

Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. H. Riedmiller

**Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor)  
beim Urothelkarzinom der Harnblase –  
Eine vergleichende Untersuchung histologischer Präparate  
nach Transurethraler Resektion und nach Cystektomie**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Ines Doris Bendig  
aus Ludwigsburg

Würzburg, März 2003

Referent: Prof. Dr. med. H. Riedmiller

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. G. Ott

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Mai 2004

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern  
in größter Dankbarkeit

**Inhaltsverzeichnis:**

Seite:

<b>I.</b>	<b>Einleitung</b>	1
<b>1.1</b>	<b>Harnblasenkarzinom</b>	3
1.1.1	Inzidenz und Epidemiologie	3
1.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren	4
1.1.3	Makropathologie	6
1.1.4	Mikropathologie	8
1.1.5	TNM-Klassifikation	9
<b>1.2</b>	<b>Angiogenese</b>	11
<b>1.3</b>	<b>Angiogenesefaktoren</b>	13
1.3.1	Angiogenese-stimulierende Faktoren	13
1.3.2	Angiogenese-inhibierende Faktoren	14
<b>1.4</b>	<b>Vascular Endothelial Growth Factor</b>	15
1.4.1	VEGF-Expression beim Harnblasenkarzinom	16
1.4.2	VEGF-Expression bei anderen Malignomen	17
<b>II.</b>	<b>Material und Methode</b>	18
<b>2.1</b>	<b>Patientengut</b>	18
<b>2.2</b>	<b>Aufbereitung der Gewebeschnitte</b>	22
2.2.1	Gewebsmaterial	22
2.2.2	Auswahl des Färbeverfahrens	22
2.2.3	Antikörper	22
2.2.3.1	Primärantikörper VEGF	22
2.2.3.2	Brückenantikörper MAK	23
2.2.4	Färbeverfahren	23

	Seite:
<b>2.3</b>	<b>Methodik der lichtmikroskopischen Auswertung</b> 26
<b>2.4</b>	<b>Methodik der Aktenauswertung</b> 27
<b>2.5</b>	<b>Statistische Methodik</b> 27
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse</b> 28
<b>3.1</b>	<b>Auswertung der TUR-B-Präparate</b> 28
3.1.1	Auswertung der TUR-B-Präparate nach Stadien 28
3.1.2	Auswertung der TUR-B-Präparate nach Grading 30
3.1.3	Auswertung der TUR-B-Präparate – Vergleich Stadien zu Grading 32
3.1.4	Auswertung der TUR-B-Präparate – Vergleich Grading zu Stadien 36
<b>3.2</b>	<b>Auswertung der Cystektomie-Präparate</b> 40
3.2.1	Auswertung der Cystektomie-Präparate nach Stadien 40
3.2.2	Auswertung der Cystektomie-Präparate nach Grading 45
3.2.3	Auswertung der Cystektomie-Präparate – Vergleich Stadien zu Grading 47
3.2.4	Auswertung der Cystektomie-Präparate – Vergleich Grading zu Stadien 51
3.2.5	Auswertung der Cystektomie-Präparate bezüglich Lymphangiosis und Hämangiosis carcinomatosa 54
3.2.6	Auswertung der Cystektomie-Präparate bezüglich lymphogener Metastasierung 55

3.2.7	Auswertung der Cystektomie-Präparate bezüglich hämatogener Metastasierung	58
<b>3.3</b>	<b>Auswertung der Präparate – Vergleich TUR-B zu Cystektomie</b>	61
<b>3.4</b>	<b>Morphologische Klassifikation</b>	63
3.4.1	Lokalisation der Tumore	63
3.4.2	Lymphknotenbefall	64
3.4.3	Histologische Deskription	64
<b>3.5</b>	<b>Klinische Aktenauswertung</b>	65
3.5.1	Risikofaktoren	65
3.5.2	Erstsymptome	65
3.5.3	Metastasierung	66
3.5.4	Harnableitung	66
3.5.5	Follow-up	67
<b>IV.</b>	<b>Diskussion</b>	68
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	78
<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	80
	<b>Danksagung</b>	
	<b>Lebenslauf</b>	

## **I. Einleitung**

In den letzten Jahren gewannen die Angiogenese und deren Wachstumsfaktoren zunehmend an Bedeutung. Vor allem der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF/VPF) ist seit 1989 Gegenstand vieler Forschungsprojekte (42,46).

Neben dessen physiologischer Rolle bei der Embryonalentwicklung, dem Menstruationszyklus oder auch bei der Wundheilung kommt dem VEGF eine wichtige Rolle in der Pathologie verschiedenster Krankheiten zu: unter anderem bei Rheumatoider Arthritis, Proliferativer Retinopathie, Makuladegeneration, Psoriasis und vor allem auch bei Malignomen (3,23,55).

Die Angiogenese wird als Grundvoraussetzung für das Tumorwachstum (39) und die Metastasierung – wie es beispielsweise beim invasiven Mamma-Ca gezeigt werden konnte – angesehen (69). Ferner erhofft man sich von der Erforschung der Angiogenesestimulatoren bzw. -inhibitoren verbesserte Möglichkeiten in der Behandlung von Karzinompatienten (68). Im Tiermodell konnte durch Behandlung mit monoklonalen Anti-VEGF-Antikörpern bereits eine Hemmung des Tumorwachstums von Rhabdomyosarkom-, Glioblastom- und Leiomyosarkomzellen erreicht werden (43,55).

Insbesondere beim Harnblasenkarzinom ist die Wachstums- und Proliferationstendenz schwierig zu beurteilen (35,41). Standardkriterien wie Staging und Grading erweisen sich oftmals als unzureichend, da Tumoren mit ähnlichen Stadien unterschiedliche klinische Verläufe zeigen können (39).

Zur Abschätzung der Wachstums- und Progressionstendenz ist daher die Erforschung neuer diagnostischer Möglichkeiten – auch zur Auswahl einer adäquaten Therapie – wichtig.

Folgenden Fragen sollen mit vorliegender Arbeit beantwortet werden.

1. Existiert eine Beziehung zwischen der Expression von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und dem Tumorstadium?
2. Korreliert die Expression von VEGF mit dem Tumorgrading?
3. Welche Bedeutung kommt VEGF bezüglich lymphogener und hämatogener Metastasierung zu ?
4. Ergeben die Untersuchungen der Präparate nach transurethraler Resektion bzw. nach Cystektomie vergleichbare Ergebnisse?
5. Ergeben sich durch die durchgeführte Untersuchung Hinweise auf neue Therapieoptionen?



## 1.1 Harnblasenkarzinom

### 1.1.1 Inzidenz und Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom macht ca. 2 % aller Malignome aus. In den USA treten jährlich 50.000 Neuerkrankungen auf, es kommt zu fast 10.000 Todesfällen pro Jahr (58). Das sind ca. 1,9 % aller Krebstoten in den USA (4). Für Europa werden in der Literatur 3,5 % aller Krebstoten angegeben (1). Das Harnblasenkarzinom ist der fünfthäufigste Tumor, hinter dem Lungen-, Prostata- und Kolonkarzinom der vierthäufigste beim Mann und der zehnthäufigste bei der Frau (34). Ebenso ist es die zweithäufigste Todesursache aller urogenitalen Tumoren (62).

Die Inzidenz ist abhängig von Alter, Geschlecht und ethnisch-geographischen Variablen (58) und in industrialisierten Ländern höher als in ländlichen Regionen (34). In den USA liegt sie bei weißen Männern bei 27/100.000, bei schwarzen Männern bei 10/100.000 und bei Frauen allgemein bei 9/100.000 (58). Für die Bundesrepublik Deutschland werden beim Mann 30, bei der Frau acht neue Fälle pro Jahr auf 100.000 Einwohner angegeben, das bedeutet rund 16.000 neue Fälle pro Jahr (34). Männer sind somit im Schnitt dreimal so häufig betroffen wie Frauen (57).

In den USA und Europa liegt die Inzidenz vergleichsweise deutlich höher als zum Beispiel in Asien.

Europas höchste Mortalitätsrate liegt in Dänemark mit 9,7/100.000 für Männer und 2,8/100.000 für Frauen (58). Generell gesehen liegt die Mortalitätsrate in Mitteleuropa bei 5,5/100.000 (57) und blieb in den letzten 30 Jahren annähernd gleich.

Die höchste Anzahl an Neuerkrankungen tritt zwischen dem 60.-80. Lebensjahr auf, nur 5 % aller Patienten sind bei der Erstdiagnose jünger als 45 Jahre (58).

Die 5-JÜR wird für pT1 G2 oder G3-Tumoren mit 90 % angegeben (1). Für das Stadium pT2 N0 M0 liegt die 5-JÜR nach radikaler Operation bei 60-75 % und für das Stadium pT3 N0 M0 bei 20-36 %. Das ergibt 50-55 % bei muskelinfiltrierenden Tumoren (50). Bei pT4-Tumoren oder stattgehabter Fernmetastasierung liegt die mittlere Überlebenszeit bei sechs Monaten (1).

### 1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Bei der Ätiologie des Harnblasenkarzinoms spielen viele chemische Verbindungen eine entscheidende Rolle: Nitrosamine, aromatische Amine, Nitroaromaten, anorganisches Arsen, Alkylanzien, Phenacetin (32).

Die berufliche Exposition mit diesen Stoffen geht mit einer deutlich erhöhten Rate an Harnblasenkarzinomen einher. Ein erhöhtes Risiko besteht insbesondere für Beschäftigte in folgenden Berufsgruppen: Farb-, Gummi-, Leder-, Kohle-, Aluminiumindustrie, Textil-, Druckereiarbeiter, Maler und Friseur (58).

Im Tierversuch induzierten hydrophile Nitrosamine nach oraler Applikation Urothelneoplasien. Insbesondere bei dem Dimethylnitrosamin wird eine Karzinogenität vermutet. Dieses zerfällt nach Hydroxylierung in ein Carbenium-Ion, welches die Urothel-DNA schädigt.

Bereits 1895 wurde ein Zusammenhang von Blasenkrebsfällen und beruflicher Exposition gegenüber aromatischen Aminen festgestellt. Bisher konnten im Tierversuch 11 Aromatische Amine als hochpotent karzinogen identifiziert werden, z.B. Benzidin und seine Derivate, 2-Naphthylamin, 4-Aminobiphenyl (32). Diese chemischen Verbindungen werden nach entsprechender Bioaktivierung, Sulfatierung und Glucuronisierung harngängig und im Harntrakt durch die Uringlucuronidase als aktive Kanzerogene freigesetzt (54). Die durchschnittliche Latenz, ein Blasenkarzinom zu entwickeln, liegt bei 20-30 Jahren, bei einer Dauer der Exposition von teilweise unter einem Jahr (32).

Auch bestimmte Medikamente haben karzinogene Wirkung, Cyclophosphamid ist ein Beispiel dafür. Es ist jedoch durch den Uroprotektor Mesna, der die Freisetzung des gefährlichen Acrolein verhindert, wieder einsetzbar. Auch Phenacetin gehört dazu, denn bei 9-10 % der Patienten mit Phenacetin-Nieren wurde ein Urothel-Carcinom diagnostiziert (32).

Rezidivierende Harnwegsinfekte erhöhen bei Frauen das Blasenkrebsrisiko um das 2,1- bis 2,4fache, bei Männern sogar um das 2- bis über 4fache. Ursächlich wird hierfür vor allem das Dimethylnitrosamin angesehen. Dieses spielt ebenso wie die chronisch-entzündliche Urothelirritation durch die Schistosomeneier bei der Bilharziose eine Rolle (32). Auch die chronische Urothelreizung durch Dauerkatheter (34) oder durch Urolithiasis (63) erhöhen das Risiko der malignen Entartung.

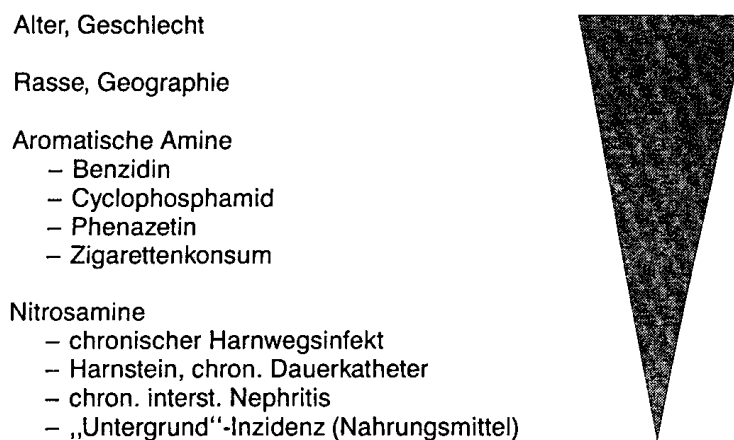
Raucher haben ein 2- bis 4fach erhöhtes Risiko, ein Urothel-Carcinom zu entwickeln. Dies ist auf das im Zigarettenrauch enthaltene 2-Naphthylamin und das 4-Aminobiphenyl zurückzuführen. Auch ehemalige Raucher haben ein erhöhtes Risiko, welches im Laufe der Jahre abnimmt. Insgesamt ist das Risiko aber abhängig vom Konsumverhalten des Einzelnen: Anzahl der Zigaretten/Tag, Alter zu Beginn, Anzahl der Jahre (32). Schätzungen zufolge werden 40-60 % aller Blasenkarzinome bei Männern und 30 % aller Blasenkarzinome bei Frauen allein durch das Rauchen verursacht (58).

Außerdem kann ein Zusammenhang zwischen der Strahlentherapie bösartiger Neoplasien und der Bildung primärer Harnblasentumoren insbesondere bei der Behandlung von Cervix-Carcinomen gefunden werden. Durchschnittlich ist das Risiko um das 2- bis 4fache erhöht. Die Risikoerhöhung liegt bei den zum Zeitpunkt der ersten Radiatio unter 55-jährigen bei 16fach, Patientinnen über 55 Jahre weisen kein signifikant erhöhtes Risiko auf (32).

Des Weiteren wurden neue zytogenetische und molekularbiologische Parameter für die Entstehung und Prognose des Urothelkarzinoms gefunden. Es lassen sich häufig numerische Aberrationen der Chromosomen 7, 8 und 9 (11), sowie strukturelle Veränderungen der Chromosomen 1, 5, 9, 11 und 17 finden (64). Somit ist auf subchromosomaler Ebene eine Aktivierung von Protoonkogenen bzw. eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen möglich.

Am häufigsten treten eine Deletion des langen Arms an Chromosom 9 (Chr. 9q) und der Verlust der Heterozygotie von Chromosom 17p, welches das p53-Tumorsuppressorgen beinhaltet, auf.

Außerdem wurde gezeigt, daß bei 50 % der männlichen Patienten mit einem Urothel-Carcinom ein altersunabhängiger Verlust des Y-Chromosoms vorliegt, während normales Urothel grundsätzlich den kompletten Satz an Geschlechtschromosomen aufweist. 65 % der Patienten mit Y-Chromosomverlust hatten histologisch fortgeschrittene, 60 % mit normalem Chromosomensatz hatten oberflächliche Karzinome. Ebenso konnte ein kürzeres tumorfreies Überleben der Patienten mit Y-Chromosomverlust nachgewiesen werden (11).



*Abbildung 1:* Rangfolge der Risikofaktoren für die Entwicklung eines Urothelkarzinoms (57)

### 1.1.3 Makropathologie

Die Tumoren der ableitenden Harnwege – meist Urothelkarzinome – verteilen sich topographisch wie folgt: Nierenbecken 6 %, Ureteren 2 % und Harnblase 92 %. Harnblasenkarzinome kommen häufig multifokal vor und sind in ca. 70 % der Fälle in der Hinter- und Seitenwand lokalisiert. Im Trigonum/Blasenhalsbereich kommen 20 % und im Blasendach 10 % der Karzinome vor (66).

Ca. 70-80 % der Harnblasentumoren werden in Frühstadien (pTa, pT1) entdeckt, etwa 20 % in den muskelinvasiven Stadien pT2-pT4, welche mit einem hohen Risiko der Progression und Metastasierung verbunden sind (56).

50-60 % der oberflächlichen Tumoren – insbesondere multifokale und höhergradige (G3) – rezidivieren nach TUR-B in den ersten 2 Jahren (28), 10-20 % von ihnen wachsen progredient invasiv in die Blasenwand (56). Die Mehrheit der muskelinfiltrierenden Tumoren wächst jedoch primär invasiv (28).

Lymphknotenmetastasen können auftreten, sobald der Primärtumor Lymphgefäße erreicht hat, also in der Submukosa (1). Bei vorhandener Lymphangiosis carcinomatosa werden häufiger Lymphknotenmetastasen bei gleichzeitig geringerer Überlebenszeit gefunden (36). Die ersten befallenen Lymphknotenstationen sind die obturatorischen, iliakalen und präsakralen. Diese werden als pelvine oder regionäre Lymphknoten bezeichnet. Weiterhin befallene paraaortale, parakavale und mediastinale Lymphknoten werden als juxtaregionär bezeichnet.

Ein Lymphknotenbefall erfolgt stadienabhängig: 5-10 % in pT1, 30 % in pT2 und pT3a und 50-60 % in pT3b und pT4 (1).

Eine Fernmetastasierung findet vor allem in Leber, Lunge, Gehirn und Skelettsystem statt (1). In den Stadien pT3 und pT4 findet man bereits bis zu 60 % Metastasen (2).

Per continuitatem kann es zu einem Tumoreinbruch in Rektum, Vagina, Urethra, Prostata und Bauchdecke kommen (1).

Typische Erstsymptome sind Hämaturie, Harnentleerungsstörungen und suprapubische Schmerzen (29,40).

#### 1.1.4 Mikropathologie

92 % aller Harnblasenkarzinome sind Übergangsepithel- oder Transitionalzellkarzinome. In 7 % findet man Plattenepithelkarzinome, die auch als Mischtumoren auftreten können. Adenokarzinome kommen in 1 % der Fälle vor (34). Für die Urothelkarzinome sind die papilläre Proliferation (70 %), ein multizentrisches Wachstum und eine meist ausgeprägte Rezidivneigung typisch (40,45).

Man unterscheidet benigne Papillome mit regelrechten, maximal siebenschichtigen Urothelien, keine Kernatypien (33). Grad-1-Urothelkarzinome weisen ein zellreiches kerndichtes Epithel mit Schichtungsverlust auf, die Kerne sind relativ gleichförmig. Beim Grad-3-Tumor liegt ein anaplastischer, undifferenzierter Malignitätsgrad vor, mit hochgradiger Kernpolymorphie und nicht mehr erkennbarer Schichtung des Epithels. Grad-2-Tumoren sind dazwischen einzustufen (34).

Plattenepithelkarzinome – am häufigsten im Verlauf chronischer Entzündungen – bilden überwiegend flache, die Wand diffus infiltrierende, ulzerierende Geschwülste (33).

Adenokarzinome werden hauptsächlich im Blasendach gefunden, wo sie aus persistierenden Urachusresten entstehen. Auch die kongenitale Harnblasenekstrophie disponiert zu Adenokarzinomen (63).

Neben diesen epithelialen Neoplasmen gibt es – wenn auch selten – benigne Tumoren mesenchymalen Ursprungs: Fibrome, Fibromyxome, Leiomyome, Neurome u.a.

Ebenfalls sehr selten treten Sarkome auf, wie das embryonale Rhabdomyosarkom beim Kind (33,40).

Weitere seltene Harnblasentumoren sind das Phäochromozytom, Karzinosarkome, malignes Lymphom und malignes Melanom.

Außerdem kann es zum sekundären Befall der Blase durch Einwachsen von Karzinomen der Prostata, des Uterus, des Ovars, des Kolons und Rektums kommen. Ein metastatischer Tumorbefall wird vor allem beim Bronchus-, Magen-, Mamma- und Nierenkarzinom sowie beim malignen Melanom, seltener bei Leukämien und malignen Lymphomen beobachtet (40,45).

## 1.1.5 TNM-Klassifikation (67)

## T- Primärtumor

- TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- T0 Kein Anhalt für Primärtumor
- Ta Nichtinvasives papilläres Carcinom
- Tis Carcinoma in situ („flat tumour“)
- T1 Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
- T2 Tumor infiltriert Muskulatur
  - T2a Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)
  - T2b Tumor infiltriert tiefe Muskulatur (äußere Hälfte)
- T3 Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe
  - T3a Mikroskopisch
  - T3b Makroskopisch (extravesikaler Tumor)
- T4 Tumor infiltriert Prostata oder Uterus oder Vagina oder Becken- oder Bauchwand
  - T4a Tumor infiltriert Prostata oder Uterus oder Vagina
  - T4b Tumor infiltriert Becken- oder Bauchwand

## N- Regionäre Lymphknoten

- NX Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
- N0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1 Metastase in solitärem Lymphknoten, 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
- N2 Metastase(n) in solitären Lymphknoten, mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung, oder in multiplen Lymphknoten, keine mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
- N3 Metastase(n) in Lymphknoten, mehr als 5 cm in größter Ausdehnung

## M- Fernmetastasen

- MX Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
- M0 Keine Fernmetastasen
- M1 Fernmetastasen

## Histopathologisches Grading

- GX Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
- G1 Gut differenziert
- G2 Mäßig differenziert
- G3-4 Schlecht differenziert/undifferenziert

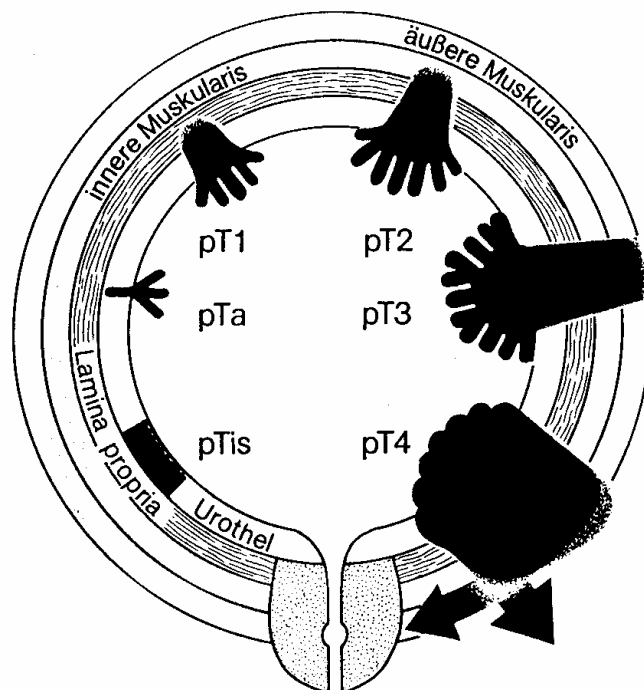


Abbildung 2: Stadieneinteilung des Harnblasenkarzinoms (54)



## 1.2 Angiogenese

Der Begriff „Angiogenese“ wurde erstmals 1935 im Zusammenhang mit der plazentären Gefäßneubildung geprägt.

Die Hypothese, solide Tumoren könnten angiogenese-abhängig sein, und anti-angiogene Maßnahmen könnten sich als potentiell therapeutisches Ziel erweisen, wurde 1971 von J.Folkman formuliert.

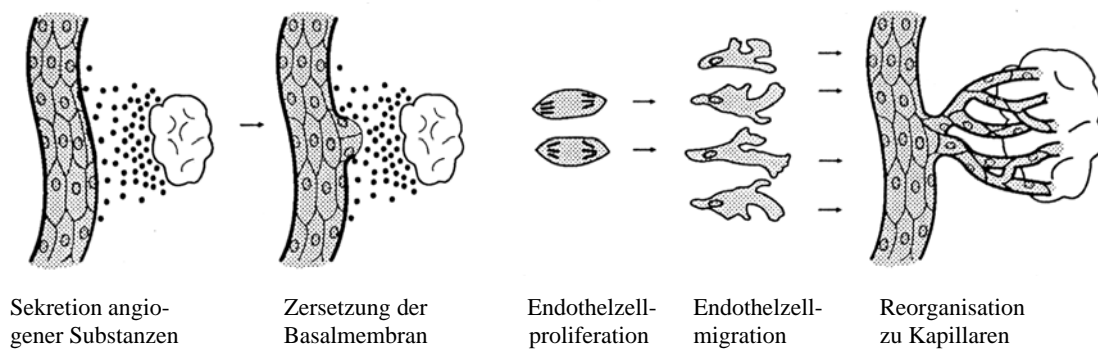
Von der Isolation eines Angiogenesefaktors von Tumoren wurde ebenfalls in den frühen 70-ern berichtet (25,27).

Die Angiogenese teilt sich in eine prävasculäre Phase, in der keine Angiogeneseinduktion stattfindet, und die Tumorgröße sowie Metastasierung limitiert sind, und in eine vaskuläre Phase (26). Bis zu einer Größe von 1-2 mm<sup>3</sup> ist eine Ernährung des Tumors per diffusionem möglich. Setzt danach die Angiogenese ein, kommt es zu exponentiellem Wachstum (27) .

In der vaskulären Phase wird die Angiogenese auf zwei Wegen induziert: zum einen durch die Tumorzellen selbst, welche angiogene Moleküle produzieren, zum anderen durch die angiogene Aktivität rekrutierter Makrophagen oder durch aus der extrazellulären Matrix mobilisierter Substanzen (z.B. bFGF). Man geht davon aus, daß die im Tumorzentrum herrschende relative Hypoxie zu einer Laktaterhöhung führt, welche wiederum Makrophagen aktiviert. Durch die Neovaskularisierung sind nun ein verbesserter Nährstoff- und Metabolitenaustausch sowie eine verbesserte Verteilung von Wachstumsfaktoren möglich (25,26).

Die Angiogenese findet in vier Schritten statt:

1. Proteolytische Zersetzung der Basalmembran und der umgebenden extrazellulären Matrix
2. Endothelproliferation
3. Endothelmigration zur Quelle des angiogenen Stimulus hin
4. Reorganisation zu einem kapillären Netzwerk (13)



*Abbildung 3:* Tumor-assoziierte Angiogenese. Freisetzung angiogener Substanzen führt zur Endothelaktivierung und Ausbildung neuer Gefäße (13).

Somit kommen in einem Tumor auf ca. 100 Tumorzellen eine Endothelzelle, welche über beispielsweise bFGF und VEGF seitens des Tumors und PDGF und IGF-1 seitens des Endothels in Interaktion stehen (61).

In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Bestimmung der Gefäßdichte ein prognostischer Indikator für Patienten mit einem invasiven Urothelcarcinom der Harnblase sein kann.

Die Gefäßdichte korreliert signifikant mit dem T-Stadium, es besteht jedoch keine signifikante Korrelation zwischen dem Grading und der Gefäßanzahl (53).

Eine erhöhte Gefäßdichte war assoziiert mit Rezidivneigung und verminderter Gesamtüberlebenszeit (8). Für Patienten mit vermehrter Gefäßanzahl wurde ein bis zu 2,5fach erhöhtes Mortalitätsrisiko angegeben (21).

Auch bei anderen Krebserkrankungen wie z.B. der Lunge (8), der Prostata, der Brust oder auch beim Malignen Melanom ist es gelungen, eine Verbindung zwischen der Ausprägung der Angiogenese und der Tumorprogression aufzuzeigen (62).

Auch in Bezug auf Lymphknotenmetastasen konnte eine Korrelation mit der Gefäßanzahl (39) und der Gefäßdichte (9) gefunden werden.

### 1.3 Angiogenesefaktoren

#### 1.3.1 Angiogenese-stimulierende Faktoren

Durch die nachstehenden Faktoren kann die Angiogenese stimuliert werden:

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Acid und Basic Fibroblast Growth Factor (FGF), Platelet-derived Endothelial Cell Growth Factor (PD-ECGF), Platelet-derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth Factor- $\alpha$  und - $\beta$  (TGF), Angiogenin, Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), Erythropoietin, Interleukin-4 und -8 (47), Epidermal Growth Factor (EGF), Prostaglandin E2 (PGE2), Placenta Growth Factor (PlGF) (3), Monobutyryl (24), Hepatocyte Growth Factor oder Scatter Factor (HGF/SF) (20)

Einige von ihnen können das Endothelzellwachstum direkt stimulieren, andere durch parakrine Freisetzung von Stimulatoren aus anderen Zellen.

Die direkte Stimulation erfolgt durch aFGF, bFGF und PD-ECGF *in vitro* und *in vivo*. Für TGF-  $\alpha$  und -  $\beta$ , EGF, Angiogenin, PGE2, Monobutyryl und TNF-  $\alpha$  konnte *in vitro* kein mitogener Effekt auf kultivierte Endothelzellen festgestellt werden. Von ihnen wird also angenommen, daß sie Faktoren aus anderen Zellen freisetzen (24).

- bFGF wurde erstmals in Hirngewebe identifiziert. Insgesamt existieren vier Isoformen mit 18, 22, 22.5 und 24 kDa (7). Er wirkt stark mitogen auf verschiedene Zellarten, nicht nur auf Endothelien (6). Im Urin von Blasenkrebspatienten ließen sich erhöhte Werte von aFGF und bFGF finden, die mit dem Ausmaß der Erkrankung korrelierten (20)
- TGF-  $\beta$  wird als inaktives Vorläufermolekül mit zwei Propeptiden sezerniert und im extrazellulären Milieu aktiviert (7). Er stimuliert die VEGF-Expression in der glatten Gefäßmuskulatur, in Fibroblasten und Epithelzellen. Außerdem induziert TGF-  $\beta$  die Expression von PDGF und bFGF, welche synergistischen Effekt zu VEGF aufweisen (3). *In vitro* hemmt er jedoch die Endothelzellproliferation (7).

- PD-ECGF konnte als wichtiger Faktor beim Harnblasenkarzinom nachgewiesen werden. Es fanden sich bei den invasiven Stadien signifikant erhöhte Werte. Außerdem scheint die PD-ECGF-Expression mit der Tumorprogression zu korrelieren (48).
- Ebenfalls bei den invasiven Harnblasentumoren wurde eine deutlich erhöhte Expression von PDGF-mRNA gefunden (52).
- Angiogenin wirkt nicht mitogen auf Endothelzellen. Es wirkt durch Aktivierung von Endothelzellen und Verstärkung anderer primärer mitogener Stimuli (6).

### 1.3.2 Angiogenese-inhibierende Faktoren

Thrombospondin (TSP), Platelet Factor 4, Interferon-  $\alpha$ , Interleukin-1, Transforming Growth Factor-  $\alpha$ , Protease inhibitors (47), Angiostatin (7)

- Thrombospondin-1 bedingt die antiangiogene Aktivität in normalen Urothelzellen. Verglichen mit normalem Urothel wurde bei Tumorzellen in über 94 % eine reduzierte TSP-1-Sekretion gefunden (14).
- Angiostatin wurde im Urin von Mäusen mit Tumoren gefunden, bei den Kontrollmäusen nicht. Seine hemmende Wirkung ist spezifisch für Endothelzellen und blockiert Neovaskularisation *in vivo* (7).

## 1.4 Vascular Endothelial Growth Factor

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist ein multifunktionelles Zytokin mit Schlüsselrolle in der physiologischen und pathologischen Neoangiogenese (3) und gehört in die Gruppe der angiogenese-stimulierenden Faktoren.

Er ist im Gegensatz zu vielen anderen Faktoren – wie z.B. EGF oder FGF, die auf verschiedene Zellarten mitogen wirken – ein endothelspezifischer Wachstumsfaktor (6).

Für Tumoren konnte *in vitro* gezeigt werden, daß VEGF die Endothelproliferation, -migration, die Tyrosin-Phosphorylierung des VEGF-Rezeptors fördert und die Gen-Expression in den Endothelzellen induziert.

Weiterhin fördert VEGF die mikrovaskuläre Permeabilität innerhalb einiger Minuten mit einer 50.000-fach höheren Potenz als Histamin. Dies führt zur Extravasation von Makromolekülen – z.B. einer Serumproteinase, welche die Basalmembran zerstört – und schließlich zur erleichterten Endothelzellmigration (16).

Neben dieser Migration der Endothelien zum Tumor hin ist gleichzeitig eine erleichterte lokale Tumorzellinvasion möglich, welche durch die vaskuläre Permeabilitätssteigerung zur Metastasenbildung führen könnte (41).

Der Vascular Endothelial Growth Factor ist ein basisches, heparin-bindendes, dimeres Glykoprotein von 34-42 kDa (59). Ähnlichkeit in der Aminosäure-Sequenz besteht zu der A- und B-Kette des Platelet-derived Growth Factor (PDGF) (30).

Das VEGF-Gen ist in acht Exonen auf dem Chromosom 6p21.3 organisiert (23).

Sechs verschiedene Splicing-Varianten mit unterschiedlicher Anzahl der Aminosäuren sind bekannt: 121, 145, 165, 183, 189, 206 (30).

Beim Harnblasenkarzinom wurden die vier Isoformen VEGF<sub>121</sub>, 165, 189 und 206 gefunden (48). Alle Isoformen induzieren vaskuläre Hyperpermeabilität, aber nur VEGF<sub>121</sub> und VEGF<sub>165</sub> zeigen mitogene Aktivität (3).

VEGF<sub>121</sub> und 165 liegen als freie Proteine vor, VEGF<sub>189</sub> und 206 sind an heparin-enthaltende Proteoglykane der Zelloberfläche bzw. der Basalmembran gebunden (43).

VEGF interagiert mit mindestens zwei Tyrosinkinase-Rezeptoren auf den Endothelzellen, *flt-1* und *KDR*. Vermutlich durch einen Phospholipase C-vermittelten Mechanismus kommt es zu einer Erhöhung des freien cytosolischen Calciums (12).

#### 1.4.1 VEGF-Expression beim Harnblasenkarzinom

VEGF wurde als wichtiger angiogenese-stimulierender Mediator beim Harnblasen-Karzinom identifiziert. Die Expression von VEGF, insbesondere von VEGF<sub>121</sub>, im Harnblasen-Karzinom ist gegenüber der normalen Blase erhöht (17).

Es wurde eine bis zu 3-fach erhöhte VEGFmRNA-Expression in Blasentumoren gefunden (52).

Eine 4-fach höhere VEGF-Expression konnte bei oberflächlichen Tumoren verglichen mit invasiven ermittelt werden (52).

Oberflächliche Tumoren mit erhöhtem VEGFmRNA-Level scheinen früher zu rezidivieren und muskelinvasiv voranzuschreiten (19).

Auch bei muskelinvasiven Tumoren sagt der erhöhte VEGF-Level eine frühe Rezidivierung voraus. Ebenso korreliert die Überexpression von VEGF mit dem erhöhten Risiko der Metastasenbildung (37).

Bereits 1984 wurde ein Tumor-Angiogenese-Faktor (TAF) im Urin von Blasenkarzinom-Patienten gefunden, welcher *in vitro* die Migration und Mitose von Kapillarendothelzellen stimulierte (60).

1999 wurde VEGF im Urin von Patienten mit Harnblasen-Karzinom quantifiziert, wobei erhöhte VEGF-Werte gemessen wurden. Im Stadium pTa lag der Durchschnittswert niedriger als bei den Stadien  $\mu$  pT1. Kein signifikanter Unterschied findet sich zwischen den Stadien pT1 und  $\mu$  pT2. Der VEGF-Level korrelierte jedoch mit der Rezidivrate (18).

#### 1.4.2 VEGF-Expression bei anderen Malignomen

Beim Magenkarzinom konnte gezeigt werden, daß die VEGF-Positivität mit der Gefäßbeteiligung, der Lymphknoten-, der Lebermetastasierung und einer signifikant schlechteren Prognose korreliert (49).

Auch bei kolorektalen Karzinomen und dem Ösophaguskarzinom ist die VEGF-Expression eng assoziiert mit der Infiltrationstiefe, der lymphogenen und hämatogenen Metastasierung und der Überlebenszeit (5,38,44).

Desweiteren konnte bei Tumoren der Lunge, der Schilddrüse, der Brust, der Niere, des Ovars, der Cervix uteri, beim Angiosarkom, beim hepatozellulären Karzinom, bei Keimzelltumoren und diversen intrakraniellen Tumoren eine Erhöhung der VEGFmRNA gezeigt werden (12,23).

Kein Zusammenhang bezüglich VEGF-Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen ließen sich beim Pankreaskarzinom finden (22,31).

## **II. Material und Methode**

### **2.1 Patientengut**

Das Patientengut setzt sich aus Harnblasenkarzinompatienten zusammen, die sich in dem Zeitraum von Mai 1996 bis April 2000 in Behandlung der Urologischen Klinik der Universität Würzburg befanden.

Voraussetzung für die Aufnahme in das Patientenkollektiv war das Vorliegen histologischen Untersuchungsmaterials, das einerseits durch transurethrale Resektion (TUR-B) und andererseits durch Cystektomie gewonnen wurde. Invasives Wachstum des Blasentumors im Befund der Cystektomie, d.h. zumindest Stadium pT1, und urotheliale Differenzierung stellten weitere Bedingungen dar.

Es wurden 52 Patienten untersucht, 40 männliche und 12 weibliche. Das Durchschnittsalter des gesamten Patientenguts lag bei 66,2 Jahren (40 bis 82 Jahre). Bezüglich des Geschlechts bestand kein Unterschied.

Im pathohistologischen Befund nach TUR-B fand sich bei zwei Patienten das Stadium pTa, bei 21 Patienten das Stadium pT1, bei 24 Patienten das Stadium pT2, bei vier Patienten das Stadium pT3 und bei einem Patienten pT4. Weiterhin konnte in einem Fall zusätzlich noch ein Carcinoma in situ gefunden werden.

Bezüglich des Gradings fand sich kein einziger G1-Tumor (gut differenziert). 16 Tumore waren G2 (mäßig differenziert), sechs G2-3 und 30 G3 (undifferenziert) differenziert.

Vier Patienten dieses Kollektivs sind einer zweiten TUR-B unterzogen worden. Bei einem bestand das Stadium pTa, bei einem das Stadium pT1 und zwei Patienten das Stadium pT2. Bei keinem fand sich Grading G1, dafür aber drei Patienten G2 und bei einem G3.

In der Histologie der Cystektomiepräparate fanden sich bei acht Patienten das Stadium pT1, bei 13 pT2, bei 20 pT3 und bei 11 pT4. Auch hier wurde wiederum kein G1-Tumor diagnostiziert, aber 16 G2, zwei G2-3 und 34 G3.

Ferner hatten 16 Patienten zusätzlich ein Carcinoma in situ, 19 eine Lymphangiosis carcinomatosa und sieben eine Hämangiosis carcinomatosa.



In 21 Fällen zeigte sich histologisch ein solides Wachstum der Neoplasie, in 15 Fällen ein papilläres Wachstum, in 16 Fällen eine gemischte Tumorformation. Außerdem fanden sich in sechs Präparaten Plattenepithelanteile.

Bei den 11 Patienten im Stadium pT4 infiltrierte der Tumor achtmal die Prostata, viermal die Urethra bzw. das periurethrale Gewebe, zweimal das Colon und jeweils einmal das Rektum, den Beckenboden, den Uterus, die Portio, die Vagina oder die Vulva.

Bei 16 Patienten trat der Tumor unifokal auf. Fünfmal war er an der linken Seitenwand lokalisiert, viermal an der Hinterwand, dreimal am Blasendach, zweimal an der rechten Seitenwand und jeweils einmal am Blasenboden bzw. im Bereich des Trigonum vesicae. Die Vorderwand war nicht betroffen.

Bei 36 Patienten trat das Karzinom jedoch multifokal auf. Der Hauptlokalisationort befand sich hierbei im Blasenboden in 13 Fällen, gefolgt von der linken Seitenwand in 12 Fällen und der Hinterwand in 11 Fällen. Weiterhin war die rechte Seitenwand achtmal, das Blasendach sechsmal, die Vorderwand dreimal, das Trigonum zweimal, der Blasenhal und die Ureterostien einmal betroffen. Und bei einem weiteren Fall befand sich der Tumor zusätzlich in einem Divertikel.

In 15 Fällen bestand ein Lymphknotenbefall, wovon sich fünf Patienten im Stadium pN1 und zehn Patienten im Stadium pN2 befanden.

Fernmetastasen zeigten sich bei acht Patienten. Die Manifestationsorgane waren die Leber sowie das Skelettsystem in drei Fällen, die Lunge und die Haut in zwei Fällen, jeweils einmal die Nebenniere, die Bauchwand und das linke Ovar. Ein Patient entwickelte eine Peritonealkarzinose.

Bei 22 Patienten wurde zusätzlich noch ein Zweittumor gefunden, wobei das Prostatakarzinom in 14 Fällen am häufigsten vorkam. Desweiteren erkrankten zwei Patienten an einem Non-Hodgkin-Lymphom, zwei Patientinnen an einem Mamma-Karzinom, und jeweils ein Patient an einem Urothel-Ca der prostatistischen Urethra, an

einem Urothel-Ca des Ureters und des Nierenbeckens, an einem Nierenzellkarzinom und an einem Endometriumkarzinom.

Pat.-Nr.	Geschlecht	Alter	T	G	N	M
1	m	62	1	2	0	0
2	m	52	1	2	0	0
3	m	66	2	2	0	0
4	w	75	2	2	0	0
5	w	58	2	2	0	0
6	m	52	2	2	0	0
7	m	71	2	2	0	0
8	m	68	2	2	0	0
9	w	80	3	2	0	0
10	m	63	3	2	0	0
11	w	67	3	2	0	0
12	w	66	3	2	0	0
13	w	74	1	3	0	0
14	m	72	1	3	0	0
15	m	70	1	3	0	0
16	m	74	2	3	0	0
17	m	63	2	3	0	0
18	w	64	2	3	0	0
19	m	73	2	3	0	0
20	m	68	2	3	0	0
21	m	78	3	2-3	0	0
22	w	67	3	3	0	0
23	m	82	3	3	0	0
24	m	70	3	3	0	0
25	m	58	3	3	0	0
26	m	66	3	3	0	0

Pat.-Nr.	Geschlecht	Alter	T	G	N	M
27	w	79	3	3	0	0
28	m	72	3	3	0	0
29	m	76	3	3	0	0
30	m	67	3	3	0	0
31	m	62	3	3	0	0
32	w	58	4	3	0	0
33	m	54	4	3	0	0
34	m	67	4	3	0	0
35	m	51	2	3	1	0
36	m	73	2	3	1	0
37	m	57	3	3	1	0
38	m	66	4	3	1	0
39	m	48	2	3	2	0
40	m	63	3	3	2	0
41	m	62	3	3	2	0
42	m	67	3	3	2	0
43	m	75	4	3	2	0
44	m	71	4	3	2	0
45	m	55	4	3	2	0
46	m	65	2	2	0	1
47	m	70	4	2	0	1
48	m	72	3	3	0	1
49	m	73	4	3	0	1
50	m	71	4	2	1	1
51	w	68	4	2	2	1
52	w	40	3	3	2	1

*Tabelle 1: Geschlecht, Alter, Tumorstadium, Grading,  
Lymphknotenstatus, Fernmetastasierung*

## 2.2 Aufbereitung der Gewebeschnitte

### 2.2.1 Gewebematerial

Die Paraffinblöcke wurden gemäß der Einlauf-Nummern aus dem Archiv des Pathologischen Institutes der Universität Würzburg entnommen.

Zur Aufbereitung fertigte man zunächst Schnitte von 4-6 µm Dicke von den Blöcken mit einem Mikrotom der Firma Leitz® an, die anschließend auf Super Frost® Plus-Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 50-55°C getrocknet wurden.

### 2.2.2 Auswahl des Färbeverfahrens

Als Färbeverfahren wurde die APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase-Anti Alkalische Phosphatase) gewählt (10,51).

Vor der Durchführung der Präparatfärbung wurde ein Primär-Antikörper gegen VEGF und der erste Brücken-Antikörper MAK (Maus-Anti-Kaninchen) nach der geeigneten Verdünnung ausgetestet.

Der MAK-Antikörper ist ein Bindeglied zum eigentlichen Brücken-Antikörper (LINK), da LINK nicht direkt an VEGF binden kann.

### 2.2.3 Antikörper

#### 2.2.3.1 Primärantikörper VEGF

Es wurde im Vergleich ein monoklonaler (Klon AB-3) und ein polyklonaler VEGF-Antikörper (Klon A-20) auf ihre Eignung hin geprüft. Dabei konnte gezeigt werden, daß der monoklonale VEGF-Antikörper eine erhöhte Hintergrundfärbung hervorruft. Dabei färbten sich die für die Untersuchung essentiellen Strukturen nur schwach.

Deshalb kam der polyklonale Antikörper zur Anwendung, der mit dem Aminoterminus der Splicing-Varianten VEGF<sub>189</sub>, <sub>165</sub>, <sub>121</sub> reagiert. Es wurden verschiedene Verdünnungsreihen mit absteigender Konzentration (1:30, 1:40, 1:50 bis hin zu 1:100) ausgetestet. Die für die Untersuchung korrekte Verdünnung war 1:80.

### 2.2.3.2 Brückenantikörper MAK

Hier wurden die Verdünnungen mit einer Konzentration von 1:40 bis 1:80 getestet. Die beste Verdünnung lag bei 1:80.

### 2.2.4 Färbeverfahren

Das Färbeverfahren gliedert sich in drei Abschnitte:

1. Entparaffinierung
2. Vorbehandlung
3. Färbung

#### 1. Entparaffinierung

Die Gewebeschnitte wurden zur Entfernung des Einbettungsmediums für 15 min. in ein Xylolbad eingelegt.

Das anschließende Einbringen der Objektträger in Aceton für 15 min. und danach in Aceton/Tris-Puffer 1:2 für 15 min. diente der Entfettung. Vor der sich anschließenden Vorbehandlung erfolgte eine Spülung der Präparate in Tris-Puffer.

#### 2. Vorbehandlung

Die Schnitte wurden in 10mM Citratpuffer gelegt. Danach wurden sie bei 1 bar 30 min. im Autoklav gekocht, um letzte Paraffinreste zu entfernen.

Vor der Färbung kühlte man die Präparate in Citratpuffer für ca. 25 min. auf  $< 37^{\circ}\text{C}$  ab und spülte anschließend in Trispuffer.

#### 3. Färbung

Der Primärantikörper VEGF wurde mit RPMI-Lösung 1:80 verdünnt. Es wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  auf die Schnitte gegeben und diese 60 min. in einer feuchten Kammer inkubiert.

Anschließend erfolgt viermaliges Spülen mit Trispuffer.

Nun erfolgte das Aufbringen des ersten Brückenantikörpers (MAK mit RPMI-Lösung 1:80), das Inkubieren für 30 min. und das viermalige Spülen in Trispuffer.

Als nächster Schritt wurde der zweite Brückenantikörper (LINK) auf die Präparate gegeben. Hierbei handelt es sich um einen Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper.

Zuerst erstellte man hierfür eine Vorverdünnung aus Humanserum und RPMI-Lösung im Verhältnis 1:8.

Eine weitere Inkubation für 30 min. und eine viermalige Spülung mit Trispuffer erfolgten im Anschluß.

Nun wurde der APAAP-Komplex mit RPMI-Lösung 1:50 verdünnt und für 30 min. auf die Objektträger gebracht, danach wieder viermal mit Trispuffer gespült.

Die Schritte LINK (1:25) und APAAP (1:50) wurden wiederholt, um alle Antigenbindungsstellen abzudecken. Die Schnitte inkubierte man nochmals für jeweils 15 min. und spülte dann 10 mal in Trispuffer.

Der darzustellende Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) färbt sich kräftig rosafarben, wenn man als Chromogen Neufuchsin-Kit aufträgt und 3 min. inkubiert.

Nach dem letztmaligen Spülen mit Trispuffer erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun für 2-3 min., die Stabilisierung und Bläuung der Präparate in Leitungswasser für weitere 2-3 min..

**SCHNEIDEN**

der Gewebelöcke mit Schichtdicke 4-6 µm



**ENTPARAFFINIERUNG**

mit Xylol

Aceton

Aceton/Trispuffer



**VORBEHANDLUNG**

mit Citratpuffer



**FÄRBUNG**

mit VEGF

MAK

LINK

APAAP

LINK

APAAP

Neufuchsin



**GEGENFÄRBUNG**

mit Hämalaun



**VEGF**

kräftig rosa gefärbt

**CYTOPLASMA**

schwach rosa gefärbt

**ZELLKERNE**

blau gefärbt

### 2.3 Methodik der lichtmikroskopischen Auswertung

Bei der Auswertung kam ein Leitz® Orthoplan Mikroskop mit einem (1,5%) Tubus, (10%) Okular und (10%) bzw. (25%) Objektiven zur Verwendung. Die Photographien wurden mit einem Leitz® Laborlux S Photomikroskop erstellt.

Zur lichtmikroskopischen Auswertung wurden die immungefärbten Paraffinschnitte zunächst bei 150-facher Vergrößerung durchmustert und im Tumorareal sogenannte Hot-Spots im Bereich der Infiltrationszone aufgesucht.

Als Hot-Spots definiert man solche Areale, welche an der Infiltrationsfront des Tumors liegen und eine hohe Tumorzell-dichte aufweisen.

Tumorzellen fallen durch Polymorphie, zahlreiche Mitosen, prominente Nukleoli, eine atypische Kern-Zytoplasma-Relation und durch infiltrierendes Wachstum auf (65).

In diesen Hot-Spots wurden dann pro Präparat fünf Rasterfelder mit je 0,9 mm<sup>2</sup> Fläche bei einer 375-fachen Vergrößerung ausgezählt. Dabei unterschied man zwischen VEGF-positiven und VEGF-negativen Zellen. VEGF-positive Tumorzellen stellten sich kräftig rosafarben, VEGF-negative Tumorzellen schwach rosafarben dar.

Aus diesen fünf Zahlenwerten wurde ein Mittelwert gebildet, um ein möglichst repräsentatives Ergebnis zu erzielen.

Es wurde ausschließlich Tumorgewebe bewertet ohne Berücksichtigung von Bindegewebszellen und Entzündungsherden.

Die Auszählung erfolgte ohne Kenntnis der pathohistologischen Stadien. Die Objektträger waren lediglich mit der Einlauf-Nummer des Pathologischen Instituts versehen.

Eine Kontrollzählung wurde durch eine unabhängige Person vorgenommen. Die Zahlenwerte wurden dann den entsprechenden Patienten zugeordnet und mit der Infiltrationstiefe, dem Tumorgrading, der lymphogenen und hämatogenen Metastasierung korreliert.



## **2.4 Methodik der Aktenauswertung**

Die Akten aller Patienten (n=52), deren histologische Präparate in die Auswertung eingingen, wurden zur Komplettierung des Krankheitsbildes durchgearbeitet.

Dabei wurden Anamnese, Befund, Therapie und Verlauf zusammengetragen und in Kapitel 3.5 dargestellt.

Von besonderer Bedeutung waren das Tumorstadium, Differenzierungsgrad, Histologie, Metastasierung, Risikofaktoren und Erstsymptome.

## **2.5 Statistische Methodik**

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 7.0 Microsoft® und mit Online Analysis of Data-Perl Programs der Arizona State University College of Education (<http://glass.ed.asu.edu/stats/analysis/>).

Die Graphiken wurden mit dem Programm Excel 7.0 Microsoft® erstellt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse in Mittelwerten mit Standardabweichung ([s]) angegeben. Die Anzahl der Fälle (n) ist in den Tabellen des Ergebnisteils genannt.

In den Säulen- und Kreisdiagrammen werden jeweils die Mittelwerte dargestellt.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) wurde mit Hilfe des t-tests berechnet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wird als signifikant klassifiziert.

### **III. Ergebnisse**

#### **3.1 Auswertung der TUR-B-Präparate**

##### 3.1.1 Auswertung der TUR-B-Präparate nach Stadien

Die lichtmikroskopische Auswertung der mit dem polyklonalen VEGF-Antikörper gefärbten TUR-Präparate ergab folgende Ergebnisse, welche in Mittelwerten bei fünf Hot-Spot Auszählungen pro Präparat angegeben werden.

Die Auszählung von fünf Gesichtsfeldern ergab für das oberflächliche Tumorstadium pTa (n=3) den Höchstwert von 97,08 % VEGF-positive und 2,92 % VEGF-negative Zellen (Standardabweichung [s]: 2,08).

Für das Stadium pT1 (n=16) wurden 96,3 % VEGF-positive und 3,7 % VEGF-negative Tumorzellen ermittelt ([s]: 3,58).

Im Stadium pT2 (n=26) fanden sich im Durchschnitt 91,72 % VEGF-positive und 8,28 % VEGF-negative Zellen ([s]: 9,59).

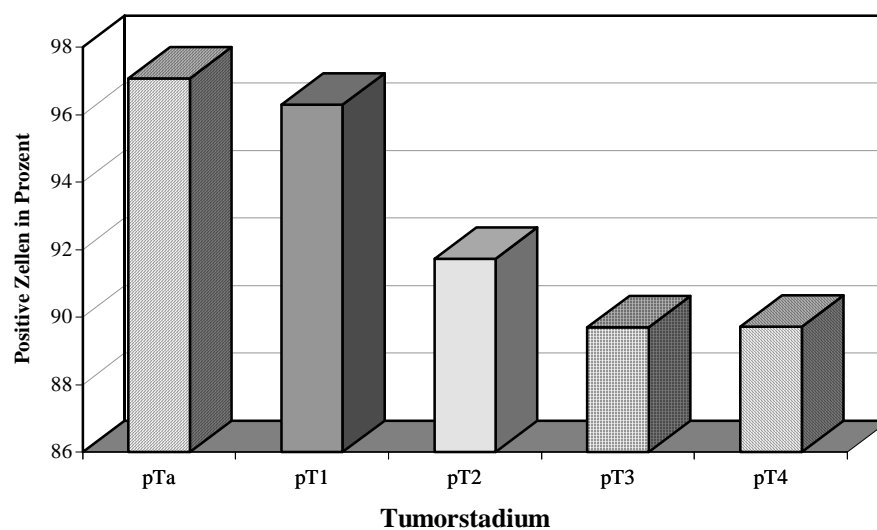
Die Tumoren des Stadiums pT3 (n=5) enthielten 89,71 % VEGF-positive und 10,29 % VEGF-negative Zellen ([s]: 8,32).

Für das Stadium pT4 (n=5) wurden 89,71 % VEGF-positive und 10,29 % VEGF-negative Tumorzellen ermittelt ([s]: 5,5).

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich im Vergleich des Stadiums pT1 zum Stadium pT3 und pT4 ( $p < 0,05$ ).

<b>Stadium</b>	<b>VEGF-positive Zellen in %</b>	<b>VEGF-negative Zellen in %</b>
pTa (n=3)	97,08	2,92
pT1 (n=16)	96,3	3,7
pT2 (n=26)	91,72	8,28
pT3 (n=5)	89,71	10,29
pT4 (n=5)	89,71	10,29

*Tabelle 2:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver bzw. VEGF-negativer Zellen im TUR-B-Präparat, gruppiert nach Stadien



*Diagramm 1:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im TUR-B-Präparat, gruppiert nach Stadien

### 3.1.2 Auswertung der TUR-B-Präparate nach Grading

Die Auswertung bezüglich Grading ergab folgende Ergebnisse:

Für das Tumorgrading G2 (n=19) wurden 96,25 % VEGF-positive und 3,75 % VEGF-negative Zellen ermittelt ([s]: 4,24).

Im Grading G2-3 (n=6) wurden durchschnittlich 97,63 % VEGF-positive und 2,37 % VEGF-negative Tumorzellen ([s]: 2,1) gefunden.

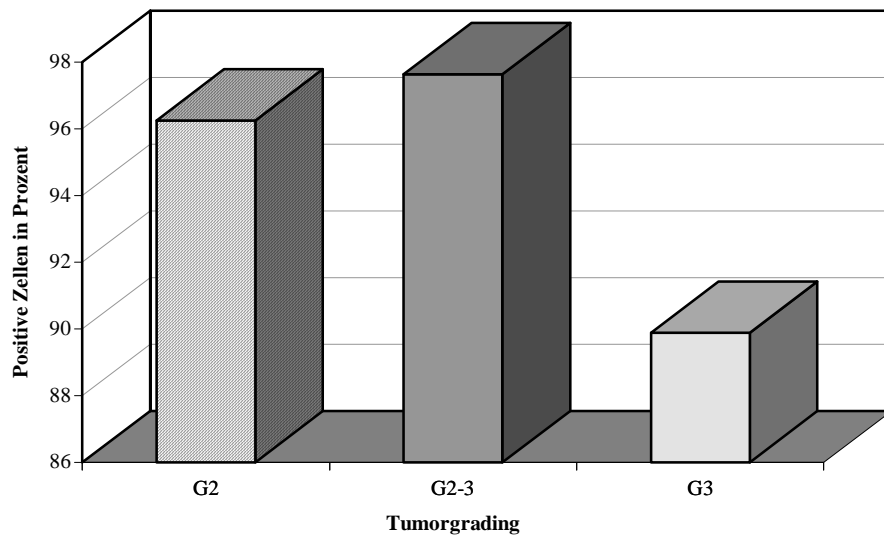
Für G3 (n=30) lagen die Mittelwerte für VEGF-positive Zellen bei 89,89 % und für VEGF-negative bei 10,11 % ([s]: 8,97).

Ein signifikanter Unterschied errechnet sich von G2 zu G3 und von G2-3 zu G3 ( $p < 0,05$ ).

In Tabelle 3 sind die prozentualen Anteile bezogen auf das Grading dargestellt.

<b>Grading</b>	<b>VEGF-positive Zellen in %</b>	<b>VEGF-negative Zellen in %</b>
G2 (n=19)	96,25	3,75
G2-3 (n=6)	97,63	2,37
G3 (n=30)	89,89	10,11

*Tabelle 3:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver bzw. VEGF-negativer Zellen im TUR-B-Präparat, gruppiert nach Grading



*Diagramm 2:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im TUR-B-Präparat, gruppiert nach Grading

### 3.1.3 Auswertung der TUR-B-Präparate – Vergleich Stadien zu Grading

Hierbei werden die Auszählungen der einzelnen Stadien mit unterschiedlichem Grading untereinander verglichen.

#### Stadium pTa:

In diesem Stadium befanden sich nur Patienten mit dem Grading G2 (n=3). Diese Tumoren hatten im Durchschnitt 97,08 % VEGF-positive und 2,92 % VEGF-negative Zellen.

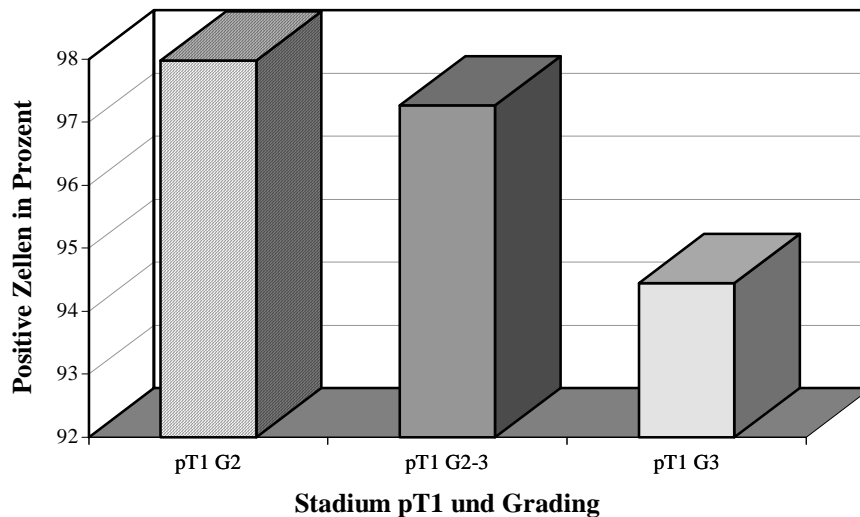
#### Stadium pT1:

Die Auswertung ergab bei den G2-Tumoren (n=6) durchschnittlich 97,98 % VEGF-positive und 2,02 % VEGF-negative Tumorzellen ([s]: 1,7).

Die Tumoren mit G2-3 (n=3) enthielten 97,27 % VEGF-positive und 2,73 % VEGF-negative ([s]: 3,21) und die mit G3 (n=7) 94,45 % VEGF-positive und 5,55 % VEGF-negative Zellen ([s]: 4,36).

<b>pT1</b>	<b>VEGF-positive Zellen in %</b>	<b>VEGF-negative Zellen in %</b>
G2 (n=6)	97,98	2,02
G2-3 (n=3)	97,27	2,73
G3(n=7)	94,45	5,55

*Tabelle 4:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver bzw. VEGF-negativer Zellen im TUR-B-Präparat im Stadium pT1 G2, pT1 G2-3, pT1 G3



*Diagramm 3:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im TUR-B-Präparat im Stadium pT1 G2, pT1 G2-3, pT1 G3

Stadium pT2:

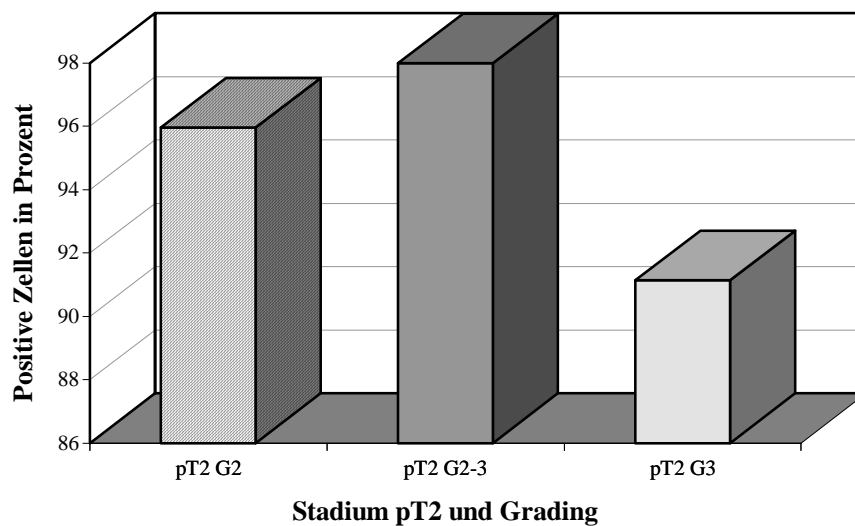
Der Mittelwert für VEGF-positive Zellen lag bei den G2-Tumoren (n=9) bei 95,96 % und für VEGF-negative bei 4,04 % ([s]: 4,82).

Für die Tumoren mit dem Grading G2-3 (n=3) wurden 97,99 % VEGF-positive und 2,01 % VEGF-negative ([s]: 0,58), für die G3-Tumoren (n=14) wurden 91,13 % VEGF-positive und 8,87 % VEGF-negative Zellen ermittelt ([s]: 11,11).

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich beim Grading G2 zu G3 ( $p < 0.05$ ).

pT2	VEGF-positive Zellen in %	VEGF-negative Zellen in %
G2 (n=9)	95,96	4,04
G2-3 (n=3)	97,99	2,01
G3 (n=14)	91,13	8,87

*Tabelle 5:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver bzw. VEGF-negativer Zellen im TUR-B-Präparat im Stadium pT2 G2, pT2 G2-3, pT2 G3



*Diagramm 4:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im TUR-B-Präparat im Stadium pT2 G2, pT2 G2-3, pT2 G3

Stadium pT3:

Bei diesem Patientenkollektiv (n=5) war nur Grading G3 vertreten. Die Auszählung erbrachte für die VEGF-positiven Tumorzellen einen prozentualen Anteil von 89,71, für die VEGF-negativen 10,29.

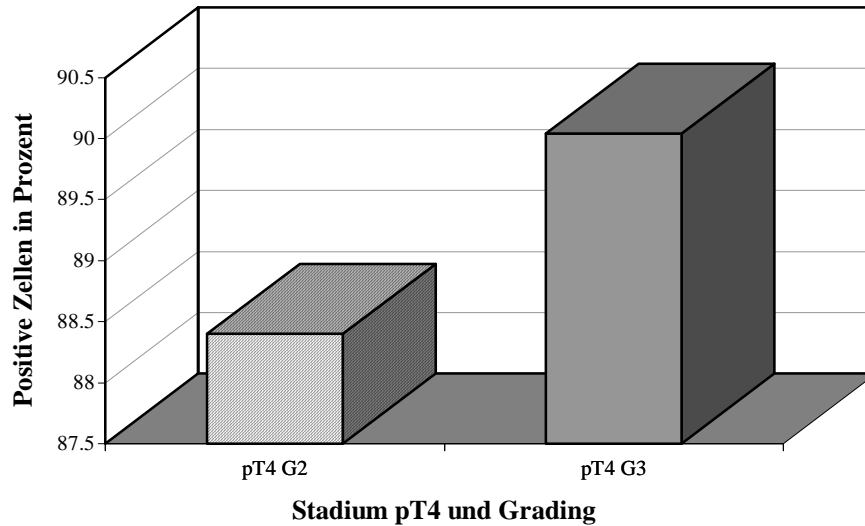


## Stadium pT4:

Im Grading G2 befand sich nur ein Tumor, bei dessen Auswertung sich 88,4 % VEGF-positive und 11,6 % VEGF-negative Zellen ergaben. Während bei den G3-Tumoren (n=4) 90,04 % VEGF-positive und 9,96 % VEGF-negative Zellen gefunden wurden ([s]: 6,29).

<b>pT4</b>	<b>VEGF-positive Zellen in %</b>	<b>VEGF-negative Zellen in %</b>
G2 (n=1)	88,4	11,6
G3 (n=4)	90,04	9,96

*Tabelle 6:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver bzw. VEGF-negativer Zellen im TUR-Präparat im Stadium pT4 G2, pT4 G3



*Diagramm 5:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im TUR-B-Präparat im Stadium pT4 G2, pT4 G3

### 3.1.4 Auswertung der TUR-B-Präparate – Vergleich Grading zu Stadien

Hierbei werden Auszählergebnisse der einzelnen Grade mit den verschiedenen Stadien verglichen.

Grading G2:

Die hier beschriebenen Tumoren haben das Grading G2.

Bei dem Stadium pTa (n=3) ließen sich 97,9 % VEGF-positive, 2,1 % VEGF-negative Tumorzellen ermitteln ([s]: 2,08).

pT1-Tumoren (n=6) enthielten 97,65 % VEGF-positive und 2,35 % VEGF-negative Zellen ([s]: 1,76).

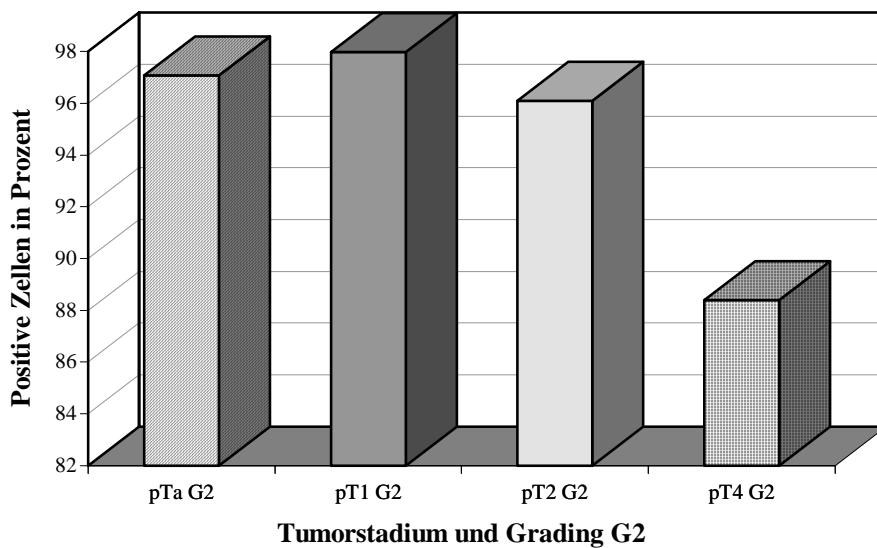
Im Stadium pT2 (n=7) waren die Tumorzellen zu 96,11 % VEGF-positiv und zu 3,89 % VEGF-negativ ([s]: 5,53).

Hingegen beliefen sich die Ergebnisse bei den pT4-Tumoren (n=1) auf 88,4 % VEGF-positive und 11,6 % VEGF-negative Zellen.

Ein signifikanter Unterschied des Stadiums pT1 berechnet sich zum Stadium pT4 ( $p < 0.05$ ).

G2-Tumoren	VEGF-positive Zellen in %	VEGF-negative Zellen in %
pTa (n=3)	97,09	2,91
pT1 (n=6)	97,98	2,02
pT2 (n=7)	96,11	3,89
pT4 (n=1)	88,4	11,6

*Tabelle 7:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver bzw. VEGF-negativer Zellen im TUR-Präparat im Stadium pTa G2, pT1 G2, pT2 G2, pT4 G2



*Diagramm 6:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im TUR-B-Präparat im Stadium pTa G2, pT1 G2, pT2 G2, pT4 G2

### Grading G2-3:

Bei sechs Patienten lag ein G2-3- Tumor vor. 97,27 % VEGF-positiv, 2,73 % VEGF-negative Zellen fanden sich im Stadium pT1 (n=3) ([s]: 3,21). 98 % VEGF-positiv Tumorzellen wurden im Stadium pT2 (n=3) ermittelt ([s]: 0,58).

<b>G2-3-Tumoren</b>	<b>VEGF-positive Zellen in %</b>	<b>VEGF-negative Zellen in %</b>
pT1 (n=3)	97,27	2,73
pT2 (n=3)	98	2

*Tabelle 8:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver bzw. VEGF-negativer Zellen im TUR-B-Präparat im Stadium pT1 G2-3, pT2 G2-3

#### Grading G3:

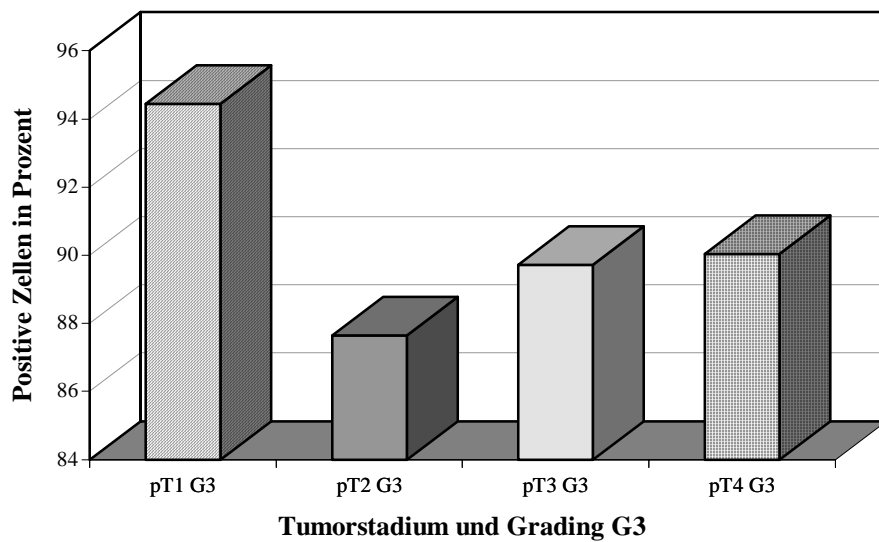
Bei den pT1 G3-Tumoren (n=7) waren durchschnittlich 94,44 % VEGF-positiv und 5,56 % VEGF-negativ zu finden ([s]: 4,36).

Für das Stadium pT2 (n=14) wurden 87,65 % VEGF-positiv, 12,35 % VEGF-negativ Tumorzellen ausgezählt ([s]: 11,11).

pT3-Tumoren (n=5) enthielten 89,71 % VEGF-positiv und 10,29 % VEGF-negativ ([s]: 8,32), pT4-Tumoren (n=4) 90,04 % VEGF-positiv und 9,96 % VEGF-negativ Zellen ([s]: 6,29).

<b>G3-Tumoren</b>	<b>VEGF-positive Zellen in %</b>	<b>VEGF-negative Zellen in %</b>
pT1 (n=7)	94,44	5,56
pT2 (n=14)	87,65	12,35
pT3 (n=5)	89,71	10,29
pT4 (n=4)	90,04	9,96

*Tabelle 9:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver bzw. VEGF-negativer Zellen im TUR-B-Präparat im Stadium pT1 G3, pT2 G3, pT3 G3, pT4 G3



*Diagramm 7:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im TUR-B-Präparat im Stadium pT1 G3, pT2 G3, pT3 G3, pT4 G3

## 3.2 Auswertung der Cystektomie-Präparate

### 3.2.1 Auswertung der Cystektomie-Präparate nach Stadien

Nach Auszählung von fünf Hot-Spots pro Cystektomie-Präparat wurden folgende Werte ermittelt:

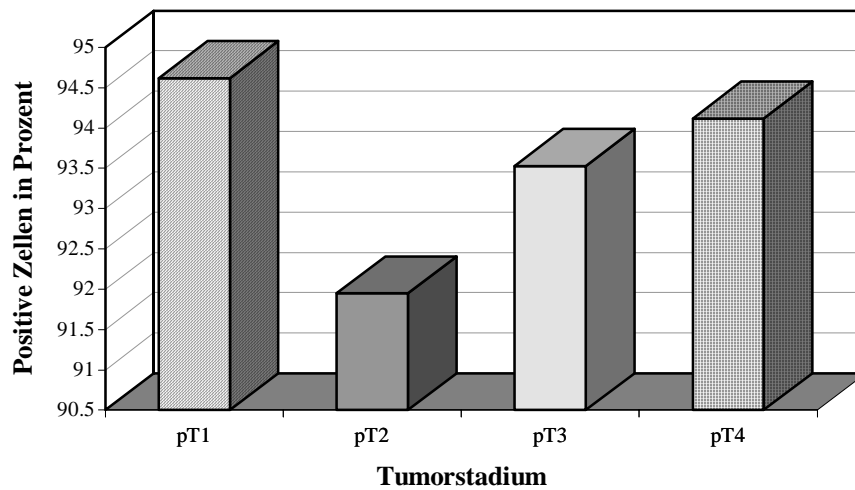
Die Auswertung ergab für das Stadium pT1 (n=5) 94,62 % VEGF-positive und 5,38 % VEGF-negative Tumorzellen ([s]: 6,1).

Für pT2 (n=15) wurden 91,95 % VEGF-positive und 8,05 % VEGF-negative Zellen ermittelt ([s]: 9,96).

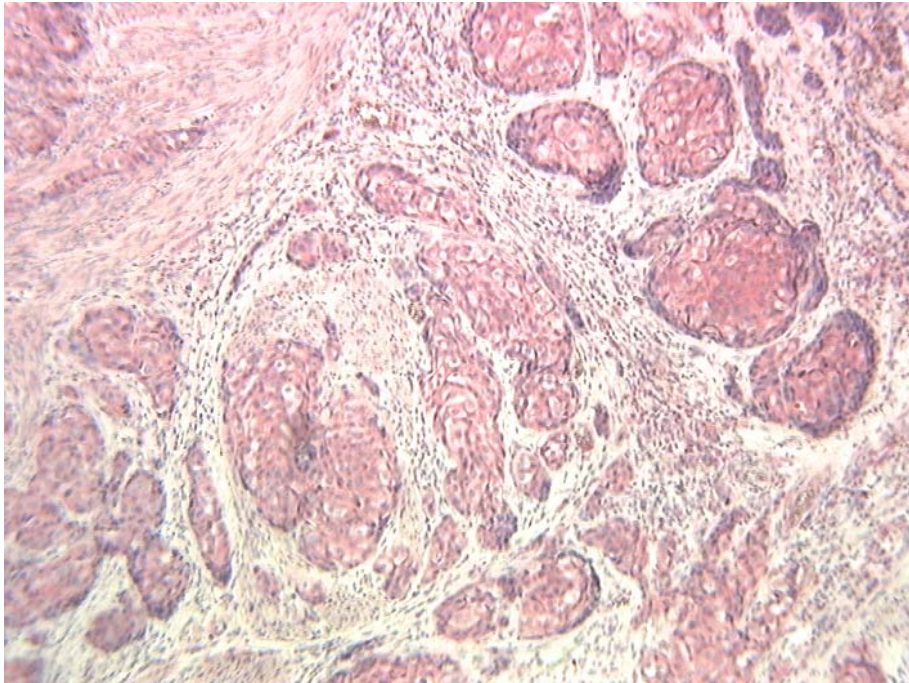
pT3-Tumoren (n=21) wiesen im Mittel 93,53 % VEGF-positive und 6,47 VEGF-negative ([s]: 6,35), pT4-Tumoren (n=11) 94,12 % VEGF-positive und 5,88 % VEGF-negative Zellen auf ([s]: 3,41).

Stadium	VEGF-positive Zellen in %	VEGF-negative Zellen in %
pT1 (n=5)	94,62	5,38
pT2 (n=15)	91,95	8,05
pT3 (n=21)	93,53	6,47
pT4 (n=11)	94,12	5,88

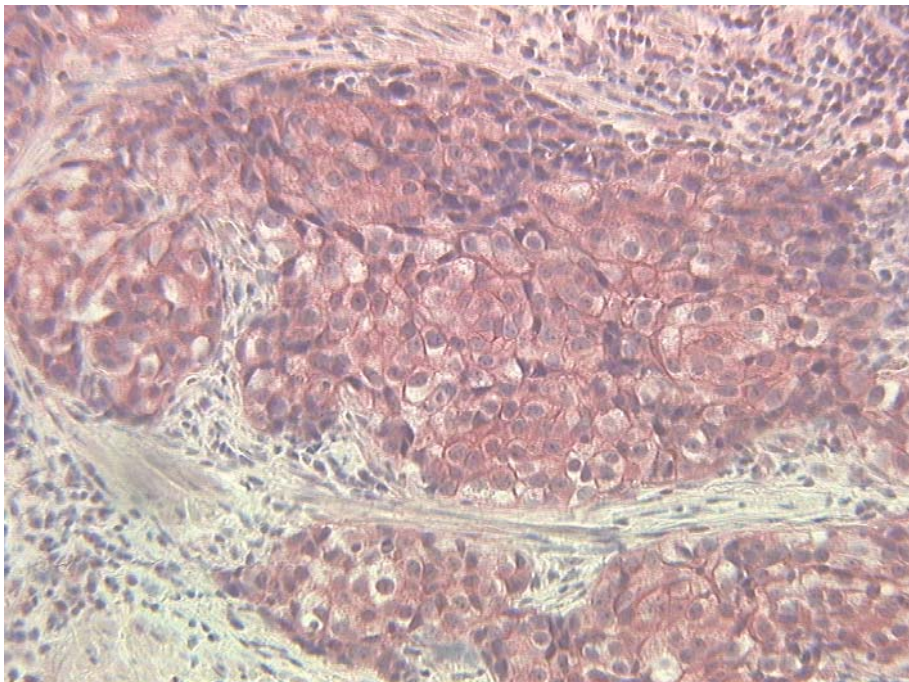
*Tabelle 10:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver bzw. VEGF-negativer Zellen im Cystektomie-Präparat, gruppiert nach Stadien



*Diagramm 8:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im Cystektomie-Präparat, gruppiert nach Stadien

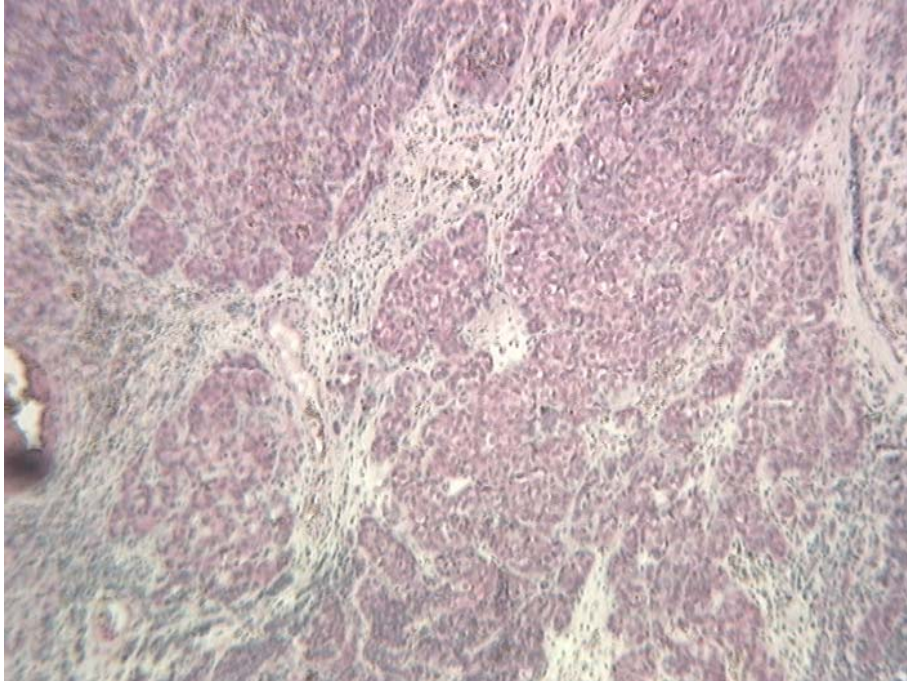


*Abbildung 4:* Histologisches Präparat: Urothelkarzinom der Harnblase, Stadium pT2G2, Anti-VEGF-Antikörper-Färbung/APAAP-Komplex, 100-fache Vergrößerung

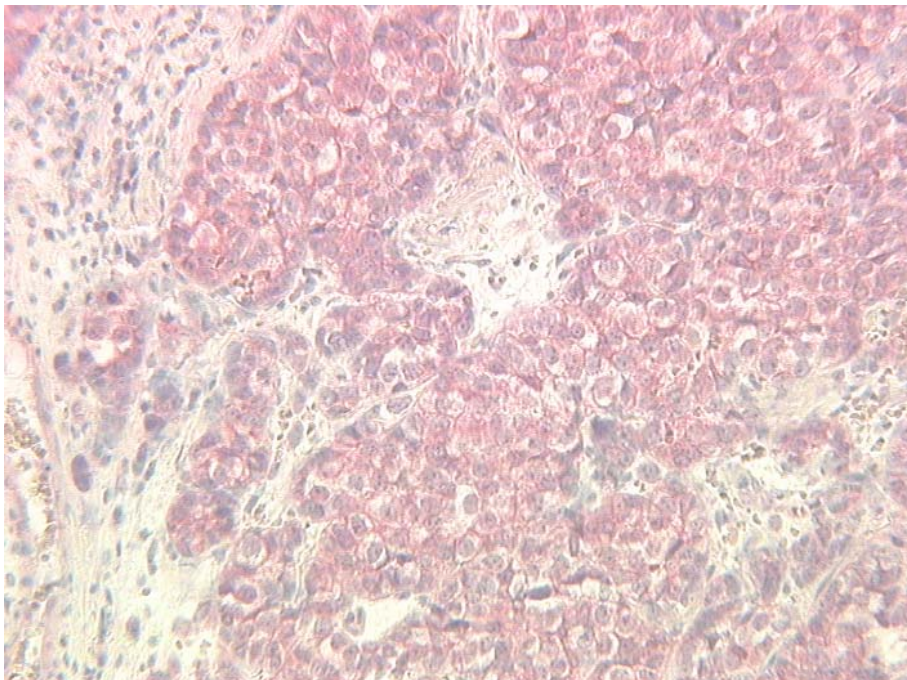


*Abbildung 5:* Histologisches Präparat: Urothelkarzinom der Harnblase, Stadium pT2G2, Anti-VEGF-Antikörper-Färbung/APAAP-Komplex, 250-fache Vergrößerung

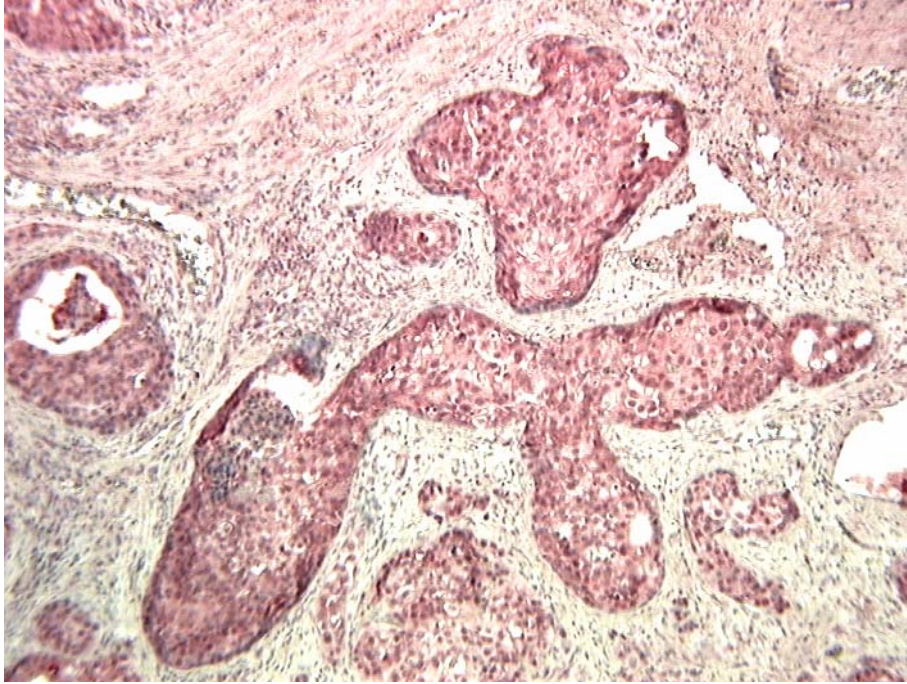




*Abbildung 6:* Histologisches Präparat: Urothelkarzinom der Harnblase, Stadium pT3G3, Anti-VEGF-Antikörper-Färbung/APAAP-Komplex, 100-fache Vergrößerung



*Abbildung 7:* Histologisches Präparat: Urothelkarzinom der Harnblase, Stadium pT3G3, Anti-VEGF-Antikörper-Färbung/APAAP-Komplex, 250-fache Vergrößerung



*Abbildung 8:* Histologisches Präparat: Urothelkarzinom der Harnblase, Stadium pT4G3, Anti-VEGF-Antikörper-Färbung/APAAP-Komplex, 100-fache Vergrößerung

### 3.2.2 Auswertung der Cystektomie-Präparate nach Grading

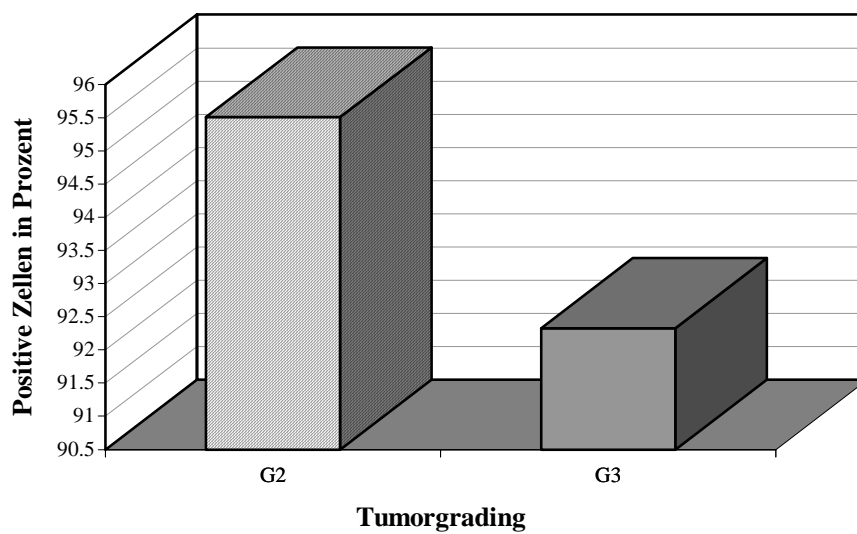
Stellt man die Ergebnisse nach den Differenzierungsgraden zusammen, so erhält man folgende Werte:

Bei den G2-Tumoren (n=16) lagen die Mittelwerte für VEGF-positive Zellen bei 95,51 %, für VEGF-negative bei 4,49 % ([s]: 3,24).

Für das Grading G3 (n=36) finden sich im Durchschnitt 92,33 % VEGF-positive und 7,67 % VEGF-negative Tumorzellen ([s]: 8,03).

<b>Grading</b>	<b>VEGF-positive Zellen in %</b>	<b>VEGF-negative Zellen in %</b>
G2 (n=16)	95,51	4,49
G3 (n=36)	92,33	7,67

*Tabelle 11:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver bzw. VEGF-negativer Zellen im Cystektomie-Präparat, gruppiert nach Grading



*Diagramm 9:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im Cystektomie-Präparat, gruppiert nach Grading

### 3.2.3 Auswertung der Cystektomie-Präparate – Vergleich Stadien zu Grading

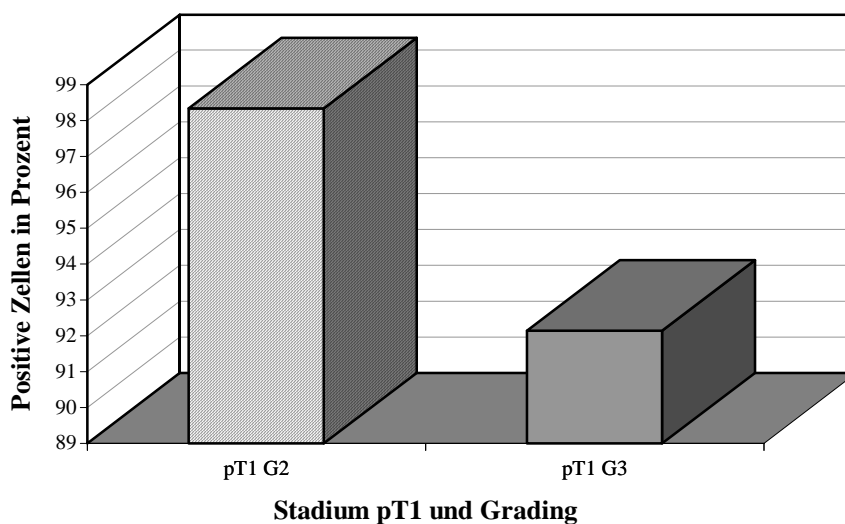
Die Auswertung der einzelnen Stadien wird hinsichtlich der unterschiedlichen histologischen Grade dargestellt.

Stadium pT1:

Für die G2-Tumoren (n=2) wurde ein Mittelwert von 98,34 % VEGF-positive Zellen und 1,66 % VEGF-negative Zellen gefunden ([s]: 2,83). Bei den G3-Tumoren (n=3) lag hingegen der Mittelwert bei 92,14 % VEGF-positive Zellen ([s]: 6,81).

pT1	VEGF-positive Zellen in %	VEGF-negative Zellen in %
G2 (n=2)	98,34	1,66
G3 (n=3)	92,14	7,86

*Tabelle 12:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver bzw. VEGF-negativer Zellen im Cystektomie-Präparat im Stadium pT1 G2, pT1 G3



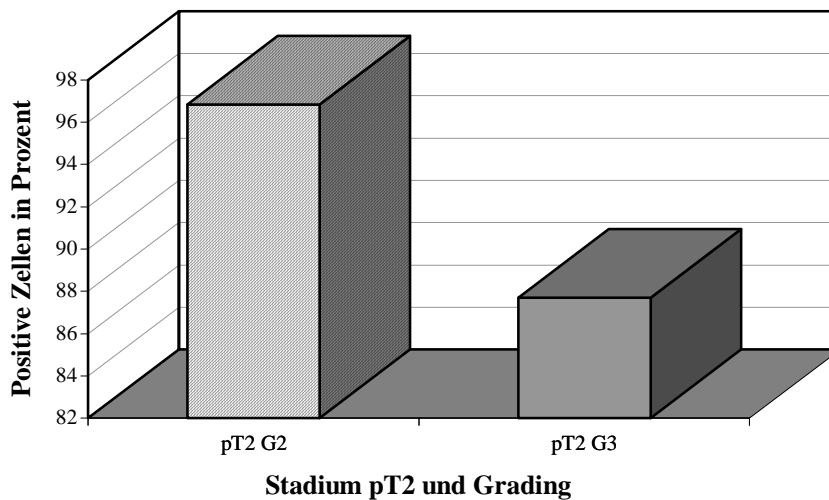
*Diagramm 10:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im Cystektomie-Präparat im Stadium pT1 G2, pT1 G3

## Stadium pT2:

Die Auszählung ergab bei den G2-Tumoren (n=7) durchschnittlich 96,82 % VEGF-positive und 3,18 % VEGF-negative ([s]: 3,13), bei den G3-Tumoren (n=8) 87,7 % VEGF-positive und 12,3 % VEGF-negative Zellen ([s]: 12,16).

pT2	VEGF-positive Zellen in %	VEGF-negative Zellen in %
G2 (n=7)	96,82	3,18
G3 (n=8)	87,7	12,3

*Tabelle 13:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver bzw. VEGF-negativer Zellen im Cystektomie-Präparat im Stadium pT2 G2, pT2 G3



*Diagramm 11:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im Cystektomie-Präparat im Stadium pT2 G2, pT2 G3

Stadium pT3:

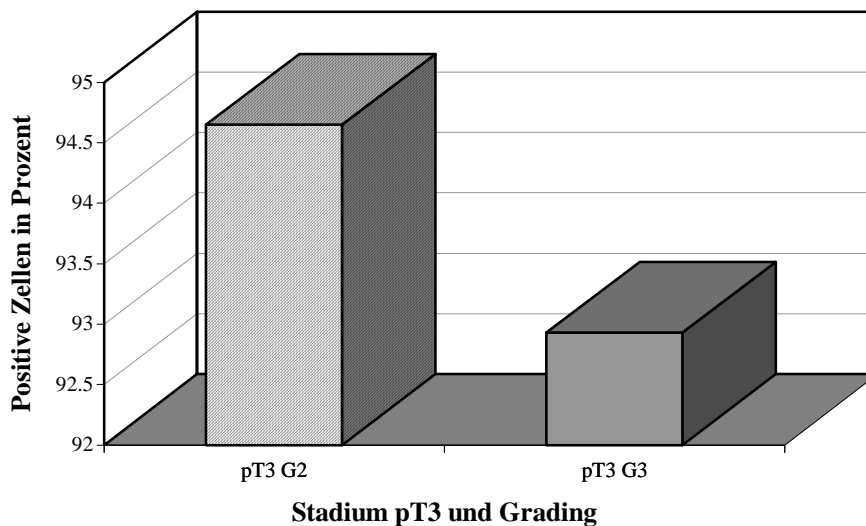
Der Anteil VEGF-positiver Zellen beläuft sich bei den G2-Tumoren (n=4) auf 94,65 %, der VEGF-negativer auf 5,35 % ([s]: 1,41).

Ein Tumor wurde im Stadium pT3 mit dem Grad G2-3 gefunden. Dieser enthielt 98,78 % VEGF-positive und 1,22 % VEGF-negative Zellen.

Die G3-Tumoren (n=16) enthielten im Durchschnitt 92,93 % VEGF-positive und 7,07 % VEGF-negative Zellen ([s]: 7,16).

<b>pT3</b>	<b>VEGF-positive Zellen in %</b>	<b>VEGF-negative Zellen in %</b>
G2 (n=4)	94,65	5,35
G2-3 (n=1)	98,78	1,22
G3 (n=16)	92,93	7,07

*Tabelle 14:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver bzw. VEGF-negativer Zellen im Cystektomie-Präparat im Stadium pT3 G2, pT3 G3



*Diagramm 12:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im Cystektomie-Präparat im Stadium pT3 G2, pT3 G3

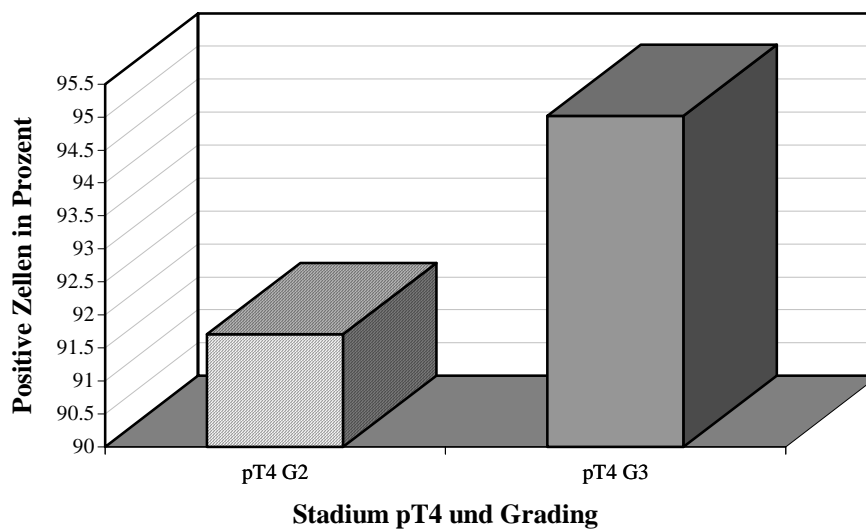
## Stadium pT4:

Im Stadium pT4 ist die prozentuale Verteilung anders.

Bei den G2-Tumoren (n=3) wurden 91,71 % VEGF-positive und 8,29 % VEGF-negative Zellen ([s]: 1,73), bei den G3-Tumoren (n=8) 95,02 % VEGF-positive und 4,98 % VEGF-negative Tumorzellen ermittelt ([s]: 3,42).

<b>pT4</b>	<b>VEGF-positive Zellen in %</b>	<b>VEGF-negative Zellen in %</b>
G2 (n=3)	91,71	8,29
G3 (n=8)	95,02	4,98

*Tabelle 15:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver bzw. VEGF-negativer Zellen im Cystektomie-Präparat im Stadium pT4 G2, pT4 G3



*Diagramm 13:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im Cystektomie-Präparat im Stadium pT4 G2, pT4 G3



### 3.2.4 Auswertung der Cystektomie-Präparate – Vergleich Grading zu Stadien

Im Folgenden werden die Grade G2 und G3 bezüglich ihrer unterschiedlichen T-Stadien einander gegenübergestellt.

Ein Patient wurde als G2-3 gradiert. Dieser hatte einen pT3-Tumor mit 98,78 % VEGF-positiven und 1,22 % VEGF-negativen Zellen.

#### Grading G2:

Bei 16 Patienten lag ein G2-Tumor vor.

98,34 % VEGF-positiv und 1,66 % VEGF-negativ Zellen wurden für das Stadium pT1 (n=2) ausgezählt ([s]: 2,83).

Für die pT2-Tumoren (n=7) wurden 96,82 % VEGF-positiv und dementsprechend 3,18 % VEGF-negativ Zellen ermittelt ([s]: 3,13).

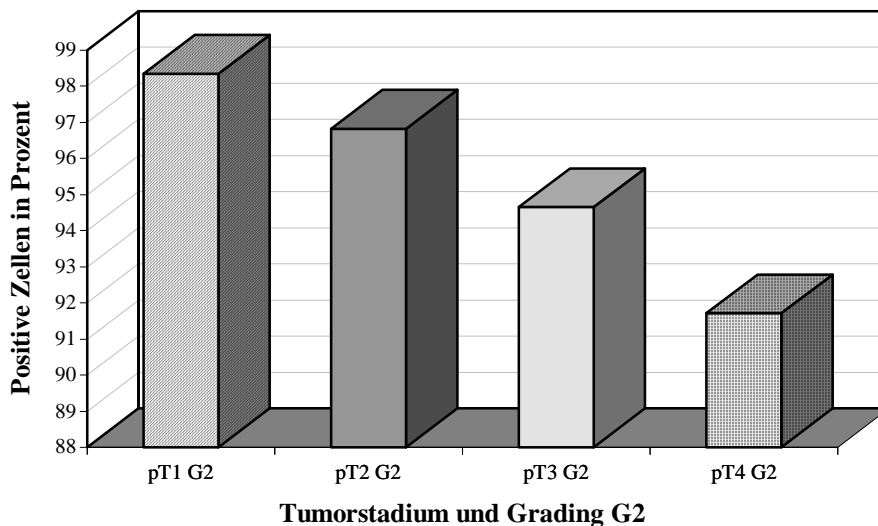
Der Durchschnitt VEGF-positiver Tumorzellen lag im Stadium pT3 (n=4) bei 94,65 %, der VEGF-negativer bei 5,35 % ([s]: 1,41).

Im Stadium pT4 (n=3) wurden 91,71 % VEGF-positiv und 8,29 % VEGF-negativ Zellen gefunden ([s]: 1,73).

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich vom Stadium pT1 zum Stadium pT3 und pT4 ( $p < 0.05$ ), ebenso von pT2 zu pT4 ( $p < 0.05$ ).

Stadium	VEGF-positive Zellen in %	VEGF-negative Zellen in %
pT1 (n=2)	98,34	1,66
pT2 (n=7)	96,82	3,18
pT3 (n=4)	94,65	5,35
pT4 (n=3)	91,71	8,29

*Tabelle 16:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver bzw. VEGF-negativer Zellen im Cystektomie-Präparat im Stadium pT1G2, pT2 G2, pT3 G2, pT4 G2



*Diagramm 14:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im Cystektomie-Präparat im Stadium pT1 G2, pT2 G2, pT3 G2, pT4 G2

#### Grading G3:

Bei 35 Patienten lag ein undifferenziertes Carcinom vor.

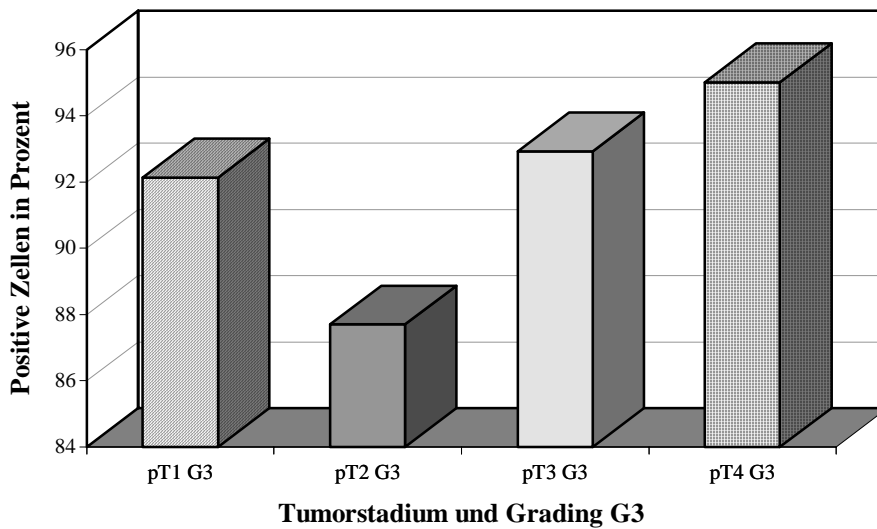
Der Anteil VEGF-positiver Tumorzellen betrug im Stadium pT1 (n=3) 92,14 %, der der VEGF-negativen 7,86 % ([s]: 6,81).

Im Stadium pT2 (n=8) wiesen 87,7 % VEGF-positiv und 12,3 % VEGF-negative Zellen auf ([s]: 12,16).

pT3-Tumoren (n=16) enthielten 92,93 % VEGF-positive und 7,07 % VEGF-negative Zellen ([s]: 7,16), pT4-Tumoren(n=8) hingegen 95,02 % VEGF-positive und 4,98 % VEGF-negative Zellen ([s]: 3,42).

Stadium	VEGF-positive Zellen in %	VEGF-negative Zellen in %
pT1 (n=3)	92,14	7,86
pT2 (n=8)	87,7	12,3
pT3 (n=16)	92,93	7,07
pT4 (n=8)	95,02	4,98

*Tabelle 17:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver bzw. VEGF-negativer Zellen im Cystektomie-Präparat im Stadium pT1 G3, pT2 G3, pT3 G3, pT4 G3



*Diagramm 15:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im Cystektomie-Präparat im Stadium pT1 G3, pT2 G3, pT3 G3, pT4 G3

### 3.2.5 Auswertung der Cystektomie-Präparate bezüglich Lymphangiosis und Hämangiosis carcinomatosa

Bei 19 Patienten lag eine Lymphangiosis carcinomatosa vor.

Diese Tumoren hatten eine VEGF-positivität von 92,57 % ([s]: 5,79). Die Tumoren ohne Lymphangiosis wiesen 93,1 % VEGF-positive Zellen auf.

Bei sieben Patienten wurde eine Hämangiosis carcinomatosa gefunden. 93,85 % der Tumorzellen waren hierbei VEGF-positiv ([s]: 5,69).

Die Tumoren ohne Hämangiosis enthielten 93,22 % VEGF-positive Zellen.

## 3.2.6 Auswertung der Cystektomie-Präparate bezüglich lymphogener Metastasierung

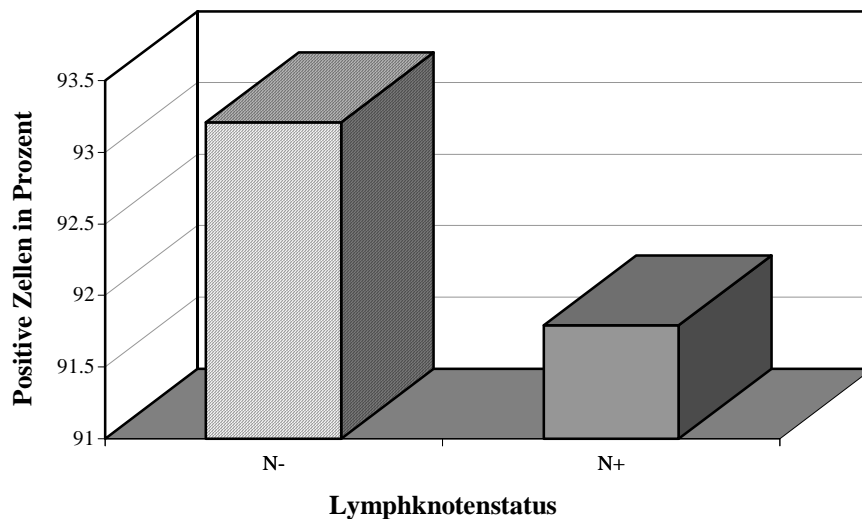
Die Auswertung bezüglich des Lymphknotenstatus ergab folgende Ergebnisse:

Der prozentuale Anteil VEGF-positiver Tumorzellen lymphknoten-negativer Patienten (n=38) betrug 93,21 %, der der VEGF-negativen 6,79 % ([s]: 7,26).

Bei den Tumoren lymphknoten-positiver Patienten (n=14) wurden 91,79 % VEGF-positiv und 8,21 % VEGF-negative Zellen ermittelt([s]: 6,42).

<b>Lymphknoten-status</b>	<b>VEGF-positive Zellen in %</b>	<b>VEGF-negative Zellen in %</b>
negativ (n=38)	93,21	6,79
positiv (n=14)	91,79	8,21

*Tabelle 18:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver bzw. VEGF-negativer Zellen im Cystektomie-Präparat, gruppiert nach Lymphknotenstatus



*Diagramm 16:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im Cystektomie-Präparat, gruppiert nach Lymphknotenstatus

Betrachtet man beide Patientenkollektive – lymphknotennegativ und lymphknotenpositiv – bezogen auf die einzelnen Stadien, so ergibt sich folgende prozentuale Verteilung:

Im Stadium pT2 wurde bei den Tumoren des lymphknotennegativen Kollektivs (n=12) im Schnitt 90,5 % VEGF-positive Zellen gefunden ([s]: 10,97), bei denen des lymphknotenpositiven Kollektivs (n=3) 95 % ([s]: 3,0).

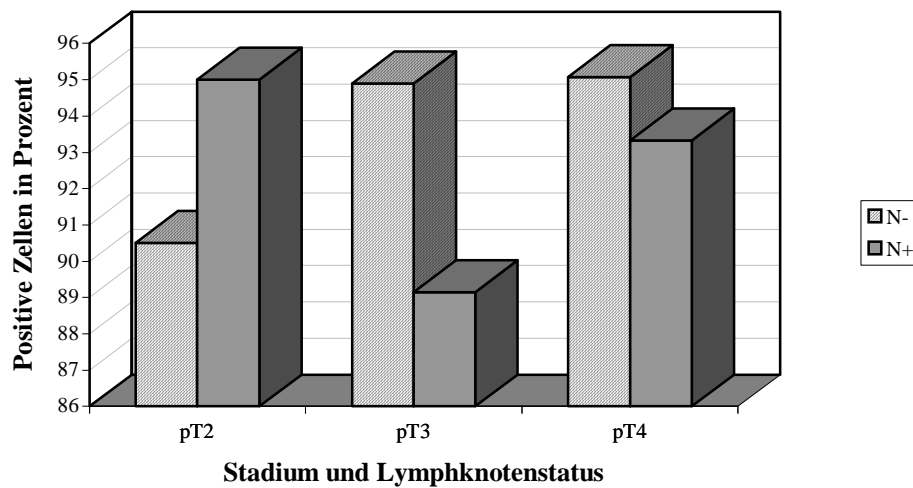
Bei den lymphknotennegativen pT3-Tumoren (n=16) waren 94,9 % der Tumorzellen VEGF-positiv ([s]: 4,34), bei den lymphknotenpositiven (n=5) dagegen nur 89,15 % ([s]: 9,89).

Im Stadium pT4 lag der Anteil VEGF-positiver Zellen der Tumoren ohne lymphogener Metastasierung (n=5) bei 95,08 % ([s]: 4,16), der der Tumoren mit lymphogener Metastasierung (n=6) bei 93,32 % ([s]: 2,79).

Ein signifikanter Unterschied berechnet sich im Stadium pT3 von Lymphknotennegativität zu Lymphknotenpositivität ( $p < 0.05$ ).

Stadium	VEGF-positive Zellen in % bei Lymphknotennegativität	VEGF-positive Zellen in % bei Lymphknotenpositivität
pT2	90,5 (n=12)	95 (n=3)
pT3	94,9 (n=16)	89,15 (n=5)
pT4	95,08 (n=5)	93,32 (n=6)

*Tabelle 19:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im Cystektomiepräparat, gruppiert nach Stadien, bezogen auf den Lymphknotenstatus



*Diagramm 17:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im Cystektomie-Präparat, gruppiert nach Stadien bezogen auf den Lymphknotenstatus

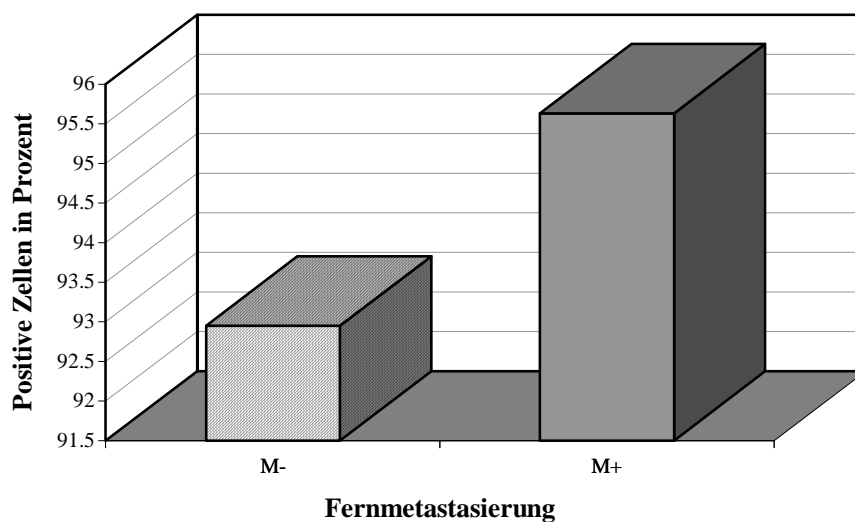
## 3.2.7 Auswertung der Cystektomie-Präparate bezüglich hämatogener Metastasierung

Vergleicht man die Ergebnisse der Patienten ohne Fernmetastasierung mit denen der Patienten mit Tochtergeschwülsten, so erhält man diese prozentuale Verteilung:

Für nicht metastasierte Tumoren (n=45) fand sich ein Mittelwert von 92,95 % VEGF-positiver und 7,05 % VEGF-negativer Zellen ([s]: 7,35). Bei metastasierten Tumoren (n=7) hingegen beläuft sich der Anteil VEGF-positiver Zellen auf 95,63 %, der VEGF-negativer auf 4,37 % ([s]: 4,0).

<b>Fern-metastasen</b>	<b>VEGF-positive Zellen in %</b>	<b>VEGF-negative Zellen in %</b>
negativ(n=45)	92,95	7,05
positiv (n=7)	95,63	4,37

*Tabelle 20:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver bzw. VEGF-negativer Zellen im Cystektomie-Präparat, gruppiert nach Fernmetastasierung



*Diagramm 18:* Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im Cystektomie-Präparat, gruppiert nach Fernmetastasierung



Auf die einzelnen Stadien bezogen erhält man folgende Ergebnisse:

Die nicht metastasierten pT2-Tumoren (n=14) enthielten durchschnittlich 91,5 % VEGF-positive Zellen ([s]:10,16).

Lediglich ein Tumor im Stadium pT2 metastasierte. Dieser enthielt 98,35 % VEGF-positive Zellen.

Im Stadium pT3 beläuft sich der prozentuale Anteil VEGF-positiver Tumorzellen bei den M0-Tumoren (n=19) auf 93,05 ([s]: 6,49) und bei den M1-Tumoren (n=2) auf 97,5 ([s]: 2,12).

Bei dem Patientenkollektiv ohne Filialisierung (n=7) wurden für die pT4-Tumoren 94,37 % VEGF-positive Zellen ([s]: 3,16) und bei dem Patientenkollektiv mit Filiae (n=4) 93,68 % VEGF-positive Tumorzellen gefunden ([s]:4,24).

Stadium	VEGF-positive Zellen in % ohne Fernmetastasen	VEGF-positive Zellen in % mit Fernmetastasen
pT2	91,5 (n=14)	98,35 (n=1)
pT3	93,05 (n=19)	97,5 (n=2)
pT4	94,37 (n=7)	93,68 (n=4)

Tabelle 21: Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im Cystektomiepräparat, gruppiert nach Stadien, bezogen auf Fernmetastasierung

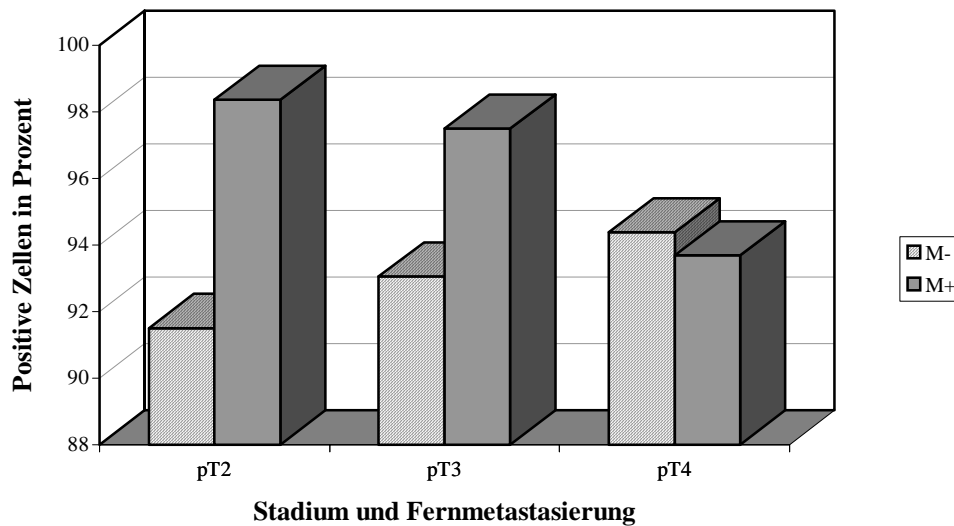


Diagramm 19: Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im Cystektomie-Präparat, gruppiert nach Stadien bezogen auf die Fernmetastasierung

### 3.3 Auswertung der Präparate –Vergleich TUR-B zu Cystektomie

Die Zuordnung zu den T-Stadien erfolgte sowohl für die TUR-B- als auch für die Cystektomie-Ergebnisse gemäß der endgültigen histologischen Befundung nach Cystektomie. Im direkten Vergleich der einzelnen Stadien nach Auswertung der TUR- bzw. der Cystektomie-Präparate ergeben sich folgende Ergebnisse:

Bei den pT1-Tumoren wurden in dem TUR-Präparat (n=16) 96,3 % VEGF-positive ([s]: 3,58) und im Cystektomie-Präparat (n=5) 94,62 % VEGF-positive Zellen ausgezählt ([s]: 6,1).

Im Stadium pT2 lag der Anteil VEGF-positiver Tumorzellen im TUR-Präparat (n=26) bei 91,72 % ([s]: 9,59), im Cystektomie-Präparat (n=15) bei 91,95 % ([s]:9,96).

Im Stadium pT3 wurden für die TUR-Präparate (n=5) 89,71 % ([s]:8,3)], für die Cystektomie-Präparate (n=21) 93,53 % ([s]: 6,35) und im Stadium pT4 für die TUR-Präparate (n=5) ebenfalls 89,71 % ([s]:5,5), für die Cystektomie-Präparate (n=11) 94,12 % VEGF-positive Zellen ermittelt ([s]:3,41).

Stadium	VEGF-positive Zellen in % TUR-B	VEGF-positive Zellen in % Cystektomie
pT1	96,3 (n=16)	94,62 (n=5)
pT2	91,72 (n=26)	91,95 (n=15)
pT3	89,71 (n=5)	93,53 (n=21)
pT4	89,71 (n=5)	94,12 (n=11)

Tabelle 22: Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im TUR- bzw. im Cystektomie-Präparat, gruppiert nach Stadien

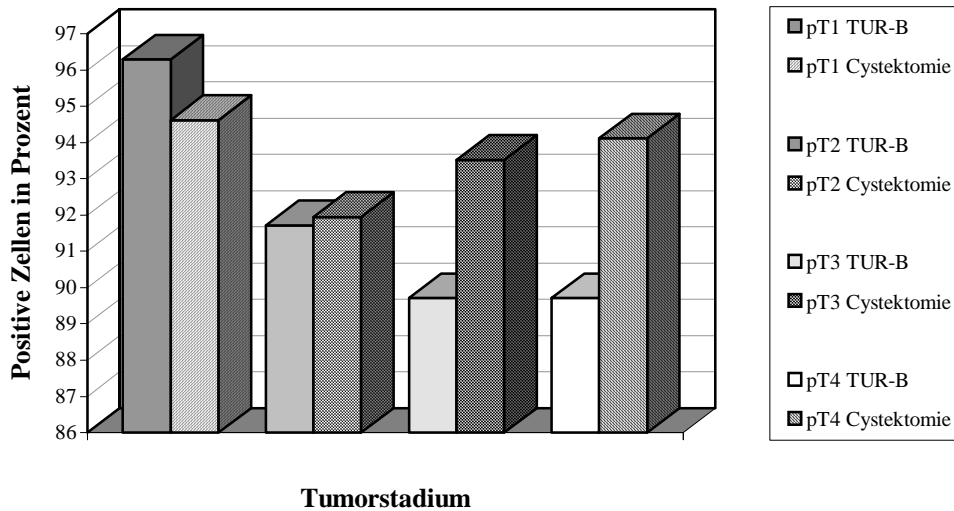
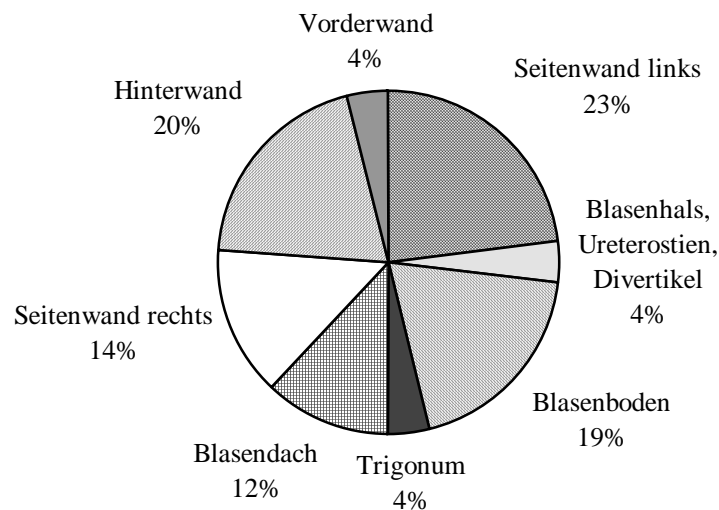


Diagramm 20: Prozentualer Anteil VEGF-positiver Zellen im TUR-B- bzw. im Cystektomie-Präparat, gruppiert nach Stadien

### 3.4 Morphologische Klassifikation

#### 3.4.1 Lokalisation der Tumore

Mit 69 % war die multifokale Lokalisation der Tumore am häufigsten zu finden. Insgesamt betrachtet war die linke Seitenwand mit 23 %, die Hinterwand mit 20 %, der Blasenboden mit 19 %, die rechte Seitenwand mit 14 %, das Blasendach mit 12 %, das Trigonum mit 4 %, die Vorderwand mit 4 % und der Blasenhalshals, die Ureterostien und Divertikel der Blase mit jeweils 1,3 % betroffen.



*Diagramm 21: Häufigkeiten der Lokalisation des Primärtumors*

In 21 % der Fälle infiltrierte das Harnblasenkarzinom per continuitatem in benachbarte Organe. Hierbei war mit 40 % die Prostata am häufigsten betroffen, gefolgt von der Urethra/periurethrales Gewebe mit 20 %, dem Colon mit 10 % und dem Rektum, dem Beckenboden, dem Uterus, der Vagina, der Portio und der Vulva mit je 5 %.

### 3.4.2 Lymphknotenbefall

Lymphknotenmetastasen fanden sich bei 15 Patienten (29 %). Davon waren fünf Patienten N1 (33 %), zehn Patienten N2 (67 %) klassifiziert. Hierbei waren in 33 % der Fälle nur die iliakalen Lymphknotenstationen, in 13 % der Fälle nur die obturatorischen und in 47 % sowohl die iliakalen als auch die obturatorischen Lymphknoten betroffen. In 7 % waren die Lymphknoten im perivesikalen Fettgewebe befallen.

### 3.4.3 Histologische Deskription

Bei allen Tumoren handelte es sich um Urothelkarzinome. 11,5 % wiesen zusätzlich Plattenepithelanteile auf.

40 % stellten sich histologisch als solide Tumorformationen dar, 29 % wuchsen papillär und 31 % hatten sowohl solide als auch papilläre Anteile.

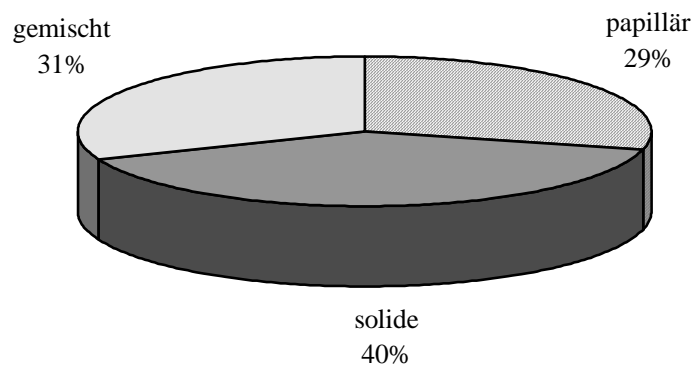


Diagramm 22: Anteile der histopathologischen Tumorformationen

Zusätzlich hatten 36,5 % der Patienten eine Lymphangiosis carcinomatosa, 13,5 % eine Hämangiosis carcinomatosa und 31 % ein Carcinoma in situ.

### 3.5 Klinische Aktenauswertung

#### 3.5.1 Risikofaktoren

Bezüglich begünstigender Faktoren zur Entstehung eines Harnblasenkarzinoms lassen sich folgende Ergebnisse darstellen:

18 Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung aktive Raucher (34,5 %). Unter den Nichtrauchern fanden sich jedoch anamnestisch vier ehemalige starke Raucher. Einer beruflichen Exposition gegenüber Stoffen, die als Risikofaktoren gelten (u.a. aromatische Amine), waren sechs Patienten (11,5 %) ausgesetzt. Zehn Patienten litten an einer chronischen Entzündung der Harnblase (19 %). Bei einem Patienten lag ein Analgetika-Abusus (> 10 Jahre) vor.

#### 3.5.2 Erstsymptome

An Erstsymptomen war die schmerzlose Makrohämaturie mit 42 Angaben (81 %) am häufigsten, gefolgt von Dysurie mit 13 Angaben (25 %), von Pollakisurie mit sechs Angaben (11,5 %) und von neu aufgetretener Nykturie mit fünf Angaben (9,5 %). Bei drei Patienten bestand eine Algurie (6 %). Jeweils einmal wurden Flankenschmerzen, Unterbauchschmerzen, Gewichtsverlust, Restharngefühl, Harndrang und Mikrohämaturie beschrieben.

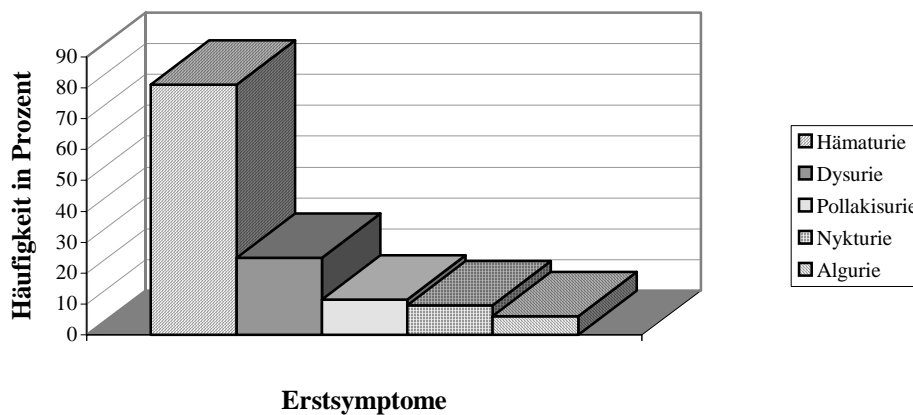


Diagramm 23: Häufigkeit der Erstsymptome in Prozent

### 3.5.3 Metastasierung

Fernmetastasen fanden sich im gesamten Betrachtungszeitraum bei acht Patienten (15,5 %).

Jeweils dreimal fanden sich Filiae in der Leber und im Skelettsystem, jeweils zweimal in der Lunge bzw. in der Haut. Jeweils einmal metastasierte das Harnblasenkarzinom in die Nebenniere, in die Bauchwand und in das linke Ovar. Einmal trat eine Peritonealcarcinose auf.

### 3.5.4 Harnableitung

Nach Cystoprostatektomie bzw. vorderer Exenteration erfolgte die Harnableitung bei 20 Patienten (38,5 %) mit einem Mainz-Pouch I (Ileozökalpouch) als eine Form der kontinenten Harnableitung. 25 Patienten (48 %) wurden mit einem Ileum-Conduit und zwei mit einem Colon-Conduit versorgt. Fünf Patienten (9,5 %) erhielten ein orthotopes Blasensubstitut mittels ileozökalem Segment.

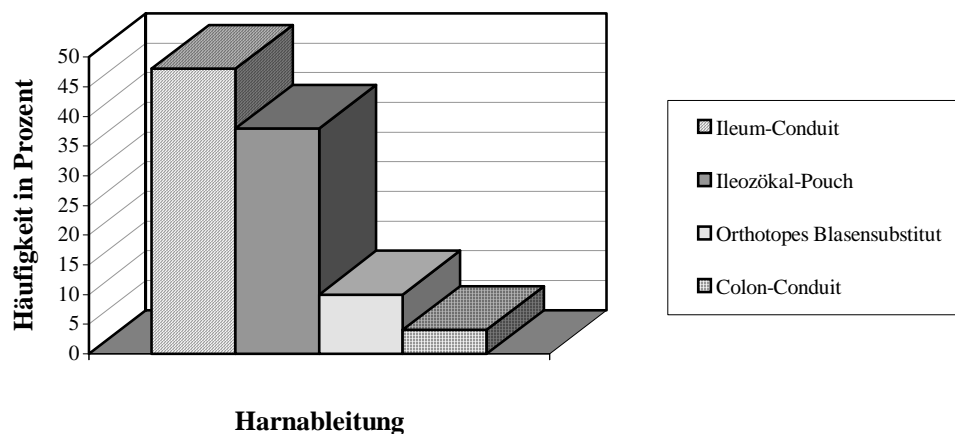


Diagramm 24: Häufigkeit der Harnableitung nach Cystektomie



### 3.5.5 Follow-up

Im weiteren Verlauf erlagen acht Patienten ihrer Erkrankung. Die Überlebenszeit nach Cystektomie betrug hierbei durchschnittlich 7,3 Monate (zwischen 2 und 20 Monaten). Diese Patienten erreichten im Mittel ein Lebensalter von 57,5 Jahren.

Bei einem dieser Patienten lag histologisch ein pT1 Tumor im Cystektomiepräparat vor, bei fünf ein pT3 und bei zwei Patienten ein pT4 Tumor.

Sieben Patienten waren als G3, einer als G2 graduiert.

Zum Zeitpunkt der Operation hatten vier Patienten Lymphknotenmetastasen (alle N2) und bei ebenfalls vier Patienten lagen Fernmetastasen vor.

## **IV. Diskussion**

An die Erforschung der Angiogenese und deren Stimulatoren bzw. Inhibitoren als Schlüsselfunktion des Tumorwachstums werden insbesondere in der Onkologie viele Hoffnungen bezüglich Diagnostik und Therapie geknüpft.

Denn solide Tumoren benötigen die Neoangiogenese sowohl für ihr Wachstum als auch für die Bildung von Metastasen (6,25).

Die Tumorangiogenese wird durch Angiogenesestimulatoren sowie -inhibitoren reguliert, die unter anderem von den Tumorzellen selbst sezerniert werden.

In den letzten Jahren konnten einige dieser Faktoren identifiziert werden. Unter ihnen ist der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), von dem angenommen wird, er habe eine zentrale Stellung in der Angiogenese zahlreicher Tumoren (3).

.

Insbesondere beim Harnblasenkarzinom ist die Wachstums- und Progressionstendenz schwierig zu beurteilen, da gerade oberflächliche Tumoren gleichen Stadiums und Gradings unterschiedliche Verläufe zeigen können (35). Von den Untersuchungen der Angiogenese und ihren Faktoren erhofft man sich zuverlässige Kriterien, die für den Einzelfall die Prognose einschließlich der Rezidiv- und Metastasierungsneigung vorhersagen lassen und somit klinische Relevanz finden.

Auch in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms wären neue Indikatoren von großem Nutzen. Denn oftmals ergibt sich durch die konventionellen Methoden keine eindeutige Indikationsstellung zur geeigneten Therapiewahl. So ist beispielsweise die radikale Cystektomie bei pT1 G3-Karzinomen immer noch umstritten.

Neben dem klinischen Bild, der histologischen Beurteilung des cystoskopisch-biopsisch gewonnenen Materials stützt sich die Entscheidung der Therapiewahl auf bildgebende Verfahren wie die Ausscheidungsurographie, die Sonographie, der nur eine orientierende Bedeutung zukommen kann, und die Computertomographie.

Das CT läßt allerdings ebenfalls keine sichere Aussage über die Eindringtiefe des Tumors zu. Lediglich ein organüberschreitendes Tumorwachstum kann mit hoher Treffsicherheit festgestellt werden.

Häufig wird das CT auch zum präoperativen Lymphknotenstaging eingesetzt. Da nicht vergrößerte tumorbefallene Lymphknoten (<2 cm) einer Entdeckung entgehen, liegt die Rate falsch-negativer Befunde bei bis zu 40 % (50).

Ebenso kommen urinzytologische Untersuchungen bei der Diagnostik, der Nachsorge urothelialer Tumoren und beim Screening von Risikogruppen zur Anwendung. Dabei kommt es bei gut differenzierten Tumoren in ca. 25 % zu falsch-negativen Resultaten (50).

Ein neuer Ansatz der Urindiagnostik wurde von Crew et al. (18) auf den Weg gebracht. Im Urin von Blasenkarzinom-Patienten (n=153) wurden erhöhte VEGF-Protein-Werte gemessen. Das Stadium  $\mu$ pT1 zeigte signifikant höhere Werte als das Stadium pTa.

Keine Signifikanzen ergaben sich zwischen den Stadien pT1 und  $\mu$ pT2. Jedoch korrelierte der VEGF-Level signifikant mit der Rezidivrate von pTa- bzw. pT1-Tumoren.

Dies wäre möglicherweise ein neues Kriterium, um die in jedem individuellen Fall vorliegende Neoplasie besser einschätzen, und damit die Prognose des Harnblasenkarzinoms entscheidend verbessern zu können.

Tumoren der Stadien pTa und pT1 rezidivieren zu 50-60 % in den ersten zwei Jahren mit einer Progression von ca. 20 % (28). Die 5-Jahreüberlebensrate (JÜR) im Stadium pT1 G3 liegt bei nur 60 % (2). Bei Anwendung der radikalen Cystektomie erreicht die 5-JÜR in den Stadien pT1 G2 und pT1 G3 bis zu 90 %.

Bei Infiltration der Lamina propria muß in 14-22 % der Fälle mit einer Metastasierung gerechnet werden. Die Metastasierung entwickelt sich nicht primär, sondern ist Folge einer lokalen Tumorprogression, die nach TUR-B in 4 % (pTaG1) bis 31 % (pT1G3) erwartet werden muß (40).

Gerade in diesen Frühstadien wird von Arzt und Patient oft die organerhaltende TUR-B bevorzugt (1). Jedoch sollte angesichts dieser Zahlen die radikale Cystektomie diskutiert werden.

In dieser Arbeit konnte bei der lichtmikroskopischen Auswertung der Cystektomie-Präparate bezüglich des Stadiums gezeigt werden, daß bei pT1- (94,62 %) und pT4-Tumoren (94,12 %) die VEGF-Positivität ungefähr gleiche Werte erreicht, gefolgt von den pT3-Tumoren (93,53 %) und den pT2-Tumoren (91,95 %) mit dem niedrigsten Wert.

Dies bedeutet, daß die Neoplasie beim Erreichen der Lamina propria ein Maximum an Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) exprimiert. Das hat zur Folge, daß der Tumor somit verbesserten Anschluß an das Gefäßsystem bekommt, indem die Neoangiogenese angeregt, und die Voraussetzung des vermehrten Tumorwachstums und der Mikrometastasensetzung geschaffen wird.

Eine mögliche Erklärung für die erhöhte VEGF-Expression im Stadium pT4 wäre damit der erhöhte Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen angesichts der Tumorgröße. Denn wie von Crew (17) gezeigt werden konnte, findet sich insbesondere im Bereich von Nekrosen eine starke VEGF-Expression, die wohl auf die lokale Hypoxie zurückzuführen ist.

Hinsichtlich des Gradings wurde gezeigt, daß G2-Tumoren (95,51 %) eine höhere VEGF-Expression aufweisen als G3-Tumoren (92,33 %).

Des weiteren ist das Verhalten der Tumoren innerhalb dieser beiden Gruppen in Bezug auf die verschiedenen Stadien unterschiedlich zu beschreiben.

Bei den G2-Tumoren weist das Stadium pT1 (98,34 %) den höchsten VEGF-Wert auf, gefolgt von pT2 (96,82 %), pT3 (94,65 %) und zuletzt pT4 (91,71 %). Bei den G3-Tumoren ist das nahezu umgekehrt. Den höchsten Wert findet man im Stadium pT4 (95,02 %), dann im Stadium pT3 (92,93 %), pT1 (92,14 %) und zuletzt im Stadium pT2 (87,7 %).

Oberflächliche Blasentumoren (n=185) mit dem Stadium pTa und pT1 wurden von Chow et al. (15) auf die VEGF-Protein-Expression hin untersucht. Es wurden ebenfalls formalin-fixierte Paraffinschnitte verwendet und mit einem polyklonalen Anti-VEGF-Antikörper gegen den Aminoterminus des VEGF<sub>165</sub> gefärbt. Als Färbeverfahren wurde die markierte Avidin-Biotin-Technik verwendet, die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin.

Weniger als 5 % angefärbte Tumorzellen wurden als leichtgradig, zwischen 5 % und 25 % als mittelgradig und mehr als 25 % als hochgradig VEGF-positiv bewertet. Als Gründe für die abweichende Prozentangabe, verglichen mit dieser Arbeit, wäre das unterschiedliche Färbeverfahren, die Verwendung anderer Antikörper (in vorliegender Arbeit Anti-VEGF-Antikörper gegen die Splicing-Varianten VEGF<sub>189</sub>, <sub>165</sub>, <sub>121</sub>), die sich in ihrer Sensitivität unterscheiden könnten, und möglicherweise eine andere Definition, welcher Grad der Anfärbung als positiv bzw. negativ zu werten ist.

Das Stadium pTa wies bei Chow et al. im Durchschnitt 17,9 % und das Stadium pT1 20,3 % VEGF-positive Zellen auf. Nur bezüglich Grading konnte ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) gezeigt werden. Im Grad G2 waren drei Schnitte leichtgradig, vier mittelgradig und acht hochgradig VEGF-positiv. Dagegen wiesen im Grad G3 acht Schnitte eine leichtgradige, drei eine mittelgradige und drei eine hochgradige VEGF-Positivität auf. Verglichen mit der Untersuchung von Chow et al. und dieser Arbeit sind also von der Aussage her vergleichbare Ergebnisse erzielt worden.

Bezüglich Tumorgröße, solitärem versus multiplem Auftreten, papillärem versus solidem Wachstum konnte jedoch keine signifikante Beziehung gefunden werden. Ebenso wurde keine Korrelation zwischen der VEGF-Expression und dem Rezidivrisiko bzw. der Überlebensrate ( $p > 0,1$ ) auf einen Untersuchungszeitraum von mehr als vier Jahren gefunden.

Weitere Untersuchungen zum VEGF beim Harnblasenkarzinom stützen sich auf die Analyse der VEGFmRNA anstelle des VEGF-Proteins. Denn erst seit kürzerem stehen Anti-VEGF-Antikörper für immunhistochemische Färbemethoden zur Verfügung. In diesen Studien wurde die VEGFmRNA mittels Hybridisierung nachgewiesen.

O'Brien et al. (52) zeigte, daß die VEGFmRNA-Expression bei oberflächlichen Tumoren ( $n=28$ ) viermal höher als bei invasiven Tumoren ( $p < 0,0006$ ) und zehnmal höher als im normalen Urothel ( $p < 0,0002$ ) ist. Bei pT1 G1/2-Tumoren, die innerhalb von drei Monaten rezidierten, konnte eine viermal höhere VEGFmRNA-Expression festgestellt werden als bei denen ohne Rezidiv.

Bei den invasiven Tumoren ( $n=17$ ) stellte er jedoch fest, daß der Platelet-derived Endothelial Cell Growth Factor (PDEC GF) eine größere Rolle als VEGF zu spielen

scheint. Denn bei den invasiven Tumoren wurde eine 33-mal höhere PDECGFmRNA-Expression als bei den oberflächlichen Tumoren und eine 260-mal höhere als in normaler Blase ausgewertet. Er kommt daher zu dem Schluß, daß oberflächliche und invasive Tumoren unterschiedliche angiogene Muster aufweisen, die deren Morphologie und Verhalten bestimmen.

Dies wäre auch die passende Erklärung dafür, daß die VEGF-Protein-Expression in vorliegender Arbeit im Stadium pT2 (91,95 %) im Vergleich zu pT1 (94,62 %) auf den niedrigsten Wert abfällt.

Auch Crew et al. (19) untersuchte pT1 G1- und pT1 G2-Tumoren (n=55) auf VEGFmRNA-Expression. Mit einer Signifikanz von  $p < 0,001$  konnte gezeigt werden, daß die VEGFmRNA-Expression in Tumoren, die innerhalb von sechs Monaten rezidierten oder eine Progression zu einem invasiven Stadium erfuhren, erhöht war. Außerdem ergab sich ein Hinweis darauf, daß die progressionsfreie Überlebenszeit bei Patienten mit erhöhtem VEGFmRNA-Level verkürzt war ( $p=0,06$ ).

VEGF scheint also ein wichtiger Faktor bezüglich der Rezidivrate zu sein.

Ferner quantifizierte diese Arbeitsgruppe das VEGF-Protein und erhielt Werte zwischen 40 und 4986 pg/mg Protein. Zwischen den Stadien pTa und pT1 ergab sich auch hier kein Unterschied.

Bezieht man die Ergebnisse vorliegender Arbeit auf den Lymphknotenstatus, so zeigt sich allenfalls ein geringer Unterschied in der VEGF-Expression bei

Lymphknotennegativität mit 93,21 % und Lymphknotenpositivität mit 91,79 %.

Somit scheint der Vascular Endothelial Growth Factor eine untergeordnete Rolle bei der lymphogenen Metastasierung zu spielen.

Untersuchungen zu einem verwandten Faktor derselben Familie, dem VEGF-C, zeigten, daß dieser lymphangiogene Eigenschaften besitzt. VEGF-C scheint bei der Entwicklung der Lymphabflußwege des Tumors und damit auch bei der lymphogenen Metastasierung eine entscheidende Position einzunehmen (17).

Eine Untersuchung von Inoue et al. (37) bezüglich des prognostischen Wertes von VEGFmRNA bei der Rezidivierung und Metastasierung beim muskelinvasiven

Harnblasenkarzinom (n=51) nach neoadjuvanter Chemotherapie und radikaler Cystektomie ergab folgende Ergebnisse.

Die VEGFmRNA-Expression sei ein signifikant besserer Vorhersagewert bezüglich der Rezidivneigung im Vergleich zum Stadium und der Messung der mittleren Gefäßdichte. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die VEGF- und auch FGF-Expression nach der M-VAC-Chemotherapie im Residualtumor höher war als vor der Therapie.

Inoue et al. kam zu der Schlußfolgerung, VEGF schütze die Tumorzellen nicht nur vor Hypoxie und Azidose, sondern auch vor Chemotherapie-induzierter Apoptose. Man stellt sich vor, die Tumorzellen mit niedriger VEGF-Expression würden absterben und die mit hoher VEGF-Expression übrigbleiben. So liegt die Überlegung nahe, daß die möglicherweise aggressiveren Tumorzellen durch einen VEGF-Schutz herausselektiert werden. Ließen sich diese Beobachtungen von Inoue et al. in weiteren Untersuchungen verifizieren, so käme der Idee einer Anti-VEGF-Therapie eine weitere Bedeutung in der Behandlung des Harnblasenkarzinoms zu.

Weiterhin wurde eine Korrelation der VEGFmRNA-Überexpression vor Therapiebeginn mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko gefunden.

Passend dazu sind die Untersuchungsergebnisse vorliegender Arbeit. Bei Patienten, bei denen eine hämatogene Metastasierung erfolgt war, ließ sich eine erhöhte Anzahl VEGF-positiver Zellen (95,63 %) ermitteln. Deutliche Unterschiede gab es im Stadium pT2 – 98,35 % mit und 90,93 % ohne Metastasen – und im Stadium pT3 – 98,15 % mit und 93,05 % ohne Metastasen. Im Stadium pT4 erreichten die Werte annähernd gleiche Zahlen – 93,68 % mit und 94,37 % ohne Metastasen –, was auf oben genannte Gründe der lokalen Tumorgröße zurückzuführen ist.

Beim metastatischen Prozeß, gefördert durch die VEGF-induzierte Hypervaskularisation des Tumors, könnte auch die ebenfalls VEGF-induzierte Permeabilitätssteigerung der neu gebildeten Gefäße eine wichtige Rolle spielen.

Vergleicht man nun beide Techniken, den Nachweis des VEGF-Proteins mittels immunhistochemischer Färbung und die mRNA-Hybridisierung, so liefert der Nachweis des Proteins im Gegensatz zum Nachweis der mRNA kaum signifikante Ergebnisse, was mit den niedrigen Fallzahlen vorliegender Studie begründet werden könnte.

Es ergaben sich lediglich Hinweise auf das komplexe Geschehen der Gefäßneubildung, die zu einem besseren Verständnis der Zusammenhänge der Angiogenese beim Harnblasenkarzinom führen.

Möglicherweise liegt die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen dem Nachweis der mRNA und dem Endprodukt Protein in posttranslationellen Prozessen begründet. Beispielsweise könnte das Protein zum Teil in einer inaktivierten Form vorliegen und sich des Nachweises entziehen. Auch die Tatsache, daß VEGF sowohl in freier Form im Cytoplasma als auch zellmembranständig vorkommt, wäre eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied.

Die alleinige Aussage, wie viele Tumorzellen VEGF produzieren und somit VEGF-positiv sind, scheint jedenfalls nicht ausreichend zu sein, um eine definitive Aussage über das Verhalten eines Tumors zuzulassen.

Um den VEGF-Level für diagnostische Maßnahmen nutzen zu können, müßte man aufgrund der eindeutigeren Ergebnisse den Nachweis der mRNA führen. Fraglich wäre hierbei nur, ob dieses Verfahren wegen des höheren technischen Aufwandes und der höheren Kosten routinemäßig einsetzbar wäre.

Ein weiterer Ansatz, einen zusätzlichen Parameter zu finden, wäre die Quantifizierung des VEGF-Proteins in Korrelation zum Tumorstadium, Grading, lymphogener und hämatogener Metastasierung. Möglicherweise ließen sich bei diesem Untersuchungsverfahren signifikante und zu Diagnosezwecken nutzbare Ergebnisse erzielen. Wobei die Quantifizierung nichts über die Wirkung bzw. Wirksamkeit des Proteins aussagt. Denn von VEGF existieren, wie in der Einleitung bereits erwähnt, diverse Isoformen mit unterschiedlichen Aufgaben. Auch sollte oben genannter Aspekt, das Protein könne in inaktivierter Form vorliegen, nicht außer Acht gelassen werden.

Oben dargelegte Ergebnisse zeigen, daß VEGF beim Harnblasenkarzinom zwar eine wichtige Rolle in der Angiogenese zu spielen scheint, aber nicht der alleinige Mediator für die Tumorausdehnung und Filialisierung sein kann. Insbesondere bei den oberflächlichen Tumoren, bei der Rezidivrate und bei der Progression zu einem höheren Stadium konnten durch jüngste Forschungsergebnisse eindeutige Zusammenhänge aufgezeigt werden.



Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, müssen weitere bekannte Faktoren, wie PDECGF (52), FGF (37) und der VEGF-C (17) untersucht bzw. neue Faktoren identifiziert werden.

Daher bleibt auch die Frage, ob eine zukünftige Anti-VEGF-Therapie ausreichend Erfolg und Nutzen in der Behandlung des Harnblasenkarzinoms bringen würde, weiterhin offen und sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

Vergleicht man die Werte der TUR-B-Präparate mit denen der Cystektomie, so erhält man in den Stadien pT1 (96,3 % in der TUR-B, 94,62 % in der Cystektomie) und pT2 (91,72 % in der TUR-B, 91,95 % in der Cystektomie) annähernd gleiche Zahlen.

Deutliche Unterschiede zeigen sich jedoch hinsichtlich der Stadien pT3 (89,71 % in der TUR-B, 93,53 % in der Cystektomie) und pT4 (89,71 % in der TUR-B, 94,12 % in der Cystektomie).

Die Erklärung liegt möglicherweise darin, daß für die mikroskopische Auswertung bei der transurethralen Resektion tiefere Gewebeschichten nicht in ausreichendem Maße miterfaßt wurden und somit der Auswertung – gemäß der Definition Auszählung an der Infiltrationsfront – entgingen.

Maeda et al. (49) untersuchte 129 Magenkarzinom-Präparate auf VEGF-Positivität. Als Färbeverfahren wurde die Streptoavidin-Biotin-Methode, als Antikörper ein polyklonaler Anti-VEGF-Antikörper verwendet. Beurteilt wurde nicht die Anzahl VEGF-positiver Zellen, sondern das gesamte Präparat an sich. Ein Präparat wurde als VEGF-positiv bewertet, wenn mehr als 5 % der Tumorzellen eine positive Anfärbung zeigten. Eine positive VEGF-Expression wurde bei 43,4 % (n=56) der Tumoren gefunden. Dabei wurde beobachtet, daß stark positive Tumorzellen häufiger an der Infiltrationsfront als im Tumorzentrum liegen.

Bezüglich des histologischen Typs, der Infiltrationstiefe und des Stagings konnte keine signifikante Beziehung hergestellt werden. Jedoch wurde ein signifikanter Unterschied zwischen VEGF-Positivität und einer carcinomatösen Blut- und Lymphgefäßbeteiligung gefunden.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse beim Harnblasenkarzinom aus dieser Untersuchung. Weder für die Hämangiosis – Mittelwert 93,85 % VEGF-positive Tumorzellen mit und 93,22 % ohne Hämangiosis – noch für die Lymphangiosis carcinomatosa – Mittelwert 92,57 % VEGF-positive Zellen mit und 93,1 % ohne Lymphangiosis – konnte eine Korrelation festgestellt werden.

Weiterhin war die Rate der VEGF-positiven Tumoren bei Patienten mit Lymphknoten- und Lebermetastasen in der Untersuchung von Maeda et al. signifikant höher als bei den Patienten ohne Metastasierung. Keine Korrelation ließ sich in Bezug auf peritoneale Metastasen zeigen. Die Frequenz eines hepatischen Rezidivs nach Resektion mit kurativem Ansatz war bei Patienten mit VEGF-positiven Tumoren außerdem signifikant höher als bei denen mit VEGF-negativen Tumoren. Somit haben VEGF-positive Tumoren beim Magenkarzinom eine signifikant schlechtere Prognose.

Kitadai et al. (44) untersuchte 119 Ösophaguskarzinom-Präparate auf VEGF-Positivität. Verwendet wurde die Immunoperoxidase-Technik, als Antikörper ein polyklonaler Anti-VEGF-Antikörper. Beurteilt wurde ebenfalls nicht die Anzahl VEGF-positiver Zellen, sondern das gesamte Präparat. Ein Präparat wurde als VEGF-positiv bewertet, wenn mindestens 30 % der Tumorzellen eine positive Anfärbung zeigten. Eine positive VEGF-Expression wurde bei 59,7 % (n=71) der Tumoren gefunden.

Die VEGF-Positivität korrelierte signifikant mit dem Tumorstadium und der Blut- und Lymphgefäßbeteiligung. Keine Korrelation ergab sich für das histologische Grading und der Überlebensrate. Lediglich eine Tendenz zu einer schlechteren Prognose konnte für VEGF-positive Tumoren festgestellt werden.

60 colorektale Tumoren wurden von Ishigami et al. (38) durch Northern-blot-Hybridisierung auf VEGFmRNA-Expression untersucht. 86,7 % (n=52) Patienten hatten eine erhöhte VEGFmRNA-Expression. Signifikante Unterschiede ergaben sich für die Gruppe D der Dukes`Klassifikation, für die Infiltrationtiefe, für Lymphknoten- und Lebermetastasen. Keine signifikante Korrelation ergab sich für Tumorgroße, Differenzierung, lymphatische und vaskuläre Beteiligung. Außerdem ist eine VEGFmRNA-Überexpression eng mit einer schlechteren Prognose korreliert. Diese Ergebnisse konnten von Arii et al. (5) bestätigt werden.

Ellis et al. (22) untersuchte 85 Patienten mit Pankreaskarzinom. Das VEGF-Protein wurde mittels Immunoperoxidase-Technik unter Verwendung eines polyklonalen Anti-VEGF-Antikörpers nachgewiesen. Eingeteilt wurden die Tumoren gemäß ihrer Anfärbung auf einer Skala von 0 (keine Färbung) bis 3 (stärkste Färbung). Bei allen Tumoren wurde VEGF-Immunreaktivität nachgewiesen, wobei der durchschnittliche Wert der VEGF-Expression bei 2,1 lag.

Keine Korrelation zeigte sich bezüglich Rezidivierung, Überlebensrate, Tumordifferenzierung und Lymphknotenmetastasen.

Fujimoto et al. (31) untersuchte 50 Pankreaskarzinompatienten auf VEGF-Protein und VEGFmRNA. Oben genannte Ergebnisse für klinisch-pathologische Kriterien und die Überlebensrate wurden bestätigt.

Es kann daher davon ausgegangen werden, daß VEGF beim Pankreaskarzinom nicht der ausschlaggebende Mediator der Angiogenese sein kann.

Jeder Karzinomtyp scheint also seinem eigenen Angiogenesemuster zu folgen, so daß jede maligne Neoplasie für sich betrachtet werden sollte. Jedoch lassen sich einige generelle Aussagen über die Rolle des VEGF in der Tumorangio-genese treffen.

## **V. Zusammenfassung**

Ziel dieser Studie war die Beurteilung des Angiogenesestimulators VEGF als Mediator bei der Neoangiogenese beim Harnblasenkarzinom in Bezug auf Stadium, Malignitätsgrad und lymphogener wie hämatogener Metastasierung.

Durch transurethrale Resektion und radikale Cystektomie gewonnene Gewebeschnitte wurden speziell aufgearbeitet und auf die Anzahl VEGF-positiver Tumorzellen untersucht.

Ergänzend wurden die Akten der Patienten auf Anamnese, Befund und Verlauf ausgewertet.

Folgende Ergebnisse konnten aus dem Kollektiv von 52 Patienten erhoben werden:

- Im Stadium pT1 wurde der höchste Wert mit 94,62 % VEGF-positive Zellen, gefolgt von 94,12 % im Stadium pT4 gefunden. Der niedrigste Wert lag bei 91,95 % im Stadium pT2. Es bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede.
- Bezogen auf den Differenzierungsgrad unterscheidet sich der Wert der G2-Tumoren mit 95,51 % VEGF-positive Zellen statistisch nicht signifikant von den G3-Tumoren mit 92,33 %.
- Mäßig differenzierte Tumoren (G2) im Stadium pT1 mit 98,34 % VEGF-positiven Zellen unterscheiden sich signifikant von den pT3- mit 94,65 % und pT4-Tumoren mit 91,71 %. Für das Stadium pT2 mit 96,82 % ergibt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zum Stadium pT4.
- Bei den schlecht differenzierten Tumoren (G3) lag der höchste Wert bei 95,02 % für das Stadium pT4, gefolgt von 92,93 % für pT3, 92,14 % für pT1 und 87,7 % für pT2. Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor.

- Bei Tumoren mit lymphogener Metastasierung lag der Wert VEGF-positiver Zellen mit 91,79 % niedriger als bei denen ohne Lymphknotenmetastasen mit 93,21 %.
- Tumoren mit hämatogener Metastasierung wiesen 95,63 %, die ohne Fernmetastasen 92,95 % VEGF-positive Zellen auf.
- Vergleichend ergeben die TUR-B für das Stadium pT1 96,3 % und für pT2 91,72 % und die Cystektomie für pT1 94,62 % und für pT2 91,95 % positive Zellen ähnliche Werte. Deutliche Unterschiede ergeben sich für das Stadium pT3 und pT4 mit jeweils 89,71 % bei der TUR-B und 93,53 % bzw. 94,12 % bei der Cystektomie.

Es muß festgestellt werden, daß die Auswertung der VEGF-Protein-Expression keinen unabhängigen prognostischen Indikator darstellt, sondern lediglich orientierende Hinweise auf die Zusammenhänge der Angiogenese liefert.

Ferner muß davon ausgegangen werden, daß VEGF beim Blasenkarzinom nicht der alleinige Mediator in der Tumorausdehnung und Filialisierung sein kann. Dies wirft damit die Frage auf, ob eine Therapie, die ausschließlich den Vascular Endothelial Growth Factor blockiert, erfolgreich wäre.

## **VI. Literaturverzeichnis**

1. Alken, P., Walz, P.H.:  
Urologie  
Chapman & Hall GmbH, 2. Auflage, 1998, S.: 221-229
2. Altwein, J.E., Rübber, H.:  
Urologie  
Enke-Verlag, 4. Auflage, 1993, S.: 194-203
3. Amoroso, A., Del Porto, F., Di Monaco, C., Manfredini, P., Afeltra, A.:  
Vascular Endothelial Growth Factor: A key mediator of neoangiogenesis. A review  
European Review for Medical and Pharmacological Sciences, Vol.1, 1997, S.: 17-25
4. Aprikian, A.G., Sarkis, A.S., Reuter, V.E., Cordon-Cardo, C., Sheinfeld, J.:  
Biological Markers of Prognosis in Transitional Cell Carcinoma of the Bladder: Current Concepts  
Seminars in Urology, Vol.11, No.3, August 1993, S.: 137-144
5. Arii, S., Mori, A., Uchida, S., Fujimoto, K., Shimada, Y., Imamura, M.:  
Implication of Vascular Endothelial Growth Factor in the Development and Metastasis of Human  
Cancers  
Human Cell, Vol.12, No.1, 1998, S.: 25-30
6. Bicknell, R., Harris, A.L.:  
Novel Growth Regulatory Factors and Tumour Angiogenesis  
European Journal of Cancer, Vol.27, No.6, 1991, S.: 781-785
7. Bikfalvi, A.:  
Significance of Angiogenesis in Tumour Progression and Metastasis  
European Journal of Cancer, Vol.31A, Nos.7/8, 1995, S.: 1101-1104
8. Bochner, B.H., Cote, R.J., Weidner, N., Groshen, S., Chen, S., Skinner, D.G., Nichols, P.W.:  
Angiogenesis in Bladder Cancer: Relationship Between Microvessel Density and Tumor Prognosis  
Journal of the National Cancer Institute, Vol.87, No.21, November 1995, S.: 1603-1612
9. Bonfig, R., Seseke, F., Beecken, W.-D., Riedmiller, H.:  
Neoangiogenesis in infiltrating bladder cancer with or without lymphnode metastases  
European Journal of Urology, Vol.30, 1996, Abstract No.287, S.: 88

10. Bourne, Janice A.:  
Handbuch I der Immunperoxidase-Färbemethoden  
DAKO® Diagnostika GmbH Hamburg, 1983, S.: 7-37
11. Brauers, A., Jakse, G.:  
Neue zytogenetische und molekularbiologische Parameter für die Entstehung und Prognose des  
Urothelkarzinoms  
Aktuelle Urologie, Vol.27, 1996, S.: 12-19
12. Brown, L.F., Berse, B., Jackman, R.W., Tognazzi, K., Manseau, E.J., Dvorak, H.F., Senger, D.R.:  
Increased Expression of Vascular Permeability Factor (Vascular Endothelial Growth Factor) and its  
Receptors in Kidney and Bladder Carcinomas  
American Journal of Pathology, Vol.143, No.5, November 1993, S.: 1255-1262
13. Campbell, S.C.:  
Advances in angiogenesis research: Relevance to urological oncology  
The Journal of Urology, Vol.158, November 1997, S.: 1663-1674
14. Campbell, S.C., Volpert, O.V., Ivanovich, M., Bouck, N.P.:  
Molecular Mediators of Angiogenesis in Bladder Cancer  
Cancer Research, Vol.58, März 1998, S.: 1298-1304
15. Chow, N., Liu, H., Chan, S., Cheng, H., Tzai, T.:  
Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Primary Superficial Bladder Cancer  
Anticancer Research, Vol.19, Oktober 1999, S.: 4593-4598
16. Claffey, K.P., Robinson, G.S.:  
Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: Consequences for tumor growth and metastasis  
Cancer and Metastasis Reviews, Vol.15, Juni 1996, S.: 165-176
17. Crew, J.P.:  
Vascular Endothelial Growth Factor: An Important Angiogenic Mediator in Bladder Cancer  
European Urology, Vol.35, 1999, S.: 2-8
18. Crew, J.P., O'Brien, T., Bicknell, R., Fuggle, S., Cranston, D., Harris, A.L.:  
Urinary Vascular Endothelial Growth Factor and its Correlation with Bladder Cancer Recurrence Rates  
Journal of Urology, Vol.161, März 1999, S.: 799-804

19. Crew, J.P., O'Brien, T., Bradburn, M., Fuggle, S., Bicknell, R., Cranston, D., Harris, A.L.:  
Vascular Endothelial Growth Factor Is a Predictor of Relapse and Stage Progression in Superficial Bladder Cancer  
Cancer Research, Vol.57, Dezember 1997, S.: 5281-5285
20. Crew, J.P., O'Brien, T.S., Harris, A.L.:  
Bladder cancer angiogenesis, its role in recurrence, stage progression and as a therapeutic target  
Cancer and Metastasis Reviews, Vol.15, Juni 1996, S.: 221-230
21. Dickinson, A.J., Fox, S.B., Persad, R.A., Hollyer, J., Sibley, G.N.A., Harris A.L.:  
Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas  
British Journal of Urology, Vol.74, 1994, S.: 762-766
22. Ellis, L.M., Takahashi, Y., Fenoglio, C.J., Cleary, K.R., Bucana, C.D., Evans, D.B.:  
Vessel counts and vascular endothelial growth factor expression in pancreatic adenocarcinoma  
European Journal of Cancer, Vol.34, No.3, 1998, S.: 337-340
23. Ferrara, N., Davis-Smith, T.:  
The Biology of Vascular endothelial Growth Factor  
Endocrine Reviews, Vol.18, No.1, Februar 1997, S.: 4-25
24. Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L., Leung, D.W.:  
Molecular and Biological Properties of the Vascular Endothelial Growth Factor Family of Proteins  
Endocrine Reviews, Vol.13, No.1, Februar 1992, S.: 18-32
25. Folkman, J.:  
What Is the Evidence That Tumors Are Angiogenesis Dependent?  
Journal of the National Cancer Institute, Vol.82, No.1, Januar 1990, S.: 4-6
26. Folkman, J.:  
The role of angiogenesis in tumor growth  
Seminars in Cancer Biology, Vol.3, 1992, S.: 65-71
27. Folkman, J., Klagsbrun, M.:  
Angiogenic Factors  
Science, Vol.253, Januar 1987, S.: 442-447



28. Fradet, Y., Cordon-Cardo, C.:  
Critical Appraisal of Tumor Markers in Bladder Cancer  
Seminars in Urology, Vol.11, No.3, August 1993, S.: 145-153
29. Frazier, H.A., Robertson, J., Dodge, R.K., Paulson, D.F.:  
The value of pathologic factors in predicting cancer-specific survival among patients treated with radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder and prostate  
Cancer, Vol.71, No.12, Juni 1993, S.: 3993-4001
30. Frelin, Ch., Ladoux, A., D'Angelo, G.:  
Vascular endothelial growth factors and angiogenesis  
Annales d'Endocrinologie, Vol.61, No.1, 2000, S.: 70-74
31. Fujimoto, K., Hosotani, R., Lee, J.-U., Koshiba, T., Miyamoto, Y., Tsuji, S., Nakajima, S., Doi, R., Imamura, M.:  
Expression of Two Angiogenic Factors, Vascular Endothelial Growth Factor and Platelet-derived Endothelial Cell Growth Factor in Human Pancreatic Cancer, and its Relationship to Angiogenesis  
European Journal of Cancer, Vol.34, No.9, 1998, S.: 1439-47
32. Gehrke, S., Staehler, G., Kälble, T.:  
Ätiologie des Harnblasenkarzinoms – Fakten und Spekulation  
Aktuelle Urologie, Vol.27, 1996, S.: 391-399
33. Grundmann:  
Spezielle Pathologie  
Urban & Schwarzenberg, 7. Auflage, 1986, S.: 549-552
34. Hautmann, Huland:  
Urologie  
Springer Verlag, 2. Auflage, 2001, S.: 204-217
35. Heney, N.M., Ahmed, S., Flanagan, M.J., Frable, W., Corder, M.P., Hafermann, M.D., Hawkins, I.R.:  
Superficial bladder cancer: Progression and recurrence  
The Journal of Urology, Vol.130, Dezember 1983, S.: 1083-1086
36. Heney, N.M., Proppe, K., Prout, G.R., Griffin, P.P., Shipley, W.U.:  
Invasive bladder cancer: Tumor configuration, lymphatic invasion and survival  
The Journal of Urology, Vol.130, Dezember 1983, S.: 895-897

37. Inoue, K., Slaton, J.W., Karashima, T., Yoshikawa, C., Shuin, T., Sweeny, P., Millikan, R., Dinney, C.P.N.:  
The prognostic value of angiogenesis factor expression for predicting recurrence and metastasis of bladder cancer after neoadjuvant chemotherapy and radical cystectomy  
Clinical Cancer Research, Vol.6, Dezember 2000, S.: 4866-4873
  
38. Ishigami, S.I., Aii, S., Furutani, M., Niwano, M., Harada, T., Mizumoto, M., Mori, A., Onodera, H., Imamura, M.:  
Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer  
British Journal of Cancer, Vol.78, No.10, 1998, S.: 1379-1384
  
39. Jaeger, T.M., Weidner, N., Chew, K., Moore, D.H., Kerschmann, R.L., Waldman, F.M., Carroll, P.R.:  
Tumor angiogenesis correlates with lymph node metastases in invasive bladder cancer  
Journal of Urology, Vol.154, Juli 1995, S.: 69-71
  
40. Jocham, D., Miller, K.;  
Praxis der Urologie Band II; Spezielle Urologie  
Thieme Verlag, 1994, S.: 49-108; 321-341
  
41. Jones, A., Crew, J.:  
Vascular Endothelial Growth Factor and its Correlation with Superficial Bladder Cancer Recurrence Rates and Stage Progression  
Urologic Clinics of North America, Vol.27, No.1, Februar 2000, S.: 191-197
  
42. Keck, P.J., Hauser, S.D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., Connolly, D.T.:  
Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF  
Science, Vol.246, Dezember 1989, S.: 1309-1312
  
43. Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H.S., Ferrara, N.:  
Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo  
Nature, Vol.362, April 1993, S.: 841-844
  
44. Kitadai, Y., Haruma, K., Tokutomi, T., Tanaka, S., Sumii, K., Carvalho, M., Kuwabara, M., Yoshida, K., Hirai, T., Kajiyama, G., Tahara, E.:  
Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinoma  
Clinical Cancer Research, Vol.4, September 1998, S.: 2195-2200

45. Laissue, J.-A., Gebbers, J.-O.:  
Einführung in die spezielle Pathologie  
Gustav Fischer Verlag, 1991, S.: 325-327
46. Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.-J., Goeddel, D.V., Ferrara, N.:  
Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen  
Science, Vol.246, Dezember 1989, S.: 1306-1309
47. Le Querrec, A., Duval, D., Tobelem, G.:  
Tumour angiogenesis  
Baillière's Clinical Haematology, Blood constituents and the vessel wall, Vol.6, No.3, September 1993,  
S.: 711-730
48. Li, N.-C., Kanda, K., Fukumori, T., Inoue, Y., Nishitani, M., Kanayama, H., Kagawa, S.:  
Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and platelet-derived endothelial cell growth  
factor in bladder cancer  
Urologic Oncology, Vol.6, 2001, S.: 10-15
49. Maeda, K., Chung, Y., Ogawa, Y., Takatsuka, S., Kang, M., Ogawa, M., Sawada, T., Sowa, M.:  
Prognostic Value of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Gastric Carcinoma  
Cancer, Vol.77, No.5, März 1996, S.: 858-863
50. Merkle, W.:  
Urologie  
Hippokrates Verlag, 1. Auflage, 1997, S.: 159-168
51. Naish, Sally J.:  
Handbuch II immunchemischer Färbemethoden  
DAKO® Diagnostika GmbH Hamburg, 1989, S.: 9-48
52. O'Brien, T., Cranston, D., Fuggle, S., Bicknell, R., Harris, A.L.:  
Different Angiogenic Pathways Characterize Superficial and Invasive Bladder Cancer  
Cancer Research, Vol.55, Februar 1995, S.: 510-513
53. Philp, E.A., Stephenson, T.J., Reed, M.W.R.:  
Prognostic significance of angiogenesis in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder  
British Journal of Urology, Vol.77, 1996, S.: 352-357

54. Riede, U.-N., Schaefer, H.-E.,:  
Allgemeine und spezielle Pathologie  
Thieme Verlag, 4. Auflage, 1995, S.: 839-844
55. Risau, W.:  
Mechanisms of angiogenesis  
Nature, Vol.386, April 1997, S.: 671-674
56. Rozanski, T.A., Grossman, H.B.:  
Recent Developments in the Pathophysiology of Bladder Cancer  
American Journal of Roetgenology, Vol.163, Oktober 1994, S.: 789-792
57. Rübber, H.:  
Uroonkologie  
Springer Verlag, 2. Auflage, 1997, S.: 85-232
58. Schmoll, H.-J., Höffken, K., Possinger, K.:  
Kompendium Internistische Onkologie  
Springer Verlag, 2.Auflage, 1997, S.: 1332- 1374
59. Senger, D.R., Van De Water, L., Brown, L.F., Nagy, J.A., Yeo, K.-T., Yeo, T.-K., Berse, B., Jackman, R.W., Dvorak, A.M., Dvorak, H.F.:  
Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology  
Cancer and Metastasis Reviews, Vol.12, 1993, S.: 303-324
60. Shahabuddin, S., Arnold, F., Costello, C.B., Kumar, S.;  
Tumour Angiogenesis Factor in Urological Cancers  
British Journal of Urology, Vol.56, 1984, S.: 490-490
61. Siegenthaler, W.:  
Klinische Pathophysiologie  
Thieme Verlag, 8. Auflage, 2001, S.: 1109-1120
62. Stein, J.P., Grossfeld, G.D., Ginsberg, D.A., Esrig, D., Freeman, J.A., Figueroa, A.J., Skinner, D.G., Cote, R.J.:  
Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature  
Journal of Urology, Vol.160, September 1998, S.: 645-659

63. Stevens, Lowe:  
Pathologie  
Ullstein, Mosby, 1997, S.: 46-47
64. Strohmeyer, T.:  
Urotheliale Karzinome  
Der Urologe, Vol.33, 1994, S.: 122-127
65. Thomas, C.:  
Histopathologie  
Schattauer Verlag, 12. Auflage, 1998, S.: 33, 216-218
66. Thomas, C.:  
Spezielle Pathologie  
Schattauer Verlag, 1996, S.: 375-377
67. TNM Klassifikation  
Springer Verlag, 5. Auflage, 1997
68. Warren, R.S., Yuan, H., Matli, M., Gillett, N., Ferrara, N.:  
Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis  
Journal of Clinical Investigation, Vol.95, April 1995, S.: 1789-1796
69. Weidner, N., Semple, J.P., Welch, W.R., Folkman, J.:  
Tumor angiogenesis and metastasis – Correlation in invasive breast carcinoma  
The New England Journal of Medicine, Vol.324, No.1, Januar 1991, S.: 1-7

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. H. Riedmiller, Leiter der Urologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg, danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Geräte, Materialien und Räumlichkeiten.

Herrn Dr. med. R. Bonfig, Oberarzt der Urologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg, danke ich für die Betreuung und Unterstützung in Fragen der theoretischen Planung sowie für die Korrektur der Arbeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. G. Ott, Mitarbeiter des Instituts für Pathologie der Universität Würzburg, danke ich für seine umfassende Hilfe bei der Auswahl geeigneter Materialien und Unterstützung bei der praktischen Durchführung.

Herrn Dr. med. W. Kieser, ehemaliger Mitarbeiter der Urologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg, danke ich für seine Betreuung und Korrektur der Arbeit.

Frau B. Dexler und Frau R. Fleischer, Medizinisch-technische Assistentinnen der Urologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg, danke ich für die Einarbeitung in die Verfahren der Präparateaufbereitung und ihre hervorragende Unterstützung in der praktischen Phase meiner Arbeit.

Meinen Eltern, meinem Partner und Freunden gilt mein besonderer Dank für ihre ständige Unterstützung und ihr Verständnis während meines gesamten Studiums.

## Lebenslauf

### **Persönliche Daten:**

Name: *Ines Doris Bendig*  
Geburtsdatum: *14. August 1974*  
Geburtsort: *Stuttgart-Bad Cannstatt*  
Eltern: *Assessor Dipl. Kaufmann Dietmar Bendig*  
*Margit Bendig, geb. Eskofier*  
Familienstand: *ledig*  
Staatsangehörigkeit: *deutsch*  
Konfession: *evangelisch*

### **Ausbildung:**

Schulbildung: *1980-1984 August-Lämmle-Grundschule, Ludwigsburg*  
*1984-1993 Friedrich-Schiller-Gymnasium,*  
*Ludwigsburg*

FSJ: *1993-1994 Freiwilliges Soziales Jahr, Altenzentrum*  
*im Falkert, Stuttgart*

Akademische Bildung: *1994-2001 Studium der Humanmedizin an der*  
*Bayerischen Julius-Maximilians-Universität*  
*zu Würzburg*  
*Aug. 1996 Ärztliche Vorprüfung*  
*März 1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*  
*März 2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*  
*April 2000 Praktisches Jahr:*  
*1. Terial: Innere Medizin, Juliusspital Würzburg*  
*2. Terial: Gynäkologie und Geburtshilfe, Frauenklinik*  
*der Universität Würzburg*  
*3. Terial: Chirurgie, Juliusspital Würzburg*  
*Nov. 2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*  
*Seit 1. Dez. 2001 Ärztin im Praktikum am Institut für*  
*Humangenetik Würzburg*