

**Abteilung für Onkologie und Hämatologie,
der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf**

Direktor : Prof. Dr. D.K. Hossfeld

**Untersuchung der prognostischen Relevanz
der VEGF- und MMP-9-Spiegel
beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom
an 118 Patienten**

**Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Annika Köhler

aus Hamburg

Hamburg 2001

Angenommen vom dem Fachbereich Medizin

der Universität am : 27 November 2001

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Dekan : Prof. Dr. C. Wagener

Referent : Prof. Dr. D.K. Hossfeld

Koreferent : -----

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
2. Material und Methoden	
2.1 Patientenkollektiv	13
2.2 Datenerfassung	13
2.3 Serologische Untersuchungen	13
2.4 Datenauswertung	16
3. Ergebnisse	
3.1 Geschlecht	17
3.2 Histologie	17

3.3 Altersverteilung	17
3.4 Tumorstadium	18
3.5 Karnofsky-Index	18
3.6 Laktatdehydrogenase (LDH)	19
3.7 Hämoglobin (Hb)	19
3.8 Thrombozyten	20
3.9 Vascular endothelial growth factor (VEGF)	20
3.10 Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9)	20
3.11 Korrelation von VEGF, MMP-9 und Thrombozyten	21
3.12 VEGF-, MMP-9-, LDH- und Hb-Werte in Bezug auf die Tumorausbreitung	22
3.13 Einfluss der Faktoren auf die Gesamtüberlebenszeit	25
4. Diskussion	
4.1 VEGF-Serumwerte beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom	36
4.2 MMP-9-Serumwerte beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom	40
4.3 Thrombozyten beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom	44
4.4 Hämoglobin beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom	47
4.5 Fibrinogen beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom	49
4.6 Therapeutische Konsequenzen der Ergebnisse	50
5. Zusammenfassung	51
6. Literaturverzeichnis	52
7. Anhang	67
8. Danksagung	71
9. Lebenslauf	72
10. Erklärung	73

1. Einleitung

Das Bronchialkarzinom ist die häufigste Tumorerkrankung der westlichen Industrienationen. Weltweit gibt es jährlich ca. 1,3 Millionen Neuerkrankungen mit steigender Tendenz, insbesondere bei Frauen und jungen Patienten. Jährlich sterben in Deutschland über 45.000 Personen an den Folgen eines Bronchialkarzinoms. In Deutschland ist das Bronchialkarzinom bei den Männern der am häufigsten zum Tode führende maligne Tumor. Statistisch erkrankt jeder zwanzigste Mann an einem Bronchialkarzinom. Bei den Frauen steht in Deutschland das Bronchialkarzinom noch hinter dem Mammakarzinom und dem Kolonkarzinom in der Statistik der durch Malignome bedingten Todesursachen. Aufgrund der zunehmenden Erkrankungshäufigkeit ist jedoch damit zu rechnen, dass in den kommenden Jahren - wie heute schon in den USA - auch in Deutschland das Bronchialkarzinom die häufigste malignombedingte Todesursache bei Frauen sein wird. Während beim Mann die Inzidenz ein Plateau erreicht hat und in einigen Ländern sogar leicht rückläufig ist, steigt sie beim weiblichen Geschlecht seit 1965 kontinuierlich an. Zur Zeit liegt das Verhältnis von Männern zu Frauen hinsichtlich der Todesrate bei 4 zu 1. Dieses wird sich aber aufgrund des raschen Erkrankungsanstiegs bei den Frauen zu deren Ungunsten deutlich verschieben. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 45. und 65. Lebensjahr, wobei zunehmend auch jüngere Menschen an einem Bronchialkarzinom erkranken.

Das aktive, inhalative Zigarettenrauchen stellt den wichtigsten exogen Risikofaktor dar. Aktive Raucher haben – in Abhängigkeit von z.B. Anzahl der Zigaretten, der Dauer der Exposition, der Teer-, Nikotin- und Benzpyrenkonzentration – ein 15 bis 35fach höheres Risiko, an einem Bronchialkarzinom zu erkranken, als Nichtexponierte. Passivraucher haben ein 2fach höheres Risiko. Neben dem Zigarettenkonsum sind weitere exogene Noxen als auslösende Faktoren eines Bronchialkarzinoms bekannt. Karzinogene Wirkungen sind u.a. für Asbest, Chromat, Nickel, Uran, Zink, Kokereigase sowie für polyzyklische Kohlenwasserstoffe nachgewiesen worden.

Die Prognose der Patienten mit einem Bronchialkarzinom ist insgesamt schlecht. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt zwischen 8 und 13 Prozent. Typische Frühsymptome existieren nicht.

Histopathologisch unterscheidet man das nicht-kleinzellige (ca. 75 bis 80 Prozent) von dem kleinzelligen (ca. 20 bis 25 Prozent) Bronchialkarzinom (SCLC). Zu dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) werden das Plattenepithelkarzinom, das Adenokarzinom und das grosszellige Karzinom gerechnet. Der histopathologischen Unterscheidung in nicht-kleinzelliges und kleinzelliges Bronchialkarzinom kommt für die weitere Diagnostik, Therapie und Prognose eine entscheidende Rolle zu.

Das nicht-kleinzellige ist im Vergleich zum kleinzelligen Bronchialkarzinom durch eine langsamere Proliferationsrate, eine längere Tumorverdopplungszeit, eine spätere Metastasierungstendenz und eine mässigere Chemosensibilität gekennzeichnet.

Neben dem histopathologischen Typ ist die Ausbreitung des Tumors, das Stadium, der bisher wichtigste bekannte prognostische Parameter.

Die Stadieneinteilung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms erfolgt nach der TNM-Klassifikation.

Für das NSCLC ist zur Zeit die 5. Auflage der TNM-Klassifikation von 1997 gültig (108) (Anhang 1). Bezüglich der Einstufung von intrapulmonalen Tumorherden, die getrennt vom Primärtumor liegen und die gleiche Histologie haben, ergibt sich in der jetzigen 5. Auflage eine Veränderung im Vergleich zur 4. Auflage von 1993. Liegen die Tumorherde im gleichen Lungenlappen wie der Primärtumor, erfolgt die Klassifikation als T4. Befinden sich die Tumorherde hingegen in einem anderen Lappen als der Primärtumor, wird M1 klassifiziert.

Die Stadien I und II wurden in der 5. Auflage (108) (Anhang 2) jeweils neu unterteilt in die Stadien IA (T1N0M0) und IB (T2N0M0) bzw. IIA (T1N1M0) und IIB (T2N1M0). Ein T3-Tumor, bei dem keine regionären Lymphknoten- oder Fernmetastasen vorliegen, wird nicht mehr dem Stadium IIIA, sondern aufgrund der ähnlichen Prognose neu dem Stadium IIB zugerechnet.

Bei Diagnosestellung liegt bei etwa 23 Prozent der Patienten ein lokal begrenztes Tumorstadium I und II, bei 44 Prozent ein lokal fortgeschrittenes Stadium IIIA/B und bei 33 Prozent der Patienten ein fernmetastasiertes Stadium (IV) vor (13).

Bei Patienten mit einem Tumorstadium I beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate nach kompletter Resektion 50 bis 75 Prozent, im Stadium II lediglich nur noch 30 bis 50

Prozent. Im Tumorstadium IIIA sind Patienten mit einem T3N1-Status von denen mit einem N2-Lymphknotenstatus prognostisch zu unterscheiden. Liegt die 5-Jahres-Überlebensrate beim T3N1-Status noch zwischen 30 und 40 Prozent, so ist die Prognose beim N2-Lymphknotenstatus schlechter. Hier beläuft sich das 5-Jahres-Überleben nach Resektion und adjuvanter Strahlentherapie für das Gesamtkollektiv aller Patienten mit einem N2-Lymphknotenstatus auf 10 bis 15 Prozent, wobei die Prognose mit der Ausdehnung und der Lokalisation des N2-Lymphknotenbefalls variiert. Bei Befall nur einer N2-Lymphknotenstation kann die 5-Jahres-Überlebensrate über 20 Prozent liegen, während diese bei mehreren positiven N2-Lymphknotenstationen häufig unter 10 Prozent sinkt. Tumöröse Lymphknoten in der Hauptbifurkation und paraösophageal sind prognostisch eher ungünstig (102).

Für das Stadium IIIB liegt das 5-Jahresüberleben bei durchschnittlich 5 Prozent nach alleiniger Strahlentherapie, wobei auch hier der N3-Lymphknotenstatus prognostisch ungünstiger ist als die T4-Tumoren. Eine Ausnahme machen hier die malignen Pleurarergüsse, die eine ähnlich schlechte Prognose wie das fernmetastasierte Stadium bedingen (5-J-ÜLR < 2 Prozent) (14).

Die Tumorausbreitung stellt beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom den entscheidenden prognostischen Faktor dar. Da aber aufgrund fehlender charakteristischer Symptomatik die Frühdiagnose oft nur ein Zufallsbefund ist und selbst im sehr frühen Stadium die 5-Jahres-Überlebensrate nicht über 75 % liegt, kommt der Identifikation biologischer Marker zur prognostischen Voraussage eine besondere Bedeutung zu. Eine zusätzliche Klassifizierung der resektablen Stadien nach Risiko bezüglich eines postoperativen Rezidivs würde eine adjuvante, individuelle Therapie ermöglichen und damit eventuell zu einer verbesserten Prognose führen (110, 128).

Zu den wichtigsten bisher untersuchten klinischen Faktoren in Bezug auf ihre prognostische Voraussage gehören neben dem Tumorstadium das Ausmass des Gewichtsverlustes und die Leistungsfähigkeit nach der Karnofsky-Skala (Anhang 1), welche in multivariaten Analysen als unabhängige prognostische Faktoren identifiziert wurden (75, 78, 92). Darüber hinaus ist als weiterer klinisch bedeutsamer Faktor das Alter zu nennen, welches u.a. aufgrund von Multimorbidität und eingeschränkter therapeutischer Möglichkeiten einen negativen Einfluss auf das Überleben hat (78, 128).

Bei der Tumorausbreitung wurde sowohl für die Tumorgröße als auch für den Lymphknotenstatus eine unabhängige prognostische Bedeutung nachgewiesen (35). Der histologische Typ stellt beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom keinen prognostischen Faktor dar (35, 50). Der Differenzierungsgrad konnte bisher ebenfalls nicht als sicherer beeinflussender Faktor identifiziert werden (35, 110). Die Proliferationsrate, quantifizierbar durch den Mitose-Index, die Flow-Zytometrie und das proliferating cell nuclear antigen (PCNA), zeigte nach bisherigen Studien Einfluss auf das Langzeit-Überleben beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom; PCNA wird im lokal begrenzten Stadium als prognostisch unabhängiger Faktor diskutiert (54, 110). Die Blutgefässinvasion eines Tumors, welche durch vermehrte Neoangiogenese induziert wird, wurde in mehreren Studien als prognostisch wichtig eingestuft (68, 69). Auch die Lymphgefässinvasion wurde als Indikator für eine schlechte Prognose beschrieben (50).

Bisher war es leider nicht möglich, einen für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom spezifischen Tumormarker im Serum zu identifizieren. Serum-Marker wie z.B. das carcinoembryonale Antigen (CEA), CYFRA 21-1, SCC stellten sich als zu unspezifisch heraus, da sie sowohl bei anderen malignen Erkrankungen, als auch bei benignen Erkrankungen, erhöht sein können. Diese Marker spielen heutzutage in der Diagnostik, im Therapieverlauf und in der Tumornachsorge beim NSCLC keine Rolle.

Zu den prognostisch relevanten Proto-Onkogenen gehören beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom zum einen das K-ras-Onkogen, welches für das p21-ras-Protein kodiert und eine Rolle bei der Signalvermittlung von Proliferationssignalen spielt (106) und zum anderen das Her2-Gen. Das Her2-Gen kodiert für ein 185-kD Protein, das zu der transmembranären EGF-Rezeptorfamilie gehört und bei Adenokarzinomen mit einer schlechten Prognose assoziiert sein soll (115). Das Proteinprodukt des Proto-Onkogens bcl-2 inhibiert den programmierten Zelltod (Apoptose) und wird durch das homologe Protein BAX gehemmt. Dieses bildet Heterodimere mit bcl-2 und erhöht somit die Rate der Zelltode. Die bcl-2/BAX-Ratio scheint ebenfalls einen Einfluss auf das Überleben zu haben (62, 94). Bei den Tumorsuppressorgenen ist hier vor allem p53 zu nennen, welches als Antwort auf DNA-Schäden einen Arrest des Zellzyklus induzieren kann. Desweiteren wird durch dieses Gen die Zellapoptose vermittelt. Die Rolle von p53 als prognostischer Faktor ist beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom allerdings bisher noch ungeklärt. Sowohl über einen prognostisch günstigen, als auch über einen

ungünstigen Einfluss auf das Überleben wurde berichtet (46, 49, 85, 103). Auch das Retinoblastom-Gen Rb scheint unter den molekularen Tumormarkern von prognostischer Relevanz zu sein (114). In klinischer Anwendung befinden sich von diesen genannten molekularen Markern bisher nur das ras-Gen und das p53-Gen, wobei letzteres kontrovers diskutiert wird. Die Molekulargenetik führte bisher bei der Frühdiagnose und Verlaufsbeobachtung beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom zu keinem Fortschritt.

Die Angiogenese, d.h. die Blutgefässneubildung aus präexistenten Blutgefässen, ist ein physiologischer Vorgang, der unter anderem bei der Wundheilung und beim Wachstum zu finden ist. Angiogenese mit Krankheitswert findet man, neben beispielsweise okulärer Neovaskularisation bei diabetischer Retinopathie oder Gefässneubildung bei rheumatoider Arthritis, besonders beim Tumorwachstum (20).

Ohne eine ausreichende Gefässversorgung wird das Wachstum der stark stoffwechselaktiven Tumorzellen durch die langsame Diffusionsrate von Sauerstoff und Wachstumsfaktoren limitiert (74). Darüber hinaus spielt die Vaskularisation eines Tumors eine grosse Rolle bei der Metastasierung und hat dadurch Einfluss auf das Langzeitüberleben der Patienten (68, 77). Zur Auslösung einer pathologischen Angiogenese sind vier wichtige Ereignisse im Umfeld des Tumors erforderlich:

1. Eine hypoxische Episode, welche die Freisetzung von Wachstumsfaktoren induziert.
2. Die durch Wachstumsfaktoren hervorgerufene Aktivierung einer Endothelzellproliferation.
3. Die Migration von Endothelzellen in Richtung der chemotaktisch stimulierenden Quelle.
4. Die Degradation der extrazellulären Matrix, welche den Endothelzellen eine Invasion ins umgebende Gewebe ermöglicht (74).

Dieser Prozess wird durch endokrin, parakrin und autokrin wirksame Wachstumsfaktoren im Zusammenspiel mit speziellen Rezeptoren, Proteasen und Adhäsionsmolekülen gesteuert (17).

Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom gab es in einigen Studien Hinweise, dass die Angiogenese einen prognostisch signifikanten Einfluss auf die rezidivfreie Zeit und

das Gesamtüberleben haben könnte (4, 30, 33). Darüber hinaus wurde eine erhöhte Vaskularisation schon im sehr frühen Stadium nachgewiesen, was, bei der Suche nach einem mit Gefässwachstum assoziierten Tumormarker, von grosser Bedeutung ist (31, 69, 95).

Eine durch den angiogenetischen Prozess geförderte Absiedlung von Mikrometastasen scheint ein wichtiger Schritt beim Metastasierungsgeschehen zu sein (47, 68).

Folgende Regulationsfaktoren der Angiogenese sind beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom untersucht worden und bieten einen möglichen Ansatz zur Evaluierung des Metastasierungsrisikos eines Tumors:

Zu den Wachstumsfaktoren, welche u.a. von Endothel- und Tumorzellen freigesetzt werden und im Stroma an lösliche Rezeptoren binden, gehört unter anderem der vascular endothelial growth factor (VEGF). Von diesem wurden bisher 5 Isoformen beschrieben, die durch differentielles Splicen entstehen. Es handelt sich dabei um einen Vorgang bei der Proteinbiosynthese, wobei für ein Protein codierende m-RNA-Abschnitte (Exons) aus der Gesamt-RNA herausgetrennt und separat zusammengefügt werden. Bei unterschiedlichen Variationen dieses Vorgangs entstehen verschiedene VEGF-Formen, die alle eine Proliferation von Endothelzellen anregen (74). VEGF ist ein dimerisches Glykoprotein, welches Ähnlichkeit mit dem platelet derived growth factor (PDGF) besitzt und an Rezeptoren aus der Familie der Tyrosinkinasen, VEGFR-1 und VEGFR-2, bindet (43).

Die VEGF-Expression wird durch viele Faktoren beeinflusst. Hierbei spielt vor allem die Hypoxie eine sehr wichtige Rolle. Durch die Entstehung des sogenannten Hypoxie-induzierten Faktors 1α wird die Transkription von VEGF bei vermehrter Stabilisierung der VEGF-m-RNA induziert (66, 67). Mechanismen auf transkriptioneller Ebene, die eine vermehrte Bildung von VEGF induzieren können, werden u.a. durch PDGF, basic fibroblast growth factor (bFGF), tumor necrosis factor α (TNF α), transforming growth factor α und β (TGF α,β) ausgelöst (42, 74). Sowohl Zellen mit aktivierten Onkogenen, wie z.B. dem ras-Gen, als auch mit Verlust von Tumorsuppressorgenen können erhöhte Mengen an VEGF sezernieren (34, 97). Neben der vermehrten Proliferation und Migration von Endothelzellen führt VEGF zu einer erhöhten Permeabilität von

Gefäßen, was die Aussaat der Tumorzellen in den Blutkreislauf erleichtern kann (28, 88). Möglicherweise kommt VEGF beim Metastasierungsgeschehen daher eine wichtige Schlüsselrolle zu (32, 72).

Ein anderer Wachstumsfaktor ist der platelet-derived endothelial cell growth factor (PDECGF), welcher u.a. von Thrombozyten sezerniert wird. Es handelt sich hierbei um eine Thymidinphosphorylase, welche ebenfalls zu verstärkter Angiogenese und zu vermehrtem Tumorwachstum führen kann (79, 80). Auch der basic fibroblast growth factor (bFGF) führt zu erhöhtem Gefäßwachstum, wobei dieser an spezielle Proteine in der extrazellulären Matrix bindet und unter Einwirkung proteolytischer Enzyme freigesetzt wird (121). Ein prognostischer Einfluss von bFGF wurde beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom in mehreren Publikationen diskutiert (40, 122).

Bei der Regulation der Angiogenese spielen Proteasen eine wichtige Rolle. Sie führen u.a. zu einer Degradation der Basalmembran und der umgebenden extrazellulären Matrix (59, 64). Eine wichtige Untergruppe dieser Enzyme sind Zink-abhängige Endopeptidasen, welche in sezernierter und an Zellmembranen gebundenen Form vorkommen. Diese sogenannten Metalloproteinasen (MMP) verfügen über ein breites Substratspektrum, wobei es hierbei auch zu Überlappungen unter den einzelnen Enzymen kommt. Dies widerspricht der bisherigen Annahme einer Substratspezifität, die zu einer Untergliederung der Metalloproteinasen in Kollagenasen, Stromolysine und Gelatinasen führte. Man geht in jüngster Zeit aus diesem Grund dazu über, an Stelle eines die Funktion beschreibenden Namens die MMP mit einer Nummer zu versehen (98).

Neben der regulativen Funktion bei der Angiogenese haben diese Endopeptidasen unter anderem auch einen Einfluss bei Umbauprozessen während des Wachstums, bei Reparationsprozessen oder beim Menstruationszyklus (109). Bisher wurde den MMP eine Schlüsselfunktion bei der Degradation der Basalmembran und der damit einhergehenden Gewebspenetration und Intravasation von Tumorzellen zugeschrieben. Neuere Untersuchungen haben aber gezeigt, dass diese Enzyme eine viel umfassendere Funktion in der Entwicklung und Aufrechterhaltung eines Milieus haben, welches das Wachstum und die Angiogenese von Primarius und Metastasen fördert (82). Mit Ausnahme von MMP-2 und den membranverankerten MMP werden die

Metalloproteinasen nur unter Einfluss bestimmter inflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie z.B. IL-1, TNF oder TGF- β exprimiert (98). Die Freisetzung erfolgt in Form von inaktiven Proenzymen, welche durch Autokatalyse oder enzymatisch aktiviert werden. Diese Aktivierung steht im Gleichgewicht mit einer Inhibition durch inaktivierende Proteine, den so genannten tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP), und verhindert somit eine überschüssende Gewebedestruktion (58, 104). MMP-9, welche auch als 92 kDa Gelatinase bezeichnet wird, kann neben Gelatin auch Kollagen, Elastin, Fibronectin und weitere Proteine in der extrazellulären Matrix abbauen (82, 98).

Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom gab es einige Hinweise auf erhöhte MMP-9-Plasmaspiegel (12, 51). Untersuchungen zur Expression von MMP-9 und seiner prognostischen Aussage beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom erbrachten bisher jedoch sehr widersprüchliche Ergebnisse (36, 60). Zur Klärung dieser Frage bedarf es weiterer prospektiver Studien.

Weitere regulative Faktoren sind Adhäsionsmoleküle, die eine wichtige Funktion bei den Zell-Zell-Verbindungen haben. Der Kontaktverlust von Zellen untereinander ist der erste Schritt im Metastasierungsprozess und steht in Abhängigkeit zur regelrechten Funktion dieser Moleküle. Beim Gefäßwachstum ermöglichen die Adhäsionsmoleküle eine tubuläre Formation der Endothelzellen. Man untergliedert diese cell adhesion molecules (CAM) in vier Gruppen: Cadherine, Selectine, Immunglobuline und Integrine (17, 84, 111).

Es wird u.a. ein Zusammenhang zwischen der Expression bestimmter Cadherine und der Tumordinvasion bzw. Metastasierung beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom vermutet (99, 105, 111).

Wachstumsfaktorrezeptoren, wie z.B. epidermal growth factor receptor (EGFR) und c-erbB-2 sind auch wichtige angiogenetische Regulationsfaktoren, deren prognostischer Einfluss beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom schon beschrieben wurde (96, 111).

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen,

- ob es eine Korrelation zwischen den prätherapeutischen Serumspiegeln von VEGF und MMP-9 und den Tumorstadien beim NSCLC gibt.
- ob es eine Korrelation zwischen den VEGF- und MMP-9-Serumspiegeln und dem 1- Jahres-Überleben gibt.
- ob VEGF und MMP-9 sowohl in univariater als auch in multivariater Analyse eine Rolle als prognostische Faktoren beim NSCLC spielen.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

In dieser prospektiven Untersuchung wurden von insgesamt 118 Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom Daten erfasst und Seren untersucht. Von den 118 Patienten wurden 72 Patienten mit einem lokal begrenzten oder operablen lokal fortgeschrittenen Tumorstadium in der Sektion für Thoraxchirurgie des Allgemeinen Krankenhauses in Harburg in der Zeit von September 1998 bis Oktober 1999 operiert. 46 Patienten befanden sich bei Diagnosestellung in einem inoperablen lokal fortgeschritten oder fernmetastasierten Tumorstadium und wurden in dem Zeitraum von Dezember 1997 bis November 1998 in einer von der Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf geleiteten multizentrischen Phase II-Studie mit einer Kombinationschemotherapie bestehend aus Gemcitabin und Vinorelbin behandelt.

2.2 Datenerfassung

Alle Patienten gaben zu Beginn der prospektiven Untersuchung ihr Einverständnis zur Datenerhebung und –auswertung sowie zur serologischen Untersuchung ihres Blutes. Zuerst wurden die prä- und perioperativen Daten der operierten Patienten den Krankenakten entnommen bzw. direkt vom Patienten erfragt und anschliessend in ein Auswertungsschema übertragen. Um Informationen über den postoperativen Verlauf zu erhalten, wurde ein Jahr postoperativ den Hausärzten ein Fragebogen zugesandt bzw. direkt Kontakt mit den Patienten aufgenommen. Für die chemotherapierten Patienten wurden ebenfalls die Daten vor, während und nach der Chemotherapie dokumentiert und in ein Auswertungsschema übertragen.

2.3 Serologische Untersuchungen

Von allen Patienten wurden direkt vor der Operation bzw. direkt vor der Chemotherapie 10 ml Vollblut entnommen. Das Serum wurde nach Gerinnung und Zentrifugation vom korpuskulären Anteil getrennt und bei -80 °C bis zum Zeitpunkt der Bestimmung der MMP-9- bzw. der VEGF-Konzentration eingefroren.

Bestimmung der MMP-9- und VEGF-Konzentration mittels ELISA

Die MMP-9- und VEGF-Serumkonzentrationen wurden in der vorliegenden Arbeit mittels Human MMP-9 (total) Immunoassay Quantikine™ und Human VEGF Immunoassay Quantikine™ der Firma R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA, bestimmt.

Testprinzip

Bei diesem Assay wird eine Mikrotiterplatte mit spezifischen, gegen ein bestimmtes Antigen gerichteten, monoklonalen Antikörpern beschichtet. Bei Inkubation mit Serumproben wird das zu bestimmende Antigen von den immobilisierten Antikörpern zu Antigen-Antikörper-Komplexen gebunden. Nach Auswaschen ungebundener Substanzen wird die Titerplatte mit Enzym-markierten, antigenspezifischen Antikörpern inkubiert, was als Sandwichmethode bezeichnet wird. Nach dem Auswaschen ungebundener Antikörper wird eine Substratlösung hinzugegeben, welche durch die antikörpergebundenen Enzyme zu einem farbigen Produkt umgesetzt wird. Die Farbintensität, welche proportional zur Antigenkonzentration ist, wird nach Zugabe einer Stopplösung photometrisch bestimmt. Die Serumkonzentration wird durch den Vergleich mit Standards bekannter Antigenkonzentration ermittelt.

Testdurchführung

1. Bei der Bestimmung der MMP-9-Konzentration wurden die Seren zunächst 100fach mit einem Assay-Puffer verdünnt, bei der Untersuchung der VEGF-Konzentration konnte unverdünntes Serum verwendet werden.
2. Zur Herstellung einer Standardverdünnungsreihe wurde der in Pulverform vorliegende MMP-9-Standard zunächst in desionisiertem Wasser und der VEGF-Standard in Assay-Puffer aufgelöst.
3. Bei beiden Untersuchungen wurden Assay-Puffer und Serumproben bzw. Standards für 2 Stunden inkubiert.
4. Nach 3 Waschvorgängen mit einem Wasch-Puffer, welcher mit desionisiertem Wasser zunächst verdünnt werden musste, wurde das Konjugat mit den Enzym-markierten Antikörpern hinzugegeben. Bei MMP-9 betrug die Inkubationszeit 1 Stunde; bei der VEGF-Bestimmung musste 2 Stunden inkubiert werden.
5. Nach erneuten 3 Waschvorgängen wurde die Mikrotiterplatte mit der Substratlösung bei beiden Untersuchungen für 30 Minuten inkubiert und dann nach Zugabe der

Stopplösung die Farbintensität der einzelnen Proben photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Aus den hierbei gemessenen Extinktionswerten werden nach unten beschriebenem Prinzip die Serumkonzentrationen errechnet.

Berechnung der Ergebnisse

Es wurden für jede Probe Doppelbestimmungen durchgeführt, wobei aus beiden Extinktionswerten das mathematische Mittel bestimmt wurde. Die Standardkurve wurde unter Verwendung der speziellen Software Delta SOFT3 der Firma Bio Metallica Princeton, New Jersey, USA, am Computer erstellt. Die Extinktionswerte der Standardreihe wurden auf der Ordinate gegen die Konzentrationswerte auf der Abszisse auf beiden Achsen logarithmisch aufgetragen und mit Hilfe des Computerprogramms eine Regressionsgerade errechnet. Aus den Extinktionsmittelwerten der Serumproben konnten dann die Konzentrationen durch Bezugnahme auf die Eichkurve ermittelt werden.

Normbereiche

Vom Hersteller wurden für VEGF-Serumkonzentration ein Normbereich von 62 - 707 pg/ml angegeben. Bei MMP-9 liegen die Normwerte laut Angaben des Herstellers im Bereich von 169 - 705 ng/ml.

Sensitivität

Die unterste Nachweisgrenze des verwendeten ELISAs betrug nach Angaben des Herstellers bei der Untersuchung von Serum auf MMP-9 0,156 ng/ml und auf VEGF 5,0 pg/ml.

Spezifität

Bei der Untersuchung des ELISAs für MMP-9 auf Spezifität ergaben sich laut Hersteller weder Kreuzreaktivität noch Interferenz bei den Faktoren: rhMMP-1, rhMMP-2, rhMMP-3 und rhTIMP-2. Eine Interferenz, aber keine Kreuzreaktivität, wurde für rhTIMP-1 bei einer Konzentration dieses Faktors von mehr als 12,5 ng/ml festgestellt.

Der VEGF ELISA zeigte keine signifikante Kreuzreaktivität oder Interferenz bei rhP1GF, rmP1GF-2, rmVEGF₁₂₀, rmVEGF₁₆₄ und weiteren untersuchten Faktoren. Das VEGF₁₆₅/ P1GF-Heterodimer zeigte eine Kreuzreaktivität von annähernd 20% über die

Reichweite des Imunoassays. Bei den mit VEGF in Beziehung stehenden Rezeptoren, zeigten rhFLT-1/Fc ab Konzentrationen über 1250 pg/ml und rhVEGF-R2(KDR)/Fc über 10000 pg/ml eine Interferenz.

Präzision

Die Präzision dieses Tests beschreibt die Streuung der gemessenen Werte um die Konzentration des zu bestimmenden Antigens. Zur Ermittlung der Streuung innerhalb einer Bestimmungsserie wurden "Intra-assay"-Tests durchgeführt und der Variationskoeffizient als Dispersionsmass angegeben. "Inter-assay"-Tests liessen die Streuung zwischen den ELISAs untereinander berechnen. Die vom Hersteller angegebenen Variationskoeffizienten sind aus folgender Tabelle zu entnehmen.

	VEGF		MMP9	
	Konzentration	V-Koeffizient in %	Konzentration	V-Koeffizient in %
intra-assay-Präzision	53,7 pg/ml	6,7	0,833 ng/ml	2
	910 pg/ml	5,1	11,0 ng/ml	2,9
inter-assay-Präzision	64,5 pg/ml	8,8	0,972 ng/ml	7,9
	1003 pg/ml	6,2	12,2 ng/ml	6,9

Tab. 1 Angaben des Herstellers zur Präzision des ELISAs bei MMP-9 und VEGF

2.4 Datenauswertung

Die computergestützte statistische Auswertung der ermittelten Daten erfolgte mit dem Programmsystem SPSS in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biomathematik und medizinische Statistik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Geschrieben wurde die Arbeit auf einem Personal Computer mit dem Programmsystem MICROSOFT WORD.

3. Ergebnisse

3.1 Geschlecht

In dem untersuchten Gesamtkollektiv (n=118) betrug der Anteil an Männern 75% (n=89) und der Anteil an Frauen 25% (n=29).

3.2 Histologie

Die histologische Begutachtung ergab folgende Verteilung:

46 (39%) der Patienten hatten ein Adenokarzinom, 41 (35%) ein Plattenepithelkarzinom und 31 (26%) ein grosszelliges Karzinom (siehe Abb. 1).

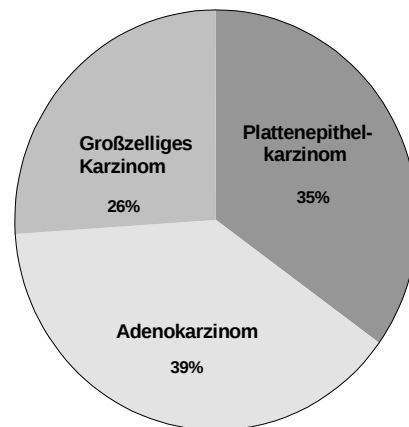


Abb. 1 Prozentuale Verteilung der Tumorhistologien im Gesamtkollektiv n=118

3.3 Altersverteilung

Das mediane Alter des Patientenkollektivs betrug 63 Jahre (Minimum: 39 J.; Maximum: 86 J.) (siehe Tab. 2).

Alter in Jahren	Anzahl d. Patienten (n)	prozentualer Anteil
< 50	13	11%
50 - 60	29	25%
60 - 70	51	43%
> 70	25	21%

Tab. 2 Altersverteilung des Gesamtkollektivs n=118

3.4 Tumorstadium

Bei 50 Patienten (42%) lag bei Diagnosestellung ein lokal begrenztes Tumorstadium (I/II), bei 27 (23%) ein lokal fortgeschrittenes (IIIA/B) und bei 41 Patienten (35%) ein fernmetastasiertes Tumorstadium (IV) vor (siehe Tab. 3 und Abb. 2).

Tumorstadium	Anzahl d. Patienten (n)	prozentualer Anteil
I A - II B	50	42%
III A - III B	27	23%
IV	41	35%

Tab. 3 Verteilung des Patientenkollektivs hinsichtlich des Tumorstadiums

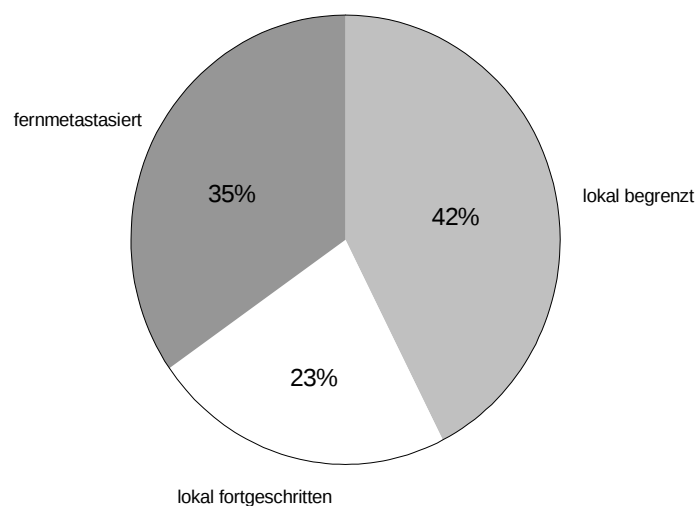


Abb. 2 Prozentuale Verteilung der Tumorstadien

3.5 Karnofsky-Index

Der Karnofsky-Index ist ein Index zur Beurteilung der Aktivität von Patienten unter Berücksichtigung körperlicher und sozialer Faktoren (siehe Anhang 3).

Im untersuchten Patientenkollektiv war die Verteilung des Karnofsky-Index wie folgt:

Karnofsky in %	Patientenanzahl n	Häufigkeit in %
60	1	1
70	13	11
80	41	35
90	50	42
100	13	11

Tab. 4 Verteilung des Karnofsky-Index innerhalb des Gesamtkollektivs (n=118)

Der mediane Karnofsky-Index betrug 90%.

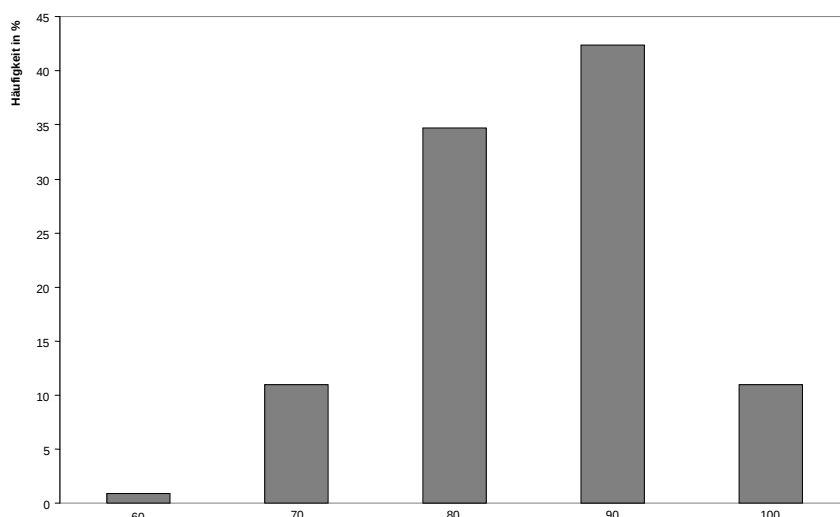


Abb. 3 Prozentuale Verteilung des Karnofsky-Index im Gesamtkollektiv (n=118)

3.6 Laktatdehydrogenase (LDH)

Bei 112 Patienten (94,9%) wurde präoperativ bzw. vor Beginn der Chemotherapie eine Bestimmung der LDH durchgeführt. In 26% (n=29) der Fälle lag die LDH über 200 U/l. Mittelwert: 185,26 U/l ; Median: 164 U/l ; Standardabweichung: 77,26 U/l

3.7 Hämoglobin (Hb)

Bei 117 (99,2%) Patienten wurde der Hb-Wert vor Chemotherapiebeginn bzw. vor der Operation bestimmt. 28 Patienten (24%) hatten einen Hb-Wert von unter 9 g/dl. Bei 68 Patienten (58%) lag der Hb-Wert zwischen 12 und 15 g/dl und bei 21 Patienten (18%) über 15 g/dl.

Mittelwert: 13,33 g/l ; Median: 13,4 g/l ; Standardabweichung: 1,66 g/l

3.8 Thrombozyten

Bei 118 Patienten wurde die Thrombozytenzahl vor Beginn der Chemotherapie bzw. vor der Operation bestimmt. In 21% (n=25) der Fälle lag eine Thrombozytose mit Werten über 400/nl vor.

Mittelwert: 336400 /nl ; Median: 313000/nl ; Standardabweichung: 126 000/nl

3.9 vascular endothelial growth factor (VEGF)

Die Messung der VEGF-Konzentration wurde bei 118 Patienten durchgeführt, wobei 43% (n=51) der Werte über dem Normbereich (62–707 pg/ml) waren.

Mittelwert: 916,79 pg/ml ; Median: 633,79 pg/ml ; Standardabweichung: 908,75 pg/ml

Die Durchführung eines T-Tests zeigte, dass die VEGF-Serumwerte des untersuchten Kollektivs signifikant über dem vom Hersteller angegebenen Mittelwert der Kontrollgruppe (220 pg/ml) lagen (Tab. 5).

	Mittelwert	Testwert	mittlere Differenz	p-Wert
VEGF	916,79	220	696,79	0,005

Tab. 5 Abweichung der VEGF-Serumwerte vom Mittelwert der Kontrollgruppe (T-Test)

3.10 Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9)

Bei 118 Patienten wurde die MMP-9 Konzentration gemessen. 80% (n=94) der Werte waren über der vom Hersteller angegebenen Norm (169–705 ng/ml).

Mittelwert: 1388 ng/ml ; Median: 1293,24 ng/ml ; Standardabweichung: 730,42 ng/ml

Bei der Durchführung eines T-Test lagen die MMP-9-Serumwerte des untersuchten Kollektivs signifikant über dem vom Hersteller angegebenen Mittelwert (436 ng/ml).

	Mittelwert	Testwert	mittlere Differenz	p-Wert
MMP-9	1388,89	436	952,89	0,005

Tab. 6 Abweichung der MMP-9-Serumwerte vom Mittelwert der Kontrollgruppe (T-Test)

3.11 Korrelation von VEGF, MMP-9 und Thrombozyten

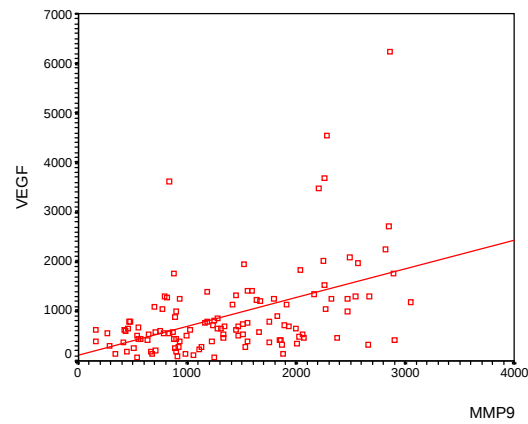


Abb. 4 Korrelation der MMP-9- und VEGF-Serumwerte

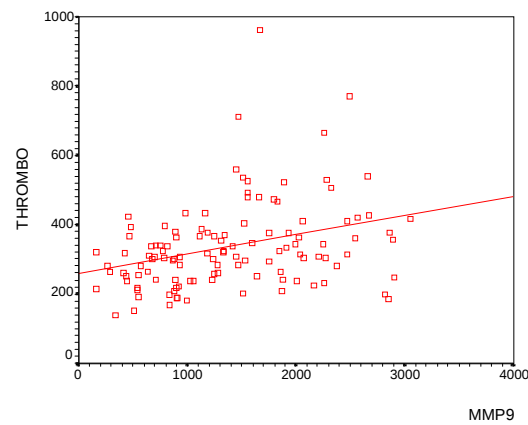


Abb.5 Korrelation der Thrombozyten- und MMP-9-Werte

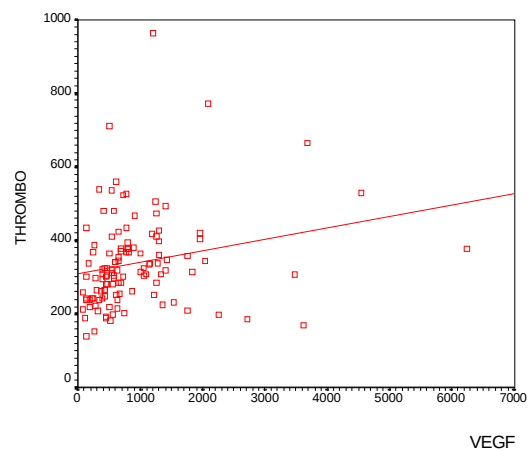


Abb.6 Korrelation der Thrombozyten- und VEGF-Werte

Spearman-Rangkorrelationskoeffizient (Signifikanz $p=0,01$):

MMP-9/VEGF : 0,42

Thrombozyten/MMP-9 : 0,35

Thrombozyten/VEGF : 0,351

3.12 VEGF-, MMP-9-, LDH- und Hb-Werte in Bezug auf die Tumorausbreitung

Die gemessenen VEGF- und MMP-9-Serumspiegel zeigten einen Anstieg mit zunehmender Tumorausbreitung.

Tumorstadium		VEGF	MMP-9
lokal begrenzt (IA - IIB)	N	50	50
	Mittelwert	627,80	1337,93
	Median	505,75	910,49
lokal fortgeschritten (IIIA - IIIB)	N	27	27
	Mittelwert	815,66	1441,91
	Median	629,80	1339,65
fernmastasiert (IV)	N	41	41
	Mittelwert	1335,82	1660,02
	Median	890,23	1795,73

Tab. 7 Median- und Mittelwerte von VEGF und MMP-9 in Bezug zum Tumorstadium

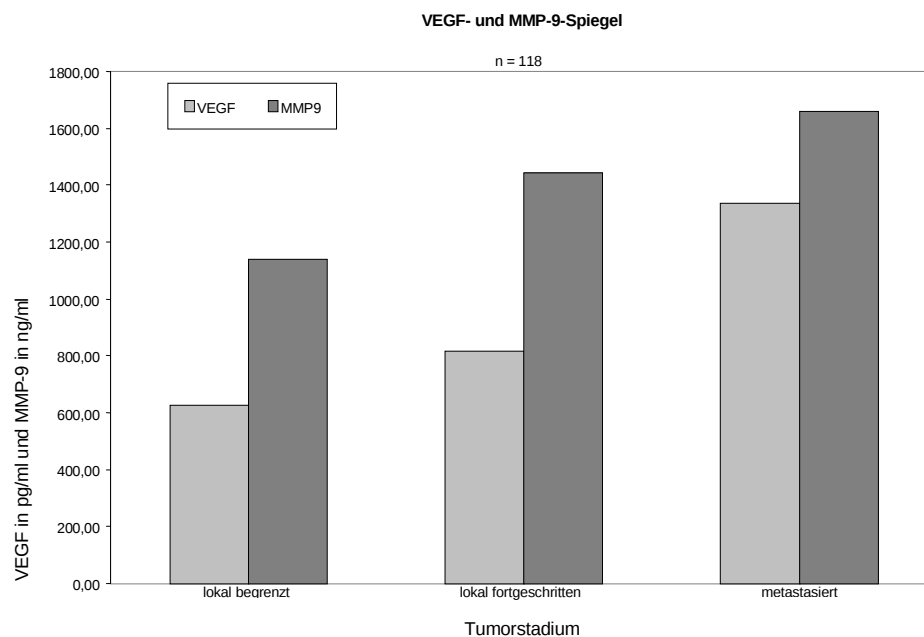


Abb. 7 Mediane VEGF- und MMP-9-Spiegel in Bezug zur Tumorausbreitung

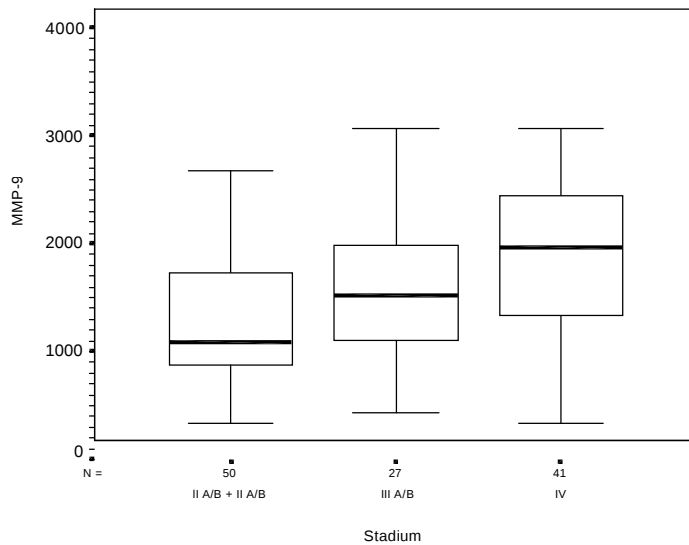


Abb. 8 Box- und Whisker-Diagramm von MMP-9-Serumwerten für die Tumorstadien I/II, IIIA/B und IV

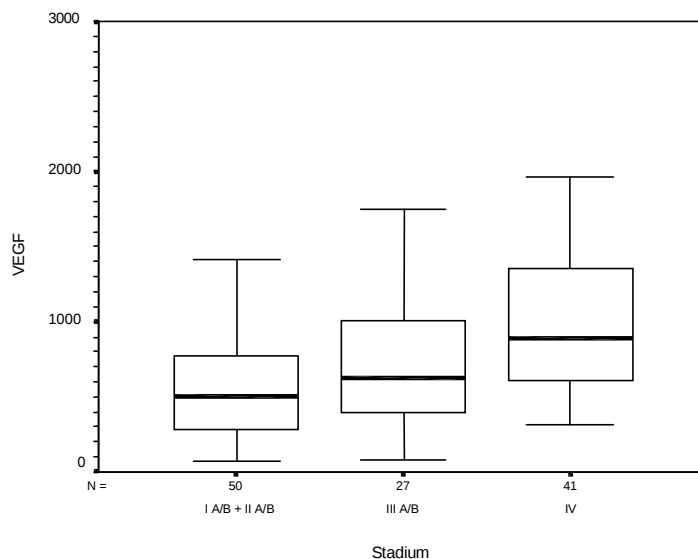


Abb. 9 Box- und Whisker-Diagramm der VEGF-Serumwerte für die Tumorstadien I/II, IIIA/B und IV

Die Stärke der Korrelation mit dem Tumorstadium wurde bei beiden Faktoren vergleichend untersucht. Da im vorliegenden Kollektiv keine durch Parameter definierbare Verteilung vorausgesetzt werden kann, wurde ein parameterfreier Test zur Signifikanzberechnung, nämlich ein Rangsummentest verwendet. Hier zeigte sich, dass sowohl der VEGF-Serumwert ($p=0,005$; Kruskal-Wallis-Test) als auch der MMP-9-Serumwert ($p=0,005$; Kruskal-Wallis-Test) signifikant mit dem Tumorstadium korrelierte.

Bei der LDH zeigte sich eine ähnliche Verteilung. Da nicht bei allen Patienten LDH-Werte präoperativ bzw. vor Beginn der Chemotherapie bestimmt worden waren, betrug das untersuchte Kollektiv hier $n=112$ (siehe Abb. 10).

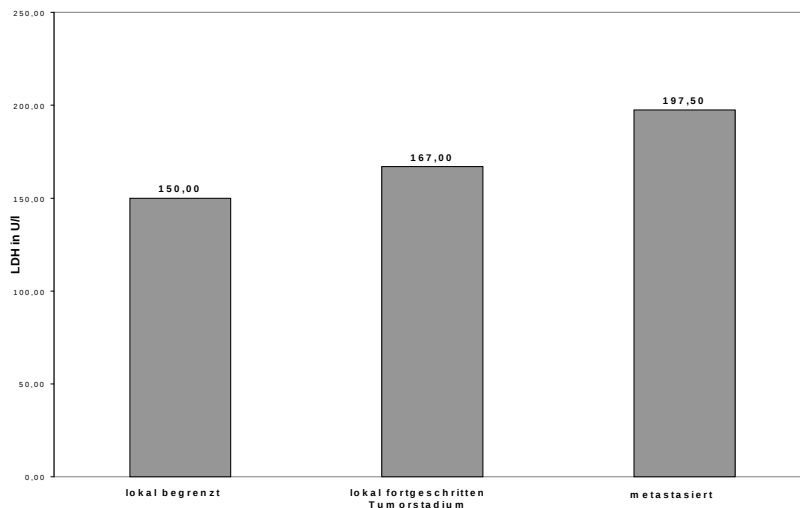


Abb. 10 Mediane LDH-Spiegel in Beziehung zur Tumorausbreitung

Beim Hämoglobin zeigte sich eine inverse Verteilung der Werte. Hier nahm der Hämoglobinspiegel im Median bei metastasiertem Tumorstadium im Vergleich zur lokal begrenzten und lokal fortgeschrittenen Tumorerkrankung ab ($n=117$) (siehe Abb. 11).

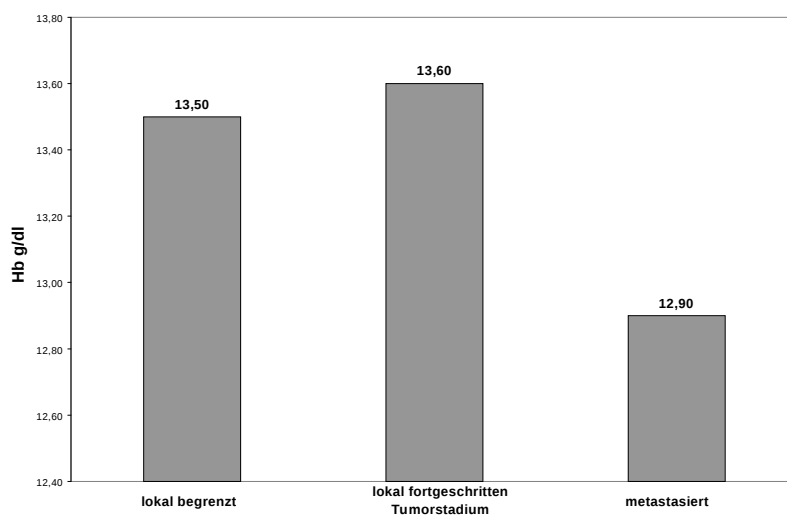


Abb. 11 Mediane Hb-Werte in Beziehung zur Tumorausbreitung

Die Thrombozytenwerte stiegen bei einer Patientenzahl von n=118 mit zunehmender Tumorausbreitung an (Abb. 12).

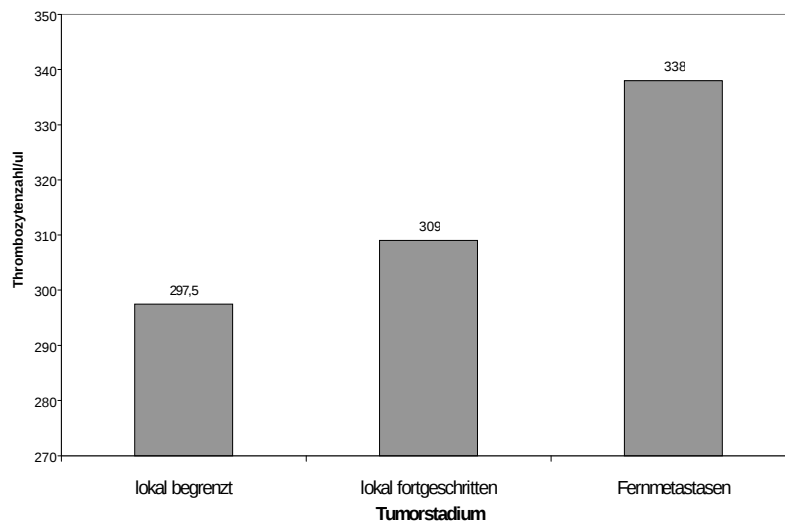


Abb. 12 Thrombozytenwerte in Bezug auf die Tumorausbreitung

Die Thrombozytenzahl korrelierten signifikant mit der Tumorausbreitung ($p=0,048$; Chi-Quadrat-Test).

3.13 Einfluss der Faktoren auf die Gesamtüberlebenszeit

Univariate Cox-Regressionsanalyse

Die Faktoren Tumorstadium, histologischer Typ, Geschlecht, Alter, Karnofsky-Index, MMP-9-Werte, VEGF-Werte, Thrombozytenzahlen, Hb- und LDH-Konzentration wurden bezüglich ihres Einflusses auf die Überlebenszeit mittels univariater Cox-Regressionsanalyse untersucht (Tab. 9). Hierbei hatten das Tumorstadium, der Karnofsky-Index, der MMP-9- und VEGF-Serumspiegel, die Thrombozytenzahl, die Hb- sowie die LDH-Konzentrationen einen prognostischen Einfluss (Tab. 8).

Faktor	p-Wert	Risiko
Alter	0,57	1
Geschlecht :		
männlich	-	1
weiblich	0,55	0,81
Histologie :		
PEC	-	1
Adeno	0,68	1,16
Grosszellig	0,4	1,38
Tumorstadium		
lokal begrenzt	-	1
lokal fortgeschritten	0,95	1,03
metastasiert	0,01	2,5
Karnofsky-Index		
100 %	-	1
90 %	0,64	1,43
80 %	0,04	4,50
≤ 70 %	0,02	6,59
MMP-9		
≤ 806 ng/ml	-	1
807 - <1293 ng/ml	0,06	3,05
1294 - < 1912 ng/ml	0,02	3,99
> 1912 ng/ml	0,001	6,95
VEGF		
≤ 417 pg/ml	-	1
418 - < 630 pg/ml	0,77	0,85
631 - < 1205 pg/ml	0,10	2,26
> 1205 pg/ml	0,004	3,96
Hb		
9 - < 12 g/dl	-	1
12 - < 15 g /dl	0,08	0,42
> 15 g/dl	0,03	0,33
Thrombozyten		
≤ 400/nl	-	1
> 400/nl	0,03	1,99
LDH		
≤ 200 U/l	-	1
> 200 U/l	0,02	2,14

Tab. 8 Univariate Cox-Regressionsanalyse im Kollektiv n=118

Multivariate Cox-Regressionsanalyse

Die Überlebenszeit der am nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom erkrankten Patienten wurde bei den operablen Stadien definiert als Periode vom Datum der Operation bis zum Todesdatum gerechnet in Monaten. Bei den chemotherapierten Patienten wurde die Zeit vom 1. Therapie-Tag bis zum Todesdatum berechnet.

Es wurde eine rückwärts schrittweise multivariate Cox-Regressionsanalyse der Faktoren in Bezug auf die Überlebenszeit (ÜLZ) durchgeführt. Dabei erwiesen sich der Karnofsky-Index, der MMP-9-Serumspiegel, die Thrombozytenzahl sowie die Hb-Konzentration als prognostische unabhängige Faktoren (Tab. 9).

	p-Wert	Risiko
Karnofsky-Index		
100 %	0,04	-
90 %	0,51	2,15
80 %	0,07	7,44
≤ 70 %	0,06	9,59
MMP-9		
≤ 806 ng/ml	0,02	
807 - <1293 ng/ml	0,39	1,72
1294 - < 1912 ng/ml	0,15	2,40
> 1912 ng/ml	0,008	4,61
Hämoglobin	0,05	
12 - < 15 g/dl	0,52	1,51
< 15 g/dl	0,48	0,64
Thrombozyten		
≤ 400 / > 400	0,08	1,90

Tab. 9 Prognostisch unabhängige Faktoren im untersuchten Kollektiv n=118 bei der schrittweisen multivariaten Cox-Regressionsanalyse

Einfluss der VEGF- und MMP-9-Serumspiegel auf die Überlebenszeit

Innerhalb eines Jahres verstarben von 118 Patienten insgesamt 39 (33,1%) und 79 Patienten (66,9%) überlebten. Patienten, die innerhalb eines Jahres verstarben, zeigten im Mittel- und im Median-Wert signifikant höhere VEGF- (p=0,005; Mann-Whitney-U-Test) und MMP-9-Serumspiegel (p=0,005; Mann-Whitney-U-Test) als Patienten, die ein Jahr überlebten (siehe Tab. 10).

		VEGF	MMP-9
< 1 Jahr	n	39	39
	Mittelwert	1355,84	1794,44
	Median	1141,30	1795,73
≥ 1 Jahr	n	79	79
	Mittelwert	700,04	1188,68
	Median	550,60	989,37
insgesamt	n	118	118
	Mittelwert	916,79	1388,89
	Median	633,79	1293,24

Tab. 10 Median- und Mittelwert der VEGF- bzw. MMP-9-Serumwerte in Bezug auf das 1 Jahres-Überleben

Die Aufteilung der Messwerte von beiden Faktoren in Quartile zeigte, dass Patienten mit hohen VEGF- oder MMP-9-Serumspiegeln (4. Quartil) eine höhere Sterberate aufwiesen als Patienten mit niedrigeren Serumspiegeln (1. Quartil) (siehe Tab. 11 und 12).

		VEGF				
		1. Quartil	2. Quartil	3. Quartil	4. Quartil	Gesamt
		≤ 417 pg/ml	418 – 630 pg/ml	631 – 1205 pg/ml	>1206 pg/ml	
lebt	n	23 31,5%	24 32,9%	16 21,9%	10 13,7%	73 100%
verstorben	n	6 13,3%	6 13,3%	14 31,1%	19 42,2%	45 100%
Gesamt	n	29 24,6%	30 25,4%	30 25,4%	29 24,6%	118 100%

Tab. 11 Verteilung der Sterberate innerhalb der Quartile der VEGF-Serumwerte

		MMP-9				
		1. Quartil	2. Quartil	3. Quartil	4. Quartil	Gesamt
		≤ 806 ng/ml	807 – 1293 ng/ml	1294 – 1912 ng/ml	> 1913 ng/ml	
lebt	n	25 34,2%	19 26,0%	18 24,7%	11 15,1%	73 100%
verstorben	n	4 8,9%	11 24,4%	12 26,7%	18 40,0%	45 100%
Gesamt	n	29 24,6%	30 25,4%	30 25,4%	29 24,6%	118 100%

Tab. 12 Verteilung der Sterberate innerhalb der Quartile der MMP-9-Serumwerte

Auffällig war, dass beim VEGF erst in den Quartilen 3 und 4, also bei höheren VEGF-Serumwerten, die Anzahl verstorbener Patienten zunahm. Im Gegensatz dazu nahm die

Sterberate bei MMP-9 schon in den unteren Quartilen 1 und 2, also bei niedrigeren Werten, sehr stark zu. Hier verdoppelte sich das Sterberisiko vom 1. zum 2. Quartil (siehe Abb. 13 und 14).

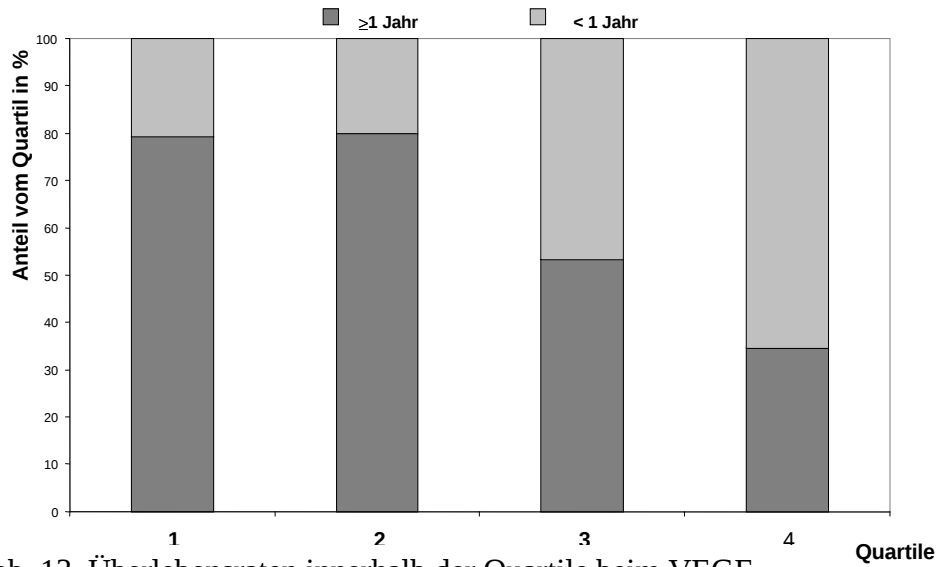


Abb. 13 Überlebensraten innerhalb der Quartile beim VEGF

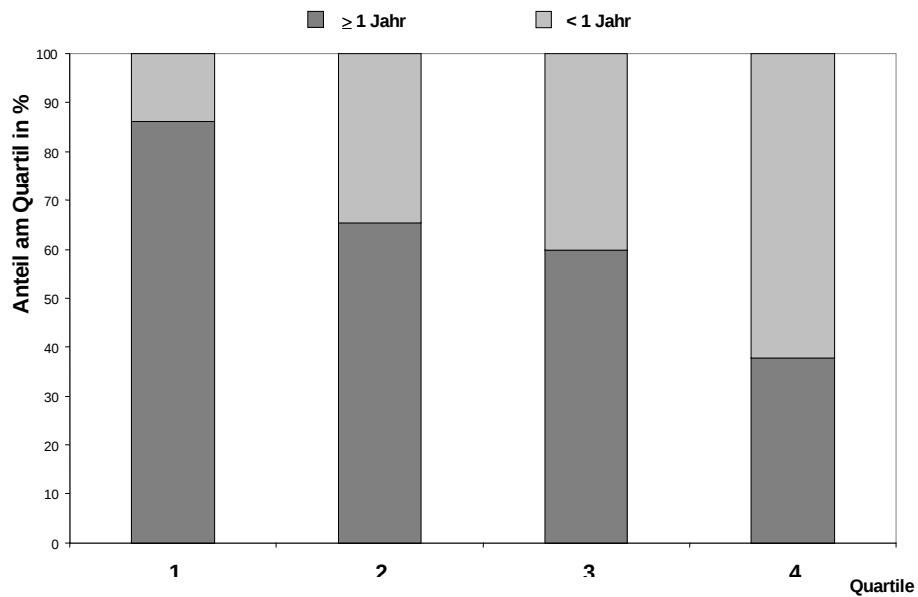


Abb. 14 Überlebensraten innerhalb der Quartile bei MMP-9

In einer Cox-Regressionsanalyse wurde der Einfluss der in Quartile klassifizierten Serum-Werte auf die Überlebenszeit untersucht (siehe Tab. 13).

VEGF	p - Wert	Sterberisiko	MMP-9	p-Wert	Sterberisiko
1. Quartil	0,118		1. Quartil	0,174	
2. Quartil	0,665	0,77	2. Quartil	0,185	2,22
3. Quartil	0,284	1,71	3. Quartil	0,075	2,90
4. Quartil	0,110	2,37	4. Quartil	0,031	3,86

Tab. 13 Analyse der klassifizierten MMP-9- bzw. VEGF-Serumwerte in Bezug auf das Gesamtüberleben

Deutlich wurde die bei MMP-9 prozentual stärkere Zunahme des Versterberisikos beim ersten Quartilssprung im Vergleich zu VEGF. Insgesamt lag das Risiko zu versterben bei MMP-9 bei allen Quartil-Übergängen über denen von VEGF. So hatten Patienten mit Serumwerten innerhalb des 4. Quartils ein ca. vierfach höheres Risiko zu versterben als Patienten im 1. Quartil. Es war nur die 4. Quartilsgruppe des MMP-9 bei dieser Untersuchung von prognostisch unabhängiger Signifikanz.

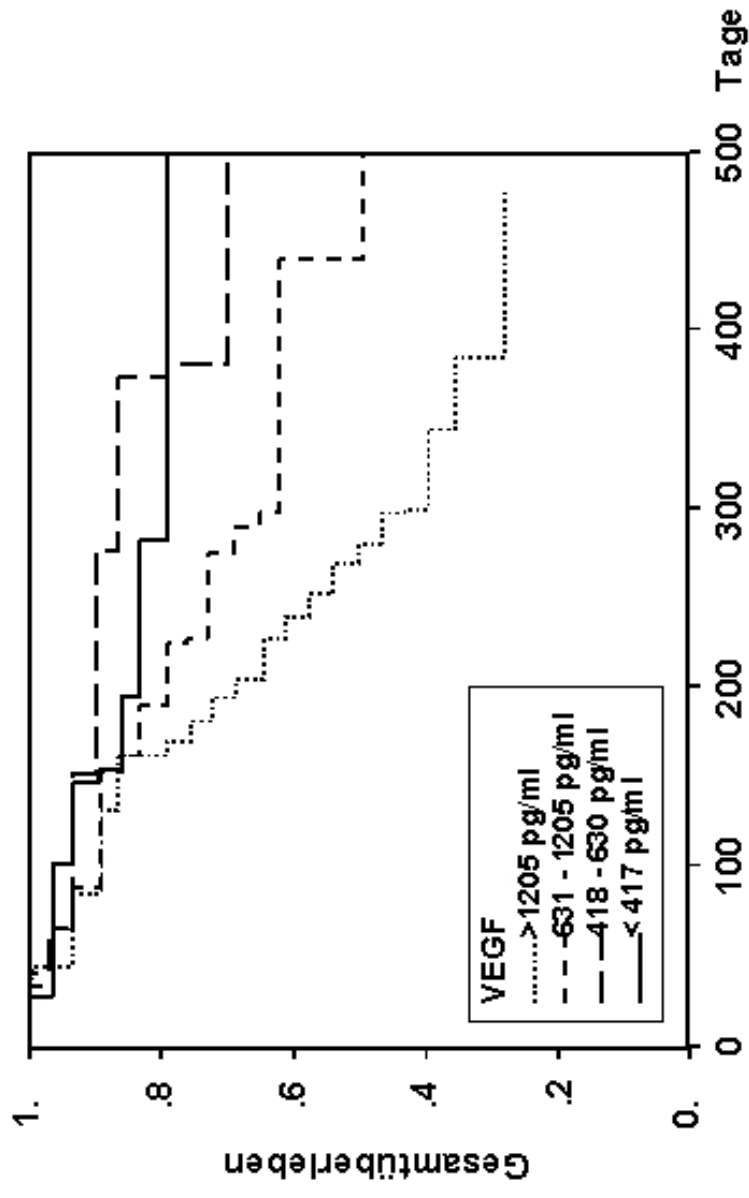


Abb. 15 Kaplan-Meier Kurven für die 4 Quartile der VEGF-Serumwertverteilung

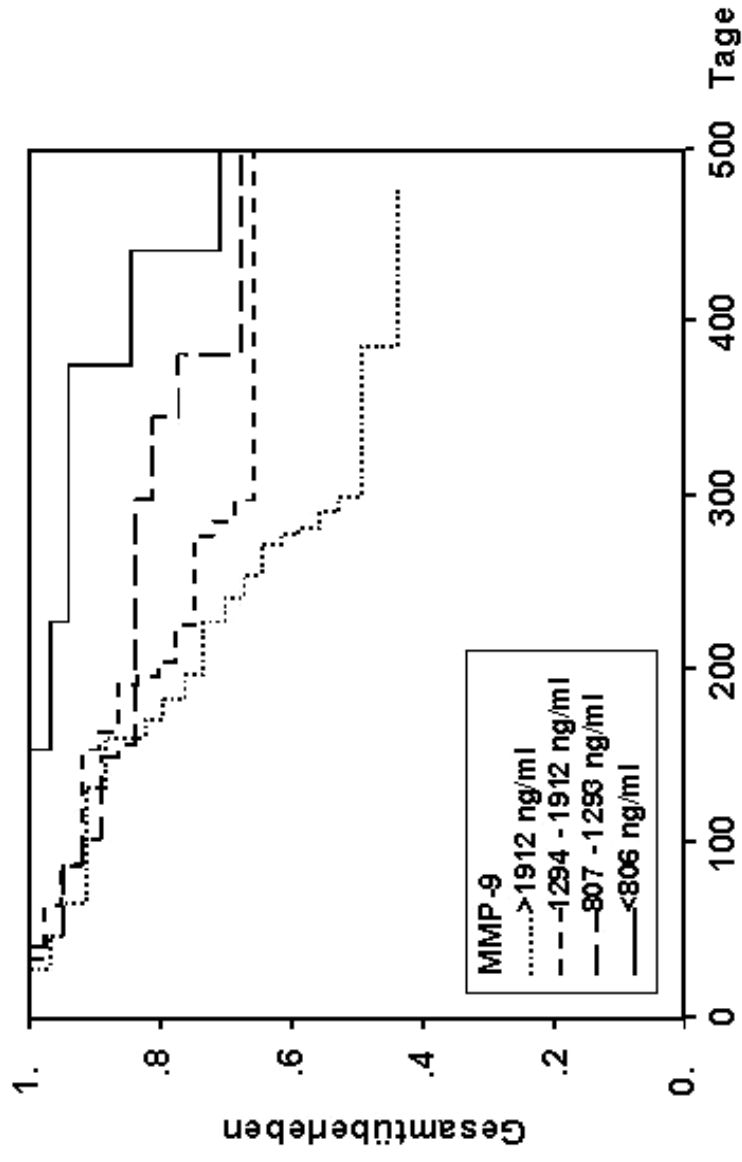


Abb. 16 Kaplan-Meier Kurven für die 4 Quartile der MMP-9-Serumwertverteilung

Korrelation von Hb-Wert und Fibrinogenkonzentration mit den MMP-9- und VEGF-Spiegeln

Für die Berechnung der Mediane und Mittelwerte innerhalb der MMP-9- bzw. VEGF-Quartile standen bei den Hb-Werten Daten von 117 Patienten (99,2%) und bei Fibrinogenwerten Daten von 83 Patienten (70,3%) aus dem Kollektiv (n=118) zur Verfügung (siehe Tab. 14 und Tab. 15).

		VEGF in pg/ml				
		1. Quartil	2. Quartil	3. Quartil	4. Quartil	Gesamt
		≤ 417	418 – 630	631 – 1205	>1205	
Hb (g/dl)	n	28	30	30	29	117
	Mittelwert	13,99	13,77	12,87	12,69	13,33
	Median	14,10	13,55	12,80	12,80	13,40
	s	1,33	1,36	1,65	1,92	1,66
Fibrinogen (mg/dl)	n	24	23	21	15	83
	Mittelwert	365,71	470,87	468,14	548,60	453,82
	Median	348,00	440,00	432,00	538,00	420,00
	s	67,75	142,45	164,77	147,62	145,34

Tab 14. Hb- und Fibrinogen-Verteilung innerhalb der VEGF-Quartile
(s = Standardabweichung)

		MMP-9 in ng/ml				
		1. Quartil	2. Quartil	3. Quartil	4. Quartil	Gesamt
		≤ 806	807 - 1293	1294 - 1912	> 1913	
Hb (g/dl)	n	29	29	30	29	117
	Mittelwert	13,72	13,93	12,92	12,75	13,33
	Median	13,50	14,10	13,00	12,90	13,40
	s	1,32	1,68	1,59	1,80	1,66
Fibrinogen (mg/dl)	n	24	25	22	12	83
	Mittelwert	403,00	428,92	492,86	535,75	453,82
	Median	379,00	408,00	515,00	519,50	420,00
	s	118,61	103,86	178,79	161,49	145,34

Tab. 15 Hb- und Fibrinogen-Verteilung innerhalb der MMP-9-Quartile
(s=Standardabweichung)

Die Hb-Werte lagen bei hohen MMP-9- und VEGF-Werten (3. und 4. Quartil) deutlich unter den Hb-Werten innerhalb des 1. und 2. Quartils (Abb. 17). Beim Fibrinogen hingegen stiegen die Serumwerte parallel zu denen von MMP-9 und VEGF an (Abb. 18).

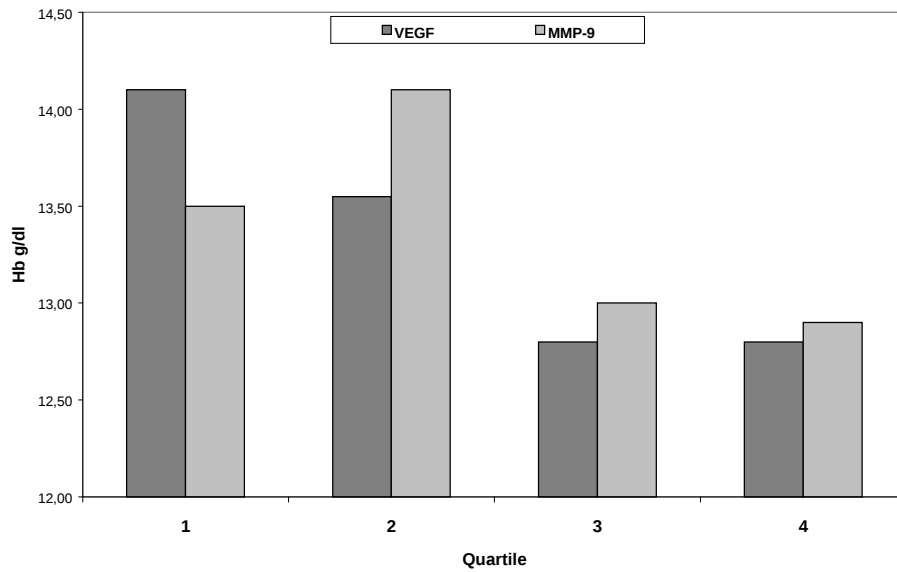


Abb. 17 Verteilung der medianen Hb-Werte innerhalb der MMP-9- und VEGF-Quartile

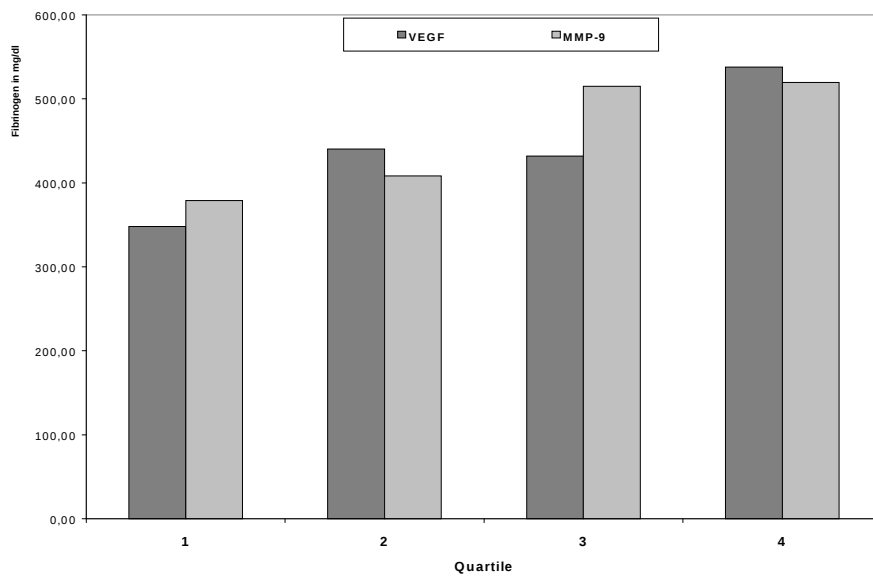


Abb. 18 Verteilung der medianen Fibrinogenwerte innerhalb der MMP-9- und VEGF-Quartile

Die Höhe der Hb-Serumwerte korrelierte signifikant mit den VEGF- ($p=0,007$; Kruskal-Wallis-Test) und MMP-9-Werten ($p=0,038$). Bei Fibrinogen korrelierten die Werte ebenfalls signifikant mit der VEGF-Konzentration ($p=0,005$; Kruskal-Wallis-Test) und der MMP-9-Konzentration im Serum ($p=0,032$).

Einfluss der Faktoren auf die rezidivfreie Zeit

Im Kollektiv der operierten Patienten (n=72) wurde im Beobachtungszeitraum nach der Operation bei 9 Patienten (12,5%) eine Metastasierung (n=7) und/oder ein Lokalrezidiv (n=2) diagnostiziert. 63 (87,5%) der 72 Patienten waren rezidivfrei.

		VEGF	MMP-9
keine Metastasen kein Lokalrezidiv	n	63	63
	Mittelwert	1110,71	585,94
	Median	928,97	501,20
Metastasen und/oder Lokalrezidiv	n	9	9
	Mittelwert	1486,00	721,00
	Median	1553,40	616,40
insgesamt	n	72	72
	Mittelwert	1157,63	602,82
	Median	1005,74	536,75

Tab.16 Median- und Mittelwerte von VEGF bzw. MMP-9 bei Patienten mit Lokalrezidiv und/oder Metastasen im Vergleich zu rezidivfreien Patienten

Rezidivfreie Patienten hatten im Mittel und im Median niedrigere prätherapeutische MMP-9- und VEGF-Serumwerte als die Patientengruppe mit Entwicklung eines Rezidivs.

Nur für MMP-9 zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p=0,037$; Mann-Whitney-Test), während für VEGF keine signifikante Korrelation ($p=0,193$) nachweisbar war.

Einfluss von Therapieform auf die Überlebenszeit

Um die Zusammenfassung der operierten und chemotherapierten Patienten zu einer Gruppe rechtfertigen zu können, wurde der Einfluss der Therapie auf das Langzeitüberleben gesondert untersucht. In der Cox-Regressionsanalyse stellte sich heraus, dass die Therapieform Operation bzw. Chemotherapie keine prognostisch signifikante Einflussgrösse war ($p=0,21$).

4. Diskussion

4.1 VEGF-Serumwerte beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom

VEGF-Serumwerte wurden beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom bisher in 3 Arbeiten untersucht (10, 53, 113). Die niedrigste Fallzahl war hierbei 68 und die höchste 91 (53, 10). Das Patientenkollektiv dieser Doktorarbeit liegt im Vergleich zu bisherigen Untersuchungen mit 118 höher. Die Tumorphistologie betreffend, waren im Kollektiv (n=68) von Brattstrom et al. (10) 59% Plattenepithelkarzinome (n=40), 34% Adenokarzinome (n=23) und 7% grosszellige Karzinome (n=5). Bei Takigawa et al. (113) bestand das Kollektiv (n=70) zu 33% aus Patienten mit Adenokarzinomen (n=23), zu 27% mit Plattenepithelkarzinomen (n=19), zu 4% mit grosszelligen Karzinomen (n=3) und zu 36% mit kleinzelligen Karzinomen (n=25). Imoto et al. (53) untersuchten 91 Patienten, darunter 63 % der Patienten mit Adenokarzinomen (n=57) und 37% mit Plattenepithelkarzinomen (n=34).

In der vorliegenden Arbeit bestand das Kollektiv (n=118) zu 39% aus Adenokarzinomen, zu 35% aus Plattenepithelkarzinomen und zu 26% aus grosszelligen Karzinomen. Der Anteil grosszelliger Karzinome war in dieser Arbeit im Vergleich zu den anderen Arbeiten grösser, der Anteil an Adeno- und Plattenepithelkarzinomen lag etwa im Mittelfeld. Bei der Geschlechtsverteilung lag der Frauenanteil in den drei Veröffentlichungen zwischen 22 und 29%. Vergleichbar hierzu waren in der vorliegenden Arbeit 25% des untersuchten Patientenkollektivs Frauen.

Das mittlere Alter lag bei Brattstrom et al. (10) bei 67 Jahren, im Kollektiv von Takigawa et al. (113) bei 68 Jahre und bei Imoto et al. bei 66 Jahren. Das mittlere Alter dieses Kollektivs beträgt 63 Jahre und liegt somit unter dem mittleren Alter der anderen Arbeiten. Brattstrom et al. (10) zeigten, dass bei einem Kollektiv mit 68 Patienten, welche chemotherapiert oder bestrahlt worden waren, die VEGF-Serumwerte vor Therapiebeginn im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht waren. Eine Korrelation der Serumwerte mit dem histologischen Typ, dem Tumorstadium, dem Ansprechen auf die Therapie oder der Überlebenszeit konnte nicht nachgewiesen werden. Auch Takigawa et al. (113) wiesen signifikant erhöhte Serumwerte bei 70 Patienten nach. Nicht nur im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, sondern auch zu einer Patientengruppe mit benignen Lungenerkrankungen waren die VEGF-Serumwerte

im untersuchten Kollektiv signifikant höher. Eine Korrelation zur Tumorhistologie, zum Tumorstadium oder zur Fernmetastasierung konnte nicht gezeigt werden. Imoto et al. (53) untersuchten VEGF-Serumwerte bei 57 von 91 Patienten und fanden signifikant höhere Werte im fortgeschrittenen Tumor-stadium (T3-4) als im frühen Tumorstadium (T1-2), jedoch keine Korrelation mit der Überlebenszeit. VEGF-Serumwerte hatten in dieser Untersuchung keine prognostische Aussagekraft (siehe Tab. 17).

Autor	Patientenkollektiv	Medium	Ergebnis
Brattsrom et al. 1998 (10)	n= 68 NSCLC	Serum	erhöhte prätherapeutische Werte vor Chemo- bzw. Radiotherapie kein prognostischer Einfluss
Takigawa et al.1998 (113)	n=70 SCLC und NSCLC	Serum	erhöhte Serumwerte keine Korrelation mit Histologie, Tumorstadium und Fernmetastasierung
Imoto et al. 1998 (53)	n=91 NSCLC	Serum	Serumwerte im Tumorstadium T3-4 höher als in T1-2 kein prognostischer Einfluss

Tab. 17 Rolle der VEGF-Serumwerte beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom in der Literatur

Da VEGF beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom in vielen Veröffentlichungen nicht im Serum, sondern im resezierten Tumorgewebe mittels Immunhistochemie oder PCR untersucht wurde, kann ein direkter Vergleich der Ergebnisse mit diesen wissenschaftlichen Arbeiten nur eingeschränkt erfolgen.

O`Byrne et al. (86) wiesen in den Tumorgewebsschnitten bei 223 operierten Patienten eine Korrelation von VEGF-Expression mit der Überlebenszeit nach. In dieser Untersuchung hatten auch der Lymphknotenstatus und die Vaskularisierung des Tumors einen prognostischen Einfluss. Bei der multivariaten Analyse war VEGF allerdings kein prognostisch unabhängiger Faktor, hingegen waren die Tumorgröße und die Vaskularisation signifikante Faktoren. Auch Decaussin et al. (23) konnten bei ihrem Kollektiv von 69 operierten Patienten im Stadium I-II keine Korrelation der VEGF-Expression mit der Überlebenszeit zeigen, VEGF hatte in dieser Untersuchung keinen prognostischen Einfluss.

In anderen Studien war eine vermehrte VEGF-Expression von prognostischem Einfluss.

So untersuchten Fontanini et al. (32) das Tumorgewebe bei 105 operierten Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom und wiesen in einer univariaten Analyse eine Korrelation von VEGF-Aktivität mit dem Tumorstadium nach. In einer multivariaten Analyse erwies sich VEGF als prognostisch unabhängiger Faktor auf die Überlebenszeit und die rezidiv- bzw. metastasenfreie Zeit. Oshika et al. (91) führten eine RT-PCR-Messung im Gewebe von 76 operierten Patienten durch und stellten eine vermehrte Expression der VEGF-Isoform 189 im resezierten Tumor im Vergleich zum extraneoplastischen Lungengewebe fest. Die VEGF 189-positive Gruppe zeigte eine schlechtere Prognose als die VEGF 189-negative Vergleichsgruppe. Aikawa et al. (1) und Yuan et al. (131) wiesen bei der Untersuchung von reseziertem Tumorgewebe beim operierten, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom eine Korrelation von VEGF-Expression mit dem Tumorstadium nach. Bei den 72 Patienten im Kollektiv von Yuan et al. (131) zeigten sich darüber hinaus bei der RT-PCR-Messung eine Korrelation der VEGF mRNA-Expression mit der Überlebenszeit und der rezidivfreien Zeit. In einer multivariaten Analyse waren VEGF und der Lymphknotenstatus die wichtigsten prognostisch unabhängigen Einflussfaktoren (siehe Tab. 18).

Autor	Patientenkollektiv	Medium	Ergebnis
O`Byrne et al. 2000 (86)	n=223 NSCLC	Tumorgewebe	kein prognostischer Einfluss
Decaussin et al.1999 (23)	n=69 NSCLC Stadium I-II	Tumorgewebe	kein prognostischer Einfluss
Fontanini et al. 1997 (32)	n=105 NSCLC	Tumorgewebe	Korrelation mit Tumorstadium prognostisch unabhängiger Faktor
Oshika et al. 1998 (91)	n=76 NSCLC	Tumorgewebe	VEGF 189 vermehrt exprimiert univariat prognostischer Einfluss
Yuan et al. 2000 (131)	n=72 NSCLC	Tumorgewebe	Korrelation mit Tumorstadium prognostisch unabhängiger Faktor

Aikawa et al. 1999 (1)	n=112 NSCLC	Tumorgewebe	Korrelation mit Tumorstadium
---------------------------	----------------	-------------	------------------------------

Tab. 18 Rolle der VEGF-Expression in Tumorgewebsschnitten beim nicht-kleinzelligen operierten Bronchialkarzinom

VEGF wird unter anderem auch von neutrophilen Granulozyten (76), Monozyten (45) und Fibroblasten (90) freigesetzt. Salgado et al. (101) untersuchten das Serum von 50 Patienten mit unterschiedlichen Tumoren und stellten fest, dass die VEGF-Serumwerte mit den Thrombozytenzahlen und den Interleukin-6-Serumwerten korrelierten. Zu einem ähnlichem Ergebnis kamen Verheul et al. (120), welche VEGF-Konzentrationen im Serum von 27 Patienten mit Brustkrebs analysierten. Die Serumwerte waren einerseits signifikant höher als die Plasmakonzentrationen, darüber hinaus korrelierten auch hier die VEGF-Werte mit den Thrombozytenzahlen. Daraus folgerten Verheul et al. (120), dass VEGF auch von Thrombozyten freigesetzt wird und dass die Thrombozyten möglicherweise eine wichtige Rolle als Träger und Freisetzer angiogenetischer Faktoren spielen.

Salgado et al. (101) verwiesen zusätzlich auf den Effekt des Interleukin-6, welches eine thrombopoetische Wirkung und einen Einfluss auf den VEGF-Gehalt der Thrombozyten habe. Da die im Serum gemessenen VEGF-Werte wahrscheinlich die biologische Aktivität des VEGF widerspiegeln, schlugen Salgado et al. vor, VEGF nicht im Plasma, sondern im Serum oder Vollblut zu messen. Dies widerspricht den Empfehlungen von Banks et al. (8). Aufgrund der VEGF-Freisetzung aus den Thrombozyten während des Gerinnungsprozesses halten sie Serum zur Messung von VEGF für ungeeignet. Sie empfehlen die Verwendung von Citratplasma unter Verarbeitung der Probe innerhalb 1 Stunde nach der Venenpunktion. Es muss in dieser Arbeit darauf verwiesen werden, dass die gemessenen VEGF-Serumwerte signifikant über den VEGF-Konzentrationen der vom Hersteller angegebenen Serumwerte der Kontrollgruppe lagen. Die Erhöhung der Werte kann also nicht allein durch eine Freisetzung aus normalen Thrombozyten erklärt werden.

Hinweise darauf, dass der Tumor direkt zur Erhöhung der VEGF-Serumkonzentrationen beiträgt, geben die Arbeiten von Yuan et al. (131), Oshika et al. (91) und Ohta et al.

(87), welche mRNA in den Tumorzellen mittels RT-PCR nachwiesen. Imoto et al. (53) untersuchten neben den VEGF-Serumwerten auch die VEGF-Expression in den Tumorzellen mit einer immunhistochemischen Färbung. Bei dieser Messung gingen VEGF-positive Tumorzellen jedoch nicht mit signifikant höheren VEGF-Serumwerten einher. Die Frage, ob und zu welchem Anteil der Tumor die Erhöhung der VEGF-Werte bewirkt, bleibt bisher ungeklärt. Serum bietet sich als diagnostisches Mittel durch die geringe Invasivität und die Einfachheit der Untersuchung an. Eine Untersuchung von Tumorgewebe zur präoperativen Prognoseeinschätzung erscheint routinemässig nur schwer praktikabel.

VEGF hatte bei Messung der Serumwerte in allen bisher veröffentlichten Untersuchungen keinen prognostischen Einfluss. Bei Imoto et al. und Gregorc et al. (38, 53) lag eine Assoziation mit dem Tumorstadium vor, wobei letztere ein kleineres Kollektiv (n=38) als in der vorliegenden Arbeit untersuchten. Auch der prognostische Stellenwert der VEGF-Expression im Tumorgewebe auf die Überlebenszeit wird in der Literatur kontrovers diskutiert (siehe Tab. 18).

In der vorliegenden Arbeit korrelierten in einer univariaten Analyse die VEGF-Serumwerte signifikant mit der Überlebenszeit und dem Tumorstadium. Bei der multivariaten Analyse war VEGF jedoch kein unabhängiger prognostischer Faktor.

4.2 MMP-9-Serumwerte beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom

In zwei Untersuchungen wurden bisher MMP-9-Serumwerte beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom gemessen, wobei die Patientenzahl 73 und 90 betrug (51, 130). In dieser Untersuchung liegt die Grösse des Patientenkollektivs deutlich über den bisher untersuchten Kollektiven. Im Kollektiv von Iizasa et al. (51) war der Anteil an Patienten mit Adenokarzinomen 52% (n=38), mit Plattenepithelkarzinomen 34% (n=25), mit grosszelligen Karzinomen 11% (n=8) und mit adenosquamösen Karzinomen 3% (n=2). Bei Ylisirnio et al. (130) waren im Patientengut 41% Plattenepithelkarzinome (n=37), 24% Adenokarzinome (n=22), 12% kleinzellige Karzinome und 22% (n=20) andere histologische Typen, welche nicht näher erläutert wurden. Im Vergleich mit den oben genannten Untersuchungen ist der Anteil an Plattenepithelkarzinomen in diesem Kollektiv (n=118) mit 35% dem von Iizasa et al. ähnlich, der Anteil an

Adenokarzinomen liegt mit 39% etwa im Mittel beider Kollektive. Der Anteil grosszelliger Tumoren liegt in diesem Kollektiv mit 26% deutlich über dem der anderen Untersuchungen. Bei Iizasa et al. betrug der Frauenanteil nur 7% und bei Ylisirnio et al. 39%.

Bei der Geschlechtsverteilung, liegt der Anteil an Frauen in der vorliegenden Arbeit mit 25% zwischen beiden Untersuchungen. Das mittlere Alter lag bei Iizasa et al. bei 67 Jahren; bei Ylisirnio et al. betrug es 65 Jahre. In diesem Patientenkollektiv lag das mittlere Alter mit 63 Jahren leichtgradig unter dem der anderen Untersuchungen.

Iizasa et al. (51) führten eine Messung der präoperativen MMP-9-Plasmawerte mit Hilfe eines ELISA-Verfahrens durch. Er benutzte einen Immunoassay Kit der Firma Fuji Chemical Industries (Japan) und färbte zusätzlich immunhistochemisch reseziertes Tumorgewebe, um die MMP-9-, MMP-2-, TIMP-1-, und TIMP-2-Expression zu bestimmen. Die MMP-9-Plasmaspiegel waren im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht. Eine Korrelation mit dem Tumorstadium konnte nicht nachgewiesen werden; eine Korrelation mit dem Alter, dem Geschlecht, dem Tumorstadium und der Metastasierung lag nicht vor. Die MMP-9-Plasmaspiegel wurden nicht auf eine Korrelation mit der Überlebenszeit untersucht, so dass keine Aussage über den prognostischen Einfluss von MMP-9 gemacht werden konnte. Auch Ylisirnio et al. (130) bestimmten bei 90 operierten Patienten mit NSCLC die präoperative MMP-9-Konzentration mit Hilfe eines ELISA-Verfahrens. Er benutzte dabei eine Mikrotiter-Platte der Firma Nunc Maxisorb (Dänemark) und führte zusätzlich eine Messung der TIMP-1-, TIMP-2- und MMP-2/TIMP-2-Komplex-Konzentrationen durch. Die MMP-9-Plasma- und Serumwerte waren im metastasierten Stadium nicht signifikant höher als beim nicht-metastasierten Tumorstadium. In einer univariaten Analyse korrelierten hohe MMP-9-Plasmawerte (>30 ng/ml) signifikant mit einer schlechteren 1-Jahres-Überlebensrate (31%). Eine ähnliche Korrelation zeigte sich bei TIMP-1-Plasmawerten, auch hier hatten hohe Werte einen ungünstigen Einfluss auf das Überleben. Bei einer multivariaten Analyse waren allerdings nur TIMP-1, das Tumorstadium und das Operationsergebnis von prognostisch unabhängigem Einfluss, hingegen war MMP-9 kein signifikanter Einflussfaktor (Tab. 19).

Autor	Patientenkollektiv	Medium	Ergebnis
lizasa et al. 1999 (51)	n=73 NSCLC	Plasma	signifikant erhöhte Plasmawerte keine Analyse des prognostischen Einflusses
Ylisirnio et al. 2000 (130)	n=90 NSCLC (n=79) und SCLC (n=11)	Plasma + Serum	Korrelation mit Überlebenszeit kein unabhängiger prognostischer Faktor

Tab. 19 Rolle der MMP-9-Serumwerte beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom in der Literatur

In den meisten Arbeiten, in denen MMP-9 beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom untersucht wurde, erfolgte eine immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes. So führten Fujise et al. (36) eine Messung der MMP-9-Expression im Tumorgewebe bei 90 operierten Patienten ohne adjuvante Therapie durch und stellten keine signifikante Korrelation zwischen der MMP-9-Expression und der Überlebenszeit fest. Auch eine Korrelation mit dem Tumorstadium lag nicht vor. Kodate et al. (60) färbten Tumorgewebsschnitte von 79 Patienten mit bronchopulmonalem Adenokarzinom mit T1-Status. In einer univariaten Analyse korrelierte die MMP-9 positive Reaktivität signifikant mit der Überlebenszeit. Cox et al. (18) untersuchten bei 169 operierten Patienten im Stadium I-IIIa die MMP-9-Expression in Tumorgewebsschnitten und fanden keine signifikante Korrelation mit dem Tumorstadium. Die MMP-9-Expression der Tumorzellen korrelierte bei dieser Untersuchung allerdings mit der Überlebenszeit und war darüber hinaus ein unabhängiger prognostischer Faktor, wobei der prognostische Einfluss des Lymphknotenstatus noch grösser war (Tab. 20).

Autor	Patientenkollektiv	Medium	Ergebnis
Fujise et al. 2000 (35)	n=90 NSCLC I-IV	Tumorgewebe	keine Korrelation der MMP-9- Expression mit der Überlebenszeit
Kodate et al. 1997 (59)	n=79 Adenokarzinome, T1-Status	Tumorgewebe	Korrelation der MMP-9-Expression mit der Überlebenszeit keine multivariate Analyse
Cox et al. 2000 (17)	n=169 NSCLC Stadium I-IIIa	Tumorgewebe	Korrelation der MMP-9-Expression mit der Überlebenszeit unabhängiger prognostischer Faktor

Tab. 20 Rolle der MMP-9-Expression in Tumorgewebsschnitten beim nicht-kleinzelligen, operierten Bronchialkarzinom

MMP-9 wird von vielen verschiedenen Zellen, unter anderem Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen, Keratinozyten, Fibroblasten, Osteoklasten, Endothelzellen und verschiedenen Tumorzellen freigesetzt (37, 39, 55, 61, 65, 89, 117, 118, 126). Fernandez-Patron et al. (29) wiesen darüber hinaus MMP-9 auch in den Thrombozyten nach, und Majka et al. (70) beschrieben eine Freisetzung von MMP-9 aus Megakaryozyten.

Iizasa et al. (51) führten neben der Bestimmung der MMP-9-Serumkonzentration zusätzlich eine immunhistochemische Färbung von Tumorgewebsschnitten durch. Sie stellten keine Korrelation zwischen der MMP-9-Expression im Tumor und der Serumkonzentration fest. Die Häufigkeit MMP-9-exprimierender Tumore war im untersuchten Kollektiv geringer als die Häufigkeit erhöhter Serumkonzentrationen. In einigen Fällen waren Makrophagen innerhalb des Tumorgewebes MMP-9 positiv, ohne dass weitere inflammatorische Zellen nachweisbar waren. Aus diesem Grund vermuteten Iizasa et al., dass die Makrophagen, welche MMP-9 produzieren können, für die erhöhten MMP-9-Serumwerte verantwortlich waren.

Ylisirnio et al. (130) wiesen neben erhöhten MMP-9-Werten auch signifikant erhöhte Werte des Metalloproteinase-Inhibitors TIMP-1 nach. Auch TIMP-1 war ein prognostisch unabhängiger Faktor in dem untersuchten Patientenkollektiv. Die Frage, welcher Anteil des MMP-9 biologisch aktiv war, bleibt in der Untersuchung von Ylisirnio et al. unbeantwortet. Auch in dieser Arbeit steht eine Klärung aus, da der ELISA von R&D Systems nur zur Bestimmung des gesamten MMP-9 (aktives und inaktives MMP-9) geeignet ist. Bei der Bestimmung von MMP-9 im Serum, muss auf eine ähnliche Problematik wie beim VEGF verwiesen werden, da es bei der Blutgerinnung zu einer Freisetzung von MMP-9 aus den Thrombozyten kommen kann. Nach Angaben des Herstellers liegen die MMP-9-Plasmawerte deutlich unter den Serumwerten. Es ist also parallel zur VEGF-Messung auch hier zu diskutieren, ob die MMP-9-Konzentration im Serum die biologische Aktivität bzw. das zirkulierende MMP-9 reflektiert. In dieser Untersuchung waren die MMP-9-Serumwerte signifikant über den vom Hersteller angegebenen Serumwerten der gesunden Kontrollgruppe. Daher ist eine Freisetzung aus normalen Thrombozyten als alleinige Erklärung für erhöhte MMP-9-Serumwerte in diesem Kollektiv nicht ausreichend.

Dies ist nach dem heutigen Wissensstand die erste Analyse, bei der VEGF und gleichzeitig MMP-9 vergleichend auf ihren prognostischen Wert beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom untersucht wurden. MMP-9 war in dieser Untersuchung im Gegensatz zur den Ergebnissen von Ylisirnio et al. (130) ein prognostisch unabhängiger Einflussfaktor. VEGF, welches in mehreren Untersuchungen und auch in dieser Analyse mit der Überlebenszeit korrelierte, zeigte in der multivariaten Analyse geringeren prognostischen Einfluss als das MMP-9. Darüber hinaus ist dies nach dem heutigen Wissensstand die erste Untersuchung beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, bei der eine Korrelation von MMP-9-Serumspiegeln mit dem Tumorstadium festgestellt werden konnte (51, 130, 44). Es gilt zu diskutieren, ob der Einfluss von MMP-9 bei der Metastasierung und Krankheitsprogression beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom grösser ist als der von VEGF. Welchen Anteil der Tumor an der MMP-9-Freisetzung hat und ob die MMP-9-Serumwerte von grösserer prognostischer Aussagekraft sind als immunhistochemische Tumorfärbungen, muss in weiteren Untersuchungen geprüft werden.

4.3 Thrombozyten beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom

Die Patientenzahlen der hier zitierten Arbeiten variieren erheblich (von 118 bis 1115 Patienten (93, 19)). Miron et al. (78) untersuchten bei 236 Patienten mit nicht-operablem NSCLC 36 Variablen auf ihren prognostischen Einfluss, unter anderem die Thrombozytenzahl vor Therapiebeginn. In einer univariaten Analyse korrelierten die Thrombozytenwerte signifikant mit der Überlebenszeit, bei der multivariaten Cox-Regressionsanalyse waren diese jedoch kein unabhängiger prognostischer Faktor. Constantini et al. (15) untersuchten die Thrombozytenwerte bei 714 Patienten mit Kolonkarzinom, kleinzelligem und nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom. Im Vergleich zu den anderen Tumortypen, zeigten Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom eine erhöhte Prävalenz einer Thrombozytose ($>400.000/\text{mm}^3$), höhere Thrombozyten-Mittelwerte, geringe Veränderung der Werte bei Progression und keine Korrelation zwischen Dosierung der Zytostatika und den Thrombozytenzahlen. Im Gegensatz dazu gab es eine inverse Korrelation zwischen Zytostatikadosierung und Thrombozytenwerten beim kleinzelligen Bronchialkarzinom, hier nahmen die Werte mit Krankheitsprogression deutlich ab. Bei allen drei Tumortypen gab es eine Korrelation zwischen den Thrombozytenzahlen und anderen Indikatoren der Knochen-

marksfunktion, wie z.B. Hämoglobinwert (negative Korrelation), Leukozytenzahlen (positive Korrelation) sowie den Fibrinogenwerten (positive Korrelation).

Pedersen et al. (93) führten eine Messung der Thrombozytenzahlen bei 1115 Patienten mit bronchopulmonalem Karzinom durch und stellten ebenfalls signifikant erhöhte Thrombozytenwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe mit benignen Lungenerkrankungen fest. Die Werte waren im fortgeschrittenen Tumorstadium (Stadium III und IV) signifikant höher als im frühen Tumorstadium (Stadium I und II) und korrelierten negativ signifikant mit der Überlebenszeit. In einer multivariaten Analyse waren die Thrombozytenwerte ein prognostisch unabhängiger Faktor. Cox et al. (19) analysierten bei 181 Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom, welche im Stadium I-IIIa operiert wurden, den prognostischen Einfluss der Thrombozytenzahl. Es stellte sich heraus, dass der präoperative Medianwert der Thrombozytenwerte im Vergleich zu Normalwerten ($>400.000 \text{ mm}^3$) signifikant erhöht war und dass hohe Werte mit einer geringeren Überlebenszeit assoziiert waren. In einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse waren die Thrombozytenwerte neben dem Lymphknotenstatus und der Tumervaskularisation (microvessel count) ein prognostisch unabhängiger Faktor (Tab.21).

Autor	Patientenkollektiv	Ergebnis
Miron et al. 1998 (78)	n=236 NSCLC (fortgeschritten)	Untersuchung von 36 Variablen : univariat prognostischer Einfluss multivariat kein prognostisch unabhängiger Faktor
Constantini et al. 1990 (15)	n=174 NSCLC (fortgeschritten), SCLC und Colon- karzinom	höhere Prävalenz für eine Thrombozytose beim NSCLC höhere prätherapeutische und mittlere Thrombozytenwerte beim NSCLC Korrelation mit Indikatoren der KM-Funktion
Pedersen et al. 1996 (93)	n=1115 NSCLC und SCLC	signifikant erhöhte Thrombozytenwerte Korrelation mit Tumorstadium und Überlebenszeit unabhängiger prognostischer Faktor
Cox et al. 2000 (19)	n=118 NSCLC I-IIIa (operiert)	erhöhte präoperative Thrombozytenwerte Korrelation mit der Überlebenszeit prognostisch unabhängiger Faktor

Tab. 21 Rolle der Thrombozytenwerte beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom in der Literatur

Ein prognostischer Einfluss der Thrombozytenwerte beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom war das Ergebnis von Miron et al. (78), Pedersen et al. (93) und Cox et al. (19). In dieser Arbeit waren die Thrombozytenwerte ein prognostisch unabhängiger Faktor, was mit den Ergebnissen von Cox et al. (19) und Pedersen et al. (93) bei wesentlich grösserer Patientenzahl übereinstimmt. Aufgrund einer Korrelation der Thrombozytenwerte mit anderen Indikatoren der Knochenmarkfunktion (s.o.) postulierten Constantini et al. (15), dass die Reaktion des Körpers auf eine maligne Erkrankung in Form von Knochenmark-stimulierenden Zytokinen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Thrombozytenwerte bei Neoplasien spielt. Es scheint eine ausgeprägte und persistierende Knochenmarkstimulation vor allem beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom zu existieren. Auch Cox et al. (19) führen als mögliche Ursache für die erhöhten Thrombozytenwerte das Interleukin-6 an, welches möglicherweise bei Hypoxie von den Tumorzellen freigesetzt wird und ein potenter Stimulator der Thrombozytenproliferation ist.

Die Untersuchungen von Baatout et al. (7) und Imai et al. (52) weisen auf einen bedeutenden Einfluss des Interleukin-6 auf die Megakaryopoese hin. Eine Freisetzung des Interleukin-6 wurde z.B. von Watson et al. (124) beim Ovarialkarzinom nachgewiesen. Eine vermehrte Freisetzung von Knochenmark-stimulierenden Zytokinen erfolgt allerdings auch bei einer unspezifischen Entzündungsreaktionen. Ob eine vermehrte Freisetzung von Zytokinen durch den Tumor selbst oder andere Ursachen für die erhöhten Thrombozytenzahlen beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom verantwortlich sind, ist zur Zeit noch ungeklärt.

Da die Thrombozyten unter anderem Träger angiogenetischer und angiostatischer Faktoren sind, ist zu diskutieren, ob die vermehrte Freisetzung dieser Faktoren den prognostischen Einfluss der Thrombozytenzahlen erklärt. Salgado et al. (101) untersuchten VEGF-Serumwerte bei 50 Patienten und fanden eine positive Korrelation zwischen den Thrombozytenwerten und der VEGF-Serumkonzentration, darüber hinaus eine ebenfalls positive Korrelation zwischen den Thrombozytenzahlen und den Interleukin-6-Werten. Hohe Interleukin-6-Werte und eine Thrombozytose waren mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Sie erklärten ihre Ergebnisse mit dem thrombopoetischen Effekt des Interleukin-6 und dem Gehalt von aktivem VEGF

innerhalb der Thrombozyten, der möglicherweise zu einer Stimulation des Tumor- und Metastasenwachstums führe.

In dieser Untersuchung war die positive Korrelation zwischen den VEGF- bzw. MMP-9-Serumspiegeln und der Thrombozytenzahl (Korrelationskoeffizient 0,3) nur schwach ausgeprägt. Über die Konzentration von VEGF- bzw. MMP-9 innerhalb der Thrombozyten kann mit der in dieser Arbeit angewendeten Messmethode keine Aussage gemacht werden.

Das Interleukin-6 trägt als Akut-Phase-Protein neben einer Thrombozytose auch zu einer Anämie, Leukozytose und Gewichtsverlust bei, was ebenfalls Einfluss auf die Überlebenszeit eines Tumorpatienten hat. Ob die Thrombozytose tatsächlich Einfluss auf die Überlebenszeit hat oder nur einen Nebeneffekt anderer prognostisch beeinflussender Faktoren darstellt, bleibt unklar.

4.4 Hämoglobin beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom

Der prognostische Einfluss des Hämoglobin beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom wurde in vielen wissenschaftlichen Arbeiten untersucht. Albain et al. (2) untersuchten das grösste Kollektiv mit 2531 chemotherapierten Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium und Wilhelm et al. (125) mit 96 nur radiotherapierten Patienten das kleinste Kollektiv. Albain et al. und Wilhelm et al. untersuchten Patienten im Stadium IIIB-IV, hingegen analysierten Jazieh et al. (56) nur Patienten im frühen Tumorstadium (Stadium I-II).

Albain et al. (2) analysierten bei 2531 Patienten mit ausgedehnter Erkrankung (Fernmetastasen oder lokoregionale Rezidive) mehrere prognostische Faktoren auf ihren unabhängigen prognostischen Einfluss. Hier waren ein guter Karnofsky-Index, das weibliche Geschlecht und ein Alter ≥ 70 Jahre signifikante unabhängige, prognostisch günstige Einflussfaktoren im gesamten Kollektiv. In einer weiteren Cox-Regressions-Analyse, welche nur Patienten mit gutem Karnofsky-Index einschloss, waren ein Hb-Wert von ≥ 11 g/dl, eine normale LDH, ein normales Calcium und ein Metastasierungsort unabhängige, prognostisch günstige Einflussfaktoren.

Eine Einteilung in Untergruppen nahmen Wilhelm et al. (125) vor, wobei 96 Patienten mit radiotherapiertem NSCLC in 3 Klassen (Hb < 11 g/dl, Hb 11-15 g/dl, Hb > 15 g/dl) unterteilt wurden. Die Faktoren Tumorphistologie, Geschlecht, Alter, Dosis und

Fraktionierung waren in den einzelnen Gruppen annähernd gleich. Es zeigte sich, dass ein hoher initialer Hb-Wert von positiver prognostischer Bedeutung war.

In einer Analyse von Jazieh et al. (56) mit 454 operierten Patienten im Tumorstadium I-II war der Hb-Wert von prognostischem Einfluss auf die Überlebenszeit und die rezidiv- bzw. metastasenfreie Zeit. Patienten mit einem Hb ≥ 10 g/dl hatten eine signifikant längere Überlebenszeit als Patienten mit einem Hb < 10 g/dl. In einer multivariaten Analyse waren das Alter, das Tumorstadium und der Hb-Wert von prognostisch unabhängigem Einfluss (Tab. 22).

Autor	Patientenkollektiv	Ergebnis
Albain et al. 1991 (2)	n=2531 NSCLC Stadium IV chemo- und radiotherapiert	univariat prognostischer Faktor im gesamten Kollektiv in Kollektiv mit guten Karnofsky-Index: unabhängiger prognostischer Faktor
Wilhelm et al. 1998 (125)	n=96 NSCLC Stadium IIIB-IV nur radiotherapiert	Hb > 15g/dl bessere Prognose vs Hb < 11g/dl
Jazieh et al. 2000 (56)	n=454 NSCLC Stadium I-II operiert	unabhängiger prognostischer Faktor

Tab. 22 Rolle des Hämoglobinwertes vor Therapiebeginn beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom in der Literatur

Bei allen Untersuchungen innerhalb der letzten 10 Jahre hatte der Hb-Wert beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom prognostischen Einfluss und war bei den meisten ein prognostisch unabhängiger Faktor (2, 26, 56, 71, 112, 125). Eine Korrelation der Hb-Werte mit dem Tumorstadium ist nach dem heutigen Wissensstand beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom bisher noch nicht erfolgt.

Bei vielen malignen Erkrankungen besteht eine Anämie aufgrund mangelnder Freisetzung von Eisen aus dem retikuloendothelialen System. Desweiteren besteht oft auch eine insuffiziente Erythropoetinfreisetzung und eine Supprimierung der Erythropoese im Knochenmark durch Zytokine wie z.B. Interleukin-1, Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor. Es wird diskutiert, dass eine geringere Sauerstoffspannung bzw. Radikalbildung innerhalb der Tumorzellen für ein geringeres Ansprechen auf die Radiotherapie verantwortlich ist (125). Möglicherweise führt eine Anämie zu einer

geringeren Teilungsrate der Tumorzellen, was für ein geringeres Ansprechen auf eine Chemotherapie verantwortlich sein könnte. Einen Zusammenhang zwischen dem Hb-Wert und der Angiogenese diskutieren Dunst et al. (27) bei der Untersuchung an 54 Patienten mit unterschiedlichen Tumoren. Bei niedrigen Hämoglobinwerten waren die VEGF-Serumkonzentrationen signifikant erhöht. Sie interpretierten ihre Ergebnisse so, dass möglicherweise bei einer Anämie eine vermehrte VEGF-Sekretion durch Hypoxie induziert wird. Die durch Hypoxie bedingte Stimulation der Angiogenese könnte also ein weiterer Erklärungsansatz für den prognostischen Einfluss der Hämoglobinwerte sein.

4.5 Fibrinogen beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom

Der Stellenwert der Fibrinogenkonzentration ist beim Bronchialkarzinom in mehreren Arbeiten untersucht worden. Bei den hier zitierten Arbeiten wurde von van Wersch et al. (119) das kleinste (n=48) und von Yamaguchi et al. (129) das grösste Kollektiv (n=339) untersucht. Van Wersch et al. (119) führte bei 48 Patienten mit einem Bronchialkarzinom eine Gerinnungsanalyse durch. Unter anderem wurde die Fibrinogenkonzentration gemessen, welche bei einem hohen Prozentsatz (70,8%) der Patienten erhöht war. Eine Korrelation mit der Überlebenszeit wurde nicht durchgeführt. Wojtukiewicz et al. (127) untersuchten die Fibrinogenkonzentration bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom. Hohe Fibrinogenwerte waren mit einer kurzen Überlebenszeit assoziiert und von prognostischer Signifikanz. Yamaguchi et al. (129) untersuchten Fibrinogen- und Interleukin-6-Plasmawerte bei 339 Patienten mit Bronchialkarzinom ohne Pleuraerguss. Hier waren die Fibrinogenwerte bei 48,4 % aller Patienten (n=164) erhöht. Dabei war die Häufigkeit erhöhter Fibrinogenwerte im fortgeschrittenen Stadium grösser als im frühen Tumorstadium, besonders bei Plattenepithelkarzinomen und grosszelligen Karzinomen. Sie verwiesen auf die Akut-Phase-Reaktion, die unter anderem durch Interleukin-6 induziert wird und bei Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium zu erhöhten Fibrinogenwerten führt.

Als mögliche Erklärung für die Korrelation der Fibrinogenkonzentrationen mit der Überlebenszeit kann der Einfluss des Fibrinogens auf das Tumorwachstum genannt werden, wie er von Constantini et al. 1991 beschrieben wurde (16). Es wurde auch von Atagi et al. (1992) eine Inhibition der zellvermittelten Immunantwort auf maligne

Zellen beschrieben (6). Biggerstaff et al. (9) untersuchten die Thrombozytenadhäsion an Tumorzellen und stellten eine durch Fibrin-Monomere gesteigerte Adhäsion fest. Sie beobachteten eine vermehrte Lungenmetastasierung bei Behandlung von Tumoren mit Fibrin-Monomeren. Da bei erhöhter Fibrinogenkonzentration auch vermehrt Fibrin-Monomere entstehen, muss diskutiert werden, ob dies eine vermehrte Thrombozytenaggregation am Tumor bewirkt. Auf diese Weise wäre es möglich, dass eine Freisetzung von angiogenetischen Faktoren wie VEGF oder MMP-9 aus Thrombozyten das Tumorwachstum und somit die Prognose beeinflusst.

4.6 Therapeutische Konsequenzen der Ergebnisse

Inhibitoren der Angiogenese unterscheiden sich von der konventionellen zytotoxischen Chemotherapie, indem sie vor allem auf normale Endothelzellen wirken. Ein grosses Problem beim Einsatz von Zytostatika kann die Entstehung von Medikamenten-Resistenzen sein, da die meisten Tumorzellen genetisch instabil sind. Da Endothelzellen in der Regel genetisch stabiler sind als Tumorzellen, ist die Entstehung einer Resistenz gegenüber Inhibitoren der Angiogenese weniger wahrscheinlich (100).

Man kann die neu entwickelten Wirkstoffe zur Angiogenese-Hemmung in drei Substanzklassen einteilen: 1. Hemmer von Endothelzellen, 2. Blocker von Angiogenese-Aktivatoren (5, 7, 11, 25, 63, 73, 100) und 3. Blocker des Abbaus der extrazellulären Matrix (3, 21, 24, 41, 57, 100, 107, 123, 132).

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die starke Bedeutung der Matrixmetalloproteinase-9 bei der Tumorprogression. Da MMP-9 einen grösseren Einfluss auf die Prognose als VEGF zeigte, liegt die Vermutung nahe, dass eine Blockade von MMP-9 einen grösseren Effekt haben könnte als die VEGF-Inhibition. Möglicherweise wäre eine selektive Inhibition von MMP-9 sogar noch effektiver als die Wirkung der bisher entwickelten MMP-Inhibitoren. Da die Angiogenese jedoch ein multifaktorielles Geschehen ist, wird möglicherweise nur eine sequentielle Blockade mehrerer Faktoren, maximale Effekte auf die Tumorprogression erreichen.

5. Zusammenfassung

Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) und vascular endothelial growth factor (VEGF) sind Proteine, die im angiogenetischen Prozess eine wichtige Rolle spielen. Bei 118 Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom mit Stadium I-IV wurden MMP-9- und VEGF-Serumwerte vor Therapiebeginn bestimmt.

Die MMP-9- und VEGF-Konzentrationen waren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Es wurde eine signifikante negative Korrelation zwischen den MMP-9- und der VEGF- Serumwerten und der Tumorausbreitung gefunden. Desweiteren waren die MMP-9- und VEGF- Serumspiegel mit der Fibrinogenkonzentration und invers mit dem Hämoglobingehalt signifikant assoziiert. Patienten, die innerhalb eines Jahres verstarben, hatten signifikant höhere MMP-9- und VEGF-Serumspiegel als die, welche länger als 1 Jahr überlebten. MMP-9- und VEGF-Werte hatten in der univariaten Analyse beide signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit. In der multivariaten Analyse waren jedoch nur der Karnofsky-Index, die Thrombozytenzahl, der Hämoglobinwert und die MMP-9-Serumwerte prognostisch unabhängige Faktoren. Das Tumorstadium, die Tumorhistologie, das Geschlecht, das Alter, die LDH-Konzentration und der VEGF-Serumspiegel hatten in dem untersuchten Kollektiv keinen prognostisch unabhängigen Einfluss.

Bei den operierten Patienten korrelierte das Auftreten eines Rezidivs signifikant mit erhöhten MMP-9-Serumspiegeln. Neben klassischen prognostischen Faktoren wie Tumorstadium und Karnofsky-Index scheint der MMP-9-Serumspiegel ein neuer prognostischer Marker beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom zu sein, mit dem die Patienten in hoch und niedrig Risikogruppen eingestuft werden können.

6. Literaturverzeichnis

1. Aikawa H, Takahashi H (1999) Immunohistochemical study on tumor angiogenic factors in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 19(5B):4305-9
2. Albain KS, Crowley JJ (1991) Survival determinants in extensive-stage non-small-cell lung cancer: the Southwest Oncology Group experience. *J Clin Oncol* 9(9):1618-26
3. Alves F, Borchers U (2001) Inhibitory effect of a matrix metalloproteinase inhibitor on growth and spread of human pancreatic ductal adenocarcinoma evaluated in an orthotopic severe combined immunodeficient (SCID) mouse model. *Cancer Lett* 165(2):161-70
4. Angeletti CA, Lucchi M (1996) Prognostic significance of tumoral angiogenesis in completely resected late stage lung carcinoma (stage IIIA-N2). Impact of adjuvant therapies in subset of patients at high risk of recurrence. *Cancer* 78(3):409-15
5. Asano M, Yukita A (1999) Wide spectrum of antitumor activity of neutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor. *Jpn J Cancer Res* 90(1):93-100
6. Atagi S, Sone S (1992) Inhibition by fibrin coagulation of lung cancer cell destruction by human interleukin-2-activated killer cells. *Jpn J Cancer Res* 83(10):1088-94
7. Baatout S (1996) Interleukin-6 and megakaryocytopoiesis: an update. *Ann Hematol* 73(4):157-62
8. Banks RE, Forbes MA (1998) Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 77(6):956-64

9. Biggerstaff JP, Seth N (1999) Soluble fibrin augments platelet/tumor cell adherence in vitro and in vivo, and enhances experimental metastasis. *Clin Exp Metastasis* 17(8):723-30
10. Brattstrom D, Bergqvist M (1998) Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera from non-small cell lung cancer patients. *Anticancer Res* 18(2A):1123-7
11. Brekken RA, Overholser JP (2000) Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Flk-1) activity by monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res* 60(18):5117-24
12. Brown PD, Bloxidge RE (1993) Association between expression of activated 72-kilodalton gelatinase and tumor spread in non-small-cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 85(7):574-8
13. Bunn PA Jr, Kelly K (1998) New chemotherapeutic agents prolong survival and improve quality of life in non-small cell lung cancer: A review of the literature and future directions. *Clin Can Res* 5:1087-1100
14. Bülzebruck H, Bopp R (1992) New aspects in the staging of lung cancer. *Cancer* 70: 1102-10
15. Constantini V, Zacharski LR (1990) The platelet count in carcinoma of the lung and colon. *Thromb Haemost* 64(4):501-5
16. Constantini V, Zacharski LR (1991) Fibrinogen deposition without thrombin generation in primary human breast cancer tissue. *Cancer Res* 51(1):349-53
17. Cox G, Jones JL (2000) Angiogenesis and non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 27(2):81-100

18. Cox G, Jones JL (2000) Matrix metalloproteinase 9 and the epidermal growth factor signal pathway in operable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 6(6):2349-55
19. Cox G, Walker RA (2000) Prognostic significance of platelet and microvessel counts in operable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 29(3):169-77
20. Danis RP, Ciulla TA (2001) Anti-angiogenic therapy of proliferative diabetic retinopathy. *jid100897346* 2(3):395-407
21. Davies B, Brown PD (1993) A synthetic matrix metalloproteinase inhibitor decreases tumor burden and prolongs survival of mice bearing human ovarian carcinoma xenografts. *Cancer Res* 53(9):2087-91
22. de Anta JM, Jassem E (1997) TP53 mutational pattern in Spanish and Polish non-small cell lung cancer patients: null mutations are associated with poor prognosis. *Oncogene* 15(24):2951-8
23. Decaussin M, Sartelet H (1999) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. *J Pathol* 188(4):369-77
24. Della Porta P, Soeltl R (1999) Combined treatment with serine protease inhibitor aprotinin and matrix metalloproteinase inhibitor Batimastat (BB-94) does not prevent invasion of human esophageal and ovarian carcinoma cells in vivo. *Anticancer Res* 19(5B):3809-16
25. Dreys J, Hofmann I (2000) Effects of PTK787/ZK222584, a specific inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, on primary tumor metastasis, vessel density and blood flow in a murine renal cell carcinoma model. *Cancer Res* 60(17):4819-24

26. Dong W, Zhao W (1996) Factors influencing long-term survival in patients with nonoperable lung cancer: an analysis by Cox model. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 18(5):339-42
27. Dunst J, Pigorsch S (1999) Low hemoglobin is associated with increased serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cancer patients. Does anemia stimulate angiogenesis? *Strahlenther Onkol* 175(3):93-6
28. Dvorak HF, Brown LF (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 146(5):1029-39
29. Fernandez-Patron C, Martinez-Cuesta MA (1999) Different regulation of platelet aggregation by matrix metalloproteinases -9 and -2. *Thromb Haemost* 82(6):1730-5
30. Fontanini G, Bigini D (1995) Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer. *J Pathol* 177(1):57-63
31. Fontanini G, Vignati S (1996) Neoangiogenesis: a putative marker of malignancy in non-small-cell lung cancer (NSCLC) development. *Int J Cancer* 67(5):615-9
32. Fontanini G, Vignati S (1997) Vascular endothelial growth factor is associated with neovascularization and influences progression of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 3(6):861-5
33. Fontanini G, Lucchi M (1997) Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small cell lung carcinoma: a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 89(12):881-6
34. Fontanini G, Vignati S (1997) Neoangiogenesis and p53 protein in lung cancer: their prognostic role and their relation with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *Br J Cancer* 75(9):1295-301
35. Fu XL, Zhu XZ (1999) Study of prognostic predictors for non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 23(2):143-52

36. Fujise N, Nanashim A (2000) Prognostic impact of cathepsin B and metalloproteinase-9 in pulmonary adenocarcinomas by immunohistochemical study. *Lung Cancer* 27(1):19-26
37. Gonzales-Avila G, Iturria C (1998) 72-kD (MMP-2) and 92-kD (MMP-9) type IV collagenase and activity in different histologic types of lung cancer cells. *Pathobiology* 66(1):5-16
38. Gregorc V, Ludovini V, Pistola S et al. (2000) Vascular endothelial growth factor serum levels (VEGFsl) in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients: correlation with histology and stage. *Ann Oncol* 11:124 (abstract 566)
39. Gress TM, Muller-Pillasch F (1995) Expression and in-situ localization of genes coding for extracellular matrix proteins and extracellular matrix degrading proteases in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 62(4):407-13
40. Guddo F, Fontanini G (1999) The expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in tumor-associated stromal cells and vessels is inversely correlated with non-small cell lung cancer progression. *Hum Pathol* 30(7):788-94
41. Heath EI, Grochow LB (2000) Clinical potential of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *Drugs* 59(5):1043-55
42. Hellwig-Burgel T, Rutkowski K (1999) Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 94(5):1561-7
43. Herold-Mende C, Steiner HH (1999) Expression and functional significance of vascular endothelial growth factor receptors in human tumor cells. *Lab Invest* 79(12):1573-82
44. Hrabec E, Strek M (2001) Elevated level of circulating matrix metalloproteinase-9 in patients with lung cancer. *Respir Med* 95(1):1-4

45. Hojo Y, Ikeda U (2000) Interaction between human monocytes and vascular smooth muscle cells induces vascular endothelial growth factor expression. *Atherosclerosis* 150(1):63-70
46. Hollstein M, Sidransky D (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* 253(5015):49-53
47. Holmgren L, O'Reilly MS (1995) Dormancy of micrometastasis: balanced proliferation and apoptosis in presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1(2):149-53
48. Huhtala P, Humphries MJ (1995) Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblast adhering to fibronectin. *J Cell Biol* 129(3):867-79
49. Huncharek M, Kupelnick B (2000) Prognostic significance of p53 mutations in non-small cell lung cancer : a meta-analysis of 829 cases from eight published studies. *Cancer Lett* 153(1-2):219-26
50. Ichinose Y, Hara N (1993) Is T factor of the TMN staging system a predominant prognostic factor in pathologic stage I non-small cell lung cancer? A multivariate prognostic factor analysis of 151 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 106(1):90-4
51. Iizasa T, Fujisawa T (1999) Elevated levels of circulating plasma matrix metalloproteinase 9 in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 5(1):149-53
52. Imai T, Koike K (1991) Interleukin-6 support human megakaryocytic proliferation and differentiation in vitro. *Blood* 78(8):1969-74
53. Imoto H, Osaki T (1998) Vascular endothelial growth factor expression in non-small-cell lung cancer: prognostic significance in squamous cell carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 115(5):1007-14

54. Ishida T, Kaneko S (1993) Proliferating cell nuclear antigen expression an argyrophilic nucleolar organizer regions as factors influencing prognosis of surgically treated lung cancer patients. *Cancer Res* 53(20):5000-3
55. Iwata H, Kobayashi S (1996) Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human breast carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 87(6):602-11
56. Jazieh AR, Hussain M (2000) Prognostic factors in patients with surgically resected stages I and II non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 70(4):1168-71
57. Johnston MR, Mullen JB (2001) Validation of an orthotopic model of human lung cancer with regional and systemic metastases. *Ann Thorac Surg* 71(4):1120-5
58. Khokha R, Zimmer MJ (1992) Up-regulation of TIMP-1 expression in B16-F10 melanoma cells supresses their metastatic ability in chick embryo. *Clin Exp Metastasis* 10(6):365-70
59. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG (1999) Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 43 Suppl:S42-51
60. Kodate M, Kasai T (1997) Expression of matrix metalloproteinase (gelatinase) in T1 adenocarcinoma of the lung. *Pathol Int* 47(7):461-9
61. Koide H, Nakamura T (1996) Increased mRNA expression of metalloproteinase-9 in peripheral blood monocytes from patients with immunoglobulin A nephropathy. *Am J Kidney Dis* 28(1):32-9
62. Krajewski S, Krajewska M (1994) Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol* 145(6):1323-36
63. Krystal GW, Honsawek S (2001) Indolinone tyrosine kinase inhibitors block kit activation and growth of small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 61(9):3660-3668

64. Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME (1998) Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases of release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc Res* 55(1):29-42
65. Larjava H, Lyons JG (1993) Anti-integrin antibodies induce type IV collagenase expression in keratinocytes. *J Cell Physiol* 157(1):190-200
66. Levy AP, Levy NS (1996) Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem* 271(5):2746-53
67. Levy NS, Chung S (1998) Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 273(11):6417-23
68. Macchiarini P, Fontanini G (1992) Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 340(8812):145-6
69. Macchiarini P, Fontanini G (1993) Blood vessel invasion by tumor cells predicts recurrence in completely resected T1 N0 M0 non-small-cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 106(1):80-9
70. Majka M, Janowska-Wieczorek A (2000) Stromal-derived factor 1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis. *Blood* 96(13):4142-51
71. Manegold C (1998) The causes and prognostic significance of low hemoglobin levels in tumor patients. *Strahlenther Onkol* 174 Suppl 4:17-9
72. Maniwa Y, Okada M (1998) Vascular endothelial growth factor increased by pulmonary surgery accelerates the growth of micrometastasis in metastatic lung cancer. *Chest* 114(6):1668-75
73. Marme´ D (2001) Tumorangiogenese: Neue Ansätze zur Krebstherapie. *Onkologie* 24 Suppl S1:1-5

74. Marme' D, Martiny-Baron G (1998) Strategien zur Hemmung der Tumorangiogenese am Beispiel des VEGF/VEGF-Reszeptorsystems. Forum DKG 13:364-367
75. Martins SJ, Pereira JR (1999) Clinical factors and prognosis in non-small cell lung cancer. Am J Clin Oncol 22(5):453-7
76. McCourt M, Wang JH (1999) Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis. Arch Surg 134(12):1325-31
77. McCulloch P, Choy A (1995) Association between tumor angiogenesis and tumor cell shedding into effluent venous blood during breast cancer surgery. Lancet 346(8986):1334-5
78. Miron L, Toma C (1998) The prognostic factors for survival in advanced forms of non-small-cell lung cancer (in Romanian). Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi 102(1-2):129-38
79. Moghaddam A, Bicknell R (1992) Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in Escherichia coli and confirmation of its thymidine phosphorylase activity. Biochemistry 31(48):12141-6
80. Moghaddam A, Zhang HT (1995) Thymidin phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth. Proc Natl Acad Sci USA 92(4):998-1002
81. Nagashima M, Yoshino S (1999) Inhibitory effects of anti-rheumatic drugs on vascular endothelial growth factor in cultured rheumatoid synovial cells. Clin Exp Immunol 116(2):360-5
82. Nelson AR, Fingleton B (2000) Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. J Clin Oncol 18(5):1135-49

83. Nelson NJ (1998) Inhibitors of angiogenesis enter phase III testing. *J Natl Cancer Inst* 90(13):960-3
84. Nguyen M, Strubel NA (1993) A role for sialyl Lewis-X/A glycoconjugates in capillary morphogenesis. *Nature* 365(6443):267-9
85. Niklinska W, Burzykowski T (2000) p53 gene mutation and protein expression in operable non-small cell lung cancer in Poland. *Eur J Cancer Prev* 9(2):81-7
86. O`Byrne KJ, Koukourakis MI (2000) Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 82(8):1427-32
87. Ohta Y, Endo Y (1996) Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* 2(8):1411-6
88. Ohta Y, Shridhar V (1999) VEGF and VEGF type C play an important role angiogenesis and lymphangiogenesis in human malignant mesothelioma tumors. *Br J Cancer* 81(1):54-61
89. Okamoto T, Akaike T (1997) Activation of human matrix metalloproteinases by various bacterial proteinases. *J Biol Chem* 272(9):6059-66
90. Orlandini M, Oliviero S (2001) In fibroblasts Vegf-D expression is induced by cell-cell contact mediated by cadherin-11. *J Biol Chem* 276(9):6576-6581
91. Oshika Y, Nakamura M (1998) Expression of cell-associated isoform of vascular endothelial growth factor 189 and its prognostic relevance in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 12(3):541-4
92. Pater JL, Loeb M (1982) Nonanatomic prognostic factors in carcinoma of the lung: a multivariate analysis. *Cancer* 50(2):326-31

93. Pedersen LM, Milman N (1996) Prognostic significance of thrombocytosis in patients with primary lung cancer. *Eur Respir J* 9(9):1826-30
94. Pezella F, Turley H (1993) bcl-2 protein in non-small cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 329(10):690-4
95. Pezella F, Pastorino U (1997) Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol* 151(5):1417-23
96. Pfeiffer P, Clausen PP (1996) Lack of prognostic significance of epidermal growth factor receptor and oncoprotein p185HER-2 in patients with systemically untreated non-small-cell lung cancer: an immunohistochemical study on cryosections. *Br J Cancer* 74(1):86-91
97. Rak J, Mitsuhashi Y (2000) Oncogenes and tumor angiogenesis: differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts. *Cancer Res* 60(2):490-8
98. R&D Systems (1999) Matrix Metalloproteinases. *Cytokine Reviews & Technical Notes* 19
99. Retera JM, Leers MP (1998) The expression of beta-catenin in non-small-cell lung cancer: a clinicopathological study. *J Clin Pathol* 51(12):891-4
100. Rosen L (2000) Antiangiogenic strategies and agents in clinical trials. *The Oncologist* 5 Suppl 1:20-7
101. Salgado R, Vermeulen PB (1999) Platelet number and interleukin-6 correlate with VEGF but not with bFGF serum levels of advanced cancer patients. *Br J Cancer* 80(5-6):892-7
102. Schirren J, Richter W, (1995) Chirurgie des Bronchialkarzinoms im Stadium IIIA: Indikation – Technik – Ergebnisse. *Langenbecks Arch Chir Suppl II* (Kongressbericht)

103. Schneider PM, Praeuer HW (2000) Multiple molecular marker testing (p53, C-Ki-ras, c-erbB-2) improves estimation of prognosis in potentially curative resected non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 83(4):473-9
104. Shapiro SD (2000) A concise yet informative stroll through matrix metalloproteinases and TIMPs. *J Cell Sci* 113(Pt 19):3355-56
105. Shibnuma H, Hirano T (1998) Influence of E-cadherin dysfunction upon local invasion and metastasis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 22(2):85-95
106. Slebos RJ, Kibbelaar RE (1990) K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 323(9):561-5
107. Sledge GW Jr, Qulali M (1995) Effect of matrix metalloproteinase inhibitor batimastat on breast cancer regrowth and metastasis in athymic mice. *J Natl Cancer Inst* 87(20): 546-50
108. Sobin LH, Wittekind Ch (eds) (1997) UICC – TNM classification of malignant tumors. 5th edn., New York, Wiley&Sons
109. Stetler-Stevenson WG (1996) Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. *Am J Pathol* 148(5):1345-50
110. Strauss GM (1997) Prognostic markers in resectable non-small cell lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 11(3):409-34
111. Sulzer MA, Leers MP (1998) Reduced E-Cadherin expression is associated with increased lymph node metastasis and unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 157(4Pt1):1319-23
112. Takigawa N, Segawa Y (1996) Prognostic factors for patients with advanced non-small cell lung cancer: univariate and multivariate analyses including recursive partitioning and amalgamation. *Lung Cancer* 15(1):67-77

113. Takigawa N, Segawa Y (1998) Elevated vascular endothelial growth factor levels in sera of patients with lung cancer. *Anticancer Res* 18(2B):1251-4
114. Takahashi T, Ueda R (1995) Molecular approach to lung cancer. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 33 Suppl:29-32
115. Tateishi M, Ishida T (1991) Prognostic value of c-erbB2-protein expression in human lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 27(11):1372-5
116. Tolnay E, Wiethage T (1997) Expression of type IV collagenase correlates with the expression of vascular endothelial growth factor in primary non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 123(11-12):652-8
117. Ueda Y, Imai K (1996) Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B) is expressed in multinucleated giant cells of human giant cell tumor of bone and is associated with vascular invasion. *Am J Pathol* 148(2):611-22
118. Unemori EN, Ferrera N (1992) Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 153(3):557-62
119. van Wersch JW, Tjwa MK (1991) Coagulation/fibrinolysis balance and lung cancer. *Haemostasis* 21(2):117-23
120. Verheul HM, Hoekman K (1997) Platelet: transporter of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 3(12 Pt 1):2187-90
121. Vlodavsky I, Bar-Shavit R (1991) Extracellular sequestration and release of fibroblast growth factor: a regulatory mechanism? *Trends Biochem Sci* 16(7):268-71

122. Volm M, Koomagi R (1997) Prognostic value of basic fibroblast growth factor and its receptor (FGFR-1) in patients with non-small cell lung carcinomas. *Eur J Cancer* 33(4):691-3
123. Wang X, Fu X (1994) Matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 (batimastat) inhibits human colon tumor growth and spread in a patient-like orthotopic model nude mice. *Cancer Res* 54(17):4726-8
124. Watson JM, Sensintaffar JL (1990) Constitutive production of interleukin 6 by ovarian cancer cell lines and by primary ovarian tumor cultures. *Cancer Res* 50(21):6959-65
125. Wilhelm R, Kovacs G (1998) Survival of exclusively irradiated patients with NSCLC. Significance of pretherapeutic hemoglobin level. *Strahlenther Onkol* 174(3):128-32
126. Wilhelm SM, Collier IE (1989) SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 264(29):17213-21
127. Wojtukiewicz MZ, Zacharski LR (1992) Prognostic significance of blood coagulation tests in carcinoma of the lung and colon. *Blood Coagul Fibrinolysis* 3(4):429-37
128. Wolf M (1997), Prognostic factors and therapeutic strategy in non-small-cell bronchial carcinoma. *Schweiz Rundsch Med Prax* 86(42):1640-6
129. Yamaguchi T, Yamamoto Y (1998) Involvement of Interleukin-6 in the elevation of plasma fibrinogen levels in lung cancer patients. *Jpn J Clin Oncol* 28(12):740-4
130. Ylisirnio S, Hoyhtya M (2000) Serum matrix metalloproteinases -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinases -1, -2 in lung cancer -TIMP-1 as a prognostic marker. *Anticancer Res* 20(2B):1311-6

131. Yuan A, Yu CJ (2000) Correlation of total VEGF mRNA and protein expression with histologic type, tumor angiogenesis, patient survival and timing of relapse in non- small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 89(6):475-83
132. Zervos EE, Norman JG (1997) Matrix metalloproteinase inhibition attenuates human pancreatic cancer growth in vitro and decreases mortality and tumorigenesis in vivo. *J Surg Res* 69(2):367-71

7. Anhang

Anhang 1

TNM-Klassifikation des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms

- TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden
oder Nachweis von malignem Zellen im Sputum oder bei Bronchialspülungen,
jedoch Tumor weder radiologisch noch bronchoskopisch sichtbar.
- T0 Kein Anhalt für Primärtumor.
- Tis Carcinoma in situ
- T1 Tumor 3cm oder weniger in grösster Ausdehnung, umgeben von Lungen-
gewebe oder
viszeraler Pleura, kein bronchoskopischer Nachweis einer Infiltration proximal
eines
Lappenbronchus (Hauptbronchus frei).
- T2 Tumor mit wenigstens einem der folgenden Kennzeichen hinsichtlich Grösse
oder
Ausbreitung:
- Tumor mehr als 3cm in grösster Ausdehnung
 - Tumor befällt Hauptbronchus, 2cm oder weiter distal der Hauptcarina
 - Tumor infiltriert viszerale Pleura
 - assoziierte Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus,
aber nicht der ganzen Lunge.
- T3 Tumor jeder Grösse mit direkter Infiltration einer der folgenden Strukturen:
- Brustwand (einschliesslich der Sulcus-superior-Tumoren)
 - Zwerchfell
 - mediastinale Pleura
 - parietales Perikard
- oder Tumor im Hauptbronchus weniger als 2cm distal der Hauptcarina, aber
Hauptcarina selbst nicht befallen,
oder Tumor mit Atelektase oder obstruktiver Entzündung der ganzen Lunge.

- T4 Tumor jeder Grösse mit Infiltration wenigstens einer der folgenden Strukturen:
- Mediastinum
 - Herz
 - grosse Gefässe
 - Trachea
 - Ösophagus
 - Wirbelkörper
 - Hauptcarina
- oder vom Primärtumor getrennte Tumorherde im gleichen Lungenlappen,
oder Tumor mit malignem Pleuraerguss.
- NX Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden.
- N0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen.
- N1 Metastasen in ipsilateralen peribronchialen und/oder in ipsilateralen Hiluslymphknoten (einschliesslich einer direkten Ausbreitung des Primärtumors).
- N2 Metastasen in ipsilateralen mediastinalen und/oder subcarinalen Lymphknoten.
- N3 Metastasen in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen Hilus-, ipsi- oder kontralateralen Skalenus- oder supraclaviculären Lymphknoten.
- MX Fernmetastasen können nicht beurteilt werden.
- M0 Keine Fernmetastasen.
- M1 Fernmetastasen, einschliesslich vom Primärtumor getrennte Tumorherde in einem anderen Lungenlappen (ipsilateral oder kontralateral).

(Quelle: 5th edition of the TNM classification of lung cancer, 1997 (108))

Anhang 2

Stadieneinteilung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms

Occult	TX	N0	M0
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I A	T1	N0	M0
B	T2	N0	M0
Stadium II A	T1	N1	M0
B	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium III A	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
B	jedes T	N3	M0
	T4	jedes N	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1

(Quelle: 5th edition of the TNM classification of lung cancer, 1997 (108))

Anhang 3

Karnofsky-Index

Aktivitätsstatus	Karnofsky-Index in %	Beschreibung	WHO-Skala
Normale Aktivität	100	Normal, ohne jegliche Beschwerden oder Zeichen von Krankheit	0
	90	Fähig zu normaler Tätigkeit, jedoch geringe Krankheitszeichen oder -symptome vorhanden	0
	80	Fähig zu normaler Tätigkeit, jedoch nur unter Anstrengung; Zeichen und Symptome der Krankheit stärker ausgeprägt	1
Selbstversorgung	70	Fähig zur Selbstversorgung, jedoch arbeitsunfähig und nicht in der Lage, normale Tätigkeiten auszuführen	1
	60	Kann die meisten Arbeiten selbst ausführen, benötigt allerdings gelegentlich Hilfe	2
	50	Hilfe in beträchtlichem Umfang erforderlich, ausserdem häufig ärztliche Versorgung nötig; Selbstversorgung in gewissem Umfang noch möglich	2
Behinderung	40	Behindert, benötigt Spezialbehandlung und Hilfe	3
	30	Schwer behindert, stationäre Behandlung erforderlich, Tod infolge Krankheit jedoch nicht unmittelbar bevorstehend	3
	20	Schwerstkrank, supportive Behandlung, stationäre Versorgung erforderlich	4
	10	Tod unmittelbar bevorstehend	4
	0	Tod	5

8. Danksagung

Für die Überlassung des Themas und seine hilfreichen Ratschläge danke ich Herrn Professor Dr. D.K. Hossfeld.

Beim Sammeln der Serumproben haben mir Herr Prof. Dr. N. Dahlmann und Herr Dr. Taylessani sehr geholfen.

Herrn Professor Dr. J. Berger danke ich für seine Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Ganz besonders herzlich möchte ich Herrn Dr. E. Laack für seine Betreuung und seine geradezu unendliche Geduld gegenüber meinen zahlreichen Ideen, hartnäckigen Fragen und oftmals kritischen Anmerkungen danken.

Darüber hinaus gilt mein Dank all jenen Patienten, die sich zur Teilnahme an dieser Arbeit bereit erklärten und ohne die meine Analysen niemals möglich gewesen wären.

Abschliessend danke ich besonders meinem inzwischen verstorbenen Grossvater Joachim Deumelandt, der mir bewusst machte, dass bei einer Dissertation nicht die Benotung, sondern der wissenschaftliche Beitrag entscheidend ist.

9. Lebenslauf

Name : Annika Köhler

Geboren : 17.02.1976 in Hamburg

Eltern : Ronald Köhler
Heidemarie Köhler, geb. Deumelandt

1995 Abitur Halepaghen-Gymnasium Buxtehude

1997 Physikum Universität Rostock

1998 1. Staatsexamen Universität Hamburg

2000 2. Staatsexamen Universität Hamburg

2001 3. Staatsexamen Universität Hamburg