

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

# **Hormonelle Regulation der Angiogenese beim Mammakarzinom**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Andreas Patrick Koch  
aus Ostfildern-Ruit**

**2004**

**Dekan:**

**Professor Dr. C. D. Claussen**

**1. Berichterstatter:**

**Professor Dr. L. Kiesel**

**2. Berichterstatter:**

Meinen Eltern gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Historischer Überblick</b>	<b>1</b>
1.1.1 Angiogenese	1
1.1.2 Tumorpathogenese und Angiogenese	3
<b>1.2 Regulation der Angiogenese</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Regulation durch Steroidhormone</b>	<b>9</b>
1.3.1 Hormonale Abhängigkeit der Brustdrüse und des Mammakarzinoms	9
1.3.2 Vermittlung hormonaler Effekte über Angiogenese	9
1.3.2.1 Hormone und Vaskularisierung in vivo	10
1.3.2.2 Hormone und Angiogenesefaktoren	10
1.3.3 Hormonale Abhängigkeit der Angiogenese beim Mammakarzinom	12
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Patienten</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Gewebe</b>	<b>14</b>
<b>2.3 Immunhistochemie</b>	<b>15</b>
2.3.1 Antikörper	15
2.3.2 Methode	15
2.3.2.1 Hydrierung	15
2.3.2.2 Antigenexposition	15
2.3.2.3 Blockade unspezifischer Bindungsstellen	16
2.3.2.4 Primärantikörper	16
2.3.2.5 Sekundärantikörper	16
2.3.2.6 ABC-Reagenz	17
2.3.2.7 Färbung und Gegenfärbung	17

2.3.2.8	Dehydrierung und Fixierung	17
2.3.2.9	Negativkontrolle	17
<b>2.4</b>	<b>Quantitative Auswertung der Färbung</b>	<b>18</b>
2.4.1	Markierung der „hotspots“	18
2.4.2	Morphometrische Messungen	18
2.4.2.1	Computerassisierte Bildanalyse	18
2.4.2.2	Markierung der Mikrogefäße	19
2.4.2.3	Markierung des Messareals	19
2.4.2.4	Erhebung der Gefäßparameter	20
<b>2.5</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>21</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>22</b>
3.1	Gefäßparameter	22
3.2	Menopausenstatus und Gefäßparameter	22
3.3	Zyklusverlauf und Gefäßparameter	24
3.4	Hormonsensitivität und Gefäßparameter	27
3.4.1	Estrogenrezeptorstatus	27
3.4.2	Progesteronrezeptorstatus	28
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>30</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>43</b>
<b>6.</b>	<b>Abbildungen und Tabellen</b>	<b>45</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>58</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>67</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>68</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Historischer Überblick

### 1.1.1 Angiogenese

Der Begriff Angiogenese für das Wachstum von neuen Gefäßen wurde zum ersten Mal im Jahr 1787 von Dr. John Hunter, einem britischen Chirurgen, zur Beschreibung der Entstehung von neuen Gefäßen in Rentiergeweihen verwendet (historical highlights of the angiogenesis field). Später beobachteten verschiedene Wissenschaftler das Auftreten von Angiogenese um Tumoren von Tieren und Menschen (Goldman, 1907; Ide et al., 1939; Algire und Chalkley, 1945). Erste Hinweise auf eine Beteiligung dieser Formation neuer Gefäße an der Embryogenese fand 1935 der Pathologe Dr. Arthur Tremain Hertig, welcher Angiogenese im Plazentagewebe von schwangeren Affenweibchen beschrieb (historical highlights of the angiogenesis field).

Neben ihrer heute, dank o.g. und anderen Studien, bekannten Bedeutung für die Wundheilung, Embryogenese, den Menstruationszyklus u.a. physiologische Vorgänge, spielt die Angiogenese auch eine wesentliche Rolle bei Wachstum, Invasion und metastatischer Streuung maligner Tumoren. Diese Aussage, 1971 zum ersten Mal als Hypothese formuliert (Folkman, 1971), wird mittlerweile durch zahlreiche Studien gestützt, die sich mit Regulation, Einfluss und Bedeutung der Angiogenese auf die Tumorphathogenese und den klinischen Verlauf diverser Tumorerkrankungen beschäftigten (Folkman, 1990; Weidner, 1998). Angetrieben durch die Hoffnung auf neue Therapiekonzepte für Tumor- oder Gefäßerkrankungen, wurden seit 1975 verschiedene Inhibitoren wie Angiostatin oder Endostatin oder aber Wachstumsfaktoren der Angiogenese entdeckt und erforscht. Wie z.B. bFGF (basic fibroblast growth factor) oder VPF (Vascular permeability factor), der heute als VEGF (Vascular endothelial growth factor) bezeichnet wird und als einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren der Angiogenese gilt (Brem und Folkman, 1975; Shing et al., 1984; Senger et al., 1983; Ferrara und Henzel, 1989). Mittlerweile sind basierend auf diversen Studien, welche Zusammenhänge der Angiogenese mit pathophysiologischen Vorgängen verdeutlichen konnten, zahlreiche Medikamente in Erprobung, die

über Stimulation oder Inhibition des Gefäßwachstums in den Krankheitsprozess eingreifen. Während bei Tumoren vor allem versucht wird das – abgesehen von der Möglichkeit Chemotherapeutika im Tumor zu verteilen - unerwünschte Gefäßwachstum zu verhindern, liegt bei der Therapie von Gefäßerkrankungen der Schwerpunkt auf der Induktion von Angiogenese in minderperfundiertem Gewebe.

Auch beim Mammakarzinom weisen verschiedene Studien sowohl auf die klinische Relevanz der Tumervaskularisation (Weidner et al., 1991; Weidner et al., 1992; Bevilacqua et al., 1995) als auch auf deren Schlüsselrolle beim komplexen Prozess der Tumorphathogenese hin (Hori et al., 1991; Gross et al., 1993; Kim et al., 1993).

Die heterogene Verteilung der Gefäße im Tumorgewebe sowie das Auftreten typischer Muster, wie z.B. das Vorhandensein von Gebieten mit sehr dicht gepackten Ansammlungen von Mikrogefäßen im Tumorrandbereich, gab Anlass zur Entwicklung einer systematischen Methodik zur Auswertung immunhistochemisch gefärbter Gefäße des Tumors. Bei einem Großteil der Studien werden hierbei Tumorareale mit der höchsten mikroskopisch sichtbaren Gefäßdichte als sogenannte „hotspots“ definiert und Messungen zur Dichte von Mikrogefäßen in diesen Gebieten durchgeführt (Weidner, 1995a). Allen Versuchen, eine einheitliche Vorgehensweise bei der Erfassung immunhistochemisch gefärbter Gefäße in diesen „hotspots“ zu prägen, zum Trotz, stößt man beim Vergleich der Methoden auf unzählige zum Teil erhebliche Unterschiede, was Färbe-, Mikroskopier-, und Zähltechnik betrifft. Dies erschwert natürlich den Vergleich der Studien untereinander, wobei die meisten Aussagen eine deutliche klinische Relevanz der Angiogenese bzw. Mikrogefäßdichte im „hotspot“ des Mammakarzinoms, wenn auch nicht einhellig, beschreiben.

So wird mittlerweile z.B. der Mikrogefäßdichte, unabhängig von anderen klinischen Faktoren, eine erhebliche Bedeutung bei der Abschätzung der Prognose (Relapse free survival/Overall survival) von Mammakarzinomen beigemessen (Weidner, 1998; Bevilacqua et al, 1995; Hansen et al., 2000). Außerdem gelang es Zusammenhänge zwischen Gefäßdichte und aggressivem

Tumorwachstum (Weidner, 1998) bzw. Nodalstatus und Grad der Metastasierung zu zeigen (Weidner et al., 1991). Insgesamt ergibt sich, wohl mit durch die Vielzahl der verwendeten Methoden zur Darstellung und Auswertung von Tumorgefäßen bedingt, ein uneinheitliches Bild vom Bedeutungsausmaß der Angiogenese beim Mammakarzinom (Weidner, 1995b; Hall et al., 1992; Axelsson et al., 1995).

### **1.1.2 Tumorpathogenese und Angiogenese**

Der Vorgang der Tumorpathogenese läßt sich grob in zwei Stadien einteilen:

**a)** Das Stadium der malignen Transformation mit Initiation, Promotion und Progression/ Proliferation.

**b)** Das Stadium des Wachstums und der metastatischen Streuung, welches ohne ausreichende Neovaskularisation des Tumors anscheinend nicht möglich ist. Die Tumorgröße pendelt sich in einem bestimmten Grenzbereich  $< 2\text{-}3 \text{ mm}^3$  ein, wenn nicht Angiogenese ein weiteres Wachstum ermöglicht (Folkman, 1971).

Ein bestehender Tumor bzw. eine Metastase kann sich, obwohl eine ständige proliferative Aktivität vorhanden ist, in einer Art funktionellem Schlafstadium befinden, in der sich Proliferation und Apoptoserate der Tumorzellen die Waage halten. Wird dieses Gleichgewicht zu Gunsten der Proliferation gestört, entweder durch einen Anstieg derselben oder durch ein Abfallen der Apoptoserate, kommt es zur Aktivierung des „schlafenden“ Tumors bzw. der Metastase mit Wachstum, Invasion und metastatischer Streuung. Es hat sich gezeigt, dass Angiogenese die Apoptoserate von Tumorzellen massiv erniedrigen kann und somit eine entscheidende Rolle in der Tumorpathogenese spielt (Holmgren et al., 1995). Die Angiogenese wird wiederum durch diverse pro- und antiangiogene Substanzen reguliert, die von Karzinomzellen, Endothelzellen, Stromazellen und korpuskulären Blutbestandteilen produziert werden oder in der extrazellulären Matrix vorhanden sind (Fukumura, 1998) und

ihre Wirkung autokrin auf sich selbst oder aber endokrin-systemisch z.B. auf Fernmetastasen entfalten. Kommt es zum Überwiegen der proangiogenen Faktoren, wird die Angiogenese stimuliert und der oben beschriebene Abfall der Apoptoserate bewirkt. Zur Frage, wie es zu diesem Ungleichgewicht kommt, werden zwei Mechanismen diskutiert:

Zum Einen könnte ein Abfall der systemischen Konzentration von Angiogeneseinhibitoren zum relativen Übergewicht der Stimuli und somit zu verstärkter Angiogenese an Orten mit ausreichender Konzentration an Wachstumsfaktoren führen. Für diese These spricht sowohl der therapeutische Effekt von systemischen Angiogenesehemmern auf verschiedene Karzinome (Boehm et al., 1997) als auch das auffällig schnelle Wachstum von Mikrometastasen in den Lungen von Mäusen nach Entfernung experimentiell subkutan eingepflanzter Primärtumoren vom Typ Lewis Lungenkarzinom oder T241 Fibrosarkom, welche den Angiogeneseinhibitor Angiostatin produzieren. Das durch die Entfernung des Primärtumors entstehende Ungleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenen Substanzen kann jedoch, der These entsprechend, mit exogenen Angiogeneseinhibitoren ausgeglichen und ein Wachstum der Mikrometastasen verhindert werden (Holmgren et al., 1995).

Die zweite mögliche Ursache für eine Störung des Gleichgewichts von Inhibitoren und Stimulatoren der Angiogenese könnte auf der Fähigkeit von Tumoren oder Metstasen beruhen, einen angiogenen Phänotyp auszubilden, d.h. die für die eigene Vaskularisierung nötigen Faktoren selbst zu produzieren und somit die Apoptoserate zu senken (Folkman et al., 1989; Folkman, 1994; Folkman, 1995). Diese genetische Aktivierung des angiogenen Potentials auf zellulärer Ebene wird als „angiogener switch“ bezeichnet, welcher als „angeschaltet“ gilt, wenn proangiogene den antiangiogenen Faktoren gegenüber überwiegen (Hanahan und Weinberg, 2000; Bouck et al., 1996). Folge eines solchen „switches“ könnte die Fähigkeit einer Zelle sein, einen bestimmten Wachstumsfaktor z.B. bFGF aus der Zelle zu exportieren ( Kandel et al., 1991). Hierbei reicht es anscheinend aus, wenn nur einige der Zellen eines Tumors diese bestimmte Fähigkeit besitzen, um den gesamten Tumor zu vaskularisieren, ihn wachsen und streuen zu lassen (Jouanneau et al., 1994).

Es sind mittlerweile verschiedene Signale bekannt, die diesen genetischen „switch“ triggern können. Ein wichtiges Signal stellt z.B. „Zellstress“ dar, der sowohl mechanisch, durch Druck des umliegenden, proliferierenden Gewebes, als auch metabolisch, durch Azidose, Hypoglykämie und besonders durch Hypoxie von Zellen bedingt sein kann. Auch immunologische und inflammatorische Reaktionen mit entsprechendem Infiltrat des Gewebes zählen zu den Triggern des „angiogenen switches“. Eine dritte wichtige Gruppe sind genetische Mutationen in Tumor- bzw. Metastasenzellen, die über eine Aktivierung von entsprechenden Onkogenen oder durch Deletion von Tumorsuppressorgenen zu besagtem „switch“ führen können (Kerbel, 2000; Carmeliet, 1999).

## **1.2 Regulation der Angiogenese**

Die genauen Regulationsmechanismen der Tumorangiogenese sind aufgrund der enormen Komplexität der einzelnen Abläufe und ihrer Interaktionen nicht vollständig geklärt. Es existiert jedoch dank einer Vielzahl von Studien, welche sich vor allem mit verschiedenen Wachstumsfaktoren und ihren angiogenen Eigenschaften beschäftigen, ein ausreichendes Hintergrundwissen, um den Vorgang der Tumorangiogenese und die wahrscheinliche Funktion der bekannten involvierten Regulatoren vereinfacht darzustellen. Reife Gefäße besitzen aufgrund diverser Schutzmechanismen eine geringe Tendenz, ihre Struktur zu ändern oder neue Gefäßäste auszubilden. Diese Stabilität beruht wahrscheinlich unter anderem auf der konstitutionellen Expression von Regulatorproteinen wie Angiopoetin 1 (Ang 1), das seine Wirkung über Bindung an den TIE 2 Rezeptor entfaltet und die Integrität des Zellverbandes sichert. Unter bestimmten Umständen, z.B. um minderperfundierte Gewebe zu vaskularisieren oder bei pathologischer Überexpression bestimmter proangiogener Faktoren im Rahmen des „angiogenen switches“ (s. Abschnitt 1.1.), kann jedoch die Angiogenese reaktiviert werden, was zur Neovaskularisation des betroffenen Gewebes führt.

Eine Schlüsselrolle bei Reaktivierung und Regulation kommt sicherlich den verschiedenen Gefäßwachstumsfaktoren zu, deren Struktur, Herkunft und Wirkung mittlerweile durch zahlreiche Studien zum Teil sehr genau untersucht sind. Als Angiogenesefaktoren wurden z.B. aFGF und bFGF (acidic und basic fibroblast growth factor) beschrieben (Slavin, 1995). Pleiotrophin, welches immerhin in 60% der Mammakarzinome stark exprimiert wird (Riegel und Wellstein, 1994), scheint ebenfalls eine angiogene Wirkung zu haben (Fang et al., 1992). TGF- $\beta$ 1 (Transforming growth factor- $\beta$ 1) inhibiert das Endothelzellwachstum in vitro, stimuliert es aber in vivo (Sunderkotter et al., 1994) und PD-ECGF (Platelet derived endothelial cell growth factor), ursprünglich als vorherrschender angiogener Faktor in Thrombozyten entdeckt (Ishikawa et al., 1989; Sumizawa et al., 1993), wird mittlerweile ein starker stimulatorischer Effekt in vivo zugewiesen (Moghaddam et al., 1995).

Der Schwerpunkt dieser Untersuchungen, seien es experimentielle oder eher klinische Ansätze, liegt jedoch auf der Charakterisierung der VEGF-Familie, zu der unter anderem auch der Placental Growth Factor (PlGF) gehört. VEGF ist an mehreren Stellen als einer der wichtigsten und potentesten Mediatoren der Tumorangiogenese beschrieben (Kim et al., 1993; Kondo et al., 1993) und wird in vielen Typen des Mammakarzinoms überexprimiert, wobei die Expression des Faktors mit der Mikrogefäßdichte im angiogenen hotspot des Tumors korreliert (Toi et al., 1995). Die Produktion und Sekretion von VEGF ist ein entscheidender Schritt im Ablauf der Tumorangiogenese, da der Faktor auf verschiedenen Stufen des Ablaufs eingreift und seine Wirkung entfaltet. So induziert VEGF neben einer Up-Regulation des eigenen Rezeptors (VEGF-R) z.B. auch eine verstärkte Expression von Angiopoetin 2 (Ang 2), welches am TIE 2 Rezeptor als Antagonist zu o.g. Angiopoetin 1 (Ang 1) wirkt und somit durch Störung der Gefäßintegrität zu einer lokalen Destabilisierung und Hyperpermeabilität (Conolly, 1991) bestehender Gefäße führt, was der lokalen Anhäufung von Wachstumsfaktoren, sowie der Aussprossung neuer Gefäßäste den Weg ebnet. Durch die Anwesenheit bestimmter Enzyme, der sogenannten Matrix-Metalloproteinasen wird die perivaskuläre, extrazelluläre Matrix aufgelockert bzw. zerstört und somit die Migration der gleichzeitig stark

proliferierenden aktivierten Endothelzellen ins umgebende Gewebe ermöglicht (Ray und Stetler-Stevenson, 1994). Auch diese Vorgänge werden neben anderen Faktoren, wie z.B. Zytokinen und lokaler Hypoxie, von VEGF zumindest mitgesteuert. Bei der Morphogenese, d.h. der Formation von Endothelzellschläuchen als Vorstufen von neuen Gefäßen, die einen der abschließenden Schritte der Tumorangiogenese darstellt, unterscheidet man bisher drei Mechanismen (Carmeliet und Rakesh, 2000). Erstens können Gefäßäste durch Aussprossung von aktivierten, proliferierenden Endothelzellen aus einem bereits vorhandenen Gefäß herauswachsen. Auch hier deutet eine verstärkte Expression von VEGF 1 und 2 Rezeptoren, die in aktivierten Endothelien gefunden wurde auf einen Einfluss von VEGF hin. Die zweite Möglichkeit besteht im Einbau von Zellen des umliegenden Binde- oder auch Tumorgewebes zwischen die gelockerten Endothelzellen, der ebenfalls zur Bildung neuer „Gefäßlumina“ führen kann. Drittens können auch aus dem Knochenmark oder aus Gefäßwänden herausgelöste Endothelzellvorstufen (Angioblasten) in den Tumor einwandern und zur Morphogenese von Tumorgefäßen beitragen, welche im Vergleich zur physiologischen Angiogenese aber weitaus unkontrollierter abläuft und zur Bildung von strukturell und funktionell abnormen Gefäßen führt. Eine fehlende oder mangelhafte Perizytschicht sowie die Inhomogenität des Endothels an sich, das z.B. auch aus Tumorzellschläuchen oder einem Mosaik aus Tumor- und Endothelzellen bestehen kann, führt zu instabilen und hyperpermeablen Gefäßen und einem chaotischen Blutfluß. Folge sind oftmals azidotische und hypoxische Areale im Tumor, die ja – wie in Abschnitt 1.1 erwähnt - als Trigger des „angiogenen switch“ gelten. Ganz abgesehen von den wahrscheinlich zahlreichen unbekanntem Variablen, verdeutlicht allein dieses positive Feedback, bei dem Folgen der Tumorangiogenese eine erneute Aktivierung derselben induzieren können, die Schwierigkeiten bei der Aufklärung von Regulationsmechanismen, da nach heutigem Wissensstand in jedem einzelnen Tumor sehr individuelle Verhältnisse bestehen dürften. Dies erschwert die Ausarbeitung eines einheitlichen Schemas enorm, zumal in den letzten Jahren ein wachsendes Interesse an der Angiogeneseregulation die Identifizierung und

Charakterisierung einer immer größer werdenden Zahl von Gefäßwachstumsfaktoren und ihrer Untergruppen vorangetrieben hat. So sind mittlerweile allein in der VEGF-Familie die Untergruppen A,B,C,D und PlGF bekannt, von denen VEGF A das zuerst charakterisierte Peptid beschreibt, dessen Effekt auf die Tumorangio-genese über den VEGF 2 Rezeptor bisher am besten untersucht ist. Von VEGF A existieren wiederum mehrere Isoformen, die sich durch den Aufbau aus 121, 165, 189 oder 206 Aminosäuren unterscheiden (Houck et al., 1995).

Eine Beteiligung von VEGF und VEGF Rezeptoren an der Angiogenese des Mammakarzinoms belegen diverse Studien, welche z.B. eine verstärkte Expression von VEGF A im Primärtumor (Toi et al., 1994; Toi et al., 1995) oder eine Up-Regulation des VEGF Rezeptors mit aktivierter Tyrosinkinasedomäne im Endothel von Tumorgefäßen nachweisen konnten (Yoshiji et al., 1996; Balsari et al., 1999; Kranz et al., 1999). Beim Mammakarzinom scheint dabei der diffusablen Form des VEGF A 121 gegenüber den an Zelloberflächen und Heparinen bindenden Formen VEGF A 165/189 eine deutlich stärkere Bedeutung zuzukommen, während VEGF206 hier keine Rolle zu spielen scheint (Houck et al., 1991). Für einen konkreten Effekt des Peptids spricht die hohe Korrelation der VEGF A Expression mit der Mikrogefäßdichte im angiogenen Hotspot des Tumors (Toi et al., 1994; Toi et al., 1995). Auch im Modellversuch mit nackten Mäusen konnte das Gen dieses Wachstumsfaktors Progression und Angiogenese von Tumorzellen in vivo steigern, ohne jedoch die Wachstumsrate der Zelllinie in vitro zu verändern (Kondo et al., 1993; Senger et al., 1983). Aber auch das bisher vor allem mit der Lymphangiogenese assoziierte VEGF C mit zugehörigem Rezeptor VEGF-R 3 scheint an der Angiogenese in Mammakarzinomen beteiligt zu sein (Valtola et al., 1999). Desweiteren wurden bei Messungen zu Serumkonzentrationen von VEGF bei verschiedenen Karzinomen sowohl die Existenz von kleinen Mengen VEGF im Serum von gesunden Kontrollpersonen als auch eine Erhöhung des Serumlevels bei Patientinnen mit fortgeschrittenen Stadien oder Rezidiven eines Mammakarzinoms festgestellt (Yamamoto et al., 1996). Diese Nachweisbarkeit systemischer Level machen VEGF möglicherweise zu einem

molekularen Marker der angiogenen Aktivität von Mammakarzinomen, zumal die zytosolische Konzentration von VEGF als prognostischer Faktor für das relapse free und overall survival von Mammakarzinompatientinnen gilt (Gasparini et al., 1997).

## **1.3 Regulation durch Steroidhormone**

### **1.3.1 Hormonale Abhängigkeit der Brustdrüse und des Mammakarzinoms**

Da die Brustdrüse physiologischerweise auf Veränderungen des hormonellen Milieus sehr empfindlich reagiert und z.B. im Rahmen des Menstruationszyklus verschiedene, morphologisch charakterisierbare Grade von Wachstum und Differenzierung durchläuft (Vogel et al., 1981), verwundert es nicht, dass endokrine Faktoren wie Hormontherapien, Parität, Menarchen- und Menopausenalter einen Einfluss auf die Inzidenz und Prognose von malignen Neoplasien der Brustdrüse haben. Mittlerweile wurde z.B. eine Steigerung des Risikos, an einem Mammakarzinom zu erkranken, durch östrogenhaltige Hormonersatztherapien mehrfach beobachtet (Colditz, 1999; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators, 2002), während das Antiöstrogen Tamoxifen die Inzidenz der Erkrankung bei Hochrisikopatientinnen senken kann (Dunn et al., 1998), wobei noch unklar ist, über welche molekularen Mechanismen und Zwischenschritte diese hormonale Abhängigkeit der Tumoren zustandekommt.

### **1.3.2 Vermittlung hormonaler Effekte über Angiogenese**

Da Hormone ihre Wirkung nicht nur über zelluläre Rezeptoren sondern auch über parakrine Mediatoren, z.B. Angiogenesefaktoren, entfalten können, ist es möglich, dass der beobachtete Effekt bestimmter Steroidhormone z.B. auf die Proliferation von Mammakarzinomen über die Tumorangiogenese vermittelt wird.

### **1.3.2.1 Hormone und Vaskularisierung in vivo**

Für diesen Weg spricht sowohl eine durch Estrogen induzierbare Progression von transplantierten MCF10AT1-Zellen (entspricht einer Proliferative breast disease) zu maligneren Stadien mit gleichzeitig verstärkter Angiogenese im Mausmodell (Shekhar et al. 1998) als auch der mehrfach belegte therapeutische Effekt des Antiöstrogens Tamoxifen, welches ebenfalls Auswirkungen auf die Vaskularisation von Mammakarzinomen zu haben scheint. So korreliert die Reduktion der Größe von Mammakarzinomen unter Tamoxifen in hohem Maße mit einem Absinken der Mikrogefäßdichte (Marson et al., 2001). Dieses Absinken fand sich auch bei der neoadjuvanten Therapie von Mammakarzinompatientinnen mit Tamoxifen zusammen mit einer kombinierten Chemotherapie (Makris et al., 1999) und schon zuvor war im Nacktmausmodell eine Regression von transplantierten Mammakarzinomzellinientumoren durch Hemmung der Angiogenese mithilfe dieses Antiöstrogens beschrieben worden (Tanaka et al., 1991; Haran et al., 1994). Desweiteren existieren dopplersonographische Untersuchungen in Bezug auf Gefäßwiderstand und Blut-Fließgeschwindigkeit, die vaskuläre Unterschiede im Tumor zwischen prä- und postmenopausalen Mammakarzinom-Patientinnen vermuten lassen (Villena-Heinsen et al., 1998). Auch scheint sich die Gefäßdichte und -permeabilität des normalen Mammagewebes im Laufe der Phasen des Menstruationszyklus zu verändern (Müller-Schimpfle et al. 1997), was sich in der kontrastmittelunterstützten Magnetresonanztomographie als variierender Parenchymkontrast darstellen lässt (Buadu et al., 1996). Ob auch die Morphologie von Tumorgefäßen einer zyklussynchronen Steuerung unterliegt, blieb ungeklärt.

### **1.3.2.2 Hormone und Angiogenesefaktoren**

Weitere Hinweise auf eine hormonale Abhängigkeit der Angiogenese beim Mammakarzinom lieferten Untersuchungen, welche den Einfluss von Zyklussteroiden auf verschiedene Angiogenesefaktoren, insbesondere VEGF, belegen konnten, deren Rolle bei der Tumolvaskularisation heute unbestritten ist (s. Abschnitt 1.2).

Eine Stimulation der VEGF Produktion durch Östrogen in vivo konnte bereits 1996 im DMBA (Dimethylbenz(a)anthrazen) induzierten Mammakarzinom der Ratte nachgewiesen werden (Nakamura et al., 1996) und auch beim Vergleich der Auswirkungen verschiedener Hormonsubstitutionstherapien auf VEGF-Serumlevel, schien Estrogen der stärkste Stimulus für ein Ansteigen der systemischen VEGF-Konzentration zu sein (Agrawal et al., 2000). Die Expression von VEGF-mRNA wird in Endothelzellen des Rattenuterus durch hohe Östrogen- und LH-Konzentrationen initiiert, während ein abfallender Östrogen- und ansteigender Progesteronspiegel (Progesteronphase) für Translation und posttranslatorische Vorgänge verantwortlich zu sein scheint (Karuri et al., 1998). Andere Studien bestätigen eine Erhöhung der Transkriptionsrate und der VEGF-mRNA-Stabilität durch Östrogene und Androgene (Ruohola et al., 1999).

Auch Progesteron alleine bewirkt (hormonspezifisch und zelltypspezifisch) dosisabhängig eine Erhöhung des VEGF- Serumlevels (Hyder et al., 1998), während die VEGF- Expression in kanzerösem Brustgewebe keine Korrelation mit dem hormonellen Status der Patientinnen zuließ, da sich kein durch das Einsetzen des Klimakteriums bedingter Rückgang der VEGF-Expression, wie in gesundem Kontrollgewebe nachgewiesen, beobachten ließ (Greb et al., 1999). Bei Schwangeren ließen sich erhöhte VEGF-Serumwerte feststellen und auch die essentielle Bedeutung von VEGF bei der Ausbildung des Corpus Luteum, welches wiederum Progesteron (wird auch als schwangerschaftserhaltendes Hormon bezeichnet) produziert, ist nachgewiesen.

Für eher antiangiogene Effekte von Progesteron sprechen verschiedene Studien, welche zyklusabhängige Schwankungen von VEGF zeigen konnten (Heer et al., 1998; Benoy et al. 1998; Chung et al. 1998). Hohe Progesteronspiegel unter konstanten Estrogenspiegeln bewirkten sowohl in vivo bei gesunden Frauen als auch bei in Serum kultivierten MCF/7 Mammakarzinomzellen einen Abfall der VEGF 165 Serumlevel bzw. Produktion. Bei der Untersuchung der PD-ECGF-Expression im Laufe des Menstruationszyklus zeigte sich jedoch ein stimulatorischer Einfluss von

Progesteron alleine auf die Expression von TGF- $\beta$  und von Progesteron zusammen mit TGF- $\beta$  auf die Expression des PD-ECGF (Zhang et al., 1997). Auch andere Steroide stimulieren die Expression von TGF- $\beta$ , dessen Aufgabe es ist, beim Abschluss eines Wachstumsvorganges, für Beendigung der Proliferation zu sorgen, und der auch etwas mit der Progression eines Brusttumors vom steroid-sensitiven zum steroid-insensitiven Typ zu tun haben könnte. Der Verlust der Fähigkeit verschiedener Tumorzellen auf TGF- $\beta$ -Einwirkung zu reagieren, könnte also aufgrund der fehlenden Inhibition einen wichtigen Schritt der Kanzerogenese darstellen (Koli und Keskia-Oja, 1996).

### **1.3.3 Hormonale Abhängigkeit der Angiogenese beim Mammakarzinom**

Obwohl sowohl die hormonelle Regulation der genannten Angiogenesefaktoren als auch die besprochenen direkten Zusammenhänge zwischen Hormonexposition und der – wahrscheinlich angiogenesefaktorvermittelten - Vaskularisierung von Mammakarzinomen für eine endokrine Steuerung der Tumorangiogenese sprechen, blieb die Suche nach einem Zusammenhang zwischen Hormonexposition und dem direkten morphologischen Korrelat der Angiogenese, der Mikrogefäßdichte im Tumor, bislang fast gänzlich aus. Dies mag zum Teil an Erkenntnissen liegen, die auf äußerst komplexe Regulationsmechanismen der Angiogenese mit vielen Einflüssen hinweisen. Zu diesen gehören wohl auch bestimmte Hormone, deren Einzelwirkung auf den Endzustand jedoch nur schwerlich zu erkennen sein dürfte, wenn man die Vielfalt der Wachstumsfaktoren bedenkt. Auch die Fähigkeit von Mammatumoren bzw. des Brustfettgewebes, diverse Faktoren - unter ihnen auch Hormone - selbst zu produzieren und/oder aus der Zirkulation heraus zu speichern (Hochberg et al., 1991; Santner et al., 1943; Pasqualini et al., 1992; Cauley et al., 1999; Bulun et al., 1993), erschwert die Suche nach Effekten sowohl endo- als auch exogener Steroide auf den angiogenen Phänotyp von Mammakarzinomen.

Trotz allem könnte der bekannte Effekt bestimmter Hormone auf die Inzidenz und Entwicklung von Mammakarzinomen durchaus durch eine Vaskularisierung des Tumors vermittelt sein, da die Mikrogefäßdichte nicht nur einen wichtigen

Parameter der Angiogeneseaktivität darstellt, sondern im übrigen, ebenso wie anamnestische endokrine Faktoren (s.o.), wenn auch kontrovers, als prognostischer Faktor diskutiert wird (Weidner, 1998; Bevilacqua et al., 1995; Hansen et al., 2000). Ziel dieser Studie ist es, herauszufinden, ob bei malignen Mammakarzinomen Zusammenhänge zwischen hormonellen Einflüssen bzw. Hormonsensitivität und dem vaskulären Phänotyp (Gefäßdichte und –größe) im hotspot des Primärtumors existieren. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse sind vor allem in Bezug auf das Verständnis hormoninduzierter Veränderungen bei der Ätiologie von Mammakarzinomen und auch im Hinblick auf endokrine Therapien von klinischer Relevanz.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Patienten

Untersucht wurden Gewebeproben von 50 Patientinnen, die zwischen 1998 und 2000 in der Universitäts-Frauenklinik Tübingen wegen eines Mammakarzinoms operativ behandelt worden waren. Im Hinblick auf die Fragestellung wurden Patientinnen mit Geburtsjahrgängen zwischen 1945 und 1960 vom Kollektiv ausgeschlossen, um eine eindeutige Einteilung nach Menopausenstatus zu erleichtern. Um die Homogenität bezüglich der Hormonexposition innerhalb der Untergruppen des Kollektivs zu erhöhen, wurden nur Patientinnen berücksichtigt, die laut anamnestischen Angaben noch nie eine Hormonsubstitutionstherapie erhalten hatten. Aus den zugehörigen Patientenakten wurden folgende Daten entnommen: OP-Art und -Datum, systemische Konzentration von FSH, Progesteron und Östrogen zum ungefähren Zeitpunkt der Tumorexzision, Progesteron- und Östrogen-Rezeptorstatus, Zeitpunkt der letzten Periode, normaler Zyklus, Tumordurchmesser, Tumorgrading, Alter der Patientin, Nodalstatus, Art des Tumors: lobulär, duktal, medullär, tubulär oder Mischform (s. **Tab. 1a-d**).

### 2.2 Gewebe

Unmittelbar nach Entnahme wurden die Gewebeproben in 5%igem, gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

Aus dem Archiv des Pathologischen Instituts Tübingen wurden sämtliche von den Gewebsentnahmen im Rahmen der Routinediagnostik erstellten Hämatoxilin-Eosin gefärbten Schnitte herausgesucht. Mit Hilfe dieser Schnitte und den zugehörigen histologischen Befunden war es einer erfahrenen Pathologin möglich, für jede Patientin die Gewebprobe zu bestimmen, welche einen repräsentativen Ausschnitt des Primärtumors darstellt. Von den ausgewählten Paraffinblöcken wurden jeweils 4µm dicke Schnitte angefertigt, auf Spezialobjektträger (Silane-Prep-Slides/Sigma Diagnostics/Art.Nr.54651),

welche zusätzlich mit Poly-L-Lysin vorbehandelt worden waren, aufgetragen und über Nacht bei 37°C angetrocknet. Unmittelbar vor dem Färben wurde das Paraffin dann bei 56-60°C abgeschmolzen, die Objektträger anschließend gekühlt und zum endgültigen Lösen des Paraffins für 10 min in ein Xylolbad gestellt.

## **2.3 Immunhistochemie**

### **2.3.1 Antikörper**

Zur Darstellung der Gefäße diente der monoklonale Mausantikörper Anti-cd34- (Immunotech/Art.Nr.0786/Lot14). Es wurde hierbei nach der Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode (Hsu et al., 1981) vorgegangen, bei der humane zelluläre Antigene durch entsprechende Antikörper vom Kaninchen (polyklonal) bzw. von der Maus (monoklonal), wie in diesem Fall, immunhistochemisch dargestellt werden.

### **2.3.2 Methode**

#### **2.3.2.1 Hydrierung**

Nach dem Entparaffinieren folgte die Hydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (Konzentrationen: 2x 100%, 2x 96%, 2x 70%) und zweimaliges Spülen in Aquadest.

#### **2.3.2.2 Antigenexposition**

Zur Verstärkung der Antigenexposition im Gewebe diente eine Hitzevorbehandlung: Die Schnitte wurden in einem offenen Sikkumat Kochtopf in Citratpuffer (82ml NaCitrat + 18ml Citronensäure + 900ml Aquadest/ auf pH 6 eingestellt) zunächst bis zum Siedepunkt des Puffers und bei geschlossenem Deckel bis zum Pfeifton erhitzt, von der Kochplatte genommen und 2 min bei immer noch geschlossenem Deckel weitergekocht. Nach Abkühlung mit Hilfe

von Leitungswasser folgte eine dreimalige Spülung in Aquadest. Die Schnitte wurden dann bis zum nächsten Schritt für einige Minuten in Bädern mit Tris-Puffer aufbewahrt. (Tris-Puffer: 100ml Tris-Konzentrat +900ml Aquadest/ auf pH 7,6 eingestellt)

#### **2.3.2.3 Blockade unspezifischer Bindungsstellen**

Zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen des Gewebes wurden die Schnitte mit 1:100 verdünntem Pferdenormalserum (ABC-Kit/Vectastain/Art.Nr.PK-6200) 20 min lang bei Raumtemperatur inkubiert.

#### **2.3.2.4 Primärantikörper**

Nach dem Absaugen des Pferdenormalserums folgte die einstündige Inkubation mit dem 1:500 verdünnten Primärantikörper, ebenfalls bei Raumtemperatur.

Zum Befreien der Schnitte von überschüssigem Antikörper fand ein Spülpuffer (50µl Tween 20 in je 200 ml Tris) Anwendung. Die Schnitte wurden hierbei mit einer Wasserstrahlsaugpumpe zuerst vorsichtig und ohne den Schnitt zu berühren vom Inkubationsmedium befreit und anschließend unter Zuhilfenahme einer 1000µl Pipette großzügig mit Spülpuffer benetzt. Der Vorgang wurde dann noch zweimal wiederholt und der Puffer der dritten Spülung erst unmittelbar vor der nächsten Inkubation abgesaugt. Bei der hier verwendeten Technik konnte ein Austrocknen der Schnitte im abgesaugten Zustand durch ein Spülschema verhindert werden, welches die Schnitte nie länger als einige Sekunden ohne Flüssigkeit ließ.

#### **2.3.2.5 Sekundärantikörper**

Anschließend wurde der biotinylierte Sekundärantikörper (ABC-Kit/Vectastain/Art.Nr.PK-6200) in 1:50 Verdünnung (50µl AK in 2,5ml 2%ige Pferdenormalserum/Tris-Lsg.) auf die Schnitte aufgetragen und für 25 min bei Raumtemperatur dort belassen.

### **2.3.2.6 ABC-Reagenz**

Beim Herstellen der ABC-Reagenz (ABC-Kit/Vectastain/Art.Nr.PK-6200) war darauf zu achten, die Mindestinkubationszeit der Lösung nach dem Ansetzen (50µl Reagenz A und 50µl Reagenz B in je 2,5 ml Tris), welche 30 min beträgt, nicht zu unterschreiten. Die Inkubation der Schnitte mit der Lösung betrug nach dreimaligem Spülen (s.o.) 25 min (Raumtemperatur).

### **2.3.2.7 Färbung und Gegenfärbung**

Zum Sichtbarmachen der gebundenen Antikörperkomplexe wurden die gespülten Schnitte 2 min lang mit einer unmittelbar vor Gebrauch hergestellten Diaminobenzidintetrahydrochlorid-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Tris-Lösung (100mg DAB + 100µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in je 200ml Tris) behandelt. Es folgte eine Gegenfärbung mit filtriertem Hämatoxilin (Harris`Hematoxilin) für 10 sek. Die Färbereaktionen wurden jeweils zeitgleich für alle Schnitte einer Färbereihe in Leitungswasser abgestoppt.

### **2.3.2.8 Dehydrierung und Fixierung**

Nach 2-3 sek in 70%igem Alkohol mit Ammoniak erfolgte die Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (2x 70%/2x96%/2x100%). Bis zum Eindecken der einzelnen Schnitte mit EUKIT befanden sich diese einige Minuten in Xylol.

### **2.3.2.9 Negativkontrolle**

Das Ersetzen des Primärantikörpers durch o.g. Tween20-Spülpuffer bei der Durchführung der Färbung bei jeweils zwei Schnitten pro Färbereihe, deren Behandlung ansonsten genau der der restlichen Schnitte entsprach, lieferte die Negativkontrollen der jeweiligen Reihe. Dies ermöglichte eine sofortige Beurteilung der Färbequalität und zeigte artifizielle, nicht primärantikörpergebundene Hintergrundfärbungen auf. Für die weiteren Untersuchungen wurden ausschließlich Schnitte aus Färbereihen verwendet, deren Negativkontrollen eindeutig negativ waren und welche selbst nur an den für den jeweiligen Antikörper bekannten Strukturen eine Farbreaktion erkennen ließen.

## **2.4 Quantitative Auswertung der Färbung**

### **2.4.1 Markierung der „hotspots“**

Unter dem Mikroskop wurden die gefärbten Schnitte von einer erfahrenen Pathologin bei schwacher Vergrößerung (40x bis 100x/totale Vergrößerung) durchgescannt und jeweils der Bereich des Tumors mit der höchsten Anzahl deutlich dargestellter Gefäße („hotspot“) markiert. Sklerotische, hypozelluläre Gebiete innerhalb des Tumors und solche, die unmittelbar an benignes Mammagewebe angrenzten, wurden nicht berücksichtigt (nach Weidner et al. 1995a).

### **2.4.2 Morphometrische Messungen**

#### **2.4.2.1 Computerassistierte Bildanalyse**

Die vormarkierten Schnittpräparate wurden mit Hilfe eines computerassistierten Bildanalysesystems (Quantimet 600/Leica/Cambridge/UK) ausgewertet, welches Bildausschnitte der immunhistochemisch gefärbten Schnitte mit einer im Mikroskop integrierten Videokamera aufnehmen kann. Von der Kamera proportional zur Helligkeit einzelner Bildpunkte (Pixel) erzeugte Signale werden in digitaler Form an das Programm Quantimet 600 gesendet und stehen somit für die computergestützte Analyse zur Verfügung. Die Auswertung der Schnitte fand ohne Wissen um die zugehörigen klinischen Parameter statt. Innerhalb des definierten „hotspots“ wurde bei einer 200fachen Vergrößerung am Mikroskop (20x Objektiv/10x Okular) bzw. einer 360fachen Vergrößerung am Monitor der Bereich mit der höchsten Gefäßdichte gesucht und aus diesem drei aneinandergrenzende Auschnitte von je 0,24 mm<sup>2</sup> eingezogen.

Es konnten nun folgende Parameter untersucht werden: Gefäßdichte, Anteil der Grundfläche aller Gefäße am Bereich der Auszählung und Verteilung der einzelnen Gefäßflächen.

#### **2.4.2.2 Markierung der Mikrogefäße**

Als Einstieg in diese semimanuelle Auswertung diente das Definieren einer Farbschwelle (red, green, blue), die eine im Programm integrierte grobe Vormarkierung aller braun gefärbten Strukturen im Areal ermöglichte. Dieses Vorgehen stellte eine nützliche Orientierungshilfe bei der anschließenden manuellen Kontrolle und gegebenenfalls Nachbesserung oder Demarkierung der gefärbten Gefäßstrukturen dar. Als einzelnes zählbares Gefäß wurde jede braun gefärbte Endothelzelle bzw. jeder Endothelzellhaufen, der sich deutlich abtrennt von angrenzenden weiteren Gefäßen, Tumorzellen und anderen Bindegewebsstrukturen darstellte, definiert. Auch Endothelzellhaufen, die von nur einem sich mehrmals durch das Gewebe schlängelnden Gefäß stammen könnten, wurden als separate Gefäße gewertet. Weder ein Gefäßlumen noch das Vorhandensein von Erythrozyten wurden für die Definition als Gefäß vorausgesetzt (nach Weidner 1995). Aber auch nicht-gefärbte Areale, die sich innerhalb eines deutlich erkennbaren Gefäßlumens befanden, wurden manuell nachmarkiert, was die rein mengenmäßige Zählung der Gefäße nicht beeinträchtigte aber Voraussetzung für die Berechnung der Gefäßflächenparameter war. Nichtvaskuläre Strukturen waren entweder schon am Monitor oder im Zweifelsfall durch nochmaliges Begutachten des Originalschnittes am Mikroskop als solche zu erkennen und wurden, wenn fälschlicherweise vormarkiert, von ihrer Markierung befreit und somit von der Zählung ausgeschlossen.

#### **2.4.2.3 Markierung des Messareals**

Im Anschluss an die automatische Messung der Gefäßparameter anhand der markierten vaskulären Strukturen folgte das Definieren des Bereichs, in dem die Messung stattgefunden hatte, mittels einer weiteren Markierung. Hierbei wurden nur zelluläre Bestandteile der Schnitte berücksichtigt und im Feld befindliche Areale von Fettgewebe, durch die Färbung zerstörte oder übereinanderlappende Teile sowie große Ductuslumina durch manuelles Entfernen der Feldmarkierung von den Berechnungen ausgeschlossen. Es wurden für jeden Schnitt, die Daten der drei zusammengehörigen Felder mit

den Flächen von je 0,24 mm<sup>2</sup> zuerst getrennt erhoben, gespeichert und anschließend addiert, um eine Gesamtfläche von 0,72 mm<sup>2</sup> zu erhalten (siehe Weidner et al. 1995a).

#### **2.4.2.4 Erhebung der Gefäßparameter**

Der Output des Programms lieferte die Anzahl der Gefäße (Count) im Feld (Areafield), die Gesamtfläche aller gezählten Gefäße (Area, in  $\mu\text{m}^2$ ), die Größe des Feldes, in dem gemessen wurde (Areafield, in  $\mu\text{m}^2$ ), die mittlere Gefäßfläche (MeanArea, in  $\mu\text{m}^2$ ), den prozentualen Anteil der Area am Areafield (Area%), die Anzahl der Gefäße pro mm<sup>2</sup> und die Verteilung der Gefäßflächen. Das Programm wurde hierbei so angelegt, dass bei der Berechnung der mittleren Gefäßfläche alle Gefäße, die entweder  $<5 \mu\text{m}^2$  oder  $>500 \mu\text{m}^2$  waren, ausgeschlossen wurden. Sehr kleine Flächen können durch Vormarkierungen nichtvaskulärer Strukturen des Schnittes - z.B. winzige Verunreinigungen des Objektträgers -, die sich am Monitor wegen ihrer geringen Größe nicht als solche identifizieren und demarkieren lassen, entstehen. Da bei keinem der Schnitte gefärbte Strukturen mit einer Fläche  $<5 \mu\text{m}^2$  gefunden wurden, erwies sich das festgelegte Minimum als eine im Nachhinein nicht benötigte, wenn auch sinnvolle Sicherheitsmaßnahme. Sehr große Flächen entstehen vor allem durch längs geschnittene Gefäße, welche so eine unverhältnismäßig große, nicht dem wahren Gefäßkaliber entsprechende Grundfläche bekommen. Werden diese „zu großen“ Gefäßflächen bei der Berechnung der mittleren Gefäßfläche berücksichtigt, können schon einzelne Gefäße diesen Wert erheblich verfälschen. Obwohl dieser Effekt, wenn auch in geringerem Ausmaß, beim Berechnen des prozentualen Anteils der Gefäßflächen am Messareal (Area%) auftritt, wurden hierbei auch Gefäße mit einer Fläche  $>500 \mu\text{m}^2$  miteinbezogen. Dies geschah, um später beim Vergleich der Untergruppen des Kollektivs zu sehen, ob Unterschiede, die bei der Mean Area zu sehen sind und sich daher auch auf die Area% auswirken müssten, dies trotz Berücksichtigung der Extremwerte tun. Auf der anderen Seite lässt sich so auch umgekehrt die Maskierung von Signifikanzen im Bereich der Mean Area durch das Ausklammern dieser Extremwerte anhand der Area% nachvollziehen. Da es bei

der Bestimmung der Gefäßdichte keine Rolle spielen darf, ob die Gefäße quer oder längs getroffen sind, wurden auch hier alle gezählten Gefäße, auch die  $>500 \mu\text{m}^2$ , miteinbezogen.

## **2.5 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde mit den Programmen JMP und SPSS im Institut für Medizinische Informationsverarbeitung (IMI) und im Zentrum für Medizinische Forschung (ZMF) durchgeführt. Die Berechnung der Mittelwertsvergleiche erfolgte nach vorheriger Varianzanalyse mit dem Wilcoxon/ Kruskal-Wallis und dem t-Test. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p=0,05$  festgelegt.

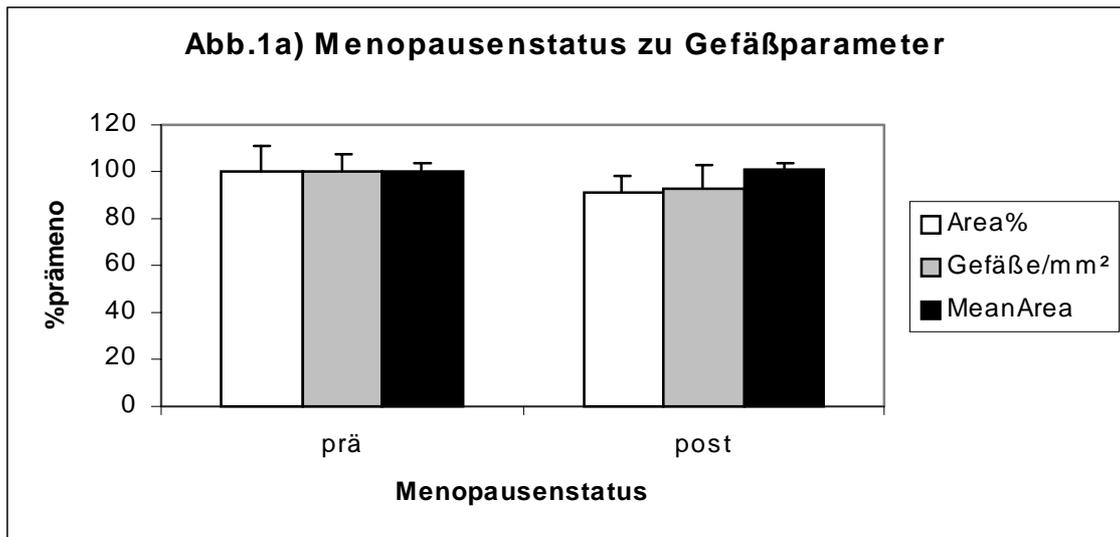
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Gefäßparameter

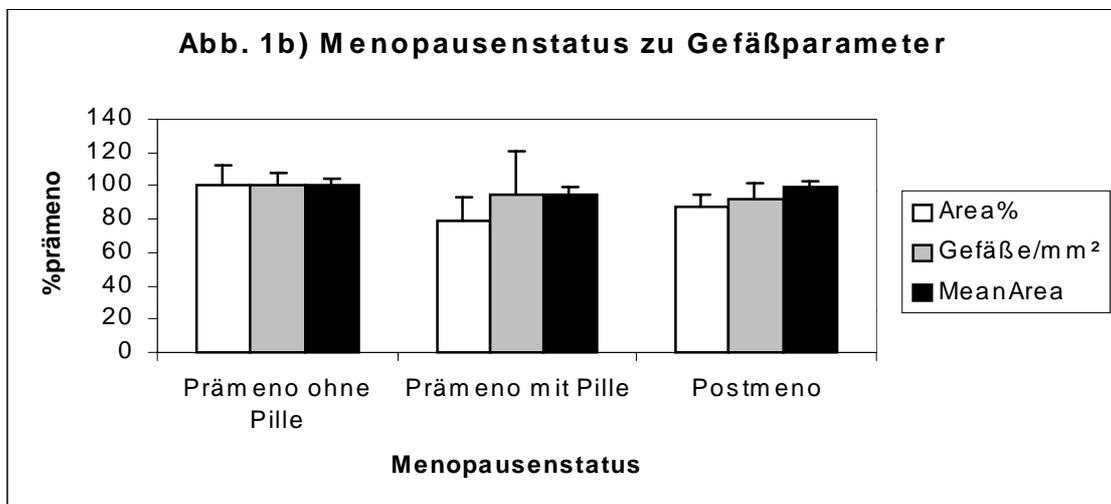
Für die statistische Auswertung wurden der prozentuale Anteil der Gefäßflächen am Bereich in dem gemessen wurde (Area% in  $\mu\text{m}^2$ ), die Gefäßdichte im Tumorhotspot (Gefäße/ $\text{mm}^2$ ) und die mittlere Gefäßfläche (MeanArea in  $\mu\text{m}^2$ ) verwendet. Die Mittelwerte der drei Gefäßparameter für jede der Patientinnen sowie Mittelwerte, Minima und Maxima für das gesamte Patientenkollektiv (n=50) sind in **Tabelle 2a-d** und **3** dargestellt.

### 3.2 Menopausenstatus und Gefäßparameter

Mit Hilfe der gesammelten Daten war eine eindeutige Einteilung des Kollektivs in Patientinnen mit Prä- (n = 22) und Postmenopausenstatus (n = 27) möglich. Die Gruppe der prämenopausalen Patientinnen wurde nochmals in Patientinnen mit (n=4) und ohne Einnahme von Ovulationshemmern (n=18) unterteilt. Um die Vergleichbarkeit innerhalb der Untergruppen zu erhöhen, waren bei der gezielten Auswahl des Kollektivs nur Patientinnen berücksichtigt worden, die laut anamnestischen Angaben noch nie eine Hormonsubstitutionstherapie erhalten hatten, wobei jedoch eine Patientin ihren perioperativen Hormonserumleveln nach eindeutig unter dem Einfluss einer Substitution stand. Die Werte dieser Patientin wurden von den statistischen Vergleichen ausgeschlossen, da sie gegenüber den anderen eine Sonderrolle einnimmt und in keine der folgenden Gruppen sinnvoll einzuordnen war. Verglichen wurden die Mittelwerte der Gefäßparameter zwischen prä- und postmenopausal (**Abb.1a**), sowie zwischen den Gruppen prämenopausal mit, ohne Pille und postmenopausal (**Abb.1b**). Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (s. **Tab. 4**).



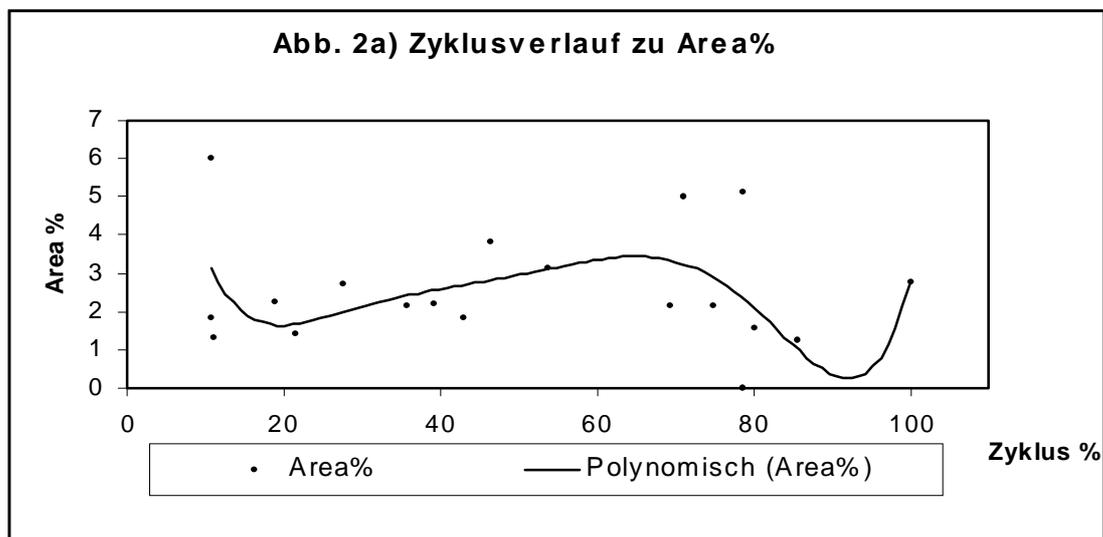
**Abb.1a)** GefäÙparameter in Verbindung mit Menopausenstatus. Gegenübergestellt werden die Mittelwerte der GefäÙparameter mit Standardfehler von Patientinnen mit Prä- (n=22) und Postmenopausenstatus (n=27). Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.



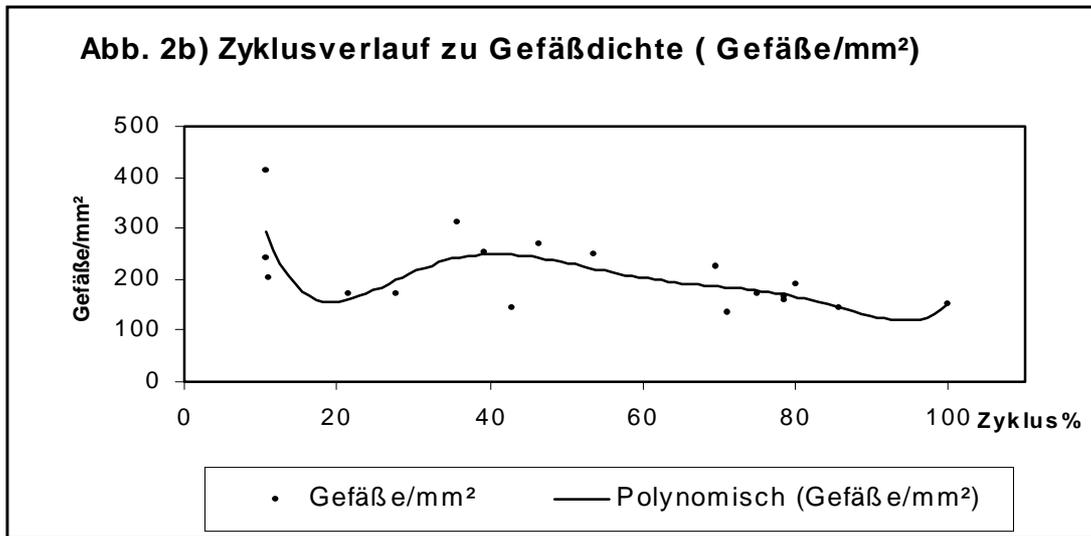
**Abb.1b)** Darstellung der GefäÙparameter in Verbindung mit Menopausenstatus und Einnahme bzw. Nichteinnahme von Ovulationshemmern. Dargestellt sind die Mittelwerte der GefäÙparameter mit Standardfehler von prämenopausalen Patientinnen, die regelmäßig Ovulationshemmer einnehmen (n=4) bzw. nicht einnehmen (n=18) und postmenopausalen Patientinnen (n=27). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen nicht.

### 3.3 Zyklusverlauf und Gefäßparameter

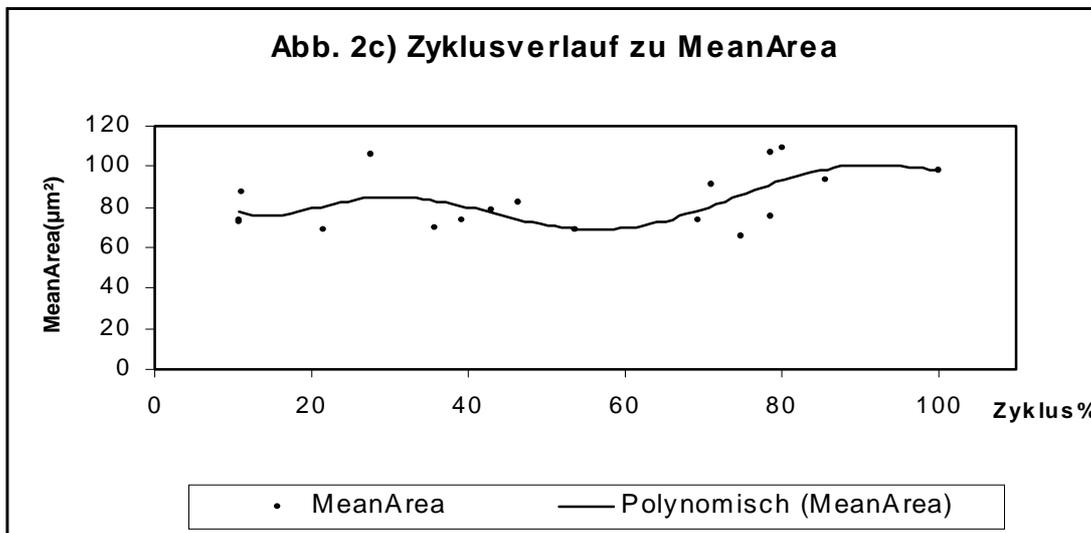
Für die prämenopausalen Patientinnen, welche zum Zeitpunkt der Gewebsentnahme nicht unter dem Einfluß von Ovulationshemmern standen (n=18), wurde basierend auf anamnestischen Angaben und den systemischen Konzentrationen der Zyklushormone jeweils berechnet, welcher prozentuale Anteil des laufenden Zyklus zum Zeitpunkt der Operation bereits verstrichen war (Zyklustag/Zykluslänge). So war es möglich, die drei erhobenen Gefäßparameter jeder Patientin dem jeweils zugehörigen prozentualen Anteil am verstrichenen Menstruationzyklus (1-100%) zuzuordnen, um mögliche Unterschiede des Gefäßphänotyps zwischen Tumoren aus verschiedenen Zyklusphasen sichtbar zu machen. Die **Abb.2a, b, c** zeigen die Verläufe der Gefäßflächenanteile am Messareal (Area%), der Gefäßdichten (Gefäße/mm<sup>2</sup>) und der mittleren Gefäßflächen (MeanArea) jeder einzelnen Patientin der Gruppe entlang des Zyklusschemas.



**Abb.2a)** Darstellung der Gefäßflächenanteile am Messareal (Area%) in Verbindung mit dem Zyklusverlauf. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Gefäßflächen am Areal, in dem gemessen wurde (Area%), von 18 Patientinnen, jede individuell in den Zyklusverlauf eingeordnet. Die Zahlen 1-100 geben den Anteil des bereits verstrichenen Zyklus in Prozent für jede einzelne Patientin an.

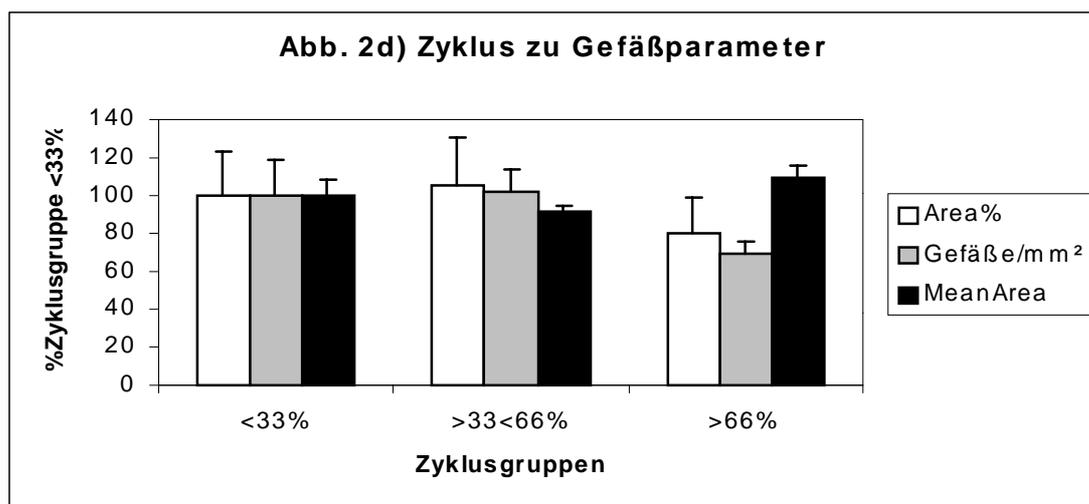


**Abb.2b)** GefäÙdichte (GefäÙe/mm<sup>2</sup>) wäÙend Ablaufes des Zyklus. Die GefäÙdichten von 18 Patientinnen werden dem jeweils zugehörigen prozentualen Anteil an verstrichenem Zyklus (1-100%) zugeordnet.



**Abb.2c)** Darstellung der mittleren GefäÙfläÙen (MeanArea) im Zyklusverlauf. Die mittleren GefäÙfläÙen von 18 Patientinnen werden dem jeweils zugehörigen prozentualen Anteil an verstrichenem Zyklus (1-100%) zugeordnet.

Um herauszufinden, ob im Verlauf des Zyklus bei den einzelnen Gefäßparametern signifikante Veränderungen auftreten, wurden die Patientinnen entsprechend ihren Prozentangaben dem ersten (0-33% n=5), zweiten (33-66% n=5) oder dritten Zyklusdrittel (66-100% n=8) zugeordnet und die Mittelwerte der Gefäßparameter in den drei Gruppen miteinander verglichen (**Abb.2d**). Ein signifikanter Unterschied ließ sich zwischen den Mittelwerten der Gefäßdichte (Gefäße/mm<sup>2</sup>) im zweiten und dritten Zyklusdrittel feststellen: Tumoren, die im zweiten Drittel des Menstruationszyklus entfernt worden waren, wiesen eine signifikant höhere Gefäßdichte als Tumoren aus dem letzten Zyklusdrittel auf (t-Test/p= 0,045/ s. **Tab.4; Abb. 4c,d**).

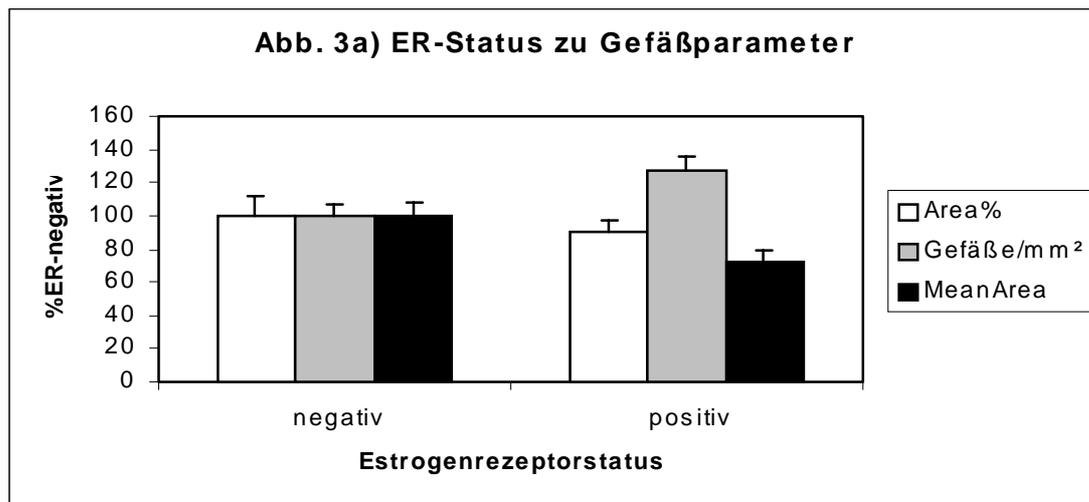


**Abb.2d)** Darstellung der Gefäßparameter in Verbindung mit dem Zyklusverlauf (gruppiert). Dargestellt sind die Mittelwerte der Gefäßparameter mit Standardfehler von 18 Patientinnen, die sich im ersten (n=5), zweiten (n=5) oder dritten (n=8) Zyklusdrittel befinden. Ein signifikanter Unterschied besteht zwischen dem zweiten und dritten Zyklusdrittel bei der Gefäßdichte ( $p=0,045$ ).

## 3.4 Hormonsensitivität und Gefäßparameter

### 3.4.1 Estrogenrezeptorstatus

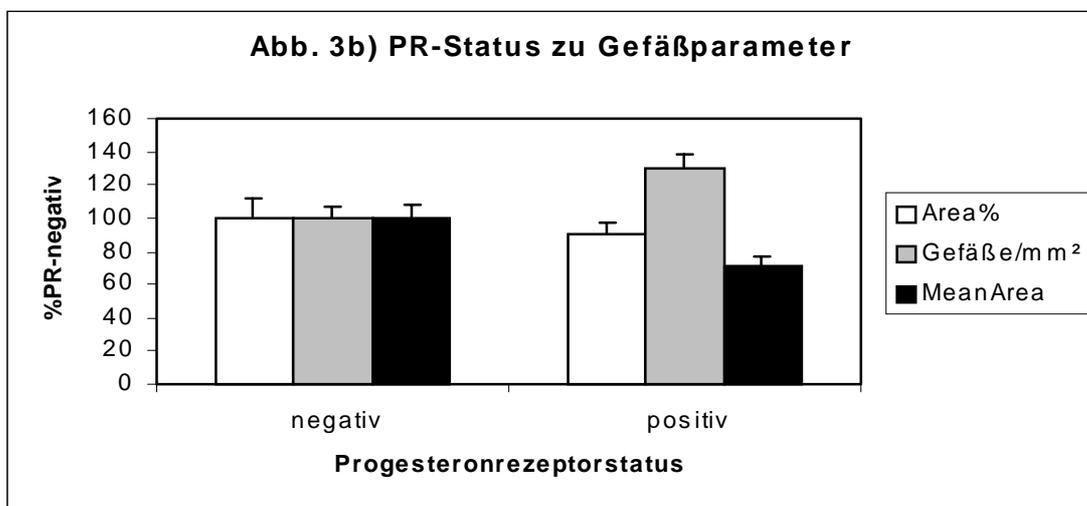
Anhand des Tumor-ER Status wurde das Kollektiv (n=49) in zwei Gruppen mit ER-Status negativ (n=19) und ER-Status positiv (n=30) aufgeteilt (**Abb.3a**). Beim Vergleich der zwei Gruppen in Bezug auf die Mittelwerte der Gefäßparameter fand sich eine signifikant größere mittlere Gefäßfläche (MeanArea) bei den ER negativen als bei den ER positiven (Wilcoxon/ Kruskal-Wallis-Test/  $p=0,0074$ ). Die ER positiven Tumoren wiesen eine signifikant höhere Varianz der Gefäßdichte auf (Bartlett-Test/  $p=0,0088$ / s. **Tab.4; Abb.3d; Abb.4a,b**).



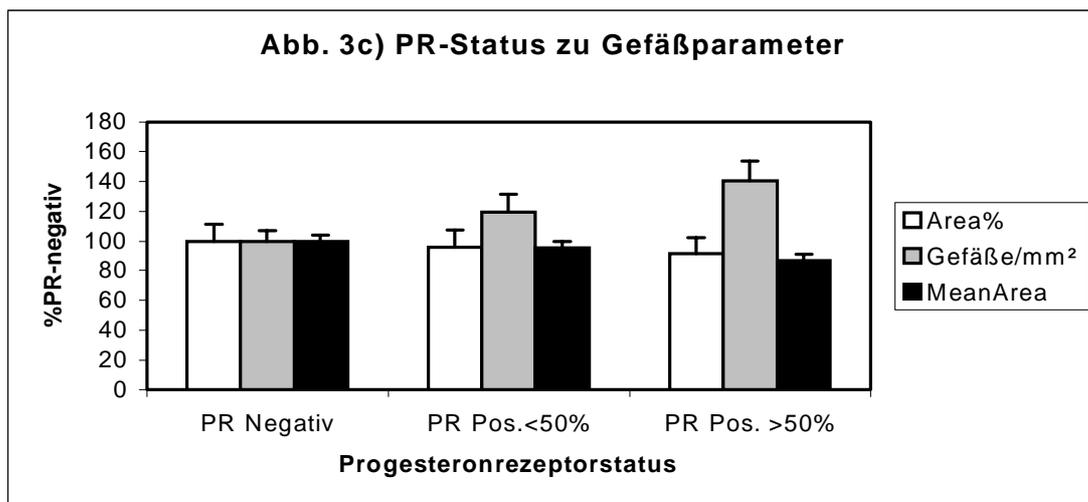
**Abb.3a)** Vergleich der Gefäßparameter in Verbindung mit Estrogenrezeptorstatus. Die Mittelwerte der Gefäßparameter mit Standardfehler von 49 Patientinnen sind hier nach ER negativ (n=19) und ER positiv (n=30) unterteilt. Die Gruppe der ER negativen zeigt eine signifikant größere mittlere Gefäßfläche (MeanArea) als die der ER positiven ( $p=0,0074$ ).

### 3.4.2 Progesteronrezeptorstatus

Wie schon in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, fand auch hier eine Gruppenbildung zunächst nur nach Rezeptorstatus – PR negativ (n=20), PR positiv (n=29) – für das gesamte Kollektiv (n=49) statt (**Abb.3b**). Hierbei wiesen die PR negativen im Vergleich zu den PR positiven eine signifikant größere mittlere Gefäßfläche (MeanArea) auf (Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test/  $p=0,0066$ ). Bei weiterer Aufspaltung der Gruppen in PR negativ (n=20), PR <50% positiv (n=14) und PR >50% positiv (n=15) ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen PR negativ und PR >50% positiv bei Mittelwerten der Gefäßdichte (Gefäße/mm<sup>2</sup>) und der mittleren Gefäßfläche (MeanArea) (t-Test/  $p<0,05$ ) in Form von höherer Dichte und kleinerer mittlerer Gefäßfläche der Gruppe PR > 50% positiv im Vergleich zu PR negativ (**Abb.3c**). Des Weiteren fand sich eine signifikant höhere Varianz der Gefäßdichte für die PR positiven Karzinome (Bartlett-Test/  $p=0,0053$ / s. **Tab.4; Abb.3d; Abb.4a,b**).



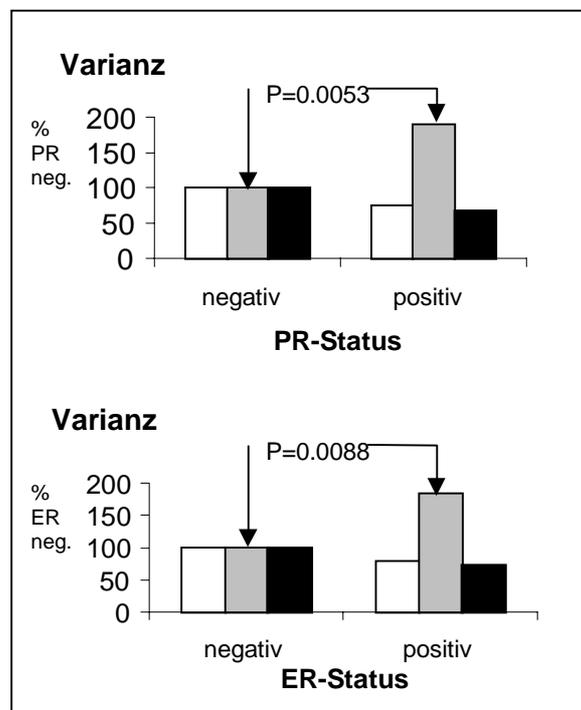
**Abb.3b)** Vergleich der Gefäßparameter in Verbindung mit dem Progesteronrezeptorstatus. Die Mittelwerte der Gefäßparameter mit Standardfehler von 49 Patientinnen sind hier nach PR negativ (n=20), PR positiv (n=29) unterteilt. Eine signifikant größere mittlere Gefäßfläche (MeanArea) weisen die PR negativen im Vergleich zu den PR positiven auf ( $p=0,0066$ ).



**Abb.3c)** Vergleich der Gefäßparameter in Verbindung mit Progesteronrezeptorstatus. Die Mittelwerte der Gefäßparameter mit Standardfehler von 49 Patientinnen sind hier nach PR negativ (n=20), PR <50% positiv (n=14) und PR >50% positiv (n=15) unterteilt. Signifikante Unterschiede bestehen bei Gefäßdichte und MeanArea zwischen den Gruppen ER negativ und ER >50% positiv ( $p < 0,05$ ).

**Abb.3d)** Beim Vergleich der Varianzen der Gefäßparameter ergaben sich bei der MeanArea und Area% keine signifikanten Unterschiede zwischen PR/ER positiven (n=29/30) und negativen (n=20/19) Tumoren, während die Varianz der Gefäßdichte bei den PR/ER positiven signifikant höher als bei den PR/ER negativen war (Bartlett-Test/ $p=0,0053/p=0,0088$ ).

□ Area%   ■ V/mm<sup>2</sup>   ■ MeanArea



## 4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe aus invasiven Mammakarzinomen immunhistochemisch mit dem monoklonalen Endothelantikörper Anti-cd34 untersucht. Erhobene Gefäßparameter im angiogenen „hotspot“ des Tumors waren Gefäßdichte (Gefäße/mm<sup>2</sup>), prozentualer Anteil der Gefäßfläche am Messareal (Area%) und die mittlere Gefäßfläche (MeanArea). Mit der Zielsetzung, einen potentiellen Einfluss der Hormonexposition auf den angiogenen Phänotyp des Tumors aufzudecken, wurden die Patientinnen nach Menopausenstatus, Zyklusverlauf und Hormonrezeptorstatus (ER und PR) des Tumors in Gruppen eingeteilt und die Mittelwerte der Gefäßparameter verglichen.

Signifikante Unterschiede bei der Gefäßdichte ließen sich im Zyklusverlauf und bei der Gruppierung nach PR- und ER-Status feststellen. Es fand sich im zweiten eine höhere Gefäßdichte als im dritten Zyklusdrittel und PR >50% positive Tumoren hatten eine höhere Dichte im Vergleich zu PR negativen.

Die mittlere Gefäßfläche war bei ER negativen Tumoren signifikant größer als bei ER positiven. PR negative wiesen verglichen mit PR positiven Tumoren ebenfalls eine größere mittlere Gefäßfläche auf. Nach weiterer Unterteilung der PR positiven in PR </> 50% positiv fand sich ein signifikant größerer Wert der mittleren Gefäßfläche von PR negativen verglichen mit den PR >50% positiven. Die Gruppierung nach Menopausenstatus mit und ohne Berücksichtigung der Einnahme von Ovulationshemmern erbrachte in Bezug auf die Gefäßparameter keine signifikanten Unterschiede.

Bei der immunhistochemischen Darstellung von Mikrogefäßen fanden bisher hauptsächlich Antikörper gegen cd31, cd34 und den von Willenbrand Faktor (F8-Ag), sogenannte Pan-endothelmarker Verwendung. Anti-cd34 und Anti-cd31 färben durch höhere Sensitivität mehr Gefäße an als Anti-F8, haben dafür aber eine geringere Spezifität. Anfärbungen von Tumorzellen, Megakaryozyten und Lymphozyten wurden für Anti-cd31 beschrieben (Weidner, 1995a). Auch Anti-cd34 markiert außer Endothelien noch einige perivaskuläre Stromazellen und stellt (wie Anti-cd31) nicht alle Gefäße des Tumors dar (Wang

et al., 1994). Da z.T. massive lymphozytäre Infiltrate der Gewebeproben eine Verwendung von Anti-cd31 ausschlossen und Anti-cd34 beim Mammakarzinom verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse liefert (Martin et al., 1997), wurde er für diese Studie ausgewählt. Hierzu ist jedoch anzumerken, dass sowohl für Anti-F8-Ag als auch für Anti-cd34 eine proportionale Mitanfärbung von Lymphgefäßen beschrieben wurde (Vermeulen et al., 1996). Obwohl es nach van Netten (1995) bei Neoplasmen nicht zur Anlage eines Lymphdrainagesystems kommt, ist eine Verfälschung durch anti-cd34 falsch positive präexistente Lymphgefäße nicht ganz auszuschließen.

Bei der Auswertung der gefärbten Schnitte wurde nach einer von Noel Weidner (1995a) beschriebenen Standardmethode vorgegangen und lediglich die Auszählung der Gefäße im „hotspot“ nicht manuell sondern mit Hilfe eines computerassistierten Bildanalysesystems vorgenommen. Dies erlaubte zusätzlichen Informationsgewinn durch Erhebung nicht nur der Gefäßdichte sondern auch der mittleren Gefäßfläche und des Flächenanteils der Gefäße am Messbereich. Aus technischen Gründen ergab sich hierbei eine minimale Verkleinerung der ausgewerteten „hotspotfläche“ von 0,02 mm<sup>2</sup> im Vergleich zur Standardmethode (0,72 anstatt 0,74mm<sup>2</sup>).

Da aufgrund der heterogenen Gefäßverteilung im Tumor z.T. erhebliche Unterschiede bei der Gefäßdichte zwischen verschiedenen „hotspots“ desselben Tumors bestehen (de Jong et al., 1995) und somit sowohl die Auswahl eines repräsentativen Tumorbereichs mit Hilfe aller verfügbarer H.E.-gefärbter Schnitte sowie die Definition und Vormarkierung des angiogenen „hotspots“ nicht zu vernachlässigende Fehlerquellen darstellen, wurden diese Aufgaben von einer erfahrenen Pathologin durchgeführt .

Effekte hormoneller Einflüsse auf die weibliche Brust sind zum Zeitpunkt der Menarche, während Menstruationszyklus (Vogel et al., 1981), Schwangerschaft und Laktation nachweisbar. Nach der Menopause fällt das Brustgewebe in einen Ruhezustand, der mit niedrigen systemischen Östrogen- und unter der Meßschwelle liegenden Progesteronspiegeln einhergeht (Hulka et al., 1994). Aufgrund dieser hormonellen Regulation physiologischer Funktionen der Brust, sowie mittlerweile zahlreicher Studien, die auf eine Hormonabhängigkeit der

Progression und/oder des Wachstums von Mammakarzinomen hindeuten, liegt die Frage nach dem Einfluss des Menopausenstatus auf die Angiogenese in Mammatumoren nahe, zumal dieser eine wesentliche Rolle bei Tumorwachstum und -pathogenese zukommt (Folkman, 1990).

Beim Versuch diese Frage zu klären, wurde bisher die Vaskularisierung von Mammagewebe mit Hilfe von indirekten Parametern erhoben und verglichen. Es fand sich bei der Untersuchung von gesundem, jedoch von Patientinnen mit Mammakarzinomen stammenden, Brustgewebe ein altersabhängiger Abfall der VEGF-Expression (m-RNA) nach der Menopause (Greb et al., 1999), sowie dopplersonographisch eine positive Korrelation von Gefäßwiderstandsindex zum Alter bei postmenopausalen Patientinnen ( Villena-Heinsen et al., 1998). Obwohl diese Ergebnisse auf eine Regulation der Mammadurchblutung durch ovarielle Steroide hindeuten, ließ sich bei denselben Messungen im Mammakarzinomgewebe keine Abhängigkeit der VEGF-Expression und Gefäßwiderstandsindizes vom Menopausenstatus oder Alter der Patientinnen nachweisen. Zytosolische VEGF-Protein-Level in Mammatumoren (ohne Befall der Lymphknoten) zeigten sich von diesen Parametern ebenso unbeeinflusst (Gasparini et al., 1997). Auch bei den in dieser Untersuchung gemessenen Gefäßparametern fanden sich keine Unterschiede zwischen prä- (unabhängig von einer weiteren Gruppierung nach Einnahme oder Nichteinnahme von Ovulationshemmern) und postmenopausalen Patientinnen.

Die gemeinsame Aussage der Ergebnisse dieser und älterer Studien, nämlich eine scheinbare Unabhängigkeit der Vaskularisation invasiver Mammakarzinome vom Menopausenstatus lässt sich zum einen mit einer Theorie zur Tumorpathogenese erklären, nach der die Entwicklung von Karzinomen mit einer Desensitivierung des Tumors gegenüber regulatorischen Signalen des Wirtes einhergeht. Diese zunehmende Unabhängigkeit mündet laut diesem Modell in einer selbständigen Hormonproduktion des Tumors, die zu einer relativen Unabhängigkeit von systemischen endokrinen Einflüssen führt (Dickson, 1992). Hormonelle Effekte dürften nach dieser Theorie bei fortgeschrittenen Tumorstadien vorwiegend auf autokriner und parakriner

Ebene zwischen vom Tumor selbst produzierten und sezernierten Hormonen und deren Rückwirkung auf seine Vaskularisierung stattfinden.

Eine zweite Möglichkeit zur Erklärung des nicht erkennbaren Einflusses des Menopausenstatus auf die Tumorangio-genese wäre die Maskierung vorhandener Unterschiede durch die starken und schnellen Veränderungen des angiogenen Phänotyps im Laufe des Menstruationszyklus, welche sich in dieser Studie zeigen ließen. Sowohl eine undifferenzierte Einordnung aller prämenopausalen Patientinnen ohne Ovulationshemmer in eine Gruppe, trotz bekannter Schwankungen der systemischen Estrogen und Progesteronkonzentrationen im Zyklusverlauf, als auch der Vergleich dieser Gruppe mit postmenopausalen Patientinnen oder solchen mit Einnahme von Ovulationshemmern, bei denen diese kurzzeitigen Änderungen des hormonellen Milieus nicht zu erwarten sind, schmälern die Vergleichbarkeit der Gruppen. Es könnte also auch der zufällige Einfluss von zyklusabhängigen kurzzeitigen Schwankungen des angiogenen Phänotyps innerhalb der Gruppe der prämenopausalen Patientinnen vorhandene Zusammenhänge überdecken. Solche Schwankungen ließen sich in dieser Studie tatsächlich bei der Gefäßdichte im Zyklusverlauf beobachten. Die mittlere Anzahl der Gefäße/mm<sup>2</sup> im angiogenen „hotspot“ war bei Tumorgewebe, welches im zweiten Zyklusdrittel entnommen worden war, signifikant höher als bei Gewebe aus dem dritten Zyklusdrittel. D.h. die Gefäßdichte scheint bei konstanter mittlerer Gefäßgröße mit Fortschreiten des menstruellen Zyklus abzunehmen, was auf eine verminderte Tumolvaskularisierung in der lutealen Phase hinweisen könnte. Da sich die Vaskularisierung der Karzinome offensichtlich parallel zum menstruellen Zyklus zu verändern scheint, stellt sich die Frage, ob zwischen den beobachteten Veränderungen der Gefäßdichte und den definierten physiologischen Schwankungen der Hormonkonzentrationen im Verlauf des Zyklus kausale Zusammenhänge bestehen. Als Regulatoren des angiogenen Phänotyps und somit Auslöser für den beobachteten Abfall der Gefäßdichte in den untersuchten Mammakarzinomen des letzten Zyklusdrittels kämen in diesem Fall vor allem die Zyklushormone Progesteron und/oder Estrogen in Frage.

So könnte z.B. der physiologische postovulatorische Progesteronanstieg mit einem Peak, der in etwa im dritten Zyklusdrittel liegen dürfte, auf einen antiangiogenen Effekt von Progesteron hindeuten, welcher bereits von Heer (1998) indirekt für gesunde prämenopausale Frauen beschrieben wurde. Er beobachtete fallende VEGF 165 Serumlevel bei steigender systemischer Progesteronkonzentration unter konstanten Estrogenspiegeln. Außerdem fand sich bei seiner Einteilung des Zyklus in luteale und folliculäre Phase ein erhöhtes VEGF165 Serumlevel bei Frauen in der folliculären Phase, sowie eine erhöhte Produktion von VEGF165 von MCF/7 Mammakarzinomzellen, die in Serum kultiviert wurden, welches in der folliculären im Vergleich zur lutealen Phase gewonnen worden war. Diese zyklusabhängige Schwankung von VEGF, welche auch schon von anderen Autoren beschrieben wurde (Benoy et al., 1998; Chung et al., 1998), könnte Hinweise auf die hormonelle Regulation der Tumorangienese geben.

Ein Modell wäre: steigende Progesteronspiegel bewirken einen Abfall des Serum-VEGF. VEGF gilt als einer der bedeutendsten und potentesten Stimulatoren der Angiogenese und zeigt im Übrigen eine positive Korrelation zur intratumoralen Gefäßdichte (Toi et al., 1995), könnte also den hier beobachteten niedrigeren Mittelwert der Gefäßdichte im dritten Zyklusdrittel im Vergleich zum zweiten erklären. Unklar bliebe bei diesem Modell, warum sich signifikante Unterschiede nicht auch zwischen erstem und dritten Zyklusdrittel finden lassen, da man ja in Bezug auf das Progesteron von ähnlichen oder sogar noch ausgeprägteren hormonellen Unterschieden als zwischen Drittel zwei und drei ausgehen kann. Des Weiteren bleibt hier die Frage nach der Übertragbarkeit von VEGF-Serumlevelschwankungen von gesunden Probandinnen auf Patientinnen mit Mammakarzinom offen, obwohl sich auch die VEGF Produktion der MCF/7-Zelllinie in vitro hormonell regulieren ließ, wobei zwischen Hormonen und VEGF dabei ähnliche Zusammenhänge zu bestehen scheinen wie bei den in vivo Messungen.

Aber nicht nur ein antiangiogener sondern auch ein stimulatorischer Effekt von Progesteron auf die Tumorangienese scheint nach den Ergebnissen verschiedener Studien durchaus möglich. Sowohl der stimulatorische Einfluss

von Progesteron auf die Expression des Gefäßwachstumsfaktors TGF- $\beta$  und von Progesteron zusammen mit TGF- $\beta$  auf die Expression des PD-ECGF im Verlauf des Menstruationszyklus (Zhang et al., 1997), als auch die Ergebnisse einer in vitro Studie, die eine Stimulation der VEGF-Produktion von T47D-Zellen durch Progesteron nachweisen konnte, deuten in diese Richtung. Dieser Effekt war sowohl hormon- als auch zellspezifisch. D.h. er war weder beim Einsatz von nicht-Progestinen noch bei Verwendung anderer Mammakarzinomzelllinien zu sehen. Bemerkenswert war in diesem Zusammenhang der hohe Anteil von PR positiven Zellen, wie er bei T47D Zellen im Vergleich zu den anderen, nicht durch Progesteron stimulierbaren Zelllinien zu finden ist. Dieser schien die angiogene Wirkung von Progesteron nachhaltig zu beeinflussen (Hyder et al., 1998). Eine parallel zur Stimulation der VEGF-Produktion aufgetretene Hemmung der Zellproliferation durch Progesteron gab Anlass zu einer weiteren Theorie: Nicht das Hormon selbst sondern der von ihm verursachte hemmende Effekt auf das Tumorwachstum könnte indirekt die VEGF Ausschüttung des Tumors, als eine Art Gegenreaktion auslösen. Ein Vorgang, der sich auch schon bei minderperfundierten hypoxischen Tumorarealen beobachten ließ, welche auf diesen Zustand mit einer verstärkten VEGF-Synthese reagierten. Beim Betrachten der zyklusabhängigen Konzentrationsschwankungen von Progesteron und Estrogen in Bezug auf die hier gefundenen signifikanten Unterschiede der Gefäßdichten fällt auf, daß Mammakarzinome mit der höchsten Mikrogefäßdichte in genau der Phase des Zyklus – dem mittleren Drittel - entnommen wurden, welcher auch mit den höchsten systemischen Estrogenkonzentrationen (periovulatorischer Estrogenpeak) einhergeht. Auch die Ergebnisse diverser Studien lassen auf Estrogen als einen wichtigen Stimulator der Angiogenese beim Mammakarzinom schließen. So konnte bei in Mäusen eingepflanzten ER positiven MCF10AT1-Zellen, die dem histologischen Stadium einer PBD (Proliferative Breast Disease) entsprechen, durch Estrogenbehandlung sowohl Progression der Zellen zu maligneren Stadien als auch eine verstärkte Neovaskularisation des eingesetzten Gewebes erzielt werden (Shekhar et al., 1998). Im karzinogen-induzierten, hormonabhängigen Mammatumor der Ratte fand sich nach Estrogenexposition eine verstärkte

Expression von VEGFmRNA sowie eine erhöhte Produktion des VEGF-Proteins (Nakamura et al., 1996) und auch an anderer Stelle wurde eine Erhöhung der Transkriptionsrate und der VEGF-mRNA-Stabilität durch Östrogene und Androgene beschrieben (Ruohola et al., 1999). Ein weiterer Hinweis auf eine potentielle Stimulation der Angiogenese durch Estrogen tauchte bei Untersuchungen zur Auswirkung verschiedener Hormonsubstitutionstherapien auf die VEGF-Serumlevel der behandelten Patientinnen auf. Estrogen schien der stärkste Stimulus für ein Ansteigen der systemischen VEGF-Konzentration zu sein (Agrawal et al., 2000), was mit der schon mehrfach beschriebenen Steigerung des Erkrankungsrisikos für ein Mammakarzinom durch östrogenhaltige Hormonersatztherapien ( Colditz, 1999; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators, 2002) in Zusammenhang stehen könnte. Auch die Senkung der Inzidenz der Erkrankung bei Hochrisikopatientinnen durch Tamoxifen (Dunn et al., 1998) und der therapeutische antiangiogene Effekt dieses Antiöstrogens, der sowohl im Nacktmausmodell (Tanaka et al., 1991; Haran et al., 1994), als auch bei Mammakarzinompatientinnen (Makris et al., 1998; Marson et al., 2001) in vivo erzielt werden konnte, sprechen für eine Estrogenabhängigkeit der Tumorangiogenese. In Bezug auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie stellt sich jedoch, wie schon zuvor beim Progesteron die Frage, warum nicht auch zwischen erstem und mittlerem Zyklusdrittel unterschiedliche Gefäßdichten zu finden waren, obwohl die Differenz der Estrogenkonzentrationen zwischen Drittel eins und zwei erheblich größer als zwischen zwei und drei sein müsste. Dieser scheinbare Widerspruch lässt sich am ehesten dadurch erklären, das nicht ein Hormon allein, sondern die Kombination von Progesteron, Estrogen und vermutlich noch anderen endokrinen Faktoren den angiogenen Phänotyp des Tumors steuert. Es wäre z.B. eine Stimulation der Angiogenese im mittleren Zyklusdrittel durch den Estrogenanstieg bei gleichbleibend niedrigem Progesteronspiegel möglich, während die proangiogene Wirkung des immer noch recht hohen Estrogens im letzten Drittel durch zunehmende Konzentrationen von Progesteron antagonisiert werden könnte.

Ein großes Problem bei der Suche nach hormonellen Regulationmechanismen der Tumorangiogenese ergibt sich durch die Tatsache, dass insbesondere für das Zyklushormon Estrogen mehrere Quellen existieren, was Rückschlüsse von systemischen Konzentrationen auf die tatsächliche lokale Hormonexposition von Tumoren, wenn überhaupt, nur bedingt zulässt. Neben zyklusabhängigen Konzentrationsschwankungen, für dessen Einfluss die Ergebnisse der vorliegenden Studie sprechen, und dem postmenopausalen Abfall der systemischen Estrogenkonzentrationen, sind mittlerweile mindestens drei Mechanismen der endogenen Estrogenproduktion bekannt, die mit der Pathogenese von Mammakarzinomen in Zusammenhang stehen könnten. Als Quelle dieser zyklusunabhängigen Hormonproduktion gelten die Fettdepots des Organismus, zu denen natürlich auch das Fettgewebe der Brust zählt. In diesem sind sowohl verschiedene Estrogenspeicher als auch Enzyme zur Freisetzung der biologisch wirksamen Formen des Hormons vorhanden. So finden sich im humanen Fettgewebe z.B. erhebliche Mengen von als Fettsäureester gespeichertem Estrogen, welches durch Hydrolyse freigesetzt werden kann (Hochberg et al., 1991). Ein weiterer Weg der zyklusunabhängigen Estrogenproduktion ist die Umwandlung von Estronsulfat, von dem sich erhöhte systemische Konzentrationen bei Männern und postmenopausalen Frauen nachweisen ließen. Die Anwesenheit des zur Freisetzung nötigen Enzyms Sulfatase in Mammakarzinomen ließ sich sowohl in vivo (Santner et al., 1943) als auch in vitro (Pasqualini et al., 1992) nachweisen und spricht für einen Zusammenhang zwischen dem auf diesem Weg entstehendem Estrogen und der Erkrankung. Die dritte und postmenopausal wahrscheinlich wichtigste Möglichkeit der fettgebundenen Estrogensynthese, stellt die Metabolisierung von systemischem Androstendion aus dem adrenalen Cortex mit Hilfe der P450 Aromatase dar (Cauley et al., 1999; Bulun et al., 1993). Signifikant erhöhte mRNA-Level dieses Enzyms zeigten sich im Brustfett der Quadranten abladiertes Mammae, in denen sich ein Mammakarzinom befand, im Vergleich zu den nicht befallenen Arealen (Bulun et al., 1993). Eine besonders hohe Aromataseaktivität wird hierbei Tumorzellen epithelialen Ursprungs (Lu et al., 1996) sowie den Stromazellen, verglichen mit

Fettzellen, des Mammagewebes zugeschrieben (Price et al., 1992). Auch erhöhte Konzentrationen des Enzyms selbst konnten direkt im Gewebe von Mammakarzinomen sowie im den Tumor umgebenden Fettgewebe nachgewiesen werden (Blankenstein et al., 1992a/b). Die Frage, ob auf diesem Weg der lokalen Estrogenproduktion ausreichende Mengen des Hormons entstehen, um einen Einfluss auf die Tumorphathogenese zu haben, wird kontrovers diskutiert. Während manche Autoren die entstehenden Konzentrationen im Verhältnis zum Brustfett für zu gering halten, um einen Effekt zu haben (Bradlow, 1982), wurden an anderer Stelle Wirkungen des Estrogens auf Tumorzellen schon bei kleinsten Mengen beobachtet (Aitken und Lippmann, 1982)) und auch der Nachweis von Enzymen zur Umwandlung des im Aromatasemetabolismus entstehenden, relativ schwach wirksamen Estrons in das hochwirksame Östradiol in Mammakarzinomen sprechen dafür, dass sich die lokale Hormonproduktion durchaus auf den Tumor auswirken könnte (Reed et al., 1991). Trotz allem bleibt unklar, ob z.B. die zufällig in bestimmten Arealen der Mamma vorhandene lokale Produktion von Estrogen im Sinne eines Risikofaktors die Entstehung eines Tumors induziert oder erst die Anwesenheit des Tumors über Wachstumsfaktoren die Hormonsynthese stimuliert, was sich gegenseitig nicht ausschließen muß. Auch das Ausmaß und somit die klinische Relevanz - im Hinblick auf den Einsatz von Antiöstrogenen oder Aromatasehemmern - der Effekte sowohl von systemischen als auch lokalen Hormonkonzentrationen im Verhältnis zueinander gilt es noch zu klären, was dadurch erschwert wird, dass sich lokale und systemische Estrogenlevel gegenseitig verfälschen können, z.B. indem systemisches Estrogen im Tumor gespeichert oder aber lokal produziertes Hormon in den Kreislauf ausgeschwemmt wird.

Welcher Anteil der in dieser Studie gezählten Gefäße im Tumor von zyklusbedingten Schwankungen der systemischen Hormonkonzentrationen und welcher durch eben erwähnte vom Tumor selbst produzierte bzw. gespeicherte Hormone zyklusunabhängig bedingt ist, lässt sich aufgrund der bekannten Daten nicht sagen. Auch eine hormonunabhängige Regulation der Angiogenese, wie sie z.B. in Form von Stimulation der VEGF Expression durch

lokale Hypoxie beschrieben wurde, kann schlussendlich nicht ausgeschlossen werden, was den Einfluss des Zyklus auf Tumorgefäße weiter in Frage stellt. In diesem Zusammenhang scheint es umso bemerkenswerter, dass sich bei Betrachtung der hier erhobenen Gefäßparameter, die ja offenbar das Endprodukt einer Kette von komplexen Regulationsmechanismen sind, signifikante Veränderungen im Verlauf des Zyklus zeigen ließen. Gestützt wird dieses Ergebnis auch durch indirekte Messungen der Mammadurchblutung über Veränderungen im MRI Kontrast. Die Einteilung des Zyklus bei diesen Untersuchungen ermöglicht zwar leider keinen Vergleich mit den hier erhobenen Gefäßparametern, es wurden jedoch Veränderungen der Kontrastmittelanreicherung im Verlauf des Zyklus beobachtet (Müller-Schimpfle et al., 1997), die auf eine sich ändernde Gefäßdichte und/oder Permeabilität hinweisen (Buadu et al., 1996). Dies zeigt auf jeden Fall die Wichtigkeit der Beachtung von sich verändernden Hormonprofilen im Verlauf des Menstruationszyklus bei weiterer Erforschung der hormonellen Regulation des angiogenen Phänotyps in Mammakarzinomen.

Die Rolle des Rezeptorstatus bei der Angiogenese im Mammakarzinom blieb bei den meisten Theorien zu diesem Thema bislang unberücksichtigt. Es ist bekannt, daß Estrogen die Expression von ER und auch PR induzieren kann und Progesteron beide Rezeptoren herunterreguliert ( Hulka et al., 1994 ). ER negative Mammatumoren und solche mit hoher Gefäßdichte haben eine schlechte Prognose für das Überleben der Patientin gemeinsam (Weidner, 1998; Bevilacqua et al., 1995; Hansen et al., 2000). Aufgrund der genannten Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Rezeptorstatus bzw. Hormonsensitivität von Mammatumoren und deren Vaskularisierung, war es naheliegend, das Augenmerk auch in der vorliegenden Studie auf diese Thematik zu richten. So fanden sich auch tatsächlich bei der Gruppierung des Kollektivs nach Estrogen- bzw. Progesteronrezeptorstatus signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der erhobenen Gefäßparameter. Sowohl die ER als auch die PR positiven Tumoren wiesen tendenziell höhere Gefäßdichten (Gefäße/mm<sup>2</sup>) sowie signifikant kleinere mittlere Gefäßgrößen (MeanArea) als die rezeptornegativen auf. Bei einer weiteren Unterteilung der

PR positiven in <>50% PR positive Tumoren waren die Mittelwerte der Gefäßdichte und der mittleren Gefäßgröße bei den PR >50% positiven signifikant größer als die der PR negativen. Ferner ergaben sich jeweils signifikant höhere Varianzen der Gefäßdichte für die hormonsensitiven Karzinome. Anhand der vorliegenden Ergebnisse lassen sich also durchaus unterschiedliche Ausprägungen des Gefäßphänotyps der untersuchten Mammakarzinome in Abhängigkeit von der Hormonsensitivität erkennen. Die erhöhte Gefäßdichte in Kombination mit der signifikant kleineren mittleren Gefäßfläche spricht für eine deutliche Ausbildung von Mikrogefäßen in den rezeptorpositiven Tumoren im Gegensatz zu den im Vergleich großvolumigeren Gefäßen der hormoninsensitiven Karzinomen. Daraus lässt sich folgende Hypothese ableiten: Die Hormonsensitivität von Tumoren (ER+/PR+) ist Ausdruck eines hohen Differenzierungsgrades des Gewebes, bei dem die Angiogenese entsprechend den physiologischen Stimuli koordiniert abläuft. Beispiel für einen solchen Stimulus ist die Gewebshypoxie beim Wachstum, welche einen Mangelzustand darstellt und eine vermehrte Vaskularisierung und somit verbesserte Versorgungslage des Gewebes induziert. Die Gefäße haben also nach koordiniertem Ablauf der Neubildung einen physiologischen Aufbau. Im Gegensatz dazu stehen die Gefäße der hormoninsensitiven Tumoren, welche durch tumorspezifische unkoordinierte Angiogenese entstehen. Als Beispiel hierfür lässt sich die Induktion von hypoxieunabhängigen Angiogenesefaktoren durch Onkogene anführen. Diese führt dann zur überstürzten Bildung von dilatierten und mangelhaft ausgereiften Gefäßen, welche zwar in geringerer Anzahl vorhanden sind aber dafür eine größere Fläche (MeanArea) einnehmen. Die hier gefundenen Zusammenhänge zwischen Rezeptorstatus und Gefäßphänotyp könnten also durchaus für eine hormonelle Komponente bei der Regulation der Angiogenese sprechen. Zumindest im Falle der hormonsensitiven Tumoren, wobei sich natürlich nach wie vor die Frage nach den molekularen Mechanismen und dem Ausmaß möglicher rezeptorvermittelter Effekte auf die Tumorangiogenese stellt und die o.g. Regulation der Rezeptorexpression durch die Hormone selbst bedacht werden muss. Die bereits erwähnte, progesteronabhängige Stimulation der

VEGF Produktion bei gleichzeitiger Hemmung der Proliferation einer Mammakarzinomzelllinie mit extrem hoher Expression des Progesteronrezeptors (Hyder et al., 1998) gibt zumindest Hinweise auf eine Beteiligung von VEGF an den rezeptorvermittelten Prozessen. Die Ergebnisse dieser in vitro Studie lassen sich jedoch nur eingeschränkt mit den hier erhobenen Gefäßparametern vergleichen, da die indirekte Methodik der VEGF-Bestimmung der direkten Begutachtung des Endprodukts der Angiogenese in Form der Gefäßparameter gegenübersteht. Und auch das Auftreten des Progesteroneffekts gerade bei der Zelllinie mit den meisten PR positiven Zellen kann den vermuteten Einfluss des Rezeptorstatus zwar untermauern, lässt aber Rückschlüsse auf die Situation in vivo weder in Bezug auf die realen Tumoren noch auf den Einfluss deren PR-Status auf ihre Vaskularisation zu. Denn obwohl man die gefundene signifikant höhere Gefäßdichte und kleinere mittlere Gefäßfläche der PR positiven (>50%) Tumore verglichen mit den negativen in diese Richtung deuten könnte, fehlen dazu exakte Kenntnisse über das hormonelle Milieu unter dessen Einfluss sich das in der vorliegenden Studie untersuchte Gewebe befand. Auch zur Rolle des Estrogenrezeptors bei einer möglichen hormonellen Regulation der Tumorphogenese gibt es bisher wenig Informationen. Es könnten jedoch die in o.g. Studie gefundene, parallele Progression und Neovaskularisation von implantierten, ER positiven MCF10AT1-Zellen (histologisch PBD) durch Estrogen im Mausmodell (Shekhar et al., 1998) auf eine rezeptorvermittelte Steuerung der Angiogenese durch das Zyklushormon hinweisen. Des Weiteren lässt eine bei invasiven duktalem Mammakarzinomen gefundene signifikante negative Korrelation des Estrogenrezeptorstatus mit der Expression des Enzyms Aromatase (Sasano et al., 1996) auch Zusammenhänge zwischen Hormonsensitivität und lokaler Hormonproduktion vermuten, wobei hierbei die am wenigsten differenzierten, rezeptornegativen Tumoren den höchsten lokalen Estrogenkonzentrationen ausgesetzt sein dürften. Dies zeigt wiederum die enorme Komplexität, die sich durch die zahlreichen, anscheinend interagierenden Faktoren ergibt, welche an einer potentiell hormonabhängigen Steuerung der Angiogenese beteiligt sein können. Das Auftreten der genannten negativen Korrelation zwischen

Aromataseexpression und ER-Status bei duktalem nicht jedoch beim invasivem lobulärem Mammakarzinom zeigt auch mögliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Formen der Erkrankung in diesem Zusammenhang, was jedoch erst noch in Studien mit höheren Fallzahlen belegt werden muss.

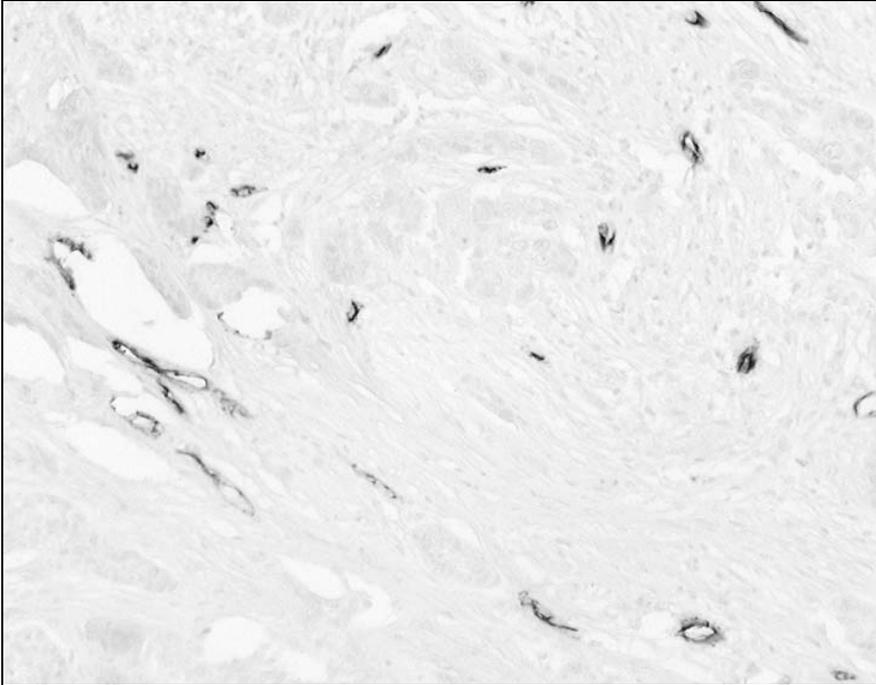
Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Studie auf eine hormonelle bzw. zyklusabhängige Regulation der Angiogenese beim Mammakarzinom hin, in deren Kontext der Hormonsensitivität des Tumors eine nicht unbedeutende Rolle zukommt. Einzelne Abläufe und Wechselwirkungen mit anderen Regulationsmechanismen gilt es noch zu klären. Ziel künftiger Studien muß es also sein, Herkunft und Einfluss der relevanten Steroidhormone auf den komplexen Vorgang der Tumervaskularisation sowie übergeordnete Regulationsmechanismen zu klären. Hierbei sinnvoll wäre die parallele Erhebung sowohl direkter (Gefäßdichte u.a.) als auch indirekter (z.B. VEGF) Gefäßparameter, die Berücksichtigung von lokalen und systemischen Hormonkonzentrationen sowie des Rezeptorstatus (ER/PR) und Typ (duktal/lobulär u.a.) des Tumors. Bei Untersuchungen von eher langfristigen Hormoneffekten, sollten vor allem beim Vergleich von prä- und postmenopausaler Angiogenese zyklusabhängige Veränderungen des angiogenen Phänotyps bedacht werden. Hierbei sollten neben der Mikrogefäßdichte auch Gefäßparameter erhoben werden, die eine Aussage über die Gefäßmorphologie und Reifung zulassen, da diese Parameter möglicherweise den entscheidenden Unterschied zwischen Tumorgefäßen unter verschiedenen Hormonexpositionen ausmachen.

## 5. Zusammenfassung

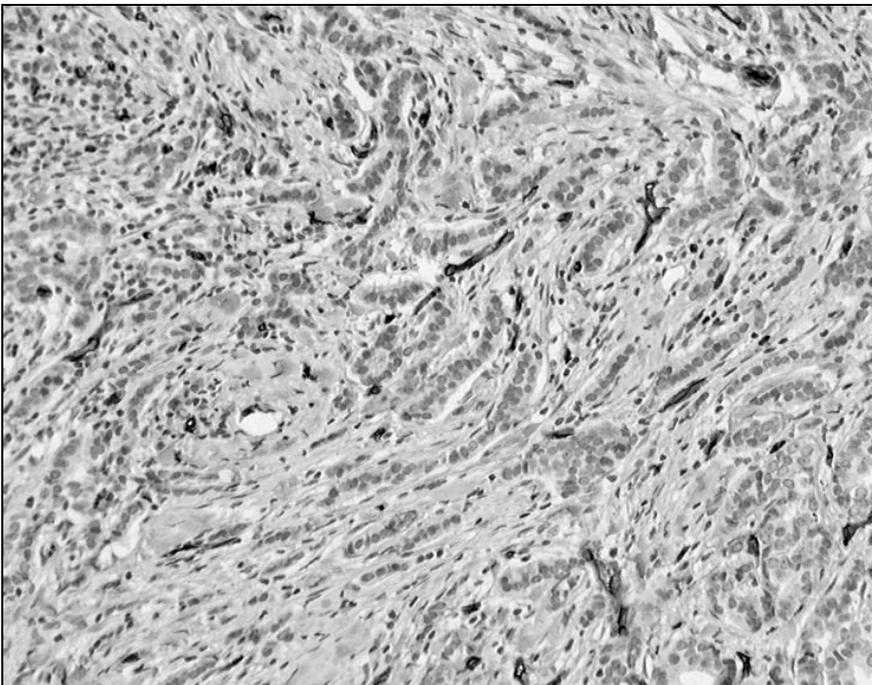
Ziel der Studie war es, Hinweise auf hormonelle Regulationsmechanismen bei der Angiogenese von Mammakarzinomen zu finden. In der vorliegenden Studie wurden formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Mammakarzinompräparate von 50 Patientinnen immunhistochemisch mit dem monoklonalen Endothelantikörper Anti-cd34 untersucht. Die quantitativ-morphometrische Auswertung der Schnittpräparate erfolgte mit einem computer-assistierten Bildanalyse-System. Jeweils im angiogenen „hotspot“ des Tumors wurden folgende Gefäßparameter erhoben: die Gefäßdichte (Gefäße/mm<sup>2</sup>), der prozentuale Anteil der Gefäßfläche am Messareal (Area%) und die mittlere Gefäßfläche (bzw. Größe) der Gefäße jedes Schnittes (MeanArea). Die Patientinnen des Kollektivs wurden zu nach Menopausenstatus, Zyklusverlauf und Hormonrezeptorstatus (ER und PR) des Tumors in verschiedene Gruppen eingeordnet und die Mittelwerte der Gefäßparameter jeder Gruppe miteinander verglichen. Bei der Unterteilung des Kollektivs nach Menopausenstatus, mit und ohne Berücksichtigung der Einnahme von Ovulationshemmern bei den prämenopausalen Patientinnen, ergaben sich in Bezug auf die Gefäßparameter keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Betrachtung der Gefäßparameter im Verlauf des menstruellen Zyklus erfolgte basierend auf einer Einordnung der prämenopausalen Patientinnen in erstes, zweites und drittes Zyklusdrittel. Es ließ sich im Verlauf des Zyklus eine signifikante Abnahme der Gefäßdichte (Gefäße/mm<sup>2</sup>) bei konstanter mittlerer Gefäßgröße (MeanArea) beobachten, was auf eine verminderte Tumovaskularisierung in der lutealen Phase hinweisen könnte. Die eindrucksvollsten Unterschiede waren allerdings beim Vergleich der Gefäßphänotypen von hormonsensitiven und –insensitiven Tumoren zu sehen. Die ER positiven Tumoren wiesen eine höhere Gefäßdichte (Gefäße/mm<sup>2</sup>) mit signifikant kleinerer mittlerer Gefäßgröße (MeanArea) auf, sodass daraus auch insgesamt eine kleinere durch Gefäße eingenommene Fläche (Area%) resultiert. Bei Einteilung nach PR-Status zeigt sich dieser Trend noch deutlicher. Mit steigender Expression von Progesteronrezeptoren steigt die Anzahl kleiner Gefäße (Anstieg der

Gefäßdichte und Abfall der MeanArea), was sich wiederum in einer kleiner werdenden Gesamtfläche der Gefäße (Area%) äußert. Die beobachteten Schwankungen des Gefäßphänotyps in Abhängigkeit von der Hormonsensitivität der untersuchten Mammakarzinome lassen Unterschiede bei der Angiogenese vermuten, die eventuell mit dem Differenzierungsgrad des Tumors zusammenhängen könnten. Insgesamt sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Studie für hormonelle Komponenten bei der Regulation der Angiogenese und/oder der Gefäßmorphologie/Reifung beim Mammakarzinom.

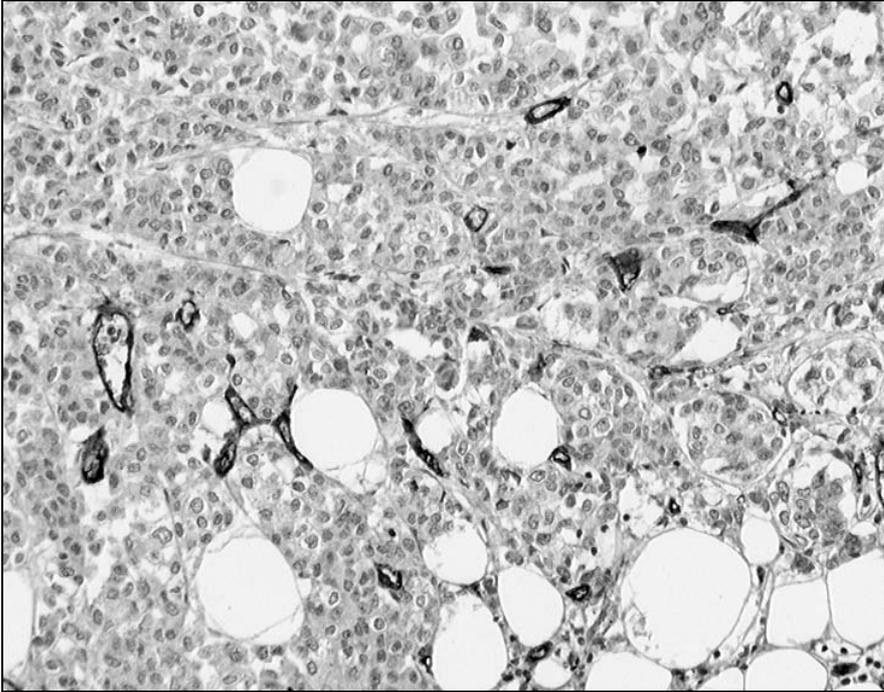
## 6. Abbildungen und Tabellen



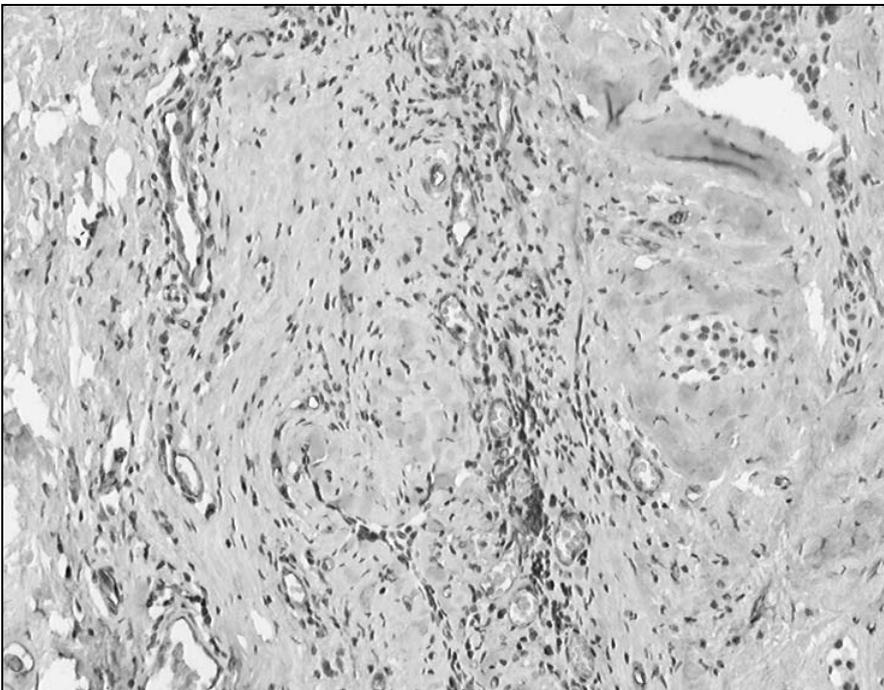
**Abb. 4a)** CD 34 Färbung eines ER und PR negativen Mammakarzinoms mit geringer Gefäßdichte und großer mittlerer Gefäßfläche (Mean Area).



**Abb. 4b)** Ausschnitt eines Tumors mit positivem ER/PR-Status (PR > 50%) mit großer Gefäßdichte und kleiner mittlerer Gefäßfläche (Mean Area).



**Abb. 4c)** Tumor einer Patientin, die sich zum Zeitpunkt der Operation im letzten Drittel des Menstruationszyklus befand. Die Gefäßdichte ist gering.



**Abb. 4d)** Mammakarzinom, das im mittleren Drittel des Zyklus operiert wurde mit hoher Gefäßdichte.

## Legende zu den Tabellen 1-4:

Nr	Patientennummer
Alter	Alter der Patientin zum Zeitpunkt der OP
M-St.	Menopausenstatus
Prä/Post= Prämeno/Postmeno	Prä-/ Postmenopausal
Histo.	Histologie
Duk/ lob	duktales/ lobuläres Mammakarzinom
med/ tub	medulläres/ tubuläres Mammakarzinom
OP(WE/PE)	Operation (Wide Excision/Probeexzision)
NR/SR	Nachresektion/Segmentresektion
AB/ME	Ablatio/Mastektomie
LP	Letzte Periode
DZ (DB)/d	Dauer des Zyklus( der Blutung) in Tagen
FSH (miu/ml)	Follikelstimulierendes Hormon (microunits/ml)
Estrog. (pg/ml)	Estrogen (picogramm/ml Serum)
Prog. (ng/ml)	Progesteron (nanogramm/ml Serum)
LK neg./ pos.	Untersuchte negative/positive Lymphknoten
TNM	TNM Stadium
G	Grading
ER/PR-Rs	Estrogen/ Progesteron Rezeptorstatus
ER/PR Neg./Pos	Estrogen-/Progesteronrezeptor Negativ/Positiv
ER%/PR%	Prozent der ER/PR positiven Tumorzellen
Hormondiagnose	Prozent des bereits verstrichenen Zyklus
HST	Hormonsubstitutionstherapie
Pille	Einnahme eines Ovulationshemmers
Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Gesamtfläche der je Schnitt gezählten Gefäße
Areafield ( $\mu\text{m}^2$ )	Fläche des Feldes, in dem gezählt wurde
Marea=MeanArea	mittlere Größe der Gefäßfläche eines Gefäßes
Area%	Anteil der Gefäßfläche an der Messfläche
Gefäße (x/mm <sup>2</sup> )	Gefäßdichte im Gefäßhotspot des Tumors
Std Dev	Standardabweichung/ Standard Deviation
Std Err Mean	Standardfehler/ Standard Error of Mean

**Tabelle 1a) Übersicht der anamnestischen Daten des Kollektivs**

Nr.	Alter M-St.	Histo.	OP-Datum	OP LP Datum	LP Jahr	DZ/d	DB/d	FSH (miu/ml)	Estrog. Prog. (pg/m)	TU (ng/ml)	Lk neg.	Lk pos.	pT	pN	M	G	ER-Rs.	ER %	PR-Rs	PR %	
1	63	Post duk	09.04.99	WE	1985	28	6	103	6.7	0.1	13	20	0	1c	0	2	N			N	
2	64	Post duk	30.08.99	PE	1989	29	6			20			1c	0	0	2	P	90		P 10	
3	62	Post lob	12.08.99	PE	1995		6.5	1.9	105	0.1	12	21	0	1c	0	0	2	P	100		P 100
4	67	Post lob	12.10.99	PE	1977			43	33	0.1	27	30	0	2	x	2	P	100			P 100
5	79	Post tub	12.08.99	PE	1969			35	5.9	0.1	9		1b	x	1	P	100				P 90
6	71	Post lob	21.10.99	WE	1970	29	6	58	5.3	0.2	7	14	7	1b	1biii	2	P	50			P 50
7	73	Post duk	04.10.99	PE	1965			64	4.9	0.1	25		3	2	3	P	100				P >80
8	81	Post lob	30.09.99	PE	1967			50	11	0.3	35	27	1	2	1biii	0	2	P	50		P 50
9	59	Post duk	18.11.99	PE	1997					18			1c	x	2	N					N
10	71	Post duk	22.04.99	PE	1959	28	5	98	0.1	0.1	10	16	0	1b	0	2	P	>80			P 60
11	64	Post duk	11.08.99	WE	1978			79	35	0.1	9	15	1	1b	1bi	2	P	90			P <5
12	88	Post lob	27.09.99	AB	1961			79	2.2	0.1	22		2	x	1	2	N				P 10
13	61	Post lob	17.09.99	ME	1989			63	7.9	0.1	58	23	11	3	1biii	3	N				N

**Tabelle 1b) Übersicht der anamnestischen Daten des Kollektivs**

Nr.	Alter	M-St.	Histo.	OP- Datum	OP Datum	LP Datum	LP Jahr	DZ/d	DB/d	FSH (miu/ml)	Estrog. (pg/ml)	Prog. (ng/ml)	TU (mm)	Lk neg.	Lk pos.	pT	pN	M	G	ER- Rs.	ER %	PR- Rs	PR %
14	63	Post	duk	02.03.99	ME	1985		40	8.4	0.1	25	8	0	4a	0	0	3	0	0	3	N		N
15	62	Post	lob	09.10.99	PE	1984	27	5.5	28	24	0.1	80	23	1	3	1biii	2	2	2	P	100	P	40
16	64	Post	duk	17.02.99	AB	1977	28	6	32	16	0.1	25	18	4	2	1bii				P	<80	P	10
17	69	Post	duklob	03.02.99	AB			81	16	0.1	30	14	0	2	0	0	2	2	2	P	80	P	40
18	58	Post	duk	01.04.99	PE	1989		170	2.6	0.2	12	19	3	1c	1bi	2	2	2	P	40	P	40	40
19	56	Post	duk	16.04.99	NR	1989	27	10	92	5.7	0.1	9	13	0	1b	0	1	1	1	P	<80	N	N
20	65	Post	duk	24.03.99	AB	1987	25	45	36	0.2	60			4	x	0	2	0	2	N		N	N
21	75	Post	duk	16.03.99	SR	1969	27	4	53	2.1	0.1	13	17	0	1c	0	0	3	0	3	N		N
22	84	Post	duk	03.03.99	PE			49	3.8	0.1	7	8	0	1b	0	2	2	2	P	80	P	60	60
23	65	Post	lob	27.07.99	PE	1983		44	11	0.2	18	15	0	1c	0	0	2	2	2	P	90	P	80
24	80	Post	duklob	12.04.99	AB	1961	28	3.5	49	21	0.2	50	16	0	3	0	0	2	2	P	90	P	<10
25	60	Post	duk	31.08.99	PE	1996	28	5	83	3.4	0.2	18	18	0	1c	0	0	2	2	P	40	P	60

**Tabelle 1c) Übersicht der anamnestischen Daten des Kollektivs**

Nr.	Alter	M-St.	Histo.	OP-Datum	OP	LP-Datum	LP	Jahr	DB/d	FSH (miu/ml)	Estrog. (pg/ml)	Prog. TU (ng/ml)	Lk neg. pos.	Lk	pT	pN	M	G	ER-Rs. %	ER-Rs. %	PR-Rs	PR %	
26	36	Prä	duk	30.06.99	NR	09. Jun	1999	28	4.7	81	10	6	13	0	1b	0	0	2	P			P	
27	35	Prä	med	25.10.99	SR	20. Okt	1999	28	4.5	13	26	0.1	22	21	0	2	0	3	N			N	
28	36	Prä	duk	15.06.99	WE	07. Apr	1999	28	3	5,9	5.9	0.1	11	18	0	1c	0	2	P	95	P	90	
29	34	Prä	med	29.03.99	WE	12. Mrz	1999	28	5	2.2	6.5	0.2	53	19	0	3	0	2	N			N	
30	39	Prä	duk	02.08.99	PE	10. Jul	1999	28	3	11	30	1,1	17	29	0	1c	0	2	P	60		N	
31	37	Prä	med	07.07.99	PE	14. Jun	1999	30	7	3.9	30	5.7	16	17	0	1c	0	2	N			N	
32	38	Prä	duk	26.10.98	PE	23. Okt	1998		11	12	12	0.1	17	38	0	1c	0	2	N			N	
33	37	Prä	duk	26.04.99	PE	05. Apr	1999	31	4.5	4.7	96	19	26	20	1	2	1bii	0	2	P	60	P	20
34	38	Prä	med	26.01.99	WE	18. Jan	1999	21	5	7.2	169	0.1	23	11	0	2	0	1	2	P	60	P	60
35	32	Prä	lob	30.07.99	AB	05. Mai	1999	28	5	0.1	807	26	30	39	0	2	1biv	2	P	80	P	10	
36	37	Prä	duk	03.03.99	PE	10. Feb	1999	27	4	8.1	89	12	8	23	0	1b	0	0	2	P	80	P	80
37	39	Prä	duklob	20.05.99	PE	23. Apr	1999	28	4.5	3.3	104	9.7	20	12	2	2	1bi	0	2	P	90	P	40
38	31	Prä	med	08.03.99	WE	Anfang	1999	28	3	1.1	24	0.1	23	21	0	2	0	0	2	P	60	P	30

**Tabelle 1d) Übersicht der anamnestischen Daten des Kollektivs**

Nr.	Alter	M-St.	Histo	OP-Datum	OP LP	LP Datum	LP Jahr	DZ/d	DB/d	FSH (miu/ml)	Estrog. Prog. (pg/ml)	TU (ng/ml)	Lk neg.	TU Lk pos.	Lk neg.	pT	pN	M	G	ER-Rs. %	ER-Rs. %	PR-Rs. %	
39	36	prä	duk	07.07.99	WE	27. Jun	1999	28	4.5	6.1	145	0.3	23	18	0	2	0	0	2	P	60	P	80
40	35	prä	duk	15.07.99	PE	01. Jul	1999	28	6	10	32	6.2	10	39	1	1b	1biii	0	2	N		N	
41	38	prä	lob	30.09.99	PE	20. Sep	1999	28	4.5	7.9	118	4.3	8	19	0	1b	0	1	2	N		N	
42	27	post	duk	06.08.99	AB	26. Jul	1999		89	3.5	0.1	35	5	5	2	1biv	1	2	N		N		
43	36	prä	duk	22.06.99	PE	29. Mai	1999	36	5	4.1	44	12	15	16	0	1c	0	0	2	N		N	
44	38	prä	lob	30.03.99	PE	23. Mrz	1999	29	7	6.1	32	0.3	19			1c	0	3	N		N		
45	35	prä	duk	03.06.98	PE	27. Mrz	1998	28	5.5	4.8	168	30				1a	0	0	2	N		N	
46	37	prä	duk	14.10.98	WE	14. Sep	1998	28	7.5	2.6	89	3.6	12			1b	x	0	2	P	90	P	70
47	38	prä	lob	08.03.00	WE	16. Feb	2000	28	7	2.4	111	11	8	21	3	1c	1bi	0	2	P	80	P	60
48	33	post	lob	08.05.00	SR	Nov	1999	28	7	39	37	0.3	15	17	3	1c	1biivy	1	2,5	P	100	P	30
49	40	prä	duk	14.07.00	PE	12. Jul	2000	27	3.5	6.2	25	0.4	12	24	9	1c	1biii	2	P	80	P	40	
50	56	post	duk	30.09.99	PE	18. Sep	1999	28	5	45	18	0.1	8	19	0	1b	0	0	2	N		N	

**Tabelle 2a) Übersicht der erhobenen Gefäßparameter**

Nr.	Hormon- diagnose	M-St.	ER-Rs	ER %	PR-Rs	PR %	Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Areafield ( $\mu\text{m}^2$ )	Marea ( $\mu\text{m}^2$ )	Area%	Gefäße ( $\times/\text{mm}^2$ )
1		post	N		N		12537,08	7,18E+05	227,95	1,75	77
2		post	P	90	P	10	11037,33	6,76E+05	141,5	1,63	115
3	HST	post	P	100	P	100	13998,84	7,19E+05	69,65	1,95	279
4		post	P	100	P	100	6888,01	7,23E+05	82,99	0,95	115
5		post	P	100	P	90	20821,83	6,15E+05	63,87	3,39	530
6		post	P	50	P	50	18279,65	4,30E+05	99,35	4,25	428
7		post	P	100	P	>80	12643	7,19E+05	108,99	1,76	161
8		post	P	50	P	50	8416,25	7,29E+05	74,48	1,15	155
9		post	N		N		5487,62	4,72E+05	91,46	1,16	127
10		post	P	>80	P	60	23816,21	6,69E+05	110,26	3,56	323
11		post	P	90	P	<5	19315,51	6,45E+05	101,7	2,99	294
12		post	N		P	10	22100,96	7,09E+05	159	3,12	196
13		post	N		N		14196,07	7,04E+05	110,1	2,02	183

**Tabelle 2b) Übersicht der erhobenen Gefäßparameter**

Nr.	Hormon- diagnose	M-St.	ER- Rs	ER %	PR-Rs	PR %	Area (µm²)	Areafield (µm²)	Marea (µm²)	Area%	Gefäße (x/mm²)
14	post	N	N		N		21607,14	7,15E+05	184,7	3,02	164
15	post	P	P	100	P	40	4405	6,75E+05	48,41	0,65	135
16	post	P	P	<80	P	10	21039,53	5,97E+05	214,7	3,52	164
17	post	P	P	80	P	40	13146,33	7,13E+05	120,6	1,84	153
18	post	P	P	40	P	40	16457,74	7,06E+05	163	2,33	143
19	post	P	P	<80	N		30135,15	7,21E+05	213,7	4,18	196
20	post	N	N		N		20924,84	7,44E+05	193,8	2,81	145
21	post	N	N		N		11767,12	6,96E+05	147,1	1,69	115
22	post	P	P	80	P	60	17215,29	7,20E+05	90,61	2,39	264
23	post	P	P	90	P	80	20878,08	6,93E+05	175,5	3,01	172
24	post	P	P	90	P	<10	14843,31	6,85E+05	151,5	2,17	143
25	post	P	P	40	P	60	15108,49	7,23E+05	84,88	2,09	246

**Tabelle 2c) Übersicht der erhobenen Gefäßparameter**

Nr.	Hormon- diagnose	M-St.	ER-Rs	ER %	PR-Rs	PR %	Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Areafield ( $\mu\text{m}^2$ )	Marea ( $\mu\text{m}^2$ )	Area%	Gefäße (x/mm <sup>2</sup> )
26	79	prä	P	P	P		9624,52	6,95E+05	82,26	1,39	168
27	21	prä	N	N	N		9259,26	7,33E+05	72,91	1,26	173
28	Pille	prä	P	95	P	90	10685,96	7,24E+05	100,8	1,47	146
29	Pille	prä	N	N	N		20211,85	7,10E+05	152	2,84	187
30	86	prä	P	60	N		11255,03	7,23E+05	107,2	1,56	145
31	80	prä	N	N	N		34949,24	6,94E+05	264,8	5,04	190
32	Pille	prä	N	N	N		13308,5	7,25E+05	162,3	1,83	113
33	71	prä	P	60	P	20	13461,18	7,36E+05	133,3	1,83	137
34	43	prä	P	60	P	60	13345,76	7,33E+05	125,9	1,82	145
35	11	prä	P	80	P	10	37218,22	7,28E+05	123,7	5,11	414
36	79	prä	P	80	P	80	20046,76	7,22E+05	171,3	2,78	162
37	100	prä	P	90	P	40	15811,97	7,39E+05	141,2	2,14	152
38	Pille	prä	P	60	P	30	17846,45	7,42E+05	69,44	2,41	347

**Tabelle 2d) Übersicht der erhobenen Gefäßparameter**

Nr.	Hormon- diagnose	M-St.	ER- Rs	ER %	PR-Rs	PR %	Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Areafield ( $\mu\text{m}^2$ )	Marea ( $\mu\text{m}^2$ )	Area%	Gefäße ( $\times/\text{mm}^2$ )
39	36	prä	P	60	P	80	21989,93	7,08E+05	99,5	3,11	312
40	54	prä	N		N		15546,06	7,00E+05	88,33	2,22	251
41	39	prä	N		N		15237,79	7,14E+05	84,19	2,13	253
42		post	N		N		15669,52	7,03E+05	156,7	2,23	142
43	69	prä	N		N		16430,72	6,09E+05	119,9	2,7	225
44	28	prä	N		N		26228,37	6,85E+05	224,2	3,83	171
45	46	prä	N		N		27172,92	4,51E+05	224,6	6,03	268
46	11	prä	P	90	P	70	14841,85	7,01E+05	86,79	2,12	244
47	75	prä	P	80	P	60	9740,67	7,40E+05	77,31	1,32	170
48		post	P	100	P	30	16541,02	6,84E+05	102,1	2,42	237
49	11	prä	P	80	P	40	16629,42	7,33E+05	111,6	2,27	203
50		post	N		N		10826,21	6,99E+05	164	1,55	94

**Tabella 3) Minima, Maxima und Mittelwerte der erhobenen Gefäßparameter des gesamten Kollektivs**

Gefäßparameter	Minimum	Maximum	Mittelwert
Gefäße (x/mm <sup>2</sup> )	77	530	201,44
MeanArea(µm <sup>2</sup> )	48,41	264,77	133,59
Area%	0,65	6,03	2,53

**Tabelle 4) Mittelwerte, Standardabweichung und -fehler, der erhobenen Gefäßparameter in den nach Menopausenstatus, Zyklus und Hormonsensitivität gebildeten Untergruppen des Kollektivs**

Gefäßparameter	ER Neg. (n=19)	ER Pos. (n=30)	PR Neg. (n=20)	PR Pos. (n=29)	PR Pos. <50% (n=14)	PR Pos. >50% (n=15)	Prämeno gesamt (n=22)	Prämeno mit Pille (n=4)	Prämeno ohne Pille (n=18)	Postmeno (n=27)	Zyklus <33% (n=5)	Zyklus >33<66% (n=5)	Zyklus >66% (n=8)
Area%	2,56	2,36	2,56	2,3529	2,46	2,345	2,6005	2,1375	2,7033	2,35667	2,92	3,06	2,35
Std Dev	1,27	1,01	1,31	0,97367	1,03	0,976	1,3074	0,6077	1,4088	0,95009	1,54	1,73	1,22
Std Err Mean	0,29	0,18	0,29	0,17488	0,28	0,252	0,2787	0,3039	0,3321	0,18284	0,69	0,77	0,43
Gefäße/mm <sup>2</sup>	171	218,688	169	221,065	202	238,2	208	198,25	210,17	193,222	241	246	169
Std Dev	53,5	101,762	52,4	102,537	90	117,9	75,328	103,68	71,309	102,117	101	61,5	28,1
Std Err Mean	12,3	17,989	11,7	18,416	24,1	30,45	16,06	51,842	16,808	19,652	45,2	27,5	9,92
MeanArea (µm <sup>2</sup> )	87,3	113,997	87,3	112,451	83	75,75	82,336	78,388	83,213	82,7219	81,5	74,9	89,5
Std Dev	15,3	40,8991	14,9	38,2165	13,9	12,09	13,419	7,2443	14,447	15,3784	15,4	5,66	16
Std Err Mean	3,51	7,23	3,33	6,864	3,72	3,12	2,861	3,6221	3,4051	2,9596	6,89	2,53	5,67

## 7. Literaturverzeichnis

Agrawal, R., Prelevic, G., Conway, G.S., Payne, N.N., Ginsburg, J., Jacobs, H.S. (2000) Serum vascular endothelial growth factor concentrations in postmenopausal women: the effect of hormone replacement therapy. *Fertility and Sterility* 73, 56-60

Aitken, S.C., Lippman, M.E. (1982) Steroid receptors in breast cancer. *Arch. Intern. Med.* 142, 363-366

Algire, G.H., Chalkley, H.W. (1945) Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J. Natl. Cancer Inst. USA* 6, 73-85

Axelsson, K., Ljung, B.M., Moore, D.H. 2<sup>nd</sup>, Thor, A.D., Chew, K.L., Edgerton, S.M., Smith, H.S., Mayall, B.H. (1995) Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 997-1008

Balsari, A., Maier, J.A., Colnaghi, M.I., Menard, S. (1999) Correlation between tumor vascularity, vascular endothelial growth factor production by tumor cells, serum vascular endothelial growth factor levels, and serum angiogenic activity in patients with breast carcinoma. *Lab. Invest.* 79, 897-902

Benoy, I., Vermeulen, P., Wuyts, H., Dirix, L. (1998) Vascular endothelial growth factor (VEGF) serum concentrations change according to the phase of the menstrual cycle. *Eur. J. Cancer* 34, 1298-1299

Bevilacqua, P., Barbareschi, M., Verderio, P., Boracchi, P., Caffo, O., Dalla Palma, P., Meli, S., Weidner, N., Gasparini, G. (1995) Prognostic value of intratumoral microvessel density, a measure of tumor angiogenesis, in node-negative breast carcinoma--results of a multiparametric study. *Breast Cancer Res. Treat.* 36, 205-217

Blankenstein, M.A., Maitimu-Smeele, I., Donker, G.H., Daroszewski, J., Milewicz, A., Thijssen, J.H. (1992a) On the significance of in situ production of oestrogens in human breast cancer tissue. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 41, 891-896

Blankenstein, M.A., Maitimu-Smeele, I., Donker, G.H., Daroszewski, J., Milewicz, A., Thijssen, J.H. (1992b) Tissue androgens and the endocrine autonomy of breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43, 167-171

Boehm, T., Folkman, J., Browder, T., O'Reilly, M.S. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390, 404-407

Bouck, N., Stellmach, V., Hsu, S.C. (1996) How tumors become angiogenic. *Adv. Cancer Res.* 69, 135-174

Bradlow, H.L. (1982) The re-assessment of the role of breast tumor aromatization. *Cancer Res.* 42, 33825

Brem, H., Folkman, J. (1975) Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage. *J. Exp. Med.* 141, 427-439

Buadu, L.D., Murakami, J., Murayama, S., Hashiguchi, N., Sakai, S., Masuda, K., Toyoshima, S., Kuroki, S., Ohno, S. (1996) Breast lesions: correlation of contrast medium enhancement patterns on MR images with histopathologic findings and tumor angiogenesis. *Radiology* 200, 639-649

Bulun, S.E., Price, T.M., Aitken, J., Mahendroo, M.S., Simpson, E.R. (1993) A link between Breast Cancer and Local Estrogen Biosynthesis Suggested by Quantification of Breast Adipose Tissue Aromatase Cytochrome P450 Transcripts Using Competitive Polymerase Chain Reaction after Reverse Transcription. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 1622-1628

Carmeliet, P., Rakesh, K.J. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257

Carmeliet, P. (1999) Controlling the cellular brakes. *Nature* 401, 657-658

Cauley, J.A., Lucas, F.L., Kuller, L.H., Stone, K., Browner, W., Cummings, S.R. (1999) Elevated serum estradiol and testosterone concentrations are associated with a high risk for breast cancer. *Ann. Intern. Med.* 130, 270-277

Chung, H.C., Rha, S.Y., Ahn, J.B., Shim, K.Y., Yoo, N.C., Kim, J.H., Roh, J.K., Lee, K.S., Min, J.S., Kim, B.S., Kim, J.J. (1998) Menstrual state should be considered in determining sero-positivity of soluble angiogenic factors in breast cancer. *Int. J. Mol. Med.* 2, 465-470

Colditz, G.A. (1999) Hormones and breast cancer: evidence and implications for consideration of risks and benefits of hormone replacement therapy. *J. Womens Health* 8, 347-357

Connolly, D.T. (1991) Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *J. Cell. Biochem.* 47, 219-223

De Jong, J., van Diest, P.J., Baak, J.P.A. (1995) Heterogeneity and reproducibility of microvessel counts in breast cancer. *Lab. Invest.* 73, 922-926

Dickson, R.B. (1992) Regulation of tumor-host interactions in breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 41, 389-400

Dunn, B.K., Kramer, B.S., Ford, L.G. (1998) Phase III, large-scale chemoprevention trials. Approach to chemoprevention clinical trials and phase III clinical trial of tamoxifen as a chemopreventive for breast cancer--the US

National Cancer Institute experience. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 12, 1019-1036

Fang, W., Hartmann, N., Chow, D.T., Riegel, A.T., Wellstein, A. (1992) Pleiotrophin stimulates fibroblasts and endothelial and epithelial cells and is expressed in human cancer. *J. Biol. Chem.* 267, 25889-25897

Ferrara, N., Henzel, W.J. (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 851-858

Folkman, J., Watson, K., Ingber, D., Hanahan, D. (1989) Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339, 58-61

Folkman, J. (1994) Angiogenesis and breast cancer. *J. clin. Onc.* 12, 441-443

Folkman, J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.* 1, 27-30

Folkman, J. (1971) Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285, 1182-1186

Folkman, J. (1990) What's the evidence that tumors angiogenesis dependent? *J. Natl. Canc. Inst.* 82, 4-6

Fukumura, D. (1998) Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 94, 715-725

Gasparini, G., Toi, M., Gion, M., Verderio, P., Dittadi, R., Hanatani, M., Matsubara, I., Vinante, O., Bonoldi, E., Boracchi, P., Gatti, C., Suzuki, H., Tominaga, T. (1997) Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 139-147

Goldman, E. (1907) The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* 2, 1236-1240

Greb, R.R., Maier, I., Wallwiener, D., Kiesel, L. (1999) Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) mRNA expression levels decrease after menopause in normal breast tissue but not in breast cancer lesions. *Br. J. Cancer* 81, 225-231

Gross, J.L., Herblin, W.F., Dusak, B.A., Czerniak, P., Diamond, M.D., Sun, T., Eidsvoog, K., Dexter, D.L., Yayon, A. (1993) Effects of modulation of basic fibroblast growth factor on tumor growth in vivo. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 121-131

Hall, N.R., Fish, D.E., Hunt, N., Goldin, R.D., Guillou, P.J., Monson, J.R. (1992) Is the relationship between angiogenesis and metastasis in breast cancer real? *Surg. Oncol.* 1, 223-229

Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70

Hansen, S., Grabau, D.A., Sorensen, F.B., Bak, M., Vach, W., Rose, C. (2000) The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 6, 139-146

Haran, E.F., Maratzek, A.F., Goldberg, I., Horowitz, A., Degani, H. (1994) Tamoxifen enhances cell death in implanted MCF7 breast cancer by inhibiting endothelium growth. *Cancer Res.* 54, 5511-5514

Heer, K., Kumar, H., Speirs, V., Greenman, J., Drew, P.J., Fox, J.N., Carleton, P.J., Monson, J.R.T., Kerin, M.J. (1998) Vascular endothelial growth factor in premenopausal women- indicator of the best time for breast cancer surgery ? *Br. J. Cancer* 78, 1203-1207

Historical highlights of the angiogenesis field.

<http://www.angio.org/researcher/library/library.html>

Hochberg, R.B., Zielinski, J.E., Lerner, J.M., Pahuja, S.L. (1991) Steroid esterification and hormone action, 31-43 in: Hochberg, R.B., Naftolin, F., eds.: *The new biology of steroid hormones*; Raven press, New York

Holmgren, L., O'Reilly, M.S., Folkman, J. (1995) Dormancy of micrometastasis: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Med.* 1, 149-153

Hori, A., Sasada, R., Matsutani, E., Naito, K., Sakura, Y., Fujita, T., Kozai, Y. (1991) Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Res.* 51, 6180-6184

Houck, K.A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., Leung, D.W. (1991) The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing. *Mol. Endocrinol.* 5, 1806-1814

Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, R. (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29, 577-580

Hulka, B.S., Liu, E.T., Lininger, R.A. (1994) Steroid hormones and risk of breast cancer. *Cancer* 74, 1111-1124

Hyder, S.M., Murthy, L., Stancel, G.M. (1998) Progestin regulation of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells. *Cancer Research* 58, 392-395

Ide, A.G., Baker, N.H., Warren, S.L. (1939) Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am. J. Radiol.* 42, 891-899

Ishikawa, K., Miyazono, U., Hellmann, H., Drexler, C., Wernstedt, K., Hagiwara, K., Usuki, F., Takaku, K., Risau, W., Heldin, C.H. (1989) Identification of the angiogenic activity and the cloning and expression of platelet derived endothelial cell growth factor. *Nature (Lond.)* 338, 557-562

Jouanneau, J., Moens, G., Bourgeois, Y., Poupon, M.F., Thiery, J.P. (1994) A minority of carcinoma cells producing acidic fibroblast growth factor induces a community effect for tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 286-290

Kandel, J., Bossy-Wetzel, E., Radvanyi, F., Klagsbrun, M., Folkman, J., Hanahan, D. (1991) Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* 66, 1095-1104

Karuri, A.R., Kumar, A.M., Mukhopadhyay, D. (1998) Differential expression and selective localization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in the rat uterus during the estrous cycle. *J. Endocrinol.* 159, 489-499

Kerbel, R.S. (2000) Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 21, 505-515

Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillet, N., Phillips, H.S., Ferrara, N. (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 362, 841-844

Koli, K., Keskia-Oja, J. (1996) Transforming growth factor beta system and its regulation by members of the steroid-thyroid hormone superfamily. *Adv Cancer Res.* 70, 63-94

Kondo, S., Asano, M., Suzuki, H. (1993) Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth and its inhibition by the antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 1234-1241

Kranz, A., Mattfeldt, T., Waltenberger, J. (1999) Molecular mediators of tumor angiogenesis: enhanced expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor KDR in primary breast cancer. *Int. J. Cancer* 84, 293-298

Lu, Q., Nakamura, J., Savinov, A., Yue, W., Weisz, J., Dabbs, D.J., Wolz, G., Brodie, A. (1996) Expression of aromatase protein and mRNA in tumor epithelial cells and evidence for functionally significant aromatization in human breast cancer. *Endocrinology* 137, 3061-3068

Makris, A., Powles, T.J., Kakolyris, S., Dowsett, M., Ashley, S.E., Harris, A.L. (1999) Reduction in angiogenesis after neoadjuvant chemoendocrine therapy in patients with operable breast carcinoma. *Cancer* 85, 1996-2000

Marson, L.P., Kurian, K.M., Miller, W.R., Dixon, J.M. (2001) The effect of tamoxifen on breast tumour vascularity. *Breast Cancer Res. Treat.* 66, 9-15

Martin, L., Green, B., Renshaw, C., Lowe, D., Rudland, P., Leinster, S.J., Winstanley, J. (1997) Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. *Br. J. Cancer* 76, 1046-1054

Moghaddam, A., Zhang, H.T., Fan, T.P., Hu, D.E., Lees, V.C., Turley, H., Fox, S.B., Gatter, K.C., Harris, A.L., Bicknell, R. (1995) Thymidine phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 92, 998-1002

Müller-Schimpfle, M., Ohmenhäuser, K., Stoll, P., Dietz, K., Claussen, C.D. (1997) Menstrual cycle and age: influence on parenchymal contrast medium enhancement in MR imaging of the breast. *Radiology* 203, 145-149

Nakamura, J., Savinov, A., Lu, Q., Brodie, A. (1996) Estrogen regulates vascular endothelial growth/permeability factor expression in 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced rat mammary tumors. *Endocrinology* 137, 5589-5596

Pasqualini, J.R., Schatz, B., Varin, C., Nguyen, B.L. (1992) Recent data on estrogen sulfatases and sulfotransferases activities in human breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 41, 323-329

Price, T., Aitken, J., Head, J., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Simpson, E.R. (1992) Determination of aromatase cytochrome P450 messenger RNA in human breast tissues by competitive polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74, 1247-1252

Ray, J.M., Stetler-Stevenson, W.G. (1994) The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumor invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur. Respir. J.* 7, 2062-2072

Reed, M.J., Singh, A., Ghilchik, M.W., Coldham, N.G., Purohit, A. (1991) Regulation of estradiol 17  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in breast tissues: The role of growth factors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 39, 791-798

- Riegel, A.T., Wellstein, A. (1994) The potential role of the heparin-binding-growth- factor pleiotrophin in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 31, 309-314
- Ruohola, J.K., Valve, E.M., Karkkainen, M.J., Joukov, V., Alitalo, K., Harkonen, P.L. (1999) Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 149, 29-40
- Santner, S.J., Feil, P.D., Santen, R.J. (1993) In situ estrogen production via estrone sulfatase pathway in breast tumors: relative importance vs. The aromatase pathway. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59, 29-33
- Sasano, H., Frost, A.R., Saitoh, R., Harada, N., Poutanen, M., Vihko, R., Bulun, S.E., Silverberg, S.G., Nagura, H. (1996) Aromatase and 17  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human breast carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 4042-4046
- Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Peruzzi, C.A., Harvey, V.S., Dvorak, H.F. (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science (Washington D.C.)* 219, 983-985
- Shekhar, M.P.V., Nangia-Makker, P., Wolman, S.R., Tait, L., Heppner, G.H., Visscher, D.W. (1998) Direct action of estrogen on sequence of progression of human preneoplastic breast disease. *Am. J. Pathol.* 152, 1129-1132
- Shing, Y., Folkman, J., Sullivan, R., Butterfield, C., Murray, J., Klagsbrun, M. (1984) Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* 223, 1296-1299
- Slavin, J. (1995) Fibroblast growth factors: at the heart of angiogenesis. *Cell. Biol. Int.* 19, 431-444
- Sumizawa, T., Furukawa, T., Haraguchi, M., Yoshimura, A., Takeyasu, A., Ishizawa, M., Yamada, Y., Akiyama, S. (1993) Thymidine phosphorylase activity associated with platelet-derived endothelial cell growth factor. *J. Biochem. (Tokyo)* 114, 9-14
- Sunderkotter, C., Steinbrink, K., Goebeler, M., Bhardway, R., Sorg, C. (1994) Macrophages and angiogenesis. *J. Leukozyte Biol.* 55, 410-422
- Tanaka, N.G., Sakamoto, N., Korenaga, H., Inoue, K., Ogawa, H., Osada, Y. (1991) The combination of a bacterial polysaccharide and tamoxifen inhibits angiogenesis and tumour growth. *Int. J. Radiat. Biol.* 60, 79-83
- Toi, M., Hoshina, S., Takayanagi, T., Tominaga, T. (1994) Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* 85, 1045-1049

Toi, M., Inada, K., Suzuki, H., Tominaga, T. (1995) Tumor angiogenesis in breast cancer: its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. *Breast Cancer Res. Treat.* 36, 193-204

Valtola, R., Salven, P., Heikkila, P., Taipale, J., Joensuu, H., Rehn, M., Pihlajaniemi, T., Weich, H., deWaal, R., Alitalo, K. (1999) VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J. Pathol.* 154, 1381-1390

Van Netten, J.P., Cann, S.A., van der Westhuizen, N.G. (1995) Angiogenesis and tumour growth (correspondence- reply by Folkman, J.). *N. Engl. J. Med.* 334, 920-921

Vermeulen, P.B., Gasparini, G., Fox, S.B., Toi, M., Martin, L., McCulloch, P., Pezzella, F., Viale, G., Weidner, N., Harris, A.L., Dirix, L.Y. (1996) Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur. J. Cancer* 32A, 2474-2484

Villena-Heinsen, C., Ertan, A.K., Hollander, M., Konig, J., Tossounidis, I., Schmidt, W. (1998) Diagnostic and predictive ranking of the vascular resistance index in breast tumors. *Ultraschall in der Medizin* 19, 10-15

Vogel, P.M., Georgiade, N.G., Fetter, B.F., Vogel, F.S., McCarty, K.S. Jr. (1981) The correlation of histologic changes in the human breast with the menstrual cycle. *Am. J. Pathol.* 104, 23-34.

Wang, J.M., Kumar, S., Pye, D., Haboubi, N., Al-Nakib, L. (1994) Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J. Natl. Cancer Inst.* 86, 386-388

Weidner, N., Semple, J.P., Welch, W.R., Folkman, J. (1991) Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 324, 1-8

Weidner, N., Folkman, J., Pozza, F., Bevilacqua, P., Allred, E.N., Moore, D.H., Meli, S., Gasparini, G. (1992) Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 84, 1850-1851

Weidner, N. (1995a) Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast cancer Res. Treat.* 36, 169-180

Weidner, N. (1995b) Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am. J. Pathology* 147, 9-19

Weidner, N. (1998) Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. *J. Pathol.* 184, 119-122

Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *J.A.M.A.* 288, 321-333

Yamamoto, Y., Toi, M., Kondo, S., Matsumoto, T., Suzuki, H., Kitamura, M., Tsuruta, K., Taniguchi, T., Okamoto, A., Mori, T., Yoshida, M., Ikeda, T., Tominaga, T. (1996) Concentrations of vascular endothelial growth factor in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2, 821-826

Yoshiji, H., Gomez, D.E., Shibuya, M., Thorgeirsson, U.P. (1996) Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res.* 56, 2013-2016

## 8. Danksagung

Bei allen, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben, möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. L. Kiesel für die Überlassung des Themas und die guten Rahmenbedingungen.

Meinem Betreuer Herrn Priv. Doz. Dr. med. R.R. Greb für die vorbildliche Betreuung, Kritik und Anregungen.

Herrn Dr. rer. nat. S. Armeanu für die Mitbetreuung der Arbeit.

Frau Dr. med. A. Greschniok für die hervorragende Zusammenarbeit und Betreuung im Pathologischen Institut.

Fr. Ableiter, Fr. Böhner und Frau Petroktistis für die sorgfältige Einarbeitung und technische Unterstützung bei den immunhistochemischen Färbungen.

Frau Schröder aus dem Forschungsbereich der Abteilung Allgemeine Chirurgie, Waldhörlestr. 22 für die Einführung in das Computerprogramm Quantimet 600.

Herrn Rosenberger aus dem Institut für Medizinische Informationsverarbeitung für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

## 9. Lebenslauf

Andreas Patrick Koch geboren am 10.09.1976 in Ostfildern/ Ruit. Eltern: Gabriele Koch, geborene Miller und Günther Koch.

1982-1986	Grundschule in Neuhausen
1986 - 1996	Otto-Hahn-Gymnasium Ostfildern/ Nellingen
1996	Abitur
1996-1997	Zivildienst
seit 1997	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
1999	Ärztliche Vorprüfung
2001	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2003	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
12.05.2004	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung