuskal-Wallis	0,0040
<b>Größe</b>	Kuskal-Wallis	0,0077
<b>Rezidiv</b>	Mann-Withney	0,0023
<b>Veneninfiltration</b>	Mann-Withney	0,1322
<b>Status (NED vs. DOD)</b>	Mann-Withney	0,0339

Tab. 5: Test auf Signifikanz VEGF versus mehrere Parameter, signifikante Ergebnisse sind grau schattiert dargestellt

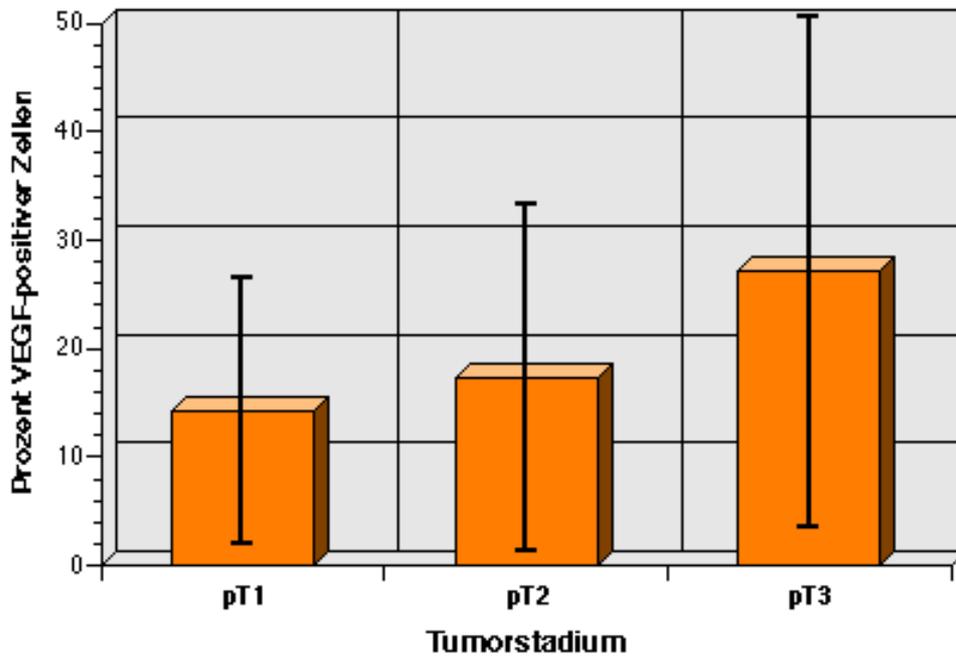


Abb. 20: VEGF und Tumorstadium gemäß UICC; Kruskal-Wallis Test:  $p < 0,05$

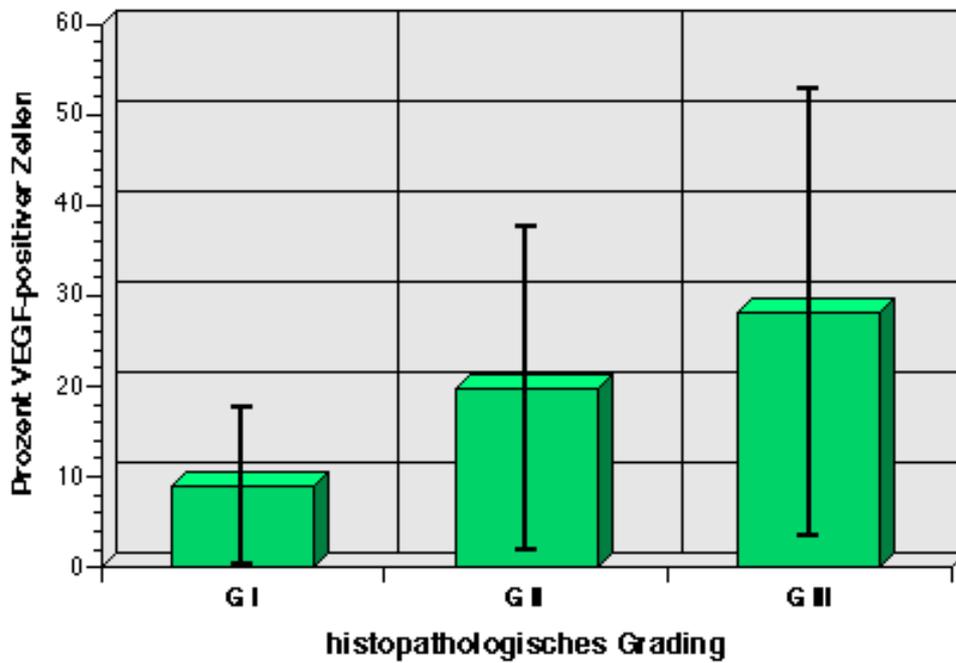


Abb. 21: VEGF und Grading; Kruskal-Wallis Test:  $p < 0,05$

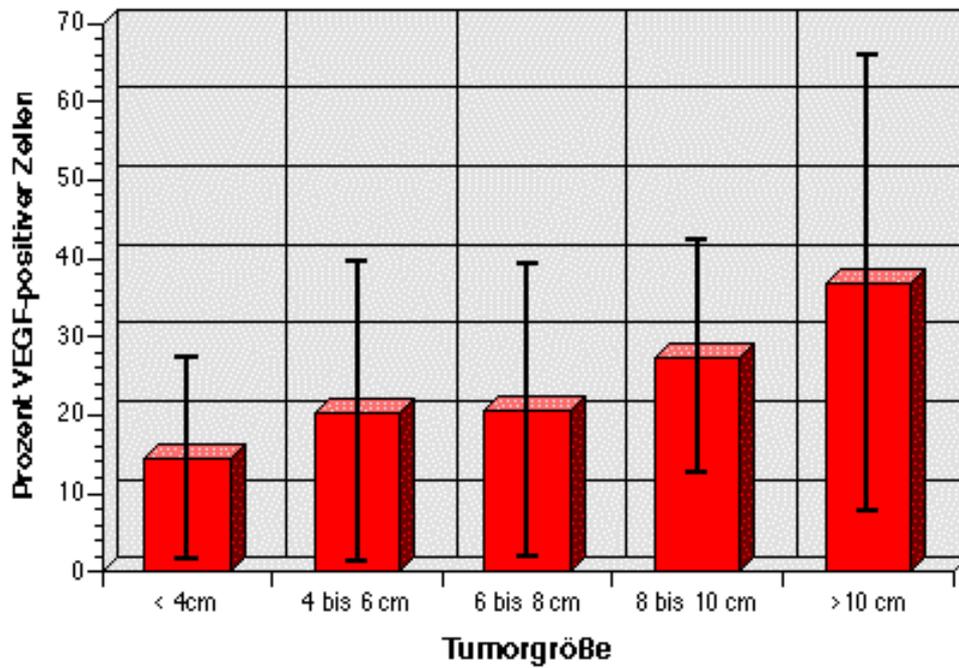


Abb. 22: VEGF und Tumorgröße; Kruskal-Wallis-Test:  $p < 0,01$

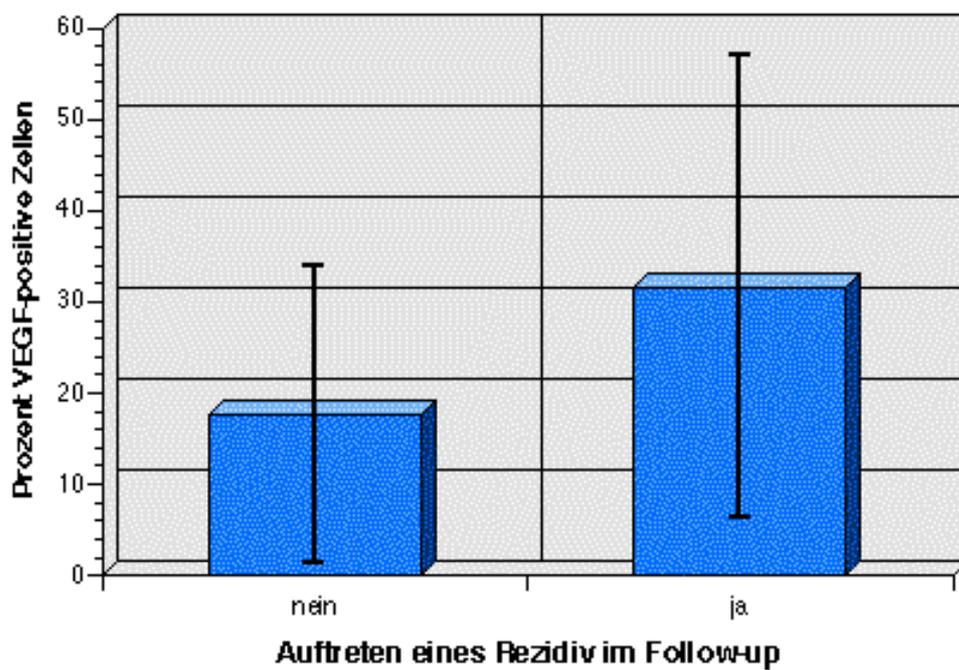


Abb. 23: VEGF und Auftreten eines Tumorrezidiv im Verlauf; Mann-Whitney Test:  $p < 0,01$

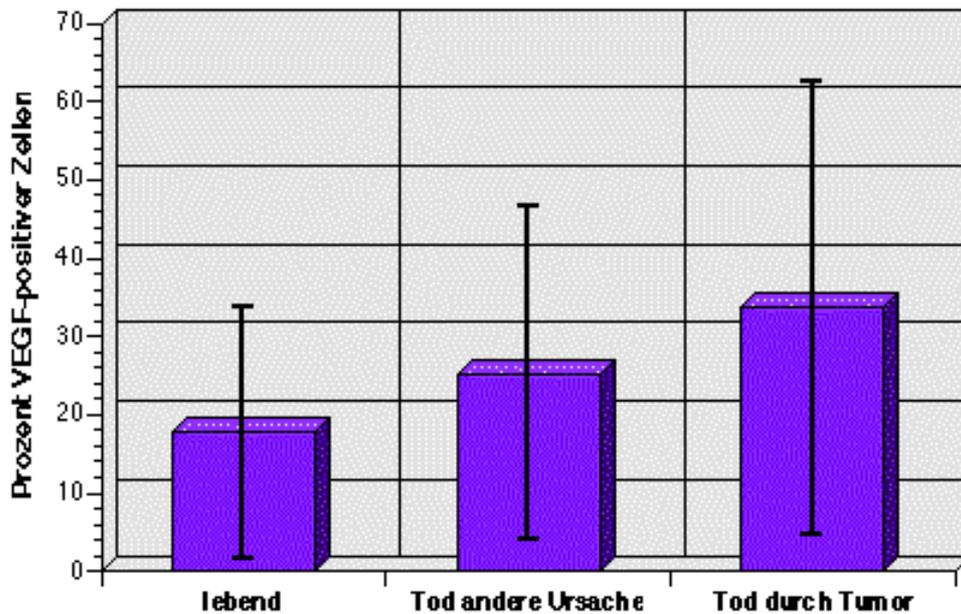


Abb. 24: VEGF und Todesursache; Mann-Whitney-Test Test:  $p < 0,05$

### 4.1.3 Multivariate Prognoseanalyse

#### 4.1.3.1 T-Stadium und Grading

Als Grundlage für die folgenden Berechnungen wurde die multiple Regression zunächst mit den etablierten Prognosefaktoren T und Grading durchgeführt. Dieses Modell war erwartungsgemäß sowohl für das Kriterium Überlebenszeit ( $p = 0,00031^{***}$ ) als auch für das Kriterium rezidivfreie Zeit ( $p = 0,00000^{***}$ ) hoch signifikant. Dabei gibt das beta-Gewicht für die Überlebenszeit Auskunft über den Einfluß des einzelnen Parameters auf die prognostische Bedeutung des Gesamtmodells. Bei T ( $\text{beta} = 1,095$ ) und Grading ( $\text{beta} = 1,158$ ) sind die Gewichte annähernd gleich verteilt.  $p$  ( $\text{beta}$ ) wiederum gibt an, ob das beta-Gewicht der einzelnen Parameter signifikant ist und dadurch einen Beitrag zur Aussagekraft des Parameters auf die Überlebenszeit und die rezidivfreie Zeit leisten kann. Beide Variablen T ( $p$  ( $\text{beta}$ ) =  $0,019^*$ ) und Grading ( $p$  ( $\text{beta}$ ) =  $0,018^*$ ) tragen somit mit gleich hoher Signifikanz, bei einem Signifikanzniveau von  $0,05$  zur Aussagekraft auf die Überlebenszeit und rezidivfreie Zeit bei.

T-Stadium / Grading	Überlebenszeit		Rezidivfreie Zeit	
Variable	beta	p (beta)	beta	p (beta)
T-Stadium	1,095	0,019*	1,336	0,00071***
Grading	1,158	0,018*	1,387	0,00054***
	P (gesamt) = 0,00031***		P (gesamt) = 0,00000***	

Tab. 6: Multiple Regression berechnet für das Modell T und Grading – getrennt im Hinblick auf die Überlebensrate und die rezidivfreie Zeit

**Beta:** Das beta-Gewicht gibt Auskunft über den Einfluß des einzelnen Parameters auf die prognostische Bedeutung des Gesamtmodells.

**P (beta):** p (beta) stellt die statistische Signifikanz des berechneten beta-Gewichts dar. P (beta) entspricht nicht dem p aus der univariaten Prognoseanalyse.

**P (gesamt):** p (gesamt) bezeichnet die statistische Signifikanz des Gesamtmodells.

Das Signifikanzniveau beträgt  $< 0,05$ .

#### 4.1.3.2 T-Stadium und VEGF

Bei der Berechnung der multiplen Regression der Prognosefaktoren T-Stadium und VEGF ergeben sich sehr unterschiedliche Ergebnisse. Dieses Modell war ebenfalls für das Kriterium Überlebenszeit ( $p = 0,00024^{***}$ ) als auch für das Kriterium rezidivfreie Zeit ( $p = 0,00000^{***}$ ) hoch signifikant. Betrachtet man aber das beta-Gewicht für die Überlebenszeit und die rezidivfreie Zeit, so ist festzustellen, daß die Auskunft über den Einfluß des einzelnen Parameters auf die prognostische Bedeutung des Gesamtmodells im wesentlichen vom T-Stadium ( $\text{beta} = 1,172 / 1,489$ ) abhängt. VEGF ( $\text{beta} = 0,024 / 0,023$ ) hat nur einen geringen Einfluß auf die prognostische Bedeutung. p (beta) wiederum, das die Signifikanz des beta-Gewichtes widerspiegelt, zeigt sowohl für das T-Stadium ( $p(\text{beta}) = 0,011^* / 0,00013^{***}$ ) und VEGF ( $p(\text{beta}) = 0,0095^{**} / 0,0026^{***}$ ) eine hohe Signifikanz, bei einem Signifikanzniveau von 0,05. Somit trägt VEGF mit geringem Einfluß, signifikant auf die Aussagen zu Überlebenszeit und rezidivfreier Zeit bei.

T-Stadium / VEGF	Überlebenszeit		Rezidivfreie Zeit	
Variable	beta	p (beta)	beta	p (beta)
T-Stadium	1,172	0,011*	1,489	0,00013***
VEGF	0,024	0,0095**	0,023	0,0026***
	P (gesamt) = 0,00024***		P (gesamt) = 0,00000***	

Tab. 7: Multiple Regression berechnet für das Modell T und VEGF – getrennt im Hinblick auf die Überlebensrate und die rezidivfreie Zeit

**Beta:** Das beta-Gewicht gibt Auskunft über den Einfluß des einzelnen Parameters auf die prognostische Bedeutung des Gesamtmodells.

**P (beta):** p (beta) stellt die statistische Signifikanz des berechneten beta-Gewichts dar. P (beta) entspricht nicht dem p aus der univariaten Prognoseanalyse.

**P (gesamt):** p (gesamt) bezeichnet die statistische Signifikanz des Gesamtmodells.

Das Signifikanzniveau beträgt  $< 0,05$ .

#### 4.1.3.3 Grading und VEGF

Bei der Berechnung der multiplen Regression der Prognosefaktoren Grading und VEGF ergeben sich ähnlich unterschiedliche Ergebnisse wie bei T-Stadium und VEGF. Dieses Modell war ebenfalls für das Kriterium Überlebenszeit ( $p = 0,00036^{***}$ ) als auch für das Kriterium rezidivfreie Zeit ( $p = 0,00000^{***}$ ) hoch signifikant. Betrachtet man das beta-Gewicht für die Überlebenszeit und die rezidivfreie Zeit, so ist festzustellen, daß die Auskunft über den Einfluß des einzelnen Parameters auf die prognostische Bedeutung des Gesamtmodells vorwiegend bei Grading (beta = 1,337 / 1,720) liegt. VEGF (beta = 0,025 / 0,026) hat nur einen geringen Einfluß auf die prognostische Bedeutung. p (beta) wiederum, das die Signifikanz des beta-Gewichtes widerspiegelt, zeigt sowohl für Grading ( $p$  (beta) = 0,0060\*\*/ 0,00001\*\*\*) und VEGF ( $p$  (beta) = 0,0074\*\*/ 0,0013\*\*) eine hohe Signifikanz, bei einem Signifikanzniveau von 0,05. Somit

trägt VEGF mit geringem Einfluß signifikant auf die Aussagen zu Überlebenszeit und rezidivfreier Zeit bei.

Grading / VEGF	Überlebenszeit		Rezidivfreie Zeit	
	beta	p (beta)	beta	p (beta)
Grading	1,337	0,0060**	1,720	0,00001***
VEGF	0,025	0,0074**	0,026	0,0013**
	P (gesamt) = 0,00036***		P (gesamt) = 0,00000***	

Tab. 8: Multiple Regression berechnet für das Modell Grading und VEGF – getrennt im Hinblick auf die Überlebensrate und die rezidivfreie Zeit

**Beta:** Das beta-Gewicht gibt Auskunft über den Einfluß des einzelnen Parameters auf die prognostische Bedeutung des Gesamtmodells.

**P (beta):** p (beta) stellt die statistische Signifikanz des berechneten beta-Gewichts dar. P (beta) entspricht nicht dem p aus der univariaten Prognoseanalyse.

**P (gesamt):** p (gesamt) bezeichnet die statistische Signifikanz des Gesamtmodells.

Das Signifikanzniveau beträgt  $< 0,05$ .

#### 4.1.3.4 T-Stadium, Grading und VEGF

Bei der Errechnung der drei Prognosefaktoren T-Stadium, Grading und VEGF folgt das Ergebnis dem Trend der vorangegangenen Ergebnisse. Dieses Modell war ebenfalls für das Kriterium Überlebenszeit ( $p = 0,00014^{***}$ ) als auch für das Kriterium rezidivfreie Zeit ( $p = 0,00000^{***}$ ) hoch signifikant. Betrachtet man das beta-Gewicht für die Überlebenszeit und die rezidivfreie Zeit, so ist festzustellen, daß die Auskunft über den Einfluß des einzelnen Parameters auf die prognostische Bedeutung des Gesamtmodells vorwiegend bei den etablierten Faktoren T-Stadium ( $\beta = 0,952 / 1,223$ ) und Grading ( $\beta = 1,002 / 1,313$ ) liegt. VEGF ( $\beta = 0,021 / 0,021$ ) hat einen geringeren Einfluß auf die prognostische Bedeutung.  $p$  ( $\beta$ ) wiederum, das die Signifikanz des beta-Gewichtes widerspiegelt, zeigt sowohl für T-Stadium ( $p$  ( $\beta$ ) =  $0,045^* / 0,0020^{**}$ ) Grading ( $p$  ( $\beta$ ) =  $0,046^* / 0,0012^{***}$ ) und VEGF ( $p$  ( $\beta$ ) =  $0,026^* / 0,0074^{**}$ ) eine hohe Signifikanz, bei einem Signifikanzniveau von 0,05. Somit trägt VEGF auch im Vergleich mit den etablierten Prognostikatoren T-Stadium und Grading, nur in geringerem Maße zu einer verbesserten Aussage hinsichtlich Überlebenszeit und rezidivfreier Zeit bei. Wir können hier von einer Verfeinerung der Analyseergebnisse durch VEGF sprechen.

TNM / Grading / VEGF	Überlebenszeit		Rezidivfreie Zeit	
	beta	p (beta)	beta	p (beta)
T-Stadium	0,952	0,045*	1,223	0,0020**
Grading	1,002	0,046*	1,313	0,0012**
VEGF	0,021	0,026*	0,021	0,0074**
	P (gesamt) = 0,00014***		P (gesamt) = 0,00000***	

Tab. 9 Multiple Regression berechnet für das Modell T-Stadium, Grading und VEGF – getrennt im Hinblick auf die Überlebensrate und die rezidivfreie Zeit

#### 4.1.4 Prognoseindizes für Überleben und Rezidiv

Bei der Errechnung von Prognoseindizes für das Überleben ist eine Vergrößerung der Fläche unter der Kurve festzustellen, wenn zu den etablierten Prognosefaktoren T-Stadium und Grading ( Fläche = 0,757260 ) noch die VEGF-Werte ermittelt worden sind (Fläche = **0,8085199**). Diese Aussage trifft in gleichem Maße für die Errechnung von Prognoseindizes für die rezidivfreien Zeit zu. Die Fläche der etablierten Faktoren T-Stadium und Grading von 0,8089147 vergrößerte sich durch Hinzunahme der VEGF-Werte für den rezidivfreien Zeitraum auf **0,8417647**.

Prognose-Index	Fläche	Sensivität	Spezifität	Index-Wert
<b>Überleben</b>				
<b>T-Stadium / Grading</b>	0,757260	68,42%	72,13%	<90,559 vs ≥ 90,559
<b>Überleben</b>				
<b>T-Stadium / VEGF</b>	0,7906368	68,42%	71,27%	<29,254 vs ≥ 29,254
<b>Überleben</b>				
<b>Grading / VEGF</b>	0,7400407	73,68%	66,85%	<25,191 vs ≥25,191
<b>Überleben</b>				
<b>T-Stadium / Grading / VEGF</b>	<b>0,8085199</b>	73,68%	69,06%	<129,295 vs ≥129,295
<b>Rezidiv</b>				
<b>T-Stadium / Grading</b>	0,8089147	76,76%	76,16%	<231,829 vs ≥231,829
<b>Rezidiv</b>				
<b>T-Stadium / VEGF</b>	0,8268627	73,33%	74,11%	<52,826 vs ≥52,826
<b>Rezidiv</b>				
<b>Grading / VEGF</b>	0,7556863	70,00%	71,18%	<57,455 vs ≥57,455
<b>Rezidiv</b>				
<b>T-Stadium / Grading / VEGF</b>	<b>0,8417647</b>	76,67%	74,12%	<542,995 vs ≥542,995

Tab. 10: Flächenwerte der erstellten Prognose-Indizes aus ROC-Kurven

Der Flächenwert (Fläche unter der gekrümmten Linie) der Indizes dieser Tabelle gibt die Qualität des jeweiligen Index wieder. Je näher der Flächenwert des jeweiligen Index bei 1 liegt, desto höher seine Qualität und desto präziser die Aussage, die man unter Gebrauch dieses Index treffen kann.

Der Indexwert gibt den arithmetischen Wert bzw. Werte des jeweiligen Index an, für den bzw. die das beste Gleichgewicht zwischen Sensivität und Spezifität in den ROC-Kurven erreicht wird.

#### 4.1.4.1 Überlebensprognose-Index T-Stadium / Grading

Der Überlebensprognose-Index wurde aus den Parametern T-Stadium und Grading nach der Gleichung **A** (siehe Seite 25) berechnet ( $n = 200$ ). Es ergeben sich Index-Werte zwischen 90,559 und 861,78. Die besten Trennwerte, die das Patientenkollektiv in Gruppen mit guter und schlechter Prognose aufteilen, wurden unter Zuhilfenahme der Receiver Operating Characteristics (ROC)-Kurven ermittelt. Unter Anwendung des Log-rank Tests erwies sich der Überlebensprognose-Index als statistisch hoch signifikanter Prognostikator ( $p = 0,00083^{***}$ ). Patienten in der Indexklasse I mit einem Prognose-Index Wert von  $< 90,559$  (68% der Patienten) überlebten zu 93,8% die ersten zehn Jahre post Op. Patienten in der Indexklasse II mit einem Prognose Index  $\geq 90,559$  (32% der Patienten) zu 67,9% die ersten zehn Jahre nach der Operation.

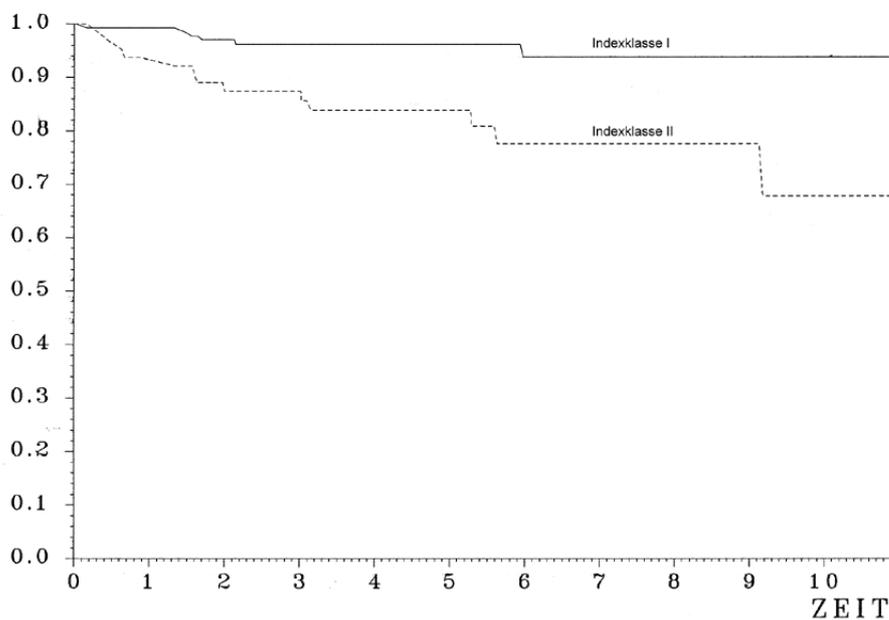


Abb. 25: Überlebensrate als Funktion der Zeit bezogen auf den Überlebens-Prognose-Index von T-Stadium und Grading

#### 4.1.4.2 Überlebensprognose-Index T-Stadium / Grading / VEGF

Der Überlebensprognose-Index wurde aus den Parametern T-Stadium und Grading und VEGF nach der Gleichung **A** (siehe Seite 25) berechnet (n = 200). Es ergeben sich Index-Werte zwischen 129,29 und 2277,9. Die besten Trennungswerte, die das Patientenkollektiv in Gruppen mit guter und schlechter Prognose aufteilen, wurden unter Zuhilfenahme der Receiver Operating Characteristics (ROC)-Kurven ermittelt. Unter Anwendung des Log-rank Tests erwies sich der Überlebensprognose-Index als statistisch hoch signifikanter Prognostikator ( $p = 0,00057^{***}$ ). Patienten mit einem Prognose-Index Wert von  $< 129,29$  (Indexklasse I) überlebten zu 94,2% die ersten zehn Jahre post op. Patienten in der Indexklasse II mit einem Prognose-Index  $\geq 129,29$  zu 67,09% die ersten zehn Jahre nach der Operation.

Daraus läßt sich mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit  $< 5\%$  ableiten, daß Patienten mit einem Prognose-Indexwert I von  $< 129,29$  (64,3% der Patienten) nur ein sehr geringes Risiko besitzen, innerhalb der ersten zehn Jahre nach Nephrektomie tumorbedingt zu versterben.

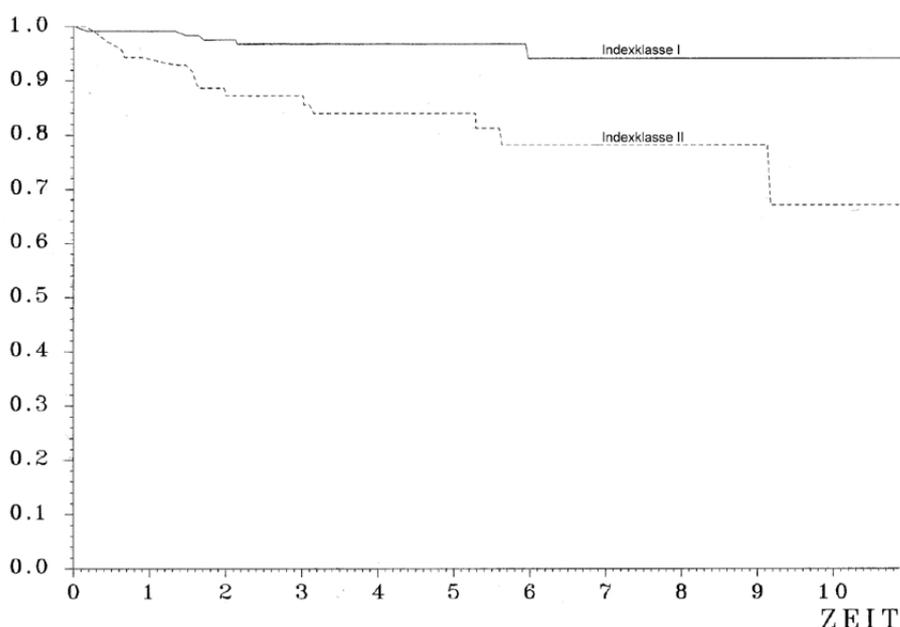


Abb. 26: Überlebensrate als Funktion der Zeit bezogen auf den Überlebens-Prognose-Index von T-Stadium, Grading und VEGF

#### 4.1.4.3 Rezidiv-Prognose-Index T-Stadium / Grading

Der Rezidiv-Prognose-Index für T-Stadium und Grading wurde unter Nutzung der Gleichung A (siehe S. 25) ( $n = 200$ ) berechnet. Es ergaben sich Indexwerte zwischen 231,83 und 3529,8. Die besten Trennungswerte, die das Patientenkollektiv in eine Gruppe mit guter und schlechter Prognose aufteilen, wurde unter Zuhilfenahme der ROC-Kurven ermittelt. Unter Anwendung des log-rank Tests erwies sich der Rezidiv-Prognose-Index als statistisch hoch signifikant ( $p = 0,000059^{***}$ ). Patienten der Indexklasse I mit einem Wert  $< 231,83$  (73% der Patienten) bekamen in den ersten zehn Jahren nach Nephrektomie zu 94,2% kein Rezidiv. Dagegen bekommen 27% der Patienten mit einem Rezidiv-Prognose-Index  $\geq 231,83$  (Indexklasse II) zu 74% in zehn Jahren post operationem ein Rezidiv.

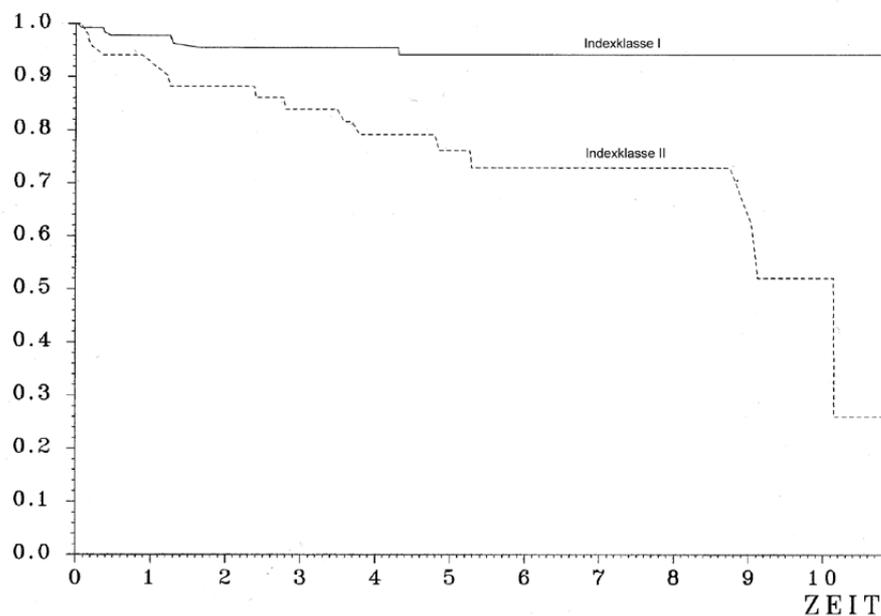


Abb. 27: Überlebensrate als Funktion der Zeit bezogen auf den Rezidiv-Prognose-Index von T-Stadium und Grading

#### 4.1.4.4 Rezidiv-Prognose-Index T-Stadium / Grading / VEGF

Der Rezidiv-Prognose-Index für T-Stadium Grading und VEGF wurde unter Nutzung der Gleichung A (siehe S. 25) ( $n = 200$ ) berechnet. Es ergaben sich Indexwerte zwischen 91 und 569,86. Die besten Trennungswerte, die das Patientenkollektiv in eine Gruppe guter und schlechter Prognose aufteilen, wurde unter Zuhilfenahme der ROC-Kurven ermittelt. Unter Anwendung des log-rank Tests erwies sich der Rezidiv-Prognose-Index als statistisch hoch signifikant ( $p = 0,000002^{***}$ ). Patienten in der Indexklasse I mit einem Wert  $<91$  (68% der Patienten) bekamen in den ersten zehn Jahren nach Nephrektomie zu 93,4% kein Rezidiv. Dagegen bekommen 32% der Patienten in der Indexklasse II mit einem Rezidiv-Prognose-Index  $\geq 91$  zu 80% in zehn Jahren post operationem ein Rezidiv

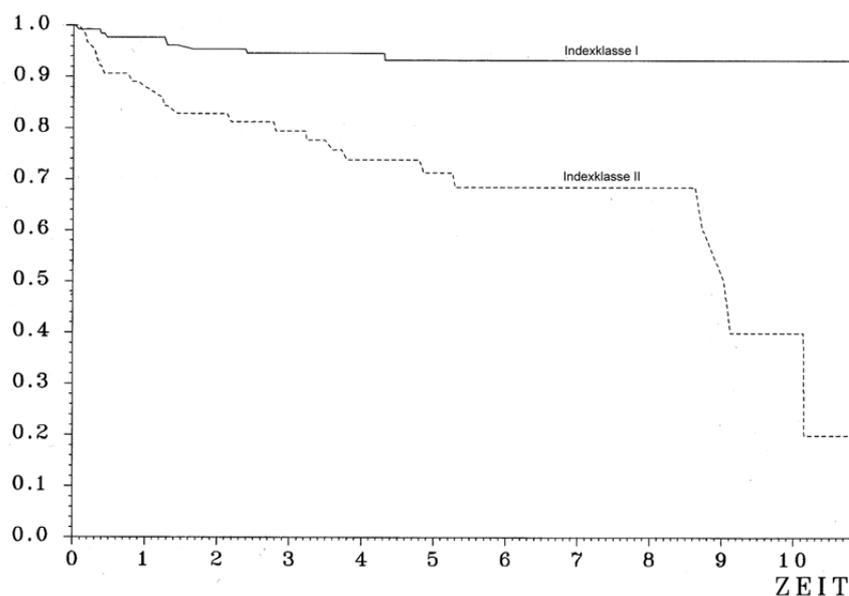


Abb. 28: Überlebensrate als Funktion der Zeit bezogen auf den Rezidiv-Prognose-Index von T-Stadium, Grading und VEGF

## 5. Diskussion

### 5.1 Tumorstadium als Prognosefaktor

Gebräuchliche Staging-Systeme für das Nierenzellkarzinom sind die Klassifikation nach Robson (Robson 1969) für den anglo-amerikanischen Bereich und die in Europa verwendete Einteilung gemäß den Richtlinien der UICC (Spiessl 1990).

Übereinstimmend zeigen mehrere Autoren einen klaren, statistisch hochsignifikanten Zusammenhang zwischen Tumorstadium und der 5-Jahresüberlebensrate, dieser Effekt ist in beiden Klassifikationssystemen nachweisbar (s. Tab. 11).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen bezogen auf 200 Patienten eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 100% bei Vorliegen eines pT<sub>1</sub>-Tumors, von 92% im Stadium pT<sub>2</sub> und von 68% bei einem pT<sub>3</sub>-Tumor. Aussagen zu Patienten im Stadium pT<sub>4</sub> können nicht gemacht werden, da diese Patienten nicht erfaßt wurden. Die gefundenen Ergebnisse stimmen mit publizierten Daten überein. (Hermanek 1989) (Helpap 1987) (Giberti 1997) (van der Poel 1994)

Autor	n	Prognose pT1	Prognose pT2	Prognose pT3	Prognose pT4
(Hermanek and Giedl 1989)	861	86		50	16
(Helpap 1987)	140	100	91	68	50
(Giberti, Oneto et al. 1997)	328	91	71	70	-
(van der Poel 1994)	121	67*	82*	59*	29*
eigene Arbeit (Weingärtner 1999)	200	100	92	68	-

Tab. 11: Zusammenhang zwischen Tumorstadium und 5-Jahresüberlebensrate, Angaben in Prozent (Einteilung nach TNM gemäß UICC); \* nur 3-Jahres-Überlebensrate angegeben.

Autor	n	Prognose Stadium I	Prognose Stadium II	Prognose Stadium III	Prognose Stadium IV
(Robson, Churchill et al. 1969)	88	66	64	42	11
(Skinner, Colvin et al. 1971)	309	65	47	51	8
(Selli 1983)	115	93	63	80	13
(Golimbu, Joshi et al. 1986)	326	88	67	40	2
(Dinney 1992)	314	73	68	51	20
(McNichols 1981)	506	67	51	33,5	13,5

**Tab. 12: Zusammenhang zw. Tumorstadium und 5-Jahresüberlebensrate, Angaben in Prozent (Einteilung n. Robson (Robson 1969))**

Weiterhin von großer prognostischer Bedeutung ist das Vorhandensein von Lymphknoten- und Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Operation. Vielfach wurde in der Literatur ein signifikanter Zusammenhang zwischen Lymphknotenstatus, dem Vorhandensein von Fernmetastasen und Prognose nachgewiesen.

Autor	n	Prognose pN <sub>0</sub>	Prognose pN <sub>1</sub>	Prognose pN <sub>2</sub>	Prognose pN <sub>3</sub>
(Hermanek and Giedl 1989)	861	74	18	20	0
(Basil 1985)	252	76		8	
(Rübben 1994) Sammelstat.	105			24	

**Tab. 13: Prognostische Unetrtschiede der 5-Jahresüberlebensrate von Patienten mit und ohne Lymphknotenmetastasen, Angaben in Prozent**

<b>Autor</b>	<b>n</b>	<b>Prognose M<sub>0</sub></b>	<b>Prognose M<sub>1</sub></b>
(Giberti, Oneto et al. 1997)	328	63	7
(Skinner, Colvin et al. 1971)	309	56	8
(Golimbu 1986)	326	61	2

**Tab. 14: Zusammenhang zwischen Fernmetastasierung und 5Jahres-Überlebensrate, Angabe in Prozent**

Kein Patient der vorliegenden Arbeit hatten zum Zeitpunkt der Operation Lymphknoten- oder Fernmetastasen; solche Patienten wurden ausgeschlossen, da ihre Prognose nicht mehr durch die Tumorbiologie des Primärtumors bestimmt wird, sondern durch eine eventuell differente Tumorbiologie der vorhandenen Metastasen.

## **5.2 Grading als Prognosefaktor**

Die histomorphologische Beschreibung der Tumorzelldifferenzierung, das Gradingssystem, charakterisiert das tumorspezifische Proliferationsverhalten. Skinner (Skinner 1971) führte das Grading (G) auf der Basis der nukleären Morphologie ein und fand eine Korrelation zwischen Grading und Überlebenszeit der Patienten.

Autor	n	Prognose	Prognose	Prognose
		G I	G II	G III
(Selli 1983)	115	93	81	55
(Helpap 1992)	143	100	81	46
(Giberti, Oneto et al. 1997)	328	81	44	24
(Thoenes and S.T. 1991)	358	90	55	20
(Shimazui 1995)	59	88	45	5
Eigene Arbeit (Weingärtner 1999)	200	95	90	50

**Tab. 15 Zusammenhang zwischen histopathologischem Grading und 5-Jahresüberlebensrate, Angabe in Prozent**

Die gefundenen Stadien- und Grading-bezogenen Überlebenswahrscheinlichkeiten korrelieren gut mit der entsprechenden Literatur, so daß das verwendete Krankengut ebenfalls als repräsentativ angesehen werden kann.

Eine systematisch bessere Prognose unserer Patienten läßt sich durch den Ausschluß von Patienten mit Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen erklären.

### **5.3 VEGF als Prognosefaktor**

Das Nierenzell-Ca ist bekannt für sein schlecht vorhersagbares klinisches Verhalten. So können Metastasen in einen spontanen Regress gehen nachdem der Primärtumor entfernt wurde, aber auch Metastasen auftreten viele Jahre nach der operativen Primärtherapie. Diese als „tumor dormancy“ bezeichnete Latenzphase ist wahrscheinlich auf verzögert einsprossende Gefäße („angiogenic switch“) bei bereits primär eingetretener Mikrometastasierung zurückzuführen (Plate 1994). Zwischen Mikrometastasierung durch den Primärtumor und kli-

nisch manifester Metastasierung nach Entfernung des Primärtumor können mehrere Jahre vergehen.

Allgemein wird das klinische Stadium als bester Prognosefaktor angesehen (Skinner 1971). Wie bereits mehrfach ausgeführt sind jedoch weitere Prognosefaktoren dringend erforderlich.

Vielfach wurde bisher ein Zusammenhang zwischen dem Wachstumsverhalten eines primären Nierentumors und seiner Vaskularisation (gemessen als microvessel density (MVD)) postuliert. Die in die MVD gesetzten Erwartungen wurden jedoch nur teilweise erfüllt, so fanden verschiedene Autoren einen positiven Zusammenhang zwischen gemessener MVD und der Prognose für bestimmte Subpopulationen (Nativ 1998, Yoshino 1995), während MacLennan et al. und Herbst et al. einen solchen Zusammenhang für das Nierenzell-Ca nicht herstellen konnten (Herbst 1998, MacLennan and Bostwick 1995).

Für einen weiteren Wachstumsfaktor mit angiogener Potenz, *Platelet-derived Endothelial Cell Growth Factor (PD-ECGF)*, konnte eine eindeutige Korrelation zur MVD und zur Prognose von Patienten hergestellt werden (Imazano 1997). Ähnliche Ergebnisse wurden für den Rezeptor des *Epidermal Growth Factor (EGF-R)* gefunden (Uhlman 1995). Ein hohes EGF-R war signifikant höher bei höhergradigen Tumoren, bei Metastasierung und war mit einer geringeren Überlebensrate korreliert. Für *Tumornekrosefaktor alpha (TNF-a)* konnten Dosquet et al. zeigen, daß normale TNF-a Werte mit einer günstigen Prognose einhergehen. (Dosquet 1997)

VEGF ist ein multifunktionales Cytokin das eine Schlüsselfunktion in der Angiogenese normalen Gewebes, und extrem gesteigert in neoplastischem Gewebe inne hat (Campbell 1997, Dvorak 1995, Folkman 1995, Folkman and Klagsbrun 1987, Marme 1996, Moses 1995, Nicol 1997, Yeo and Dvorak 1995). Unter den angiogenen Faktoren hat es einen herausragenden Stellenwert, da es von nahezu allen soliden Primärtumoren gebildet wird. Es ist in der Lage neue Gefäße zu induzieren und es wirkt ausschließlich an der Endothelzelle. Darüber hinaus wird es in normalen Gefäßen nur in sehr geringem Maß exprimiert, während es

in Gefäßen, die den Tumor penetrieren und umgeben, in erheblichem Maß überexprimiert wird.

Bislang wurden 5 Isoformen des VEGF isoliert, VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub> entsprechend der Anzahl der Aminosäuren des Moleküls. Alle Isoformen werden von dem gleichen Gen kodiert und entstehen durch differentielles Splicing der m-RNA. Der N-Terminus, verantwortlich für die Bindung an den entsprechenden Rezeptor, ist bei allen Isoformen gleich. Alle VEGF-Formen sind daher in der Lage die Proliferation anzuregen. Sie unterscheiden sich hauptsächlich in vivo in ihrer Bioverfügbarkeit (Dreves 2000, Marme 1996).

Bei ischämischen Erkrankungen (AVK/KHK) ist die nachfolgende Kollateralbildung sehr wahrscheinlich auf eine hypoxisch bedingte Hochregulation der VEGF-Produktion zurückzuführen (Folkman 1995, Shweiki 1992, Takeshita 1994).

Analog zur benignen Ischämie führen hypoxische Areale im Tumorgewebe zu einer erhöhten VEGF-m-RNA Expression. So fanden Marmé und Brown durch in-situ-Hybridisierung eine um den Faktor 3 bis 13 erhöhte VEGF-m-RNA Expression in Nekrosearealen eines Nierentumors im Vergleich zu angrenzendem normalen Nierengewebe (Brown 1993, Marme 1996).

Aber auch andere Wachstumsfaktoren, wie *Platelet-derived Growth Factor (PDGF)*, *basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)*, *Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)*, *Tumornekrosefaktor alpha (TNF-a)*, *Transforming Growth Factor alpha* und *beta (TGF-a, TGF-b)* sowie die Zytokine *Interleukin 1b* und *Interleukin 6* stimulieren die Expression von VEGF (Dreves 2000). Zusätzlich wird die VEGF-Expression durch aktivierte Onkogene, wie *raf*, *ras* und *src* stimuliert. Aber auch der Verlust von Tumorsuppressor-Genen erhöht die Transkription des VEGF-Gens (Blankenship 1999, Raak and Mitsuhashi 1995, Rak 1995). Die Redundanz und Komplexität der Regulation erklärt warum VEGF in nahezu allen untersuchten Tumoren gefunden wurde.

Eine Vielzahl von Studien haben eine entscheidende Rolle von VEGF in der Tumorangiogenese demonstriert (Breier 1996, Brown and Detmar 1997, Dvorak 1995, Folkman 1995, Folkman 1995, Marme 1996, Yeo and Dvorak 1995).

Für das Nierenzell-Ca haben Jacobsen et al. gezeigt, daß ein im Serum von Patienten die Isoform VEGF<sub>165</sub> deutlich gegenüber einer Kontrolle erhöht ist (Jacobsen 2000). Sie konnten zusätzlich zeigen, daß mit steigendem VEGF<sub>165</sub> bei gleichem Tumorstadium die Überlebenswahrscheinlichkeit abnimmt. Erstaunlicherweise galt dieser Zusammenhang jedoch nur für Männer, bei weiblichen Patienten bestand kein signifikanter Zusammenhang. Im Rahmen einer Multivarianzanalyse konnte VEGF jedoch nicht als unabhängiger Prognoseparameter bestätigt werden.

Für andere maligne Tumore, wie der Mamma, Lunge oder des ZNS konnte Serum-VEGF durch eine Multivarianzanalyse jedoch als unabhängiger Prognoseparameter bestätigt werden (Linderhol 1998, Salven 1998). Möglicherweise liegt dem Unterschied das verwendete Meßverfahren zugrunde.

Beim Blasenkarzinom konnte ein Zusammenhang zwischen Prognose und Serum-VEGF (Miyake 1999) sowie zwischen Rezidivrate beim oberflächlichem Tumor und im Urin gemessenem VEGF demonstriert werden (Crew 1999, Crew 1999).

Durch in-situ-Hybridisierung kann die VEGF kodierende m-RNA im Gewebe nachgewiesen werden. Mehrfach wurde im Tumorgewebe von Nierenzellkarzinomen eine Überexpression dieser m-RNA-Sequenz gefunden (Berger 1995, Nakagawa 1997, Takahashi 1994). Eine eindeutige Korrelation zwischen dem Ausmaß der Überexpression und Tumor-Stadium, –grading oder –größe wurde zunächst nicht gefunden (Sato 1994, Takahashi 1994). Erst durch eine Unterteilung von VEGF in die 5 Isoformen konnten Tomisawa et al. eine Korrelation von VEGF<sub>189</sub> zum Tumorstadium zeigen (Tomisawa 1999). Für andere Tumor-entitäten sind jedoch eindeutige Korrelationen nachgewiesen (Ishigami 1998, Yuan 2000).

VEGF lässt sich durch immunhistochemische Färbung am Präparat nachweisen und quantifizieren. So konnten Ferrer et al. nachweisen, daß Prostatatumorzellen in hohem Maße VEGF enthalten, während normales Prostatagewebe und BPH-Gewebe kaum VEGF enthalten (Ferrer 1997). Analoge Befunde zeigten sich beim Nierenzell-Ca. Auch hier wird VEGF von normalem Gewebe nicht exprimiert, während im Tumorgewebe und unmittelbar angrenzendem Gewebe eine deutliche Expression stattfindet (Nicol 1997).

Einen signifikanten Zusammenhang zwischen immunhistochemisch nachgewiesenem VEGF und der Prognose bei nichtkleinzelligem Bronchial-Ca der Lunge konnten Imoto et al. nachweisen (Imoto 1998). Paradis et al. konnten diesen Zusammenhang für das Nierenzell-Ca bestätigen (Paradis 2000).

VEGF-Nachweis Methode	Organ / Tumor	Autor	Prognostische Relevanz
Serum - ELISA	Niere	(Jacobsen 2000)	+
	Lunge	(Salven 1998)	+
	Mamma	(Callagy 2000)	+
	Ovar	(Chen 1999)	+
Urin - ELISA	Blase	(Crew 2000)	+
In-situ-Hybridisierung m-RNA	Niere	(Sato 1994)	- / +
		(Takahashi 1994)	
		(Tomisawa 1999)	
	Lunge	(Yuan 2000)	+
Colon	(Ishigami 1998)	+	
Immunhistochemie	Niere	(Paradis 2000)	+
	Lunge	Eigene Arbeit (Imoto 1998)	+

Tab. 16: Prognostische Relevanz unterschiedlicher VEGF-Nachweismethoden

Die Ergebnisse der eigenen Arbeit zeigen in Übereinstimmung mit der Literatur einen signifikanten Zusammenhang zwischen immunhistochemisch gemessenem VEGF und Überleben sowie der rezidivfreien Zeit der Patienten in der univariaten Analyse. Die etablierten Parameter, wie T-Stadium und Grading sind in ihrer Wertigkeit jedoch dem VEGF als Einzel-Item überlegen (s. Tab. 9). Eine weitere Steigerung der Qualität der Vorhersage läßt sich durch Kombination einzelner Parameter wie Staging und Grading erreichen.

Die beste Aussage über die Prognose eines Patienten, bezüglich Überleben und rezidivfreiem Intervall, läßt sich jedoch an Hand einer multivariaten Analyse mit den Parametern T-Stadium, Grading und immunhistochemisch gemessenem VEGF treffen. Die Kombination dieser Variablen zu einem Gesamtmodell ist jeder einzelnen Variable weit überlegen. Das Hauptgewicht liegt auf den etablierten Prognosefaktoren T-Stadium und Grading. Die Hinzunahme von VEGF stellt jedoch eine weitere Verbesserung des Gesamtmodells dar (vgl. Tab. 10). Die Prognose eines Patienten wird durch Anwendung des Gesamtmodells besser vorhersagbar. Risikopatienten können so besser identifiziert und ggf. einer adjuvanten Therapie zugeführt werden.

Es kann ebenfalls eine risikoadaptierte Nachsorge erfolgen, Patienten mit einem hohen Risiko eines Rezidives könnten enger bildgebend überwacht werden und frühzeitig einer operativen Therapie des Rezidives oder der Metastasen zugeführt werden.

Die im Rahmen dieser retrospektiven Analyse gefundenen Prognoseindizes (Kombination aus Tumorstadium, -gradierung und VEGF-Immunhistochemie) lassen eine genauere Abschätzung der Prognose eines Patienten mit Nierenzell-Ca zu. Der Unterschied in der Gewichtung der einzelnen Prognosefaktoren (Stadium, Grading oder VEGF) innerhalb des Gesamt-Index zu Lasten des VEGF liegt möglicherweise in der Selektion organbeschränkter Tumore begründet.

Sie sollten zunächst prospektiv auf ihre Wertigkeit bei allen Tumorstadien (also auch lymphknoten-positive und organüberschreitende sowie metastasierte Tu-

more) überprüft werden. Bestätigt sich der gefundene Zusammenhang, wäre eine weitere Studie mit serologischer Messung des VEGF als Variable sinnvoll.

#### **5.4 *Klinische Relevanz verbesserter Prognosekriterien***

Verlässliche prognostische Parameter erlauben die Unterteilung ob Patienten einer adjuvanten Therapie bedürfen oder nicht. Neben den klassischen Kriterien, wie TNM-Stadium und Grading sind weitere tumorbezogene Parameter zur Entscheidungsfindung wünschenswert.

Die bessere Abschätzung des individuellen Rezidiv- und Progreßrisikos in Form von differenzierenden prognostischen Parametern ist erforderlich zur Durchführung adjuvanter Therapiestudien als auch zur rationellen Durchführung einer risikoadaptierten Nachsorge. Die frühzeitige Detektion eines Rezidives durch gezielten Einsatz bildgebender Verfahren erlaubt gegebenenfalls operative Maßnahmen zur Entfernung isolierter Metastasen oder eines Lokalrezidives.

Zusätzlich könnte VEGF als Verlaufsparemeter eingesetzt werden. So konnte Crew zeigen, daß ein erhöhtes VEGF im Urin von Blasen-tumorpatienten mit einer erhöhten Rezidivneigung und damit schlechterer Prognose einhergeht (Crew 1999). Baccala et al. schlagen Serum-VEGF als Biomarker für den Verlauf von Patienten mit Nierenzell-Ca vor (Baccala 1998). Bei fehlender Organspezifität von VEGF erscheint jedoch die Verwendung als Tumormarker nicht sinnvoll.

#### **5.5 *Therapeutische Ansätze***

Wie bereits ausgeführt, weist die VEGF-Expression eine erhebliche Redundanz auf. Viele Faktoren können die Upregulation von VEGF bewirken. Die Hemmung der Expression, als möglicher therapeutischer Ansatz erscheint deshalb nicht sinnvoll. Vielmehr konzentrieren sich die Bemühungen derzeit auf die beiden bislang identifizierten VEGF-Rezeptoren (VEGF-R1 (FLT-1) und VEGF-2

(KDR/flk)) (Barleon 1997). Hier kommen sowohl Hemmstoffe als auch Konjugate von VEGF-Antikörpern mit einem bakteriellen Toxin zum Einsatz, deren Target die tumoröse Endothelzelle ist. (Boehm 1997, Kim 1993, Plowmann 1994, Shawver 1997). Novartis-Pharma und Schering testen derzeit einen spezifischen VEGF-Rezeptor-(KDR)-Inhibitor (PTK787/ZK222584) im Rahmen einer Phase 2-Studie während Sugen einen spezifischen VEGF-Rezeptor-(FLT-1)-Inhibitor (SU5416) testet (Dreves 2000, Fiedler 2001). Genentech testet einen Anti-VEGF-Antikörper im Rahmen einer Phase 2-Studie beim Nierenzell-Ca (Fiedler 2001).

Hervorzuheben ist jedoch der Wirkmechanismus aller anti-angiogenen Therapieansätze: Die Zielzelle ist die *Endothelzelle* und *nicht die Tumorzelle*. Es ist davon auszugehen, daß durch alleinigen Einsatz von Angiogenese-Inhibitoren nur selten Teil- und Vollremissionen zu erreichen sind. Vielmehr ist das Ziel mit einer Dauertherapie den Progress einer Tumorerkrankung zu verhindern. In Zukunft müssen sicherlich auch Kombinationstherapien aus klassischen Chemotherapeutika und Angiogenese-Inhibitoren getestet werden.

## 6. Zusammenfassung

Die Abschätzung des individuellen Rezidiv- und Progreßrisikos eines Patienten mit einem Nierenzellkarzinom gelingt durch Bestimmung von Staging und Grading nur unzureichend.

Ziel der durchgeführten Untersuchung war es neben etablierten Prognoseparametern wie Staging und Grading eines Nierentumors die VEGF-Immunreaktivität zu untersuchen und auf seine Tauglichkeit zu überprüfen. Hierzu wurden die Parafin-fixierten Präparate von 200 Patienten, die an der Urologischen Universitätsklinik Würzburg zwischen 1985 und 1994 tumor-nephrektomiert wurden, immunhistochemisch untersucht. Zu allen Patienten ist ein postoperativer Verlauf bekannt (mittlere Nachbeobachtungszeit: 58 Monate)

Die Präparate wurden zunächst entparaffiniert und anschließend mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen VEGF beschickt und durch Brückenantikörper zusätzlich markiert. Die entstandenen Antigen-Antikörper-Antikörperkomplexe lassen sich färben und zur Auszählung nutzen (Avidin-Biotin-Methode).

Für jedes Präparat wurde der prozentuale Anteil der VEGF-positiven Zellen im Tumor durch zwei unabhängige Untersucher bestimmt.

Als Maß der Prognose (abhängige Variable) wurden Überlebens- und rezidivfreie Zeit nach Tumornephrektomie gewählt, als prognostische Parameter (unabhängige Variable) dienten etablierte Faktoren wie Staging (TNM) und Grading als auch der potentiell relevante Faktor VEGF.

Neben den etablierten prognostisch relevanten Faktoren Staging und Grading hat sich das im Präparat immunhistochemisch gemessene VEGF als statistisch signifikanter Prognosefaktor erwiesen, ist aber den klassischen Faktoren unterlegen.

Durch eine multivariate Prognoseanalyse nach dem Proportional Hazard Modell (Cox 1972) und die Berechnung von Prognoseindizes sowie Receiver Operating

Characteristics (ROC)-Kurven konnte gezeigt werden, daß die Kombination der etablierten Prognosefaktoren (Staging/Grading) mit VEGF eine statistisch signifikante Steigerung der Vorhersagegenauigkeit erreicht.

Die Bestimmung des individuellen Rezidiv- und Progreßrisikos eines Patienten erlaubt ein riskoadäquates Vorgehen bezüglich möglicher adjuvanter Therapieansätze, auch im Hinblick auf eine risikoadaptierte Nachsorge mit möglichst effizientem Einsatz diagnostischer Maßnahmen.

## 7. Literatur

1. Baccala, A. A. (1998). "Serum vascular endothelial growth factor is a candidate biomarker of metastatic tumor response to ex vivo gene therapy of renal cell cancer." *Urology* 51: 327-31.
2. Banai, S. D. S., A. Pinson, M. Chandra, G. Lazarovici, G. Keshet, E. (1994 b). "Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis." *Cardiovasc Res* 28: 1176-9.
3. Barleon, B. (1997). "Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosinkinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial cells." *Cancer Res* 57: 5421-5.
4. Basil, B. (1985). "Validation of the tumor, nodes and metastasis classification of renal cell carcinoma." *J Urol* 134: 450-4.
5. Berger, D. P. (1995). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human tumor models of different histologies." *Ann Oncol* 6: 817-25.
6. Berkman, R. A. (1993). "Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms." *J Clin Invest* 91: 153-9.
7. Berse, B. (1992). "Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors." *Mol Biol Cell* 3: 211-20.
8. Blankenship, C. (1999). "Alternate choice of initiation codon produces a biologically active product of the von Hippel Lindau gene with tumor suppressor activity." *Oncogene* 18: 1529-35.
9. Boehm, T. (1997). "Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance." *Nature* 390: 404-7.
10. Breier, B. R., W (1996). "The role of vascular endothelial growth factor in blood vessel formation." *Cell Biology* 6: 454 - 456.
11. Brown, L. (1993). "Increased expression of vascular permeability factor (Vascular Endothelial Growth Factor) and its receptors in kidney and bladder." *Am J Pathol* 143: 1255-62.
12. Brown, L. and Detmar, M. (1997). "Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor; A multifunctional angiogenic cytokine." *Regulation of Angiogenesis: Basel, Birkhäuser* 233-269.

13. Brown, L. F. (1995). "Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in bullous pemphigoid, dermatitis herpetiformis, and erythema multiforme." *J Invest Dermatol* 154: 2801-7.
14. Brown, L. F. (1992). "Expression of vascular permeability factor (endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing." *J Exp Med* 176: 1375-79.
15. Campbell, S. (1997). "Advances in Angiogenesis Research: Relevance to Urological Oncology." *J Urol* 158: 1663 - 74.
16. Charnok Jones, D. S. (1993). "Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines." *Biol Reprod* 48: 1120-8.
17. Cox, D. R. (1972). "Regression models and life-table." *J Stat Soc B* 34: 187-220.
18. Crew, J. P. (1999). "Vascular endothelial growth factor: an important angiogenic mediator in bladder cancer." *Eur Urol* 35: 2-8.
19. Crew, J. P. (2000). "Eukaryotic initiation factor-4E in superficial and muscle invasive bladder cancer and its correlation with vascular endothelial growth factor expression and tumour progression." *Br J Cancer* 82: 161-6.
20. Crew, J. P. (1999). "Urinary vascular endothelial growth factor and its correlation with bladder cancer recurrence rates." *J Urol* 161: 799-804.
21. De Vries, C. (1992). "The fms tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor." *Science* 255: 989-91.
22. Detmar, M. (1994). "Overexpression of vascular permeability factor and its receptors in psoriasis." *J Exp Med* 180: 1141-6.
23. Dineen, M. K. (1988). "Results of surgical treatment of renal cell carcinoma with solitary metastasis." *J Urol* 140: 277-9.
24. Dinney, C. P. (1992). "Analysis of imaging modalities, staging systems, and prognostic indicators for renal cell carcinoma." *Urology* 39: 122-9.
25. Dosquet, C. (1997). "Are angiogenic factors, cytokines, and soluble adhesion molecules prognostic factors in patients with renal cell carcinoma?" *Clin Cancer Res* 3: 2451-8.
26. Drevs, J. (2000). "Angiogenese-Inhibition. Von der Prälinik zur klinischen Studie." *Arzneimitteltherapie* 18: 246-9.
27. Dvorak, H. F. (1995). "Vascular Permeability Faktor/Vascular Endothelial Growth Factor, Microvascular Hyperpermeability, and Angiogenesis." *Am J Pathol* 146: 1029-39.
28. Dvorak, H. F. (1991). "Structure of solid tumors and their vasculature: Implications for therapy with monoclonal antibodies." *Cancer Cells* 3: 77-85.

29. Feng, D. (1996). "Vesiculo-vacuolar organelles and the regulation of venule permeability to macromolecules by vascular permeability factor, histamine, and serotonin." *J Exp Med* 183: 1981-6.
30. Ferrer, F. A. (1997). "Vascular endothelial factor (VEGF) expression in human prostate cancer: in situ and in vitro expression of VEGF by human prostate cancer cells." *J Urol* 157: 2329-33.
31. Fiedler, W. (2001). "Neoangiogenese und Tumorwachstum." *Dt Ärztebl* 98: A 1392-4.
32. Finkenzeller, G. (1992). "Platelet-derived growth factor-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is mediated by protein kinase C." *Cancer Res* 52: 4821-3.
33. Folkman, J. (1995). "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." *Nature Medicine* 1: 27 - 30.
34. Folkman, J. (1995). "Clinical applications of research on angiogenesis." *The New England Journal of Medicine* 333: 1757 - 1763.
35. Folkman, J. (1995). "Tumor Angiogenesis." *The Molecular Basis of Cancer*: , Saunders 206 - 232.
36. Folkman, J. and Klagsbrun, M. (1987). "Angiogenic factors." *Science* 235: 442 -7.
37. Folkman, J. W., K; Ingber, D; Hanahan, D (1989). "Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia." *Nature* 339: 58 - 61.
38. Folkmann, J. (1971). "Tumorangiogenesis: therapeutic implications." *N Engl J Med* 285: 1182-6.
39. Frank, I. (1995). "Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing." *J Biol Chem* 270: 12607-13.
40. Giberti, C. (1997). "Radical nephrectomy for renal cell carcinoma: long-term results and prognostic factors on a series of 328 cases." *Eur Urol* 31: 40-8.
41. Goepel, M. and Rübber, H. (1991). "Adjuvant therapy in renal cancer." *World J Urol* 9: 232-6.
42. Golimbu, M. (1986). "Renal cell carcinoma: Survival and prognostic factors." *Urology* 27: 291-5.
43. Grischke, E. M. (1994). "Angiogenesis as a diagnostic factor in primary breast cancer. Microvessel quantification by stereological methods and correlation with color Doppler sonography." *Onkologie* 17: 35-42.

44. Helpap, B. (1987). "Morphologie und Klinik von Nierentumoren." *Extracta Urologica* 10: 176-205.
45. Helpap, B. (1992). "Grading and prognostic significance of urologic carcinomas." *Urol Int* 48: 245-57.
46. Herbst, C. (1998). "Evaluation of microvessel density by image analysis in human renal cell carcinoma. Correlation to stage, nuclear grade, proliferation and metastasis." *Clin Oncol Cancer Res* 124: 141-7.
47. Hermanek, P. and Giedl, J. (1989). "Die prognostische Aussagekraft der neuen pTNM Klassifikation und Stadieneinteilung des Nierenkrebses." *Verh Dtsch Ges Pathol* 73: 415-7.
48. Houck, K. (1992). "Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms." *J Biol Chem* 267: 1474-80.
49. Imazano, Y. (1997). "Correlation between thymidine phosphorylase expression and prognosis in human renal cell carcinoma." *J Clin Oncol* 15: 2570-8.
50. Imoto, H. (1998). "Vascular endothelial growth factor expression in non-small-cell lung cancer: prognostic significance in squamous cell carcinoma." *J Thorac Cardiovasc Surg* 115: 1007-14.
51. Ishigami, S. I. (1998). "Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer." *Br J Cancer* 78: 1379-84.
52. Jacobsen, J. (2000). "Vascular endothelial growth factor as prognostic factor in renal carcinoma." *J Urol* 163: 343-7.
53. Jakeman, L. (1992). "Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues." *J Clin Invest* 89: 244-53.
54. Kaplan, E. and Meier, P. (1958). "Nonparametric estimation from incomplete observations." *J Am Stat Assoc* 53: 457-81.
55. Kim, K. J. (1993). "Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo." *Nature* 362: 841-4.
56. Koos, R. (1995). "Increased expression of vascular growth/ permeability factor in the rat ovary following an ovulatory gonadotropin stimulus potential roles in follicle rupture." *Biol Reprod* 52: 1426-35.
57. Kugler, A. (2000). "Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids." *Nature medicine* 6: 332-6.

58. Ladoux, A. and Frelin, C. (1993). "Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart." *Biochem Biophys Res Commun* 195: 1005-10.
59. Levy, A. P. (1995). "Transcription regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia." *J Biol Chem* 270: 1333-40.
60. Li, J. (1996). "VEGF, Flk-1 and Flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis." *Am J Physiol* 270: 1803-11.
61. Linderhol, B. (1998). "The vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma." *J Clin Oncol* 16: 3121-4.
62. MacLennan, G. T. and Bostwick, D. G. (1995). "Microvessel density in renal cell carcinoma: lack of prognostic significance." *Urology* 46: 27-30.
63. Malek, R. S. and Omess, P. J. (1987). "Renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau-Syndrome." *Am J Med* 82: 236-40.
64. Marme, D. (1996). "Tumor angiogenesis: the pivotal role of endothelial growth factor." *World J Urol* 14: 166-74.
65. McNichols, D. W. (1981). "Renal cell carcinoma: Long-term survival and late recurrence." *J Urol* 126: 17-21.
66. Miyake, H. (1999). "Elevation of serum level of vascular endothelial growth factor as a new predictor of recurrence and disease progression in patients with superficial urothelial cancer." *Urology* 53: 302-7.
67. Morii (1993). "Expression of vascular endothelial growth factor in capillary hemangioplastoma." *Biochem Biophys Res Commun* 194: 749-755.
68. Moses, M. (1995). "The Role of Growth Factors in Vascular Cell Development and Differentiation." *Inter Revi Cyto* 161: 1 - 48.
69. Murata, T. (1995). "Vascular endothelial growth factor plays a role in hyperpermeability of diabetic retinal vessels." *Opht Res* 27: 48-52.
70. Naish, S. (1989). "Handbuch immunchemischer Färbemethoden II: Carpinteria, Kalifornien, USA, DAKO Cooperation 9 -27.
71. Nakagawa, M. (1997). "Tubulogenesis by microvascular endothelial cells is mediated by vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal cell carcinoma." *Br J Urol* 79: 681-7.
72. Nativ, O. (1998). "Clinical significance of tumor angiogenesis in patients with localized renal cell carcinoma." *Urology* 51: 693-6.
73. Nicol, D. (1997). "Vascular endothelial growth factor expression increases in renal cell carcinoma." *J Urol* 157: 1482 -6.

74. Olander, J. (1991). "Specific binding of vascular permeability factor to endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* 175: 68-76.
75. Paradis, V. (2000). "Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas." *Virchows Arch* 436: 351-6.
76. Plate, K. H. (1994). "Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis." *Brain Pathol* 4: 207-18.
77. Plate, K. H. (1992). "Vascular endothelial growth factor is a potential tumor angiogenesis factor in human gliomas in vivo." *Nature* 359: 845-8.
78. Plowmann, G. D. (1994). "Receptor tyrosin kinases as targets for drug intervention." *Drugs News Perspect* 7: 334-9.
79. Raak, J. and Mitsuhashi, Y. (1995). "Mutant ras oncogenes upregulate VEGF, VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis." *Cancer Res* 55: 4575.
80. Rak, J. (1995). "Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/ VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis." *Cancer Res* 55: 4575-80.
81. Robson, C. J. (1969). "The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma." *J Urol* 101: 297-301.
82. Rübber, H. (1994). "Uroonkologie: Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Springer 22 - 50.
83. Salven, P. (1998). "High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer." *Int J Cancer* 79: 144-6.
84. Samoto, K. (1995). "Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors." *Cancer Res* 55: 1189-93.
85. Sato, K. (1994). "Frequent overexpression of vascular endothelial growth factor gene in human renal cell carcinoma." *Tohoku J Exp Med* 173: 355-8.
86. Selli, C. (1983). "Stratification of risk factors in renal cell carcinoma." *Cancer* 52: 899-904.
87. Senger, D. R. (1993). "Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology." *Cancer Metastasis Rev* 12: 303-24.
88. Shawver, L. K. (1997). "Receptor tyrosin kinases as targets for inhibition of angiogenesis." *Drug Disc Today* 2: 50-63.
89. Shimazui, T. (1995). "A prognostic significance of nucleolar organizer region (AgNOR) in renal cell carcinoma." *J Urol* 154: 1522-6.

90. Shweiki, D. (1992). "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis." *Nature* 359: 843-5.
91. Sioussat, T. (1993). "Inhibition of vascular permeability factor (VEGF) with anti-peptide antibodies." *Arch Biochem Biophys* 301: 15-20.
92. Skinner, D. G. (1971). "Diagnosis and management of renal cell carcinoma: A clinical and pathologic study of 309 cases." *Cancer* 28: 1165-72.
93. Spiessl, B. (1990). "TNM-Atlas: Berlin, Springer 250 -8.
94. Takahashi, A. (1994). "Markedly increased amounts of messenger RNAs for vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in renal cell carcinoma associated with angiogenesis." *Cancer Res* 54: 4233-7.
95. Takeshita, S. (1994). "A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularisation in a rabbit ischemic hind limb model." *J Clin Invest* 93: 662-70.
96. Tarone (1975). "Test for trend in life table analysis." *Biometrika* 62: 679-682.
97. Thoenes, W. and S.T., S. (1991). "Die Pathologie der benignen und malignen Nierenzell-tumoren." *Urologe A* 30: 41-50.
98. Thoenes, W. (1986). "Histopathology of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas): the basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics." *Pathol Res Pract* 181: 125-43.
99. Tomisawa, M. (1999). "Expression pattern of vascular endothelial growth factor isoform is closely correlated with tumour stage and vascularisation in renal cell carcinoma." *Eur J Cancer* 35: 133-7.
100. Uhlman, D. L. (1995). "Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in papillary and nonpapillary renal cell carcinoma: correlation with metastatic behavior and prognosis." *Clin Cancer Res* 1: 913-20.
101. van der Poel, H. G. (1994). "Tumor heterogeneity as prognostic factor in patients with low-stage (T1-3N0M0) renal-cell carcinoma." *Investig Urol Berl* 5: 60-5.
102. Viores, S. A. (1995). "Blood-ocular barrier breakdown in eyes with ocular melanoma. A potential role for vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor." *Am J Pathol* 147: 1289-97.
103. Weidner, N. and Carroll, P. (1993). "Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma." *Am J Path* 143: 401-4.
104. Weidner, N. (1992). "Tumorangiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma." *J Natl Cancer Inst* 84: 1875-87.

105. Weindel, K. (1994). "Detection and quantification of vascular endothelial growth factor/vascular permeability in brain tumor tissue and cyst fluid: the key to the angiogenesis?" *Neurosurgery* 35: 439-48.
106. Weingärtner, K. (1999). "Vascular Endothelial Cell Growth Factor (VEGF)-Immunoreactivity in Renal Cell Carcinoma (RCC)." *J. Urol.* 161 (4): 148.
107. Weiß, C. (1999). "Basiswissen Medizinische Statistik: Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.
108. Wizigmann-Voos, S. (1995). "Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in von Hippel-Lindau disease-associated and sporadic hemangioblastomas." *Cancer Res* 55: 1358-64.
109. Yeo, T. and Dvorak, H. (1995). "Tumor Stroma." *Diagnostic Immunopathology: New York, Raven Press* 685-97.
110. Yoshino, S. (1995). "Prognostic significance of microvessel count in low stage renal cell carcinoma." *Int J Urol* 2: 156-60.
111. Yuan, A. (2000). "Correlation of total VEGF mRNA and protein expression with histologic type, tumor angiogenesis, patient survival and timing of relapse in non-small-cell lung cancer." *Int J Cancer* 89: 475-83.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H. Riedmiller und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. K. Weingärtner danke ich für die Überlassung des Themas und die mir gewährte Unterstützung bei der Ausarbeitung. Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. A. Marx für die Erstellung des Gutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. U. Köhl, der mir stets unermüdlich bei Fragen und Problemen mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ich danke weiterhin der medizinisch-technischen Assistentin im Labor der Urologischen Klinik Frau B. Dexler, die mich mit grosser Geduld in die Methoden der Immunhistochemie einarbeitete. Herrn Dr. med. M. Heuschmid sei für die ausführliche Heranführung an die statistische Vorgehensweise gedankt.

# **L e b e n s l a u f**

## **Persönliche Daten**

Name, Vorname	Kruchten, Birgit
Strasse	Hettenrodter Strasse 3
PLZ / Wohnort	55743 Idar-Oberstein
Geburtsdatum	11.6.1961 in Bilsdorf
Familienstand	verheiratet

## **Schulbildung**

1967 - 1971	Grundschule in Bilsdorf
1971 - 1972	Hauptschule in Nalbach
1972 - 1982	Staatliches Gymnasium in Dillingen

## **Hochschulausbildung**

1982 - 1983	Studium der katholischen Theologie, Geschichte und Romanistik an der Johannes Gutenberg Universität Mainz
1983 - 1990	Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg Universität Mainz
1986	Physikum
1987	Erstes Staatsexamen
1989	Zweites Staatsexamen
1990	Drittes Staatsexamen

## **Ärztliche Ausbildung**

- 1991 – 1993 Assistenzärztin in der Praxis für Laboratoriums-  
medizin Drs. Albath, Riegel und Partner in  
Wiesbaden
- 1994 – 1995 Assistenzärztin in der Klinik für Hämatologie,  
Onkologie und Knochenmarktransplantation  
in Idar-Oberstein Prof. Dr. A. Fauser
- 1996 - 2000 Assistenzärztin in der Abteilung Anästhesiologie  
und operative Intensivmedizin der Städt. Kranken-  
anstalten in Idar-Oberstein Dr. E. A. Göbel
- 2000 – 2001 Fachärztin für Anästhesiologie in der Abteilung  
Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der  
Städt. Krankenanstalten in Idar-Oberstein Dr. E. A.  
Göbel

Idar-Oberstein, im September 2001