

1. Einleitung

1.1. Das Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom zählt mit nur 1 - 2 % aller Malignome zu den eher seltenen Krebserkrankungen (Jadvapour 1984, Fischer 1999). In der Niere ist es mit 85 % der häufigste maligne Tumor (Ruckle et al.1993). Weitere histologische Differenzierungen sind das Transitionalzellkarzinom, Nephroblastome, Sarkome und Metastasen anderer Karzinome (Boeckmann et al.1993). Bei den urogenitalen Tumoren liegt es an dritter Stelle nach dem Prostata- und dem Harnblasenkarzinom.

Die Inzidenz der Erkrankung lag 1970 bei 3-7 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner. Für das Jahr 2000 wird die Zahl von Neuerkrankungen für Frauen mit 13 pro 100 000 Einwohner und für Männer mit 20 pro 100 000 Einwohner angegeben (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2004). Eine dänische Studie konnte eine Verdopplung der Inzidenz seit 1940 nachweisen (Mellempgaard et al.1993). In den USA steigt die Inzidenz jährlich um 3 % an (McLaughlin 2000). Weltweit wird aus Skandinavien von der höchsten Inzidenz berichtet, von der niedrigsten aus Japan. Der Tumor ist in Nordeuropa und Nordamerika häufiger als in Südeuropa und Südamerika.

Die Anzahl zufällig entdeckter Nierentumoren hat in den letzten Jahren ständig zugenommen. Sie stieg zwischen 1980 und 1990 von etwa 17 % auf bis zu 50 % an (Bretheau et al.1995). Dies ist besonders auf die zunehmende Verbreitung und Weiterentwicklung bildgebender Verfahren, wie Sonographie und Computertomographie zurückzuführen. Aus Japan, wo die Sonographie als Routinevorsorgeuntersuchung etabliert ist, werden Zufallsbefunde von bis zu 70 % berichtet (Yamaguchi et al. 1995). Im Gegensatz dazu liegt die Rate der Zufallsbefunden in Irland , wo die Sonographie wesentlich seltener eingesetzt wird , bei nur 15 % (Sweeney et al. 1996). Die inzidentell entdeckten Tumoren weisen ein niedrigeres Stadium und einen höheren Differenzierungsgrad, als die symptomatischen Neoplasien auf (Nakano et al.1992). Symptomlose Tumoren werden im Rahmen der Diagnostik kardiovaskulärer Erkrankungen (26%), von Leber (22%)-, Prostata (15%)- und Hauterkrankungen (4%) sowie bei Vorsorgeuntersuchungen (23 %) diagnostiziert.

Der Beginn der Erkrankung wird bei symptomatischen Befunden mit 59,9 Jahren und bei den symptomlosen mit 59,8 Jahren angegeben (Bretheau et al. 1995).

Die Fünfjahres-Überlebenszeit, die seit 1960 von 40 % auf 60 % anstieg (McLaughlin 2000), ist bei Patienten mit zufällig entdeckten Nierentumoren 85 % im Gegensatz zu 53 % bei Patienten mit symptomatischen Tumoren (Sweeney et al.1996).

Die steigende Anzahl von Zufallsbefunden führt zu einer wachsenden Anzahl von Nierentumoren in früheren Stadien (Roriguez-Rubio et al.1996). So kommt dem lokal begrenzten Nierentumor eine zunehmend größere Bedeutung zu.

Die Therapie des lokal begrenzten Nierenzellkarzinoms besteht in der radikalen Tumornephrektomie mit lokaler Lymphadenektomie. Ein organerhaltendes Vorgehen führt bei elektiver Indikation (gesunde Gegenniere) bei Tumoren bis 4 cm Durchmesser (Stadium T1a) zu onkologisch vergleichbaren Ergebnissen, entsprechend den Leitlinien der DGU und der Deutschen Krebsgesellschaft (Deutsche Krebsgesellschaft 2002). 30% der so therapierten Patienten haben jedoch einen progredienten Krankheitsverlauf (Sevinc et al 2000).

Prognostische Faktoren sind wesentlich, um den Krankheitsverlauf radikal tumornephrektomierter Patienten abschätzen zu können.

1.2. Angiogenese

Als Neoangiogenese wird der Vorgang bezeichnet, bei dem neue Blutgefäße entstehen. Diesem kommt sowohl unter physiologischen Bedingungen, wie auch beim Wachstum maligner Tumoren eine besondere Bedeutung zu. Er konnte bereits 1960 im Tierversuch demonstriert werden (Warren 1966).

Die Angiogeneseforschung steht vor der Anwendung in der Klinik. Die vom Tumor aktivierte Endothelzelle hat sich dabei als sekundärer therapeutischer Ansatzpunkt in der Therapie maligner Erkrankungen gezeigt. Angiogeneseinhibitoren können mit Chemo- oder Strahlentherapie kombiniert werden. Kombinationstherapien mit Angiogeneseinhibitoren sind denkbar und sind heute in Studienprotokollen bereits in der Anwendung (Folkman et al. 2001).

Die Forschungsergebnisse zeigen aber auch die bedeutende Rolle der Modulation der Mikrogefäßdichte in der Entstehung und Entwicklung natürlicher Prozesse, wie auch im Verlauf benigner Erkrankungen. Die besondere Bedeutung neu entstehender Gefäßstrukturen bei reparativen Prozessen und benignen Neoplasien konnte zum Beispiel für die Wund- und Frakturheilung (Folkman et al.1993, Brown et al. 2002), Neoangiogenese nach Apoplexia cerebri (Manoonkitiwongsa et al. 2001), Adenomyosis uteri (Schindl et al. 2001), intraepitheliale Neoplasien der Vulva (Saravanamuthu et al. 2003) sowie für die noduläre Prostatahyperplasie (Shih et al. 2003) gezeigt werden. Für die BPH wurde weiterhin

nachgewiesen, dass Finasterid zum Rückgang periurethraler Mikrogefäße und damit zur Verminderung des Blutverlustes bei TUR führt (Hochberg et al. 2002).

Reproduktive Vorgänge wie Ovulation, Menstruation und Plazentawachstum sind ebenfalls angiogeneseabhängig (Folkman 1992).

Nach Folkmans Theorie benötigt jeder Tumor ab einer Größe von 2-3 mm³ eigene Blutgefäße (Folkman 1971). Eine Veränderung im Verhältnis von positiven und negativen Regulatoren wird als Beginn des Prozesses der Gefäßneubildung angesehen (Folkman 1995). Zu den am häufigsten nachgewiesenen Promotoren der Angiogenese gehören der basic fibroblast growth factor (bFGF) und der vascular endothelial growth factor (VEGF). Zu den Inhibitoren gehören z.B. Angiostatin, Metalloproteinaseinhibitoren und Interferon alpha. Auch ein Zusammenhang zwischen Angiogenese und Metastasierung konnte gefunden werden (Liotta 1991).

Die internationale Angiogeneseforschung verfolgt gegenwärtig drei Schwerpunkte:

- 1.) Quantifizierung der Angiogenese zum Einsatz in der Diagnostik und zur Prognosebeurteilung (Vermeulen et. al. 2002)
- 2.) Stimulierung der Angiogenese bei Reparationsvorgängen (Brown et al. 2002)
- 3.) Inhibierung der Angiogenese beim Wachstum maligner Tumoren (Zieche et. al. 2004)

Für einige Tumorentitäten, wie z.B. das Mammakarzinom ist die Bedeutung der Neoangiogenese als Prognosefaktor bereits gut untersucht. So ist in einigen Arbeiten bei Patientinnen mit Mammakarzinom eine hohe Mikrogefäßdichte sowohl mit einer erhöhten Metastasierungsrate, als auch mit einer schlechteren Prognose hinsichtlich der postoperativen Überlebenszeit verbunden (Weidner et al. 1991, Tsutsui et al.2003).

Weitere Untersuchungen für die diesen Zusammenhang nachgewiesen werden konnte, sind in Tabelle 1 (Seite 4) aufgeführt.

Demgegenüber stehen aber auch aktuell Untersuchungen, die für eine Reihe von Karzinomen keine prognostische Signifikanz der Mikrogefäßdichte nachweisen konnten. Diese sind in Tabelle 2 (Seite 5) dargestellt.

Tab. 1: Nachgewiesene prognostische Wertigkeit der Neoangiogenese

Prostatakarzinom	Weidner et al. 1993, Strohmeyer et al. 2000, Bono et al. 2002
Urothelkarzinom	Chaudhary et al.1999
Adenokarzinom der Harnblase	El-Sobky et al. 2002a
Plattenepithelkarzinom der Harnblase	El-Sobky et al. 2002b
Endometriumkarzinom	Kaku et al. 1997
Zervixkarzinom	Cooper et al.1998, Gasinska et al. 2002, Cantu de Leon et al. 2003
Ovarialkarzinom	Hollingsworth et al.1995
malignes Melanom	Zamolo et. al. 2001
Magenkarzinom	Erenoglu et al.2000
kolorektale Karzinome	Sternfeld et al. 1999, Li et al. 2003
Ösophaguskarzinom	Nakagawa 2001
Pankreaskarzinom	Niedergethmann et al.2000
primäres Leberzellkarzinom	Poon et al. 2002
Adenokarzinom der Gallenblase	Giatromanolaki et al. 2002
Plasmozytom	Rajkumar et al.2000, Kumar et al. 2003
nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	O'Byrne et al. 2000, Meert et al. 2002
Plattenepihelkarzinom der Mundhöhle	Lopez-Graniel et al. 2001
Mesotheliom	Edwards et al. 2001
Hirntumoren	Leon 1996

Auch für das Nierenzellkarzinom finden sich hinsichtlich der prognostischen Bedeutung der Angiogenese unterschiedliche Angaben. Während teilweise eine prognostische Bedeutung vollständig verneint wird (MacLennan 1995, Gelb et al. 1997, Ou et al. 1998), konnte einerseits für eine hohe Mikrogefäßdichte im Tumor eine schlechtere Prognose bezüglich der Überlebenszeit nachgewiesen werden (Yoshino 1995, Nativ et al.1998, Sabo et al. 2001). Andererseits wird aber auch eine bessere Prognose für gut vaskularisierte Tumoren berichtet (Herbst et al.1998).

Die Bedeutung der Mikrogefäßdichte für die prognostische Beurteilung von Metastasierung und rezidivfreiem Überleben ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht geklärt.

Tab.2 : Keine prognostische Wertigkeit der Neoangiogenese

Hodentumoren	Jones et al.2000
Prostatakarzinom	Moul 1999
Urothelkarzinom der Harnblase	Reiher et al. 2002, Offersen et al. 2002
Endometriumkarzinom	Ozulysal et al. 2003
Mammakarzinom	Fridman et al. 2000, Ludovini et al. 2003
nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	Offersen et al. 2001, Tanaka et al. 2003
malignes Melanom	Jonjic et al. 2003, Massi et al. 2002
Rectumkarzinom	Galindo-Gallego et al.2001
Kolonkarzinom	Pietra et al.2000
papilläres Schilddrüsenkarzinom	Akslen 2000
Larynxkarzinom	Hagedorn 2000

1.3. Nachweismethoden der Mikrogefäßdichte und Methoden der Bildanalyse

Die manuelle oder computergestützte Auszählung immunhistochemisch markierter Gefäßstrukturen ist heute die Standardmethode zur Bestimmung der Mikrogefäßdichte. Dazu werden im histologischen Präparat zunächst die Endothelzellen mit Antikörpern immunhistochemisch markiert. Anschließend erfolgt die Auszählung der markierten Strukturen im Gebiet mit der höchsten Tumorgefäßdichte („hot-spot“) (Weidner 1995). Antikörper gegen CD31 gehören heute zu den Standardantikörpern, die zur immunhistochemischen Darstellung von Gefäßstrukturen verwendet werden. So können CD31-Antikörper auch zur Bestimmung der Mikrogefäßdichte bei Nierentumoren eingesetzt werden (Wechsel et. al. 2000, Song et. al. 2001, Chang et. al. 2001, Kinouchi et. al. 2003). Zur Bestimmung der Mikrogefäßdichte beim Nierenzellkarzinom sind aber auch Antikörper gegen das CD34-Antigen (Joo et. al. 2004, Rioux-Leclercq et. al. 2001, Sabo et. al. 2001) geeignet. Gelegentlich kommen auch Antikörper gegen das von-Willebrand-Faktor-assoziierte Antigen (Faktor VIII-RAG) zum Einsatz (Dekel Y et. al. 2002). Vergleichende Studien zur Sensitivität der eingesetzten immunhistochemischen Marker finden für den CD34-Antikörper die höchste Sensitivität (Bialas M et. al. 2003, de la Taille et. al. 2000). Demgegenüber konnte nachgewiesen werden, dass CD31-Antikörper deutlich mehr Mikrogefäße markieren als Antikörper gegen das von-Willebrand-Faktor-assoziierte Antigen (Vermeulen et. al. 1995, Schmidt et. al. 1995).

Am immunhistochemisch gefärbten Präparat erfolgte die Bestimmung der Mikrogefäßdichte in modifizierter Form nach den Kriterien von Weidner (Weidner et. al. 1991 und 1993) unter Berücksichtigung der „hot-spots“ (Weidner et. al. 1995). Eine weitere, aber selten eingesetzte Methode zur Bestimmung der Mikrogefäßdichte ist der „Chalkley count“. Hier erfolgt eine relative Bestimmung der Mikrogefäßdichte durch Zählung der Schnittpunkte eines Messrasters mit den markierten Endothelstrukturen (Chalkley 1943).

Neuere Methoden wie das Scannen des gesamten, immunhistochemisch markierten Präparates mit anschließender computergestützter Analyse der Mikrogefäßdichte (Chantrain et. al. 2003) werden noch nicht in der Routine eingesetzt.

Bildgebende Verfahren zur nichtinvasiven Bestimmung der Mikrogefäßdichte in-vivo liefern Ergebnisse, die mit denen der Bestimmung am immunhistochemischen Präparat vergleichbar sind. So wurde die Magnetresonanztomographie des Mammakarzinoms (van Dijke et. al. 1996) zur Darstellung der Mikrogefäßdichte verwendet.

In den meisten Studien wird die manuelle Auszählung der Tumorgefäßdichte durchgeführt (Weidner 1995, Vermeulen et. al. 1995, Wechsel et. al. 2000, Nakayama et. al. 2001, Kionuchi et. al. 2003, Wendum et. al. 2003, Vermeulen et. al. 2002). Studien zum Vergleich der manuellen mit der computergestützten Bildanalyse bei der Bestimmung der Mikrogefäßdichte konnten eine signifikante Übereinstimmung der Ergebnisse beider Analysemethoden nachweisen (Fox et. al. 1995, Cruz et. al. 2001). Individuelle Unterschiede in der Anzahl der detektierten Mikrogefäße pro Standardfläche sind in Abhängigkeit von der Erfahrung des Untersuchers vorzufinden (Vermeulen et. al. 1997) und betragen bis zu 30 % (Hansen et. al. 1998).

2. Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Ermittlung des Stellenwertes der Mikrogefäßdichte von Nierenzellkarzinomen hinsichtlich der Prognoseabschätzung. Zusätzlich werden zur Prognosebeurteilung Stadium und histologischer Befund wie auch Überlebenszeit und das Metastasierungsintervall erfasst.

Folgende Schwerpunkte stehen dabei im Vordergrund:

1. Qualitative Markierung der einzelnen Gefäße eines Tumors durch immunhistochemische Darstellung der Endothelzellen mit einem Antikörper gegen CD 31 (Wechsel et. al. 2000)
2. Quantitative Bestimmung von Angiogeneseparametern durch Einsatz eines computergestützten Bildanalysverfahrens und der Vergleich der erhobenen Daten mit den Ergebnissen der manuellen Auszählung der Tumorgefäße am Lichtmikroskop (Vergrößerung 200x)
3. Untersuchung von 70 Nierenzellkarzinomen bezüglich weiterer biologischer Eigenschaften: Zelltyp und Kerngrading nach Fuhrman
4. Der Zusammenhang zwischen Mikrogefäßdichte, rezidivfreiem Überleben und dem Intervall bis zum Auftreten einer eventuellen Metastasierung