

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Prof.Dr.med. Jürgen Dunst)

## **Tumorbiologische Prognosefaktoren beim fortgeschrittenen, primär strahlentherapeutisch behandelten Uteruszervixkarzinom**

**Eine Untersuchung zur Bedeutung von Tumoroxygenierung,  
Tumovaskularisation, Anämie und Tumorproteinen für das klinische  
Behandlungsergebnis**

### **Habilitation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr.med.habil.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Dr.med.Gertrud Gabriele Hänsgen

geb. am 20.06.1947 in Wilsdruff/Sachsen

#### **Gutachter:**

1. Prof. J.Dunst, Halle

2. Prof. J.Radke, Halle

3. Univ.Prof. R.Pötter, Wien

Datum der Verteidigung: 17.12.2002

**urn:nbn:de:gbv:3-000004683**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004683>]

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1. Sauerstoff und Strahlenwirkung .....	6
1.2. Das Zervixkarzinom in der Strahlentherapie.....	7
1.3. Tumorhypoxie und Tumolvaskularisation bei fortgeschrittenen..... Uteruszervixkarzinomen.....	9 9
1.4. Bedeutung der Tumoranämie.....	11
1.5. Proliferation und Regulation der Proliferation bei Zervixkarzinomen.....	11
1.6. Additive Behandlung mit Interferon-alpha-2a und 13-cis-Retinsäure .....	13
1.7. Ziel der Untersuchung.....	14
<b>2. Material und Methode</b> .....	<b>15</b>
2.1. Patientengut.....	15
2.1.1. Altersverteilung .....	15
2.1.2. Einschlußkriterien und Befundbeurteilung .....	16
2.1.3. Stadienverteilung und histologische Befunde .....	18
2.2. Strahlentherapie.....	19
2.2.1. Bestrahlungsplanung und Zielvolumen.....	19
2.2.2. Gesamtdosis und Therapiedauer .....	20
2.3. Behandlung mit Isotretinoin/Interferon-alpha-2a und Strahlentherapie .....	21
2.4. Untersuchungsablauf und Untersuchungsdurchführung.....	22
2.4.1. Tumorhistologie .....	22
2.4.2. Immunhistochemische Untersuchungen.....	22
2.4.3. Flußzytometrie .....	23
2.5. Messung der Tumoroxygenierung.....	24
2.5.1. Messung des Sauerstoffpartialdruckes im Tumor.....	24
2.5.2. Meßparameter .....	24
2.6. Statistische Auswertung.....	26
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>28</b>
3.1. Klinische Resultate .....	28
3.2. Untersuchungen zur Tumoroxygenierung .....	31
3.2.1. Prätherapeutischer Oxygenierungsstatus.....	31
3.2.2. Überlebenswahrscheinlichkeit und Tumoroxygenierung.....	33
3.2.3. Tumorhypoxie als Prognosefaktor.....	35
3.2.4. Oxygenierungsstatus unter der Strahlentherapie .....	38

3.2.5. Änderung der Oxygenierung unter der Strahlentherapie und ihr Einfluß auf das Behandlungsergebnis .....	41
3.2.6. Oxygenierungsverhalten, Tumorresponse und Metastasierung („Event-free-Survival“).....	47
3.3. Bedeutung der Hämoglobinkonzentration als Prognosefaktor.....	49
3.3.1. Hämoglobinkonzentration und klinische Resultate .....	49
3.3.2. Anämie und Tumorstadium .....	54
3.3.3. Anämie und Tumoroxygenierung .....	56
3.3.4. Anämie und Tumorphypoxie .....	57
3.4. Gefäßdichte im Tumor .....	60
3.4.1. Gefäßdichte und Prognose.....	60
3.4.2. Gefäßdichte und Tumoroxygenierung .....	62
3.4.3. Anämie und Gefäßdichte .....	65
3.5. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	66
3.6. Proliferation und maligne Progression.....	72
3.6.1. Flußzytometrische Untersuchungen.....	72
3.6.2. Ploidie und Überlebenswahrscheinlichkeit .....	73
3.6.3. DNA-Index und Tumoroxygenierung .....	74
3.6.4. Untersuchung der Tumorproliferation.....	76
3.6.5. Tumorproliferation und Anämie .....	78
3.6.6. Tumorresponse, Proliferation und Metastasierung .....	79
3.7. Tumorprotein P53 .....	81
3.7.1. Analyse der P53-Expression .....	82
3.7.2. P53-Expression und Überlebenswahrscheinlichkeit .....	83
3.7.3. Zusammenhang von Hypoxie, P53 und DNA-Index .....	84
3.8. BCL-2-Bestimmungen.....	85
3.8.1. BCL-2 und Tumorstadium.....	85
3.8.2. BCL-2 und DNA-Index .....	87
3.9. Analyse der Ergebnisse der Behandlung mit alleiniger Strahlentherapie im Vergleich zur adjuvanten IFN/cRA-Behandlung .....	89
3.10. Mehrfaktorielle Regressionsanalyse ausgewählter Parameter .....	92
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>96</b>
4.1. Klinische Therapieergebnisse .....	96
4.2. Bedeutung der Tumoroxygenierung als Prognosefaktor.....	99
4.3. Bedeutung der Änderung der Sauerstoffversorgung unter Bestrahlung .....	103
4.4. Bedeutung der Anämie als Prognosefaktor .....	106

4.5.	Gefäßdichte als Prognosefaktor .....	110
4.6.	Klinische Bedeutung der VEGF-Bestimmung .....	112
4.7.	DNA-Index und Prognose .....	115
4.8.	Tumorproliferation und Prognose .....	116
4.9.	Die klinische Bedeutung der P53-Expression.....	117
4.10.	Ergebnisse der Kombinationstherapie mit Interferon-alpha2a/13-cis-.....	
	Retinsäure .....	120
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung und Schlußfolgerungen.....</b>	<b>121</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>126</b>

**Abkürzungen**

CR	klinische Komplettremission
cRA	13-cis-Retinsäure
CT	Computertomographie
CTC	Common Toxicity Criteria: Klassifikation von akuten Nebenwirkungen
DI	DNA-Index
EFS	Event-Free-Survival
FIGO	Fédération Internationale de Gynecologie et d' Obstretique
FM	Fernmetastasen
Hb	Hämoglobinkonzentration
HDR	High-Dose-Rate-Afterloading
HF2,5	hypoxische Fraktion <2,5mmHg
HF5	hypoxische Fraktion <5mmHg
HPF	High-Power-Field
HPV	Human Papilloma Virus
IFN	Interferon-alpha-2a
LDR	Low-Dose-Rate- Kontakttherapie
Lnn	Lymphknoten
MRT	Magnetresonanztomographie
NCI	National Cancer Institut
PD	Progressive Disease
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
RR	relatives Risiko
tP53	transformiertes P53
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
wtP53	Wildtyp-P53

# 1. Einleitung

## 1.1. Sauerstoff und Strahlenwirkung

Bereits zu Beginn der Strahlentherapie wurde von Gottlieb Schwarz die Beobachtung mitgeteilt, daß durch eine Kompression der Haut während der Bestrahlung die postradiogene Hautreaktion verringert werden kann (zit. in 143). Diese empirisch ermittelte relative Radioresistenz der Haut war in der Röntgentiefentherapie in der klinischen Routine in den nächsten Jahrzehnten eine übliche Praxis- der Tubus hatte so aufgesetzt zu werden, daß es zu einer erkennbaren Kompression der Haut kam. Wahrscheinlich war es weder dem Radiotherapeuten noch der Röntgenassistentin dabei klar, daß die damit erzeugte Hypoxie in der Haut eine klinische Anwendung der relativen Radioresistenz des hypoxischen Gewebes darstellt. Quantifiziert wurde die Bedeutung der Anwesenheit von Sauerstoff für die Strahlenempfindlichkeit erstmals mit den inzwischen historischen Versuchen von Gray und Thomlinson (61).

Maligne Tumoren zeichnen sich durch eine ausgeprägte Inhomogenität aus, die durch zeitliche und regionale Unterschiede der Durchblutung, der Sauerstoffversorgung, des Säure-Basen-Haushaltes und des zellulären Energiestatus gekennzeichnet ist (202). Der Einfluß des Mikromilieus auf das biologische Verhalten der Tumoren einerseits und auf das Therapieansprechen andererseits ist in den letzten Jahren zunehmend Gegenstand der klinischen Forschung geworden.

Veränderungen des Mikromilieus können nachhaltig das Behandlungsergebnis beeinflussen. Das trifft sowohl auf die Therapie mit Chemotherapeutika (14, 192,196) als auch in einem besonderen Maße auf die Anwendung ionisierender Strahlung zu (203).

Ionisierende Strahlung schädigt die Zellen letal durch Doppelstrangbrüche der DNA, die nicht mehr repariert werden können. Die in der Strahlentherapie verwendete locker ionisierende Strahlung wirkt nur zu einem geringen Anteil über einen direkten Einfluß auf die DNA, der weitaus größere Effekt der ionisierenden Strahlung ist auf die indirekte Wirkung über die Bildung freier Radikale, die mit der DNA reagieren, zurückzuführen. Der initiale Schaden wird durch Peroxide stabilisiert und fixiert. Für die Bildung der Peroxide ist die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff im Gewebe erforderlich.

Dieser Zusammenhang ist die Ursache dafür, daß die Strahlenwirkung locker ionisierender Strahlung in Anwesenheit von Sauerstoff wesentlich höher ist als unter hypoxischen oder anoxischen Bedingungen (61). In Zellkulturen wurde der Sauerstoffverstärkungsfaktor (OER, Oxygen Enhancement Ratio) ermittelt, der mit dem Faktor 2,8 eine fast 3-fache Radiosensibilität für Zellen unter aeroben Bedingungen im Vergleich zu Zellen unter anaeroben Bedingungen beschreibt.

Die Strahlensensibilität von Geweben zeigt bis 10mmHg Sauerstoffpartialdruck einen fast linearen Anstieg (61, 194, 204), oberhalb einer Grenze von ca. 25mmHg ist durch eine Anhebung des Sauerstoffpartialdruckes nur noch mit einer geringen Änderung der Strahlenempfindlichkeit zu rechnen. Aus dem fast linearen Zusammenhang im hypoxischen Bereich ist bei einer geringen Erhöhung der Sauerstoffkonzentration im Gewebe, insbesondere im Bereich des Sauerstoffpartialdruckes zwischen <2,5mmHg und <5mmHg, eine relativ hohe Änderung der Radiosensibilität zu erwarten.

Aus diesen Überlegungen ist die Analyse der Sauerstoffversorgung im Tumorgewebe für die Strahlentherapie von besonderem Interesse. Die eingesetzten Strahlenqualitäten von 6 MeV bis 15 MeV-Photonenstrahlung in der Hochvolttherapie und 0,7 MeV des Iridium-192 in der Kontakttherapie gehören zu den locker ionisierenden Strahlenqualitäten und sind in ihrer Wirkung damit sauerstoffabhängig.

Der klinische Nachweis der Abhängigkeit der Strahlenwirkung vom Sauerstoffpartialdruck war von der Entwicklung klinisch einsetzbarer Meßmethoden abhängig. Erst mit der Entwicklung der polarographischen Elektroden (47) und der  $pO_2$ -Histographie stand ein Verfahren zur Verfügung, daß sowohl tierexperimentell als auch in klinischen Untersuchungen reproduzierbare Messungen des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe erlaubte. Nachteil des Verfahrens ist die Invasivität der Untersuchung: Es muß mit der Nadelelektrode das zu untersuchende Gewebe penetriert werden. Damit ist die Anwendung des Verfahrens in der Onkologie auf gut zugängliche Tumorarten beschränkt. Aus diesem Grund liegen die meisten Untersuchungen zum Sauerstoffpartialdruck in menschlichen Tumoren bei Kopf-Hals-Tumoren (einschließlich der Lymphknotenmetastasen), Uteruszervixkarzinomen, Mammakarzinomen und bei Weichteilsarkomen vor (11,18,51,74,98,117,139,185). Die Invasivität des Verfahrens ist die Ursache für die relativ geringe Anzahl an Veröffentlichungen zu Verlaufsmessungen in menschlichen Tumoren unter der Strahlentherapie (19, 29, 38, 184).

## **1.2. Das Zervixkarzinom in der Strahlentherapie**

Die Strahlentherapie ist in der Behandlung des Uteruszervixkarzinoms eine etablierte Behandlungsmethode. Bereits 1913 wurden auf dem Gynäkologenkongreß in Halle erstmalig die Behandlungsergebnisse mit Anwendung von Radium beim Zervixkarzinom beschrieben. Damit wurde im Prinzip ein Grundstein der Strahlentherapie gelegt. Die Kontakttherapie wurde mit der Ablösung des Radiums durch Cobalt-60 und Cäsium-137 modifiziert, die Grundsätze der Low-dose-Therapie veränderten sich durch den Einsatz der künstlichen Nuklide nicht.

Ein markanter Einschnitt in der Strahlentherapie war der Beginn der Hochvolttherapie-Ära in den 60-iger Jahren, ein weiterer die Ablösung der Low-dose-Brachytherapie (LDR) durch das High-dose-rate-Afterloading (HDR) mit Iridium-192. Diese Form der ferngesteuerten Kontakttherapie wurde in Deutschland 1973 durch Rotte in Würzburg (161) und 1974 durch Glaser in Halle (57) etabliert.

Die Optimierung der Fraktionierung und der Dosierung des HDR-Verfahrens erfolgte damals in einer sehr aufwendigen und sorgfältigen Untersuchung, an der auch der Verfasser beteiligt war (57). Die damals begründeten Dosismodifikationen bestimmen nach wie vor das Grundkonzept in der primären Strahlentherapie des Zervixkarzinoms in unserer Klinik, auch wenn durch die technische Entwicklung in der Hochvolttherapie und den Ersatz der perkutanen Hochvoltbestrahlung mit Kobalt-60 durch hochenergetische Photonenbestrahlung Anpassungen erfolgt sind.

Trotz verbesserter technischer Behandlungsmöglichkeiten haben sich in den letzten Jahren die Therapieergebnisse nicht wesentlich gebessert. Sicher hat es durch die Einführung der Hochvolttherapie, CT-gestützten Bestrahlungsplanung und individuelleren Bestrahlungsmöglichkeiten durch den Einsatz der Remote-Afterloading-Technik in der Kontakttherapie einen Qualitätssprung in der Behandlungstechnik gegeben. Bei kritischer Betrachtung haben die verbesserten Bestrahlungstechniken weniger Behandlungskomplikationen durch eine Schonung der gesunden Tumorumgebung und damit eine bessere Lebensqualität für die geheilten Patientinnen erbracht, eine höhere Tumorsensibilität ist durch eine verbesserte Behandlungstechnik nicht unbedingt zu erwarten. Es müssen für den Erfolg der lokalen Strahlentherapie auf der einen Seite und für das aggressivere Tumorwachstum mit hoher Metastasierungsfrequenz auf der anderen Seite biologische Besonderheiten eine Rolle spielen, die bis jetzt nur in Ansätzen bekannt sind.

Uteruszervixkarzinome gehören in Bezug auf Sauerstoffversorgung, Gefäßdichtebestimmung und pathophysiologische Besonderheiten zu den bestuntersuchten Karzinomen. Zervixkarzinome können bereits in ihren Frühformen durch die Besonderheiten der pathologischen Gefäßstrukturen in Vorsorgeuntersuchungen (Kolposkopie) erkannt werden (41). In einer Zeit, in der andere Verfahren noch nicht zur Verfügung standen, war die Kolposkopie das Standardverfahren der Karzinom-Früherkennung. Zervixkarzinome sind anatomisch gut zugänglich und damit sowohl bei der Primäruntersuchung als auch im Therapieverlauf mit einfachen klinischen Untersuchungstechniken zuverlässig zu beurteilen. Zervixkarzinome besitzen keine Nerven. Es sind damit sowohl die Probeentnahmen von Tumorgewebe als auch die

invasiven Sauerstoffmessungen im Primärtumor ohne wesentliche Beeinträchtigungen für die Patientinnen möglich und es können Wiederholungsuntersuchungen durchgeführt werden. Nicht zuletzt gehören Uteruszervixkarzinome zu den soliden Karzinomen mit den besten Therapieresultaten nach alleiniger Strahlentherapie. Die Langzeitergebnisse sind nach primärer Strahlentherapie in Frühstadien mit denen operativer Verfahren vergleichbar, in fortgeschrittenen Stadien zeigt die primäre Strahlentherapie bessere Heilungsergebnisse (5). Damit eignen sich Zervixkarzinome in besonderem Maße für die Suche nach Prognosefaktoren für die Therapieergebnisse und Überlebensbeobachtung in der Radioonkologie.

### **1.3. Tumorhypoxie und Tumovaskularisation bei fortgeschrittenen Uteruszervixkarzinomen**

Die klinischen Ergebnisse nach primärer Strahlentherapie beim Zervixkarzinom sind abhängig vom Oxygenierungsstatus des Tumors. Prognosebestimmend ist der hypoxische Tumoranteil, der letzten Endes für die Radioresistenz verantwortlich ist. Die bisherigen Daten bestätigen den Einfluß der Sauerstoffversorgung des Tumors als Prognoseparameter, insbesondere die Bedeutung der Tumorhypoxie für die Radioresistenz (19, 52, 75, 187, 188).

Spärliche und widersprüchliche Ergebnisse wurden bisher zum Einfluß der Oxygenierung im Verlauf der Strahlentherapie auf das Behandlungsergebnis veröffentlicht (29, 51, 184). Ebenso unklar ist die Datenlage zum Zusammenhang zwischen Tumoroxygenierung und Hämoglobinkonzentration (12, 91, 92).

Die Abhängigkeit der Radiosensibilität vom Oxygenierungsstatus am Beispiel des primär strahlentherapierten Uteruszervixkarzinoms ist ein Schwerpunkt der vorliegenden Untersuchung.

Das Tumorstadium ist abhängig von einer Anbindung an das Gefäßsystem des umgebenden Normalgewebes und benötigt eine eigene Vaskularisation. Nicht nur die Sauerstoffzufuhr ist auf dieses Gefäßsystem angewiesen, auch der Antransport von Nährstoffen (Glucose) und die Entsorgung von Stoffwechselprodukten benötigt eine funktionierende Mikrozirkulation. Nicht zuletzt entscheidet die Verbindung der Tumorgefäße mit den Gefäßen der Umgebung über die Potenz zur Absiedlung von Tumorzellen aus dem Gewebeverband und damit über die Möglichkeit der Metastasierung. Damit ist die Tumovaskularisation Voraussetzung für das maligne Wachstumspotential von bösartigen Tumoren (202).

Maligne Geschwülste unterscheiden sich vom umgebenden Normalgewebe nicht nur in ihrer histopathologischen Darstellung. Genetische und pathophysiologische Kriterien bestimmen bei Tumoren das unkontrollierte Zellwachstum. Eine Folge dieses ungezügelter Wachstums ist ein relatives Mißverhältnis zwischen Tumorgewebe und der Bildung von ausreichenden Gefäßstrukturen. Die im Tumor initiierte Neoangiogenese ist in ihrer Struktur ungeordnet, es bilden sich chaotische Gefäßstrukturen mit Arealen einer scheinbaren Überversorgung neben Arealen mit einer Unterversorgung an Gefäßen heraus. In Tumoren fehlt die typische hierarchische Gefäßstruktur. Neben dieser unterschiedlichen Gefäßdichte in Tumoren weisen Tumorgefäße in ihrer Struktur Besonderheiten auf: Tumorgefäße verlaufen im Gewebe geschlängelt, können blind enden, weisen arterio-venöse Shunts auf oder sind entgegen dem Blutfluß gerichtet. Den Gefäßwänden fehlen die glattmuskulären Elemente, so daß sie nicht auf physiologische Reize aktiv reagieren können. Die Endothelauskleidung ist lückenhaft (7,16, 41, 69,119,188, 204). Tumorgefäße erweisen sich auf grund ihrer Besonderheiten als funktionell minderwertig.

Mit dem Verlust des Reaktionsvermögens auf ein verändertes Mikromilieu ist eine unzureichende aktive Blutflußregulation bei verändertem pH oder bei zunehmender Gewebhypoxie verbunden (175). Die chaotische Gefäßstruktur in Tumoren kann einen Steel-Effekt mit vermehrtem Sauerstoffverbrauch und einem ansteigenden pH im Gewebe zur Folge haben. Tumorzellen haben sich an dieses veränderte Mikromilieu in ihrem Stoffwechsel angepaßt. Seit Warburg ist bekannt, daß in Tumorzellen nur ein Teil des Stoffwechsels über den Zitratzyklus abläuft. Adaptativ können Tumorzellen ihre Energie auch unter den Bedingungen des Sauerstoffmangels über anaerobe Glykolyse gewinnen (204, 207). Ein Hinweis für den gestörten Glucosemetabolismus in Tumoren ist der Nachweis hoher Lactat-Konzentrationen in malignen Tumoren (171, 207).

Eine Reaktionsmöglichkeit auf den Sauerstoffmangel sowohl im Normalgewebe als auch im Tumorgewebe kann die Induktion von vermehrter Gefäßbildung sein. Unter den Bedingungen der Gewebhypoxie können Zellen mit der Ausschüttung gefäßinduzierender Faktoren reagieren. Diese Angiogenese induzierenden Zytokine (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) werden unter hypoxischen Bedingungen im Tumor zu einer Zunahme der chaotischen Gefäßbildung beitragen mit der Folge einer weiteren Zunahme der Hypoxie. Der Prozeß, der im Normalgewebe physiologisch sinnvoll ist, verkehrt sich im Tumor in das Gegenteil und führt in einen Circulus vitiosus. Aus zahlreichen Untersuchungen (26,28,44,69,81,118,156,167) ist bekannt, daß Patientinnen mit gefäßdichten Zervixkarzinomen eine ungünstigere Prognose haben als Patientinnen mit weniger gefäßdichten Tumoren. Unklar ist der Zusammenhang zwischen Gefäßdichte im Tumor und Sauerstoffpartialdruck. Untersuchungen zur Bedeutung des Blutflusses

mittels Doppler-Sonographie und dynamischen MRT bestätigen die Bedeutung eines funktionierenden Gefäßsystems für die Prognose (41,69,126,151).

#### **1.4. Bedeutung der Tumoranämie**

Inwieweit die Abnahme der Sauerstoffkonzentration im Blut, d. h. eine Anämie, den Effekt auf die Gefäßinduktion verstärkt, ist bis jetzt unklar. Gesichert ist, daß anämische Tumorpatientinnen eine ungünstigere Prognose in Bezug auf das Überleben (89,123) haben als nichtanämische Patientinnen. In einer großen Metaanalyse von Overgaard (143) stehen 29 Studien mit 12.500 Patienten, bei denen ein Einfluß des Hämoglobins auf den Effekt der Radiotherapie gefunden wurde, 4 Studien mit 1200 Patienten ohne Effekt einer Anämie auf das Behandlungsergebnis gegenüber.

Die Anämie bei Patientinnen mit Uteruszervixkarzinomen kann sowohl als akute Anämie über eine plötzliche Tumorblutung als auch als chronische Tumoranämie auffällig werden. Tumore haben über die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen (50, 85) einen Einfluß auf die Erythropoietin-Wirkung und verhindern eine Ausreifung der Erythroblasten. Es ist zu fragen, ob diese tumorspezifische Anämie über die Verschlechterung der Tumoroxygenierung einen negativen Einfluß sowohl auf das lokale Resultat der Strahlentherapie als auch- über einen Einfluß auf die Angiogenese- auf das Metastasierungsverhalten und damit auf den malignen Phänotyp des Karzinoms haben kann.

Die Bedeutung der prätherapeutischen Hämoglobinkonzentration auf das Therapieergebnis bei primär bestrahlten Karzinomen ist seit vielen Jahren bekannt (23, 43, 55, 59, 72, 98, 113,169). Aber nicht nur der Ausgangswert des Hämoglobins hat einen Einfluß auf das klinische Behandlungsergebnis, auch die Veränderung der Hämoglobinkonzentration unter der Strahlentherapie ist ein Prognoseparameter (55, 59, 113). Unklar ist der Wirkungsmechanismus: Sprechen Karzinome besser auf eine Strahlentherapie an, weil die Hämoglobinkonzentration hoch ist oder ist die Anämie als Paraneoplasie ein Symptom eines hochmalignen Tumors? Aus diesem Grund wurde die Anämie und der mögliche Zusammenhang zwischen Hämoglobin und Tumoroxygenierung in die Untersuchung eingeschlossen.

#### **1.5. Proliferation und Regulation der Proliferation bei Zervixkarzinomen**

Die Tumorpheriferation als ein Hinweis für das maligne Wachstumspotential eines Karzinoms ist in der Bedeutung als Prognoseparameter für Zervixkarzinome in der Literatur unterschiedlich bewertet (101,131). Karzinome mit einem hohen Anteil an

schnellproliferierenden Zellen sollen eine ungünstigere Prognose haben als solche mit langsam proliferierenden (198,199).

Ebenso verschieden bewertet wird der Einfluß der Ploidie. Diploide Karzinome sollen eine bessere Prognose haben als aneuploide Karzinome (131). Unklar ist, ob es unter hypoxischen Bedingungen zu einer Zunahme eines aneuploiden Tumoranteils kommt. Der Einfluß der Tumoroxygenierung auf das Proliferationsverhalten bei Zervixkarzinomen ist nur bei Cooper et al. (28) beschrieben.

Mit der Flußzytometrie steht ein einfach zu handhabendes Verfahren zur Bestimmung des DNA-Index und des S-Phasenanteils als Proliferationsmarker sowie für die Bestimmung der Ploidie zur Verfügung (9). Als zusätzlicher Marker für das Proliferationsverhalten konnte immunhistologisch KI-67 bestimmt werden. Der Zusammenhang Proliferation-Sauerstoffversorgung war ein weiterer Gegenstand der Untersuchung.

Im Vergleich zu anderen soliden Karzinomen weisen Zervixkarzinome eine weitere Besonderheit auf: Sie sind in einem hohen Maße wahrscheinlich virusinduziert. Durch eine Infektion mit Papilloma-Viren kommt es bei Zervixkarzinomen zu einer Beeinflussung der Wirksamkeit des Tumorsuppressorgens *P53* (82).

*P53*<sup>1</sup> hat als "Wächter des Genoms" in der Zellzyklusregulation vielfältige Aufgaben. Beim Verlust von *P53* kann das Apoptose-Programm nicht mehr ordnungsgemäß ablaufen, d.h. es können weder DNA-Schäden repariert noch Tumorzellen mit geschädigter DNA eliminiert werden (2,17, 54, 58,170).

Die kausale Beziehung zwischen einer Infektion mit den humanen Papillomaviren HPV16 und HPV18 und der Entwicklung von Uteruszervixkarzinomen ist gesichert (168). HPV16 kodiert das E6-Protein, bindet das zelluläre Tumorsuppressorprotein *P53* und bewirkt seine Degradation. HPV18 inaktiviert auf dem gleichen Wege über das Protein E7 das Retinoblastom-Tumorsuppressorprotein Rb. In Zervixkarzinomen ist Wildtyp-*P53* nachweisbar, wobei aber die Degradation und Inaktivierung durch E6 funktionell einer Mutation gleichzusetzen ist (177,183,190). Dem beschleunigten Abbau des Protein-E6-Wildtyp-*P53*-Komplexes stehen Untersuchungen gegenüber (1, 94, 97,134,150), die nachweisen, daß unter hypoxischen Bedingungen die *P53*-Degradation durch E6 über das MDM2-Protein behindert ist und daß sich trotz der HPV16-Infektion eine *P53*-Überexpression nachweisen läßt. Zu den Faktoren, die eine Expression von *P53* aktivieren und damit eine Apoptose auslösen, gehört die zelluläre Hypoxie. Nach Giaccia et al. (54) und Graeber et al. (58) sollen beim Vorliegen einer Hypoxie diejenigen Zellen im Tumor selektioniert werden, die ein defektes *P53*-Protein besitzen. Diese Zellen verlieren die Apoptosefähigkeit (200, 213). Die Frage, ob Hypoxie im Tumorgewebe

---

<sup>1</sup> Die Schreibweise für Tumorgene und kodierte Proteine folgt den Empfehlungen des "Genetic Nomenclature Guide", zit. in: Christoph Wagener: Molekulare Onkologie: Georg Thieme Verlag Stuttgart 1999

verbunden ist mit dem Nachweis einer erhöhten P53-Expression und inwieweit eine P53-Überexpression einen Einfluss auf den Effekt der Strahlentherapie beim primär strahlentherapeutisch behandelten Uteruszervixkarzinom hat, war ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Untersuchung.

Als ein "Gegenspieler" vom *P53*-Gen ist das *BCL2*-Gen anzusehen, da es die Apoptoseinduktion hemmen oder vermindern kann. Ob die beiden Tumorsuppressorgene *P53* und *BCL2* einen Einfluß auf die Wirksamkeit einer Strahlentherapie und damit auf das klinische Behandlungsergebnis haben, wird in der Literatur sehr unterschiedlich bewertet (3, 67,127,150,155, 206). In der vorliegenden Untersuchung wurde die immunhistochemische Untersuchung der von *P53* und *BCL2* kodierten Proteine P53 und BCL2 eingeschlossen.

### **1.6. Additive Behandlung mit Interferon-alpha-2a und 13-cis-Retinsäure**

In-vivo- und in-vitro-Versuche haben den hemmenden Effekt von Interferon-alpha-2a (IFN) und 13-cis-Retinsäure (cRA) auf das Tumorstadium bewiesen (80). Neben einer antiproliferativen und einer antiangiogenen Wirkung besitzen Interferone eine antivirale Wirkung. Die Wirkung erfolgt über die Hemmung der Synthese viraler Proteine. Auf den Zusammenhang zwischen der Entwicklung von Zervixkarzinomen und einer Infektion mit humanen Papilloma-Viren wurde bereits hingewiesen. Die Überprüfung der Wirksamkeit eines antiviralen Medikaments auf ein möglicherweise virusinduziertes Karzinom erschien sinnvoll, zumal Interferon-alpha-2a als rekombinantes Präparat auch zur Verfügung steht. Als Therapiekombination schien eine Kombination von Interferon-alpha-2a und 13-cis-Retinsäure eine erfolgversprechende Option. Die 13-cis-Retinsäure hat sich in Zellkulturen als ein besonders wirksames Isomere der Vitamin-A-Säure erwiesen. Die Retinoide als Vitamin-A-Derivate greifen in die Proliferation und Differenzierung menschlicher Zellen ein. Sie bewirken eine De-Entdifferenzierung präneoplastisch veränderter Zellen. Unter der Therapie mit Retinoiden konnte die Rückbildung kutaner Präkanzerosen und auch von zervikalen Dysplasien beobachtet werden (79, 80, 95).

Die Behandlung fortgeschrittener Uteruszervixkarzinome mit einer Kombination von IFN/cRA wurde erstmals von Lippman (112) und Kavanagh (90) beschrieben. Diese Behandlung bewirkte in einem Teil der Fälle eine Rückbildung der großen Tumore bis zur Operationsfähigkeit. Allerdings hielt bei den nichtoperierten Patientinnen der Therapieeffekt nur über wenige Monate bis zum erneuten Progreß an.

In einer Phase-2-Studie, an der unsere Klinik in der Studienleitung beteiligt war, sollte diese Behandlung in Kombination mit einer typischen kurativen Strahlentherapie auf die Verträglichkeit getestet werden, in einer anschließenden Phase-3-Studie der Vergleich mit

einer alleinigen Strahlentherapie auf das klinische Behandlungsergebnis randomisiert geprüft werden.

Aus der Klinik für Strahlentherapie wurde eine hohe Patientenzahl in diese beiden Studien eingeschlossen. Die Behandlungsergebnisse der Studien werden unter der besonderen Berücksichtigung der Sauerstoffmessungen im Tumor dargestellt.

### **1.7. Ziel der Untersuchung**

In der vorgelegten Arbeit wurde der Einfluß der Sauerstoffkonzentration im Tumor als Prognosefaktor sowohl in prätherapeutischen Messungen als auch im Verlauf der Strahlentherapie bei Patientinnen mit primär bestrahlten Uteruszervixkarzinomen untersucht. Insbesondere sollte analysiert werden, inwieweit sich unter der Strahlentherapie der Oxygenierungsstatus im Tumor änderte und ob sich daraus prognostische Aussagen ableiten lassen.

Neben den Messungen zur Tumoroxygenierung im Verlauf der Therapie sollte weiterhin untersucht werden, ob mögliche Zusammenhänge zwischen Tumorhypoxie und Anämie, Tumorhypoxie und Tumorangiogenese sowie Tumorhypoxie und Proliferation bestanden. Ein weiterer Aspekt war die Bestimmung des P53-Status und die Frage nach Zusammenhängen zwischen Expressionshöhe von P53 und der Tumorhypoxie sowie der Bestimmung von BCL2 im Tumorgewebe.

Als Angiogeneseparameter wurde der Vascular Endothelial Growth Factor im Serum von Patientinnen mit Uteruszervixkarzinomen und der Einfluß der Anämie auf die Expressionshöhe untersucht. Weiterhin sollten Zusammenhänge zwischen Tumorhypoxie und Gefäßdichte in Tumorbiopsaten bestimmt werden.

Alle Untersuchungen erfolgten unter dem Aspekt der klinischen Relevanz und des klinischen Therapieerfolges, d.h. des Überlebens für die untersuchten Patientinnen.

Letzten Endes wurden die Untersuchungen durchgeführt, um Zusammenhänge zwischen Tumorbiologie und Radioresistenz zu klären und auf dieser Basis Hypothesen für eine Weiterentwicklung bestehender Therapiekonzepte zu formulieren.

## 2. Material und Methode

### 2.1. Patientengut

#### 2.1.1. Altersverteilung

Die Untersuchungen zum Oxygenierungsverhalten erfolgten an 87 Patientinnen mit inoperablen Uteruszervixkarzinomen, die vom März 1995 bis September 1999 in der Klinik für Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle primär bestrahlt wurden. Alle Patientinnen erhielten eine kurative Behandlung, die geplante Therapie konnte in jedem Fall ohne Einschränkung oder Therapieänderung durchgeführt werden.

Das Durchschnittsalter aller Patientinnen lag bei 58,6 Jahren (34-80 Jahre). Die Verteilung der Altersgruppen ist in der Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Altersgruppen der Patientinnen

Alter	Anzahl	Prozent
≤40 Jahre	10	11,5
40- 50 Jahre	14	16,1
50- 60 Jahre	22	25,3
60- 70 Jahre	24	27,6
>70 Jahre	17	19,5
Gesamt	87	100,0

Es überwogen die Patientinnen im fortgeschrittenen Alter. Der Altersgipfel lag bei den Patientinnen zwischen 60 und 70 Jahren. Insgesamt waren 41 Patientinnen (47,1%) älter als 60 Jahre. Erwähnenswert ist, daß 4 Patientinnen unter 35 Jahre und 5 Patientinnen über 75 Jahre alt waren.

### 2.1.2. Einschlußkriterien und Befundbeurteilung

Voraussetzung, um in die vorliegende prospektive Untersuchung einbezogen zu werden, waren folgende Bedingungen:

1. Sowohl vom Allgemeinzustand der Patientin als auch von der Tumorausdehnung war ein kurativer Therapieansatz möglich.
2. Als klinische Untersuchungen lagen vor: klinischer Status, gynäkologischer Untersuchungsbefund, histologischer Tumornachweis, Thoraxröntgen, Computertomogramm des Ganzabdomens (Ausschluß paraaortaler Metastasen, Beurteilung der Nierenfunktion und Harnableitung, Tumorausdehnung im kleinen Becken), Laborstatus.
3. Es handelte sich um ein Plattenepithelkarzinom der Zervix uteri.
4. Die Größe des Karzinoms ließ eine Probenentnahme von Tumorgewebe zur histologischen Bearbeitung sowie eine Sauerstoffmessung im Tumor zu, ohne daß für die Patientin größere Beschwerden zu erwarten waren. Daher wurden vor allem exophytisch wachsende Karzinome bevorzugt in die Untersuchung eingeschlossen.
5. Die Patientin mußte ihr Einverständnis für diese Untersuchungen geben.

Ausgeschlossen wurden Karzinome im Stadium IA und IB, da bei diesen kleinen Tumoren eine ausreichende Gewebeentnahme nicht möglich war und bei der Sauerstoffmessung u.U. Normalgewebe mit erfaßt werden konnte. Weiterhin wurden Adenokarzinome nicht eingeschlossen. Ein weiteres Ausschlußkriterium war die anatomisch bedingte Unmöglichkeit, die Untersuchungen durchzuführen, wie z.B. extrem enge Verhältnisse oder endomurales sowie szirrhotes Tumorwachstum. Als letzte Ausschlußkriterien sind die fehlende Compliance oder Verweigerung der Untersuchungen durch die Patientin zu nennen.

Alle Patientinnen der Studie wurden in der eigenen Nachsorgeambulanz regelmäßig nachuntersucht. Konnten die Patientinnen aus verschiedenen Gründen die Nachuntersuchungstermine nicht wahrnehmen, erfolgte die Befundnachfrage über den behandelnden Gynäkologen. Von den 87 Patientinnen ist keine ohne Nachbetreuung als „verschollen“ in der Statistik zu führen. Der Krankheitsverlauf und das Schicksal der Patientinnen ist in den kliniksinternen Unterlagen dokumentiert.

Endpunkt für die vorgelegte Auswertung der Daten der von März 1995 bis September 1999 behandelten Patientinnen war der 31. Dezember 2000. Die Überlebenskurven wurden nach Kaplan-Meier ausgehend vom Behandlungsbeginn gerechnet. Zur Beurteilung der Therapieergebnisse wurde das tumorspezifische Überleben 3 Jahre nach Therapiebeginn herangezogen. Weiterhin erfolgte die Analyse des ereignisfreien Überlebens insgesamt und getrennt nach lokalem Therapieversagen und eingetretener Fernmetastasierung.

### 2.1.3. Stadienverteilung und histologische Befunde

Die Beurteilung des Tumorstadiums erfolgte sowohl klinisch als auch mit bildgebenden Verfahren. In allen Fällen lag ein Computertomogramm vor; eine Magnetresonanztomographie war im Behandlungszeitraum noch nicht routinemäßig möglich. Die Beurteilung der Tumorausdehnung war vom überweisenden Gynäkologen mitgeteilt worden und wurde in der Erstuntersuchung nochmals durch den behandelnden Radiotherapeuten überprüft. Die Klassifizierung der Tumorstadien erfolgte nach dem FIGO-System, da keine Probelaparotomien oder laparoskopisches Lymphknotensampling durchgeführt worden waren. In der Tabelle 2 ist die Stadienverteilung für die 87 Patientinnen dargestellt.

Tabelle 2: Stadienverteilung der 87 Patientinnen

Stadium (FIGO)	Anzahl	Prozent
IIB	19	21,8
IIIB	59	67,8
IVA	9	10,3
Gesamt	87	100,0

Es überwogen die fortgeschrittenen Karzinome, ca. 80% aller Patientinnen wiesen auf Grund der Tumorausdehnung ein inoperables Karzinom auf. Bei den 19 Patientinnen im Stadium IIB war entweder eine internistische Inoperabilität gegeben oder der Befund lag an der Grenze zum Stadium IIIB. Im Differenzierungsgrad überwogen die undifferenzierten Karzinome (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht über das histologische Grading

Grading	Anzahl	Prozent
1	1	1,1
2	42	48,3
3	44	50,6
Gesamt	87	100,0

## 2.2. Strahlentherapie

### 2.2.1. Bestrahlungsplanung und Zielvolumen

Alle Patientinnen wurden unter kurativer Zielsetzung bestrahlt, wobei zwischen den Stadien IIB und IIIB n. FIGO kein Unterschied bezüglich der Therapie gemacht wurde, lediglich das Stadium IVA wurde modifiziert behandelt. Prinzipieller Bestandteil der Bestrahlung war eine Kombination aus Hochvolt-Therapie und lokaler Kontakttherapie.

Das Planungszielvolumen für die perkutane Therapie umfaßte den Primärtumor sowie die regionalen Lymphabflußwege mit einem Sicherheitsabstand von mindestens 1,5cm.

Als regionäre Lymphabflußwege müssen beim Uteruszervixkarzinom der parametraner Bereich, die Lnn.iliiac.interni und Lnn.iliiac.externi, die Lnn. obturatoriae sowie die Lnn.iliiac.communes in das Bestrahlungsgebiet einbezogen werden.

Die Hochvolttherapie erfolgte bei allen Patientinnen mit 15 MeV-Photonen am Linearbeschleuniger (KD2 der Fa.Siemens) über 2 individuell geplante opponierende Felder unter Ausblockung von Ecken im Bereich der oberen lateralen Feldgrenzen, um eine gewisse Schonung des Dünndarms in diesem Bereich zu erzielen. Obere Feldgrenze war der Zwischenwirbelraum L4/L5, die seitlichen Feldgrenzen wurden 1,5 cm seitlich der Linea terminalis eingestellt. Nach caudal wurde die untere Feldgrenze mindestens in Höhe der Symphysenmitte festgelegt, wobei die Obturatorlöcher mit in das Bestrahlungsfeld einbezogen wurden. Lag eine Infiltration der Scheide vor, verlängerten sich die kaudalen Feldgrenzen nach unten und lagen mindestens 2 cm unterhalb der Tumordinfiltration. Dabei sollte nach Möglichkeit der Introitus vaginae geschont werden. Mit dieser Bestrahlungstechnik waren die Region der Lnn.iliiacae internae und externae, die Lnn. communes und auch- als Fortsetzung der Externa-Lymphknoten- die medial gelegenen tiefen Lnn.inguinales erfaßt.

Konnte der Uterus für eine Kontakttherapie sondiert werden, wurde zur Verringerung der Strahlenbelastung an Blase und Darm nach 19,8 Gy ein standardisierter Mittelblock gesetzt, der so gestaltet war, daß in Patientenmitte eine Feldbreite von 4cm bis zur Promontoriumshöhe ausgeblockt wurde. Die 4 cm ergeben sich aus der Dosierung der Kontakttherapie auf den Punkt A, der jeweils 2cm lateral der Mittellinie und 2 cm oberhalb der Portioebene per definitionem zu finden ist.

Als Kontakttherapieverfahren verwendeten wir ein High-Dose-Rate-Afterloadingverfahren mit Iridium-192 (Selectron der Fa. Nucletron). Als Applikator kam ausschließlich eine einfache mittelständige Sonde mit Vaginalrohr zur Fixation zur Anwendung, eine Stift-Ring-Applikation wurde nicht verwendet. Vor jeder Applikation wurde die Uterussondenlänge überprüft. Der Quellenweg war in der Regel mit der Sondenlänge identisch. Eine Mitbestrahlung der Scheide mittels Kontakttherapie ist in der vorliegenden Untersuchung nicht erforderlich gewesen.

Der Quellenvorschub wurde auf 5 mm festgelegt. Bei einer Sondenlängen bis 70mm wurde der Quellenweg nicht gewichtet. Bei längeren Sonden erfolgte eine Wichtung des Quellenweges in der Form, daß im Uteruszervixbereich auf 7 Haltepositionen mit doppelten Standpositionen bestrahlt wurde. Durch diese Wichtung konnte eine Überdosierung insbesondere im Bereich des Blasenbodens verringert werden. In der Regel kam eine mäßig gebogene 20°-Intrauterinsonde zum Einsatz, nur bei starr anteflektiertem und fixierten Uterus mußte auf die stärker gekrümmte 40°-Sonde ausgewichen werden. Alle Behandlungen wurden ohne allgemeine oder lokale Anästhesie appliziert.

Die Strahlenbelastung der kritischen Organe Blase und Darm konnte bei den meisten Afterloading-Behandlungen durch eine Blasen- und Rektum-Messung mittels Ionisationskammern (AM6, PTW Freiburg) überwacht und dokumentiert werden.

Zusätzlich wurde jede Behandlung mit einer Röntgen-Lokalisationsaufnahme in 2 Ebenen verifiziert.

### 2.2.2. Gesamtdosis und Therapiedauer

Die gesamte Bestrahlung wurde in einem Zyklus ohne Bestrahlungspause durchgeführt. Einzelne bestrahlungsfreie Tage, bedingt durch Gerätewartung oder Feiertage, konnten meistens durch Behandlungen am Samstag ausgeglichen werden, so daß in der Regel eine Gesamtbestrahlungszeit von 7 Wochen nicht überschritten wurde.

#### Bestrahlungsschema:

Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5	Woche 6
XXXXX	XXXXX	XALXXX	XALXXX	XALXXX	ALXXXAL
X	1,8 Gy ED Hochvolt , 15 MeV-Photonen				
AL	7 Gy Afterloading im Punkt A				

Die Hochvolttherapie erfolgte mit einer Einzeldosis von 1,8 Gy, die jeweils an 5 Tagen in der Woche gegeben wurde. An den Kontaktherapie-Tagen erfolgte keine Hochvolttherapie. Bei Ausblockung der Mitte wurde bis 45 Gy Gesamtdosis im Bereich der 90%-Isodose aufgesättigt.

Im Bereich der Blockränder, die auf Grund der Fokussierung dem Punkt A entsprechen, betrug die Gesamtdosis 32,4 Gy (19,8 Gy homogene Beckenbestrahlung + 50% Dosis am Blockrand von 25,2 Gy = 12,6 Gy).

Als Brachytherapieeinzeldosis applizierten wir 7 Gy im Punkt A in 5 Einzelapplikationen, daraus resultiert eine Gesamtdosis von 35 Gy im Punkt A. Die Dosis an der Beckenwand

durch die Kontakttherapie lag- in Abhängigkeit von der Sondenlänge- bei 1,4- bis 1,5 Gy pro Fraktion.

Als Gesamtdosis im Bereich des Primärtumors im Punkt A resultiert aus Hochvolt- und Brachytherapie eine Dosis von 65 bis 70 Gy, im Bereich der Lymphabflußwege von 52 bis 54 Gy.

Aus dem Behandlungskonzept ergibt sich, daß durch die Anwendung eines Mittelblockes zur Schonung von Blase und Darm die Blasen- und Rektumbelastung unter 55 Gy lag.

Tumoren im Stadium IVA (Blasen-oder Rektumeinbruch):

Aufgrund der Gefahr, daß es durch eine schnelle Tumoreinschmelzung ohne adäquate bindegewebige Umwandlung des Tumorgewebes zu einer Fistelbildung- entweder zu einer Blasen-Scheiden- Fistel oder zu einer Rektum-Scheiden-Fistel- kommt, hat die Kontakttherapie in diesem Stadium in den bisherigen Therapiestandards einen eher untergeordneten Stellenwert, der Schwerpunkt liegt eindeutig in der höher dosierten Hochvolttherapie mit gleichem Zielvolumen. Daher wurde von uns eine Kontakttherapie nur in Einzelfällen als Boostbestrahlung eingesetzt. Die Gesamtdosis lag bei mindestens 54 Gy im Bereich der 90%-Isodose, mit Boost bei 60 Gy.

### **2.3. Behandlung mit Isotretinoin/Interferon-alpha-2a und Strahlentherapie**

Von den insgesamt 87 Patientinnen wurden 32 Patientinnen im Stadium IIB und IIIB entweder im Rahmen einer Phase-II-Studie oder einer Phase-III-Studie zusätzlich zur Strahlentherapie mit einer zusätzlichen medikamentösen Therapie, die aus einer Kombination von 13-cis-Retinsäure und Interferon- alpha-2a bestand, behandelt.

Entsprechend dem Therapieprotokoll erhielten die Patientinnen eine 14-tägige Vorbehandlung mit täglich 6 Mio IE Interferon-alpha-2a (IFN) subkutan (Roferon A ®) und 1mg/kg KG Isotretinoin (cRA, Roaccutan®) per os. Mit Beginn der Strahlentherapie wurde die Interferon-Applikation auf 3 x 3 Mio. IE Roferon® und 0,5mg/kgKG Roaccutan® reduziert, die adjuvante Therapie endete mit der Bestrahlung.

Sowohl für die Phase-II-Studie als auch für die Phase-III-Studie lagen die Voten der Ethik-Kommission vor, alle Patientinnen waren mit der Studie einverstanden.

Ziel der Studien war eine Verbesserung des tumorspezifischen Überlebens. Die Auswertung dieses Studienziels ist nicht Inhalt dieser Untersuchung. Trotzdem muß ein Einfluß dieser adjuvanten Behandlung auf das Therapieergebnis ausgewertet werden. Daher wird in den Analysen ein möglicher Einfluß geprüft.

## **2.4. Untersuchungsablauf und Untersuchungsdurchführung**

### **2.4.1. Tumorhistologie**

Aus dem makroskopisch sichtbaren Tumor wurden aus mindestens 2 repräsentativen Bereichen mit der Biopsiezange unter Sicht Gewebeproben entnommen. Es wurde darauf geachtet, daß die Entnahme nicht aus nekrotischen Arealen oder aus massiv blutenden Gebieten erfolgte. Bevorzugte Areale waren oberer und unterer Tumor-Quadrant, da in diesem Gebieten auch die Bestimmung des Sauerstoffpartialdruckes vorgenommen wurde.

Die Gewebeproben wurden kurz in physiologischer Kochsalzlösung gespült und für die histologische Aufarbeitung in Formalinlösung fixiert.<sup>2</sup>

Aus der gleichen Biopsie entnommenes Gewebe konnte zur Bestimmung der DNA-Analyse mittels Flußzytometrie verwendet werden.

### **2.4.2. Immunhistochemische Untersuchungen**

Das Biopsiematerial wurde in in Kochsalzlösung ab gespült und in 4%iger gepufferter Formalinlösung fixiert. Die Weiterverarbeitung der Gewebeproben erfolgte im Institut für Pathologie an Paraffinschnitten. Von eingebetteten Gewebsblöcken wurden 3-4 µm dicke Gewebsschnitte auf mit Poly-L-Lysin beschichtete, kommerziell erhältliche Objektträger aufgezogen. Weitere Schritte in der Verarbeitung waren die Deparaffinierung und die Hemmung endogener Peroxidasen. Die Vorbehandlung der Schnittpräparate und die Verdünnung der Primärantikörper ist entsprechend der Tabelle 4 vorgenommen worden. Nach entsprechender Vorbehandlung erfolgte die Sichtbarmachung der Reaktion mit den jeweiligen Primärantikörpern mit der Avidin-Biotin-Komplex-Methode und 3,3'-Diaminobenzidin als Chromogen.

Die Menge der MIB-1, der P53- und der BCL-2-exprimierenden Tumorzellen wurde jeweils in Prozent positiv angefarbter Tumorzellen im Verhältnis zur Gesamttumorzellzahl in 300 ausgezählten Tumorzellen in den Abschnitten mit der besten Anfärbung angegeben. Bei der Auszählung der Kapillaranschnitte nach Markierung mit dem Endothelmarker CD 31 wurden einzelne solide Endothelzellcluster, einzelne markierte Endothelzellen und Endothelzellcluster mit Lumen jeweils als eine Kapillare gezählt. Die Auszählung erfolgte lichtmikroskopisch mit einer modifizierten Methode nach Weidner (210) bei 400facher Vergrößerung und Sehfeldzahl 25 (Mikroskop Zeiss Jenamed 2 histology) in möglichst 10 nichtüberlappenden Gesichtsfeldern in den vaskulären Hot-

---

<sup>2</sup> Die histologischen Untersuchungen wurden von Herrn Dr.U.Krause und Dr.A.Hammer, Institut für Pathologie, durchgeführt, denen ich dafür danke.

spots. Bei den Biopsien, die auf Grund ihrer Größe nicht 10 beurteilbare Gesichtsfelder aufwiesen, wurden alle Gesichtsfelder in die Untersuchung einbezogen.

Tabelle 4: Immunhistochemische Methoden und verwendete Antikörper

Monoklonale Primärantikörper von der Maus	Klon	Hersteller	Mikrowellenvorbehandlung	enzymatische Vorbehandlung	Verdünnung des Antikörpers
Proliferations-assoziiertes Antigen KI-67	MIB-1	Dianova Hamburg Deutschland	3 x 5 min	ohne	1:30
P53	DO-7	Dako-Group Dänemark	3 x 5 min	ohne	1:200
BCL-2	124	Dako-Group Dänemark	5 x 5 min	ohne	1:50
Endothelmarker CD 31	JC/70A	Dako-Group Dänemark	ohne	0,1% Trypsin	1:20

### 2.4.3. Flußzytometrie

Die gewonnenen Gewebestücke wurden schnell weiterverarbeitet. Nach Abspülen mit physiologischer Kochsalzlösung erfolgte die Zerkleinerung größerer Gewebestücke mechanisch mit einer kleinen Schere und die Inkubation des Gewebestreifens in einer Zitruslösung für 10- 20min. Anschließend wurde die Lösung durch ein Filtersieb in ein Schliff-Zentrifugenglas gegeben und 6 Minuten bei 600 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgegossen, das Sediment aufgeschüttelt und mit 1ml PBS-Lösung versetzt. Diese Zellsuspension mußte mit einer 1ml Insulin-Spritze und feiner Nadel aufgezogen, 10-20x wieder ausgespritzt und aufgezogen werden. Damit sollte eine Zellvereinzlung erreicht werden. Anschließend wurde diese Zellsuspension mit 9ml 80%igem Äthanol versetzt, das Glas verschlossen und bis zur Messung kühl aufbewahrt.

Die Messungen<sup>3</sup> erfolgten im Labor für Flowzytometrie der Universitätshautklinik der Martin-Luther-Universität mit einem Gerät FACScan der Firma Becton Dickinson.

<sup>3</sup> Für die flußzytometrischen Messungen danke ich Herrn Klapperstück aus der Universitäts-Hautklinik.

Als Parameter für die Beurteilung dienen der DNA-Index als Maß für die Ploidie sowie der S-Phasen-Anteil für die proliferative Aktivität des Tumorgewebes. In Tumoren mit diploiden- und aneuploiden Anteilen wurde der höhere DNA-Index, d.h. der aneuploide Tumoranteil für die Auswertung herangezogen.

## **2.5. Messung der Tumoroxygenierung**

### **2.5.1. Messung des Sauerstoffpartialdruckes im Tumor**

Die Messung der Tumoroxygenierung erfolgte über ein polarographisches Verfahren mittels einer sauerstoffsensitiven Nadelelektrode und dem  $pO_2$ -Histogrammen der Fa.Eppendorf, Hamburg. Das gewählte Untersuchungsverfahren ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt das einzige Meßverfahren, das diese Aussagen zuläßt und gilt in der Klinik als derzeitiger "Goldstandard".

Die zur Messung verwendeten Feinnadeln hatten einen Schaftdurchmesser von  $300\mu m$ . Die Goldkathode an der Nadelspitze ist von einer dünnen sauerstoffdurchlässigen Membran ( $\varnothing 12\mu m$ ) überzogen. Die Referenzelektrode aus Silber und Silberchlorid wird über eine EKG-Elektrode an der Haut in der Innenseite des Oberschenkels befestigt.

Vor und nach jeder Messung wird die Elektrode kalibriert. Hierzu wird die Elektrode in physiologischer Kochsalzlösung zunächst mit Raumluft und anschließend mit 100%-igem Stickstoff äquilibriert unter Einbeziehung der Raumtemperatur und des Luftdruckes. Die Kalibrierung im Anschluß an eine  $pO_2$ -Messung dient der Korrektur der Meßwerte unter Berücksichtigung einer Veränderung in der Meßgenauigkeit der Elektrode oder der Meßbedingungen in der Zwischenzeit.

Gemessen wird der Sauerstoffpartialdruck an Meßpunkten entlang einer vorgegebenen Wegstrecke. Damit ist es möglich, einen Eindruck über eine gewisse räumliche Verteilung des Sauerstoffdruckes in einem Gewebeareal zu erzielen, wenn die Messungen in mehreren Meßtracks erfolgen. Es ist dabei absolut unbestimmt, an welcher anatomischen Stelle im Gewebe der jeweilige Meßpunkt liegt: Er kann im Interstitium, in der Zelle, im Bindegewebe oder auch in einer arteriellen Kapillare angesiedelt sein. Die Interpretation der Meßergebnisse müssen diesem, im Verfahren begründeten Umstand, Rechnung tragen.

### **2.5.2. Meßparameter**

Ein typisches Charaktermerkmal maligner Tumoren ist die Inhomogenität der Verteilung des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe - Areale mit einer guten Perfusion liegen neben

minderversorgten oder nekrotischen Gebieten. Zur Beschreibung der Verteilung des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe werden aus diesem Grund eine Mindestanzahl von Meßpunkten benötigt (117). Andererseits ist wegen der Invasivität des Verfahrens bei Messungen in menschlichen Tumoren ohne Narkose der Anzahl der Messungen eine Grenze zu setzen. Die von uns gemessenen 4 Meßtracks mit je 32 Meßpunkten (entspricht einer Weglänge von je 22 mm) sind ein Kompromiß zwischen Meßgenauigkeit und Akzeptanz der Untersuchung durch die Patientinnen. Eine geringere Anzahl von Meßdaten schränkt die Aussage der Messungen ein.

Der Eppendorf-Histograph gibt die Werte in mmHg an, entweder als 10-; 50- oder 90%-Percentile. Wahlweise können die Meßwerte als prozentualer Anteil der gemessenen Werte unter 2,5mmHg, 5mmHg, als Medianwert ( $\cong$  50%-Percentile) sowie als Mittelwert ausgedrückt werden. Die Meßtracks können als Einzeltrack oder auch gepoolt für alle pro Messung untersuchten Tracks in einem Histogramm dargestellt werden.

Für die vorgelegte Untersuchung wurden alle in einer Sitzung gemessenen Werte aus den 4 Meßtracks gepoolt und in einem Histogramm dargestellt. Da in unserer Untersuchung direkt im Tumor ohne Einsatz einer Kanüle gemessen wurde, kann davon ausgegangen werden, daß Einblutungen in den Stichkanal keine Rolle spielten. Auch die Möglichkeit, artifiziell "negative" Meßwerte bei sehr fibrösen Tumoren zu erhalten, war bekannt. Es wurden diese Untersuchungen aus der Auswertung ausgeschlossen. Für alle Untersuchungen standen mindestens 100 auswertbare Meßpunkte zur Verfügung (47, 88,193).

Als Bezugspunkte wurden sowohl der prozentuale Anteil der Meßwerte unter 2,5mmHg und unter 5mmHg als auch der Medianwert aller Meßpunkte (entspricht der 50%-Percentile) in die Auswertung eingeschlossen, der Mittelwert wurde nicht eingesetzt.

In der Literatur wird zur Beschreibung der Hypoxie die relative Häufigkeit der Meßwerte unter 5mmHg verwendet. Als Grenzwert zur Beschreibung der Tumorphypoxie wird in einer Reihe von Veröffentlichungen (18, 74, 98,181) der Wert von 10mmHg als Grenzwert benutzt. Dieser Wert war in der ersten klinischen Beschreibung des Meßverfahrens in der Arbeit von Höckel et al.1996 (74) der Median der damals gemessenen Zervixkarzinome und wurde von anderen Autoren übernommen. Aus diesem Grund haben wir auch die 10 mmHg-Werte in den Überlebensanalysen als Cut-off-Wert eingesetzt. Die Eingruppierung erfolgte ansonsten nach dem jeweiligen Median des untersuchten Meßparameters.

Alle Meßdaten wurden auf Fehlermöglichkeiten überprüft. Nicht in die Auswertung einbezogen wurden negative Meßwerte unter  $-1$ mmHg. Werte bis  $-1$ mmHg können auf Grund der Streuung im physikalischen Meßvorgang entstehen (193) und können automatisch rechnergestützt übertragen werden. Eine weitere Fehlermöglichkeit ist das

Auftauchen von Werten  $>100\text{mmHg}$  im Meßprotokoll. Auch diese Werte müssen eliminiert werden, da unter normobaren Bedingungen die maximale Sauerstoffkonzentration im arteriellen Blut bei  $100\text{mmHg}$  liegt.

Insgesamt ist die Anzahl der auswertbaren Meßwerte auch als ein Maß für die Qualität der Messung zu betrachten. In unserer Analyse wurden Messungen mit mindestens 100 auswertbaren Meßpunkten einbezogen.

In der vorliegenden Auswertung wurde zur Charakterisierung des Oxygenierungsstatus der Zervixkarzinome der Median der jeweiligen Messung eingesetzt. Weiterhin wurde zum Vergleich mit Literaturangaben der  $10\text{mmHg}$ -Wert als Parameter verwendet. Für die Beschreibung der Tumorhypoxie diente die relative Häufigkeit der Werte unter  $2,5\text{mmHg}$  (hypoxische Fraktion HF 2,5) und unter  $5\text{mmHg}$  (hypoxische Fraktion HF5).

In der vorliegenden Untersuchung wurde bei allen Patientinnen eine prätherapeutische Messung sowie eine zweite Sauerstoffmessung im Tumor nach 11 Fraktionen Hochvolttherapie durchgeführt. Der 2. Zeitpunkt der Messung ergab sich aus unserem Behandlungskonzept: Nach  $19,8\text{Gy}$  homogener Beckenbestrahlung mußte über die HDR-Kontakttherapie entschieden werden. Die Festlegung der Afterloading-Therapie war mit der Sondierung des Uterus verbunden, einem mäßig invasiven Eingriff, der zwar nicht in Narkose erfolgte, aber u.U. doch eine analgetische Vorbehandlung erforderlich machte. Weitere  $\text{pO}_2$ -Messungen im Therapieverlauf wurden bei einigen Patientinnen zwar durchgeführt, aber nicht in die vorliegende Auswertung einbezogen. Grund dafür war, daß im weiteren Therapieverlauf möglicherweise nicht mehr im Tumor, sondern in Fibrose oder Nekrose gemessen wurde. Mit dem Ansprechen des Primärtumors auf die Strahlentherapie waren außerdem keine annähernd reproduzierbaren Meßorte zu verifizieren.

## **2.6. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen Statistikprogramm SPSS 9.0 für Windows (21).

Die Verteilung der Meßwerte wurde durch den Mittelwert mit Standardfehler ( $\bar{X} \pm \text{SE}$ ) sowie dem Median des jeweiligen Parameters angegeben.

Wenn keine physiologisch begründeten Trennwerte für eine Einteilung in Patientinnengruppen bekannt waren, erfolgte in der Regel eine Gruppeneinteilung und ein Vergleich der Gruppen in Abhängigkeit vom Median der untersuchten Variablen.

Der Vergleich von 2 Gruppen erfolgte mittels des Mann-Whitney-U-Tests für unabhängige Stichproben. Waren mehr als 2 Gruppen zu vergleichen, kam der H-Test nach Kruskal-Wallis zur Anwendung.

Die Untersuchung eines Zusammenhanges zwischen metrisch skalierten Größen erfolgte mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson.

Für die Berechnung der Überlebensanalysen wurden die 3-Jahresergebnisse nach der Kaplan-Meier-Methode angegeben. Die Überlebensanalysen wurden sowohl für das tumorspezifische Überleben als auch für das ereignisfreie Überleben (insgesamt als auch getrennt nach lokalem Tumorprogreß und Fernmetastasierung) durchgeführt, als Test kam der Log-Rank-Test zur Anwendung.

Die Beurteilung sinnvoll erscheinender Zusammenhänge erfolgte in mehrfaktorieller Betrachtung (Cox-Regression), wobei der klassische Prognoseparameter „Tumorstadium“ immer als Kovariate einbezogen wurde. Für eine mehrfaktorielle Regressionsanalyse war die Umwandlung einzelner Parameter in dichotome Variable erforderlich. Die Trennung dafür erfolgte ebenfalls nach dem Medianwert des jeweiligen Parameters oder nach sinnvollen physiologischen Grenzwerten.

Alle Tests wurden auf ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 5\%$  ( $p < 0,05$ ) bezogen. Bei Mehrfachtestungen wurde eine entsprechende Korrektur durchgeführt.

Wenn nicht ausdrücklich anders gekennzeichnet, sind die untersuchten Parameter als Mittelwerte mit den entsprechenden 95%-Konfidenzintervallen (CI 95%) dargestellt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Klinische Resultate

Die Analyse erfolgte nach den klinischen Behandlungsergebnissen. 2 Patientinnen verstarben im Therapiezeitraum interkurrent ( 1 Apoplex, 1 Myocardinfarkt).

Die Abbildung 1 zeigt die tumorspezifischen Überlebenskurven in Abhängigkeit vom Tumorstadium. Bei einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 42,5 Monaten (max.60 Monate) betrug das tumorspezifische Gesamtüberleben für alle Stadien nach 3 Jahren  $57 \pm 5 \%$ .

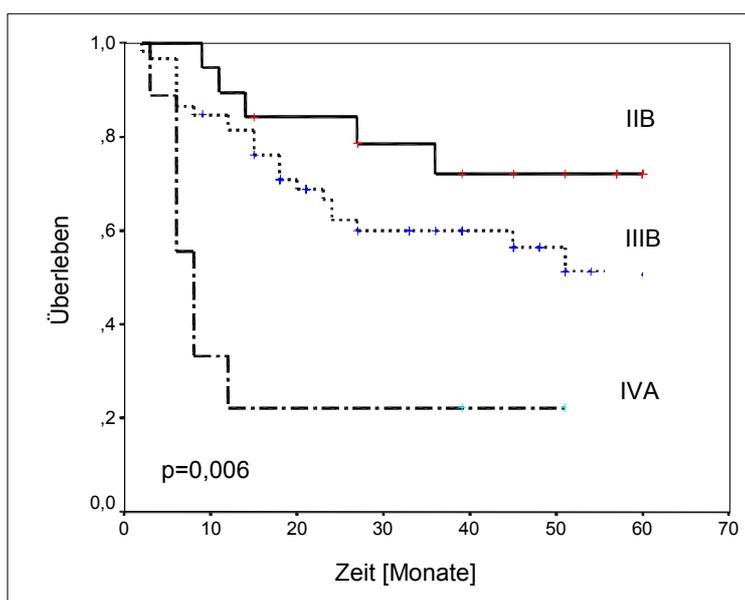


Abbildung 1 : Überleben in Abhängigkeit vom klinischen Tumorstadium nach FIGO

In der Tabelle 5 ist das stadienbezogene 3-Jahresüberleben zusammengestellt.

Tabelle 5: 3-Jahresüberleben in Abhängigkeit vom Tumorstadium

Stadium FIGO	N	3-Jahres-Überleben [%] $\bar{X} \pm SE$	p
IIB	19	$72 \pm 11$	
IIIB	59	$60 \pm 7$	
IVA	9	$22 \pm 14$	0,006
Gesamt	87	$57 \pm 5$	

Der Tabelle ist zu entnehmen, daß es für das Stadium IIB im Vergleich zum Stadium IIIB zwar einen Unterschied von 12% im Überleben gab, der jedoch nicht signifikant war.

Dagegen hat sich das Stadium IVA als ein signifikanter unabhängiger Prognosefaktor erwiesen.

In der Tabelle 6 sind die tumorspezifischen Events und das ereignisfreie Überleben aufgeschlüsselt. Natürlich lebten zum Zeitpunkt der Datenauswertung Patientinnen mit Tumorsymptomen, so daß die Quote von 55% ereignisfreiem Überleben niedriger ist als das Gesamtüberleben.

Tabelle 6: Ereignisfreies Überleben für das gesamte Patientenkollektiv

Ereignis	N	Ereignisfreies 3-Jahresüberleben [%] $\bar{X} \pm SE$
lokaler Tumorprogreß (PD)	19	
Fernmetastasen (FM)	17	
PD + FM	36	55 ± 6

Von den 19 Fällen mit lokalem Tumorprogreß wurden 12 in den ersten 12 Kontrollmonaten beobachtet, von den 17 Patientinnen mit Fernmetastasen nur 6 Fälle. Demnach entscheidet sich der lokale Therapieerfolg im wesentlichen im ersten Erkrankungsjahr, Fernmetastasen treten später auf.

Stadienbezogen ergaben sich dabei folgende Befunde:

Im Stadium IIB wurden in den ersten 3 Jahren 2 Patientinnen mit lokalem Progreß und 3 mit Fernmetastasen beobachtet, im Stadium IIIB 11 mit lokalem Progreß und 13 mit Fernmetastasen, im Stadium IVA 6 Patientinnen mit lokalem Therapieversagen und nur 1 mit Fernmetastasen. Mit der Zunahme der Tumorgröße kam es zu einer Zunahme des lokalen Therapieversagens, wobei aber möglicherweise bei den Patientinnen mit lokalem Therapieversagen die Fernmetastasierung nicht mehr erlebt wird.

Es wurde weiterhin die Prognose hinsichtlich der einzelnen Altersgruppen analysiert.

Die Überlebenschancen in Abhängigkeit von den Altersgruppen ist in der Abbildung 2 dargestellt.

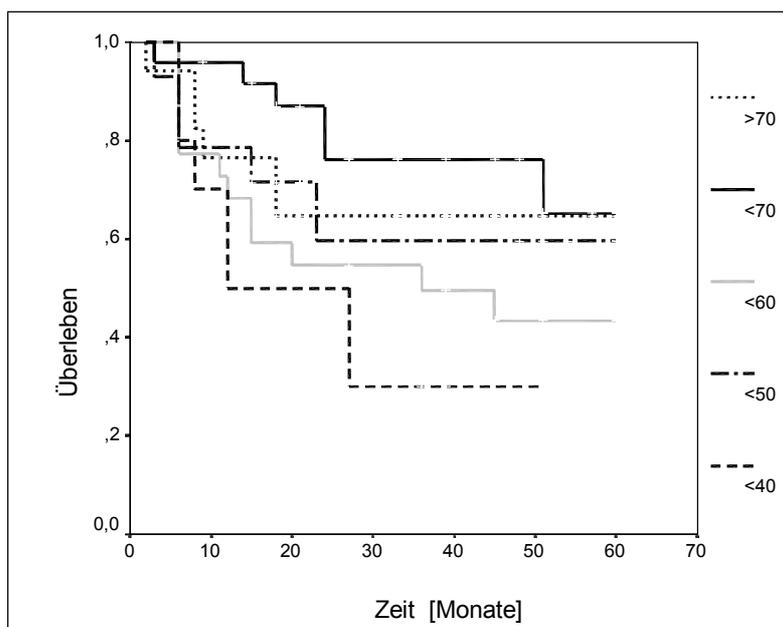


Abbildung 2: Überlebenswahrscheinlichkeit für die einzelnen Altersgruppen

Für die 10 Patientinnen im Alter unter 40 Jahre war das 3-Jahresüberleben mit  $30 \pm 15\%$  erheblich schlechter als für die älteren Patientinnen über 40 Jahre ( $63 \pm 6\%$ ), der Unterschied war aber im Log-Rank-Test mit  $p = 0,053$  nicht signifikant. Wurde die Altersgrenze bei 50 Jahren angesiedelt, war ein Unterschied im Überleben nicht mehr festzustellen. Auch für die sehr alten Patientinnen war die Prognose nicht schlechter als für die anderen Altersgruppen, so daß das Alter nicht als isolierte Kovariate in die weiteren Auswertungen einbezogen werden mußte. Trotzdem sollte ein niedriges Alter als ein erhöhter Risikofaktor betrachtet werden.

### 3.2. Untersuchungen zur Tumoroxygenierung

Die Bedeutung der Sauerstoffversorgung im Tumor für die Strahlenempfindlichkeit ist in der Einleitung dargestellt worden. In der Untersuchung zum Oxygenierungsstatus bei Zervixkarzinomen wurde zunächst die prätherapeutische Sauerstoffversorgung im Tumor als ein möglicher Prognoseparameter für das Ansprechen der Karzinome untersucht.

Für den Oxygenierungsstatus im Tumor wurde der mediane Sauerstoffpartialdruck unseres Patientenkollektivs sowie die Werte über und unter 10mmHg verwendet. Die Beschreibung der Hypoxie im Tumor erfolgte durch die Angaben über den prozentualen Anteil der hypoxischen Meßwerte unter 2,5mmHg (HF2,5) und unter 5mmHg (HF5).

Als weiterer möglicher Prognoseparameter wurde eine zweite Messung nach 11 Fraktionen Hochvoltbestrahlung, also nach 19,8 Gy, herangezogen. Schwerpunkt der Analysen waren die Veränderungen der Tumoroxygenierung unter der Strahlentherapie in Hinblick auf das klinische Resultat.

#### 3.2.1. Prätherapeutischer Oxygenierungsstatus

In der Tabelle 7 sind alle prätherapeutisch gemessenen Oxygenierungsparameter sowohl für die einzelnen Tumorstadien als auch für das gesamte Patientenkollektiv als Übersicht aufgelistet.

Tabelle 7: Prätherapeutische Tumoroxygenierung in Bezug zum Tumorstadium

Oxygenierungsparameter		Stadium IIB N = 19	Stadium IIIB N = 59	Stadium IVA N = 9	Gesamt N = 87
Medianer pO <sub>2</sub> [mmHg]	$\bar{X} \pm SE$	22 ± 5	21 ± 2	18 ± 5	21 ± 2
	Median	14	15	16	15
2,5mmHg [%]	$\bar{X} \pm SE$	16 ± 5	15 ± 3	23 ± 10	16 ± 2
	Median	2	5	4	3
5 mmHg [%]	$\bar{X} \pm SE$	24 ± 6	26 ± 3	30 ± 11	26 ± 3
	Median	10	20	15	18

Aus der Tabelle 7 ist zu entnehmen, daß sich der Oxygenierungsstatus nur gering zwischen den Tumorstadien unterschied. Die Tumorgöße spielte offensichtlich keine Rolle bezüglich der Tumoroxygenierung. Als Beispiel für die große intertumorale Heterogenität wurden zwei Originalhistogramme bei vergleichbaren Tumorgößen und Histologien abgebildet (Abbildung 3). Beide Histogramme stellen den

Oxygenierungsstatus von Uteruzervixkarzinomen im Stadium IIIB dar, in beiden Fällen handelte es sich um undifferenzierte Tumore. Das obere Histogramm zeigt einen gut oxygenierten Tumor mit einem medianen Sauerstoffpartialdruck von 37,9 mmHg, das untere Histogramm einen ausgesprochen hypoxischen Tumor mit einem medianen  $pO_2$  von 4,3 mmHg.

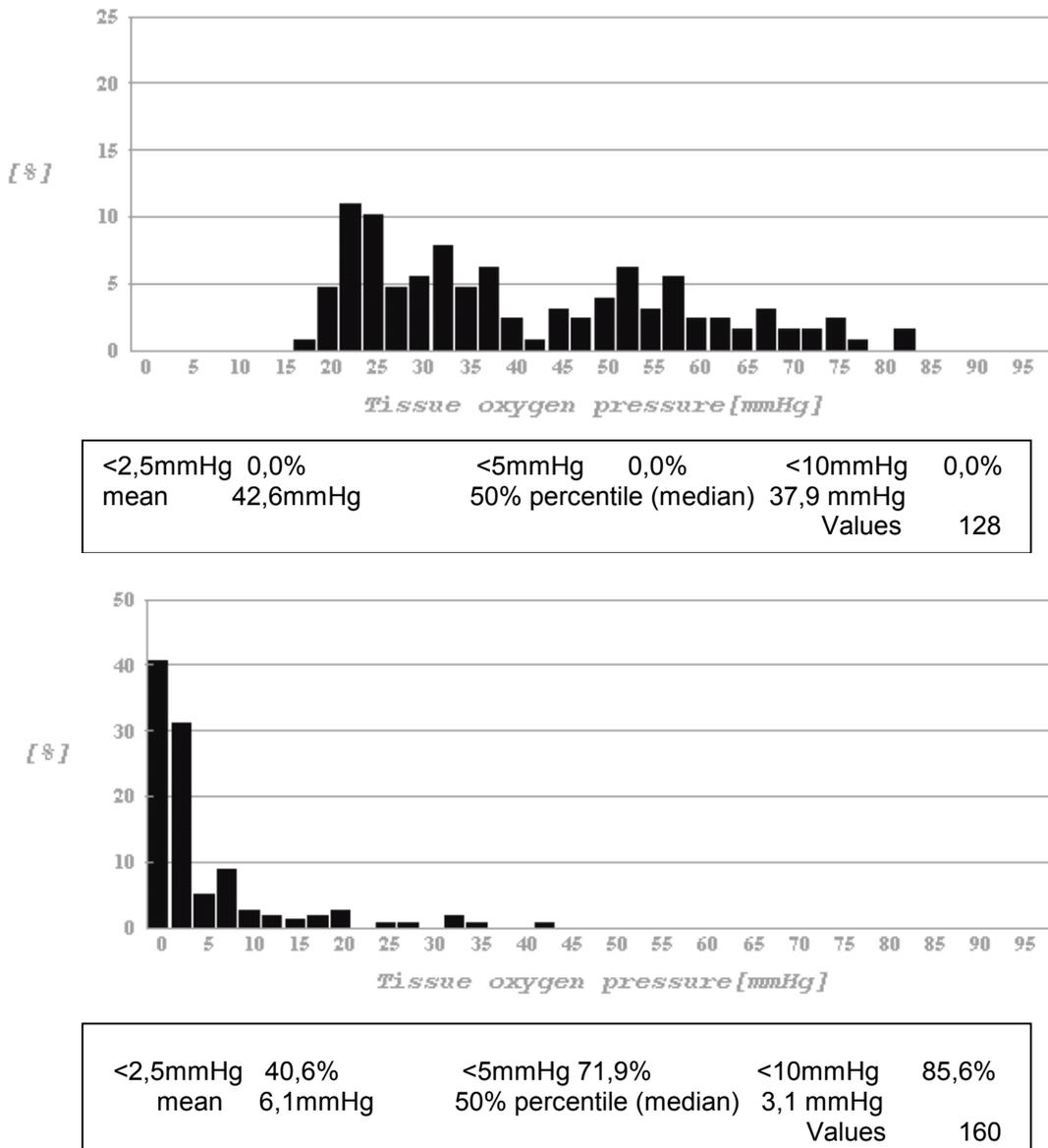


Abbildung 3: Darstellung von Histogrammen eines gut oxygenierten Tumors (oben) und eines hypoxischen Tumors (unten), beide im Stadium IIIB G3

Für die weiteren Untersuchungen bedeutete das Ergebnis, daß keine signifikanten Unterschiede der Tumoroxygenierung zwischen den klinischen Stadien vorlagen. Daher konnte in den weiteren Analysen mit dem Median der Oxygenierungsparameter für die gesamte Patientinnengruppe gearbeitet werden.

### 3.2.2. Überlebenswahrscheinlichkeit und Tumoroxygenierung

Zur Beurteilung des Einflusses des prätherapeutischen Sauerstoffpartialdruckes auf das Behandlungsergebnis wurde das 3-Jahresüberleben nach Kaplan-Meier berechnet. Als Trennwert für die Patientinnengruppen diente der Median des jeweiligen Oxygenierungsparameters.

Als erster wichtiger Parameter wurde die Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom medianen Sauerstoffpartialdruck für alle 87 Patientinnen geprüft.

Die Tabelle 8 zeigt die Daten für das 3-Jahresüberleben für die Tumorstadien IIB-IVA in Bezug auf den medianen Sauerstoffpartialdruck des jeweiligen Stadiums.

Tabelle 8 : 3-Jahresüberleben in Bezug auf den medianen Tumor- pO<sub>2</sub> vor Strahlentherapie

Stadium	Medianer pO <sub>2</sub>	Patientenzahl	3-Jahres-Überleben	p
IIB	≤14	10	70 ± 14	0,75
	>14	9	74 ± 16	
IIIB	≤15	29	49 ± 10	0,15
	>15	30	71 ± 9	
IVA	≤16	5	0	0,12
	>16	4	50 ± 25	
alle Pat.	≤15	43	49 ± 8	0,12
	>15	44	68 ± 7	

Für die relativ kleinen Karzinome im Stadium IIB hatte der Tumor-pO<sub>2</sub> mit 4% Unterschied im 3-Jahresüberleben auf das Behandlungsergebnis offensichtlich keinen Einfluß. Für das Stadium IIIB war der Unterschied mit 22% schon sehr erheblich. Im Stadium IVA lebten nur noch die Patientinnen mit einem besser oxygenierten Karzinom. Trotzdem waren signifikante Vorteile im Überleben für die besser oxygenierten Karzinome in Abhängigkeit vom medianen pO<sub>2</sub> in der univariaten Analyse nicht zu belegen, obwohl ein deutlicher Trend mit 19% Überlebensvorteil für das gesamte Patientenkollektiv für die besser oxygenierten Karzinome zu erkennen war.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit aller 87 Patientinnen bezogen auf den medianen Tumor-  $pO_2$  mit dem Tumorstadium als zusätzlicher Kovariaten ist in der folgenden Coxregression dargestellt.

Unter Einbeziehung des Stadiums bestand für die Patientinnen bei Tumoren mit einem höheren medianen Sauerstoffpartialdruck, gemessen vor Therapiebeginn, eine statistisch signifikant bessere Überlebenswahrscheinlichkeit als für die schlechter oxygenierten Karzinome.

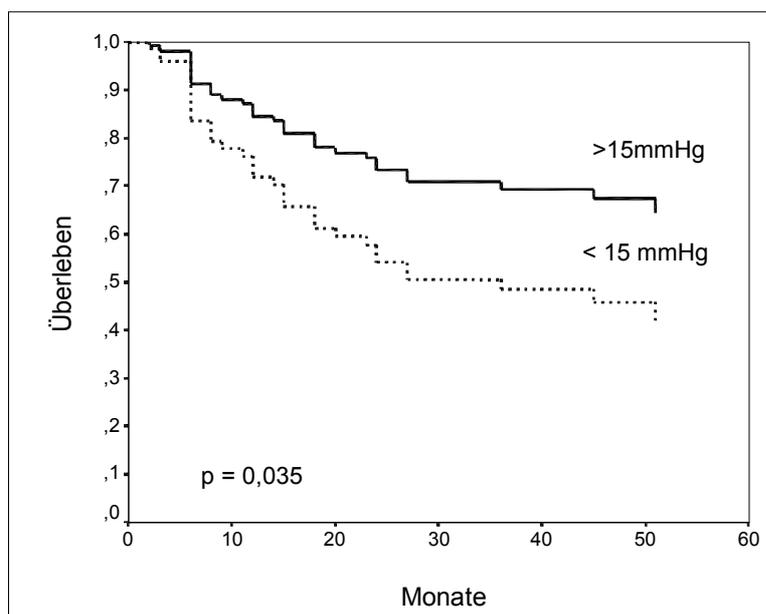


Abbildung 4: Coxregression für den medianen Tumor- $pO_2$  adjustiert nach dem Tumorstadium;  $p < 0,05$

In der Coxregression war der Einfluß des medianen Tumor-  $pO_2$  auf das Überleben mit  $p < 0,05$  signifikant. Das relative Risiko, am Tumor zu versterben, lag in Bezug zum medianen Sauerstoffpartialdruck bei einem Faktor 2. Für den Einfluß des Tumorstadiums wurde ein signifikanter Wert von  $p = 0,002$  errechnet, der Faktor für das relative Risiko, am Tumor zu versterben, lag bei 2,8.

Das Tumorstadium hatte einen größeren Einfluß auf die Lebenserwartung als der prätherapeutisch gemessene mediane Sauerstoffpartialdruck im Tumor.

Eine Analyse des Überlebens der Patientinnen wurde auch bei einem Sauerstoffpartialdruck von 10mmHg-Wert als Grenzwert durchgeführt.

In sehr vielen Veröffentlichungen wird der Wert von 10mmHg als Grenzwert zur Definition von gut und schlecht oxygenierten Tumoren verwendet (18, 74, 98). In Tabelle 9 sind die 3-Jahresergebnisse sowohl für die einzelnen Stadien als auch für das gesamte Patientenkollektiv aufgeführt.

Tabelle 9: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Tumorstadium und dem 10mmHg-Wert als Grenzwert

Stadium	Grenzwert 10mmHg	Patientinnen- zahl	3-Jahres- Überleben $\bar{X} \pm SE$	p
IIB	$\leq 10$	7	$71 \pm 17$	
	$> 10$	12	$73 \pm 13$	0,93
IIIB	$\leq 10$	26	$50 \pm 10$	
	$> 10$	33	$68 \pm 8$	0,30
IVA	$\leq 10$	3	0	
	$> 10$	6	$33 \pm 19$	0,10
Gesamt	$\leq 10$	36	$50 \pm 8$	
	$> 10$	51	$65 \pm 7$	0,25

Wiederum ergab sich für das Stadium IIB kein Unterschied im Überleben (71% vs.73%). Für die Stadien IIIB war bei 18%-iger Differenz ebenfalls kein statistischer Unterschied vorhanden. Für das Stadium IVA und für das Gesamtkollektiv bestand mit  $p = 0,1$  nur ein Trend zur günstigeren Prognose für die besser oxygenierten Karzinome.

Auch die mehrfaktorielle Analyse, adjustiert nach dem Tumorstadium, ergab keinen signifikanten Überlebensunterschied in Abhängigkeit vom 10mmHg-Wert als Grenzwert.

### 3.2.3. Tumorhypoxie als Prognosefaktor

Zur Beschreibung des Oxygenierungstatus eines Tumors reicht es nicht aus, allein Angaben zum Sauerstoffpartialdruck im Gewebe zu machen. Von besonderem Interesse ist der hypoxische Tumoranteil, da durch die Hypoxie im Tumor u.a. die Strahlenresistenz bestimmt wird.

Als Maß für die Hypoxie wurde der prozentuale Anteil der hypoxischen Meßwerte  $< 2,5\text{mmHg}$  und  $< 5\text{mmHg}$  angegeben. Im Folgenden werden die Therapieergebnisse für den prätherapeutisch gemessenen hypoxischen Tumoranteil  $< 2,5\text{mmHg}$  (HF2,5) und  $< 5\text{mmHg}$  (HF5) dargestellt.

Die Überlebensdaten sowohl für die einzelnen Stadien als auch die gesamte Patientinnengruppe unterteilt nach dem Median für 2,5mmHg sind in der Tabelle 10 aufgelistet.

Die Überlebensanalyse ließ keinen Einfluß des hypoxischen Tumoranteils <2,5mmHg auf das 3-Jahresüberleben erkennen, weder für die einzelnen Stadien noch für das Gesamtkollektiv.

Tabelle 10: Stadienbezogenes 3-Jahresüberleben in Bezug auf den hypoxischen Tumoranteil <2,5mmHg, getrennt nach dem Median für das jeweilige Stadium

Stadium	Median 2,5MmHg %	Patientinnen- zahl	3-Jahres- Überleben $\bar{X} \pm SE$	p
IIB	≤2	10	77 ± 14	0,51
	>2	9	67 ± 16	
IIIB	≤5	30	57 ± 9	0,46
	>5	29	62 ± 10	
IVA	≤4	5	40 ± 22	0,26
	>4	4	0	
Gesamt	≤3	44	59 ± 8	0,96
	>3	43	58 ± 7	

Auch in der Coxregression, adjustiert nach Tumorstadium, hatte zwar das Tumorstadium als unabhängiger Prognosefaktor einen signifikanten Einfluß mit  $p = 0,003$ , für den hypoxischen Tumoranteil <2,5mmHg war statistisch kein Einfluß auf die Prognose zu sehen.

Auch eine Überprüfung der Überlebenswahrscheinlichkeit für die Karzinome, die vor Behandlungsbeginn keine meßbaren Werte <2,5mmHg im Vergleich zu Tumoren mit Meßwerten <2,5mmHg hatten, ergab im Überleben keinerlei Unterschied.

In der Literatur wird als Maß und für die Beschreibung der Hypoxie die hypoxische Fraktion <5mmHg (HF5) verwendet. In der folgenden Tabelle 11 sind die 3-Jahresdaten bezogen auf die HF5 aufgelistet.

Obwohl die Überlebensanalyse ein 18% besseres Überleben für die Karzinome mit einem geringeren hypoxischen Tumoranteil ergab, ist statistisch lediglich ein Trend zum Überlebensvorteil für die weniger hypoxischen Karzinome zu verifizieren.

Tabelle 11: 3-Jahresüberleben in Abhängigkeit vom Tumorstadium und der hypoxischen Tumorfraktion <5mmHg

Stadium	Median HF 5 %	Patientenzahl N	3-Jahres-Überleben [%] $\bar{X} \pm SE$	p
IIB	≤10	11	77 ± 14	0,51
	>10	9	67 ± 16	
IIIB	≤20	30	65 ± 9	0,46
	>20	29	55 ± 9	
IVA	≤15	4	40 ± 22	0,26
	>15	5	0	
Gesamt	≤18	44	68 ± 8	0,14
	>18	43	50 ± 8	

Da sich in der Überlebensanalyse für das klinische Ergebnis das Stadium als ein signifikanter Prognosefaktor erwies, wurde der Einfluß des Tumorstadiums in einer mehrfaktoriellen Analyse als Kofaktor zur HF5 überprüft. Als Maß für die Hypoxie wurde der Median von 18% für die HF5 vom gesamten Patientenkollektiv eingesetzt.

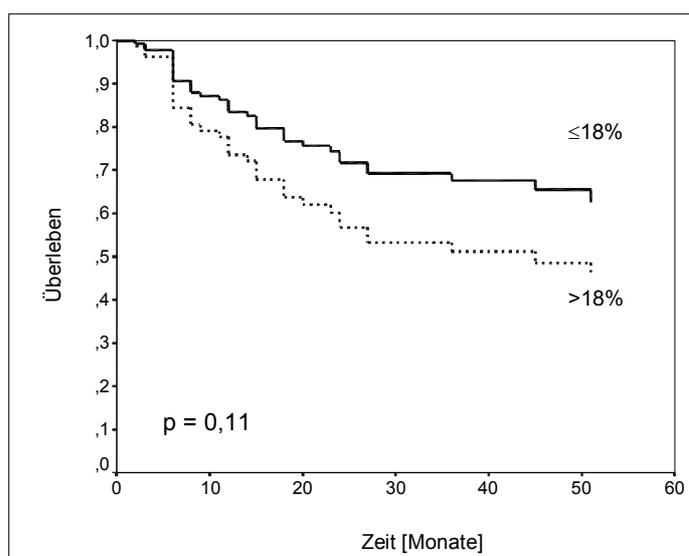


Abbildung 5: Coxregression für HF5 <18% vs.>18%, adjustiert nach Stadium, p = 0,11

Es ergab sich als Resultat nur ein Trend, die hypoxische Fraktion <5mmHg hatte – adjustiert nach Tumorstadium- keinen statistisch zu verifizierenden Einfluß auf das klinische Resultat. Auch ein Vergleich der Patientinnen ohne hypoxische Meßwerte <5mmHg im Tumor mit den Patientinnen mit hypoxischen Meßwerten <5mmHg im Tumor erbrachte kein anderes Resultat. Damit kommt in unserem Patientinnengut der vor Strahlentherapie gemessenen hypoxischen Fraktion <5mmHg als Prognosefaktor keine statistisch zu beweisende Bedeutung zu.

### 3.2.4. Oxygenierungsstatus unter der Strahlentherapie

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, daß dem prätherapeutisch gemessenen Oxygenierungsstatus bei Zervixkarzinomen in unserem Patientinnengut nicht die klinische Bedeutung als Prognosefaktor zukam, wie es in der Literatur beschrieben ist (51,75, 98,119).

Da über die Modifizierung der Oxygenierung unter Strahlentherapie in Zervixkarzinomen widersprüchliche Aussagen bestehen, die in Untersuchungen mit kleinen Fallzahlen erfolgt sind (29,38, 52, 184), haben wir den Einfluß der Bestrahlung auf die Sauerstoffversorgung der Karzinome unter der Therapie gemessen. Für die Bestimmung des Sauerstoffpartialdruckes im Tumor bot sich der Zeitpunkt an, an dem über eine Afterloading-Kontakttherapie entschieden werden mußte, also nach 11 Fraktionen Hochvoltbestrahlung und einer Dosis von 19,8 Gy.

Die pO<sub>2</sub>- Messungen erfolgten in den gleichen Tumorarealen wie bei den prätherapeutischen Messungen.

Tabelle 12 zeigt die Änderungen des Oxygenierungsverhaltens für die gesamte Patientinnengruppe vor Bestrahlungsbeginn und nach 11 Fraktionen Hochvolttherapie.

Tabelle 12: Tumoroxygenierung nach 11 Fraktionen Hochvolttherapie (N = 87)

Oxygenierungsparameter	$\bar{X} \pm SE$	(Min.-Max)	Median	
<2,5 mmHg [%]	0 Gy	16 ± 22	(0- 87)	3
	19,8 Gy	13 ± 19	(0- 80)	0
<5mmHg [%]	0 Gy	26 ± 27	(0- 89)	18
	19,8 Gy	24 ± 28	(0- 85)	10
pO <sub>2</sub> -Median [mmHg]	0 Gy	21 ± 19	(0,1- 88)	15
	19,8 Gy	20 ± 17	( 1 - 84)	15

Betrachtet man die Daten aller Patientinnen vor Bestrahlung und nach 11 Bestrahlungsfractionen, so ergibt sich keine relevante Änderung im Oxygenierungsstatus unter der Therapie. Für die einzelne Patientin ergab sich aber ein unterschiedliches Verhalten des Sauerstoffpartialdruckes im Tumor unter der Bestrahlung.

Wenn die Sauerstoffmessungen zu 2 verschiedenen Zeitpunkten verglichen werden, bieten sich 4 verschiedene Möglichkeiten der Änderung im Verlauf an:

1. Es besteht an beiden Meßtagen ein unverändert hoher Sauerstoffpartialdruck im Tumor, d.h. der  $pO_2$ -Median liegt an beiden Tagen über 15mmHg (persistierend euoxisch).
2. Es besteht an beiden Meßtagen ein hypoxisches Karzinom mit Werten <15mmHg (persistierend hypoxisch).
3. Der Tumor zeigt einen hypoxischen Ausgangswert, aber ein Ansteigen des medianen Sauerstoffpartialdruckes über 15mmHg nach 19,8Gy (ansteigender  $pO_2$ ).
4. Der Tumor hat einen Sauerstoffpartialdruck > 15mmHg vor Beginn der Therapie, nach 19,8Gy zeigt er einen Abfall unter 15mmHg (abfallender  $pO_2$ ).

Alle 4 Möglichkeiten waren in unserem Patientenkollektiv zu finden. In der Tabelle 13 sind alle Meßparameter vor Bestrahlung und nach 19,8Gy dargestellt.

Tabelle 13: Übersicht über die gemessenen Oxygenierungsparameter vor Behandlungsbeginn und nach 19,8Gy Strahlentherapie für die 4 Gruppen. Dargestellt sind Mittelwerte sowie der Median.

Oxygenierungsverhalten	Pat. Zahl N		HF 2,5 0 Gy [%]	HF 2,5 19,8 Gy [%]	HF5 0 Gy [%]	HF5 19,8 Gy [%]	pO <sub>2</sub> - Median 0 Gy [mmHg]	pO <sub>2</sub> - Median 19,8 Gy [mmHg]
persistierend euoxisch	28	$\bar{X} \pm SE$	3 ± 1	1 ± 1	7 ± 2	6 ± 3	34 ± 3	35 ± 3
		Median	0	0	1	0	30	35
ansteigender pO <sub>2</sub>	17	$\bar{X} \pm SE$	20 ± 5	3 ± 2	38 ± 6	7 ± 3	7 ± 1	27 ± 3
		Median	16	0	40	0	7	25
abfallender pO <sub>2</sub>	19	$\bar{X} \pm SE$	8 ± 4	26 ± 6	11 ± 1	41 ± 7	33 ± 2	7 ± 1
		Median	0	21	0	40	25	6
persistierend hypoxisch	23	$\bar{X} \pm SE$	36 ± 5	31 ± 4	54 ± 4	50 ± 5	4 ± 1	5 ± 1
		Median	35	30	57	45	3	4

Bemerkenswert war, daß sowohl für die unverändert gut oxygenierten Karzinome als auch für die Tumoren mit einem ansteigenden  $pO_2$  kein hypoxischer Tumoranteil  $<5\text{mmHg}$  nach 11 Fraktionen meßbar war.

Die 23 Tumore mit einem sowohl vor der Messung als auch nach 11 Fraktionen ausgewiesenen hypoxischen Karzinom zeigten durch die Strahlentherapie offensichtlich keinerlei Veränderung bezüglich des Sauerstoffpartialdruckes im Tumor, weder in Bezug auf die mediane Verteilung noch in Bezug auf den hypoxischen Tumoranteil, der mit fast 50% der Werte  $<5\text{mmHg}$  sehr hoch war.

Bei 19 Patientinnen fand sich ein prätherapeutisch gut oxygenierter Tumor, der nach 19,8Gy abfallende  $pO_2$ -Werte zeigte.

### 3.2.5. Änderung der Oxygenierung unter der Strahlentherapie und ihr Einfluß auf das Behandlungsergebnis

Die Änderung des medianen Sauerstoffpartialdruckes wurde zunächst hinsichtlich der klinischen Resultate analysiert.

In der Abbildung 6 sind die Kaplan-Meier-Kurven für die vier Gruppen mit unterschiedlichem Oxygenierungsverhalten dargestellt.

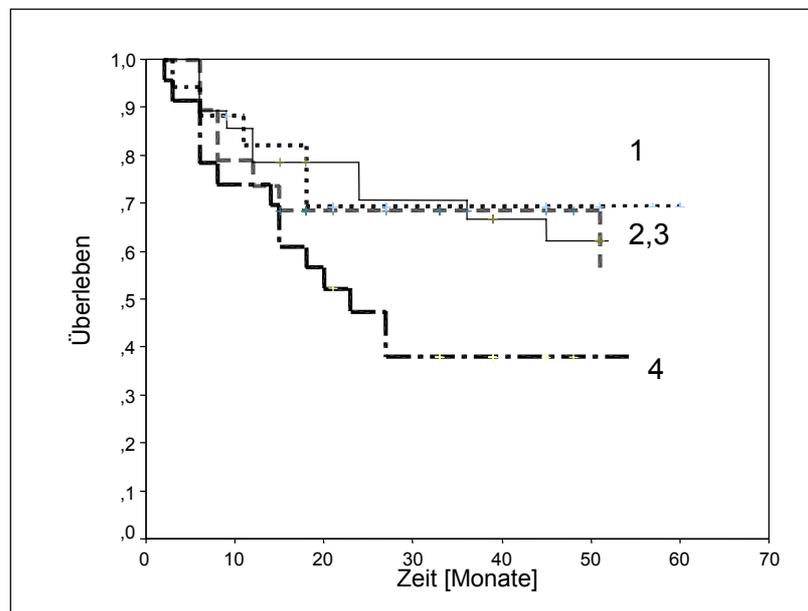


Abbildung 6: Überlebenskurven in Abhängigkeit vom Oxygenierungsverhalten  
 1 pers. eoxisch, 2 ansteigender  $pO_2$ , 3 abfallender  $pO_2$ ,  
 4 pers. hypoxisch

Die Überlebenskurven zeigen für die Patientinnen mit einem entweder vor Behandlungsbeginn gut oxygenierten Karzinom (Gruppe 1 und 3) oder einem

prätherapeutisch hypoxischen, aber unter der Therapie im Sauerstoffpartialdruck ansteigenden Tumor (2) nahezu identische Verläufe.

Die ungünstigsten Überlebensdaten ergaben sich für die Gruppe der Karzinome (4), die sowohl vor Therapiebeginn als auch nach 11 Bestrahlungen einen unverändert niedrigen Sauerstoffpartialdruck im Tumor aufwiesen. Diese persistierend hypoxischen Karzinome hatten eine um 30% niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit als alle anderen 3 Gruppen.

Die 3-Jahresergebnisse für die 4 Gruppen, unterschieden nach Oxygenierungsverhalten, sind in der Tabelle 14 aufgeführt.

Für die Patientinnen mit einem Ausgangs- $pO_2$  über dem medianen Sauerstoffpartialdruck von 15mmHg waren die 3-Jahresergebnisse nahezu identisch mit den Ergebnissen der 17 Patientinnen mit einem niedrigen Ausgangs- $pO_2$ , der aber im Verlauf der Behandlung anstieg.

Diese Zunahme des  $pO_2$  war offensichtlich auch mit einer Zunahme der Radiosensibilität verbunden.

Tabelle 14: Änderung des Oxygenierungsverhaltens unter der Strahlentherapie und der Einfluß auf das klinische 3-Jahresüberleben (3-JÜLZ)

Oxygenierungsverhalten	Patientinnenzahl N	3-JÜLZ [%] $\bar{X} \pm SE$
persistierend euoxisch	28	$67 \pm 9$
euoxisch, abnehmender Median	19	$68 \pm 11$
hypoxisch, zunehmender Median	17	$69 \pm 11$
persistierend hypoxisch	23	$38 \pm 10$

Es ist festzustellen, daß ein hoher Sauerstoffpartialdruck im Tumor vor oder unter der Strahlentherapie ein Hinweis auf eine günstige Prognose ist.

Es wurde analog zur Analyse der prätherapeutischen Meßwerte in einer Coxregression unter Einbeziehung des Tumorstadiums als Kovariate die Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug zur Änderung des medianen Sauerstoffpartialdruckes betrachtet.

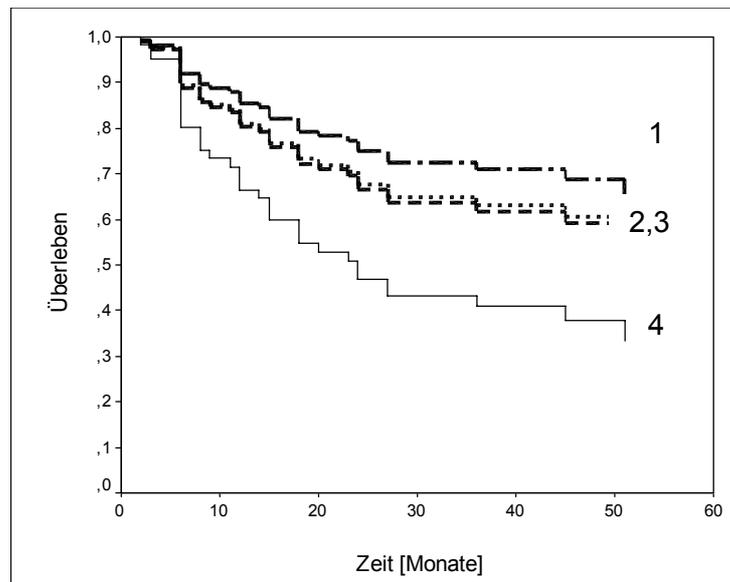


Abbildung 7: Coxregression, adjustiert nach Stadium, für die vor oder unter der Strahlentherapie gut oxygenierten Karzinome (1), für Karzinome mit ansteigendem (2) oder abfallendem  $pO_2$  (3) und persistierend hypoxische Karzinome (4)

Patientinnen mit einem anhaltend gut oxygenierten Karzinom hatten auch unter Einbeziehung des Tumorstadiums die beste Prognose, im Gegensatz zu Patientinnen mit einem anhaltend schlecht oxygenierten Karzinom.

Für die Patientinnen mit einem hypoxischen Ausgangsbefund verbesserte sich die Prognose, wenn es unter der Therapie zu einem Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes im Tumor kam. Im Gegensatz dazu verschlechterte sich die Prognose für Patientinnen mit einem vor Therapie gut oxygenierten Tumor, wenn sich unter der Behandlung der Sauerstoffpartialdruck im Tumor verringerte.

Der Unterschied im Überleben zwischen der Gruppe der persistierend hypoxischen Karzinome und den anderen 3 Gruppen ist mit  $p = 0,04$  signifikant. Das relative Risiko, am Tumor zu versterben, verdoppelt sich für die Patientinnen mit persistierend hypoxischen Karzinomen.

Damit ist festzustellen, daß die Änderung des Sauerstoffpartialdruckes im Tumor ein

entscheidender prognostischer Faktor für die Radiosensibilität bei Zervixkarzinomen ist.

Das Tumorstadium (Stadium 4A) hatte in der Betrachtung aller Patientinnen jedoch einen größeren Einfluß auf die Prognose als die Änderung des Sauerstoffpartialdruckes. Deshalb stellte sich die Frage, ob diese Verhalten nicht von der Größe des Tumors abhängig war. Da im Stadium IIIB die meisten Patientinnen eingeschlossen waren, wurde dieses Tumorstadium gesondert geprüft. Die Überlebenskurven sind in der folgenden Abbildung dargestellt:

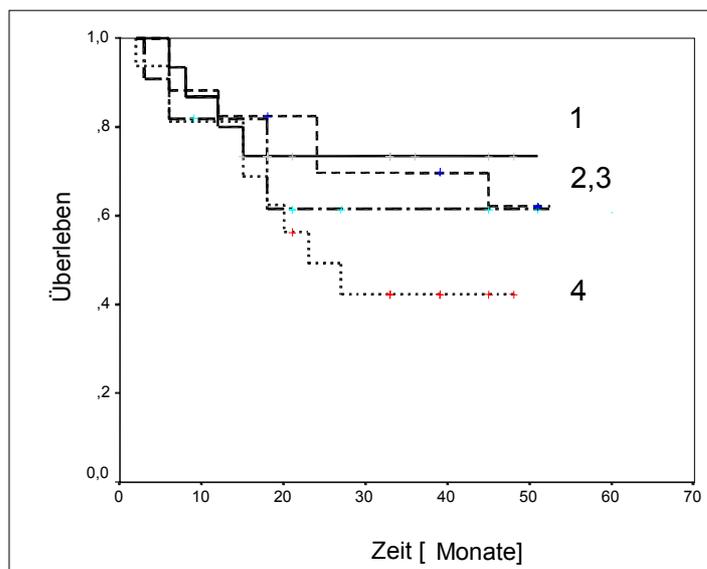


Abbildung 8: Überlebenskurven in Abhängigkeit vom Oxygenierungsverhalten für das Stadium IIIB n.FIGO (N = 59)  
 1: pers. euoxisch (N = 17), 2: ansteigender pO<sub>2</sub> (N = 11),  
 3: abfallender pO<sub>2</sub>, (N=15), 4: pers. hypoxisch (N = 16)

Der Abbildung 8 ist zu entnehmen, daß auch eine getrennte Analyse für das Stadium IIIB die gleichen Verhaltensmuster im Oxygenierungsverlauf zeigt. Am schlechtesten im Überleben waren die 16 Patientinnen mit einem persistierend hypoxischen Karzinom, 17 Patientinnen mit persistierend euoxischen Karzinomen hatten die günstigste Prognose. Für die 11 mit ansteigendem pO<sub>2</sub> und 15 Patientinnen mit abfallendem pO<sub>2</sub> war die Prognose nahezu identisch. Eine statistische Signifikanz im Vergleich der Gruppen 1-3 gegen 4 ist mit  $p = 0,1$  allerdings nicht signifikant.

Der Einfluß des unterschiedlichen Oxygenierungsverhaltens auf das klinische Behandlungsergebnis ist auch in den Stadien IIB und IVA entsprechend, wobei im Stadium IVA nur 2 Patientinnen mit einem persistierend euoxischen Karzinom noch am Leben sind.

In der Tabelle 13 ist zu sehen, daß die primär euoxischen und die Karzinome mit ansteigendem Sauerstoffpartialdruck keine meßbaren hypoxischen Werte <5mmHg nach 19,8Gy aufwiesen.

Interessant war es deshalb für uns zu überprüfen, inwieweit eine Veränderung der Hypoxie einen Einfluß auf das klinische Resultat haben könnte. Bei der Betrachtung der Veränderung der hypoxischen Werte gab es wiederum 4 Möglichkeiten:

1. keine meßbaren Werte <5mmHg vor und nach 11 Fraktionen (HF5-/-)
2. zu beiden Zeitpunkten meßbare hypoxische Werte (HF5 +/+)
3. am Anfang meßbar Werte <5mmHg, nach 19,8Gy keine meßbaren Werte (HF5 +/-)
4. bei der prätherapeutischen Messung keine Werte <5mmHg, aber nach 19,8 Gy meßbare Werte (HF5-/+).

In der Tabelle 15 sind die 3-Jahresüberlebensdaten in Abhängigkeit von der Änderung der hypoxischen Fraktion HF5 unter Bestrahlung aufgelistet.

Tabelle 15: Änderung der hypoxischen Fraktion <5mmHg und Überlebenswahrscheinlichkeit

Änderung der HF5 0Gy /19,8Gy	Patientinnenzahl N	3-Jahres-Überleben [%] $\bar{X} \pm SE$
HF5 -/-	10	69 $\pm$ 15
HF5 +/-	22	67 $\pm$ 10
HF5 +/+	42	52 $\pm$ 8
HF5 -/+	13	54 $\pm$ 14

Die Patientinnen, deren Karzinom nach 19,8Gy Hochvoltbestrahlung keine hypoxischen Meßwerte <5mmHg aufwiesen, hatten eine um 13 - 17% bessere Prognose.

In der Abbildung 9 sind die Kaplan-Meier-Kurven für die Änderung der hypoxischen Fraktion <5mmHg dargestellt:

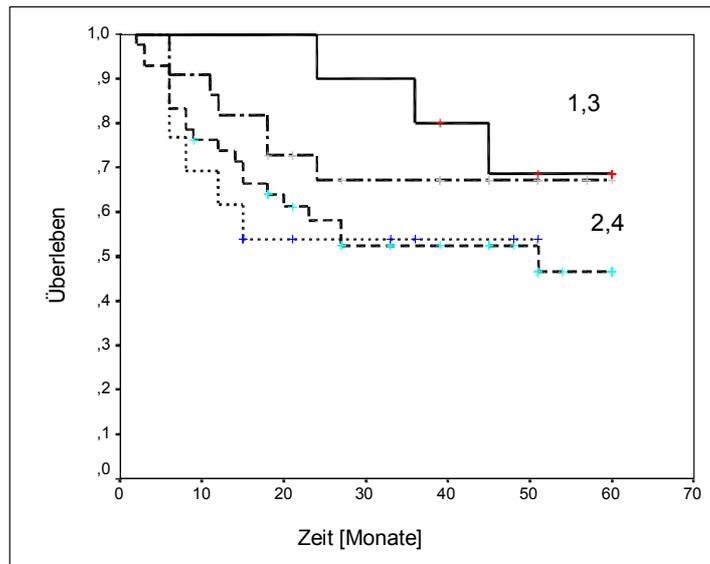


Abbildung 9: Überlebenskurven nach 19,8Gy in Abhängigkeit von der Änderung der hypoxischen Fraktion <5mmHg für alle 87 Patientinnen  
 1,3: keine hypoxischen Werte <5mmHg bei 19,8Gy  
 2,4: hypoxische Werte <5mmHg bei 19,8Gy

Es hat den Anschein, daß sich die Überlebenskurven in Abhängigkeit vom Status der HF5 nach 19,8Gy unabhängig vom prätherapeutischen Zustand angleichen: HF5(-) und HF5(+) nach 11 Fraktionen sind fast deckungsgleich.

Alle 32 Patientinnen mit Tumoren ohne hypoxischen Tumoranteil nach 19,8 Gy wiesen in der univariaten Analyse eine 3-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von  $65 \pm 9\%$  auf im Vergleich zu  $50 \pm 7\%$  für die 55 Patientinnen mit meßbarer hypoxischer Fraktion <5mmHg.

Es wurden deshalb die Patientinnen mit Karzinomen ohne hypoxische Werte bei 19,8Gy mit denen verglichen, die hypoxische Werte nach 19,8Gy aufwiesen. Da das Tumorstadium einen unabhängigen Prognosefaktor darstellte, erfolgte die Analyse als Coxregression unter Adjustierung nach dem Stadium (Abb.10).

In der mehrfaktoriellen Analyse, adjustiert nach dem Stadium, hatte die Hypoxie <5mmHg bei 19,8Gy, im Vergleich zu den Karzinomen ohne meßbaren hypoxischen Anteil <5mmHg nach einer Dosis von 19,8Gy einen mit  $p < 0,05$  signifikanten Einfluß auf das Überleben. Das relative Risiko eines fatalen Ausgangs erhöhte sich für die Patientinnen mit einem Karzinom mit hypoxischen Meßwerten <5mmHg um den Faktor 2. Das Stadium hatte mit  $p < 0,001$  und dem Faktor 2,8 für das relative Risiko einen höheren Einfluß.

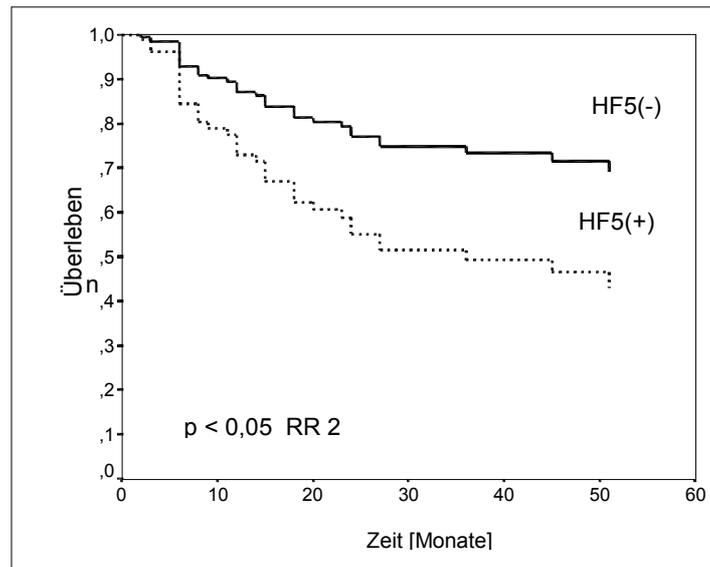


Abbildung 10 : Coxregression adjustiert nach Tumorstadium, für HF5 (-) versus HF5(+) bei 19,8Gy,  $p < 0,05$ ; RR 2 für HF5;  $p < 0,001$ ; RR 2,8 für Stadium

### 3.2.6. Oxygenierungsverhalten, Tumorresponse und Metastasierung („Event-free-Survival“)

Aus den bisherigen Analysen war nicht zu klären, ob die Tumoroxygenierung bzw. deren Änderung unter der Bestrahlung im Hinblick auf die klinischen Resultate ausschließlich oder vorwiegend einen Einfluß auf das lokale Tumorgeschehen hatte, oder ob die hypoxischen Zervixkarzinome insgesamt einen maligneren Phänotyp darstellen. Es ist zu fragen, ob bei gut oxygenierten Zervixkarzinomen die Bestrahlung über den klassischen Sauerstoffeffekt wirkt und damit die schlechtere Prognose für hypoxische Karzinome zu erklären ist, oder ob hypoxische Karzinome per se bösartiger sind.

Die klinischen Daten wurden nach dem Befund einer Vollremission, eines lokalen Tumorprogresses und einer Fernmetastasierung ausgewertet und speziell unter dem Aspekt der Änderung des medianen Sauerstoffpartialdruckes und der Änderung der hypoxischen Fraktion (HF5) evaluiert. Diese Datenanalyse unterscheidet sich vom Gesamtüberleben, da durchaus Patientinnen mit lokalem Progreß oder mit Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Datenauswertung noch am 31.12.2000 am Leben waren.

Die Häufigkeit der Ereignisse in Abhängigkeit von der Änderung des medianen Sauerstoffpartialdruckes sind in der Tabelle 16 dargestellt:

Tabelle 16: Lokale Tumorrückbildung und der Fernmetastasierungshäufigkeit in Bezug zum medianen Sauerstoffpartialdruckes unter der Strahlentherapie  
PD = lokaler Progreß, FM = Fernmetastasen

Oxygen. verhalten	Patientinnen N	PD lokal N	%	FM N	%
persistierend euoxisch	28	4	14	6	21
ansteigender pO <sub>2</sub>	17	2	12	6	35
abfallender pO <sub>2</sub>	19	5	26	3	16
persistierend hypoxisch	23	9	39	6	26
Gesamt	87	20	23	21	24

Die Karzinome mit einer persistierend schlechten Sauerstoffversorgung unter der Bestrahlung zeigten mit 39% Tumorprogreß lokal das schlechteste Ansprechen im Vergleich zu den Karzinomen mit einer guten Tumoroxygenierung unter der Bestrahlung mit nur 14 bzw. 12% lokalem Therapieversagen. Das ist wiederum als ein Hinweis auf den lokalen Sauerstoffeffekt für die Wirksamkeit der Strahlentherapie zu werten. Für die Patientinnen mit einem unter der Behandlung abfallenden Sauerstoffpartialdruck im Tumor verschlechterte sich das lokale Therapieansprechen. Schwierig ist die Bewertung der Fernmetastasierung. Eine eindeutig höhere Fernmetastasierungsfrequenz für die persistierend hypoxischen Karzinome war nicht zu beweisen. Wahrscheinlich werden Patientinnen mit einem lokalen Therapieversagen ihre Fernmetastasierung nicht erleben, da diese erst nach einem längeren Zeitraum auftritt, der lokale Mißerfolg sich aber sofort manifestiert. (s. Tab. 6).

Die gleiche Analyse wurde für den Einfluß der Änderung des hypoxischen Tumorteils <5mmHg unter der Bestrahlung vorgenommen.

Tabelle 17: Abhängigkeit der lokalen Tumorrückbildung und Fernmetastasierungshäufigkeit vom Verhalten der hypoxischen Fraktion HF5 unter der Strahlentherapie  
 PD = lokaler Tumorprogreß FM = Fernmetastasen

Oxygenierungsverhalten 0Gy/19,8Gy	N	PD lokal		FM	
		N	%	N	%
HF5-/-	10	1	10	2	20
HF5+/-	22	3	14	6	27
HF5+/+	42	12	29	10	24
HF5-/+	13	4	31	3	23
Gesamt	87	20	23	21	24

Die Hypoxie hat eine Bedeutung für die lokale Radiosensibilität. Karzinome ohne hypoxischen Tumoranteil nach 19,8 Gy hatten die besseren lokalen Tumorkontrollraten. Nahm der hypoxische Tumoranteil unter der Bestrahlung ab, verbesserte sich die lokale Kontrollrate ebenfalls, sie verschlechterte sich aber erheblich, wenn es im Verlauf der Behandlung zu einer Zunahme der Hypoxie im Tumor kam.

In unserem Patientinnengut hatte die hypoxische Fraktion <5mmHg überhaupt keinen Einfluß auf die Fernmetastasierung.

### 3.3. Bedeutung der Hämoglobinkonzentration als Prognosefaktor

#### 3.3.1. Hämoglobinkonzentration und klinische Resultate

Tumorpatientinnen weisen in einem hohen Maße eine Anämie auf (143). Der Einfluß der Anämie auf die Prognose bei primär bestrahlten Patientinnen mit Zervixkarzinomen ist bekannt (23, 98,157,169,172) und wurde auch in unserem Patientinnengut überprüft.

Bei der Festlegung des Grenzwertes für die Anämie richteten wir uns nach den Empfehlungen der CTC des NCI. Für Frauen liegt demnach der Grenzwert für die Definition einer milden Anämie bei einem Hämoglobinwert von 7mmol/l (entspricht 11,2g/dl).

Der Ausgangswert der Hämoglobinkonzentration für alle 87 Patientinnen lag bei  $7,7 \pm 0,8$ mmol/l, im Median 7,8 mmol/l. Nach 19,8Gy betrug der Mittelwert  $7,5 \pm 0,8$ mmol/l, im Median 7,4 mmol/l.

Die Überlebenskurven für alle Patientinnen in Abhängigkeit von der prätherapeutischen Hämoglobinkonzentration  $\leq 7$  mmol/l bzw. über diesem Grenzwert sind in der Abbildung 11 dargestellt:

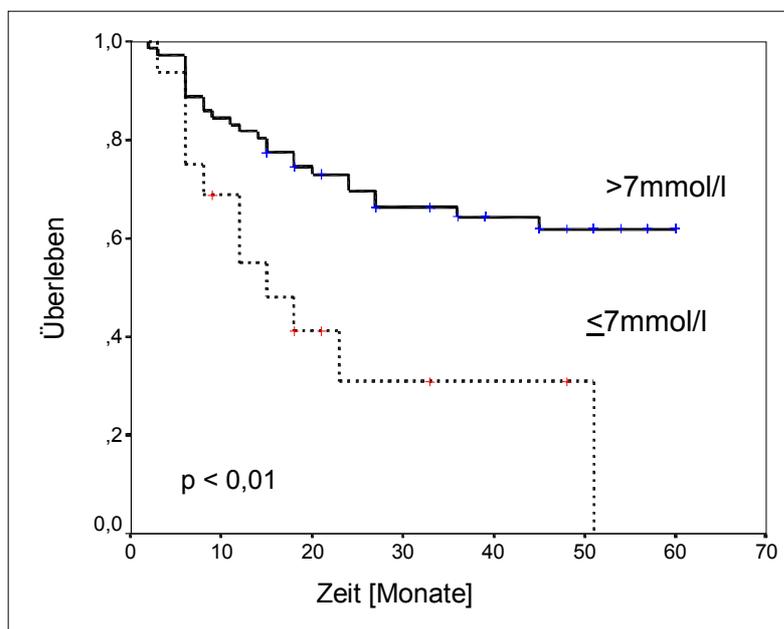


Abbildung 11: Überlebenskurven anämischer und nichtanämischer Patientinnen, N = 87

Für die anämischen Patientinnen (N = 16) betrug die 3-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit  $31 \pm 13\%$ , für die Patientinnen mit einem höheren prätherapeutischen Hämoglobinwert (N = 71)  $64 \pm 6\%$ ;  $p < 0,01$ .

Die Tabelle 18 zeigt den Zusammenhang zwischen Tumorstadium, prätherapeutischer Hämoglobinkonzentration und Überleben:

Tabelle 18: 3-Jahresüberleben in Bezug auf das Tumorstadium und den prätherapeutischen Hämoglobinwert

Stadium FIGO	Pat. N	3-Jahresüberleben[%] Hämoglobin $\leq 7$ mol/l $\bar{X} \pm SE$	Pat. N	3-Jahresüberleben[%] Hämoglobin $> 7$ mol/l $\bar{X} \pm SE$
IIB	0		19	$72 \pm 11$
IIIB	13	$38 \pm 15$	46	$65 \pm 7$
IVA	3	0	6	$33 \pm 19$

Im Stadium IIB bestand bei keiner Patientin eine Anämie mit einem Hb <7mmol/l.

Alle anämischen Patientinnen im Stadium IVA waren zum Zeitpunkt der Auswertung bereits verstorben, von den 6 nichtanämischen Patientinnen leben noch zwei in klinischer Vollremission.

Am augenfälligsten ist der Unterschied im Stadium IIIB: Der Überlebensvorteil von 27% für die nichtanämischen Patientinnen ist mit  $p < 0,05$  signifikant.

Da nicht allein der prätherapeutische Hämoglobinwert ein Prognosefaktor ist, sondern auch ein niedriger Hämoglobinwert unter der Bestrahlung mit einer ungünstigeren Prognose verbunden sein kann (55, 59), wurde ein Zusammenhang zwischen der Hämoglobinkonzentration vor Bestrahlungsbeginn und nach 19,8Gy Hochvolttherapie hinsichtlich des klinischen Therapieansprechens analysiert.

Es ist bis jetzt nicht geklärt, welche Hämoglobinhöhe für Tumorpatientinnen optimal ist und bis zu welcher Hämoglobinhöhe bei Tumorpatientinnen unter der Bestrahlung eine Substituierung erfolgen soll. Deshalb wurden im nichtanämischen Bereich die Hämoglobinkonzentrationen nochmals unterteilt in die Bereiche zwischen 7-8mmol/l und >8mmol/l. Die 3-Jahresergebnisse sind in der Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Tumorspezifisches 3-Jahres-Überleben in Abhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration

Hämoglobin [mmol/l]	Patientinnen N 0 Gy	3-JÜLZ für Hb bei 0 Gy	Patientinnen N 19,8Gy	3-JÜLZ für Hb bei 19,8 Gy
<7	16	31 ± 13	20	41 ± 10
≥7 - 8	33	59 ± 9	47	61 ± 8
>8	38	72 ± 7	20	75 ± 10

Der Tabelle 19 ist zu entnehmen, daß die Patientinnen mit einer Anämie <7mmol/l, die sowohl vor der Therapie als auch nach 19,8Gy bestand, das schlechteste 3-Jahresüberleben zeigten. Dabei ergab sich ein Überlebensvorteil im höheren Hämoglobinbereich im Vergleich zu anämischen Werten <7mmol/l.

Die Frage war, ob die Anämie einen Einfluß auf die lokale Tumorrückbildung hat und ob anämische Patientinnen auch eine höhere Fernmetastasierungsrate aufwiesen. Aus

diesem Grunde erfolgte eine Analyse der lokalen Ereignisse und der Fernmetastasierungsquote in Beziehung zur Hämoglobinkonzentration (Tabelle 20)

Tabelle 20: Anämie und Tumorresponse  
PD = lokaler Tumorprogreß FM = Fernmetastasen

Hämoglobinwert [mmol/l]	prätherapeutisch					nach 19,8Gy				
	Pat. N	PD N	%	FM N	%	Pat. N	PD N	%	FM N	%
<7	16	6	38	5	31	25	11	44	4	16
7-8	33	9	27	7	21	40	7	18	10	25
> 8	38	5	13	9	27	22	1	5	4	18

Anämische Patientinnen hatten mit 38% bzw. 44% die höchste Rate an lokalem Therapieversagen.

Patientinnen mit einem prätherapeutischen Hämoglobinwert >8mmol/l dagegen zeigten nur in 5 Fällen (13%) lokal einen Tumorprogreß. Bestand unter der Behandlung ein Hämoglobinwert >8mmol/l, wurde nur in 1 Fall ein lokales Therapieversagen beobachtet. Für Patientinnen mit einem Hb zwischen 7-8mmol/l ergab die Analyse des lokalen Tumoransprechens ein zwischen beiden Gruppen liegendes Ergebnis. Für die Abhängigkeit des lokalen Therapieansprechens von der prätherapeutischen Hämoglobinkonzentration konnte eine Signifikanz mit  $p < 0,05$  ermittelt werden, für die Hämoglobinkonzentration unter der Therapie mit  $p < 0,01$ .

Anämische Patientinnen wiesen zwar mehr Fernmetastasen auf, ein statistischer Zusammenhang zur Hämoglobinkonzentration konnte in der univariaten Analyse nicht hergestellt werden ( $p = 0,18$  prätherapeutisch und  $p = 0,6$  für 19,8Gy).

Aus der Analyse der Hämoglobinwerte vor Therapiebeginn und nach 11 Fraktionen ergab sich eine besondere Bedeutung der Hämoglobinkonzentration für das lokale Therapieansprechen.

Es wurde deshalb untersucht, inwieweit sich eine Veränderung der Hämoglobinkonzentration innerhalb der ersten 2 Behandlungswochen im lokalen Therapieansprechen widerspiegelt. Als Grenzwert wurde 7mmol/l verwendet.

Von den 87 Patientinnen zeigten 51 Patientinnen einen Hämoglobinwert  $>7\text{mmol/l}$  an beiden Tagen, 13 eine persistierende Anämie  $<7\text{mmol/l}$ , 18 Patientinnen abfallende und 5 Patientinnen ansteigende Werte. 5 anämische Patientinnen wurden transfundiert, aber nur bei 2 von ihnen konnte hierdurch eine Hämoglobinanhebung in den nichtanämischen Bereich erzielt werden.

Die Überlebenskurven sind in der Abbildung 12 dargestellt.

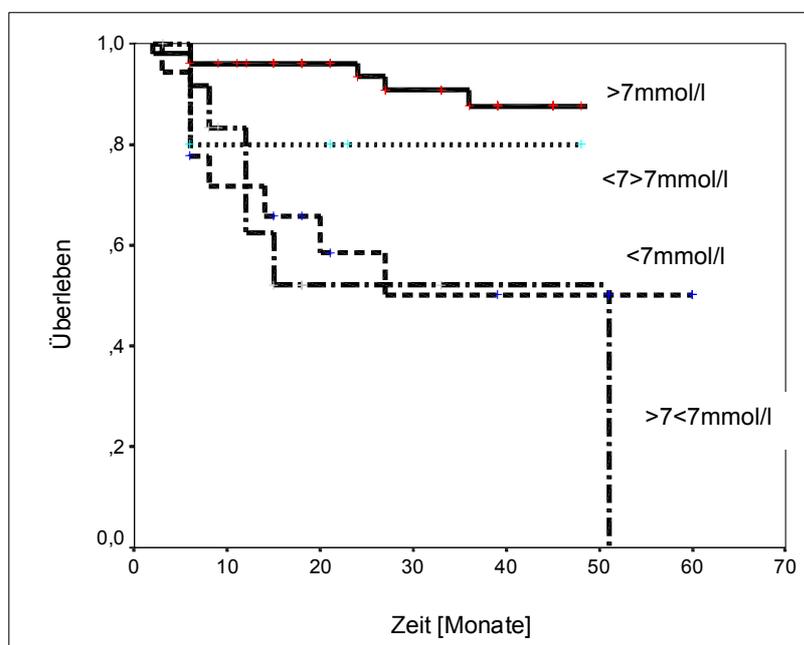


Abbildung 12: Überleben in Abhängigkeit vom lokalen Therapieergebnis und der Änderung der Hämoglobinkonzentration nach 19,8Gy

Den Kurven ist zu entnehmen, daß sich für die Patientinnen mit einem abfallenden Hämoglobin die lokale Kontrollrate verringerte, dagegen für die 5 Patientinnen mit einem ansteigenden Hämoglobin  $>7\text{mmol/l}$  sich die Prognose verbesserte. Der Unterschied ist mit  $p<0,001$  signifikant.

Ob durch eine noch größere Anhebung des Hämoglobins sich eine weitere Prognoseverbesserung ergeben würde, kann aus dem vorliegenden Patientinnengut nicht geschlossen werden, da eine Substituierung  $>8\text{mmol/l}$  nicht erfolgte.

### 3.3.2. Anämie und Tumorstadium

Die Analyse der Hämoglobinkonzentration in Abhängigkeit vom Tumorstadium ergab eine Zunahme der anämischen Werte im höheren Tumorstadium. Aus diesem Grund erfolgte die mehrfaktorielle Analyse unter Einschluß der Hämoglobinwerte und des Tumorstadiums als Kovariate. In den Tabellen 21 und 22 sind das rel. Risiko (RR) sowie die 95%-CI-Werte und die statistische Signifikanz für das Gesamtüberleben, den lokalen Tumorprogreß sowie die Fernmetastasierung aufgeschlüsselt.

Für das Gesamtüberleben waren sowohl das Tumorstadium als auch die prätherapeutische Hämoglobinkonzentration mit dem rel. Risiko von 2,3 signifikante unabhängige Prognosefaktoren.

Die größte klinische Bedeutung jedoch ergab sich für das lokale Tumorgeschehen in Abhängigkeit vom Hämoglobinwert bei 19,8Gy. Mit dem Faktor 4 wurde ein größeres Risiko im Vergleich zum Tumorstadium mit dem rel. Risiko von 3,7 errechnet.

Diese Ergebnis unterstreicht die Bedeutung der Hämoglobinkonzentration für die lokale Strahlentherapiewirkung und läßt auf die Bedeutung des Sauerstoffs als strahlensensibilisierendem Faktor schließen.

Tabelle 21: Mehrfaktorielle Analyse (Coxregression) für den Zusammenhang zwischen Tumorstadium und prätherapeutischer Hämoglobinkonzentration für das Gesamtüberleben, das lokale Tumorgeschehen und die Fernmetastasierung  
RR = rel. Risiko

	Gesamtüberleben			lokales Tumorgeschehen			Fernmetastasen		
	RR	95%-CI	p	RR	95%-CI	p	RR	95%-CI	p
Stadium	2,3	1,1-4,5	0,013	3,8	1,6-9	0,002	1,1	0,4-2,6	0,9
prätherapeut.Hb ( $\leq 7$ mmol/l vs. $> 7$ mmol/l)	2,3	1,1-4,9	0,026	2	0,7-5,5	0,17	2,5	0,9-7,4	0,09

Tabelle 22: Mehrfaktorielle Analyse (Coxregression) für den Zusammenhang zwischen Tumorstadium und Hämoglobinkonzentration für das Gesamtüberleben, das lokale Tumorgeschehen und die Fernmetastasierung nach 19,8 Gy  
RR = rel. Risiko

	Gesamtüberleben			lokales Tumorgeschehen			Fernmetastasen		
	RR	95%-CI	p	RR	95%-CI	p	RR	95%-CI	p
Stadium	2,4	1,3-4,6	0,007	3,7	1,6- 8,9	0,003	1,3	0,6- 2,9	0,6
Hb 19,8 Gy ( $\leq 7$ mmol/l vs. $> 7$ mmol/l)	1,9	1- 3,9	0,06	4	1,6 - 9,8	0,003	0,7	0,2 - 2,3	0,5

### 3.3.3. Anämie und Tumoroxygenierung

Der Zusammenhang zwischen lokalem Therapieansprechen und einer Anämie läßt einen Zusammenhang zwischen Tumoroxygenierung und Hämoglobinkonzentration vermuten. Als erstes wurde eine mögliche Korrelation zwischen dem medianen Sauerstoffpartialdruck im Tumor und dem Hämoglobinspiegel geprüft:

In der Abbildung 13 ist die Hämoglobinkonzentration in Abhängigkeit zum prätherapeutischen Sauerstoffpartialdruck im Tumor dargestellt:

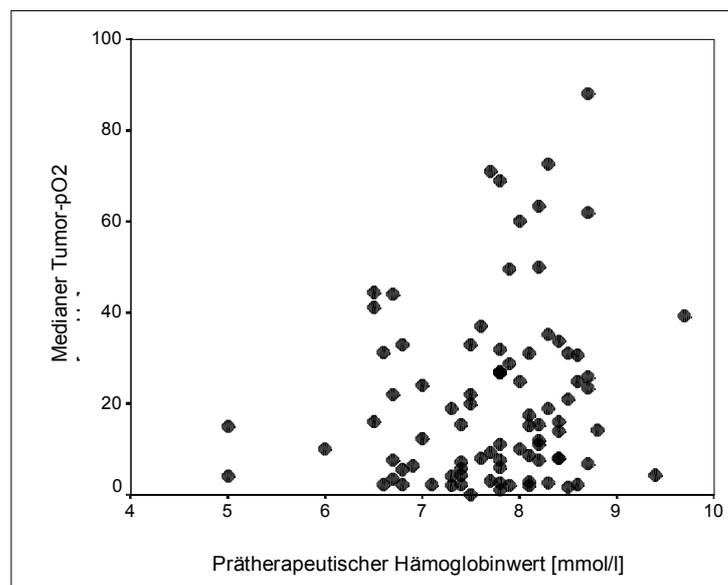


Abbildung 13: Hämoglobinkonzentration und medianer Tumor-pO<sub>2</sub>; N = 87, p = 0,09

Obwohl das Streudiagramm optisch den Eindruck einer Korrelation vermittelt, ist mit p = 0,09 nur ein statistischer Trend, aber kein signifikanter Zusammenhang aufzuzeigen.

In der Analyse der Hämoglobinhöhe, bezogen auf den medianen Sauerstoffpartialdruck im Tumor von 15mmHg, besteht auf Grund der großen Streubreite ebenfalls keine statistische Signifikanz (Abb.14):

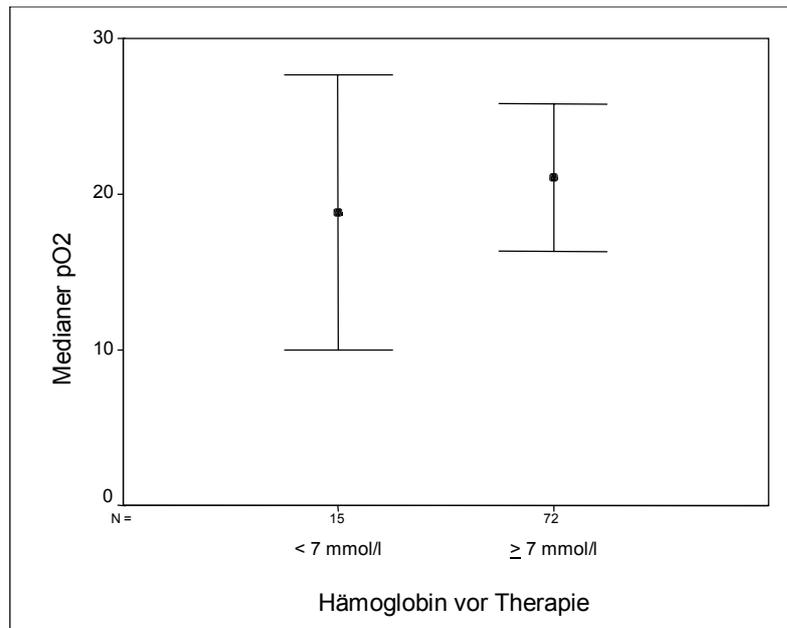


Abbildung 14: Höhe des prätherapeutischen medianen Sauerstoffpartialdruckes in Abhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration unter oder über 7mmol/l für alle 87 Patientinnen

Die Hämoglobinkonzentration für Karzinome mit einem pO<sub>2</sub>-Median ≤15mmHg betrug 7,5 ± 0,9 mmol/l, für die Tumore mit einem medianem pO<sub>2</sub> >15mmHg 7,9 ± 0,7mmol/l, p = 0,197.

Auch eine getrennte Auswertung nach dem Stadium erbrachte keine anderen Resultate. Offensichtlich kann auch bei einer hohen Hämoglobinkonzentration ein hypoxischer Tumor vorhanden sein.

### 3.3.4. Anämie und Tumorphoxie

Eine Anämie verursacht eine Gewebhypoxie, so daß der Zusammenhang zwischen Tumorphoxie und Anämie analysiert wurde.

Zwischen den gemessenen pO<sub>2</sub>-Werten <5mmHg (HF5) und der Hämoglobinkonzentration konnte keine Beziehung, zumindest nicht bei Betrachtung des gesamten Patientenkollektivs, hergestellt werden, es bestand keine statistische Korrelation (Abb.15).

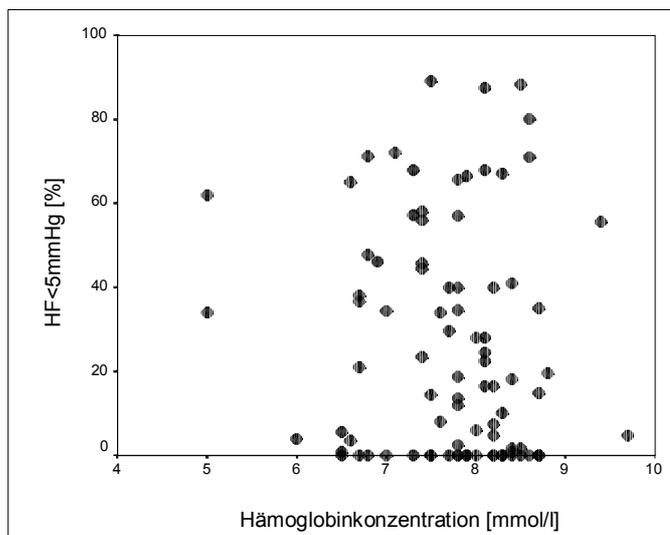


Abbildung 15: Tumorphypoxie HF5 (N =87) und Hämoglobinkonzentration für das gesamte Patientenkollektiv

Auch eine Auswertung des prätherapeutischen Oxygenierungswertes in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Hämoglobinhöhen ergab für den medianen Tumor- $pO_2$  ( $p=0,3$ ), die HF 2,5 ( $p=0,2$ ) und die HF5 ( $p=0,5$ ) keinen signifikanten Unterschied

Anders stellen sich die gleichen Analysen bei Betrachtung der Tumoroxygenierung und der Hämoglobinkonzentration bei 19,8Gy dar.

Es fand sich für die hypoxische Fraktion  $<2,5\text{mmHg}$  und  $<5\text{mmHg}$  eine signifikante Korrelation zwischen der Hämoglobinkonzentration und dem prozentualen Anteil der hypoxischen Meßwerte. Die Korrelationen sind in einem Matrix- Streudiagramm dargestellt (Abb.16).

Für den medianen Sauerstoffpartialdruck konnte mit  $p=0,08$  nur ein Trend errechnet werden.

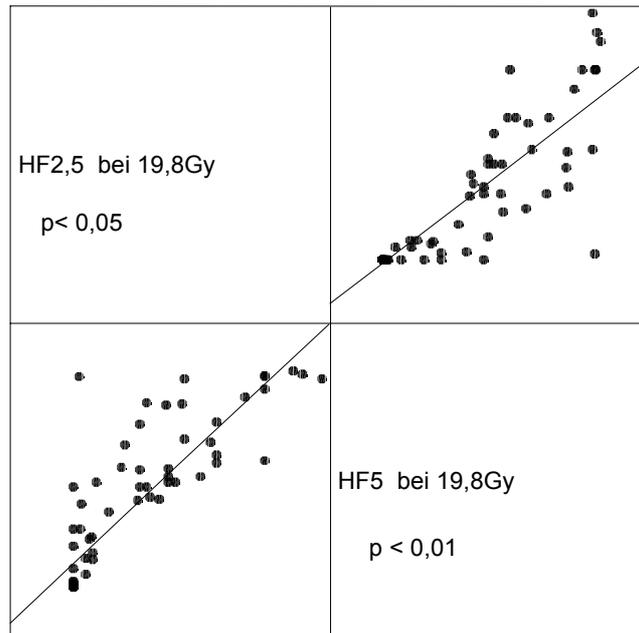


Abbildung 16: Matrix-Streudiagramm für die hypoxischen Fraktionen HF2,5 und HF5 und die Hämoglobinkonzentration bei 19,8Gy

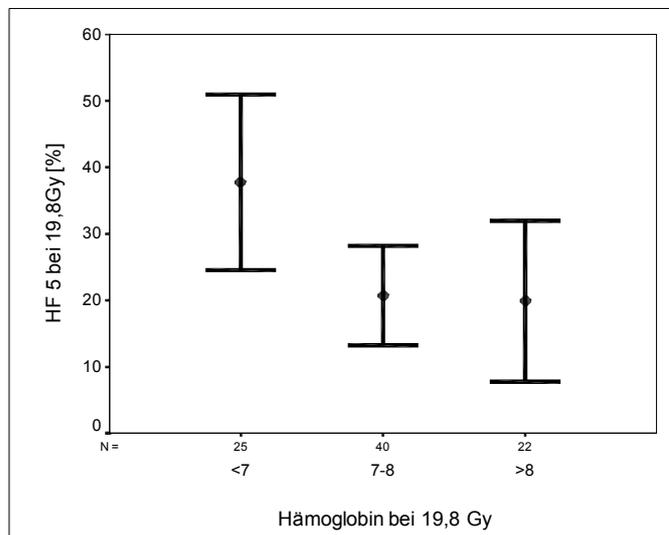


Abbildung 17 : Tumorphypoxie HF5 in Abhängigkeit von der unterschiedlichen Hämoglobinkonzentration, p < 0,05

Eine Aufschlüsselung der HF5 bei 19,8Gy in Bezug zu den unterschiedlichen Hämoglobinkonzentrationen ist in der Abbildung 17 dargestellt.

Anämische Patientinnen mit einem Hämoglobinwert  $<7\text{mmol/l}$  nach  $19,8\text{Gy}$  hatten einen signifikant höheren Anteil an hypoxischen Meßwerten  $<5\text{mmHg}$  gegenüber nichtanämischen Werten bei dieser Strahlendosis.

Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung der Hämoglobinkonzentration im Verlauf der Strahlentherapie für die Tumoroxygenierung. Die klinische Schlußfolgerung kann nur sein, alles zu vermeiden, was zu einer Abnahme der Hämoglobinkonzentration unter der Strahlentherapie führt und damit die lokale Tumorphoxie verstärkt.

### 3.4. Gefäßdichte im Tumor

#### 3.4.1. Gefäßdichte und Prognose

Untersuchungen zur Bedeutung der Tumoroxygenierung und zur Bedeutung der Anämie als Prognosefaktoren für das Ansprechen von Uteruszervixkarzinomen auf eine Strahlentherapie erfordern eine Untersuchung zur Gefäßdichte.

Bei 46 Patientinnen wurde in prätherapeutisch entnommenen Tumorbiopsien immunhistochemisch mit dem Antikörper CD31 die Gefäßdichte bestimmt. Angegeben wird die Gefäßdichte auf 10 High-Power-Fields (HPF).

In der Abbildung 18 sind zwei Beispiele für die unterschiedliche Vaskularisation in Zervixkarzinomen dargestellt. Der linke Schnitt zeigt ein gut vaskularisiertes Karzinom, der rechte Schnitt ein Karzinom mit einer geringen Vaskularisation.

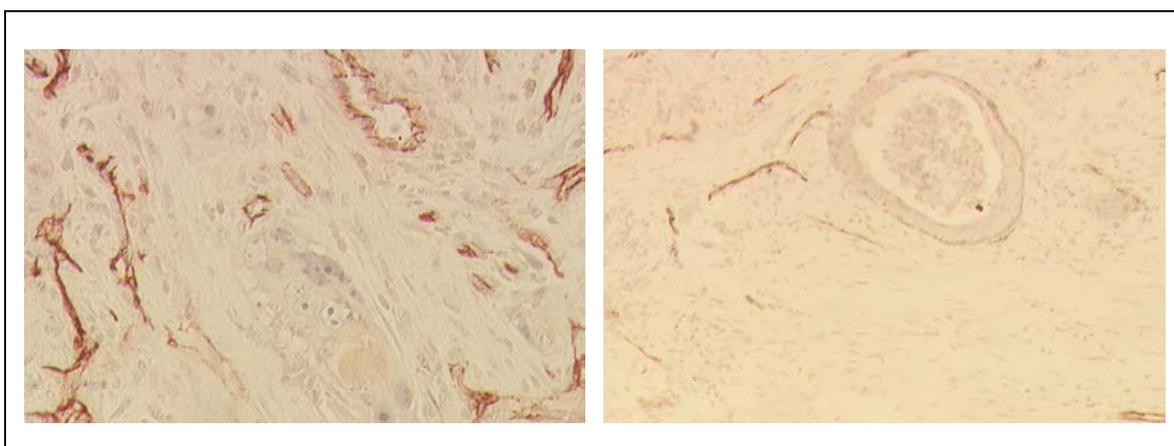


Abbildung 18: Histologische Schnitte mit immunhistochemischer Darstellung von Endothelzellclustern und Gefäßanschnitten mit CD31, links gefäßreicher Tumor, rechts gefäßarmer Tumor

Die mittlere Gefäßdichte aller untersuchten Biopsien betrug  $149 \pm 104$  Gefäße pro 10 HPF, der Median der Gefäßdichte lag bei 128 Gefäße/10 HPF.

Tabelle 23: Gefäßdichte im Tumor in Abhängigkeit vom Tumorstadium

Stadium	N	Gefäßdichte/10 HPF	Median
IIB	6	$98 \pm 61$	95
IIIB	35	$162 \pm 112$	145
IVA	5	$112 \pm 40$	126
Gesamt	46	$149 \pm 104$	128

Ein statistisch zu belegender Unterschied der Gefäßdichte vom Tumorstadium bestand nicht, auch nicht zwischen Stadium IIB und IIIB.

Es wurde der Einfluß der Gefäßdichte auf das Überleben für alle Patientinnen getestet, unterteilt nach dem Median der Gefäßdichte des jeweiligen Stadiums. Die Überlebenskurven zeigt die Abbildung 19. Patientinnen mit einem Tumor mit höherer Gefäßdichte hatten mit  $33 \pm 10\%$  3-Jahresüberleben gegenüber  $72 \pm 10\%$  für Tumore mit einer geringeren Gefäßdichte eine geringere Überlebenschance. Der Unterschied im Überleben ist mit  $p = 0,0135$  signifikant.

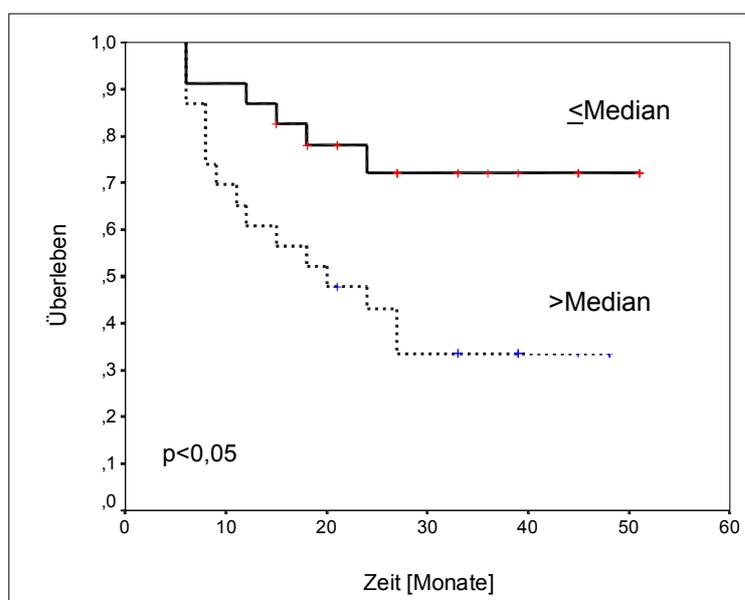


Abbildung 19: Überlebenschance in Abhängigkeit von der Gefäßdichte, unterteilt nach dem Median der Gefäßdichte des jeweiligen Stadiums

Es wurden weiterhin die Zahl der Tumoren mit einem lokalen Progreß und die Häufigkeit der Fälle mit Fernmetastasen in Bezug auf die Gefäßdichte analysiert.

Tabelle 24: Tumorkontrolle bezogen auf den Median der Gefäßdichte des jeweiligen Tumorstadiums (CR = Komplettremission; PD = lokaler Progreß; FM = Fernmetastasen)

Gefäßdichte	CR	Häufigkeit [%]	PD	Häufigkeit [%]	FM	Häufigkeit [%]
≤Median	14/23	61	6/23	26	3/23	13
>Median	9/23	39	7/23	30	7/23	30

Die Karzinome mit einer geringeren Gefäßdichte zeigten eine höhere Rate von anhaltenden Komplettremissionen. Der Unterschied im lokalen Therapieansprechen war dabei gering, dafür konnte bei gefäßdichten Tumoren eine höhere Rate an Fernmetastasen beobachtet werden.

Der Schluß, daß gefäßdichte Tumoren häufiger Fernmetastasen verursachen als solche mit einer geringeren Gefäßdichte ist auf Grund der geringen Fallzahl sicher sehr zurückhaltend zu beurteilen und bedarf weiterer Beobachtungen.

### 3.4.2. Gefäßdichte und Tumoroxygenierung

Die hohe Gefäßdichte als negativer Prognosefaktor veranlaßte uns, die Beziehung zwischen Gefäßdichte und Oxygenierung zu analysieren. Es ist zu fragen, ob die hohe Gefäßdichte mit einer besseren Durchblutung und damit einer besseren Oxygenierung im Tumor verbunden ist, oder ob im Gegenteil dazu die hohe Gefäßdichte eher zu einer Verringerung des Sauerstoffpartialdruckes im Tumor infolge eines chaotischeren Gefäßwachstums und der daraus resultierenden Stase mit erhöhtem Verbrauch an Sauerstoff im Tumorgewebe führt. Damit ist indirekt die Frage nach der Funktionsfähigkeit des Tumorgefäßsystems verbunden.

Es wurde zunächst die Abhängigkeit zwischen Gefäßdichte und Sauerstoffpartialdruck im Tumor, repräsentiert durch den pO<sub>2</sub> - Medianwert ermittelt.

Betrachtet man für alle 46 Patientinnen den Zusammenhang zwischen Gefäßdichte im Tumor und dem medianen Tumor-pO<sub>2</sub>, besteht kein Zusammenhang (Abb.20).

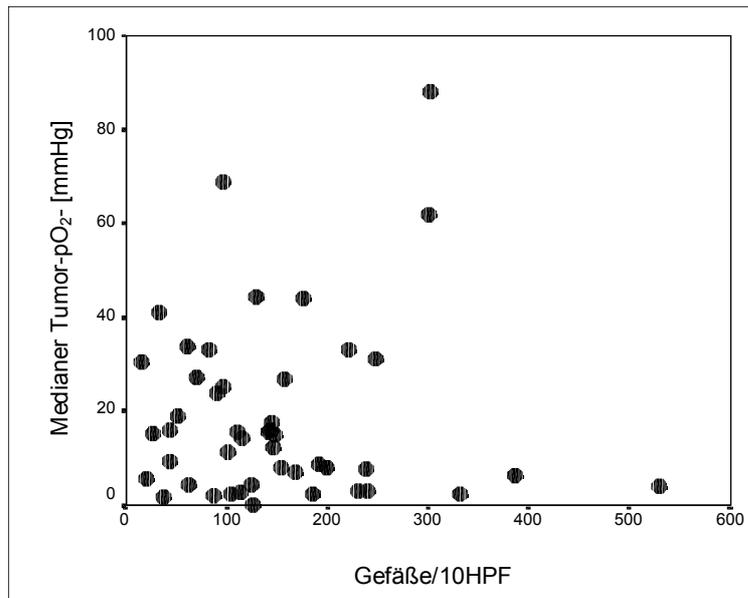


Abbildung 20: GefäÙdichte und medianer Tumor-pO<sub>2</sub>,  $p = 0,8$

Die gleiche Beziehung wurde zwischen der GefäÙdichte und dem hypoxischen Tumoranteil, repräsentiert durch die hypoxische Fraktion <5mmHg, geprüft. Der Abbildung 21 ist zu entnehmen, daß auch für die GefäÙdichte und die HF5 keine Korrelation ermittelt werden konnte.

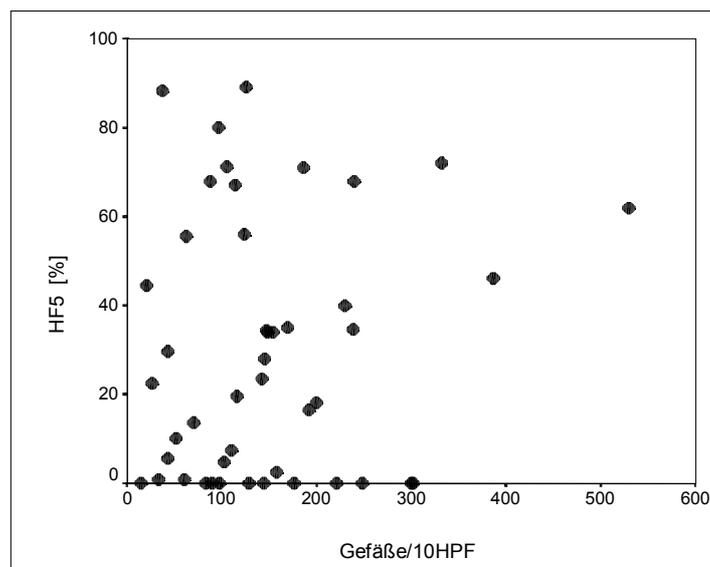


Abbildung 21: GefäÙdichte im Tumor und hypoxische Fraktion ( HF5),  $p = 0,5$

Im Folgenden wurde die Gefäßdichte hinsichtlich der Veränderung des Oxygenierungsstatus unter der Bestrahlung ermittelt. Für diese Auswertung konnten nur die Änderungen des medianen Tumor-pO<sub>2</sub> ausgewertet werden, da nur hier die Gruppen annähernd gleich besetzt waren.

Tabelle 25: Tumoroxygenierung unter Bestrahlung und Gefäßdichte

Oxygenierungsverhalten	N	Gefäßdichte/10 HPF	p
persistierend euoxisch	11	132 ± 94	}
ansteigender pO <sub>2</sub>	7	74 ± 40	
abfallender pO <sub>2</sub>	14	121 ± 66	
persistierend hypoxisch	14	226 ± 121	0,002

Vergleicht man die Gefäßdichte der 14 anhaltend schlecht oxygenierten Karzinome mit der Gefäßdichte der 3 anderen Gruppen, die vor Beginn der Behandlung oder unter der Therapie nach 19,8Gy einen hohen Sauerstoffpartialdruck >15mmHg Median aufwiesen, besteht ein hochsignifikanter Unterschied mit p = 0,002. Die Gefäßdichte in den persistierend hypoxischen Karzinomen ist mindestens doppelt so hoch wie die in den Tumoren mit einem vor oder unter der Therapie gut oxygenierten Karzinom.

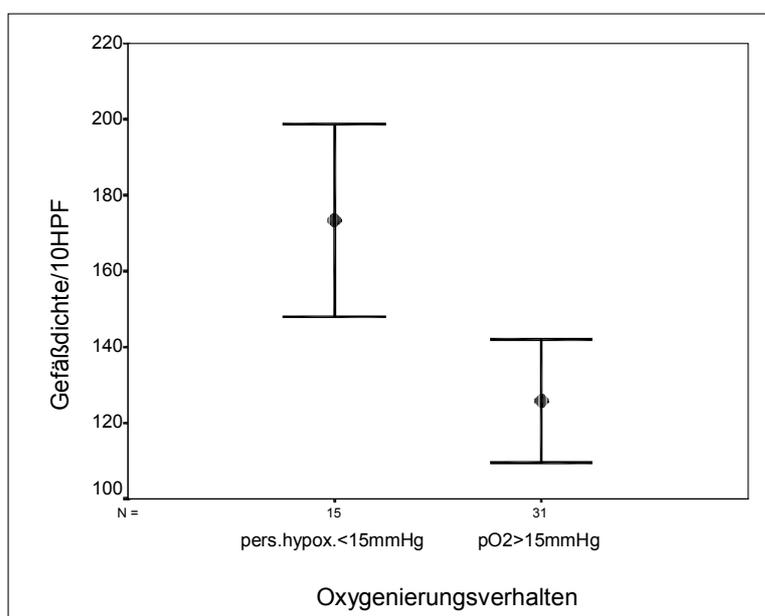


Abbildung 22: Gefäßdichte für die persistierend hypoxischen Karzinome und für die vor oder nach 19,8Gy Bestrahlung gut oxygenierten Karzinome

Beim Zervixkarzinom sind eine intratumorale Hypoxie und eine hohe Gefäßdichte eng miteinander verbunden. Mit dieser Feststellung ist nicht geklärt, worin die Ursache zu

suchen ist oder welche kausalen Zusammenhänge bestehen. Es ist aber naheliegend, daß es sich bei den Tumorgefäßen um funktionell minderwertige Gefäße handelt, die mit einer Störung des Blutflusses zu einer lokalen Hypoxie führen. Andererseits hat eine permanente Tumorphoxie offensichtlich eine Gefäßinduktion zur Folge.

### 3.4.3. Anämie und Gefäßdichte

Wenn wir nachweisen können, daß es einen Zusammenhang gibt zwischen der Tumorphoxie und der Gefäßdichte, stellt sich die Frage, ob nicht die Anämie als Ursache der Gewebhypoxie eine Angiogenese induziert.

Es wurde von uns zunächst die Korrelation zwischen Gefäßdichte und Hämoglobinkonzentration für alle 46 Patientinnen, bei denen eine CD31-Bestimmung vorlag, vorgenommen.

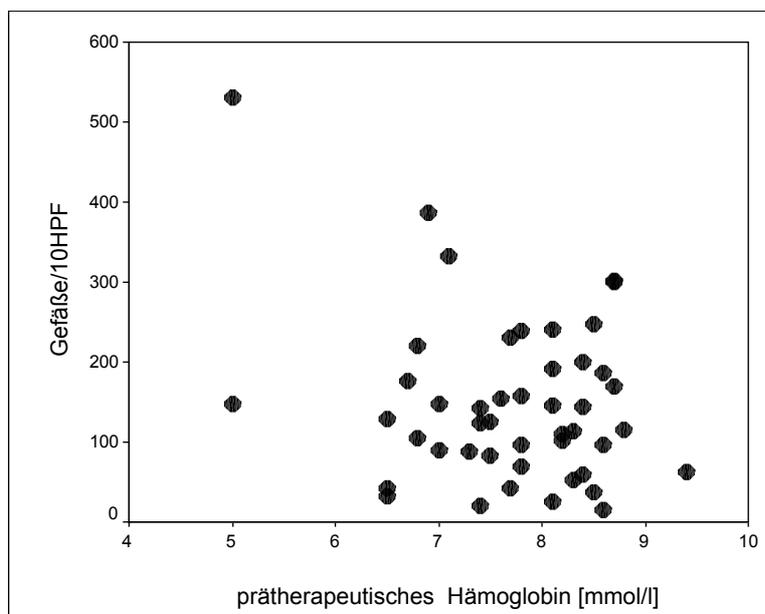


Abbildung 23: Gefäßdichte und prätherapeutischer Hämoglobinspiegel,  $p = 0,08$

Zwischen der Konzentration des Hämoglobin und der Gefäßdichte bestand mit  $p = 0,08$  ein Trend in Richtung zur höheren Gefäßdichte im Tumor für anämische Patientinnen, aber keine Signifikanz.

Auch die Analyse der Gefäßdichte für die Gruppe der anämischen Patientinnen im Vergleich zur Gefäßdichte mit den nichtanämischen Patientinnen erbrachte keinen signifikanten Unterschied, ebenso der Vergleich der Hämoglobinkonzentration getrennt nach dem Medianwert der Gefäßdichte von 128 Gefäßen/10 HPF.

Als bedeutsam für die Prognose hatte sich in der Analyse der Veränderungen der Tumoroxygenierung unter der Strahlentherapie die Subgruppe der persistierend hypoxischen Karzinome im Vergleich zu den Gruppen der Karzinome, die vor oder unter der Behandlung einen medianen Sauerstoffpartialdruck >15mmHg boten, herausgestellt.

Aus diesem Grund haben wir die Beziehung zwischen der Gefäßdichte im Tumor und der Hämoglobinkonzentration für die Gruppen mit einem vor oder unter der Therapie gut oxygenierten Tumor und einem persistierend hypoxischen Karzinom analysiert.

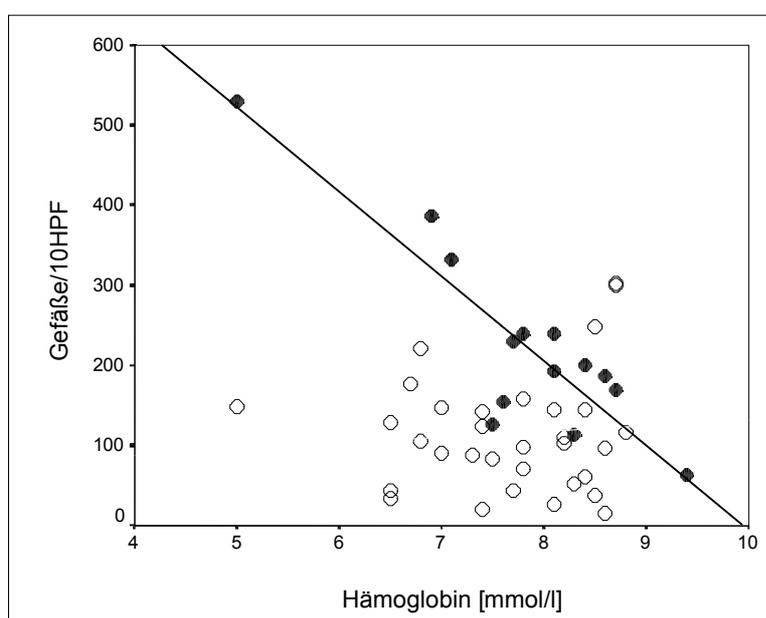


Abbildung 24 : Gefäßdichte und Hämoglobin für persistierend hypoxische Karzinome (●), N = 14, und Karzinome mit vor oder unter der Therapie gut oxygenierten Karzinomen (○), N = 32;  $p < 0,01$

Für die 14 Patientinnen mit einem unter der Bestrahlung persistierend hypoxischen Karzinom <15mmHg bestand zwischen der Gefäßdichte im Tumor und der Höhe der Hämoglobinkonzentration eine signifikante Korrelation ( $r = 0,8$ ;  $p < 0,01$ ). Für die 32 Patientinnen mit einem primär gut oxygenierten Karzinom oder einem  $pO_2$ -Anstieg unter der Behandlung war ein Zusammenhang nicht herzustellen.

### 3.5. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Der Nachweis einer ungünstigeren Prognose für die Patientinnen mit Zervixkarzinomen mit hoher Gefäßdichte hatte uns veranlaßt, den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) als Wachstumsfaktor für die Angiogenese zu bestimmen.

Analysiert wurden die Befunde von 41 Patientinnen, die wegen eines histologisch gesicherten Uteruszervixkarzinoms eine primäre kurative Strahlentherapie erhalten hatten.

Der Test stand erst ab Ende 1996 zur Verfügung. Das Patientinnengut ist nur partiell mit den Patientinnen, die in die Oxygenierungsuntersuchungen einbezogen worden, identisch, so daß diese Daten gesondert ausgewertet wurden. Zur Überprüfung einer Tumorgrößenabhängigkeit haben wir auch Patientinnen mit Zervixkarzinomen des Stadiums IB einbezogen.

Die Bestimmung von VEGF erfolgte mittels eines kommerziell erhältlichen Immunoassays für humanes VEGF<sub>165</sub> (Quantikine; R&D Systems Europe). Mit diesem Test ist eine quantitative Bestimmung des freien VEGF-Proteins im Serum, Plasma oder auch in Zellüberständen von Zellkulturen möglich.

Das mittlere Alter aller Patientinnen betrug  $64 \pm 16$  Jahre ( 32 –85 Jahre). Die Beurteilung des Therapieresultates (CR: Komplettremission, PD: progredienter Verlauf) erfolgte klinisch. Für die Auswertung wurde die VEGF-Bestimmung im Serum vor Beginn der Strahlentherapie herangezogen.

Tabelle 26: Die VEGF-Werte im Serum (sVEGF) in Abhängigkeit vom Tumorstadium

Stadium	Patientinnenzahl N	VEGF im Serum [pg/ml] $\bar{X} \pm SE$	Median [pg/ml]
I	3	$326 \pm 156$	319
II	6	$258 \pm 54$	229
III	24	$450 \pm 61$	424
IV	8	$815 \pm 304$	422
Alle	41	$484 \pm 73$	376

Eine Übersicht über die VEGF-Höhe im Serum (sVEGF) in Abhängigkeit vom Tumorstadium ist in Tabelle 26 dargestellt.

Die Betrachtung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler für die Stadien IIB bis IVA ergab eine scheinbare Beziehung von der sVEGF-Höhe zum Tumorstadium. Auf Grund der sehr großen Streuung war eine statistische Sicherung eines stadienrelevanten und damit tumorgrößenassoziierten sVEGF-Wertes nicht möglich.

Weder im Vergleich der Mittelwerte vom Stadium IIB (N = 6;  $258 \pm 54$  pg/ml) zum Stadium IIIB (N = 24;  $450 \pm 61$  pg/ml), noch von Stadium IIIB zu Stadium IVA (N = 8;  $815$

$\pm 304\text{pg/ml}$ ) noch von Stadium IIB zu Stadium IVA war ein signifikanter Unterschied feststellbar.

Da es für die VEGF-Höhe im Serum keinen Referenzbereich für Gesunde gibt, wurden die Höhen der sVEGF-Konzentration für die Patientinnen mit Tumorprogreß (PD, N = 19) mit den 22 in Remission lebenden Patientinnen (CR) verglichen.

Die sVEGF-Höhe für die CR-Patientinnen betrug  $320 \pm 44 \text{ pg/ml}$  (Median  $256\text{pg/ml}$ ), für die Patientinnen mit progredientem Verlauf  $674 \pm 138 \text{ pg/ml}$  (Median  $438\text{pg/ml}$ ). Der Unterschied ist mit  $p = 0,015$  signifikant.

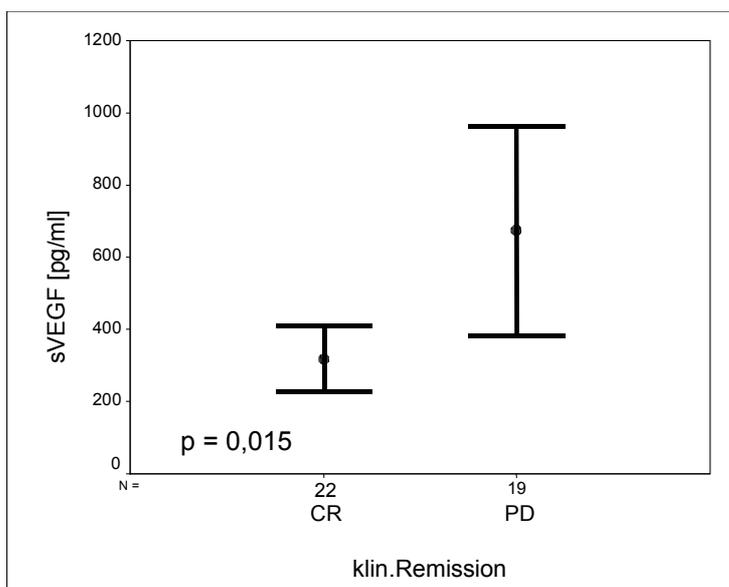


Abbildung 25: sVEGF in Abhängigkeit vom klinischen Verlauf

Die Schwelle für eine ungünstige Prognose konnte mit  $600 \text{ pg/ml}$  für das untersuchte Patientengut ermittelt werden.

Für diesen Wert wurde für alle Patientinnen, die auch im weiteren Verlauf klinisch nachgesorgt wurden, die Überlebenswahrscheinlichkeit nach Kaplan-Meier berechnet (Abb. 26 ).

Von den Patientinnen mit einem Serum-VEGF  $>600\text{pg/ml}$  (N = 9) lebte nach 3 Jahren keine mehr, von denen mit einem VEGF  $\leq 600\text{pg/ml}$  (N = 32)  $63 \pm 9\%$ ,  $p = 0,0004$ .

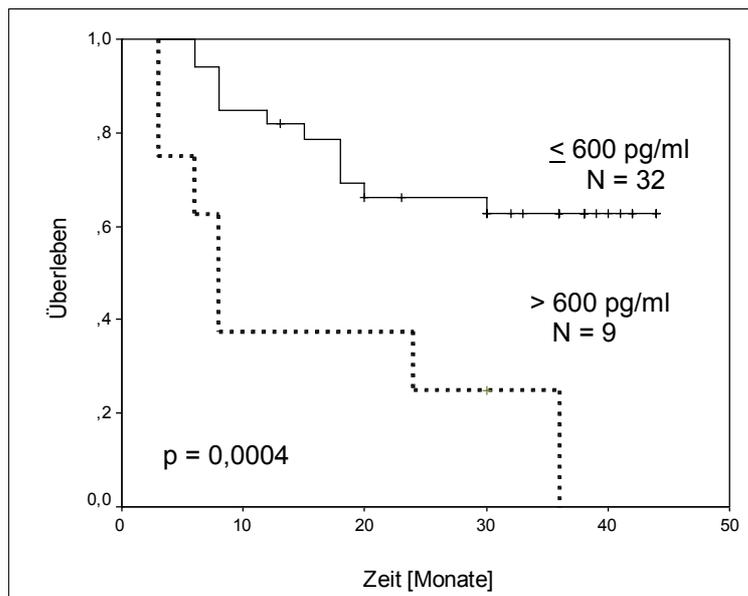


Abbildung 26 : Überlebenskurven für Patientinnen mit Uteruszervixkarzinomen in Abhängigkeit vom Serum-VEGF

Es ist festzustellen, daß Patientinnen mit einem Serum- VEGF-Spiegel >600 pg/ml eine ungünstige Prognose hatten.

Die Erkenntnis, daß VEGF auch in Megakaryozyten synthetisiert, Thrombozyten für das VEGF-Protein ein „Vehikel“ darstellen und VEGF bei der Thrombozytenaktivierung freigesetzt wird (10, 122, 164, 205, 209), gab den Anlaß, einen möglichen Zusammenhang zwischen VEGF und der Thrombozytenzahl bei unseren Patientinnen zu analysieren.

Zwischen der Höhe der Thrombozytenzahl und den nachgewiesenen sVEGF-Werten war eine signifikante Korrelation nachweisbar ( $p < 0,01$ ).

Es ist demnach davon auszugehen, daß durch die Gerinnungsvorgänge über aktivierte Thrombozyten VEGF aus Thrombozyten freigesetzt wird und im Serum nicht nur VEGF aus Endothelzellen und Tumorzellen, sondern auch aus Thrombozyten bestimmt wird.

Wenn im Serum auch Thrombozyten-VEGF bestimmt wird und ein hoher VEGF-Level im Serum mit einer ungünstigen Prognose verbunden war, bestand die Möglichkeit, daß auch der Thrombozytenzahl eine prognostische Bedeutung zukommen könnte.

Patientinnen mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf wiesen weit höhere Thrombozytenwerte auf als solche mit Komplettremissionen. Für die Patientinnen in Remission (N = 22) wurde ein Thrombozytenwert von  $223 \pm 17$  Gpt/l (Median: 216Gpt/l) ermittelt, für die Patientinnen mit Tumorprogreß (N = 19)  $309 \pm 28$  Gpt/l (Median: 263Gpt/l),  $p = 0,012$ .

Die Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Höhe der Thrombozytenzahl haben wir auf die mediane Thrombozytenzahl von 250Gpt/l bezogen.

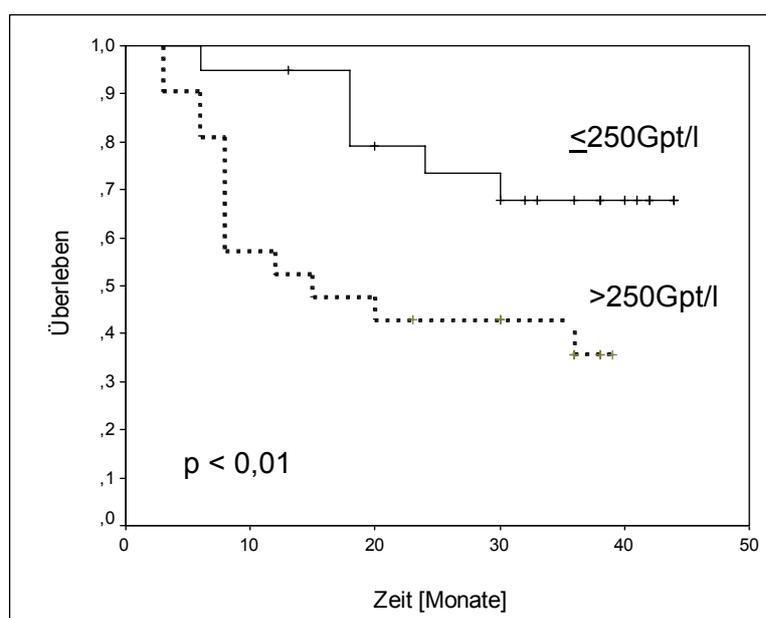


Abbildung 27: Überlebenskurven für Zervixkarzinome in Abhängigkeit vom Median der Thrombozytenwerte (250 Gpt/l)

Die 20 Patientinnen mit einer niedrigeren Thrombozytenzahl wiesen ein 3-Jahresüberleben von  $68 \pm 11\%$  auf, die 21 Patientinnen mit einer höheren Thrombozytenzahl  $36 \pm 11\%$ ,  $p < 0,01$ .

Der Thrombozytenwert von 250Gpt/l entspricht immer noch einem klinischen Normwert. Ob sich der negative Einfluß der Thrombozyten nur über das VEGF ableiten läßt, ist bis jetzt absolut unklar. Sicher ist aber, daß mit der Bestimmung des freien VEGF im Serum in hohem Maße Thrombozyten-VEGF bestimmt wird.

Eine weitere Fragestellung war, ob eine Anämie einen Einfluß auf die VEGF-Expression hat. Für die 41 Patientinnen, bei denen die Untersuchungen für das Serum-VEGF erfolgten, ergab sich kein statistischer Zusammenhang zur Hämoglobinkonzentration. Es

war aber nicht sicher, ob nicht die Thrombozyten einen möglichen Effekt der Anämie verschleiern könnten. Um den Thrombozyteneinfluß zu umgehen, haben wir daraufhin VEGF im Zitrat-Plasma bestimmt. Durch den Zusatz von Zitrat wird die Thrombozytenaktivierung verhindert und damit eine Freisetzung von VEGF-Protein aus Thrombozyten blockiert.

Da retrospektiv kein Plasma von den Serum-VEGF-Patientinnen zur Verfügung stand, erfolgten Untersuchungen an 38 Patientinnen mit gynäkologischen Plattenepithelkarzinomen. Es handelte sich dabei um 36 Patientinnen mit Zervixkarzinomen der Stadien III und IV sowie um 2 Vulvakarzinome im Stadium III. Als Bezugspunkt für die Anämie wurde ein Wert von 7mmol/l gewählt.

Der VEGF-Wert im Blutplasma betrug  $52 \pm 14$  pg/ml für anämische ( $n = 8$ ) und  $31 \pm 21$  pg/ml für nichtanämische Patientinnen ( $n = 30$ ),  $p < 0,05$ .

Unter anämischen Bedingungen kam es zu einer Stimulation der VEGF-Expression. Ob das freie VEGF dabei vermehrt in Tumorzellen oder im Normalgewebe exprimiert wird, kann aus der Untersuchung nicht ermittelt werden. Es kann aber aus unseren Untersuchungen ein Zusammenhang zwischen Anämie, Gewebhypoxie, VEGF-Expression und Angiogenese postuliert werden.

### 3.6. Proliferation und maligne Progression

#### 3.6.1. Flußzytometrische Untersuchungen

Über die Relevanz des DNA-Gehaltes in Zellen von Zervixkarzinomen für die Strahlensensibilität gibt es widersprüchliche Aussagen. Einigkeit besteht darüber, daß in Zervixkarzinomen sowohl rein diploide, rein aneuploide als auch gemischt diploid-und aneuploide Zellen vorkommen (9,115).

Eine unkomplizierte und etablierte Methode zur Bestimmung des DNA-Gehaltes von Tumorzellen ist die Flußzytometrie. Neben der Aussage zum DNA-Index können mit der Flußzytometrie Angaben zum S-Phasen-Anteil und damit zum Proliferationsverhalten der Tumorzellen gewonnen werden (9).

Bei insgesamt 66 Patientinnen konnten die Ergebnisse der flowzytometrischen Untersuchung ausgewertet werden.

Da die Gewebeproben für die DNA-Analyse aus der gleichen Probeexcision stammten wie die Proben für die immunhistochemischen Untersuchungen, konnte sichergestellt werden, daß es sich in jedem Fall auch um Tumormaterial handelte.

In normalen Zellen beträgt der DNA-Index 1,0. Jeder andere Wert über oder unter 1 ist ein Hinweis auf einen gestörten DNA-Gehalt der Tumorzellen.

In den von uns untersuchten Tumoren waren alle Varianten von einfachen diploiden Tumoren, Tumoren mit aneuploiden und diploiden Tumoranteilen bis zu ausschließlich aneuploiden Tumoren nachweisbar. Für die Auswertung wurde die angenommen ungünstigste Variante ausgewählt, bei gemischt diploid-aneuploiden Tumoren demnach der aneuploide DNA-Wert zugrunde gelegt.

Tabelle 27 : DNA-Index und S-Phasenanteil in Abhängigkeit von dem Tumorstadium

Stadium	Pat. N	DNA-Index $\bar{X} \pm SE$	DNA-Index Median	S- Phasenanteil [%] $\bar{X} \pm SE$	S- Phasenanteil [%] Median
IIB	13	2,19 $\pm$ 2,9	1,43	16 $\pm$ 1,7	16
IIIB	35	1,81 $\pm$ 2,3	1,22	19,5 $\pm$ 2,3	16
IVA	8	1,39 $\pm$ 0,4	1,36	19,5 $\pm$ 3,3	17
Gesamt	66	1,8 $\pm$ 2,3	1,36	18,9 $\pm$ 1,6	16

In der Tabelle 27 ist die Höhe des DNA-Index sowie der S-Phasenanteil für die einzelnen Tumorstadien aufgeführt.

Es konnte kein Unterschied des DNA-Index in Abhängigkeit vom Tumorstadium ermittelt werden.

Die Höhe des DNA-Index lag zwischen 1 und 15,7. Auch wenn es den Anschein hatte, daß es zwischen den Stadien IIB und IIIB bzw. IVA einen Unterschied gab, war dies auf Grund der großen Streubreite statistisch nicht zu belegen.

Die Tumorgroße hatte demnach keinen Einfluß auf die Störung des Zellwachstums.

Neben der Differenzierung nach der Ploidie und dem DNA-Index haben wir als möglichen Proliferationsmarker den S-Phasenanteil ausgewertet, zumal als weiterer Proliferationsmarker immunhistologisch KI-67 bestimmt worden war.

Es konnte auch für die Höhe des S-Phasenanteils keine Stadienabhängigkeit ermittelt werden.

### **3.6.2. Ploidie und Überlebenswahrscheinlichkeit**

In der Literatur gibt es einige Hinweise, die einen Überlebensvorteil für diploide Tumoren beschreiben (101,115,121,135,149,198,199). Aus diesem Grund erfolgte zunächst die Überlebensanalyse:

Wie aus der Kaplan-Meier-Kurve (Abb. 28) zu sehen ist, gibt es in Bezug auf den Ploidiestatus keinerlei Unterschiede im Überleben für unsere Patientinnen. In der mehrfaktoriellen Analyse, adjustiert nach dem Stadium, haben die diploiden Karzinome eine etwas bessere Prognose, die aber statistisch nicht relevant war. Auch bei isolierter Betrachtung der Tumorstadien ergab sich kein Unterschied im klinischen Ergebnis in Abhängigkeit von der Ploidie.

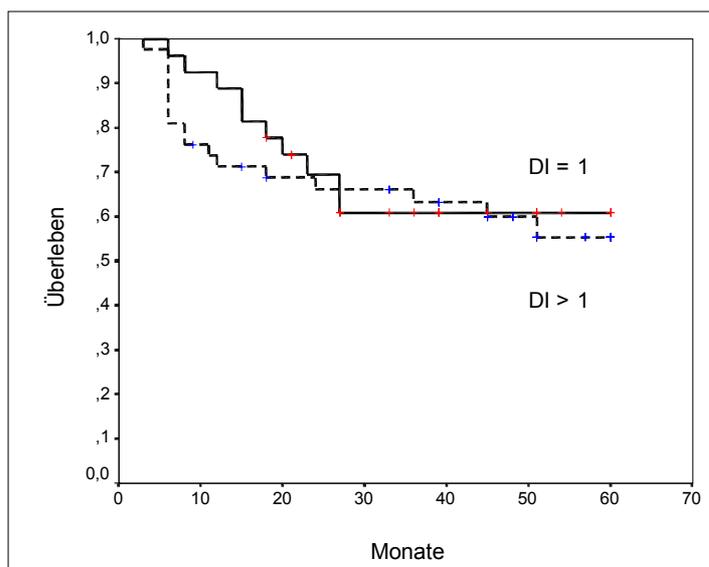


Abbildung 28: Überleben und Ploidiestatus für diploide Karzinome (DI =1; N = 26) und aneuploide Karzinome (DI>1; N = 40)

### 3.6.3. DNA-Index und Tumoroxygenierung

Eine weitere Frage war, ob die Sauerstoffversorgung im Tumor einen Einfluß auf das Zellwachstum hat und ob es unter hypoxischen Verhältnissen zu Unterschieden im DNA-Index kommt.

Es wurde dafür die Höhe des DNA-Index - getrennt nach dem Median des untersuchten Oxygenierungsparameters - verglichen. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 28: DNA-Index in Bezug auf den Median der Oxygenierungsparameter

Oxygenierungsparameter	DNA-Index
2,5mmHg-Wert; Median $\leq 3\%$	1,8 $\pm$ 2,0
$> 3\%$	1,9 $\pm$ 2,5
5mmHg-Wert; Median $> 18\%$	1,8 $\pm$ 2,0
$\leq 18\%$	1,9 $\pm$ 2,5
medianer Tumor-pO <sub>2</sub> $\leq 15\text{mmHg}$	2,2 $\pm$ 3,0
$> 15\text{mmHg}$	1,4 $\pm$ 0,3

Für die Hypoxieparameter HF2,5 und HF5 gab es keine Unterschiede in der Höhe des DNA-Index zwischen den Karzinomen mit einem höheren hypoxischen Tumoranteil und einem weniger hypoxischen Tumoranteil.

Die Differenz in der Höhe des DNA-Index, bestimmt nach dem medianen Tumor-  $pO_2$  für die gesamte Patientengruppe, zeigt zwar mit  $2,2 \pm 3$  einen höheren DNA-Index als in der gut oxygenierten Gruppe, der Unterschied ist aber auf grund der Streubreite nicht signifikant. Trotzdem kann der höhere DNA-Index und insbesondere die hohe Streubreite bei den hypoxischen Karzinomen als ein Hinweis für eine Störung im Teilungsverhalten in hypoxischen Tumoren gedeutet werden.

Da im Stadium IIIB die meisten Untersuchungen sowohl für die Flußzytometrie als auch bei den Oxygenierungsmessungen durchgeführt worden, erfolgte eine gesonderte Analyse für dieses Stadium.

Die Betrachtung für das Stadium IIIB demonstriert den Einfluß der persistierenden Hypoxie auf die Zellteilung. Für die 13 persistierend hypoxischen Karzinome betrug der DNA-Index  $2,44 \pm 4$ , für die 30 Karzinome, die vor oder unter der Strahlentherapie euoxisch waren, nur  $1,5 \pm 0,7$ , (n.s). Die hohe Streubreite der DNA unter Hypoxie ist ein Hinweis für die Störung der Replikation unter Sauerstoffmangel.

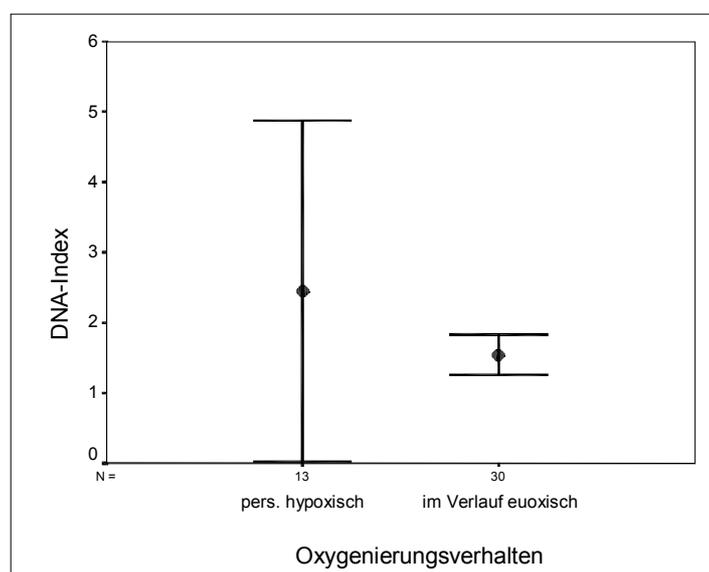


Abbildung 29: DNA-Index in Abhängigkeit von der Änderung des medianen Tumor- $pO_2$  für das Stadium IIIB für die persistierend hypoxischen Karzinome und vor oder im Verlauf euoxischen Karzinome (N = 43)

Auch die Anämie hatte keinen statistisch zu verifizierenden Einfluß auf die DNA-Index-Höhe.

### 3.6.4 Untersuchung der Tumorphiliferation

Als ein Marker zur Beurteilung der Proliferation diente der in der Flußzytometrie bestimmte S-Phasenanteil. Weiterhin wurde für die Beurteilung des Proliferationsverhaltens immunhistologisch KI-67 (MIB-1) bestimmt. In der Tabelle 29 sind die Daten der beiden untersuchten Marker bezogen auf die Tumorstadien dargestellt:

Tabelle 29: S-Phasen-Anteil und KI-67 bei Zervixkarzinomen

Stadium	N	S-Phase $\bar{X} \pm SE$	Median	N	KI-67 $\bar{X} \pm SE$	Median
IIB	13	17 ± 6	16	14	64 ± 23	65
IIIB	35	20 ± 14	16	49	71 ± 19	74
IVA	8	20 ± 10	17	7	78 ± 18	81
Gesamt	56	19 ± 12	16	70	70 ± 20	75

Es gab weder für die Höhe der S-Phase noch für KI-67 einen Unterschied zwischen den einzelnen Tumorstadien.

Aus der Überlegung, daß schnell proliferierende Karzinome in einem höheren Maße hypoxische Tumoranteile aufweisen können, sollte in einem weiteren Schritt der Zusammenhang zwischen Proliferation und Tumoroxygenierung geprüft werden. Als Trennpunkt wurde dabei der Medianwert von KI-67 und der Median der S-Phase gewählt und für beide Gruppen der prozentuale Anteil der hypoxischen Fraktion HF2,5 und HF5 sowie die Höhe für den prätherapeutischen Sauerstoffpartialdruck bestimmt.

Tabelle 30: S-Phasenanteil und Oxygenierungsparameter

S-Phase [%]	N	HF2,5 [%]		HF5 [%]		Medianer pO <sub>2</sub> [mmHg]	
		$\bar{X} \pm SE$	Median	$\bar{X} \pm SE$	Median	$\bar{X} \pm SE$	Median
≤16%	26	13 ± 20	3	22 ± 23	15	18 ± 12	18
>16%	30	22 ± 27	7	34 ± 31	31	8 ± 19	9

Es zeigt sich, daß die Karzinome mit einem höheren S-Phasenanteil, d.h. mit einer höheren Proliferationsrate, hypoxischer sind. Auf Grund der hohen Streubreite war diese Vermutung aber statistisch nicht abzusichern. Für die S-Phase konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Tumoren mit einer höheren Proliferationsrate (>16%) und denen mit einer geringeren Proliferationsrate (≤16%) und den Oxygenierungsparametern bewiesen werden, allerdings fand sich für den hypoxischen Tumoranteil HF5 ein Trend mit  $p = 0,1$  dahingehend, daß höher proliferierende Karzinome einen höheren hypoxischen Tumoranteil hatten..

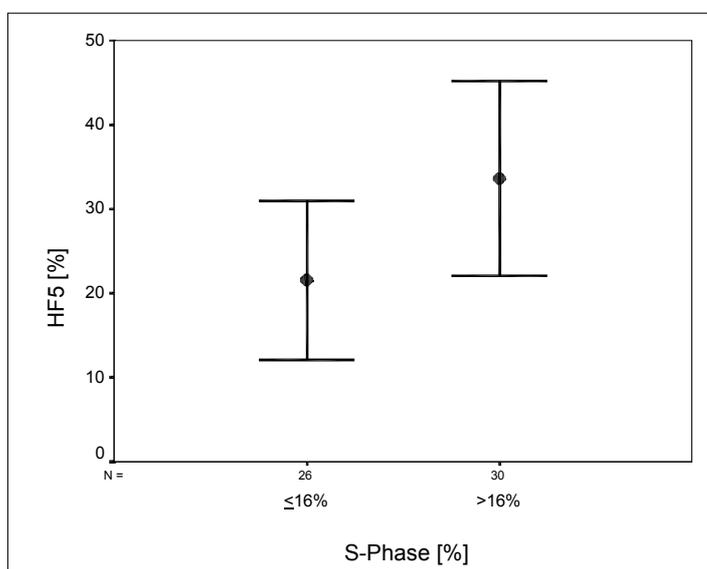


Abbildung 30: Hypoxische Fraktion &lt;5mmHg und Median des S - Phasenanteils

Als zweiter Proliferationsmarker wurde von uns KI-67 in Bezug zur Tumoroxygenierung untersucht. Als Bezugspunkt für die Auswertung wurde der Median von 75% gewählt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 31 aufgeführt:

Tabelle 31: KI-67-Expressions und Tumoroxygenierungsparameter

KI-67	N	HF2,5 [%]		HF5 [%]		Medianer pO <sub>2</sub> [mmHg]	
		$\bar{X} \pm SE$	Median	$\bar{X} \pm SE$	Median	$\bar{X} \pm SE$	Median
<75%	35	14 ± 24	0	22 ± 27	10	26 ± 22	20
≥75%	35	12 ± 19	1	26 ± 27	16	17 ± 14	15

Aus der Tabelle 31 geht hervor, daß – zumindest in dieser Untersuchung - für KI-67 in Bezug auf die Oxygenierungsparameter keine Unterschiede bestanden. Auch in der Umkehr - Höhe der Expression von KI-67 in Abhängigkeit vom Median von HF2,5; HF5 und dem medianen Sauerstoffpartialdruck - ergibt sich kein wesentlicher Unterschied in der Expressionshöhe für die einzelnen Gruppen. Es konnte damit kein Zusammenhang zwischen dem Oxygenierungsstatus der untersuchten Zervixkarzinome und der Expression des Proliferationsmarkers KI-67 nachgewiesen werden.

### 3.6.5. Tumorproliferation und Anämie

Es wurde die Höhe der S-Phase in Bezug auf den prätherapeutischen Hämoglobinspiegel untersucht. Die These war, daß die Anämie die Tumorproliferation hemmen soll. In der Abbildung 31 ist der S-Phasenanteil für die vor Therapiebeginn anämischen und nichtanämischen Patientinnen dargestellt:

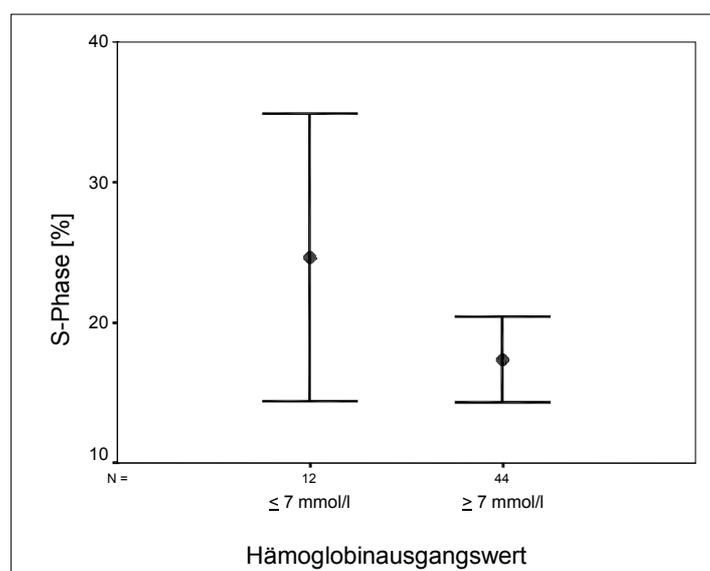


Abbildung 31: S-Phasenanteil und prätherapeutischer Hämoglobinwert

Anämische Patientinnen hatten Karzinome mit einer höheren Proliferationsrate, d.h. mit einem höheren S-Phasenanteil, aufzuweisen. Der Unterschied für beide Gruppen war mit  $p = 0,059$  an der Grenze zur statistischen Relevanz. Auf alle Fälle hatte eine hohe Hämoglobinkonzentration keinen Einfluß im Sinne einer Förderung des Proliferationsverhaltens, sondern das Ergebnis ist als ein Hinweis auf einen systemischen Effekt eines stark proliferierenden Karzinoms mit einer Anämie als Folgeerscheinung zu interpretieren. Für KI-67 konnte keine Beziehung zwischen der Expressionshöhe und der Anämie festgestellt werden.

### 3.6.6. Tumorresponse, Proliferation und Metastasierung

Zur Überprüfung der Annahme, daß Tumore mit einer höheren Proliferationsrate in einem größeren Ausmaß Fernmetastasen bilden als Tumore mit einer niedrigeren Proliferationsrate wurde der Anteil an lokalem Therapieversagen und an Fernmetastasen für die beiden Proliferationsmarker bezogen auf den jeweiligen Median, geprüft.

Tabelle 32 Tumorremission und Metastasierung in Bezug zur Proliferation  
CR Komplettremission; PD lokaler Progreß; FM Fernmetastasen

KI-67-Expression	CR	Häufigkeit [%]	PD	Häufigkeit [%]	FM	Häufigkeit [%]
<75%	20/35	57	9/35	26	6/35	17
>75%	17/35	49	7/35	20	11/35	34
S-PHASE						
<16%	17/26	65	5/26	19	4/26	15
>16%	17/30	57	9/30	30	4/30	13

Während bei Analyse des Proliferationsmarkers KI-67 doppelt so viel Fernmetastasen für die Karzinome mit einem hohen Proliferationsanteil beobachtet wurden, kann diese Beobachtung für den S-Phasenanteil nicht bestätigt werden. Für die Karzinome mit höherem S-Phasenanteil war die lokale Remissionsrate ungünstiger.

Der Anteil der Tumore in klinischer Komplettremission war nahezu identisch.

Die Annahme, daß schnell proliferierende Karzinome eine hohe Fernmetastasierungsrate haben, konnte zumindest in dieser Untersuchung für Zervixkarzinome nach primärer Strahlentherapie nicht eindeutig belegt werden.

In der Überlebensanalyse, getrennt nach dem Median des S-Phasenanteils und dem Median der KI-67-Expression, gab es keinen Unterschied im Behandlungsergebnis.

Zusammengefaßt kann festgestellt werden, daß das Proliferationsverhalten vor Strahlentherapie für das klinische Behandlungsergebnis nicht relevant war.

### 3.7. Tumorprotein P53

P53 ist eines der wichtigsten Tumorsuppressorproteine, dessen Aufgabe die Aufrechterhaltung und Kontrolle normalen Wachstums ist. Der Verlust der P53-Funktion kann bei Tumoren mit einem aggressiveren Wachstum verbunden sein. Der Verlust der Wildtyp-Funktion von P53 kann durch eine Mutation entstehen. Das Wildtyp-P53-Protein kann durch Bildung von Komplexen mit viralen Proteinen ebenfalls einen Funktionsverlust erleiden. In der Untersuchung wurde P53-Protein immunhistochemisch in prätherapeutischen Biopsien bestimmt.

Der in unserer Untersuchung für die immunhistochemische Untersuchung verwendete Antikörper DO-7 ist ein Antikörper, der zwischen transformiertem P53 und Wildtyp-P53 nicht unterscheiden kann. Es besteht in der Literatur Übereinstimmung, daß Wildtyp-P53-Protein eine sehr kurze Halbwertszeit hat (46), die unter 20 min. liegt; demgegenüber hat transformiertes P53 eine Halbwertszeit von über 3 Stunden. Auf Grund der kurzen Nachweiszeit von Wildtyp-P53 in den immunhistochemischen Untersuchungen haben wir postuliert, daß die Karzinome ohne P53-Nachweis Karzinome mit Wildtyp-P53-Protein (wt-P53) waren, die P53-positiven Karzinome aber ein transformiertes und damit ein in der Funktion eingeschränktes P53 (t-P53) aufwiesen.

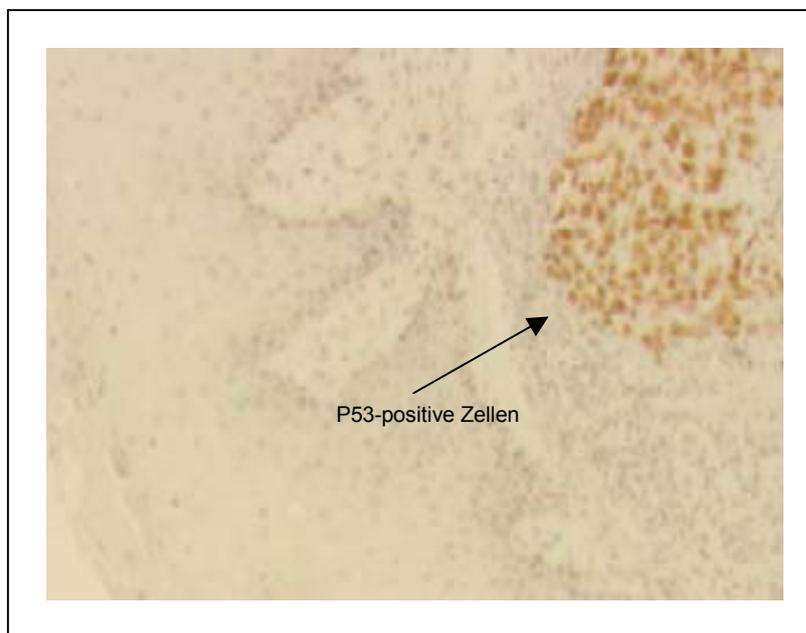


Abbildung 32: Immunhistochemische Darstellung von P53-Protein in einem Plattenepithelkarzinom der Zervix uteri

### 3.7.1. Analyse der P53-Expression

In 60 von 70 untersuchten Tumoren kam P53 in unterschiedlicher prozentualer Höhe zur Darstellung. Es wurde davon ausgegangen, daß es sich bei diesen Befunden um Tumore mit transformiertem P53 handelte. In unserer Untersuchung konnte bei 10 Karzinomen keine Darstellung des P53-Proteins in der Immunhistologie erfolgen, es wurde angenommen, daß es sich in diesen Fällen um Wildtyp-Befunde handelte.

Eine Zusammenhang zwischen Tumorstadium und der Höhe der P53-Expression war nicht zu sichern.

Tabelle 33: Tumorstadium und P53-Expressionshöhe

Stadium FIGO	Patientinnen zahl N	P53 $\bar{X} \pm SE$ [%]	P53 median [%]
IIb	14	27 $\pm$ 22	28
IIIb	49	21 $\pm$ 24	15
IVa	7	23 $\pm$ 32	13
Total	70	23 $\pm$ 24	15

Zur Überprüfung der Frage, ob Hypoxie im Tumor einen Einfluss auf die P53-Expression hat, wurde die Höhe der P53-Expression bestimmt für die Tumore mit und ohne meßbare Sauerstoffpartialdrücke unter 2,5 und 5mmHg und verglichen mit der Höhe der P53-Expression für Karzinome mit nachweisbarem hypoxischen Tumoranteil (Tab.34).

Tabelle 34: P53-Expressionshöhe und Tumorhypoxie

Tumor- hypoxie	Pat. N	P53 $\bar{X} \pm SE$ [%]	p
HF2,5 [-]	35	19 $\pm$ 4	
HF2,5 [+]	35	27 $\pm$ 4	0,022
HF5 [-]	21	13 $\pm$ 4	
HF5 [+]	49	27 $\pm$ 4	0,012

Im Ergebnis konnte nachgewiesen werden, daß in hypoxischen Karzinomen eine höhere P53-Expression immunhistochemisch darstellbar war als in Karzinomen ohne meßbare hypoxische Tumoranteile. Der Unterschied in der Höhe der P53-Expression in hypoxischen Tumoren ist mit  $p = 0,022$  für die Werte  $<2,5\text{mmHg}$  und mit  $p = 0,012$  für die  $<5\text{mmHg}$ -Werte gegenüber der Höhe der P53-Expression in Tumoren ohne hypoxische Tumoranteile signifikant. Die Anämie hatte auf die Höhe der P53-Expression keinen Einfluß.

### 3.7.2. P53-Expression und Überlebenswahrscheinlichkeit

Sechzig der siebenzig Tumoren wiesen eine P53-Expression auf. Die Überlebenswahrscheinlichkeit betrug dabei nach 3 Jahren für die tP53-Karzinome  $51 \pm 1 \%$ , für die 10 Patientinnen ohne P53-Expression  $89 \pm 15 \%$ . Auf Grund der kleinen Fallzahl ist der Unterschied in der Prognose aber mit  $p = 0,14$  statistisch nicht signifikant.

Auch in der mehrfaktoriellen Analyse, adjustiert nach dem Stadium, ist – trotz eines Überlebensvorteils von ca. 25% für die wtP53-Patientinnen - der Einfluß des P53-Status zum Zeitpunkt der Analyse nicht signifikant.

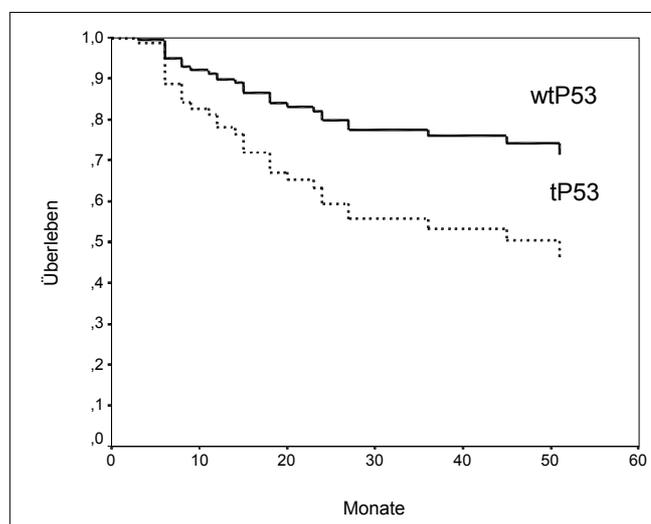


Abbildung 33: Überlebenswahrscheinlichkeit für Patientinnen mit wtP53-Karzinomen (N = 10) und tP53 (N = 60), adjustiert nach Tumorstadium,

Unter Einbeziehung des Tumorstadiums wurde in einer Cox-Regression der Einfluß des P53-Status und der Tumorhypoxie auf das Überleben als multifaktorielles Geschehen überprüft.

Als Hypoxie-Marker wurde der Median der hypoxischen Fraktion  $<5\text{mmHg}$  von 18% gewählt. Auf Grund der kleinen Fallzahl haben wir dabei die Gruppe der 10 wtP53-

Tumoren nicht unterteilt. Die Kombination "tP53 und HF5 über 18%" wurde bei 32 Patientinnen, die Kombination "tP53 und HF5 unter 18%" " bei 28 Patientinnen beobachtet.

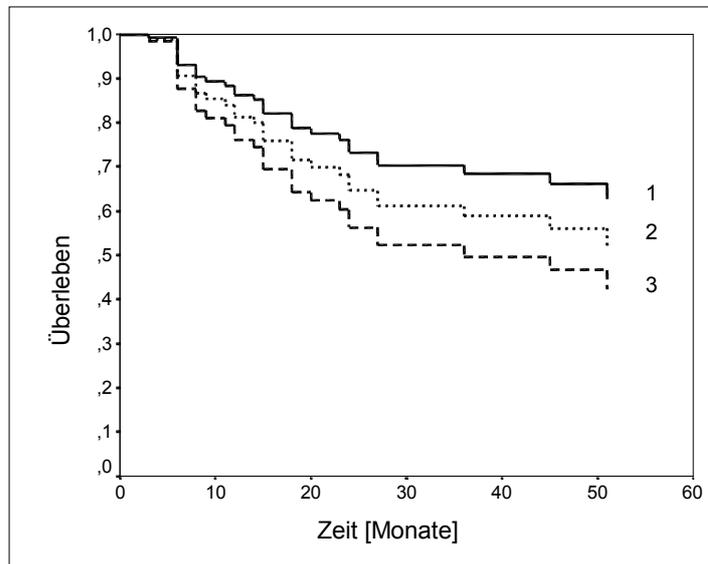


Abbildung 34: Coxregression für wtp3-Karzinome (1), tP53/HF5<18% (2) und tP53/HF5>18% (3) adjustiert nach Stadium

Die beste Prognose für das Überleben hatten die Patientinnen mit einem wtP53-Tumor, schlechter war die Prognose für tP53- Karzinome mit einer hypoxischen Fraktion <5mmHg unter 18%, am ungünstigsten stellte sich die Prognose für das Überleben der Patientinnen mit tP53-Tumor und einem hypoxischen Tumoranteile >18% HF5 dar. Insgesamt ist aber der Unterschied in der Prognose zwischen den 3 Patientengruppen statistisch nicht signifikant.

### 3.7.3. Zusammenhang von Hypoxie, P53 und DNA-Index

Für den DNA-Index konnten Unterschiede in Abhängigkeit von dem P53-Status nachgewiesen werden. Transformierte P53-Karzinome wiesen einen DNA-Index von  $1,97 \pm 0,4$  auf, wtP53 von  $1,67 \pm 0,1$ ,  $p = 0,05$ . Bei tP53-Karzinomen ist demnach ein höherer Anteil an Tumorzellen mit aneuploiden DNA-Gehalt festzustellen.

In der Abb. 35 ist die Höhe des DNA-Index in Abhängigkeit von der die P53-Expression dargestellt. Parameter ist die Tumorphoxie <5mmHg. Die hypoxischen und P53-positiven Karzinome wiesen mit einem DNA-Index von  $2,2 \pm 3,1$  gegenüber einem DNA-Index von  $1,2 \pm 0,3$  bei P53-positiven nichthyoxischen Karzinomen einen deutlich höheren aneuploiden DNA-Anteil auf.

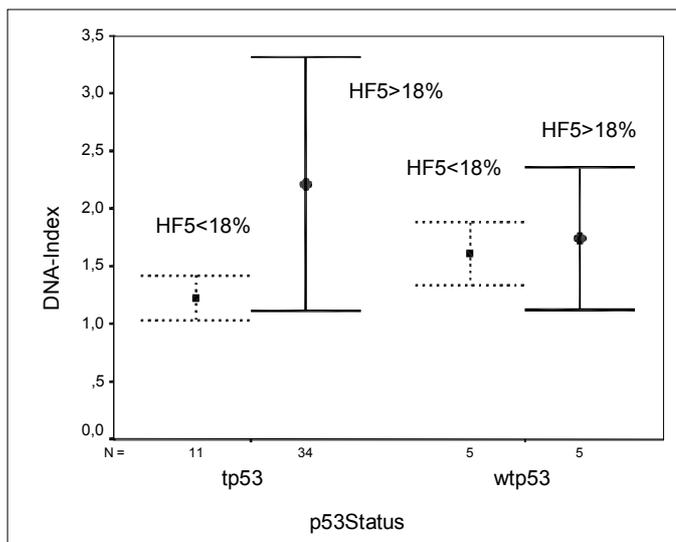


Abbildung 35: DNA-Index in Bezug zum P53-Status und der Tumorhypoxie HF5

Die Tumorhypoxie hatte offensichtlich bei den Tumoren mit Wildtyp-P53 keinen Einfluß auf die Höhe des DNA-Index. Ebenso war der DNA-Index bei den Tumoren mit tp53-Zellen niedrig, wenn keine Tumorhypoxie meßbar war. Auffallend war der hohe DNA-Index mit einer großen Standardabweichung für die Karzinome, die hypoxische Meßwerte und ein transformiertes P53 aufwiesen.

### 3.8. BCL-2-Bestimmungen

In den immunhistochemischen Untersuchungen wurde mit BCL-2 ein weiteres Protein bestimmt, daß einen Einfluß auf die Apoptose hat. So, wie P53 in die Zellzyklusregulation eingreift und in den Fällen einer gestörten DNA-Synthese die Reparatur oder Apoptose einleitet, verhindert BCL2 die Apoptoseinduktion.

Eine Verbindung zwischen den beiden apoptoseregulierenden Oncogenen läßt sich in unserer Untersuchung nachweisen, es bestand zwischen der Höhe der Expression von BCL2 und der Höhe der Expression von P53 eine positive Korrelation von  $p = 0,002$ .

#### 3.8.1. BCL-2 und Tumorstadium

In unserer Untersuchung fand sich bei 34/70 immunhistochemischen Untersuchungen kein Nachweis von BCL2.

Der Median der BCL2-Expression für die am Tumor verstorbenen Patientinnen betrug 1%, für die zum Stichtag lebenden 0,1%. Ein Unterschied im Überleben für das gesamte Patientenkollektiv war in Abhängigkeit vom BCL2-Median nicht festzustellen. Die Analyse des prozentualen Vorkommens, bezogen auf die Tumorstadien und das gesamte

Patientenkollektiv, ist in der Übersicht in Tabelle 35 dargestellt:

Tabelle 35: BCL2-Expression und Tumorstadium

Stadium	N	BCL2 $\bar{X} \pm SE$ [%]	Median
IIB	14	25 ± 35	6,5
IIIB	49	12 ± 24	1
IVA	7	19 ± 38	0,1
TOTAL	70	15 ± 28	1

Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Expressionshöhe war zwischen den einzelnen Stadien nicht zu ermitteln. Der Median war aber im Tumorstadium IIB am Höchsten und nahm zum Stadium IVA ab.

Die Überlebensanalyse, bezogen auf den Median der Expression der Tumorstadien, ergab folgende Resultate:

Tabelle 36: 3-Jahresüberleben in Abhängigkeit von der BCL-2-Expression

Stadium und Median der Expression [%]	N	3-Jahres- Überleben	p
IIB <6,5%	7	86 ± 13	0,12
>6,5%	7	38 ± 20	
IIIB <1,0%	26	59 ± 10	
>1,0%	23	62 ± 11	
IVA <0,1%	4	0	
>0,1%	3	33 ± 27	
Gesamt <1%	31	56 ± 9	
>1%	39	56 ± 8	

Für das Tumorstadium IIB bestand in Abhängigkeit von der Expressionshöhe von BCL2 ein Überlebensunterschied von fast 50%. Trotzdem war der Unterschied wegen der kleinen Fallzahlen statistisch nicht zu sichern. Für die höheren Tumorstadien hatte die BCL2-Expression keinerlei Bedeutung für das klinische Therapieergebnis.

### 3.8.2. BCL-2 und DNA-Index

BCL-2 hemmt die Apoptose. Es konnte vermutet werden, daß sich ein gestörtes Zellwachstum bei immunologisch positivem Nachweis von BCL-2 durch einen hohen DNA-Index beweisen läßt. Es erfolgte aus diesem Grund die Analyse des DNA-Index in bezug zum BCL-2-Status. Da sich der Median für die einzelnen Tumorstadien erheblich unterschied, erfolgte die Analyse getrennt nach Tumorstadium.

In der Abbildung 37 ist der DNA-Index für die Tumorstadien in Abhängigkeit vom Median der BCL2-Expression des jeweiligen Tumorstadiums dargestellt:

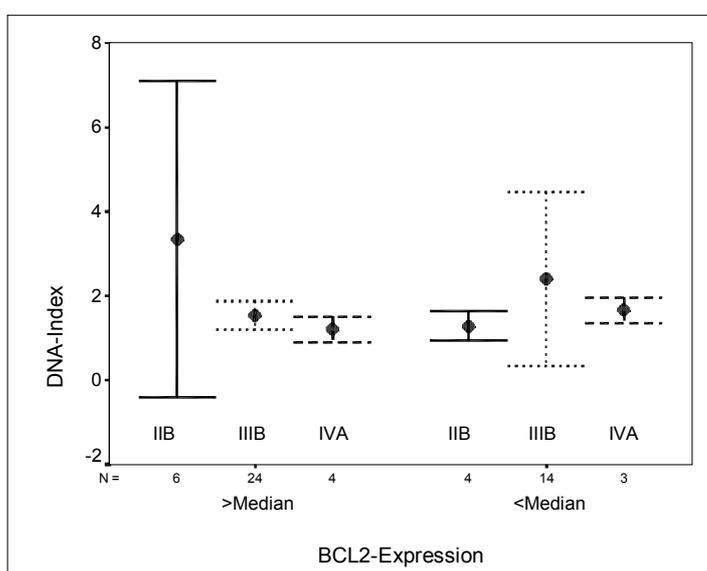


Abbildung 37: DNA-Index in Abhängigkeit vom Median der BCL-2-Expression des jeweiligen Tumorstadiums

Nur im Stadium IIB war ein höherer DNA-Index mit einer breiteren Standardabweichung in den Tumoren mit einer BCL2-Expression über dem Median von 6,5% im Vergleich zu den Gewebeproben mit einer höheren BCL2-Expression zu beobachten. Dies spricht für eine funktionierende Apoptosehemmung durch BCL2 im Stadium IIB: Hohe Expression mit wenig Apoptose; niedrige Expression mit höherer Apoptosewirkung.

In den höheren Tumorstadien hatte die BCL2-Expression keinerlei Bezug zum DNA-Index.

Möglicherweise ist nur in den niedrigeren Tumorstadien noch mit einer vergleichsweise intakten BCL2-Funktion zu rechnen, in den höheren Stadien spielt BCL2 in der Apoptoseregulierung keine Rolle mehr. Dafür spricht auch der relative Verlust der BCL2-

Expression in den Stadien IIIB und IVA.

Eine Beziehung zur Tumoroxygenierung konnte nicht gefunden werden, weder für den medianen Sauerstoffpartialdruck noch zur hypoxischen Fraktion.

Die Analyse der Tumorrückbildung in Abhängigkeit von der BCL2-Expression zeigte keine Unterschiede .

Tabelle 37: BCL-2-Expression und Tumorresponse

BCL-2-Expression	CR	Häufigkeit [%]	PD	Häufigkeit [%]	FM	Häufigkeit [%]
<1%	16/31	52	9/31	29	6/31	19
>1%	21/39	54	7/39	18	11/39	28

Zusammenfassend kann gezeigt werden, daß BCL-2 als Prognosemarker für fortgeschrittene Zervixkarzinome ungeeignet war.

### 3.9. Analyse der Ergebnisse der Behandlung mit alleiniger Strahlentherapie im Vergleich zur adjuvanten IFN/cRA-Behandlung

Im Rahmen einer Phase-II- und Phase-III-Studie zum Einfluß einer Behandlung mit Interferon-alpha-2a und 13-cis-Retinsäure auf das Behandlungsergebnis beim fortgeschrittenen, primär bestrahlten Zervixkarzinom wurden in unserer Klinik zwischen 1995 und 1999 Patientinnen mit Zervixkarzinomen der Stadien IIB und IIIB n.FIGO in diese Studien eingebracht. Auch wenn die Auswertung dieser Studien nicht das Ziel der Untersuchung war, haben wir die Therapieresultate und tumorbiologischen Parameter der Studienpatientinnen mit den Ergebnissen der Patientinnen verglichen, die im gleichen Zeitrahmen mit einer alleinigen Strahlentherapie behandelt worden waren.

32/87 Patientinnen waren in den IFN/cRA-Studien behandelt worden, 55 Patientinnen erhielten eine alleinige Strahlentherapie.

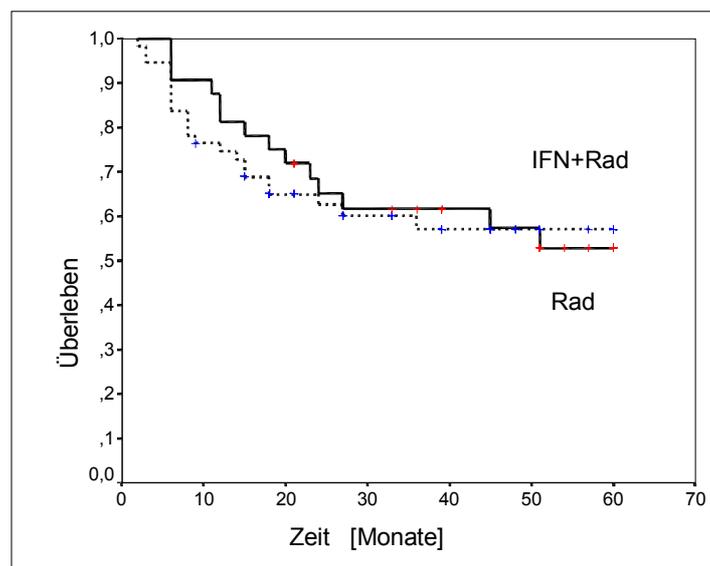


Abbildung 38: Überlebenskurven für die Gruppe der IFN/cRA-Patientinnen ( N = 32) im Vergleich zur Gruppe mit alleiniger Radiatio ( N = 55)

Die 3-Jahres-Analyse ergab für die 32 Patientinnen bei einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 42 Monaten ein tumorspezifisches Überleben von  $61 \pm 8\%$  im Vergleich zu  $57 \pm 7\%$  für die 55 Patientinnen mit einer alleinigen Strahlentherapie.

Auch im ereignisfreien Überleben zeigte sich kein Unterschied: Für die IFN-Patientinnen ergab sich eine Prognose für lokal tumorfreies Überleben mit  $77 \pm 8\%$  vs.  $73 \pm 6\%$  für nur bestrahlte Patientinnen. Für das fernmetastasenfreie Überleben betrug der Unterschied  $75 \pm 8\%$  für die IFN-Gruppe und  $74 \pm 7\%$  für die nur bestrahlte Gruppe,  $p = 0,84$ .

Es bestand kein Unterschied in der Prognose zwischen beiden Behandlungsgruppen.

Die Analyse des 3-Jahresüberlebens in Bezug zur adjuvanten Therapie nach dem Interferon-Protokoll und dem Tumorstadium zeigt die Tabelle 38:

Tabelle 38 : 3-Jahresüberleben nach alleiniger Strahlentherapie (Rad) und kombinierter Behandlung mit IFN/cRA (IFN+Rad)

Stadium	Therapie	Patientinnen- zahl	3-Jahres- Überleben ( $\bar{X} \pm SE$ )	p
IIB	IFN +Rad	6	83 $\pm$ 15 %	0,51
	Rad	13	65 $\pm$ 14 %	
IIIB	IFN +Rad	26	56 $\pm$ 10 %	0,54
	Rad	33	64 $\pm$ 9 %	

Wie der Übersicht zu entnehmen ist, bestand weder für das Stadium IIB noch für das Stadium IIIB ein statistischer Unterschied im Vergleich beider Therapieoptionen. Die adjuvante Therapie mit Interferon-alpha-2a und 13-cis-Retinsäure hat den Patientinnen keinen Therapievorteil gebracht.

In der Tabelle 39 sind alle geprüften Parameter für die Gruppe der IFN/cRA-Patientinnen und derjenigen Patientinnen mit einer alleinigen Strahlentherapie gegenübergestellt und statistisch analysiert.

Der einzige evaluierbare Unterschied zwischen beiden Therapiegruppen betraf die prätherapeutische Tumoroxygenierung.

Die Patientinnen in der IFN/cRA-Behandlungsgruppe wiesen eine statistisch signifikant bessere Tumoroxygenierung im Vergleich zu den Patientinnen mit alleiniger Strahlentherapie in den prätherapeutisch gemessenen Werten auf. Dieser Unterschied konnte jedoch nach 19,8 Gy Hochvolttherapie nicht mehr beobachtet werden. Die zusammengehörenden Werte wurden in der Tabelle 39 mit einer Klammer markiert.

Tabelle 39: Übersicht über die untersuchten Parameter, unterschieden nach alleiniger Strahlentherapie und Interferon/cRA-Zusatzbehandlung

Parameter	Interferon/cRA		alleinige Bestrahlung		p
	Pat. N	Wert	Pat. N	Wert	
Hämoglobin 0Gy mmol/l	32	7,8 ± 0,1	55	7,7 ± 0,1	0,8
Hämoglobin 19,8Gy mmol/l	32	7,4 ± 0,1	55	7,5 ± 0,1	0,6
HF 2,5 0 Gy %	32	10,5± 3	55	19 ± 3,2	<b>0,07</b> }
HF 2,5 19,8 Gy %	32	11± 3	55	17 ± 3	0,17 }
HF5 0 Gy %	32	17 ±4	55	32 ± 4	<b>0,02</b> }
HF 5 19,8 Gy %	32	22 ± 5	55	17 ± 2	0,27 }
Median 0 Gy mmHg	32	26 ± 4	55	18 ±2	<b>0,04</b> }
Median 19,8 Gy mmHg	32	23 ±4	55	17± 2	0,19 }
Gefäßdichte /10HPF	15	157 ± 31	31	144 ±17	0,99
S-Phase %	22	16 ± 1,5	44	21± 2	0,36
DNA-Index	22	2,4 ± 0,7	44	1,5± 0,1	0,92
P53 %	28	20 ± 4	42	24± 4	0,46
BCL2 %	28	11 ± 4	42	18 ±5	0,11
KI67 %	28	67± 4	42	72 ± 3	0,21

Letzendlich konnte unsere Untersuchung nachweisen, daß nicht die prätherapeutische Oxygenierung, sondern der Sauerstoffpartialdruck im Tumor unter der Bestrahlung prognoserelevant war, so daß der Vorteil der besseren prätherapeutischen Oxygenierung für die IFN/cRA-Patientinnen sich nicht im besseren Therapieergebnis niedergeschlagen hat.

Auf alle anderen geprüften Parameter hatte die 2-wöchige Vorbehandlung mit Interferon-alpha-2a und 13-cis-Retinsäure keinen Einfluß.

### 3.10. Mehrfaktorielle Regressionsanalyse ausgewählter Parameter

In den bisherigen Kapiteln wurden einzelne Parameter auf deren Einfluß auf das Therapieergebnis und auf ihre mögliche Wechselwirkungen geprüft. Zur Bewertung der untersuchten Faktoren hinsichtlich ihrer klinische Bedeutung sollen diese abschließend in einer logistischen Regressionsanalyse untersucht werden. Es wurden in diese Untersuchung die Parameter einbezogen, die in der univariaten Analyse oder in der Coxregression einen signifikanten Einfluß auf das klinische Ergebnis gezeigt hatten. Dazu gehörten Tumorstadium, der mediane Sauerstoffpartialdruck bzw. die hypoxische Fraktion <5mmHg im Tumor sowie die Hämoglobinkonzentration vor und unter der Bestrahlung.

Für die Regressionsuntersuchung war eine Umwandlung der Werte in dichotome Variable erforderlich. Die Bewertung erfolgte dabei für den Sauerstoffpartialdruck nach dem Median der gemessenen Werte. Für die hypoxische Fraktion HF5 erfolgte die Einteilung nach "gemessene Werte von 5mmHg" versus "keine Werte <5mmHg". Die Bewertung der Hämoglobinkonzentration wurde in Abhängigkeit von 7mmol/l als Grenzwert vorgenommen.

Die Regressionsanalyse erfolgte für das Gesamtüberleben, den lokalen Tumorprogreß und die Fernmetastasierungsrate zum Zeitpunkt der Auswertung mit Stichtag vom 31.12.2000.

Als kategoriale Kovariate wurde das klinische Stadium eingesetzt..

Da sich sowohl der mediane Sauerstoffpartialdruck als auch die Tumorhypoxie als prognostisch bedeutsame Faktoren erwiesen haben, aber beide Faktoren voneinander abhängig sind, wurde zur Vermeidung eines "Overfitting" für beide Oxygenierungsparameter die Untersuchung getrennt vorgenommen.

In den Tabellen 40 und 41 sind die p-Werte für die geprüften Parameter für das Gesamtüberleben, das lokale Tumorgeschehen sowie für die Fernmetastasierung aufgeführt.

Tabelle 40: Signifikanzen der logistischen Regression unter Einbeziehung des medianen Sauerstoffpartialdruckes als Oxygenierungsparameters  
***kursiv***: günstiger Prognoseparameter

Parameter	Gesamt- überleben	Lokaler Tumorprogreß	Fern- metastasen
Hämoglobin prätherapeut. <b><i>&gt;7mmol/l vs. &lt;7mmol/l</i></b>	<b>0,005</b>	0,127	0,462
Hämoglobin 19,8 Gy <b><i>&gt;7mmol/l vs. &lt;7mmol/l</i></b>	<b>0,015</b>	<b>0,0001</b>	0,260
medianer pO <sub>2</sub> vor Therapie <b><i>&gt;15mmHg vs.&lt;15mmHg</i></b>	0,598	0,281	0,189
medianer pO <sub>2</sub> nach 19,8 Gy <b><i>&gt;15mmHg vs.&lt;15mmHg</i></b>	0,377	<b>0,042</b>	0,768
Stadium n.FIGO	<b>0,037</b>	<b>0,003</b>	0,626
<b>Gesamtmodell</b>	<b>0,037</b>	<b>0,001</b>	0,479

Tabelle 41: Signifikanzen der logistische Regression unter Einbeziehung der hypoxischen Fraktion HF5 als Oxygenierungsparameter  
***kursiv***: günstiger Prognoseparameter

Parameter	Gesamt- überleben	Lokaler Tumorprogreß	Fern- metastasen
prätherapeut. Hämoglobin <b><i>&gt;7mmol/l</i></b> vs. <7mmol/l	<b>0,005</b>	0,127	0,462
Hämoglobin 19,8Gy <b><i>&gt;7mmol/l</i></b> vs. <7mmol/l	<b>0,015</b>	<b>0,0001</b>	0,260
prätherapeut. HF5 <b><i>HF5 =0</i></b> vs. HF5 >0	0,640	0,868	0,754
HF5 nach 19,8Gy <b><i>HF5 =0</i></b> vs. HF5 >0	<b>0,075</b>	<b>0,076</b>	0,886
Stadium n.FIGO	<b>0,037</b>	<b>0,003</b>	0,626
<b>Gesamtmodell</b>	<b>0,018</b>	<b>0,002</b>	0,726

Als wichtigster Prognoseparameter bei fortgeschrittenen Zervixkarzinomen im vorliegenden Modell unter Einbeziehung des Stadiums, der Hämoglobinkonzentration vor Therapiebeginn und nach 19,8Gy sowie der Oxygenierungsparameter vor Therapie und nach 19,8Gy erwies sich die Hämoglobinkonzentration sowohl in den prätherapeutischen Untersuchungen als auch in besonderem Maße die Hämoglobinabhängigkeit nach 19,8Gy. Anämische Patientinnen mit primär bestrahlten Zervixkarzinomen hatten sowohl im Gesamtüberleben als auch im lokalen Therapieansprechen signifikant schlechtere Ergebnisse als nichtanämische Patientinnen. Von allen untersuchten Parametern kam in diesem Modell der Hämoglobinkonzentration bei 19,8Gy die höchstsignifikante prognostische Bedeutung für das lokale Tumorgeschehen zu.

Die prätherapeutische Tumoroxygenierung war im vorliegenden Modell bei Zervixkarzinomen unter Berücksichtigung unseres Therapiekonzeptes nicht prognoserelevant. Auch die prätherapeutisch gemessene Tumorphoxie, repräsentiert durch die hypoxische Fraktion  $<5\text{mmHg}$ , hatte weder für das Gesamtüberleben noch für das lokale Ansprechen auf die Strahlentherapie einen signifikanten Effekt. Von signifikantem Einfluß, insbesondere für das lokale Tumorgeschehen, erwies sich aber die Tumoroxygenierung im Verlauf der Strahlentherapie, d.h. nach 19,8Gy. Hier konnte in den univariaten Analysen eine Korrelation zum Hämoglobin bewiesen werden.

Unabhängig von allen Parametern hat sich ein hohes Tumorstadium, d.h. das Stadium IVA, als ungünstiger Prognosefaktor bewiesen.

Keinerlei Einfluß konnte in Bezug auf die Fernmetastasierung gefunden werden. Die Behauptung, daß hypoxische Karzinome an sich bösartiger sind, kann durch die vorliegende Untersuchung nicht gestützt werden.

Unser Ergebnis unterstreicht die Bedeutung des Sauerstoffs als strahlensensibilisierender Substanz. Klinische Schlußfolgerung muß sein, im Verlauf einer Strahlentherapie den hämatologischen Parametern größere Bedeutung zu widmen als bisher und eine Anämie im Behandlungsverlauf adäquat zu behandeln.

## 4. Diskussion

### 4.1. Klinische Therapieergebnisse

Das in der Behandlung der Patientinnen mit inoperablen Zervixkarzinomen angewandte strahlentherapeutische Konzept beruht auf den klinischen Ergebnissen der zwischen 1974 und 1978 in Halle untersuchten Dosis- und Fraktionierungsschemata in der Kombinationsbehandlung mit Hochvoltbestrahlung und High-dose-rate-Afterloading (57). Im Therapieregime mit einer Hochvoltbestrahlung von 45 Gy im Punkt B und 7Gy Einzeldosis HDR-AL im Punkt A hatte von je her die Kontakttherapie einen hohen Anteil an der Gesamtdosis, so daß der internationale Trend zur Erhöhung des Anteils der Kontakttherapiedosis (99) keine Veränderung des Therapiekonzeptes in unserer Klinik in den letzten Jahren erforderlich machte.

Eine - sich möglicherweise auch im Therapieergebnis auswirkende - Veränderung wurde allerdings vorgenommen: der zeitliche Ablauf im Einsatz der Kontakttherapie wurde modifiziert. Während im ursprünglichen Therapiekonzept mit Beginn der Strahlentherapie eine Brachytherapie-Applikation pro Woche erfolgte, wurde für die vorliegende Untersuchung der Beginn der Brachytherapie auf die 2. Hälfte der Hochvolttherapie, d.h. nach 11 Fraktionen, verlegt. Die Überlegung war, für die Messungen des Sauerstoffpartialdruckes unter der Behandlung eine identische Dosisverteilung im Tumor zu erhalten, die in ihrer Homogenität nur durch eine Hochvolttherapie erreicht werden konnte. Damit bestanden für alle untersuchten Patientinnen gleiche Bedingungen. Zur Einhaltung der Gesamtbehandlungszeit machte es sich erforderlich, in der letzten Therapiewoche 2 Kontakteinlagen zu applizieren. Damit konnte bei ungestörtem Ablauf die Therapiezeit auf 30 Behandlungstage, d.h. 6 Wochen begrenzt werden. Dieser Idealfall ist durch Geräteausfälle oder Feiertage nicht immer zu realisieren gewesen, eine Gesamtbehandlungsdauer von 7 Wochen wurde aber in keinem Fall überschritten. Aus der zeitlichen Umstellung des Therapieablaufes ergab sich keine Änderung der Gesamtdosen im Therapiekonzept. Die Modifikation des Behandlungsablaufes ist möglicherweise auch ein Grund für die relativ günstigen Überlebensdaten, die ausgewiesen werden können. Eine Zusammenfassung der publizierten Ergebnisse unter Anwendung des HDR-Afterloading-Verfahrens ist in der Tabelle 41 dargestellt.

Es werden nach unserem Konzept in der letzten Behandlungswoche fast 20 Gy (3 Fraktionen Hochvolt und 2 Fraktionen Kontakttherapie) appliziert. Die Verlagerung der HDR-Kontakttherapie in den letzten Teil des Therapiezeitraumes wird von verschiedenen Autoren (146) diskutiert. In amerikanischen Arbeiten (146,147) ergab sich für das Stadium IIIB mit 58% Überleben für Low-Dose-Rate-Verfahren vs. 33% für HDR ein bessere Ergebnis für das LDR-Verfahren. Die Diskrepanzen in den Therapieergebnissen zwischen dem Low-dose-Verfahren und dem High-dose-Verfahren für das Stadium IIIB sind

möglicherweise darauf zurückzuführen, daß die Low-dose-Applikationen in der Regel am Ende der Behandlung durchgeführt wurden. Zu diesem Zeitpunkt ist eine Tumorrückbildung erreicht, und es wird mit der Kontakttherapie in einem relativ kleinen Volumen eine hohe Dosis im Primärtumor eingestrahlt. Auch für das HDR-Verfahren wird aus dieser Überlegung heraus eine Verlagerung der Applikationen in den zweiten Behandlungsteil gefordert.

Die von uns eingesetzten Einzeldosen der Hochvolttherapie von 1,8 Gy entsprechen den in der Hochvolttherapie üblichen Standarddosen. Die Gesamtdosis von 45 Gy an der Beckenwand (entspricht Punkt B, der in der 95%-Isodose liegt) erscheint verhältnismäßig niedrig. Es ist aber zu beachten, daß bei 7Gy ED HDR-AL im Punkt A ca. 1,5 Gy (in Abhängigkeit von der Sondenlänge und Wichtung zwischen 1,40 Gy und 1,55 Gy) im Punkt B addiert werden müssen, so daß bei 5 Fraktionen HDR-AL 52-53 Gy an der Beckenwand, d.h. im Bereich der Lymphabflußwege erreicht werden, eine Dosis, die bei Plattenepithelkarzinomen im üblichen Bereich liegt.

Für die Beschreibung der Kontakttherapie-Dosis wurde der Punkt A benutzt, obwohl er nur eine punktförmige Dosis angibt und keinen auf Tumor, sondern einen auf den Applikator bezogenen Referenzpunkt beschreibt. Trotz aller Unzulänglichkeiten in der Dosispezifikation hat sich der Punkt A in der Literatur (153,154) als Bezugspunkt bewährt. Unsere gewählte Gesamtdosis von ca. 68 Gy im Punkt A ist im internationalen Vergleich im unteren Dosisbereich (147) angesiedelt. Unsere 3-Jahresergebnisse von 72% für das Stadium IIB und 59% für das Stadium IIIB sind in der Literaturübersicht durchaus vergleichbar, für das Stadium IIIB sogar relativ günstig. Die Ergebnisse im Stadium IVA sind auch im internationalen Vergleich immer sehr schlecht, eine der Ursachen ist wahrscheinlich der Verzicht auf den Einsatz der Kontakttherapie zur Vermeidung therapiebedingter Fisteln (22, 66,114). Es ist zu diskutieren, ob nicht die Anwendung einer Kontakttherapie oder eine adäquate kleinräumige Dosisaufsättigung auch beim Vorliegen eines Stadiums IVA zu einer Verbesserung der Therapieresultate führen könnte.

Da unsere Therapieergebnisse im internationalen Maßstab vergleichbar sind, gehen wir davon aus, daß auch die Analysen zur prognostischen Relevanz der hier untersuchten tumorbiologischen Prognoseparameter allgemeine Gültigkeit haben.

Tabelle 42: Zusammenstellung über veröffentlichte Behandlungsergebnisse in der primären Strahlentherapie unter Anwendung einer kombinierten Hochvolttherapie und HDR-AL- Kontakttherapietechnik

Autor	Jahr	Pat. N	HV-PA (Gy)	AL-PA (Gy)	3-JÜLZ	5-JÜLZ
Rotte et al. (161)	1985					I: 82% IIB:65% IIIB: 38%
Glaser et al. (57)	1985	500	45	5x7		51,45% IIB: 53,1% IIIB:42,2%
Sarkaria* et al. (166)	1994	40	30-60	20-40	77%	
Chatani et al. (25)	1994	200	28-40	22-45		IIB:84% IIIB:54% IVA:20%
Pechoux et al. (145)	1995	54 76	45 45	4x5 6x6		52% 72%
Busch et al. (22)	1998	73 9 6	36	4x7,5		56% IIB: 60% IIIB:50%
Petereit et al. (146)	1999	64 50	40-50	5x6	IIB:65% IIIB:33%	
Pötter et al. (154)	2000	189	48-50 50	5-6x7 3-4x7	69% IIB:78% IIIB:58% IVA:53%	
Petereit et al. Literatur-Übersicht (147)	1999	5.619	40	4x7		IB:85% IIB:68% IIIB:47%
Reinertz et al. (157)	2000	103	33 44 18			IIB: 52% IIIB:39,5% IV: 26%
Lorvidhaya et al. (114)	2000	2.063	46	6x6		IB: 85% IIB: 59% IIIB: 32% IVA: 7,8%
Kucera et al. (104)	2001	189	46	3-6	IIB:78,9 IIIB:53,8%	
Hänsgen	2001	87 19 59 9	45	5x7	57% IIB:72% IIIB:60% IVA:22%	

\*20 Pat. im Stadium IB/IIA

## 4.2. Bedeutung der Tumoroxygenierung als Prognosefaktor

Bereits in den ersten klinischen Arbeiten von Höckel et al. (73,74) wurde die unterschiedliche Verteilung der Sauerstoffversorgung in Zervixkarzinomen im Vergleich zu normalen Zervixbefunden beschrieben. In diesen Arbeiten wurde auch erstmals der höhere Anteil an niedrigen Sauerstoffpartialdrücken (Hypoxie) in Tumoren im Vergleich zur normalen Zervix uteri nachgewiesen.

In vorausgegangenen Sauerstoffmessungen in Tiermodellen sowie in humanen Zervix- und Mammakarzinomen war die Inhomogenität der Sauerstoffverteilung im Tumor im Vergleich zum entsprechenden Normalgewebe verifiziert worden (88). Auf die Variabilität der Verteilung des Sauerstoffpartialdruckes sowohl innerhalb eines Tumors als auch zwischen Patientinnen mit gleichen Tumoren verwies Brizel et al. (18-20) in seinen Messungen an Zervixkarzinomen, Kopf-Halstumoren und Weichteilsarkomen, Lyng et al. (117) und SundfØr et al. (186) an Zervixkarzinomen.

In unseren vor Strahlentherapiebeginn erhobenen Meßergebnissen zum intratumoralen Sauerstoffpartialdruck konnte neben einer ausgeprägten intratumoralen Heterogenität keine Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdruckes zum Tumorstadium und damit zur TumorgroÙe gefunden werden. Große Karzinome hatten nicht automatisch auf Grund ihrer Ausdehnung eine schlechtere Sauerstoffversorgung und einen höheren Anteil an hypoxischen Meßwerten als kleinere Karzinome. Wir konnten auch innerhalb des gleichen Tumorstadiums eine ausgesprochen große intertumorale Inhomogenität feststellen, so wie es am Beispiel von 2 Karzinomen im klinischen Stadium IIIB demonstriert wurde. Die Palette der intertumoralen Heterogenität reicht vom ausgesprochen hypoxischen Karzinom bis zum gut oxygenierten Tumor.

Die von Vaupel et al. (201) im Tiermodell gefundene Beziehung zwischen TumorgroÙe und Oxygenierung wurde von Höckel in seinen Messungen in Zervixkarzinomen mit einem Trend zum hypoxischeren Karzinom in höheren Stadien (73) zunächst bestätigt, eine Aussage, die allerdings in späteren Veröffentlichungen der Mainzer Arbeitsgruppe nicht mehr aufrecht erhalten wurde (202, 204).

Aus der gleichen Arbeitsgruppe datieren die ersten Untersuchungen zur klinischen Bedeutung der Tumorphypoxie auf das therapeutische Resultat sowohl bei primär strahlentherapierten als auch operierten Patientinnen (73-78). In diesen Veröffentlichungen fand sich bei 103 Patientinnen ein medianer Sauerstoffpartialdruck von 10mmHg, der für die Betrachtung der klinischen Resultate als Trennwert benutzt wurde. Die Definition eines hypoxischen Karzinoms als eines Karzinoms mit einem medianen Sauerstoffpartialdruck <10mmHg resultiert aus diesen

Werten. Diese Definition ist in den Folgejahren von einer Reihe von Autoren übernommen worden (29,98,106, 187,188).

Zervixkarzinome im höheren Stadium als IB waren in den Höckel'schen Ergebnissen im Vergleich hypoxischer als Tumore im Stadium IB. Diesen Aspekt konnten wir nicht nachuntersuchen, da uns Patientinnen im Stadium IB für Messungen nicht zur Verfügung standen. Höckel fand bei hypoxischen operierten Karzinomen einen Trend zur höheren biologischen Aggressivität, eine signifikant höhere Rate an Lymphgefäßinvasion, höhere Anteile an parametraner Ausbreitung sowie mehr Lymphknotenmetastasen. Seine Schlußfolgerung war, daß hypoxische Karzinome in einem höheren Maße maligne sind und einer extensiven operativen Behandlung bedürfen. Ob allerdings wirklich die Hypoxie die Ursache für einen maligneren Phänotyp darstellt oder ob nicht die Hypoxie die Folge eines besonders aggressiv wachsenden Karzinoms mit der Folge der unzureichenden Sauerstoffversorgung im Tumor ist, kann allein mit der Methode der Eppendorf-Histographie nicht bewiesen werden. In der Arbeit von Höckel hatten die Patientinnen mit einem hypoxischen Tumor nach primärer Strahlentherapie ein schlechteres Überleben als diejenigen Patientinnen mit einem besser oxygenierten Karzinom ( $>10\text{mmHg}$ ). Dieser Unterschied bestand sowohl für das Gesamtüberleben als auch für das tumorspezifische Überleben. Für operierte Patientinnen ergab sich auch ein Unterschied, jedoch war das Therapieergebnis für hypoxische, operierte Patientinnen bei Höckel schlechter als für hypoxische primär strahlentherapierte Patientinnen. Es läßt sich daraus die Vermutung ableiten, daß die Sauerstoffversorgung im Tumor für das Ergebnis der Strahlentherapie eine besonders hohe Bedeutung besitzt, daß aber nicht jedes primär hypoxische Karzinom ein Therapieversagen voraussagt. Ein weiterer Schluß aus den ungünstigeren Überlebensdaten der hypoxischen operierten Patientinnen ist aus unserer Sicht nicht die extensive operative Behandlung. Die Schlußfolgerung muß sein, daß in diesen Fällen einer Strahlentherapie, ggf. in Kombination mit einer Chemotherapie, gegenüber einer operativen Behandlung der Vorzug zu geben ist.

Die Daten von Höckel wurden von anderen Arbeitsgruppen für Zervixkarzinome bestätigt. In der folgenden Tabelle sind die Daten für prätherapeutische Messungen bei Zervixkarzinomen als Prognoseparameter zusammengefaßt. Es fand sich in allen Mitteilungen ein signifikanter Vorteil für die besser oxygenierten Karzinome bezüglich des tumorspezifischen Überlebens.

Tabelle 43 : Literaturangaben zur Bedeutung des prätherapeutischen Sauerstoffpartialdruckes beim Zervixkarzinom als Prognosefaktor. (RT Radiotherapie, OP Operation, RchTh Radiochemotherapie)

Autor	Jahr	Pat. Zahl	Therapie	Bezugspunkt	Prognosefaktor für krankheitsfreies Überleben	p
Höckel et al. (76)	1996	89	RT, OP, RChTH	10mmHg	besser oxygenierte Karzinome	0,0039
Fyles et al. (52)	1998	74	RT	HF5 pO <sub>2</sub> -Median	besser oxygenierte Karzinome	0,02 0,02
Knocke et al. (98)	1999	51	RT	HF5 pO <sub>2</sub> -Median von 10mmHg	besser oxygenierte Karzinome	0,02
Sundfør et al. (185)	2000	40	RT	HF5	besser oxygenierte Karzinome	0,03

Auch für andere Tumorentitäten wurde der prätherapeutische Sauerstoffpartialdruck als Prognoseparameter bestätigt. Von Nordmark et al. (139,140) liegen Daten zu Kopf-Halstumoren vor, die ein besseres klinisches Ergebnis mit einer signifikant höheren lokalen Kontrollrate für die weniger hypoxischen Karzinome ergeben. Bezugspunkt war in diesen Untersuchungen die hypoxische Fraktion <2,5mmHg. Bestätigt wurde die Bedeutung des hypoxischen Tumoranteils ebenfalls von Becker et al. (11) und Stadler et al. (181) für HNO-Tumore. Auf den relativ höheren Anteil an Fernmetastasen bei hypoxischen Weichteilsarkomen verweisen Brizel et al. (18). Rofstad et al. (159) fanden bei 32 Zervixkarzinomen in hypoxischen Tumoren eine höhere Metastasierungsfrequenz. Für das klinische Resultat, insbesondere für das lokale Therapieansprechen, aber auch für das Gesamtüberleben war nur die hypoxische Fraktion <5mmHg signifikant von Bedeutung. Der Nachweis von Metastasen hatte keinen Einfluß auf das Überleben. Die Schlußfolgerung war, daß die hypoxie-induzierte Radioresistenz für das Behandlungsergebnis der wichtigste Faktor war.

Zusammengefaßt ist festzustellen, daß in den publizierten Untersuchungen zur prätherapeutischen Tumoroxygenierung die Hypoxie bei primär operierten, aber in entscheidendem Maße bei primär strahlentherapierten Patienten, einen signifikanten Prognosefaktor darstellt.

Die Analyse der Sauerstoffversorgung in Abhängigkeit vom Tumorstadium ergab in unseren prätherapeutischen Untersuchungen keine Unterschiede, weder in Bezug zum medianen  $pO_2$  noch zu den Hypoxie-Parametern  $<2,5\text{mmHg}$  und  $<5\text{mmHg}$ .

Unsere Resultate stehen im Gegensatz zu allen publizierten Untersuchungen zu prätherapeutischen  $pO_2$ -Messungen als Prognosefaktor. Es hat sich in der univariaten Analyse die Bedeutung des prätherapeutisch gemessenen Sauerstoffpartialdruckes als Prognoseparameter nicht bestätigt, zumindestens nicht in der Eindeutigkeit wie in den anderen Arbeitsgruppen. Für das Stadium IIB ergab sich mit 70% vs. 74% 3-Jahresüberleben in Abhängigkeit vom  $pO_2$ -Median kein Unterschied. Im Stadium IIIB betrug der Überlebensvorteil für die besser oxygenierten Karzinome zwar 20%, war aber nicht statistisch signifikant. Von den 9 Patientinnen im Stadium IVA leben nur noch die 4 Patientinnen mit dem besser oxygenierten Karzinom, aber auch hier resultierte statistisch nur ein Trend.

In der mehrfaktoriellen Analyse unter Einschluß des Tumorstadiums ergab sich für alle 87 Patientinnen ein relatives Risiko, am Karzinom zu versterben, mit einem Faktor von  $RR=2$ , wenn es sich um ein hypoxisches Karzinom handelte. Für ein hohes Tumorstadium (Stadium IVA) errechnete sich allerdings ein höheres Risiko mit  $RR=2,8$ , so daß ein hohes Tumorstadium als Prognosefaktor eine höhere Bedeutung als der prätherapeutische mediane  $pO_2$  besitzt.

Für den Wert von  $10\text{mmHg}$  als Cut-off entsprechend der Vaupel/Höckelschen Definition für die Grenze zur Hypoxie (76) sind die Überlebensdaten mit den Resultaten unter Anwendung unseres Median-Wertes vergleichbar.

Die Betrachtung der  $pO_2$ - Meßwerte  $<2,5\text{mmHg}$  und  $<5\text{mmHg}$  als Prognoseparameter für das tumorspezifische Überleben ergab weder in der univariaten noch in der mehrfaktoriellen Analyse unter Einschluß des Tumorstadiums einen signifikanten Vorteil für die weniger hypoxischen Karzinome. Damit kann die Bedeutung der prätherapeutischen Hypoxie als ein signifikanter Prognosefaktor bei unserem Patientinnengut und unter Berücksichtigung unseres Therapiekonzeptes für primär strahlentherapierte Zervixkarzinome nicht bestätigt werden.

Kritikpunkt an den Literaturdaten ist die Definition eines Prognosefaktors- der Tumorphoxie- für ein inhomogen zusammengesetztes Patientenkollektiv mit z.T. kleinen Fallzahlen mit unterschiedlichen Therapiekonzepten. Aus strahlenbiologischem

Verständnis kommt dem Behandlungskonzept, d.h. der Einheitlichkeit des Bestrahlungsablaufes sowohl vom Zielvolumen, der Einzel- und Gesamtdosis, der Einbindung der Kontakttherapie sowie dem Zeitfaktor eine wesentliche Bedeutung zu. Nur wenn annähernd identische Voraussetzungen erfüllt sind (die in klinischen Untersuchungen nie die Reproduzierbarkeit der Messungen in Tierversuchen mit klonogen entstandenen Tumoren haben werden), kann für die untersuchte Patientengruppe und für das entsprechende Therapiekonzept ein Prognosefaktor ermittelt werden.

In unsere Untersuchung wurden nur die Patientinnen einbezogen, die ohne Einschränkung nach einem identischen Therapiekonzept behandelt wurden. Damit bestanden vergleichbare Bedingungen für das gesamte Patientenkollektiv.

Eine Erklärung für die von allen anderen Arbeitsgruppen abweichenden Resultate könnte in unserem Bestrahlungskonzept begründet sein. Nach zwei Wochen Hochvolttherapie erfolgt die erste After-loading-Applikation, in der letzten Woche zur Einhaltung der Gesamtbehandlungszeit werden 2 Kontakttherapie-Einlagen verabreicht. Damit werden Tumore am Ende des Behandlungszyklus mit einer hohen Einzeldosis kleinräumig behandelt. Aus tierexperimentellen Untersuchungen am R1H-Tumor der Ratte unter klinisch vergleichbarer normfraktionierter Bestrahlung bis 60 Gy ist bekannt, daß es nach 45 Gy zu einer signifikanten Zunahme der Hypoxie im Tumor kommt. Ursache dafür ist die Schädigung der Tumorgefäßstruktur (194, 216). Wenn diese Daten auch auf humane Tumore zutreffen, könnten durch die hohe Kontakttherapiedosis möglicherweise die hypoxischen Tumoreareale inaktiviert werden, die nach 45 Gy zu erwarten sind. Diese Interpretation wäre auch eine Erklärung für unsere verhältnismäßig günstigen Therapieergebnisse im Stadium IIIB. Eine Bestätigung dieser These kann nur durch weitere Sauerstoffmessungen im Therapieverlauf erfolgen.

#### **4.3. Bedeutung der Änderung der Sauerstoffversorgung unter Bestrahlung**

In der vorliegenden Untersuchung wurde bei allen Patientinnen eine zweite Sauerstoffmessung im Tumor nach 11 Fraktionen Hochvolttherapie durchgeführt. Auf Grund der hohen intertumoralen Heterogenität zwischen Patientinnen mit vergleichbaren Tumorstadien war eine Poolung aller Meßdaten zweifelhaft, da damit ein Verwischungseffekt zu erwarten gewesen wäre. Aus diesem Grund wurde von vornherein der individuellen Änderung des Sauerstoffpartialdruckes für jede Patientin eine besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Es zeigte sich, daß die Veränderung des Sauerstoffpartialdruckes bereits nach 2 Behandlungswochen ein entscheidender prognostischer Faktor war: Nur die Karzinome, die auch bei 19,8 Gy noch eine

Tumorhypoxie aufwiesen, hatten im Vergleich zu den Karzinomen, die vor oder unter der Bestrahlung ein besser sauerstoffversorgtes Karzinom aufwiesen, eine signifikant schlechtere Prognose. Diese Veränderung betraf sowohl den medianen Sauerstoffpartialdruck im Tumor als auch die hypoxische Fraktion  $<5\text{mmHg}$ . Patientinnen mit einem unter der Bestrahlung persistierend niedrigen medianen  $\text{pO}_2$  hatten im 3-Jahresüberleben mit 38% gegenüber 67 bis 69% für die Patientinnen mit einem vor oder unter der Behandlung gut oxygenierten Karzinom ein signifikant schlechteres Therapieresultat. In der mehrfaktoriellen Analyse unter Einschluß des Tumorstadiums als Kovariate zeigte sich die höchste Überlebenswahrscheinlichkeit für die Patientinnen mit einem anhaltend gut oxygenierten Karzinom, die ungünstigste Überlebenswahrscheinlichkeit bei einem persistierend hypoxischen Karzinom. Für Patientinnen mit einem ansteigenden oder abfallenden Sauerstoffpartialdruck lag die Prognose zwischen beiden Überlebenskurven. Das heißt, daß sich für die Patientinnen mit einem prätherapeutisch hypoxischen Karzinom bei einem  $\text{pO}_2$ -Anstieg nach 2 Wochen die Prognose erheblich verbesserte bzw. umgekehrt ein  $\text{pO}_2$ -Abfall unter der Behandlung die Prognose relativ verschlechterte.

In unserer Untersuchung kam der Tumorhypoxie auch ein entscheidender Einfluß auf die Prognose zu. Unabhängig vom Ausgangswert verliefen die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier für die Patientinnen, die bei 19,8Gy keine hypoxischen Werte  $<5\text{mmHg}$  aufwiesen, fast identisch. Patientinnen mit meßbaren hypoxischen Werten  $<5\text{mmHg}$  bei 19,8Gy hatten, unabhängig vom Ausgangswert, eine signifikant schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zu den Patientinnen ohne hypoxische Meßwerte nach diesem Behandlungszeitraum. Daß die Hypoxie einen entscheidenden Einfluß auf die lokale Radiosensibilität hat, ergab die Analyse des lokalen Therapieansprechens: Patientinnen mit persistierend hypoxischen Karzinomen zeigten mit 39% mehr als doppelt so häufig ein lokales Therapieversagen im Vergleich zu den Patientinnen mit einer anhaltend guten oder zunehmenden Tumoroxygenierung mit nur 14% lokalem Progreß. Patientinnen ohne meßbare hypoxische Fraktion  $<5\text{mmHg}$  an beiden Meßpunkten zeigten nur zu 10% ein lokales Therapieversagen im Vergleich zu 30% bei Tumoren mit einem Karzinom mit Meßwerten  $<5\text{mmHg}$  nach 11 Fraktionen Hochvolttherapie.

Auf die Fernmetastasierungsrate hatte die Hypoxie in unserer Untersuchung keinen statistisch zu belegenden Einfluß. Es muß aber einschränkend bemerkt werden, daß Fernmetastasen in der Regel mindestens 1 Jahr später als ein lokales Rezidiv auftreten. Patientinnen, die am lokalen Progreß versterben, erleben ihre Fernmetastasen möglicherweise nicht.

Verlaufsmessungen zum Sauerstoffpartialdruck unter Strahlentherapie bei Zervixkarzinomen sind in der Literatur nur von 2 Arbeitsgruppen bei einer geringen Patientinnenzahl beschrieben. Cooper et al. (29) kommt in ihrer Untersuchung an 19 Patientinnen mit Zervixkarzinomen zu der Schlußfolgerung, daß sich unter der Bestrahlung am Sauerstoffpartialdruck wenig ändert. 12 Patientinnen zeigten einen  $pO_2$ -Anstieg, in 6 Fällen eine Abnahme und bei 1 Patientin keine Veränderung. In 15 Fällen konnte eine Abnahme der Werte  $<5\text{mmHg}$ , in 4 Fällen ein Anstieg gefunden werden. Allerdings wurden von ihr die Daten aller Messungen vor Bestrahlungsbeginn und nach 40 -45 Gy in Histogrammen gepoolt. Ein klinischer Bezug zur Veränderung des  $pO_2$  unter der Therapie wurde nicht gezogen. Auch in unserer Untersuchung ergab sich keinerlei Unterschied, wenn von allen Patientinnen die Messungen im Mittel bei 0 Gy und 19,8 Gy verglichen wurden. Eine gepoolte Darstellung der  $pO_2$ -Werte ist im klonogen entstandenen Tierversuch erlaubt, im humanen Tumor aber obsolet. Alle beschriebenen inter- und intrahomogenen Heterogenitäten der Sauerstoffversorgung werden damit nivelliert, und die unterschiedlichen Verläufe in der Veränderung der Sauerstoffversorgung können nicht mehr erkannt werden.

Weitere Untersuchungen bei 22 Zervixkarzinomen veröffentlichte Sheridan et al. (173) aus der Arbeitsgruppe von Cooper. In dieser Arbeit wurde der Apoptoseindex aus prätherapeutischen Biopsien in Bezug zur  $pO_2$ -Änderung bestimmt. Es zeigte sich, daß der Apoptoseindex bei den Patientinnen mit einem  $pO_2$ -Anstieg höher war als bei denen ohne Veränderung des  $pO_2$ . Dies wird mit einer besseren Prognose korreliert, obwohl keine Überlebensdaten mitgeteilt werden. Keinen signifikanten Einfluß der Änderung der hypoxischen Fraktion  $<5\text{mmHg}$  auf das Behandlungsergebnis konnte Fyles et al. bei 43 Zervixkarzinomen nachweisen (51). Bei seiner Untersuchung erfolgte die 2. Messung allerdings erst nach Abschluß der Hochvolttherapie nach 50 Gy, einem sehr späten Zeitpunkt. Auf die tierexperimentellen Untersuchungen und dem Nachweis einer signifikanten Zunahme der Hypoxie im Tumor unter klinisch vergleichbarer normfraktionierter Bestrahlung bis 60 Gy wurde hingewiesen. Daß es zur Veränderung der Oxygenierung innerhalb der ersten 2 Bestrahlungswochen kommt, beschreibt Lyng et al. (119) bei 22 Zervixkarzinomen. Tumore mit einem ansteigenden  $pO_2$  zeigten eine höhere Radiosensibilität mit einem Anstieg der Apoptoserate. Der  $pO_2$ -Anstieg unter Strahlentherapie war unabhängig von der Veränderung der Tumorgroße (129,184).

Weitere  $pO_2$ -Verlaufsmessungen liegen nur noch für Kopf-Hals-Karzinome vor. Brizel et al. (19) fand bei 27 Patienten mit einer 2. Messung nach 10-15 Gy keine Veränderung im Sauerstoffpartialdruck. Die Messungen von Jund (86) an 4 HNO-Patienten unter Radiochemotherapie haben eher preliminären Charakter, am Therapieende waren alle 4 Patienten hypoxisch. Einen  $pO_2$ -Anstieg in 9/14 Tumoren im Kopf-Hals-Bereich innerhalb

der ersten 2 Behandlungswochen unter akzelerierter Bestrahlung bei 32 Gy beschrieb Lartigau et al. (106). 5 Patienten erhielten eine Carbogen-Atmung. Allerdings sind auch in dieser Arbeit die Meßdaten gepoolt dargestellt und weisen damit keinen statistischen Unterschied auf. Beziehungen zum klinischen Ergebnis sind nicht beschrieben.

Aus der Literaturanalyse geht hervor, daß bis jetzt keine mit unserer Untersuchung vergleichbare Daten publiziert wurden. Die veröffentlichten  $pO_2$ -Messungen bei Zervixkarzinomen unter der Bestrahlung sind an kleinen Patientinnenzahlen und an ungünstigen Zeitpunkten durchgeführt worden. Unsere Untersuchung an einem einheitlich primär strahlentherapierten Patientinnengut hat gezeigt, daß eben nicht prätherapeutische Ausgangsbefunde prognoserelevant sind, sondern die Veränderungen im Tumor unter der Behandlung ein entscheidendes Kriterium darstellen. Wichtig erscheint auch der Zeitpunkt der 2.Sauerstoffmessung: Nach 2 Behandlungswochen besteht immer noch genügend Spielraum, um die Therapie zu modifizieren. Es sei angemerkt, daß zu Beginn der Untersuchung 1995 eine Chemotherapie beim Zervixkarzinom keine Rolle spielte, heute sollte eine simultane Behandlung mit Cisplatin (133) durchgeführt werden. Alternativ, im hypoxischen Milieu besonders effektiv wirkend, kann Mitomycin C (192) eingesetzt werden. Damit kommt der vorliegenden Untersuchung auch in Hinblick auf eine Therapieoptimierung eine klinische Bedeutung zu.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß eine persistierende Tumorphoxie unter Bestrahlung mit einer ungünstigen lokalen Tumorremission verbunden ist. Sicher hat auch der Ausgangswert der Sauerstoffversorgung im Tumor für die Strahlentherapie einen prognostischen Wert, entscheidender aber ist, daß unter der Bestrahlung der Tumor eine gute Oxygenierung aufweist. Damit spricht alles für die klinische Bedeutung des klassischen Sauerstoffeffektes in der primären Radiotherapie beim Zervixkarzinom. Als Konsequenz kann nur die Schlußfolgerung gezogen werden, daß alles vermieden werden muß, was eine Tumorphoxie begünstigt. Damit muß folgerichtig die Betrachtung des Hämoglobins als Sauerstoffträger und die Analyse der Zusammenhänge zwischen Anämie und Tumoroxygenierung diskutiert werden.

#### **4.4. Bedeutung der Anämie als Prognosefaktor**

Ein hoher Anteil an Tumorpatienten weist eine Anämie auf. Als Ursachen kommen akute und chronische Blutungen, ernährungs- und resorptionsbedingte Anämien oder auch ein Knochenmarkbefall durch den Tumor in Frage. Neben diesen häufigen Ursachen kann eine Anämie bei Tumorpatienten eine spezifische immunologische Ursache über die Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen haben. Charakteristisch für diese tumorassoziierte Anämie ist eine Hemmung der Erythropoietinproduktion und Erythropoietinwirkung durch T-Zell-Aktivierung über die Interleukine IL1, IL6, IL8,

Interferon-gamma und TNF-alpha (13, 50, 85). Durch Substitution von Erythropoietin in relativ hohen Dosen kann eine Anhebung der Hämoglobinkonzentration auch bei Tumorpatienten erreicht werden (39, 49,176,189).

Die Anämie als ungünstiger Prognosefaktor in der Behandlung von Tumorpatienten ist seit langem bekannt. In einer Metaanalyse von 1996 listet Overgaard (143) 29 klinische Studien mit 12.596 Patienten auf, in denen ein Zusammenhang zwischen Anämie und lokoregionaler Kontrolle durch eine Strahlentherapie festgestellt wurde. Dem standen 4 Studien mit 1208 Patienten gegenüber, die keinen Zusammenhang ergaben, sondern sogar einen negativen Einfluß von Bluttransfusionen bei Tumorpatienten auf die Prognose herstellten. Eine Betrachtung einzelner Untersuchungen (6,191,212) zeigte jedoch, daß in diesen Analysen die HNO-Patienten mit niedrigem Ausgangs-Hb und hohem Tumorstadium in besonderem Maße transfusionsbedürftig wurden. Die höhere Rezidivrate bei diesen Patienten lag nicht an den Bluttransfusionen, sondern an den ungünstigen tumorbedingten Prognosefaktoren.

Die Bedeutung der Anämie als ungünstiger Prognosefaktor wurde für Ovarialkarzinome (142), für HNO-Tumore sowohl in der primären Bestrahlung (12,19,31,35, 56,108,152,172) als auch für primär operierte Patienten (116) beschrieben.

Für Zervixkarzinome ist die Bedeutung der Anämie schon seit vielen Jahren bekannt (23, 77, 98, 157,169,172). Leider sind dabei die Grenzwerte sehr unterschiedlich gewählt. Sie reichen von 10g/dl (= 6,25mmol/l) bis zu 12g/dl (=7,5mmol/l), so daß die Behandlungsergebnisse mit unseren Ergebnissen in den Absolutwerten nicht verglichen werden können. Der von uns gewählte Grenzwert von 7mmol/l entspricht dem Grenzwert für eine Anämie nach CTC-Kriterien und liegt zwischen den genannten Werten. Übereinstimmend in allen Untersuchungen ist aber die Aussage, daß die prätherapeutisch bestehende Anämie ein signifikanter Prognosefaktor für das klinische Behandlungsergebnis und insbesondere für das lokale Ansprechen der Tumore ist. Damit stehen auch unsere Ergebnisse der univariaten Analyse voll in Übereinstimmung mit den Literaturdaten. Der Unterschied im 3-Jahresüberleben war mit 64% für nichtanämische Patientinnen gegenüber 31% für anämische Patientinnen hochsignifikant. Die Hämoglobinkonzentration ist in unserer Untersuchung einer der wichtigsten Prognosefaktoren für das lokale Therapieansprechen. Anämische Patientinnen wiesen im Vergleich zu nichtanämischen ein fast doppelt so hohes lokales Therapieversagen auf, Patientinnen mit einer Hämoglobinkonzentration >8mmol/l bei 19,8 Gy zeigten nur in einem Fall ein lokales Therapieversagen. Für die Fernmetastasierung war der Unterschied nur gering. Damit wird auch ein Hinweis auf die Abhängigkeit der lokalen Strahlenwirkung von der Sauerstoffkonzentration gegeben. Vergleichbare Schlußfolgerungen sind bis jetzt nur für HNO-Tumoren beschrieben (31,130): Der

prätherapeutische Hämoglobinwert ist für das lokale Ansprechen von Bedeutung, die Fernmetastasierungsrate war unabhängig vom Hämoglobinwert.

Noch nicht in der Metaanalyse von Overgaard aufgeführt waren die Daten von Logsdon (113) über 1.096 Patientinnen mit primär bestrahlten Zervixkarzinomen im Stadium IIIB sowie die Untersuchung von Grogan (59) an 605 ebenfalls primär radiotherapierten Zervixkarzinomen.

Die Bedeutung dieser beiden Untersuchungen lag nicht nur in der Feststellung des Einflusses der prätherapeutischen Hämoglobinkonzentration, sondern insbesondere im Nachweis, daß die Änderung des Hämoglobin unter der Behandlung eine wichtigere Rolle spielte, als der Ausgangswert. Nach Logsdon (113) betrug das 5-Jahresüberleben für die 441 Patientinnen, deren Hb unter der Bestrahlung auf  $<10\text{g/dl}$  abfiel, 29% vs. 44% 5-Jahresüberleben für die 505 Patientinnen ohne Hb-Abfall, ein hochsignifikanter Unterschied. In der multizentrischen Studie von Grogan (59) konnte nicht nur dieses Resultat bestätigt, sondern auch der Nachweis erbracht werden, daß ein Hb-Anstieg unter der Bestrahlung die Prognose verbessert. Auch diese Untersuchungen sind nicht neu, denn bereits 1989 verwies Girinsky (55) bei 386 Zervixkarzinomen in einer multivariaten Analyse nach, daß die Änderung die Hämoglobinkonzentration unter der Bestrahlung ein entscheidender prognostischer Parameter ist, unabhängig davon, ob es spontan zu einer Besserung kommt oder ob substituiert wird. Patientinnen mit einem Hämoglobinabfall unter  $10\text{g/dl}$  unter der Strahlentherapie hatten eine signifikant schlechtere Prognose. Diese Daten können von uns bestätigt werden. Patientinnen mit einem in den ersten zwei Behandlungswochen unverändert hohen Hb-Wert größer  $7\text{mmol/l}$  hatten die beste Überlebenschance, diejenigen mit einem abfallenden Hb-Wert die schlechteste Prognose. In einer logistischen Regression wurde in einem Modell, daß das Tumorstadium, die Hämoglobinkonzentration vor Bestrahlung und nach 11 Fraktionen und die Oxygenierungsparameter einschloß, als wichtigster Prognosefaktor die Hämoglobinkonzentration bei 19,8 Gy ermittelt.

Aus klinischen Verläufen ist bekannt, daß es auch ohne Substitution bei gut ansprechenden Tumoren zu einer spontanen Erholung des roten Blutbildes kommen kann. Diese Beobachtungen lassen einen Zusammenhang über eine immunologische Wirkung vermuten- mit der Inaktivierung der Tumorzellen entfällt die Ursache für eine immunologische Antwort. Andererseits spricht das bessere lokale Therapieansprechen bei nichtanämischen Patientinnen für die höhere Strahlenwirkung über den Sauerstoffverstärkungsfaktor (162). Vor der Möglichkeit einer Erythropoietin-Substitution wurde sowohl in Tierversuchen ( 71,72) als auch in klinischen Untersuchungen (32,172) durch eine Re-Transfusion nach artefiziell erzeugter Anämie ein höheres lokales Therapieansprechen beobachtet. Die strahlensensibilisierende Wirkung einer höheren

Hämoglobinkonzentration nach Erythropoietin-Substitution konnten Thews et al. (195) in Tierversuchen, Frommhold et al. (49) und Glaser et al. (56) bei Kopf-Hals-Tumoren nachweisen.

Ein Zusammenhang zwischen Hämoglobinkonzentration und Tumoroxygenierung in Form einer einfachen linearen Beziehung war in keiner der publizierten Untersuchungen herzustellen. Im Tierexperiment (92) war der Sauerstoffpartialdruck im Tumor bei anämischen Tieren niedriger als in nichtanämischen Tieren. Eine Angleichung durch Epo konnte nur partiell erreicht werden. Keinerlei Beziehung zwischen Tumor-pO<sub>2</sub> und Hämoglobin fanden Dietz et al. (31) bei HNO-Patienten. Becker et al. (12) hatten bei Oxygenierungsuntersuchungen in Kopf-Hals-Tumoren eine Beziehung zwischen Tumoroxygenierung und Hämoglobin nur für die Patienten mit einer Anämie <10mg/dl (=6,25 mmol/l) beweisen können. Bei einer moderaten Anämie bestand kein Einfluß auf die Tumoroxygenierung. In der vorgelegten Untersuchung konnte prätherapeutisch ein Trend in der Beziehung zwischen Hb-Status und Oxygenierung sowohl in Bezug auf den medianen Tumor-pO<sub>2</sub> als auch auf die hypoxische Tumorfraktion HF5 gefunden werden. Im Gegensatz zur fehlenden Korrelation bei 0 Gy zeigte sich für die hypoxischen Werte HF2,5 und HF5 bei 19,8 Gy eine statistisch zu verifizierende Korrelation. Der Nachweis einer Beziehung zwischen Hämoglobinhöhe und Tumorphoxie bei 19,8 Gy und die Bedeutung beider Parameter für die klinische Prognose führt zu der Schlußfolgerung, daß alles vermieden werden muß, was eine Absenkung der Hämoglobinkonzentration in anämische Bereiche unter der Bestrahlung zur Folge haben könnte. Ein weiterer interessanter Aspekt unserer Ergebnisse betrifft die Hämoglobinkonzentration im nichtanämischen Bereich >8mmol/l: Bis jetzt wird einer Substitution der Hämoglobinwerte >8mmol/l sehr abwartend gegenüber gestanden. Begründung dafür ist - neben den Kosten- auch die Argumentation eines möglichen Wachstumsschubs für den Tumor unter verbesserter Sauerstoffversorgung. Aus unserer Untersuchung läßt sich diese Argument aber durch die Bestimmung der S-Phase entkräften: Anämische Patientinnen hatten einen höheren S-Phasen-Anteil im Vergleich zu nichtanämischen Patientinnen. Die Anämie ist als eine immunologische Reaktion auf ein stark proliferierendes Karzinom zu interpretieren. Ob eine Substitution durch Erythropoietin zu einer Verbesserung der klinischen Resultate über einen Hb-Anstieg führen kann, ist bis jetzt nur durch die Ergebnisse der Arbeit von Glaser et al. (56) belegt, die Ergebnisse größerer Studien zu diesem Problem stehen zur Zeit noch aus.

Als alternative Methode zur Anhebung des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe steht mit der hyperbaren Oxygenierung (32) eine weitere Option zur Verfügung, die allerdings eines hohen technischen Aufwandes bedarf. Ob es dabei zu einer länger anhaltenden Verbesserung des Tumor-pO<sub>2</sub> kommt, zumindest für die Zeit einer Bestrahlung nach

Normalisierung der Druckverhältnisse, ist bis jetzt unklar. Es sei an dieser Stelle auch auf die Bedeutung der Sauerstoffversorgung im Tumor für die Wirkung einer zytostatischen Therapie hingewiesen (192,195,196). Fast alle Zytostatika sind in ihrer Wirkung sauerstoffabhängig.

#### **4.5. Gefäßdichte als Prognosefaktor**

In der vorgelegten Untersuchung konnte gezeigt werden, daß die immunhistologisch ermittelte Gefäßdichte ein signifikanter Prognosefaktor war. Der Vergleich der 3-Jahresüberlebenszeiten zeigt in der univariaten Analyse für die Patientinnen mit einer unter dem Median des jeweiligen Tumorstadiums liegenden Gefäßdichte mit 72% Gesamtüberleben einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber den Patientinnen mit einer höheren Gefäßdichte im Tumor mit 33% Überlebenswahrscheinlichkeit. Für das lokale Tumorsprechen war der Unterschied nicht so eindeutig. An Fernmetastasen verstarben 7 Patientinnen mit gefäßdichten Tumoren gegenüber 3 Patientinnen mit gefäßarmen Tumoren, eine doppelt so hohe Rate.

Ein weiteres, bisher nicht untersuchtes Ergebnis unserer Arbeit war der Zusammenhang zwischen Tumorphoxie und Gefäßdichte. Die Karzinome mit einer unter der Bestrahlung persistierenden Hypoxie wiesen eine hochsignifikant höhere Gefäßdichte auf im Vergleich zu den Patientinnen, bei denen vor oder unter der Bestrahlung der Tumor gut oxygeniert war. Diese Patientinnen hatten auch mit 38% 3-Jahresüberleben für persistierend hypoxische Karzinome im Vergleich zu 68% 3-Jahresüberleben für gut oxygenierte Karzinome eine signifikant schlechtere Prognose. Tumorphoxie und hohe Tumolvaskularisation korrelierten in unserer Untersuchung. Ein Hinweis für den Einfluß der Gewebhypoxie auf die Angiogenese war der Zusammenhang zwischen Hämoglobinkonzentration und Gefäßdichte, der für alle 46 untersuchten Patientinnen zwar nur einen Trend ergab, aber für die Gruppe der persistierend hypoxischen Karzinome eine signifikante Korrelation bot.

Die Bedeutung der Gefäßinduktion für die Mikrozirkulation und damit für Tumorstadium und Metastasierung ist aus klinischen und histo-pathomorphologischen Untersuchungen bekannt (7,41,100). Die Gefäßdichte korrelierte dabei mit der Häufigkeit der HPV-Infektionen (HPV16 und HPV18) (134). Zwischen Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen der Zervix uteri konnte keine Differenz in der Gefäßdichte gefunden werden (26). Ebenfalls besteht (26,69) keine Abhängigkeit der Gefäßdichte von der Tumorgroße bzw. vom Tumorstadium. Es wurde beim Zervixkarzinom ein Zusammenhang zwischen Tumorkapillardichte und tumorbiologischer Aggressivität gefunden. Mit der Zunahme der Gefäßdichte konnte eine Zunahme der lymphangischen Ausbreitung und des Lymphknotenbefalls nachgewiesen werden, Faktoren, die die

klinische Prognose ganz entscheidend beeinflussen (25, 41, 69). Demgegenüber fand eine japanische Arbeitsgruppe (70) keine Beziehung zwischen Gefäßdichte und histopathologischen Prognosefaktoren. Übereinstimmung besteht in den meisten Untersuchungen über die klinischen Bedeutung der Gefäßdichte. Eine hohe Gefäßdichte ist mit einer ungünstigen klinischen Prognose verbunden, unabhängig davon, ob die Patientinnen primär operiert oder bestrahlt werden (16, 28, 81, 167). Die Wahrscheinlichkeit der Tumorzellabsiedlung und damit der Fernmetastasierung ist beim Vorliegen gefäßdichter Tumoren größer, wobei die Lymphgefäßinvasion für Zervixkarzinome eine größere Bedeutung für die Metastasierung haben dürfte als die Blutgefäßinvasion (41, 69).

Keine Aussagen können im histologischen Präparat über die Funktionalität der Tumorgefäße gemacht werden. Als Untersuchungstechniken stehen dafür die Dopplersonographie, die dynamische Magnetresonanztomographie und in letzter Zeit die Laserdoppleruntersuchung zu Verfügung. Auf Grund der limitierten Eindringtiefe sind bis jetzt Untersuchungen zum Laserdopplerverfahren schwierig und nur als Pilotuntersuchung publiziert (41). Die hohe Gefäßdichte in Karzinomen mit einer chaotischen Gefäßstruktur führt zu einer Zunahme des vaskulären Strömungswiderstandes (202). In der Farbdoppler-Sonographie konnte gezeigt werden, daß eine Abnahme des Gefäßwiderstandes im Tumor und eine Zunahme des A.uterina-Blutflusses unter der Bestrahlung bei Zervixkarzinomen mit einer günstigeren Prognose verbunden war (151). Nach einer abgeschlossenen Radiatio mit entsprechender Dosis ist eine signifikante Reduktion des Flows als Folge eines erhöhten Gefäßwiderstandes zu erfassen (41, 68), eine Beobachtung, die in tierexperimentellen Untersuchungen mit dem Nachweis eines sich unter der Radiatio entwickelnden Gefäßschadens nach 40 Gy zu erklären ist (194, 216, 217).

Als weiteres nichtinvasives Verfahren zur Untersuchung der Mikrozirkulation von Tumorgefäßen wurden Untersuchungen mittels dynamischen MRT publiziert. Hawighorst et al. (69) konnten keine Korrelation zwischen Kapillardichte und den pharmakokinetischen Parametern herstellen, ein Hinweis für das unterschiedliche Perfusionsverhalten in einzelnen Tumorregionen. Eine Beziehung zwischen dem Ansprechen auf Strahlentherapie und dem Perfusionsverhalten wies Mayr et al. (126) in Zervixkarzinomen nach. Mit der Abnahme der pathologischen unreifen Gefäße im Tumor unter Strahlentherapie kam es zum Anstieg der Perfusion bei den Tumoren, die strahlensensibel waren. Keine Perfusionsveränderung war ein Hinweis für eine ungünstige Prognose. Die Veränderungen der Tumorperfusion in den ersten zwei Wochen der Strahlentherapie (120) sind dabei prognoseentscheidend, ein Ergebnis, das durchaus mit unseren Oxygenierungsmessungen korreliert.

Ursachen der Neovaskularisation im Tumor ist die Potenz sowohl der Tumorzellen als auch des umgebenden Normalgewebes, Tumor-Angiogenesefaktoren zu produzieren. Ein wichtiger Faktor in der Neovaskularisation ist HIF-1-alpha (Hypoxie-induzierter Faktor), der in menschlichen Tumoren überexprimiert ist (148,174) und zu einer Induktion und Überexpression von VEGF führt. Bereits in Präkanzerosen ist eine Zunahme der VEGF-Expression und der Gefäßdichte nachweisbar (33,134,179,180). Inwieweit eine pathologische Gefäßstruktur mit der Folge einer regionalen Tumorperfusionsstörung und der daraus resultierenden Hypoxie wiederum eine Neovaskularisation induziert und damit einen Circulus vitiosus provoziert, ist eine Vermutung und kann aus der vorgelegten Untersuchung nicht belegt werden. Es ist zur Zeit ebenfalls Spekulation, ob durch eine moderate Antiangiogenese-Therapie mit dem Ziel der Obliteration kleiner, unreifer Tumorgefäße durch Reduktion des Steel-Effektes eine Blutflußverbesserung im Tumor erreicht werden kann. Die Entwicklung antiangiogenetischer Substanzen und deren klinische Erprobung ist aber in den nächsten Jahren zu erwarten.

#### **4.6. Klinische Bedeutung der VEGF-Bestimmung**

Zervixkarzinome gehören zu den relativ gefäßreichen Tumoren. Unter dem Aspekt der VEGF-Synthese sowohl in Endothelzellen (63) als auch in Tumorzellen wurde eine besonders gute Korrelation von freiem VEGF zum Tumorstadium erwartet (64). Der Vergleich der VEGF-Mittelwerte im Serum vor Therapiebeginn ergab in unserer Untersuchung eine sehr hohe Streubreite innerhalb des gleichen Tumorstadiums und keinen statistisch relevanten Unterschied zwischen den einzelnen Tumorstadien, allenfalls einen Trend zum höheren VEGF-Wert bei zunehmender Tumorgroße.

Ein signifikanter Unterschied bezüglich der VEGF-Höhe im Serum konnte aber - unabhängig vom Tumorstadium- ermittelt werden: Patientinnen mit einer klinischen Komplettremission hatten im Vergleich zur Gruppe der Nonresponder eine mit  $p < 0,005$  hochsignifikant niedrigere Konzentration von freiem VEGF im Serum. Ähnliche Resultate erhielt auch Pillai (149) in seiner Untersuchung zum klinischen Verlauf bei Zervixkarzinomen, er findet einen signifikanten Unterschied von  $p < 0,05$  in den VEGF-Werten für die unterschiedlichen Verlaufgruppen.

Die VEGF-Expression steigt im Verlauf der Malignisierung der Portioveränderungen ganz entscheidend mit der Invasivität der Gewebeveränderungen an. Dobbs et al. (33) und Smith-McCune(179) konnten in immunhistochemischen Untersuchungen von Veränderungen der Zervix uteri im Stadium CIN I – CIN III und in minimalinvasiven bis invasiven Karzinomen eine Zunahme der VEGF-Expression feststellen. Die Zunahme der Gefäßdichte korrelierte hochsignifikant mit der VEGF-Expression im histologischen Präparat (15,34). Nach Bremer et al.(16) sind nur die Gefäßdichte und der lymphangische

Tumornachweis statistisch entscheidende Prognosekriterien für das Überleben.

Normalwerte von VEGF bei gesunden Kontrollpersonen werden von Yamamoto et al. (214) mit  $227,5 \pm 77$  pg/ml angegeben, wobei kein Unterschied zwischen Männern und Frauen oder den Altersgruppen gefunden wurde. Sehr große Unterschiede in der VEGF-Konzentration ergaben sich bei den verschiedensten Tumoren, wobei sich ein stadienbezogener signifikanter Unterschied nur bei Mammakarzinomen beweisen ließ. Von Bedeutung ist der Nachweis der höheren VEGF-Werte bei invasiven und metastasierenden Mammakarzinomen. Nach Untersuchungen von Linderholm et al. (111) war VEGF, bezogen auf den DNA-Gehalt, bei nodal-negativen Mammakarzinomen ein hochsignifikant besserer Prognosefaktor als der Östrogenstatus. Auch bei Linderholm war die VEGF-Höhe bei Mammakarzinomen zwischen Stadium I und II signifikant unterschiedlich. Ein „Cut-point“ für VEGF kann aber nicht angegeben werden. Ebenfalls konnte eine Beziehung zwischen hoher VEGF-Expression und ungünstigem klinischen Resultat für Colonkarzinome (42,105) und für Magenkarzinome (8) hergestellt werden.

In unserer Untersuchung konnte ein Wert von 600-650 pg/ml VEGF im Serum als Grenzwert für eine ungünstige Prognose ermittelt werden. Die Angabe dieses VEGF-Wertes als Grenzwert ist aber mit großer Zurückhaltung zu betrachten. Einen neuen Aspekt in der Diskussion über die Wertigkeit von VEGF im Serum als Marker für die Angiogenese ist mit der Veröffentlichung der Untersuchungen von Banks et al. (10), Maloney et al. (122), Salven et al. (164), Verheul et al. (205), Wartiovaara et al. (208) und Webb et al. (209) zur Rolle der Thrombozyten in der Beurteilung von Serum-VEGF aufgetreten. Die Autoren weisen unabhängig voneinander nach, daß im Serum auch Thrombozyten-VEGF bestimmt wird.

Neben den bisher bekannten Syntheseorten für VEGF ist immunhistochemisch eine VEGF-Synthese in Megakaryozyten nachzuweisen. Thrombozyten werden als „Vehikel“ für die VEGF-Moleküle benutzt und geben diese bei der Aggregation in kürzester Zeit frei. Der Nachweis ist in vivo durch die Zugabe verschiedener, eine Thrombozytenaggregation auslösender Substanzen (ADP und - mit dem größten Effekt - Thrombin) zu Plasma zu reproduzieren. Auch konnte eine signifikante Reduktion von Serum-VEGF durch Abciximab (ReoPro®), einem vorwiegend in der Kardiologie verwendeten Antikörper gegen GIIb/IIIa-Rezeptoren von Thrombozyten, erreicht werden.

Der Nachweis der Freisetzung von VEGF durch die Thrombozytenaggregation erklärt auch den Anstieg von VEGF in der Wundheilung (160), nach Operationen (215) und nach Polytraumata (60). Hier ist die physiologische Funktion von VEGF, der mitogenen Wirkung auf Endothelzellen, Veränderung der Gefäßwandpermeabilität, Neovaskularisation etc. im Prozeß der Reparatur zu verstehen. In Blutpräparaten ist ebenfalls freies VEGF nachzuweisen (138).

In der vorliegenden Arbeit läßt sich die Korrelation des Serum-VEGF zur Thrombozytenzahl mit einer Signifikanz von  $p < 0,01$  bestätigen. Hohe Thrombozytenwerte haben einen hohen VEGF-Spiegel im Serum zur Folge. Damit kann die Schlußfolgerung, daß Serum-VEGF ein quantitativer Prognosemarker für Karzinompatienten ist, nicht mehr aufrecht erhalten werden (62, 84, 164).

Unklar ist die Rolle der Thrombozytose bei Tumorpatienten. Wir konnten einen signifikanten Zusammenhang von Thrombozytenzahlen für die Patientinnen mit einer Komplettremission im Vergleich zu progredienten Verläufen nachweisen.

Es ist bekannt, daß Tumorpatienten eine höhere Thrombozytenzahl haben und eine höhere Thromboseneigung als gesunde Patientinnen aufweisen. Inwieweit durch Mikrothrombosen und Mikroembolien in pathologischen Tumorgefäßen eine an dieser Stelle eher fatale VEGF-Freisetzung gefördert wird, ist nur Spekulation. Der Zusammenhang zwischen der ungünstigen Prognose beim Vorliegen einer Thrombozytose und der VEGF-Freisetzung durch die Thrombozytenaktivierung läßt die Vermutung zu, daß die Thrombozyten für Tumorpatienten möglicherweise eine größere Bedeutung haben, als bis jetzt angenommen wurde. Der Zusammenhang zwischen der Expression von proinflammatorischen Zytokinen (Interleukin 6) und der Stimulation der Thrombopoese ist seit kurzem bekannt (163). Möglicherweise spielen die gleichen Zytokine, die auch für die tumorspezifische Anämie verantwortlich sind, in diesem pathologischen Regulationsmechanismus eine Rolle. Hypoxie stimuliert die VEGF-Produktion sowohl im Tumorgewebe als auch in Normalgeweben (128, 165). In Tierversuchen konnte der Einfluß der Gewebhypoxie auf die Expression von VEGF in allen Normalgeweben nachgewiesen werden (125). Experimentell konnte in Zervixkarzinom-Zellen (27) und in Stroma-Fibroblasten von Zervixtumoren unter hypoxischen Bedingungen die VEGF-Expression stimuliert werden (148). Eine Gewebhypoxie kann aber auch durch eine Anämie erzeugt werden. Der Zusammenhang zwischen der VEGF-Höhe im Serum und der Hämoglobinkonzentration (37) konnte in der Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Die Ursache ist sicherlich eine Überlagerung des VEGF im Serum durch das Thrombozyten-VEGF. Wird VEGF aber im Zitrat-Plasma bestimmt (in dem durch die Aufhebung der Gerinnung die Freisetzung des VEGF aus Thrombozyten verhindert wird) ist bei anämischen Patientinnen eine höhere VEGF-Expression nachweisbar als bei nichtanämischen Patientinnen. Möglicherweise ist die Stimulation der VEGF-Expression im Normalgewebe bei einer Anämie ein zusätzlicher Stimulus einer Neovaskularisation und damit eine mögliche Erklärung der negativen Prognose für anämische Patientinnen. Neben der autokrinen Stimulation der Tumorangiogenese über die Expression von VEGF durch Tumorzellen kommt dem VEGF-Protein damit auch eine parakrine Funktion zu.

Die Angiogenese wird durch ein kompliziertes System von Faktoren induziert, in dem die Zytokine ein Netzwerk mit vielen Regulationsmechanismen steuern (109,128). Die Bestimmung *eines* Zytokins aus diesem Netzwerk kann nur ein Hinweis auf eine pathologische Fehlsteuerung bei Tumorpatienten sein und muß im Zusammenhang mit anderen Prognoseparametern gesehen werden.

#### 4.7. DNA-Index und Prognose

Die Bestimmung des DNA-Index (DI) ist mit der Verfügbarkeit der Flußzytometrie in vielen Laboratorien zu einer gut zugänglichen Untersuchungsmethode geworden (9).

In unserer Untersuchung konnte an 66 Patientinnen der DNA-Index aus prätherapeutisch entnommenen Biopsien ermittelt werden. Es fand sich bei unseren Patientinnen kein statistisch signifikanter Unterschied in der Höhe des DNA-Index in Bezug zum Tumorstadium und damit zur Tumorgröße. Die Überlebenswahrscheinlichkeit für die Patientinnen mit einem aneuploiden Karzinom unterschied sich nicht von der von diploiden Karzinomen. Auch eine Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeit, berechnet auf einen DNA-Index von 1,7, (137) konnte keinen Prognoseunterschied nachweisen. Insgesamt hatte der DNA-Index in unserer Untersuchung als unabhängiger klinischer Prognosefaktor keine Relevanz.

Unabhängig davon ist ein hoher DNA-Index ein Hinweis für eine gestörte Zellteilung und ein pathologisches Zellwachstum und weist auf eine Störung der Zellreparatur bzw. Apoptoseinduktion hin und wurde unter diesem Aspekt in die Auswertungen einbezogen (9). Die Differenz im DNA-Index zwischen persistierend hypoxischen Karzinomen und euoxischen Karzinomen war zwar nicht signifikant, jedoch ist die sehr hohe Streubreite für den DNA-Index bei persistierend hypoxischen Karzinomen zumindest ein Hinweis auf eine gestörte Zellreplikation unter hypoxischen Bedingungen.

Zur Bedeutung des DNA-Index und der Ploidie als Prognoseparameter für Strahlen- und Chemotherapie bei hämatologischen und soliden Malignomen gibt es in der Literatur viele Angaben (101,115,121,135, 149,198,199).

Generell sollen diploide Karzinome (DI=1) eine bessere Prognose haben als aneuploide Karzinome (DI>1) (9,131). Für die Bedeutung des DNA-Index als Prognoseparameter bei Zervixkarzinomen zu histopathologischen Kriterien und zur klinischen Prognose sind die Literaturangaben sehr kontrovers. Tumoren im höheren Stadium sollen in höherem Maße eine Aneuploidie aufweisen (137). Diploide Zervixkarzinome waren assoziiert mit einer abnehmenden Strahlenempfindlichkeit und verbunden mit einer geringeren Rate an Komplettremissionen, mehr Lokalrezidiven und schlechteren Überlebensraten (115).

Demgegenüber soll die Prognose nicht von der Differenzierung aneuploider vs. diploider Tumor abhängen, sondern ein DNA-Index >1,5 mit einer signifikant niedrigeren

Radiosensibilität verbunden sein (137). Lutgens et al. (115) fanden bei 98 primär strahlentherapierten Zervixkarzinomen der Stadien IB-IIIB eine höhere Strahlensensibilität bei aneuploiden Tumoren im Vergleich zu diploiden Karzinomen ( $p < 0,05$ ). Keine Korrelation bestand zum Tumorstadium und zum histologischen Befund bei Zervixkarzinomen (101,115, 198). Bei Blasenkarzinomen, Nieren-, Magen-, Prostata- und Endometrium-Karzinomen zeigten aneuploide Tumoren ein schlechteres Ansprechen, bei Zervixkarzinomen war die Ansprechrate unterschiedlich beurteilt (83, 87,101,131).

#### **4.8. Tumorproliferation und Prognose**

Der Grad der Malignität eines Karzinoms wird weitgehend vom Proliferationsverhalten bestimmt. Schnell wachsende Tumore sind bösartiger, sprechen aber möglicherweise besser auf eine Strahlentherapie an. Die Begründung für eine höhere Strahlensensibilität wird mit einem höheren Anteil von Zellen in strahlensensiblen Zellzyklusphasen gegeben (107).

Ein weiterer Grund, Proliferationsbestimmungen in unsere Untersuchung aufzunehmen, war die Energieabhängigkeit. Bei unregelmäßigen chaotischen Wachstumsmustern in Tumoren kommt es zwangsläufig zu Arealen mit vaskulärer Minderversorgung und den sich daraus ergebenden Defiziten in Bezug auf Versorgung mit Sauerstoff und Glukose. Auf die Bedeutung eines funktionierenden Gefäßsystems wurde bereits hingewiesen. Andererseits ist bekannt, daß Tumorzellen nur beschränkt auf den oxydativen Stoffwechsel angewiesen sind und einen Teil der für die Proliferation benötigten Energie auch über anaerobe Glykolyse gewinnen können.

Unser Interesse galt deshalb dem Proliferationsverhalten in Abhängigkeit vom Oxygenierungsstatus der untersuchten Zervixkarzinome und einem möglichen Einfluß bzw. einer Wechselwirkung zur Anämie.

Es konnte aus den prätherapeutischen Biopsien kein Unterschied im S-Phasenanteil und in der Höhe der KI-67-Expression zwischen den Tumorstadien gefunden werden. Allerdings ist die Untersuchung an inoperablen großen Karzinomen erfolgt, so daß hier ein methodischer Fehler liegen könnte. Die These, daß schnell proliferierende Karzinome hypoxischer auf Grund des Mißverhältnisses zwischen Tumoranteil und gefäßführendem Stroma sind, kann allenfalls als Trend sowohl in Bezug zum medianen Sauerstoffpartialdruck als auch zum hypoxischen Tumoranteil bestätigt werden (65). In der immunhistochemischen Untersuchung konnte kein Zusammenhang zwischen KI67-Expression und Tumoroxygenierung gefunden werden.

Für die Metastasierung bzw. den lokalen Tumorresponse fand sich kein eindeutiger Zusammenhang zum Proliferationsverhalten. Es hatte zwar den Anschein, daß Karzinome

mit einem KI-67-Marker >dem Median von 75% eine höhere Fernmetastasenrate hatten, diese aber in der S-Phasenanalyse nicht bestätigt werden konnte.

Ähnliche Ergebnisse veröffentlichte Tsang et al. (198,199), die ebenfalls keine Beziehung zwischen Tumorproliferation und Tumorphypoxie beim Zervixkarzinom fanden. In Weichteilsarkomen konnte der postulierte Zusammenhang zwischen Tumorphypoxie und niedriger Proliferationsrate von Nordmark et al. 1996 (141) ebenfalls nicht nachgewiesen werden, im Gegenteil, die hypoxischsten Sarkome wiesen die höchsten Proliferationsraten auf. Diese Resultate sprechen dafür, daß Malignome nicht auf einen aeroben Stoffwechsel angewiesen sind, und daß die Tumorphypoxie die Folge eines schnell proliferierenden Tumors ist. Eine inverse Korrelation zwischen hypoxischen, pimonidazolmarkierten Zervixkarzinomzellen und KI-67-Expression konnte Kennedy et al. (93) nachweisen.

Interessant ist die Beziehung zwischen S-Phasen-Anteil und Anämie: Anämische Patientinnen zeigten einen höheren S-Phasen-Anteil in den Biopsien als nichtanämische Patientinnen. Die Schlußfolgerung daraus kann aber nicht sein, daß Tumore unter anämischen Bedingungen besser proliferieren. Die tumorassoziierte Anämie kann als Antwort auf ein schnell wachsendes Karzinom betrachtet werden. Es fand sich nur bei Fossa et al. (48) für Myelome bei anämischen Patientinnen ein hoher S-Phasenanteil, vergleichbar zu unseren Resultaten. Für Kopf-Hals-Karzinome, nodalnegative Mammakarzinome (45), Endometrium-Karzinome (87) und Adenokarzinome der Zervix uteri (136) dagegen war der S-Phasenanteil bei nodalnegativen Patientinnen ein signifikanter Risikofaktor für eine Rezidiventstehung (121), für Magenkarzinome (83) ein hoher KI-67-Anteil ein negativer Faktor. Die Literaturdaten weisen für einzelne Malignomarten eine Fülle divergierender Resultate auf. Insgesamt hat sich aus der Analyse der Proliferationsmarker KI-67 und S-Phasenanteil ergeben, daß diese nicht als sinnvolle Prognoseparameter bei primär bestrahlten Zervixkarzinomen verwendet werden können.

#### **4.9. Die klinische Bedeutung der P53-Expression**

Die Wirksamkeit einer Strahlen -oder Chemotherapie hängt davon ab, inwieweit die Tumorzellen durch die Therapie zur Apoptose gebracht werden, d.h. den programmierten Zelltod erleiden. (3) Die Regulation der DNA-Schädigung nach der Einwirkung zytotoxischer Einflüsse (ionisierende Strahlung, Chemotherapie, aber auch der Tumorphypoxie) wird über Tumorsuppressorgene gesteuert, deren bedeutendstes nach dem gegenwärtigen Stand der Erkenntnisse das *P53* ist (17,30,53,103,110).

Wildtyp-*P53* greift in den Zellzyklus ein, reguliert Reparaturvorgänge und veranlaßt die Einleitung der Apoptose. (36). Das kodierte P53-Protein gilt als "Stressprotein", es wird unter dem Einfluß zellschädigender Noxen hochreguliert (17).

Es ist bekannt, dass in verschiedenen Tumoren P53 als mutierte Variante vorliegt. Diese Mutation geht mit dem Verlust der zellzyklusregulierenden Funktion einher. In Zervixkarzinomen wurden nur 0,5-2% mutiertes P53-Protein beobachtet (150,178).

WtP53 hat die Eigenschaft, mit verschiedenen onkogenen Viren eine Komplexbildung einzugehen, es wird damit inaktiviert. Für Zervixkarzinome von Bedeutung ist die Infektion mit den humanen Papillomaviren HPV16, die über das Protein E6 einen Komplex mit wtP53 bilden und einen beschleunigten Abbau (Degradation) von wtP53 bewirken. Unter hypoxischen Bedingungen wird dieser Abbau über eine MDM2-Aktivierung behindert, so daß auch in HPV16-infizierten Zellen eine Überexpression von P53 nachweisbar ist. Die Degradation von wtP53 geht mit einer Einschränkung der Funktion der Zellzyklusregulation und Apoptoseeinleitung durch P53 einher. (96,124,144,177,182,183, 211). Dieser Effekt kann im Tierexperiment mit einem E6-Antikörper rückgängig gemacht werden (2).

In unserer Untersuchung hatten Patientinnen mit wtP53-Tumoren einen deutlichen Überlebensvorteil gegenüber tP53-Karzinomen, wenn auch dieser Unterschied auf Grund der hohen Differenz der Patientinnenzahlen in beiden Gruppen nicht signifikant war. Dagegen fanden Pillai et al. (150) in einer retrospektiven Untersuchung in Indien und Ebara et al. (40) in Japan keinen Einfluss der P53-Expression auf das Überleben bei primär radiotherapierten Zervixkarzinomen. Möglicherweise ist eine Erklärung für diese unterschiedlichen Resultate ein anderes Spektrum an HPV-Virusgruppen im Infektionsverhalten in diesen Ländern. (102) gegenüber der Inzidenz der Infektion mit HPV16/18 im europäischen Raum.

Eine Stadienabhängigkeit und damit ein Bezug zur Tumorgroße war in unserer Untersuchung nicht nachzuweisen. Für kleine Zervixkarzinome fand Hove et al. (81) keine Prognoserelevanz für P53.

Eine Untersuchung zur HPV-Infektion haben wir nicht durchgeführt. Es ist aber gesichert, daß Patientinnen mit Uteruszervixkarzinomen im mitteleuropäischen Raum bis zu 94% mit den Papillomaviren HPV16 und HPV18 infiziert sind (102).

Aus in-vitro-Untersuchungen ist bekannt (58), daß es in Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen zu einer Selektion von Zellen mit defektem P53 kam, Hypoxie bei Zellen mit intaktem P53 dagegen zur Apoptose führte (54).

An Zervixkarzinomzellen wurden bestätigt, daß die hypoxie-induzierte Apoptose abhängig ist von dem Vorliegen von wtP53. Über E6 kam es zu einer Hemmung der normalen P53-

Funktion und zu einer Hemmung der hypoxie-induzierten Apoptose. Ein Anstieg der P53-Expression unter hypoxischen Bedingungen an Zellkulturen aus HPV-infizierten Zervixkarzinom-Biopsaten wurde beschrieben (97). Interessant an diesen Versuchen ist die Abnahme der Apoptosefähigkeit unter hypoxischen Bedingungen im Verlauf der Zellpassagierung, was als eine Anpassung und Malignisierung der Zervixkarzinomzellen unter Hypoxie interpretiert wird.

Unsere klinischen Ergebnissen bestätigen diese experimentellen Daten. Zervixkarzinome mit meßbaren hypoxischen Tumoranteilen wiesen eine signifikant höhere Expression von P53 auf als nichthyoxische Karzinome. Der Einfluss der Hypoxie auf die Störung der Zellzyklusregulation ist anhand der unterschiedlichen Höhe des DNA-Index für P53-positive hypoxische Karzinome im Vergleich zu P53-positiven nichthyoxischen Karzinomen zu sehen. Wenn auch auf Grund der großen Streubreite die Unterschiede nicht statistisch zu sichern waren, so besteht dennoch eine Tendenz zu einem höheren DNA-Index unter Hypoxie und zu einer größeren Heterogenität der Tumorzellen für tP53-Karzinome. Für die Karzinome mit wtP53-Expression spielte die Tumorphoxie hinsichtlich der Höhe des DNA-Index dagegen keine Rolle.

Im hypoxischen Tumor-Mikromilieu war zwar eine höhere P53-Expression der Tumorzellen als Streißreaktion zu beobachten, auf die durch die Hypoxie induzierten Störungen in der Replikation der DNA konnte aber durch die Inaktivierung des P53 nicht durch Reparatur oder Apoptose reagiert werden. Der klinische Effekt dieser Determinierung des P53 durch die Hypoxie ist aus den Überlebenskurven zu entnehmen. In unseren klinischen Ergebnissen konnten wir zeigen, daß die besten 3-Jahresresultate bei den Patientinnen mit wtP53- Karzinomen erreicht wurden. Die Kombination tP53/hypoxische Karzinome zeigten die schlechtesten klinischen Resultate. Damit kann vermutet werden, daß die Hypoxie über die Determination vom P53 und damit über eine Apoptoseinhibition für Uteruszervixkarzinome prognoserelevant wird. Damit können wir auch klinisch die experimentell gewonnenen Hypothesen von Gaccia et al. (54) und Gräber et al. (58) bestätigen, auch wenn diese in unserer Untersuchung letztendlich keine klinische Relevanz als Prognosefaktor hatten.

In den immunhistochemischen Untersuchungen wurde als ein weiteres apoptoseregulierendes Onkogen BCL-2 bestimmt. Es gilt als ein potentieller "Gegenspieler" von P53 und kann die Apoptose-Induktion verhindern (3,127,150). Die Rolle von BCL-2 in der strahleninduzierten Apoptose ist bis jetzt aber unklar. Möglicherweise kann BCL-2 eine Rolle in der Radiosensibilität auch bei Zervixkarzinomen spielen (67). In unserer Untersuchung fand sich eine positive Korrelation zwischen der Expressionshöhe von P53 und BCL-2. Ein Unterschied in der Expressionshöhe in

Abhängigkeit vom Stadium hatte sich nur für das Stadium IIB ergeben. Für dieses Tumorstadium konnte auch ein relativ höherer DNA-Index in Bezug zur Expressionshöhe gegenüber den anderen Tumorstadien gefunden werden. Es hatte den Anschein, daß nur in den niedrigeren Tumorstadien noch mit einer vergleichsweise intakten BCL2-Funktion zu rechnen ist. In den höheren Stadien spielte BCL-2 in der Apoptoseregulierung keine Rolle mehr. Dafür spricht der relative Verlust der BCL2-Expression in den Stadien IIIB und IVA.

Als Prognoseparameter spielte die BCL-2-Expression in Zervixkarzinomen keine Rolle. Pillai et al. (150) und Harima et al. (67) beschrieben gleiche Resultate, dagegen fand Rajkumar et al. (155) bei 32 Patientinnen mit Zervixkarzinomen der Stadien IIB und IIIB einen Überlebensvorteil für die Gruppe der BCL-2-negativen Tumore im Vergleich zu den BCL-2 exprimierenden Karzinome. Dieses Ergebnis können wir nicht bestätigen. Insgesamt spielte die BCL-2-Expression als Prognosefaktor in der vorliegenden Untersuchung keine Rolle.

#### **4.10. Ergebnisse der Kombinationstherapie mit Interferon-alpha-2a/13-cis-Retinsäure**

Ein Nebenresultat der Arbeit ist der Nachweis der fehlenden Effektivität der adjuvanten Behandlung mit Interferon-alpha-2a und 13-cis-Retinsäure.

In Zellkulturen (4, 79) war insbesondere für Zervixkarzinomzellen ein additiver Effekt in der Behandlung dieser Zellkulturen mit Interferon-alpha-2a (IFN) und 13-cis-Retinsäure (cRA) und Bestrahlung zu verzeichnen. Der theoretische Ansatz dieses Behandlungskonzeptes war von der Wirkungsweise der additiven Medikation interessant: Interferon-alpha-2a hat einen antiviralen Effekt - Zervixkarzinome sind in über 90% der Fälle mit humanen Papillomaviren infiziert ( 102 ). IFN hat einen antiproliferativen Effekt (24) und es wirkt in experimentellen Ansätzen moderat antiangiogenetisch (158). Die Kombination mit cRA ließ einen Effekt auf das Apoptoseverhalten der Tumore erhoffen: Unter cRA kommt es zu einer De-Entdifferenzierung. Tumorzellen durchlaufen noch einige Mitosen, um dann in Apoptose zu gehen (95).

Die klinischen Daten von Lippman et al. (112), Kavanagh et al. (90) und Toma et al. (197) zeigten ein Ansprechen der Zervixkarzinome auf eine Therapie mit IFN und cRA, allerdings hielten diese Effekte nur kurze Zeit an. Immerhin bildeten sich einige der fortgeschrittenen Zervixkarzinome soweit zurück, daß sie operabel wurden. Die Kombination einer etablierten Behandlungsmethode, der Strahlentherapie, mit dieser adjuvanten Medikation versprach vom Ansatz her ein günstigeres klinisches Behandlungsergebnis (90).

Diese Hoffnung erfüllte sich nicht. Die hier dargestellten klinischen Resultate unterscheiden sich nicht von den Patientinnen, die nur mit einer Strahlentherapie behandelt wurden. Wir wissen nicht, welche Patientinnen möglicherweise von der Zusatzbehandlung profitierten. Der Anstieg der Tumoroxygenierung (38) bei einem Teil der mit IFN/cRA vorbehandelten Patientinnen allein schon durch die 2-wöchige Vorbehandlung ist ein Hinweis darauf, daß im Tumor eine Veränderung erfolgte, möglicherweise durch eine bessere Durchblutung als Folge eines moderaten antiangiogenetischen Effektes vom Interferon. Leider konnte dieser Ansatz durch das vorzeitige Schließen der Studie nicht weiter verfolgt werden.

Letzten Endes konnte unsere Untersuchung nachweisen, daß nicht die prätherapeutischen Oxygenierung, sondern die Veränderung der Oxygenierung unter der Bestrahlung der entscheidende prognostische Faktor war. Für die Gruppe der IFN/cRA-Patientinnen ergab sich nach 19,8 Gy kein Vorteil in der Tumoroxygenierung.

Vergleichbare klinische Untersuchungen als Phase-II- oder Phase-III-Studie sind nicht publiziert.

## 5. Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Die Strahlentherapie ist in der Behandlung des Uteruszervixkarzinoms eine etablierte Behandlungsmethode. Uteruszervixkarzinome gehören zu den soliden Karzinomen mit den besten Therapieresultaten nach alleiniger Strahlentherapie. Trotz verbesserter technischer Behandlungsmöglichkeiten haben sich in den letzten Jahren die Therapieergebnisse nicht wesentlich verändert. Für den Erfolg der lokalen Strahlentherapie auf der einen Seite und für das aggressivere Tumorwachstum mit hoher Metastasierungsfrequenz auf der anderen Seite sind biologische Besonderheiten von Bedeutung, die bis jetzt nur zum Teil bekannt sind.

Ziel der vorgelegten Untersuchung war die Evaluierung von tumorbiologischen Prognosefaktoren, die einen Hinweis auf die zu erwartende Strahlensensibilität und damit auf das klinische Ergebnis geben können. Letztendlich sollten als Resultat der Arbeit Zusammenhänge zwischen tumorbiologischen Besonderheiten und klinischen Ergebnissen aufgedeckt werden, die die Definition von Risikofaktoren ermöglichen und damit eine individuellere Behandlung, d.h. eine Therapieoptimierung, ermöglichen.

In den bisher publizierten Untersuchungen zu intratumoralen Sauerstoffmessungen wurde übereinstimmend neben dem Tumorstadium die intratumorale Hypoxie als dominierender Prognosefaktor beschrieben. Experimentelle Daten belegen den Einfluß der Hypoxie auf genetische Veränderungen mit der Folge einer genetischen Instabilität sowie auf die Angiogeneseinduktion. Hypoxische Karzinome sollen sich biologisch maligner verhalten

als besser oxygenierte Karzinome und auf eine Strahlen- oder Chemotherapie ungünstiger ansprechen.

Alle bisherigen Daten dazu wurden an nichtbehandelte Karzinomen in prätherapeutischen Messungen erhoben.

Systematische  $pO_2$ -Verlaufsmessungen im Tumor unter Bestrahlung mit einer mehrjährigen klinischen Nachbetreuung sind bis jetzt in der Literatur nicht beschrieben. Diese Untersuchungen sind von strahlenbiologischem Interesse, da eine bisher gängige strahlenbiologische These eine "Reoxygenierung" der hypoxischen Tumore unter einer Strahlentherapie formuliert. Deshalb war ein Schwerpunkt der vorliegenden Untersuchung die Evaluierung der Änderung des intratumoralen Sauerstoffpartialdruckes innerhalb der ersten beiden Behandlungswochen.

Die Untersuchung erfolgte bei 87 Patientinnen mit fortgeschrittenen Uteruszervixkarzinomen. Alle Patientinnen wurden mit einer kombinierten Hochvoltbestrahlung und einer HDR-Kontakttherapie unter kurativer Zielstellung primär bestrahlt. 32/87 Patientinnen erhielten zusätzlich zur Bestrahlung im Rahmen einer Therapieoptimierungsstudie eine additive Behandlung mit Interferon-alpha-2a und 13-cis-Retinsäure.

Als Untersuchungsmethode kam die polarographische intratumorale Messung mit dem  $pO_2$ -Histogrammen der Fa. Eppendorf zur Anwendung.

Neben den Messungen zur Tumoroxygenierung im Verlauf der Therapie wurden mögliche Zusammenhänge zwischen Tumorphoxie und Anämie, Tumorangiogenese sowie Proliferation untersucht. In prätherapeutischen Biopaten wurden bei 70/87 Patientinnen immunhistochemisch der Proliferationsmarker KI-67 sowie die Tumorproteine BCL2 und P53 bestimmt. Aus den gleichen Tumorbiopaten konnte flußzytometrisch der DNA-Index und der S-Phasenanteil ermittelt werden. Als Angiogeneseparameter wurden im Tumorgewebe die Gefäßdichte immunhistochemisch mit CD31 markiert sowie der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) im Serum und Blutplasma bestimmt.

Die Analyse der Oxygenierungsparameter ergab in unserer Untersuchung einen signifikanten Einfluß auf das 3-Jahresüberleben in Abhängigkeit von der Änderung des Sauerstoffpartialdruckes im Verlauf der Hochvolttherapie nach 11 Bestrahlungsfractionen. Ein genereller Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes im Sinne einer "Reoxygenierung" konnte nicht bestätigt werden. Es wurde sowohl ein Anstieg als auch eine Abnahme der Tumoroxygenierung beobachtet, Karzinome zeigten einen gleichbleibend hohen oder niedrigen Sauerstoffpartialdruck unter der Behandlung.

Der Sauerstoffpartialdruck im Tumor unter der Therapie war dennoch für das Behandlungsergebnis maßgebend:

Die Karzinome, die vor oder nach 11 Hochvolt-Fractionen gut oxygeniert waren, hatten einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Patientinnen mit persistierend hypoxischen Karzinomen. Auch unter Einbeziehung des Tumorstadiums konnte für die persistierende Hypoxie unter Bestrahlung ein signifikanter Einfluß bestätigt werden. Die Hypoxie unter der Bestrahlung hatte insbesondere einen Einfluß auf eine größere lokale Radioresistenz im Vergleich zu den nichthyloxischen Karzinomen, die ein besseres lokales Ansprechen zeigten. Auf die Fernmetastasierungsrate hatte die Tumorphypoxie in unserer Untersuchung keinen Einfluß

Es kann festgestellt werden, daß die klinischen Ergebnisse nach primärer Strahlentherapie beim Zervixkarzinom abhängig waren vom Oxygenierungsstatus des Tumors. Prognosebestimmend war der hypoxische Tumoranteil *unter* der Bestrahlung, der letzten Endes für die Radioresistenz verantwortlich ist.

Die Analyse der prätherapeutisch gemessenen Oxygenierungsparameter in Abhängigkeit vom Median des Sauerstoffpartialdruckes sowie der hypoxischen Meßwerte  $<2,5\text{mmHg}$  und  $<5\text{mmHg}$  erbrachte in unserer Untersuchung keinen statistisch zu verifizierenden Einfluß auf das 3-Jahresüberleben.

Der sowohl für das Gesamtüberleben als auch für das lokale Tumoransprechen bedeutendster klinischer Prognosefaktor war die Anämie. Anämische Patientinnen hatten gegenüber nichtanämischen Patientinnen ein hochsignifikant schlechteres klinisches Ergebnis. Es konnte bei 19,8 Gy Bestrahlung insbesondere für die hypoxischen Parameter HF2,5 und HF5 bei 19,8 Gy eine signifikante Korrelation zum Hämoglobinwert festgestellt werden. Damit kommt der Hämoglobinkonzentration unter der Bestrahlung eine Bedeutung für die Tumorphypoxie und damit der Radioresistenz zu. Diese Ergebnis weist erstmals einen Zusammenhang zwischen Tumorphypoxie und Anämie unter der Bestrahlung auf und hat damit in der klinischen Routine Konsequenzen für die Anämiebehandlung.

Der Einfluß insbesondere auf die lokale Strahlenwirkung wurde in Abhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration sowohl für den anämischen als auch durch Betrachtung unterschiedlicher Hämoglobinhöhen im nichtanämischen Bereich nachgewiesen: Patientinnen mit den höchsten Hämoglobinkonzentrationen unter der Bestrahlung zeigten die besten lokalen Remissionsraten.

In den prätherapeutischen Bestimmungen war ein Zusammenhang zwischen Tumoroxygenierung und Hämoglobinwert nicht herzustellen.

Der Einfluß der Vaskularisation im Tumor auf das klinische Gesamtergebnis sowie die Beziehung zwischen Angiogeneseinduktion und Hypoxie konnte nachgewiesen werden.

Persistierend hypoxische Karzinome zeigten eine signifikant größere Gefäßdichte. Eine hohe intratumorale Gefäßdichte war wiederum mit einer signifikant schlechteren Prognose verbunden. Zwischen Gefäßdichte im Tumor und anämischen Hämoglobinwerten bestand nur für die persistierend hypoxischen Karzinome ein statistischer Zusammenhang.

Die Bestimmung des Angiogenesefaktors VEGF im Serum war als ein hochsignifikant ungünstiger Prognosefaktor anzusehen, wenn der Wert  $>600\text{pg/ml}$  lag, wobei der Einfluß der Thrombozyten sowohl hinsichtlich der Funktion als VEGF-Vehikel als auch als Prognosemarker bei malignen Tumoren weiterer Untersuchung bedarf. Gezeigt werden konnte ein Anstieg der VEGF-Expression unter anämischen Bedingungen. Damit kann eine Verbindung zwischen Anämie- Gewebhypoxie- Angiogeneseinduktion- Gefäßdichte- Prognose postuliert werden. Die bisherige These, daß die Anämie bei Tumorkranken ein paraneoplastischer Effekt ohne Wechselwirkungen mit dem Tumorgeschehen und ohne Beziehung zum therapeutischen Ergebnis ist, kann nicht mehr aufrecht erhalten werden.

Keine Bedeutung als Prognosemarker konnte für den Ploidiestatus ermittelt werden, Diploide Karzinome waren in der Prognose nicht besser als aneuploide Tumoren. Ebenfalls hatten die Proliferationsmarker KI-67 und der S-Phasenanteil keine Bedeutung für das klinische Resultat.

Als Tumorproteine mit einem Einfluß auf die Apoptose wurden P53 und BCL2 immunhistochemisch bestimmt. Für BCL2 ergaben sich keine Aussagen für das klinische Ergebnis.

Für P53-Protein konnte ein Einfluß der Hypoxie auf die Expressionshöhe gezeigt werden: Hypoxische Karzinome hatten eine signifikant höhere Expressionsrate von P53.

Der Einfluß der Hypoxie auf das P53-Expressionsverhalten ist bis jetzt nur experimentell nachgewiesen worden. Der von uns ermittelte relativ hohe DNA-Index bei hypoxischen Tumoren mit gestörter P53-Funktion ist als ein Hinweis auf ein gestörtes Apoptoseverhalten zu interpretieren und bestätigt experimentelle Daten. Die Patientinnen mit P53-negativen (wtP53)Biopsien wiesen ein besseres 3-Jahresüberleben gegenüber den Patientinnen mit (tP53)Biopsien auf. Diese in Experimentaltumoren gefundenen Systeme der malignen Progression lassen sich in unseren klinisch fortgeschrittenen Karzinomen zwar wiederfinden, sind aber für das Behandlungsergebnis nicht relevant.

Aus den immunhistochemischen Untersuchungen der Tumorproteine P53, BCL2 und KI-67 konnten keine prognoserelevante Schlußfolgerungen gezogen werden.

Die additive Behandlung mit Interferon-alpha-2a und 13-cis-Retinsäure hatte auf das klinische Resultat keinerlei Einfluß. Die 3-Jahresergebnisse für die Patientinnen mit einer

alleinigen Strahlentherapie entsprachen denen der Patientinnengruppe mit der IFN/cRA-Zusatzbehandlung.

Folgende Schlußfolgerungen sind festzuhalten:

1. Wichtigster prognostischer Faktor in unserer Untersuchung war die Anämie während der Radiotherapie.
2. Die Anämie unter der Bestrahlung beeinflusste die Hypoxie unter der Bestrahlung und hatte damit einen wesentlichen Einfluß auf die Radioresistenz. Hypoxie und Anämie unter der Bestrahlung waren in dieser Untersuchung in erster Linie für die lokale Radioresistenz und nicht für die Fernmetastasierung von Bedeutung.
3. Die strahlenbiologische Bedeutung der Hypoxie konnte bestätigt werden, allerdings nur, wenn diese auch unter der Bestrahlung persistent war. Eine generelle Reoxygenierung unter der Radiotherapie wurde nicht gefunden.
4. Zwischen der Gefäßdichte in Tumorbiopaten und der Tumorphoxie konnte ein Zusammenhang hergestellt werden. Die routinemäßige Bestimmung der Gefäßdichte als Prognosemarker ist zu diskutieren und sollte in weiterführenden Untersuchungen kontrolliert werden.
5. Die weiteren Prognosemarker (Apoptosemarker P53 und BCL2, Proliferationsmarker KI67 und S-Phasenanteil) waren gegenüber den etablierten klinischen Faktoren nicht aussagekräftig.
6. Die nachgewiesenen Interaktionen zwischen den verschiedenen Prognosefaktoren Anämie, Hypoxie, Gefäßdichte und VEGF-Expression lassen auf ein pathophysiologisches Netzwerk schließen, das in seiner Gesamtheit nicht durch einzelne Parameter beschrieben werden kann.
7. Klinische Schlußfolgerung kann nur sein, alles zu vermeiden, was unter der Bestrahlung eine lokale Tumorphoxie begünstigt. Dazu gehört unbedingt eine Korrektur der Anämie. Bis zu welcher Höhe diese Korrektur erfolgen soll, wird zur Zeit kontrovers diskutiert und bedarf weiterer Untersuchungen.
8. Die tumorassoziierte Anämie ist ein Symptom für ein besonders aggressives Karzinom. Die Behandlung dieses Symptoms muß in erster Linie in der Behandlung der auslösenden Ursache, d.h. in der Behandlung des Tumors liegen. Mit einer Substitution der Anämie mit Transfusionen oder mit Erythropoietin unter der Bestrahlung wird nicht die Ursache der Anämie beseitigt, aber es besteht die Option, über einen sauerstoffabhängigen strahlensensibilisierenden Effekt ein besseres lokales Ansprechen zu erreichen und damit die lokale Tumorkontrolle zu erhöhen.

## 6. Literatur

1. Alarcon R, Koumenis C, Geyer RK, Maki CG, Giaccia AJ: Hypoxia induces P53 accumulation through MDM2 down- regulation and inhibition of E6- mediated degradation. *Cancer Res* 59 (1999) 6046-6051
2. Alvarez-Salas LM, Arpawong TE, DiPaolo JA: Growth inhibition of cervical tumor cells by antisense oligodeoxynucleotides directed to the human papillomavirus type 16 E6 gene. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 9 (1999) 441-450
3. Amling M, Posl M, Basler I, Delling G: Apoptosis: bcl- 2 ein Schlüsselprotein für den programmierten Zelltod. *Pathologe* 15 (1994) 331-336
4. Angioli R, Sevin BU, Perras JP, Untch M, Koechli OR, Nguyen HN, Steren A, Schwade JG, Villani C, Averette HE: In vitro potentiation of radiation cytotoxicity by recombinant interferons in cervical cancer cell lines. *Cancer* 71 (1993) 3717-3725
5. Annual report on the results of treatment in gynecological cancer. Twenty- first volume. Statements of results obtained in patients treated in 1982 to 1986, inclusive 3 and 5-year survival up to 1990: *Int J Gynaecol Obstet* 36 (1991) Suppl 1-315
6. Austin JR, Weber RS: Blood transfusion in head and neck surgery. *Current Science* 3 (1995) 89-94
7. Awwad HK, el Naggar M, Mocktar N, Barsoum M: Inter-capillary distance measurement as an indicator of hypoxia in carcinoma of the cervix uteri. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12 (1986) 1329-1333
8. Baba M, Konno H, Maruo Y, Tanaka T, Kanai T, Matsumoto K, Matsuura M, Nishino N, Maruyama K, Nakamura S, Baba S: Relationship of P53 and vascular endothelial growth factor expression of clinicopathological factors in human scirrhous gastric cancer. *Eur Surg Res* 30 (1998) 130-137
9. Baisch H: Flußzytometrische Untersuchungen des DNA- Gehaltes der Proliferationskinetik menschlicher Tumoren. *Strahlentherapie* 160 (1984) 431-435
10. Banks RE, Forbes MAS, Kinsey E, Stanley A, Ingham E, Walters C, Selby PJ: Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *B J Cancer* 77 (1998) 956-964
11. Becker A, Haensgen G, Bloching M, Weigel C, Lautenschlaeger C, Dunst J: Oxygenation of squamous cell carcinoma of the head and neck: comparison of primary tumors, neck node metastases, and normal tissue. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42 (1998) 35-41
12. Becker A, Stadler P, Lavey RS, Haensgen G, Kuhnt T, Lautenschlaeger C, Feldmann HJ, Molls M, Dunst J: Severe anemia is associated with poor tumor

- oxygenation in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46 (2000) 459-466
13. Beguin Y: Erythropoietin and the anemia of cancer. *Acta Clin Belg* 51 (1996) 36-52
  14. Beinert T, Mergenthaler HG, Sezer O, Loffel J, Binder D, Oehm C, Werner T, Possinger K : Hypoxia in solid tumors. *Dtsch Med Wochenschr* 124 (1999) 534-540
  15. Berger DP, Herbstritt L, Dengler WA, Marmé D, Mertelsmann R, Fiebig HH: Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human tumor models of different histologies. *Ann Oncol* 6 (1995) 817-825
  16. Bremer GL, Tiebosch AT, van der Putten HW, Schouten HJ, de Haan J, Arends JW: Tumor angiogenesis: an independent prognostic parameter in cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol* 174 (1996) 126-131
  17. Bristow RG, Benchimol S, Hill RP: The P53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: Implications for radiotherapy. *Radiother Oncol* 40 (1996) 197-223
  18. Brizel DM, Rosner GL, Prosnitz LR, Dewhirst MW: Patterns and variability of tumor oxygenation in human soft tissue sarcomas, cervical carcinomas, and lymph node metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 32 (1995) 1121-1125
  19. Brizel DM, Dodge RK, Clough RW, Dewhirst MW: Oxygenation of head and neck cancer: changes during radiotherapy and impact on treatment outcome. *Radiother Oncol* 53 (1999) 113-117
  20. Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, Dewhirst MW: Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 56 (1996) 941-943
  21. Bühl A, Zöfel P: SPSS Version 8 Einführung in die moderne Datenanalyse. 5. Aufl. Addison-Wesley Longman, München, 1999
  22. Busch M, Meden H, Meibodi F, Duhmke E, Kuhn W: Long term results of definitive radiotherapy for cervical carcinoma using four applications of high dose rate afterloading. *Cancer*. 86 (1999) 1520-1527
  23. Bush RS: The significance of anemia in clinical radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12 (1986) 2047-2050
  24. Charuruks N, Voravud N, Termrungruanglert W, Lertsanguansinchai P, Tresukosol D, Niruthisard S, Sirisabya N: 13-cis-retinoic acid and interferon-alpha 2a therapy in locally advanced squamous cell carcinoma of the cervix: P53 alteration, proliferating cell nuclear antigen expression and angiogenesis response. *J Obstet Gynaecol Res* 24 (1998) 335-341
  25. Chatani M, Matayoshi Y, Masaki N, Teshima T, Inoue T: A prospective randomized study concerning the point A dose in high-dose rate intracavitary therapy for carcinoma of the uterine cervix. *Strahlenther Onkol* 56 (1994) 636-642

26. Cheng WF, Lee CN, Chu JS, Chen CA, Chen TM, Shau WY, Hsieh CY, Hsieh FJ: Vascularity index as a novel parameter for the in vivo assessment of angiogenesis in patients with cervical carcinoma. *Cancer* 85 (1999) 651-657
27. Chiarotto JA, Hill RP: A quantitative analysis of the reduction in oxygen levels required to induce up- regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA in cervical cancer cell lines. *Br J Cancer* 80 (1999) 1518-1524
28. Cooper RA, West CM, Wilks DP, Logue JP, Davidson SE, Roberts SA, Hunter RD: Tumour vascularity is a significant prognostic factor for cervix carcinoma treated with radiotherapy: independence from tumour radiosensitivity. *Br J Cancer* 81 (1999) 354-358
29. Cooper RA, West CM, Logue JP, Davidson SE, Miller A, Roberts S, Stafford IJ, Honess DJ, Hunter RD: Changes in oxygenation during radiotherapy in carcinoma of the cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 45 (1999) 119-126
30. Dewey WC, Ling CC, Meyn RE: Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 33 (1995) 781-796
31. Dietz A, Rudat V, Conradt C, Vanselow B, Wollensack P, Staar S, Eckel H, Volling P, Schroder M, Wannemacher M, Muller RP, Weidauer H: Prognostischer Stellenwert vor primärer Radiochemotherapie von Kopf-Hals-Karzinomen. *HNO* 48 (2000) 655-664
32. Dische S: Radiotherapy and anaemia- the clinical experience. *Radiother Oncol* 20 (1991) Suppl 1: 35-40
33. Dobbs SP, Hewett PW, Johnson IR, Carmichael J, Murray JC: Angiogenesis is associated with vascular growth factor expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 76 (1997) 1410-1415
34. Doi R, Kuratate I, Okamoto E, Ryoike K, Ito H: Expression of P53 Protein increases intratumoral microvessel formation in human salivary gland carcinomas. *J Oral Pathol Med* 28 (1999) 259-263
35. Dubray B, Mosseri V, Brunin F, Jaulerry C, Poncet P, Rodriguez J, Brugere J, Point D, Giraud P, Cosset JM: Anemia is associated with lower local- regional control and survival after radiation therapy for head and neck cancer: a prospective study. *Radiology* 20 (1996) 553-558
36. Dulic V, Kaufmann WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW, Elledge SJ, Reed SI: tP53dependent inhibition of cyclin- dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation- induced G1 arrest. *Cell* 76 (1994) 1013-1023
37. Dunst J, Pigorsch S, Haensgen G, Hintner I, Lautenschlaeger C, Becker A: Low hemoglobin is associated with increased serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cancer. *Strahlenther Onkol* 175 (1999) 93-96

38. Dunst J, Haensgen G, Lautenschlaeger C, Fuchsel G, Becker A: Oxygenation of cervical cancers during radiotherapy and radiotherapy + cis- retinoic acid/interferon. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43 (1999) 367-373
39. Dusenbery KE, McGuire WA, Holt PJ, Carson LF, Fowler JM, Twigg LB, Potish RA: Erythropoietin increases hemoglobin during radiation therapy for cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 29 (1994) 1079-1084
40. Ebara T, Mitsuhashi N, Saito Y, Sakurai H, Hasegawa M, Takahashi M, Takahashi T, Hayakawa K, Niibe H: Prognostic significance of immunohistochemically detected P53 protein expression in stage IIIB squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation therapy alone. *Gynecol Oncol* 63 (1996) 216-218
41. Ebert A, Runkel S, Entezami M, Schaller G, Kühn W, Weitzel H: Mikrozirkulation der Cervix uteri und des Zervixkarzinoms. *Der Frauenarzt* 38 (1997) 758-765
42. Ellis LM, Takahashi Y, Liu W, Shaheen RM: Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: biology and therapeutic implications. *Oncologist* 5 (2000) Suppl 1:11-15
43. Fein DA, Lee WR, Hanlon AL, Ridge JA, Langer CJ, Curran WJ Jr, Coia LR: Pretreatment hemoglobin level influences local control and survival of T1- T2 squamous cell carcinomas of the glottic larynx. *J Clin Oncol* 13 (1995) 2077-2083
44. Feldmann HJ, Molls M, Vaupel P: Blood flow and oxygenation status of human tumors. Clinical investigations. *Strahlenther Onkol* 175 (1999) 1-9
45. Fietkau R, Iro H, Tulusan AH, Dressel V, Altendorf-Hofmann A, Sauer R: Prognostic value of S-Phase fraction in head and neck squamous cell carcinomas and nodal negative breast carcinomas. *Strahlenther Onkol* 170 (1994) 13-24
46. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ: Activating mutations for transformation by P53 produce a gene product that forms an hsc- 70- P53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 8 (1988) 531-539
47. Fleckenstein W, Jungblut JR, Suckfull M, Hoppe W, Weiss C: Sauerstoffdruckverteilungen in Zentrum und Peripherie maligner Kopf- Hals-Tumoren. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir* 12 (1988) 205-211
48. Fossa A, Brandhorst D, Myklebust JH, Seeber S, Nowrousian MR: Relation between S- phase fraction of myeloma cells and anemia in patients with multiple myeloma. *Exp Hematol* 27 (1999) 1621-1626
49. Frommhold H, Gutenberger R , Henke M: The impact of blood hemoglobin content on the outcome of radiotherapy. The Freiburg experience. *Strahlenther Onkol* 174 (1998) 31-34

50. Fuith LC, Fuchs D, Reibnegger G, Wachter H: Cellular immune activation and erythropoiesis in gynaecological cancer. *Lancet* 1 (1989) 908
51. Fyles AW, Milosevic M, Pintilie M, Hill RP: Cervix cancer oxygenation measured following external radiation therapy. *J Radiat Oncol Biol Phys* 42 (1998) 751-753
52. Fyles AW, Milosevic M, Wong R, Kavanagh MC, Pintilie M, Sun A, Chapman W, Levin W, Manchul L, Keane TJ, Hill RP: Oxygenation predicts radiation response and survival in patients with cervix cancer. *Radiother Oncol* 48 (1998) 149-156
53. Geisler JP, Geisler HE, Wiemann MC, Zhou Z, Miller GA, Crabtree W: P53 expression as a prognostic indicator of 5- year survival in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 74 (1999) 468-471
54. Giaccia AJ, Brown JM, Wouters B, Denko N, Koumenis C: Cancer therapy and tumor physiology. *Science* 279 (1998) 12-13
55. Girinski T, Pejovic-Lenfant MH, Bourhis J, Campana F, Cosset JM, Petit C, Malaise EP, Haie C, Gerbaulet A, Chassagne D: Prognostic value of hemoglobin concentrations and blood transfusions in advanced carcinoma of the cervix treated by RT: results of a retrospective study of 386 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16 (1989) 37- 42
56. Glaser CM, Millesi W, Kornek GV, Lang S, Schull B, Watzinger F, Selzer E, Lavey RS: Impact of hemoglobin level and use of recombinant erythropoietin on efficacy of active chemoradiation therapy for squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50 (2001) 705-715
57. Glaser FH, Grimm D, Haensgen G, Rauh G, Schuchardt V: Clinical experience with short- term afterloading therapy in comparison with conventional brachytherapy in the treatment of gynecologic tumors. *Strahlentherapie* 161 (1985) 459-475
58. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ: Hypoxia- mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors. *Nature* 379 (1996) 88-91
59. Grogan M, Thomas GM, Melamed I, Wong FL, Pearcey RG, Joseph PK, Portelance L, Crook J, Jones KD: The importance of hemoglobin levels during radiotherapy for carcinoma of the cervix. *Cancer* 86 (1999) 1528-1536
60. Grad S, Ertel W, Keel M, Infanger M, Vonderschmitt DJ, Maly FE: Strongly enhanced serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) after polytrauma and burn. *Clin Chem Lab Med* 36 (1998) 379-383
61. Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OCA: The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 26 (1953) 638-648

62. Gunsilius E, Petzer A, Stockhammer G, Nussbaumer W, Schumacher P, Clausen J, Gastl G: Thrombocytes are the major source for soluble vascular endothelial growth factor in peripheral blood. *Oncology* 58 (2000) 169-174
63. Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, Ohlstein E, Stadel JM: Chemokine Receptors in Human Endothelial Cells. *J Biol Chem* 7 (1998) 4282- 4287
64. Hänsgen,G, Hintner I, Becker A, Dunst J: VEGF im Serum– ein neuer Tumormarker? *Strahlenther Oncol* 174 (1998) 20
65. Hänsgen G, Hintner I, Krause V, Wohlrab W, Dunst J: Intratumor pO<sub>2</sub>, S- phase fraction and P53 status in cervix carcinomas. *Strahlenther Onkol* 173 (1997) 385-387
66. Hammer J, Zoidl JP, Altendorfer C, Seewald DH, Track C, Stummvoll W, Labeck W: Combined external and high dose rate intracavitary radiotherapy in the primary treatment of cancer of the uterine cervix. *Radiother Oncol* 27 (1993) 66-68
67. Harima Y, Harima K, Shikata N, Oka A, Ohnishi T, Tanaka Y: Bax and Bcl- 2 expressions predict response to radiotherapy in human cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 124 (1998) 503-510
68. Harrison DK, Harrison EM, Newton DJ, Windsor PM: Changes in microvascular blood flow patterns and oxygen saturation in breast skin during radiotherapy. *Adv Exp Med Biol* 471(1999) 481- 486
69. Hawighorst H, Knapstein PG, Knopp MV, Weikel W , Schaeffer U, Zuna I, Schönberg SO, Essig M, Hoffmann U, Brix G, van Kaick G : Angiogenese des Zervixkarzinoms. *Radiologe* 38 (1998) 50-57
70. Hirakawa T, Kamura T, Kaku T, Amada S, Ariyoshi K, Kinukawa N, Nakano H: Prognostic significance of epithelial- stromal vascular cuffing and microvessel density in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 74 (1999) 369-374
71. Hirst DG, Wood PJ: The adaptive response of mouse tumours to anaemia and retransfusion. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 51 (1987) 597-609
72. Hirst DG: Anemia: a problem or an opportunity in radiotherapy? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12 (1986) 2009-2017
73. Höckel M, Vorndran B, Schlenger K, Baussmann E, Knapstein PG: Tumor oxygenation: a new predictive parameter in locally advanced cancer of the cervix. *Gynecol Oncol* 51 (1993) 141-149
74. Höckel M, Knoop C, Schlenger K, Vorndran B, Baussmann E, Mitze M, Knapstein PG, Vaupel P: Intratumoral pO<sub>2</sub> predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother Oncol* 26 (1993) 45-50

75. Hoeckel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P : Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 56 (1996) 4509-4515
76. Höckel M, Schlenger K, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P: Hypoxia and radiation response in human tumors. *Semin Radiat Oncol* 6 (1996) 3-9
77. Höckel M, Vaupel P: Biological consequences of tumor hypoxia. *Semin Oncol* 28 (2001) 36-41
78. Hoeckel M, Schlenger K, Hockel S, Vaupel P: Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive. *Cancer Res* 59 (1999) 4525-4528
79. Hoffmann W, Blase MA, Santo-Hoeltje L, Herskind C, Bamberg M, Rodemann HP: Radiation sensitivity of human squamous cell carcinoma cells in vitro is modulated by all- trans and 13- cis- retinoic acid in combination with interferon- alpha. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 45 (1999) 991-998
80. Hoffmann W, Schiebe M, Hirnle P, Souchon R, Clemens M, Adamietz I, Bamberg M. 13- cis retinoic acid and interferon-alpha +/- irradiation in the treatment of squamous-cell carcinomas. *Int J Cancer* 70 (1997) 475 - 477
81. Hove MG, Dinh TV, Hannigan EV, Lucci JA 3rd, Chopra V, Smith ER, To T: Oncogene expression and microvessel count in recurrent and nonrecurrent stage Ib squamous cell carcinoma of the cervix. *J Reprod Med* 44 (1999) 493 - 496
82. Hunt CR, Hale RJ, Buckley CH, Hunt J: P53 expression in carcinoma of the cervix. *J Clin Pathol* 49 (1996) 971-974
83. Igarashi N, Takahashi M, Ohkubo H, Omata K, Iida R, Fujimoto S: Predictive value of KI-67, P53 protein, and DNA content in the diagnosis of gastric carcinoma. *Cancer* 86 (1999) 1449-1454
84. Jelkmann W: Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor. *Clin Chem* 47 (2001) 617-623
85. Jelkmann WE, Fandrey J, Frede S, Pagel H: Inhibition of erythropoietin production by cytokines. Implications for the anemia involved in inflammatory states. *Ann N Y Acad Sci* 718 (1994) 300-309; discussion 309-311
86. Jund R, Feldmann HJ, Molls M: Der Sauerstoffpartialdruck im Gewebe menschlicher Kopf- Hals- Karzinome während primärer Radio-Chemotherapie. *Laryngorhinootologie* 75 (1996) 43-47
87. Kaleli S, Kosebay D, Bese T, Demirkiran F, Oz UA, Arvas M, Aydinli K, Erkun E: A strong prognostic variable in endometrial carcinoma: flow cytometric S- phase fraction. *Cancer* 79 (1997) 944 - 951

88. Kallinowski F, Zander R, Hoeckel M, Vaupel P: Tumor tissue oxygenation as evaluated by computerized- pO<sub>2</sub>- histography. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19 (1990) 953-961
89. Kapp DS, Fischer D, Gutierrez E, Kohorn EI, Schwartz PE: Pretreatment prognostic factors in carcinoma of the uterine cervix: a multivariate analysis of the effect of age, stage, histology and blood counts on survival. *Int J Oncol Biol Phys* 9 (1983) 445-455
90. Kavanagh JJ, Lippman SM, Paredes-Espinoza M, Erikson AO, Delgadillo-Madrueno F, Paredes-Casillas P, Kudelka AP, Hong WK, Lotans R, Hittelman W, Ahn WS, Holdener E, Schleuniger U, Silva EG, Tornos CS, Krakoff IH: The combination of 13-cis- retinoic acid and interferon- alpha- 2a with radiation therapy in squamous cell carcinoma of the cervix. *Int J Gynecol Cancer* 6 (1996) 439 - 444
91. Kelleher DK, Thews O, Vaupel P: Can Erythropoietin improve tumor oxygenation? *Strahlenther Onkol* 174 (1998) Suppl 4; 20-23
92. Kelleher DK, Mattheisen U, Thews O, Vaupel P: Blood flow, oxygenation, and bioenergetic status of tumors after erythropoietin treatment in normal and anemic rats. *Cancer Res* 56 (1996) 4728 - 4734
93. Kennedy AS, Raleigh JA, Perez GM, Calkins DP, Thrall DE, Novotny DB, Varia MA: Proliferation and hypoxia in human squamous cell carcinoma of the cervix: first report of combined immunohistochemical assays. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 37 (1997) 897-905
94. Kersemaekers AM, Fleuren GJ, Kenter GG, Van den Broek LJ, Uljee SM, Hermans J, Van de Vijver MJ: Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res* 5 (1999) 577- 586
95. Kiemle-Kallee J, Porzsolt F: Retinoide in der Onkologie. *Dtsch Med Wochenschr* 118 (1993) 390 -394
96. Kilic G, Cardillo M, Arun B: Human papillomavirus 18 Proteins E6 and E7 enhance irradiation- and chemotherapeutic agent- induced apoptosis in P53 and Rb mutated cervical cancer cell lines. *Eur J Gynaecol Oncol* 20 (1999) 167-171
97. Kim CY, Tsai MH, Osmanian C, Graeber TG, Lee JE, Giffard RG, DiPaolo JA, Peehl DM, Giaccia AJ: Selection of human cervical epithelial cells that possess reduced apoptotic potential to low-oxygen condition. *Cancer Res* 57 (1997) 4200 - 4204
98. Knocke TH, Weitmann HD, Feldmann HJ, Selzer E, Potter R: Intratumoral pO<sub>2</sub>-measurements as predictive assay in the treatment of carcinoma of the uterine cervix. *Radiother Oncol* 53 (1999) 99 -104

99. Komaki R, Brickner TJ, Hanlon AL et al.: Long-term results of treatment of cervical carcinoma in the United States in 1973, 1978, and 1983: Patterns of Care Study (PCS). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31 (1995) 973 - 982
100. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Fezoulidis I: Cancer vascularization: implications in radiotherapy? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48 (2000) 545 - 553
101. Kristensen GB, Kaern J, Abeler VM, Hagmar B, Trope CG, Pettersen EO: No prognostic impact of flow-cytometric measured DNA ploidy and S-phase fraction in cancer of the uterine cervix: a prospective study of 465 patients. *Gynecol Oncol*. 57 (1995) 79 - 85
102. Krul EJ, Kersemaekers AM, Zomerdijk-Nooyen YA, Cornelisse CJ, Peters LA, Fleuren GJ: Different profiles of allelic losses in cervical carcinoma cases in Surinam and The Netherlands. *Cancer* 86 (1999) 997-1004
103. Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB: Wild-type P53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89 (1992) 7491-7495
104. Kucera H, Potter R, Knocke TH, Baldass M, Kucera E: High-dose versus low-dose rate brachytherapy in definitive radiotherapy of cervical cancer. *Wien Klin Wochenschr* 113 (2001) 58-62
105. Landrisciona M, Cassano A, Ratto C, Ippoliti M, Palazzotti B, Crucitti F, Barone C: Quantitative analysis of basic fibroblast growth factor and vascular endothel growth factor in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 78 (1998) 765 - 770
106. Lartigau E, Lusinchi A, Weeger P, Wibault P, Luboinski B, Eschwege F, Guichard M: Variations in tumour oxygen tension (pO<sub>2</sub>) during accelerated radiotherapy of head and neck carcinoma. *Eur J Cancer* 34 (1998) 856-861
107. Laskey RA, Fairman MP, Blow JJ: S phase of the cell cycle. *Science*. 246 (1989) 609 - 614
108. Lee WR, Berkey B, Marcial V, Fu KK, Cooper JS, Vikram B, Coia LR, Rotman M, Ortiz H: Anemia is associated with decreased survival and increased locoregional failure in patients with locally advanced head and neck carcinoma: a secondary analysis of RTOG 85-27. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42 (1998) 1069 -1075
109. Leek RD, Harris AL, Lewis CE: Cytokine networks in solid human tumors: regulation of angiogenesis. *J Leuk Biol* 56 (1994) 423 - 435
110. Levine EL, Renehan R, Gossiel R, Davidson SA, Roberts SA, Chadwick C, Wilks DP, Potten CS, Hendry JH, Hunter RD, West CML: Apoptosis, intrinsic radiosensitivity and prediction of radiotherapy response in cervical carcinoma. *Radiother Oncol* 37 (1995) 1-9

111. Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R: Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 16 (1998) 3121-3128
112. Lippman SM, Kavanagh JJ, Paredes-Espinoza M, Delgadillo-Madrueno F, Paredes-Casillas P, Hong WK, Massimini G, Holdener EE, Krakoff IH: 13-cis-retinoic acid plus interferon-alpha 2a in locally advanced squamous cell carcinoma of the cervix. *J Natl Cancer Inst* 85 (1993) 499 - 500
113. Logsdon MD, Eifel PJ: FIGO IIIB squamous cell carcinoma of the cervix: an analysis of prognostic factors emphasizing the balance between external beam and intracavitary radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43 (1999) 763-775
114. Lorvidhaya V, Tonusin A, Changwiwit W, Chitapanarux I, Srisomboon J, Wanwilairat S, Chawapun N, Sukthomya V: High-dose-rate afterloading brachytherapy in carcinoma of the cervix: an experience of 1992 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46 (2000) 1185-1191
115. Lutgens LCH, Schutte B, De Jong JMA, Thunissen FBJM: DNA Content as Prognostic Factor in Cervix Carcinoma Stage IB-III treated with Radiotherapy. *Gynecol Oncol* 54 (1994) 275-281
116. Lutterbach J, Guttenger R: Anemia is associated with decreased local control of surgically treated squamous cell carcinomas of the glottic larynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48 (2000) 1345 - 1350
117. Lyng H, Sundfør K, Trope C, Rofstad EK. Oxygen tension and vascular density in human cervix carcinoma. *Br J Cancer* 74 (1996) 1559-1563
118. Lyng H, Sundfør K, Rofstad EK: Changes in tumor oxygen tension during radiotherapy of uterine cervical cancer: relationships to changes in vascular density, cell density, and frequency of mitosis and apoptosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 46 (2000) 935-946
119. Lyng H, Sundfør K, Trope C, Rofstad EK: Disease control of uterine cervical cancer: relationships to tumor oxygen tension, vascular density, cell density, and frequency of mitosis and apoptosis measured before treatment and during radiotherapy. *Clin Cancer Res*. 6 (2000) 1104 -1112
120. Lyng H, Vorren AO, Sundfør K, Taksdal I, Lien HH, Kaalhus O, Rofstad EK: Intra- and intertumor heterogeneity in blood perfusion of human cervical cancer before treatment and after radiotherapy. *Int J Cancer* 96 (2001) 182-190
121. Magtibay PM, Perrone JF, Stanhope CR, Katzmann JA, Keeney GL, Li H: Flow cytometric DNA analysis of early stage adenocarcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 75 (1999) 242-247

122. Maloney JP, Silliman CS, Ambrusco DR, Wang J, Tuder RM, Voelkel NF: in vitro release of vascular endothelial factor during platelet aggregation. *Am J Physiol* 275, (1998) H1054 - H1061
123. Manegold C: The causes and prognostic significance of low hemoglobin levels in tumor patients. *Strahlenther Onkol* 174 (1998) Suppl 4;17-19
124. Mantovani F, Banks L: Inhibition of E6 induced degradation of P53 is not sufficient for stabilization of P53 protein in cervical tumour derived cell lines. *Oncogene* 18 (1999) 3309 - 3315
125. Marti HH, Risau W: Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 15809-15814
126. Mayr NA, Yuh WT, Magnotta VA, Ehrhardt JC, Wheeler JA, Sorosky JI, Davis CS, Wen BC, Martin DD, Pelsang RE, Buller RE, Oberley LW, Mellenberg DE, Hussey DH: Tumor perfusion studies using fast magnetic resonance imaging technique in advanced cervical cancer: a new noninvasive predictive assay. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 36 (1996) 623-633
127. McCluggage G, McBride H, Maxwell P, Bharucha H: Immunohistochemical detection of P53 and bcl-2 proteins in neoplastic and non-neoplastic endocervical glandular lesions. *Int J Gynecol Pathol* 16 (1997) 22-27
128. McMahon G: VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* 5 (2000) Suppl 1: 3 -10
129. Molls M, Vaupel P: Blood perfusion and microenvironment of human tumors. Springer Verlag Berlin-Heidelberg 1998
130. Molls M, Stadler P, Becker A, Feldmann HJ, Dunst J: Relevance of oxygen in radiation oncology. Mechanisms of action, correlation to low hemoglobin levels. *Strahlenther Onkol* 174 (1998) Suppl 4:13-16
131. Merkel DE, McGuire WL: Ploidy, proliferative activity and prognosis. DNA flow cytometry of solid tumors. *Cancer* 65 (1990) 1194-1205
132. Mittelman M, Neumann D, Peled A, Kanter P, Haran-Ghera N: Erythropoietin induces tumor regression and antitumor immune responses in murine myeloma models. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98 (2001) 5181-5186
133. Morris M, Eifel PJ, Lu J et al: Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med* 340 (1999)1137-1143
134. Nair P, Gangadevi T, Jayaprakash PG, Nair MB, Nair MK, Pillai MR: Increased angiogenesis in the uterine cervix associated with human papillomavirus infection. *Pathol Res Pract*. 195 (1999) 163-169

135. Nakano T, Oka K, Ishikawa A, Morita S: Correlation of cervical carcinoma c-erb B-2 oncogene with cell proliferation parameters in patients treated with radiation therapy for cervical carcinoma. *Cancer*. 79 (1997) 513-520
136. Nakano T, Oka K, Ishikawa A, Morita S. Immunohistochemical prediction of radiation response and local control in radiation therapy for cervical cancer. *Cancer Detect Prev* 22 (1998) 120-128
137. Ngyen HN, Sevin BU, AveretteHE, Ganjei P, Perras J, Ramos R, Angiolo R, Donato D, Penalver M: The Role of DNA Index as a Prognostic Factor in Early Cervical Carcinoma. *Gynecol Oncol* 50 (1993) 54 - 59
138. Nielsen HJ, Werther K, Mynster T, Brunner N: Soluble vascular endothelial growth factor in various blood transfusion components. *Transfusion* 39 (1999) 1078-1083
139. Nordsmark M, Overgaard M, Overgaard J: Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 41 (1996) 31-39
140. Nordsmark M, Overgaard J: A confirmatory prognostic study on oxygenation status and loco-regional control in advanced head and neck squamous cell carcinoma treated by radiation therapy. *Radiother Oncol* 57 (2000) 39 - 43
141. Nordsmark M, Hoyer M, Keller J, Nielsen OS, Jensen OM, Overgaard J: The relationship between tumor oxygenation and cell proliferation in human soft tissue sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 35 (1996) 701-708
142. Obermair A, Petru E, Windbichler G, Peters-Engl C, Graf AH, Stummvoll W, Kaider A, Kurschel S, Kolbl H, Sevelde P: Significance of pretreatment serum hemoglobin and survival in epithelial ovarian cancer. *Oncol Rep* 7 (2000) 639 - 644
143. Overgaard J, Horsman MR: Modification of hypoxia-induced radioresistance in tumors by the use of oxygen and sensitizers. *Semin Radiat Oncol* 6 (1996) 10-21
144. Park CS, Joo IS, Song SY, Kim DS, Bae DS, Lee JH: An immunohistochemical analysis of heat shock protein 70, P53, and estrogen receptor status in carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 74 (1999) 53 - 60
145. Le Pechoux C, Akine Y, Sumi M, Tokuuuye K, Ikeda H, Yajima M, Yamada T, Tanemura K, Tsunematsu R, Ohmi K: High dose rate brachytherapy for carcinoma of the uterine cervix: comparison of two different fractionation regimens. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31 (1995) 735-741
146. Petereit DG, Sarkaria JN, Potter DM, Schink H: High-dose-rate versus low-dose-rate brachytherapy in the treatment of cervical cancer: analysis of tumor recurrence--the University of Wisconsin experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 45 (1999) 1267-1274

147. Petereit DG, Pearcey R: Literature analysis of high dose rate brachytherapy fractionation schedules in the treatment of cervical cancer: is there an optimal fractionation schedule? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43 (1999) 359 -366
148. Pilch H, Schlenger K, Steiner E, Brockerhoff P, Knapstein P, Vaupel P: Hypoxia-stimulated expression of angiogenic growth factors in cervical cancer cells and cervical cancer-derived fibroblasts. *Int J Gynecol Cancer* 11 (2001) 137-142
149. Pillai MR, Jayaprakash PG, Nair MK: Tumour-proliferative fraction and growth factor expression as markers of tumour response to radiotherapy in cancer of the uterine cervix. *Canc Res Clin Oncol* 124 (1998) 456 - 461
150. Pillai MR, Jayaprakash PG, Nair MK: bcl-2 immunoreactivity but not P53 accumulation associated with tumor response to radiotherapy in cervical carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 125 (1999) 55 - 60
151. Pirhonen,JP, Grenman SA, Bredbacka AB,Bahado-Singh RO,Salmi TA: Effects of external radiotherapy on uterine blood flow in patients with advanced cervical carcinoma assessed by color Doppler ultrasonography. *Cancer* 76 (1995) 67-71
152. Poskitt TR: Radiation therapy and the role of red blood cell transfusion. *Cancer Invest* 5 (1987) 231-236
153. Potter R, Van Limbergen E, Gerstner N, Wambersie A: Survey of the use of the ICRU 38 in recording and reporting cervical cancer brachytherapy. *Radiother Oncol* 58 (2001) 11-18
154. Potter R, Knocke TH, Fellner C, Baldass M, Reinthaller A, Kucera H: Definitive radiotherapy based on HDR brachytherapy with iridium 192 in uterine cervix carcinoma: report on the Vienna University Hospital findings (1993-1997) compared to the preceding period in the context of ICRU 38 recommendations. *Cancer Radiother* 4 (2000) 159-172
155. Rajkumar T, Rajan S, Baruah RK, Majhi U, Selvaluxmi G, Vasanthan A: Prognostic significance of Bcl-2 and P53 protein expression in stage IIB and IIIB squamous cell carcinoma of the cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* 19 (1998) 556 - 560
156. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A: Regulation of tumor angiogenesis by P53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 14 (2000) 34 - 44
157. Reinartz G, Bartsch S, Willich N: Long-term follow-up results of irradiation alone or combined with surgery in stage I-IV carcinoma of the uterine cervix. *Zentralbl Gynakol* 122 (2000) 318-323

158. Ribatti D, Vacca A, Iurlaro M, Ria R, Roncali L, Dammacco F: Human recombinant interferon alpha-2a inhibits angiogenesis of chick area vasculosa in shell-less culture. *Int J Microcirc Clin Exp.* 16 (1996) 165-169
159. Rofstad EK, SundfØr K, Lyng H, Trope CG: Hypoxia-induced treatment failure in advanced squamous cell carcinoma of the uterine cervix is primarily due to hypoxia-induced radiation resistance rather than hypoxia-induced metastasis. *Br J Cancer* 83 (2000) 354 - 359
160. Roesel JF, Nanney, LB :Assesment of differential cytokine effects on angiogenesis using an in vivo model of cutaneous wound repair. *J Surg Res* 58 (1995) 449 - 459
161. Rotte K: Clinical results of afterloading short-term therapy compared to radium therapy. *Strahlentherapie* 161 (1985) 323 - 328
162. Rudat V, Dietz A, Schramm O, Conradt C, Maier H, Flentje M, Wannemacher M: Prognostic impact of total tumor volume and hemoglobin concentration on the outcome of patients with advanced head and neck cancer after concomitant boost radiochemotherapy. *Radiother Oncol* 53 (1999) 119-125
163. Salgado R, Vermeulen PB, Benoy I, Weytjens R, Huget P, Van Marck E, Dirix LY: Platelet number and interleukin-6 correlate with VEGF but not with bFGF serum levels of advanced cancer patients. *Br J Cancer* 80 (1999) 892-897
164. Salven P, Orpana A, Joensuu H: Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 5 (1999) 487- 491
165. Sandner P, Gess B, Wolf K, Kurtz A: Divergent regulation of vascular endothelial growth factor and of erythropoietin gene expression in vivo. *Pflugers Arch* 431 (1996) 905-912
166. Sarkaria JN, Petereit DG, Stitt JA, Hartman T, Chappell R, Thomadsen BR, Buchler DA, Fowler JF, Kinsella TJ: A comparison of the efficacy and complication rates of low dose-rate versus high dose-rate brachytherapy in the treatment of uterine cervical carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 30 (1994) 75-82; discussion 247.
167. Schlenger K, Hockel M, Mitze M, Schaffer U, Weikel W, Knapstein PG, Lambert A: Tumor vascularity -a novel prognostic factor in advanced cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 59 (1995) 57- 66
168. Schoell W, Janicek M, Mirhashemi R: Epidemiology and Biology of Cervical Cancer. *Semin Surg Oncol* 16 (1999) 203-211
169. Schreiner P, Siracka E, Sibacký J, Manka I. The effect of anemia on the radiotherapy results of the uterine cervix cancer. *Neoplasma* 22 (1975) 655 - 660
170. Schulte-Hermann R, Bursch W, Grasl-Kraupp B: Bedeutung der Apoptose für die Tumorentstehung. *Verh Dtsch Ges Path* 78 (1994) 15-21

171. Schwickert G, Walenta S, Sundfjør K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W: Correlation of high lactate levels in human cervical cancer with the incidence of metastasis. *Cancer Res* 55 (1995) 4757- 4759
172. Sealy R, Jacobs P, Wood L, Levin W, Barry L, Boniaszczuk J, Blekkenhorst G: The treatment of tumors by the induction of anemia and irradiation in hyperbaric oxygen. *Cancer* 64 (1989) 646 - 652
173. Sheridan MT, West CM, Cooper RA, Stratford IJ, Logue JP, Davidson SE, Hunter RD: Pretreatment apoptosis in carcinoma of the cervix correlates with changes in tumor oxygenation during radiotherapy. *Br J Cancer* 82 (2000) 1177-1182
174. Shweiki D, Iltin A, Soffer D, Keshet E: Vascular endothel growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359 (1992) 843-845
175. Silbernagl S, Despopoulos A: *Taschenatlas der Physiologie*: Georg-Thieme-Verlag Stuttgart 1991
176. Silver DF, Piver MS: Effects of recombinant human erythropoietin on the antitumor effect of cisplatin in SCID mice bearing human ovarian cancer: A possible oxygen effect. *Gynecol Oncol* 73 (1999) 280 -284
177. Skomedal H, Kristensen GB, Lie AK, Holm R: Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, RB, and EGFR in cervical carcinomas. *Gynecol Oncol* 73 (1999) 223-228
178. Slagle BL, Kaufman RH, Reeves WC, Icenogle JP: Expression of ras, c-myc, and P53 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 83 (1998) 1401-1408
179. Smith-McCune KK, Zhu Y, Darragh T: Angiogenesis in histologically benign squamous mucosa is a sensitive marker for nearby cervical intraepithelial neoplasia. *Angiogenesis* 2 (1998) 135 -142
180. Soini Y, Pollanen R, Kempainen S, Paakko P, Lehto VP: The association of vascular proliferation with HPV status and epithelial PCNA positivity in cervical intraepithelial lesions. *APMIS* 104 (1996)183-190
181. Stadler P, Becker A, Feldmann HJ, Hansgen G, Dunst J, Wurschmidt F, Molls M: Influence of the hypoxic subvolume on the survival of patients with head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 44 (1999) 749 -754
182. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L: Role of a P53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 393 (1998) 229 - 234
183. Street D, Delgado G: The role of P53 and HPV in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 59 (1995) 287-288 Published erratum appears in *Gynecol Oncol* 59 (1995) 435

184. Stüben G, Thews O, Pottgen C, Stuschke M, Sack H: Tumour oxygenation during fractionated radiotherapy- comparison with size-matched controls. *Acta Oncol* 38 (1999) 209 -213
185. Sundfjør K, Lyng H, Trope CG, Rofstad EK: Treatment outcome in advanced squamous cell carcinoma of the uterine cervix: relationships to pretreatment tumor oxygenation and vascularization. *Radiother Oncol* 54 (2000) 101-107
186. Sundfjør K, Trope C, Suo Z, Bergsjø P: Normobaric oxygen treatment during radiotherapy for carcinoma of the uterine cervix. Results from a prospective controlled randomized trial. *Radiother Oncol* 50 (1999) 157-165
187. Sundfjør K, Lyng H, Kongsgard UL, Trope C, Rofstad EK: Polarographic measurement of pO<sub>2</sub> in cervix carcinoma. *Gynecol Oncol* 64 ( 1997) 230-236
188. Sutherland RM, Ausserer WA, Murphy BJ, Laderoute KR: Tumor Hypoxia and eterogeneity: Challenges and Opportunities for the Future. *Semin Radiat Oncol* 6 (1996) 59-70
189. Sweeney PJ, Nicolae D, Ignacio L, Chen L, Roach M 3rd, Wara W, Marcus KC, Vijayakumar S: Effect of subcutaneous recombinant human erythropoietin in cancer patients receiving radiotherapy: final report of a randomized, open-labelled, phase II trial. *Br J Cancer* 77 (1998) 1996-2002
190. Szarka K, Veress G, Konya J, Gergely L: Frequency of P53 codon 72 genotypes in human papillomavirus associated squamous intraepithelial lesions and cervical cancer. *Anticancer Res* 19 (1999) 2377-2379
191. Tartter PI, Francis DM: Blood transfusion and tumor growth. *Transplant Proc* 20 (1988) 1108-1111
192. Teicher BA, Ara G, Herbst R, Takeuchi H, Keyes S, Northey D: PEG-hemoglobin: effects on tumor oxygenation and response to chemotherapy. *In Vivo* 11 (1997) 301-311
193. Thews O, Vaupel P: Relevant parameters for describing the oxygenation status of solid tumors. *Strahlenther Onkol* 172 (1996) 239-243
194. Thews O, Zywiets F, Lecher B, Vaupel P: Quantitative changes of metabolic and bioenergetic parameters in experimental tumors during fractionated irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 45 (1999) 1281-1288
195. Thews O, Koenig R, Kelleher DK, Kutzner J, Vaupel P: Enhanced radiosensitivity in experimental tumors following erythropoietin treatment of chemotherapy-induced anaemia. *Br J Cancer* 78 (1998) 752-756
196. Thews O, Kelleher DK, Vaupel P: Erythropoietin restores the anemia-induced reduction in cyclophosphamide cytotoxicity in rat tumors. *Cancer Res* 61 (2001) 1358-1361

197. Toma S, Palumbo R, Vincenti M, Aitini E, Paganini G, Pronzato P, Grimaldi A, Rosso R: Efficacy of recombinant alpha-interferon 2a and 13-cis-retinoic acid in the treatment of squamous cell carcinoma. *Ann Oncol* 5 (1994) 463- 465
198. Tsang RW, Fyles AW, Kirkbride P, Levin W, Manchul LA, Milosevic MF, Rawlings GA, Banerjee D, Pintilie M, Wilson GD: Proliferation measurements with flow cytometry Tpot in cancer of the uterine cervix: correlation between two laboratories and preliminary clinical results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 32 (1995) 1319-1329
199. Tsang RW, Fyles AW, Milosevic M, Syed A, Pintilie M, Levin W, Manchul LA: Interrelationship of proliferation and hypoxia in carcinoma of the cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46 (2000) 95 - 99
200. Tseng CJ, Pao CC, Lin JD, Soong YK, Hong JH, Hsueh S: Detection of human papillomavirus types 16 and 18 mRNA in peripheral blood of advanced cervical cancer patients and its association with prognosis. *J Clin Oncol* 17 (1999) 1391-1396
201. Vaupel P: Hypoxia in neoplastic tissue. *Microvasc Res* 13 (1977) 399 - 408
202. Vaupel P, Kelleher DK, Günderoth M: Tumor Oxygenation. Gustav-Fischer-Verlag Stuttgart 1995
203. Vaupel P, Hockel M: Blood supply, oxygenation status and metabolic micromilieu of breast cancers: characterization and therapeutic relevance (Review). *Int J Oncol* 17 (2000) 869 - 879
204. Vaupel P, Kelleher DK, Hockel M: Oxygen status of malignant tumors: Pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol* 28 (2001) Suppl :29-35
205. Verheul HMW, Hoekman K, Luykx-deBakker S, Eekman CA, Folman CC, Broxterman HJ, Pinedo HM: Platelet: Transporter of Vascular endothelial growth factor. *Ci Cancer Res* 218 (1997) 2187-2190
206. Waggoner SE, Baunoch DA, Anderson SA, Leigh F, Zagaja VG: Bcl-2 protein expression associated with resistance to apoptosis in clear cell adenocarcinomas of the vagina and cervix expressing wild-type P53. *Ann Surg Oncol* 5 (1998) 544 - 547
207. Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfjør K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W: High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res* 60 (2000) 916-921
208. Wartiovaara U, Salven P, Mikkola H, Lassila R, Kaukonen J, Joukov V, Orpana A, Ristimäki A, Heikinheimo M, Joensuu H, Alitalo K, Palotie A: Peripheral blood platelets express VEGF-C and VEGF which are released during platelet activation. *Thromb Haemost* 80 (1998) 171-175

209. Webb NJ, Bottomley MJ, Watson CJ, Brenchley PE. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: implications for measurement of circulating VEGF levels in clinical disease. *Clin Sci (Lond)* 94 (1998) 395-404
210. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J: Tumor angiogenesis and metastasis- correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 324 (1991) 1-8
211. Wheeler JA, Stephens LC, Tornos C, Eifel PJ, Ang KK, Milas L, Allen PK, Meyn RE Jr. ASTRO Research Fellowship: apoptosis as a predictor of tumor response to radiation in stage IB cervical carcinoma. *American Society for Therapeutic Radiology and Oncology. Int J Radiat Oncol Biol Phys* 30 (1995) 1487-1493
212. Woolley AL, Hogikyan ND, Gates GA, Haughey BH, Schechtman KB, Goldenberg JL: Effect of blood transfusion on recurrence of head and neck carcinoma. Retrospective review and meta-analysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 101 (1992) 724-730
213. Wouters BG, Denko NC, Giaccia AJ, Brown JM: A P53 and apoptotic independent role for p21waf1 in tumor response to radiation therapy: *Oncogene* 18 (1999) 6540-6545
214. Yamamoto Y, Toi M, Kondo S, Matsumoto T, Suzuki H, Kitamura M, Tsuruta K, Taniguchi T, Okamoto A, Mori T, Yoshida M, Ikeda T, Tominaga T: Concentrations of Vascular endothelial growth factor in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res* 2 (1996) 821-826
215. Zacher S, Becker A, Hintner I, Neumann HJ, Dunst J: Hat eine Operation im Kopf-Hals-Bereich einen Einfluß auf die VEGF-Konzentration im Serum?: *Strahlenther Oncol* 174 (1998) 104
216. Zywiets F, Hahn LS, Lieser W: Ultrastructural studies on tumor capillaries of a rat rhabdomyosarcoma during fractionated radiotherapy. *Acta Anat* 150 (1994) 80-85
217. Zywiets F, Reeker W, Kochs E: Tumor oxygenation in a transplanted rat rhabdomyosarcoma during fractionated irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 32 (1995) 1391-1400

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Prof.Dr.med. Jürgen Dunst)

## **Thesen der Habilitation**

**Tumorbiologische Prognosefaktoren beim fortgeschrittenen,  
primär strahlentherapeutisch behandelten Uteruszervixkarzinom**

**Eine Untersuchung zur Bedeutung von Tumoroxygenierung,  
Tumervaskularisation, Anämie und Tumorproteinen für das klinische  
Behandlungsergebnis**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr.med.habil.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Dr.med.Gertrud Gabriele Hänsgen

geb. am 20.06.1947 in Wilsdruff/Sachsen

1. Die Strahlentherapie ist in der Behandlung des Uteruszervixkarzinoms eine etablierte Behandlungsmethode. Uteruszervixkarzinome gehören zu den soliden Karzinomen mit den besten Therapieresultaten nach alleiniger Strahlentherapie. Die Langzeitergebnisse sind nach primärer Strahlentherapie in Frühstadien mit denen operativer Verfahren vergleichbar, in fortgeschrittenen Stadien zeigt die primäre Strahlentherapie bessere Heilungsergebnisse.
2. Die klinischen Ergebnisse nach primärer Strahlentherapie beim Zervixkarzinom sind abhängig vom Oxygenierungsstatus des Tumors. Prognosebestimmend ist der hypoxische Tumoranteil, der letzten Endes für die Radioresistenz verantwortlich ist.
3. Bisherige intratumorale Sauerstoffmessungen erfolgten am nichtbehandelten Karzinom. In der vorgelegten Arbeit wurde der Einfluß der Sauerstoffkonzentration im Tumor als Prognosefaktor sowohl in prätherapeutischen Messungen als auch im Verlauf der Strahlentherapie bei 87 Patientinnen mit primär bestrahlten Uteruszervixkarzinomen untersucht. Insbesondere sollte analysiert werden, inwieweit sich unter der Strahlentherapie der Oxygenierungsstatus im Tumor ändert und ob sich daraus prognostische Aussagen ableiten lassen.
4. Als Untersuchungsmethoden kam die polarographische intratumorale Messung des Sauerstoffpartialdruckes im Tumor mit dem pO<sub>2</sub>-Histogrammen der Fa. Eppendorf- zur Anwendung. Gemessen wurde der Sauerstoffpartialdruck vor Therapiebeginn und nach 11 Fraktionen Hochvolttherapie, also bei 19,8 Gy.
5. In prätherapeutischen Biopaten wurden bei 70/87 Patientinnen immunhistochemisch der Proliferationsmarker KI-67 sowie die Proteine BCL2 und P53 unter dem besonderen Aspekt des Einflusses der Tumorphoxie bestimmt. Aus den gleichen Tumorbiosien konnte flowzytometrisch der DNA-Index sowie als Proliferationsmarker der S-Phasenanteil ermittelt werden. Als Angiogeneseparameter wurden im Tumorgewebe die Gefäßdichte immunhistochemisch mit CD31 markiert und ausgezählt. Weiterhin wurde der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) im Serum und Plasma von Patientinnen mit Uteruszervixkarzinomen untersucht.
6. Die Untersuchungen erfolgten ab März 1995 bei insgesamt 87 Patientinnen mit inoperablen Uteruszervixkarzinomen der Stadien IIB n. FIGO (N = 19), IIIB ( N = 59) und im Stadium IVA ( N = 9) mit einem Durchschnittsalter von 58,6 Jahren (34-80 Jahre). Es handelte sich ausschließlich um Plattenepithelkarzinome. Das 3-

Jahresüberleben betrug im Tumorstadium IIB  $72 \pm 11\%$ , im Stadium IIIB  $60 \pm 7\%$  und im Stadium IVA  $22 \pm 14\%$  (Gesamt  $57 \pm 5\%$ ). 19 Patienten erlitten ein lokales Therapieversagen (22%), davon 12 im ersten Jahr nach Therapie. Die Fernmetastasierungsrate betrug 20%.

7. Die strahlenbiologische Bedeutung der Hypoxie konnte bestätigt werden, allerdings nur, wenn diese auch unter der Bestrahlung persistent war. Eine generelle Reoxygenierung unter der Radiotherapie wurde nicht gefunden. Die Karzinome, die vor oder nach 11 Hochvolt-Fraktionen gut oxygeniert waren, hatten mit 68% 3-Jahresüberleben einen signifikanten Vorteil gegenüber 38% 3-Jahresüberleben der Patientinnen mit persistierend hypoxischen Karzinomen.
8. Die Hypoxie unter der Bestrahlung hatte insbesondere einen Einfluß auf eine größere lokale Radioresistenz im Vergleich zu den nichthypoxischen Karzinomen, die ein besseres lokales Ansprechen zeigten. Auf die Fernmetastasierungsrate hatte die Tumorphypoxie in unserer Untersuchung keinen Einfluß.
9. Zwischen der Gefäßdichte in Tumorbiopaten und der Tumorphypoxie konnte ein Zusammenhang hergestellt werden. Persistierend hypoxische Karzinome zeigten eine signifikant größere Gefäßdichte. Eine hohe intratumorale Gefäßdichte war wiederum mit einer schlechteren Prognose verbunden. Die routinemäßige Bestimmung der Gefäßdichte als Prognosemarker ist zu diskutieren und sollte in weiterführenden Untersuchungen kontrolliert werden.
10. Bedeutendster klinischer Prognosefaktor war die Anämie. Anämische Patientinnen hatten mit 31% 3-Jahresüberleben gegenüber 64% für nichtanämische Patientinnen ein hochsignifikant schlechteres klinisches Ergebnis.
11. Einen Zusammenhang zwischen Tumoroxygenierung und Hämoglobinwert konnte unter der Bestrahlung insbesondere für die hypoxischen Parameter statistisch abgesichert werden. Für die hypoxischen Meßwerte HF2,5 und HF5 war bei 19,8Gy eine signifikante Korrelation zum Hämoglobinwert festzustellen.
12. Die Anämie unter der Bestrahlung beeinflusste die Hypoxie unter der Bestrahlung und hatte damit einen wesentlichen Einfluß auf die Radioresistenz. Hypoxie und Anämie unter der Bestrahlung waren in dieser Untersuchung in erster Linie für die lokale Radioresistenz und nicht für die Fernmetastasierung von Bedeutung. Für anämische

Patientinnen betrug das lokale Therapieversagen 38% vs. 20% für nichtanämische Patientinnen.

13. Ein hoher VEGF-Wert im Serum (>600pg/ml) war als ein hochsignifikant ungünstiger Prognosefaktor anzusehen, wobei der Einfluß der Thrombozyten sowohl hinsichtlich der Funktion als VEGF-Vehikel als auch als Prognosemarker bei malignen Tumoren weiterer Untersuchung bedürfen. Gezeigt werden konnte auch ein Einfluß der Anämie auf die VEGF-Expression.
14. Für P53 konnte ein Einfluß der Hypoxie auf die Expressionshöhe nachgewiesen werden: Hypoxische Karzinome hatten eine signifikant höhere Expressionsrate von P53. Die 10 Patientinnen mit p53-negativen Biopsien (wtP53) wiesen ein 3-Jahresüberleben von 79% gegenüber 51% für die 60 Patientinnen mit P53-positiven Biopsien (tP53) auf, der Unterschied ist aber nicht signifikant.
15. Aus den immunhistochemischen Untersuchungen der Tumorproteine p53, BCL2 und Ki-67 konnten keine prognoserelevante Schlußfolgerungen gezogen werden.
16. In einer mehrfaktoriellen Regressionsanalyse unter Einbeziehung des Hämoglobinwertes vor Therapie und nach 19,8Gy, der Tumoroxygenierung vor Therapie und nach 19,8Gy sowie dem Tumorstadium waren Tumorstadium und Hämoglobinwert signifikante Prognosefaktoren. Für das lokale Tumorgeschehen hatte der Hämoglobinwert bei 19,8Gy einen höchstsignifikanten Einfluß.
17. Die nachgewiesenen Interaktionen zwischen den verschiedenen Prognosefaktoren Anämie, Hypoxie, Gefäßdichte und VEGF-Expression lassen auf ein pathophysiologisches Netzwerk schließen, das in seiner Gesamtheit nicht durch einzelne Parameter beschrieben werden kann.
18. Wichtigster Prognosefaktor war in unserer Untersuchung neben dem hohen Tumorstadium IVA der Hämoglobinwert sowohl vor als im besonderen Maße unter der Strahlentherapie. Er beeinflusste in entscheidendem Maße die Tumorphoxie unter der Behandlung und hatte damit auf das lokale Ansprechen der Zervixkarzinome auf die Bestrahlung einen entscheidenden Einfluß.
19. Schlußfolgerung kann nur sein, alles zu vermeiden, was unter der Bestrahlung eine lokale Tumorphoxie begünstigt. Dazu gehört unbedingt eine Korrektur der Anämie.

## Lebenslauf Dr. Gabriele Hänsen

- 20.06.1947 geb. in Wilsdruff/Kreis Meißen  
 Vater: Horst Haufe, Berufsschullehrer, ab 1962 Diplomchemiker  
 Mutter: Hanna-Rose Haufe, Uhrmacherin
- 1954-1962 Besuch der Grundschule in Wilsdruff  
 1962-1964 Besuch der Erw.Oberschule Bernburg  
 1964-1966 EOS "Thomas Müntzer" in Halle, Abschluß mit Abitur  
 Chemiefacharbeiterprüfung im VEB BUNA Schkopau
- 1966-1972 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle  
 9.8.1972 Approbation  
 seit 1972 verheiratet mit Dr. Klaus Hänsen, Internist an der Martin-Luther-Universität Halle
- 1973 Geburt des Sohnes Peter (Dipl.Ing)  
 1979 Geburt der Tochter Sabine (Studentin)

## Wissenschaftlicher Werdegang

- 1.11.1972 Assistenzarzt in Facharztausbildung an der Klinik für Radiologie der Martin-Luther-Universität Halle
- 1975 Diplomarbeit zu einem Strahlenschutz-Thema in der Kontakttherapie
- Febr.1980 Facharztprüfung zum "Facharzt für Radiologie", Weiterbeschäftigung an der Abteilung für Strahlentherapie der Klinik für Radiologie, Leitender Facharzt der Fachambulanz für Gynäkologische Strahlentherapie der Radiologischen Universitätsklinik Halle
- 1984 Verteidigung der Dissertation A mit "Magna cum laude"
- 1985 Hospitation an der Radiologischen Universitätsklinik Szeged (Ungarn)  
 Hospitation im Strahlentherapeutischen Institut in Budapest (Ungarn)
- 1.7.1993 Ernennung zum Oberarzt  
 1.4.-30.9.93 Kommissarischer Klinikleiter

## Wissenschaftliche Schwerpunkte:

- 1974-1990: Einführung der After-loading-Kontakttherapie 1974 an der Klinik als 2.gesamtdeutscher Klinik, Mitarbeit an der Erarbeitung von Dosiskonzepten und Fraktionierungsschemata, die auch jetzt noch Gültigkeit haben. Ausbildung von Kollegen aus der gesamten damaligen DDR auf dem Gebiet der HDR-Kontakttherapie  
 Organisation von 2 HDR-Anwenderkonferenzen in Halle (1984, 1989) mit gesamtdeutscher und internationaler Beteiligung
- 1994 Mitglied der Studienleitung " Additive Behandlung mit Roferon und Roaccutan in der primären Strahlentherapie beim fortgeschrittenen Zervixkarzinom"
- 2001 Mitglied der Studienleitung "Simultane Radiochemotherapie mit Cisplatin beim fortgeschrittenen Zervixkarzinom ohne vs.mit zusätzlicher Gabe von Erythropoetin"

## Forschungsschwerpunkte:

- seit 1994 Prognosefaktoren beim fortgeschrittenen Zervixkarzinom, insbesondere Untersuchungen zum Mikromilieu (prospektive Untersuchung)
- Radiochemotherapie beim operierten Zervixkarzinom in High-Risk-Situation
- Untersuchungen zu Angiogenesefaktoren (VEGF) als Prognosemarker

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß die vorgelegte Arbeit von mir und nur unter Anwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfaßt wurde.

Weder diese noch eine andere Arbeit wurde von mir an einer anderen Medizinischen Fakultät oder Universität eingereicht.

Halle, 15.Januar 2002

Dr.Gabriele Hänsgen

## Danksagung

Mein Dank gilt zuerst meinem Chef, Herrn Prof. Dr. Jürgen Dunst, Direktor der Klinik für Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle.

Ich darf mich für die Möglichkeit, die Untersuchungen durchführen zu können, und für die vielen Anregungen bedanken. Er war immer an den Ergebnissen der Arbeit interessiert und für offene Probleme stets ansprechbar.

Bei Herrn Prof. Dr. Friedrich Rath, Direktor des Pathologischen Institutes, bedanke ich mich für die Erlaubnis, die immunhistochemischen Untersuchungen für meine Arbeit verwenden zu dürfen.

Gleichfalls darf ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Wohlrab, Leiter der Abt. Experimentelle Dermatologie der Universitätshautklinik, für die Genehmigung der Verwendung der flowzytometrischen Befunde bedanken.

Frau Dr. Chr. Lautenschläger, Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik, danke ich für die Beratung bei der Erstellung der statistischen Analysen und für die viele Geduld dabei.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Friedrich Zywietz, Institut für Strahlenbiologie und Biophysik am Krankenhaus Hamburg-Eppendorf der Hamburger Universität, für die fachliche Beratung und den Zuspruch bei der Erstellung der Arbeit.

Frau Christa Perl, MTA in unserer Klinik, war für die Aufarbeitung der Gewebeproben und die Laborarbeiten einschließlich der VEGF-Bestimmungen verantwortlich. Auch ihr gilt mein besonderer Dank.

Nicht zuletzt danke ich meinen ärztlichen Kollegen und meinen Ambulanzschwestern für die Unterstützung bei der Untersuchungsdurchführung.

Ohne die Geduld und Hilfe meiner Familie, insbesondere meines Ehemannes PD Dr. Klaus Hänsgen, wären die letzten Monate noch schwieriger geworden. Auch dafür mein Dank.

Mein allergrößter Dank gilt aber meinen Patientinnen, denn ohne ihr Einverständnis zur Durchführung der Sauerstoffmessungen und Gewebsentnahmen wäre die vorliegende Arbeit nie möglich gewesen.