

**Evaluation immunologischer Prognosefaktoren
des Vulvakarzinoms**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Andrea Rohr, geb. Ohlert
aus Euskirchen
2019

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Rudlowski
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Marieta Toma

Tag der Mündlichen Prüfung: 01.10.2019

Aus der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie
Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Gembruch

Für Benjamin und Julian

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung.....	11
1.1 Das Plattenepithelkarzinom der Vulva.....	11
1.1.1 Epidemiologie	11
1.1.2 Risikofaktoren	12
1.1.3 Die Rolle Humaner Papillomaviren.....	12
1.1.4 Ätiologie und Pathogenese.....	13
1.1.5 Prävention und Früherkennung	14
1.1.6 Diagnostik	15
1.1.7 Staging.....	16
1.1.8 Prognose	18
1.1.9 Therapie.....	18
1.1.10 Nachsorge	19
1.1.11 Rezidive und Metastasen	20
1.2 Das immunologische Mikromilieu des Tumors	20
1.2.1 Die Wechselbeziehung von Immunsystem und Tumor	20
1.2.2 Tumor-assoziierte Makrophagen	21
1.2.3 Regulatorische T-Zellen.....	22
1.3 Immunhistochemische Färbungen	24
1.3.1 p16 ^{INK4A}	24
1.3.2 Foxp3.....	24
1.3.3 CD163.....	24
1.3.4 CD31.....	25
1.3.5 D2-40	25
1.4 Zielsetzung	25

2. Material und Methoden	27
2.1 Kollektiv	27
2.2 Klinische, histologische und immunhistochemische Variablen.....	27
2.3 Färbeverfahren	29
2.4 Mikroskopie und Bilddokumentation.....	29
2.5 Statistische Auswertung	32
3. Ergebnisse	33
3.1 Merkmale des Kollektivs.....	33
3.1.1 Verteilung der Fälle im Untersuchungszeitraum.....	33
3.1.2 Alter	33
3.1.3 p16 ^{INK4a} -positive HPV-Infektion	35
3.1.4 Klinische Parameter.....	36
3.2 Follow-up	37
3.2.1 Adjuvante Therapie.....	37
3.2.2 Rezidive	37
3.2.3 Tod.....	38
3.3 Selektion der Hauptprognosefaktoren	38
3.4 Klassische Prognoseparameter.....	42
3.4.1 Alter	42
3.4.2 Stadium.....	42
3.4.3 Infiltrationstiefe.....	44
3.4.4 Grading	48
3.4.5 Resektion.....	50
3.4.6 Inguinaler Lymphknotenstatus.....	54
3.4.7 Lymph- und Blutgefäßinvasion	57
3.4.8 Fernmetastasierung.....	59

3.5	Immunologische und vaskuläre Marker.....	60
3.5.1	CD163-positive TAMs.....	61
3.5.2	Foxp3-positive T _{reg}	62
3.5.3	D2-40-positive Lymphgefäßdichte	65
3.5.4	CD31-positive Blutgefäßdichte	67
3.6	Zusammenhänge der immunologischen und vaskulären Marker.....	69
3.6.1	Intra- und peritumorale Infiltration mit Foxp3-positiven T _{reg}	70
3.6.2	D2-40-positive Lymphgefäßdichte und CD163-positive TAMs	71
3.6.3	D2-40-positive Lymphgefäßdichte und L1- und N1-Status.....	73
4.	Diskussion	75
4.1	Das Studienkollektiv	75
4.1.1	Größe des Kollektivs.....	75
4.1.2	Epidemiologische und klinische Befunde	75
4.1.3	p16 ^{INK4a} -positive HPV-Infektion	77
4.2	Die klassischen Prognoseparameter.....	78
4.2.1	Alter	78
4.2.2	Stadium.....	78
4.2.3	Inguinaler Lymphknotenstatus.....	78
4.2.4	Infiltrationstiefe.....	79
4.2.5	Resektionsrand.....	79
4.3	Die immunologischen und vaskulären Marker.....	80
4.3.1	D2-40-basierte Evaluation der peritumoralen Lymphgefäßdichte	80
4.3.2	D2-40-basierte Lymphgefäßdichte und CD31-basierte Blutgefäßdichte	80
4.3.3	Nachweis von CD163-positiven TAMs	81
4.3.4	D2-40-basierte Lymphgefäßdichte und CD163-positive TAMs	82
4.3.5	CD163-positive TAMs und Foxp3-positive T _{reg}	82
4.4	Limitationen der Studie.....	83
4.5	Fazit.....	83

5. Zusammenfassung	85
6. Literaturverzeichnis	87
Danksagung	95
Lebenslauf	96

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
CCL	C-C motif ligand
CCR	C-C motif receptor
CD	Cluster of differentiation
CDKN2A	Dependent kinase inhibitor 2A
DAB	Diaminobenzidin
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
Foxp3	Forkhead box P3
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HPF	High-Power-Field, Haupt Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung
HPV, HP-Viren	Humane Papillomaviren
lrHPV	Low-risk Humane Papillomaviren
hrHPV	High-risk Humane Papillomaviren
icr	Intraepithelial compartment, intratumoral
IL	Interleukin
iNO-Synthase	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
k.A.	Keine Angabe
LK	Lymphknoten
LNE	Lymphonodektomie
LSAB	Labeled Streptavidin-Biotin
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
RKI	Robert Koch Institut
r_s	Rangkorrelationskoeffizienz nach Spearman
STIKO	Ständige Impfkommission
str	Stromal compartment, peritumoral

TAM(s)	Tumor-assoziierte Makrophage(n)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNM-Klassifikation	
T	Tumorstadium
N	Lymphknotenmetastasen
M	Fernmetasen
G	Grading
L	Lymphgefäßinvasion
V	Blutgefäßinvasion
R	Resektion
R _{dys}	Resektion mit randbildender Dysplasie
R _{is}	Resektion mit randbildendem Carcinoma in situ
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
nT _{reg} -Zellen	Natürlich auftretende regulatorische T-Zellen
iT _{reg} -Zellen	Induzierbare regulatorische T-Zellen
UKB	Universitätsklinikum Bonn
VIN	Vulväre intraepitheliale Neoplasie
dVIN	differenzierte vulväre intraepitheliale Neoplasie
uVIN	usual vulväre intraepitheliale Neoplasie

1. Einleitung

Von der Postulierung eines „Krebsbacillus“ durch Rudolf Virchow im Jahr 1888 bis zu den Erkenntnissen der Molekularpathologie und Immunologie des 21. Jahrhunderts hat die Erforschung der Interaktion von Immunsystem und Tumor zahllose Fortschritte gemacht. Dennoch ist die Tatsache, dass maligne Tumore nicht nur inmitten eines gegen sie gerichteten Immuninfiltrats wachsen, sondern sich dieses sogar nutzbar machen können, ein bisher immer noch nicht vollständig verstandenes Paradoxon.

Die vorliegende Dissertation evaluiert den Einfluss bekannter histopathologischer und neuer immunhistochemischer Faktoren auf die Prognose des Plattenepithelkarzinoms der Vulva. Hierbei wird ein besonderes Augenmerk auf das den Tumor umgebende immuninfiltrierte Mikromilieu gelegt.

1.1 Das Plattenepithelkarzinom der Vulva

1.1.1 Epidemiologie

Das Vulvakarzinom ist in Deutschland das vierthäufigste Genitalkarzinom der Frau (Jemal et al., 2010; Robert Koch-Institut, 2010). Mit etwa 90 % macht das Plattenepithelkarzinom den Großteil der invasiven Vulvakarzinome aus (Dittmer et al., 2011; Tumorzentrum München, 2001). Insgesamt ist es mit einer Inzidenz von 2-7/100.000 Frauen jedoch ein seltener bösartiger Tumor und in Deutschland für deutlich unter 1 % der krebisbedingten Sterbefälle verantwortlich (DGGG, 2008; Dittmer et al., 2011; Statistisches Bundesamt, 2010; Woelber et al., 2009; Zeppernick et al., 2013). Aufgrund seiner Seltenheit basieren epidemiologische Daten daher teilweise auf Schätzungen. 2004 erkrankten in Deutschland ca. 1600 Frauen und ca. 620 starben an einem Vulvakarzinom (DGGG, 2008; Tumorzentrum München, 2001). Berechnungen des Krebsregisters Schleswig-Holstein zufolge muss mittlerweile von einer jährlichen Neuerkrankungsrate von 3400 - 4000 Frauen ausgegangen werden (Institut für Krebsepidemiologie Lübeck, 2011).

In den letzten Jahrzehnten findet sich ein deutlicher Inzidenzanstieg, vor allem bedingt durch eine häufigere Diagnosestellung bei jüngeren Frauen. Während der Altersgipfel bei

Diagnosestellung früher zwischen 70 und 80 Jahren lag, findet sich mittlerweile eine homogenere Verteilung über alle Altersklassen hinweg, mit einem zweiten Gipfel um das 50. Lebensjahr (DGGG, 2008; Hampl et al., 2008a; Judson et al., 2006; Statistisches Bundesamt, 2010).

1.1.2 Risikofaktoren

Gesicherte Risikofaktoren für die Entwicklung eines Vulvakarzinoms sind in jüngerem Lebensalter eine persistierende Infektion mit Humanen Papillomaviren (HPV) und in höherem Lebensalter der *Lichen sclerosus*. Darüber hinaus finden sich Risikofaktoren wie Immunsuppression, Nikotinabusus und nordeuropäische Abstammung (Ansink, 1996; Madeleine et al., 1997; Madsen et al., 2008).

Die vulväre intraepitheliale Neoplasie (VIN) gilt als Vorstufe des Vulvakarzinoms (Ansink, 1996; Madeleine et al., 1997) und ist mit einer Inzidenz von etwa 7/100.000 Frauen die häufigste präinvasive Erkrankung der Vulva. Seit den 1970er Jahren hat sich die Inzidenzrate mehr als verzehnfacht (DGGG, 2008; Sturgeon et al., 1992). Dieser deutliche Anstieg, vor allem bei Frauen unter 65 Jahren (Jones et al., 2005), wird hauptsächlich auf die gestiegene Inzidenz von HPV-Infektionen sowie die Nutzung der gynäkologischen Vorsorgeuntersuchungen und damit einhergehende frühzeitige Diagnosestellung zurückgeführt.

1.1.3 Die Rolle Humaner Papillomaviren

Humane Papillomaviren (HPV) gehören zur Gruppe der DNA-Viren. Mit über 100 beschriebenen Subtypen können sie Haut und Schleimhaut infizieren und eine gesteigerte Proliferation der Epithelzellen verursachen. Dadurch können sowohl gutartige Läsionen wie *Condylomata acuminata* als auch prä maligne intraepitheliale Läsionen und Malignome verursacht werden. Diese treten vor allem im anogenitalen sowie oropharyngealen Bereich auf. Nahezu alle zervikalen intraepithelialen Neoplasien und Zervixkarzinome werden von HPV verursacht. Aber auch vulväre Neoplasien entstehen in bis zu 50 % der Fälle auf dem Boden einer HPV-Infektion. Insgesamt sind HPV für rund 5 % aller neu aufgetretenen Malignome verantwortlich und damit eine der häufigsten infektiösen Ursachen von Krebs (Madsen et al., 2008; Muñoz et al., 2003; Parkin, 2006; Schiffman et al., 2007). Die Infektion erfolgt über direkten Haut- und Schleimhautkontakt,

hauptsächlich beim Sexualverkehr. Es besteht eine sehr hohe Lebenszeitprävalenz von 80-90 %, allerdings heilt die Infektion bei guter Immunlage und jungem Lebensalter in der überwiegenden Anzahl der Fälle innerhalb von Monaten folgenlos ab. Bei Persistenz der HPV-Infektion sinkt die Wahrscheinlichkeit einer Spontanremission jedoch, und das Risiko, an den oben genannten Tumoren zu erkranken, steigt (Robert Koch-Institut, 2012; Sotlar, 2008).

Verschiedene HPV-Genprodukte, vor allem die Proteine E6 und E7, begünstigen durch Verhinderung von regelrechter Zellapoptose und Reparatur von DNA-Schäden über mehrere Jahre hinweg eine maligne Transformation von Epithelzellen (Sotlar, 2008). Die Subtypen der HP-Viren werden nach ihrem onkogenen Potenzial in Hoch- und Niedrigrisikogruppen eingeteilt. Die Hauptvertreter der *low-risk* HPV (lrHPV), die hauptsächlich *Condylomata acuminata* verursachen, sind die Subtypen 6 und 11. Die wichtigsten Subtypen der *high-risk* HPV (hrHPV) sind 16, 18, 31 und 33 (Muñoz et al., 2003). Vor allem HPV 16 scheint eine kritische Bedeutung bei der Progression zu invasiven Neoplasien zuzukommen, da es im Gegensatz zu anderen *high-risk*-Subtypen in nahezu allen hochgradigen, aber nur in sehr wenigen geringgradigen VIN nachzuweisen ist (Srodon et al., 2006).

1.1.4 Ätiologie und Pathogenese

Dass, wie oben beschrieben, nur etwa der Hälfte aller vulvären Plattenepithelkarzinome eine HPV-Infektion zugrunde liegt, spricht für zwei verschiedene, distinkte Ätiologien bei der Tumorgenese mit jeweils unterschiedlichen Vorläuferstadien (siehe Abb. 1).

Während der hrHPV-abhängige Anteil der Vulvakarzinome vor allem bei jüngeren Frauen vorkommt und mit der klassischen, oder *usual*, VIN (uVIN) sowie Multifokalität einhergeht, entsteht der andere, größere Teil HPV-unabhängig auf dem Boden chronischer Entzündungen. Dies betrifft hauptsächlich postmenopausale Frauen. Als Vorläuferstadium wurde die unifokale differenzierte VIN (dVIN) auf dem Boden eines *Lichen sclerosus* beschrieben (DGGG, 2008; Hampl et al., 2006; Kokka et al., 2011; Madsen et al., 2008; Ueda et al., 2011; van de Nieuwenhof et al., 2008). HPV-abhängige und -unabhängige Vulvakarzinome unterscheiden sich jedoch nicht bezüglich ihrer Prognose (Alonso et al., 2011).

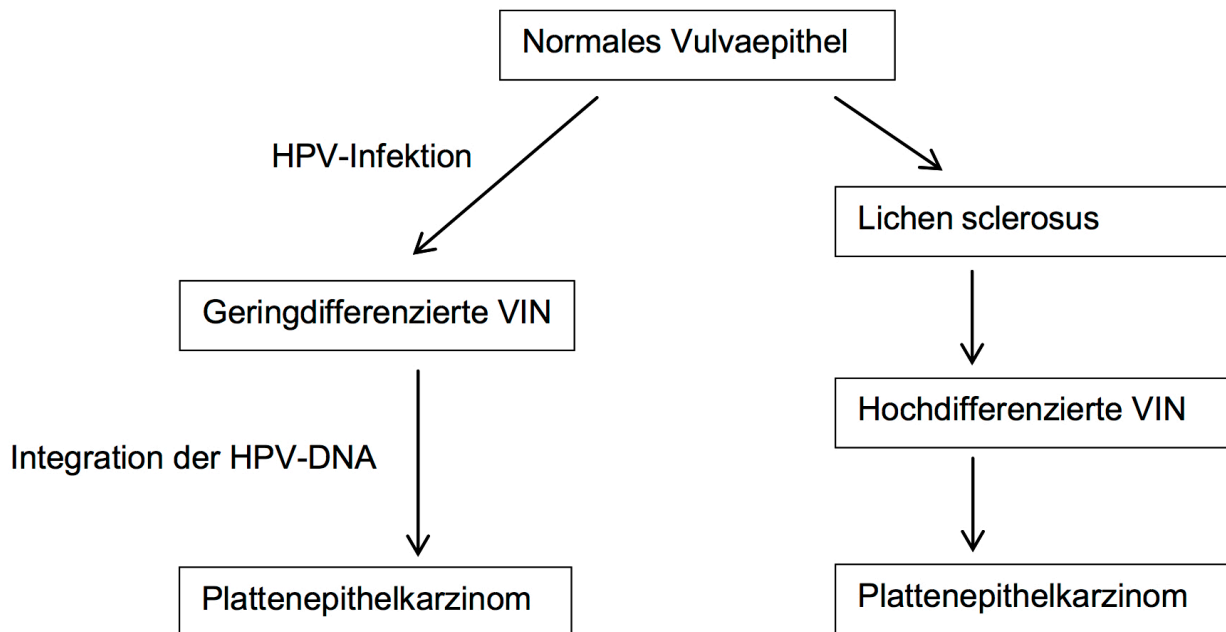


Abb. 1: Die Pathogenese des Vulvakarzinoms von normalem Plattenepithel über Vorläuferläsionen (Vulväre intraepitheliale Neoplasien, VIN) zum invasiven Karzinom (nach Ueda et al., 2011)

Die Progressionsrate von einer VIN zum invasiven Karzinom beträgt unbehandelt 9 % und unter Behandlung 3,8-6,5 % (Jones et al., 2005; van Seters et al., 2005). Die histopathologische Unterscheidung der HPV- und nicht-HPV-assoziierten Neoplasien und ihrer Vorläuferläsionen kann durch die immunhistochemische Färbung mit p16^{INK4a} gestützt werden (Santos et al., 2006; siehe auch Kapitel 1.4.1 p16^{INK4A}).

1.1.5 Prävention und Früherkennung

Die primäre Prävention der VIN und damit des Vulvakarzinoms besteht in der Verhinderung einer genitalen Infektion mit HPV (Hampl et al., 2006). Seit 2006 stehen zwei Totimpfstoffe zur Verhinderung einer Infektion mit verschiedenen hrHPV-Subtypen, unter anderem 16 und 18, zur Verfügung. Diese sollen laut Empfehlung der Ständigen Impfkommission (STIKO) allen Mädchen bis zum 18. Lebensjahr und wenn möglich vor dem ersten Geschlechtsverkehr verabreicht werden (Robert Koch-Institut, 2011b). In diesem Kollektiv sollen sie einen nahezu 100%igen Impfschutz gegen die Entwicklung einer

Impftyp-assoziierten Dysplasie und Neoplasie bieten (Villa et al., 2006). Bei einer flächendeckenden Primärprävention sollen so bis zu 90 % der VIN und bis zu 60 % der Vulvakarzinome verhindert werden können (DGGG, 2008).

Die sekundäre Prävention besteht in der frühzeitigen Diagnostik und sanierenden Behandlung präinvasiver Läsionen. In Ermangelung einer etablierten Screeningmethode bietet jedoch einzig die eingehende Untersuchung der Vulva, die obligater Bestandteil der jährlich vorgesehenen gynäkologischen Vorsorgeuntersuchung ist, die Möglichkeit zur Früherkennung. Allerdings ist die Teilnahmerate gerade postmenopausaler Frauen an der Vorsorge noch niedriger als der allgemeine Durchschnitt von 50 % und nimmt mit zunehmendem Alter immer weiter ab (Tumorzentrum Erlangen-Nürnberg, 2011). Dies ist besonders problematisch, da in dieser Altersgruppe die Inzidenz der VIN und des Vulvakarzinoms deutlich zunimmt.

1.1.6 Diagnostik

Es existiert kein pathognomisches klinisches Bild des Vulvakarzinoms. Typische, aber unspezifische Frühsymptome beinhalten genitalen Pruritus, perineale Schmerzen und Dysurie. Ein Teil der Patientinnen entdeckt selbst sicht- oder tastbare Hautveränderungen. Blutungen oder Fluor sind selten. Etwa die Hälfte aller Patientinnen mit VIN ist bei Diagnosestellung symptomfrei (DGGG, 2008).

Eine komplette klinische Untersuchung von Vulva, Vagina, Zervix und Leisten ist unentbehrlich (Hampl et al., 2006). Besonders bei HPV-assoziierten Veränderungen ist Multifokalität häufig. Die Labia majora sind die häufigste Lokalisation von VIN und Vulvakarzinom, danach in absteigender Reihenfolge Klitoris, Labia minora, Perineum, Periurethralregion und Bartholini'sche Drüse. Schnelle Größenprogredienz, Ulzeration, unscharfe und asymmetrische Begrenzung sowie fehlendes Ansprechen auf konservative Therapie deuten auf einen malignen Befund hin (DGGG, 2008).

Eine Vulvoskopie, ggf. mit Applikation von Essigsäure, kann die klinische Untersuchung ergänzen. Insbesondere der Stanzbiopsie kommt eine hohe Bedeutung zu (DGGG,

2008). Hierbei kann bei Nachweis eines malignen Befunds auch das Ausmaß der Stromainvasion beurteilt werden.

1.1.7 Staging

Prätherapeutisch werden folgende klinische Befunde erhoben:

- Bestimmung der Tumorlokalisierung und -ausdehnung, Invasionstiefe sowie Ausschluss von Multizentrität oder Zweitkarzinom durch vollständige klinische und histologische Untersuchung.
- Bestimmung des klinischen Lymphknotenstatus durch Palpation und Sonografie (Abang et al., 2000; Arango et al., 2000).
- Bei klinisch fortgeschrittenen Tumoren sollten eine Zysto- sowie eine Rektoskopie erfolgen.
- Eine routinemäßige radiologische Diagnostik wird aufgrund unzuverlässiger Vorhersagen nicht verlangt, insbesondere beim Verdacht auf fortgeschrittene Tumorstadien aber häufig durchgeführt (DGGG, 2008; Zeppernick et al., 2013).
- Eine Suche nach Fernmetastasen ist ausschließlich bei fortgeschrittenen Tumoren indiziert (Hacker et al., 1983a).

Nach der histologischen Sicherung stellt die Tumorexzision die Therapie und gleichzeitig das Staging dar. Die klinischen Befunde werden durch folgende histopathologische Angaben ergänzt (DGGG, 2008):

- Tumortyp und -stadium, Grading, Gefäß- und Lymphgefäßeinbruch, Resektionsklassifikation und Breite des Resektionsrands.
- Bei inguino-femorale Lymphonodektomie Zahl der untersuchten und der befallenen Lymphknoten sowie Größe der Lymphknotenmetastasen und etwaige Kapselüberschreitung.
- Fernmetastasierung, zu welcher auch befallene pelvine retroperitoneale Lymphknoten zählen.

Die Einteilung des Krankheitsstadiums erfolgt über die TNM-Klassifikation sowie gemäß den Kriterien der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) (Tab. 1).

Tab. 1: TNM/FIGO-Stadien-Klassifikation der Vulvakarzinome (aus Horn et al., 2010).

TNM-Kategorien	FIGO-Stadien	Definition
TX		Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0		Kein Anhalt für Primärtumor
Tis		Carcinoma in situ (präinvasives Karzinom), vulväre intraepitheliale Neoplasie (VIN) 3
T1	I	Tumor begrenzt auf Vulva oder Vulva und Perineum
T1a	IA	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung, Stromainvasion nicht größer als 0,1 cm ^a
T1b	IB	Tumor mehr als 2 cm in größter Ausdehnung oder Stromainvasion >0,1 cm ^a
T2	II	Tumor infiltriert eine der folgenden Strukturen: unteres Drittel der Urethra, unteres Drittel der Vagina, Anus
T3 ^b	IVA	Tumor infiltriert eine der folgenden Strukturen: obere zwei Drittel der Urethra, obere zwei Drittel der Vagina, Blasenschleimhaut, Rektumschleimhaut, oder ist an Beckenknochen fixiert
^a Die Invasionstiefe ist definiert als Ausmaß der Tumorausdehnung, gemessen von der Epithel-Stroma-Grenze der angrenzenden oberflächlichsten dermalen Papille bis zum tiefsten Punkt der Invasion. ^b Die T3-Kriterien werden in der FIGO-Klassifikation nicht benutzt, sie werden dort als T4 klassifiziert.		
N – Regionäre Lymphknoten		
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden	
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen	
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen mit folgenden Eigenschaften:	
N1a	Eine oder 2 Lymphknotenmetastase(n), jede kleiner als 0,5 cm	
N1b	Eine Lymphknotenmetastase 0,5 cm oder größer	
N2	Regionäre Lymphknotenmetastasen mit folgenden Eigenschaften:	
N2a	3 oder mehr Lymphknotenmetastasen, jede kleiner als 5 mm	
N2b	2 oder mehr Lymphknotenmetastasen, 5 mm oder größer	
N2c	Lymphknotenmetastasen mit extrakapsulärer Ausbreitung	
N3	Fixierte oder ulzerierte regionäre Lymphknotenmetastasen	
M – Fernmetastasen		
M0	Keine Fernmetastasen	
M1	Fernmetastasen (einschließlich Beckenlymphknotenmetastasen)	

1.1.8 Prognose

Bei den mikroinvasiven Vulvakarzinomen (pT1a) ist der Resektionsabstand der entscheidende Prognosefaktor in Bezug auf Rezidivfreiheit und Gesamtüberleben. Die Relevanz von Lymphgefäßeinbrüchen ist nicht abschließend geklärt (Yoder et al., 2008).

Ab dem Stadium pT1b sind folgende Prognosefaktoren entscheidend:

- Tumorstadium; die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 77,7 % bei pT1-Karzinomen und 13,1 % bei pT4-Karzinomen (Beller et al., 2006).
- Multifokalität als prognostisch ungünstiger Faktor (Preti et al., 2000).
- Inkomplette Resektion oder ein Resektionsrand < 8-10 mm gehen mit erhöhter Lokalrezidivrate einher (Preti et al., 2000).
- Grading; eine hohe bis mäßige Differenzierung (G1-2) geht mit einer besseren Prognose einher als eine schlechte Differenzierung (G3) (Preti et al., 2000).
- Lymphgefäßeinbrüche weisen eine Korrelation mit höherem Tumorstadium und positivem Lymphknotenstatus auf, haben als eigenständiger Faktor aber nur bei nodal-negativen Tumoren eine prognostische Relevanz (Preti et al., 2000; Raspagliesi et al., 2006).
- Tumore mit assoziierter VIN haben eine höhere Rezidivrate (Yoder et al., 2008).
- Bei nodal metastasierten Vulvakarzinomen sinkt die 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate unabhängig vom Tumorstadium von 80,7 % auf 62,9 %; bei mehr als zwei befallenen Lymphknoten beträgt sie unter 30 % (Beller et al., 2006; Raspagliesi et al., 2006).

1.1.9 Therapie

Die Entfernung des Vulvakarzinoms erfolgt durch eine lokale radikale Exzision („partielle Vulvektomie“), oder eine „radikale Vulvektomie“ mit Resektion der Labia majora und minora, der Klitoris und der hinteren Kommissur. Bei der operativen Therapie des Vulvakarzinoms ist zur Vermeidung von Lokalrezidiven eine Resektion mit einem tumor- und VIN-freien Rand von mindestens 10 mm anzustreben (Heaps et al., 1990).

Der Lymphabfluss der Vulva erfolgt über die oberflächlichen inguinalen Lymphknoten. Die Infiltrationstiefe des Tumors weist eine Korrelation mit dem Vorkommen einer nodalen Metastasierung auf. Im Stadium pT1a ist eine Metastasierung praktisch ausgeschlossen

(DGGG, 2008; Hacker et al., 1983b). Ab dem Stadium pT1b (makroinvasives Karzinom) ist dagegen eine inguino-femorale Lymphonodektomie (LNE) obligat. Dabei sollen auf jeder Seite mindestens 6 Lymphknoten entfernt und histologisch untersucht werden. Nur bei streng lateral lokalisierten Tumoren (Abstand zur Mittellinie > 10 mm) reicht eine ipsilaterale Lymphonodektomie aus (DGGG, 2008; Zeppernick et al., 2013).

Die inguino-femorale LNE weist eine hohe Komplikationsrate auf. Am häufigsten sind Lymphödeme (20-69 %), Wundheilungsstörungen (14-44 %) und Lymphozelen (30 %). Daher kann eine Sentinel-LNE erwogen werden, bei der der erste drainierende Lymphknoten des Tumorgebiets farblich oder radioaktiv markiert, exstirpiert und histopathologisch untersucht wird. Finden sich hier keine metastatischen Absiedlungen, wird auf eine komplette LNE verzichtet. Der Stellenwert der Sentinel-LNE ist allerdings noch nicht abschließend geklärt (DGGG, 2008).

Eine adjuvante Radiotherapie erfolgt bei R1- oder knapper (Resektionsrand < 10 mm) R0-Situation sowie bei drei oder mehr Lymphknotenmetastasen, Metastasengröße > 10 mm und Kapselüberschreitung. Bei pN0 wird immer, bei 1-2 befallenen Lymphknoten mehrheitlich auf die postoperative Radiatio verzichtet (Barnes und Thomas, 2006).

Eine neoadjuvante Radiochemotherapie ist nur bei fortgeschrittenen Tumoren zum Erreichen von Operabilität und Kontinenzhaltung indiziert (DGGG, 2008).

In Palliativsituationen kann eine alleinige primäre Chemotherapie erwogen werden, es existieren jedoch diesbezüglich aufgrund mangelnder Datenlage keine klaren Empfehlungen (Zeppernick et al., 2013).

1.1.10 Nachsorge

Ziel der Nachsorge ist die frühzeitige Diagnose und Therapie von Rezidiven (Tertiärprophylaxe). Hierbei werden eine krankheitsspezifische Symptomanamnese, eine klinische Untersuchung mit fakultativer Vulvoskopie und Entnahme von Biopsien sowie bei unklaren und rezidivverdächtigen Befunden eine weiterführende Bildgebung durchgeführt (DGGG, 2008). In Anlehnung an die Rezidivwahrscheinlichkeit erfolgt die Nachsorge in den ersten 3 Jahren engmaschig alle 3 Monate, in den folgenden 2 Jahren dann sechsmonatlich und ab dem 5. Nachsorgejahr jährlich.

1.1.11 Rezidive und Metastasen

Lokalrezidive von Vulvakarzinomen findet man in über 30 % der Fälle. Wurde der geforderte Resektionsabstand von 10 mm nicht erreicht, beträgt die Rezidivrate sogar ca. 50 %. Multifokalität und Lymphgefäßeinbrüche erhöhen das Rezidivrisiko ebenfalls (DGGG, 2008; Heaps et al., 1990). Lymphknoten-Rezidive treten früher auf als Lokalrezidive und sind prognostisch ungünstiger. Generell haben frühe Rezidive eine schlechtere Prognose als spät auftretende (DGGG, 2008; Piura et al., 1993).

Für die Radikalität der Rezidivtherapie gelten die gleichen Prinzipien wie bei der Primärbehandlung. Operative Resektion, Radiatio und Chemotherapie kommen jeweils einzeln oder in Kombination zum Einsatz. Die Anwendung orientiert sich am Allgemeinzustand der Patientin und erfolgt tumoradaptiert (DGGG, 2008; Piura et al., 1993).

1.2 Das immunologische Mikromilieu des Tumors

1.2.1 Die Wechselbeziehung von Immunsystem und Tumor

Es ist seit langem bekannt, dass Infektionen und maligne Erkrankungen in einem direkten Zusammenhang zueinander stehen. Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts postulierte Rudolf Virchow die Existenz eines „Krebsbacillus“ (Virchow, 1888). Tatsächlich konnten Infektionen mit verschiedenen pathogenen Keimen wie *Helicobacter pylori* oder HPV als prädisponierende Faktoren für bestimmte Krebsarten identifiziert werden. So entsteht etwa jede vierte Krebserkrankung auf dem Boden einer chronischen Entzündung und ist damit potenziell vermeidbar (Hussain und Harris, 2007; Parkin, 2006).

Auch unabhängig von einer Virus-assoziierten Tumorgenese scheint das Immunsystem bei vielen Tumorentitäten eine Rolle zu spielen. So konnten sowohl unterschiedliche Immunzellpopulationen wie Leuko- und Lymphozyten, sowie Zyto- und Chemokine in vielen malignen Tumoren nachgewiesen werden (Chen et al., 2005; Ganjoo et al., 2011; Lewis et al., 2006; Steidl et al., 2010). In Abhängigkeit der Immunzellentität und des Milieus können sie die Tumorgenese sowohl unterstützen als auch hemmen. Dementsprechend korrelieren sie entweder mit einer schlechten oder einer günstigen Prognose.

Im Folgenden sollen aus der Vielzahl der mit dem Tumor in Interaktion stehenden Immunzellen immunsupprimierende Faktoren am Beispiel der Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) und der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) betrachtet werden.

1.2.2 Tumor-assoziierte Makrophagen

1.2.2.1 Einteilung und Wirkweise

Makrophagen, die in entzündliches oder tumoröses Gewebe rekrutiert werden, besitzen ein duales Potenzial. Je nach Stimulation durch das Mikromilieu, andere Immun- oder auch Tumorzellen können sie sich zu M1- oder M2-Phänotypen entwickeln.

M1-Makrophagen sind Phagozyten mit einer immunstimulierenden Wirkung auf das umliegende Mikromilieu. Sie produzieren proinflammatorische Zytokine wie Interleukin 12 (IL-12) und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass sie das Tumorwachstum hemmen können (Sinha et al., 2005).

Im Gegensatz dazu wirken M2-Makrophagen und die in ihren Eigenschaften sehr ähnlichen TAMs immunsuppressiv. Durch die Produktion verschiedener Zytokine wie Interleukin 10 (IL-10) und Transformierender Wachstumsfaktor beta ($TGF-\beta$) schützen sie gegen überschießende Entzündungsreaktionen.

1.2.2.2 Die Rolle Tumor-assoziiierter Makrophagen in Neoplasien

TAMs spielen eine wichtige Rolle bei Induktion und Aufrechterhaltung der Immunsuppression im Tumormilieu. Hierbei sezernieren sie das Chemokin (C-C motif) ligand 2 (CCL2), das nicht nur weitere Immunzellen ins Tumorgewebe lockt, sondern ebenfalls die Metastasierung fördert. Insbesondere die hypoxische Mikroumgebung von Neoplasien fördert diese Entwicklung (Balkwill und Mantovani, 2001; Mantovani et al., 1992; Mantovani, 2011; Solinas et al., 2010; Vasievich und Huang, 2011). Darüber hinaus stimulieren TAMs die Lymphangiogenese in der unmittelbaren Tumorumgebung, was der lymphogenen Ausbreitung des Tumors dient (Böhmer et al., 2011).

1.2.2.3 Einfluss auf die Prognose

Die symbiotische Beziehung von Tumor und TAMs führt zu gesteigertem Wachstum und Invasion und damit zu erhöhter Malignität des Tumors. Eine hohe Inzidenz von TAMs

korreliert daher bei diversen Malignomentitäten mit einer schlechten Prognose (Chen et al., 2005; Ganjoo et al., 2011; Steidl et al., 2010).

1.2.3 Regulatorische T-Zellen

1.2.3.1 Einteilung und Wirkweise

T_{reg}-Zellen sind eine Subpopulation von CD4-positiven T-Lymphozyten, die auf ihrer Oberfläche CD25, die α -Kette des Interleukin 2-Rezeptors, exprimieren. Sie unterdrücken die Aktivierung der Immunantwort gegenüber körpereigenen Antigenen und regulieren so die Selbsttoleranz des Organismus. Ihre korrekte Funktionsweise verhindert Autoimmunkrankheiten und Allergien (Ha, 2009; Özdemir et al., 2009). Bei infektiösem Geschehen werden sie vermutlich herunterreguliert und gewährleisten so die angemessene Abwehr von Krankheitserregern.

Mehrere Untergruppen von T_{reg}-Zellen sind an der Immunmodulation beteiligt. Diese können durch spezielle Marker und Zytokinprofile charakterisiert werden: die „klassischen“ T_{reg}-Zellen exprimieren als spezifischen Marker den X-chromosomal kodierten Transkriptionsfaktor Forkhead box P3 (Foxp3) und machen den Großteil der regulatorischen T-Zell-Population aus. Daneben existieren Typ1- und Typ2-T_{reg}-Zellen, Typ3-Helferzellen und Natürliche Killer (NK)-T-Zellen (Ha, 2009). Im Folgenden sollen die CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T_{reg}-Zellen betrachtet werden.

Diese gliedern sich in zwei Untergruppen: Die „natürlich auftretenden“ nT_{reg}-Zellen entstehen zentral im Thymus und werden von dort in die Peripherie ausgeschwemmt, wo sie sich in Lymphknoten und der Milz anreichern. Sie machen etwa 5-10% aller Lymphozyten aus. Die „adaptiven“ oder „induzierbaren“ iT_{reg}-Zellen entwickeln sich dagegen in der Peripherie unter dem Einfluss von verschiedenen Induktoren, vor allem TGF- β und IL-10, aus naiven T-Zellen. T_{reg}-Zellen sind zunächst anerg. Ihre Aktivierung und Proliferation erfolgt erst nach Stimulation mit Interleukin 2 (IL-2), das vor allem von aktivierten T-Effektor-Zellen sezerniert wird (Ha, 2009; Josefowicz und Rudensky, 2009).

T_{reg} supprimieren die Immunantwort über vielfältige Mechanismen, wie der Produktion antiinflammatorischer Zytokine, direkten Zell-Zell-Kontakt und der Regulation antigen-

präsentierender Zellen. Sie beeinflussen damit eine große Zahl verschiedener Zelltypen, insbesondere CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten, Dendritische Zellen, B-Lymphozyten, Makrophagen, Osteoblasten, Mastzellen, NK- und NK-T-Zellen (Curiel et al., 2004; Ha, 2009; Shevach, 2009).

1.2.3.2 Die Rolle der regulatorischen T-Zellen in Neoplasien

T_{reg}-Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Unterhaltung der immunsuppressiven Mikroumgebung maligner Tumore. T_{reg}-Zellen werden aktiv vom Tumor rekrutiert und stimuliert, um die reguläre Immunantwort des Organismus und insbesondere die T-Zell-Aktivierung gegen die Neoplasie zu unterdrücken (Ha, 2009; Schabowsky et al., 2007). Sowohl Tumorzellen als auch tumorinfiltrierende Makrophagen produzieren dabei das Chemokin (C-C motif) ligand 22 (CCL22), welches über den Rezeptor CCR4 auf der Oberfläche von T_{reg}-Zellen deren Einwanderung in die Mikroumgebung des Tumors vermittelt (Curiel et al., 2004; Shevach, 2004; Vasievich und Huang, 2011). Die tumorinfiltrierenden T_{reg}-Zellen zeigen eine verminderte Apoptose- und eine erhöhte Proliferationsrate, was zu einer Akkumulation innerhalb des Tumors führt (Lutsiak et al., 2008).

1.2.3.3 Einfluss auf die Prognose

Die vermehrte Präsenz von T_{reg}-Zellen in der Tumorumgebung wie auch im peripheren Blut steht bei diversen Malignomen in einem antiproportionalen Zusammenhang zur Prognose des Patienten, unabhängig von Staging und chirurgischer Reduktion der Tumormasse (Beyer und Schultze, 2006; Ha, 2009; Shevach, 2004). Foxp3 als spezifischer T_{reg}-Marker ist beispielsweise beim Mammakarzinom ein prognostischer Faktor für Invasivität und Metastasierungshäufigkeit sowie insgesamt für ein schlechteres Gesamtüberleben. Zusätzlich zu der Unterdrückung der Immunantwort könnte die Expression von Foxp3 auf T_{reg}-Zellen daher mit dem Metastasierungspotential des Tumors in Verbindung stehen (Lu, 2009; Merlo et al., 2009).

1.3 Immunhistochemische Färbungen

1.3.1 p16^{INK4A}

Der *cyclin dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A oder p16^{INK4a}) ist ein Tumorsuppressorgen. Das kodierte Protein reguliert durch Bindung an die Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 den Zellzyklus (Liggett und Sidransky, 1998; NCBI, 2012a). Mutationen in diesem Gen und eine veränderte Expression des Genproduktes gehen mit der Karzinogenese verschiedener Tumorarten einher (Chung, 2010; Liggett und Sidransky, 1998). In HPV-assoziierten Läsionen wird es paradox überexprimiert und kann dadurch HPV-induzierte von nicht-HPV-induzierten Vulvakarzinomen unterscheiden. Immunhistochemisch zeigt sich eine diffus-ubiquitäre Positivität von p16^{INK4a} in HPV-assoziierten Karzinomen; chronisch-entzündliche Läsionen im Sinne eines *Lichen sclerosus* sind p16^{INK4a}-negativ oder allenfalls fokal positiv (O'Neill und McCluggage, 2006; Riethdorf et al., 2004). Sensitivität und Spezifität der p16^{INK4a}-Färbung für vulväre HPV-assoziierte Karzinome sind mit 100 % bzw. 98,7 % hoch (Santos et al., 2006).

1.3.2 Foxp3

Foxp3 ist ein essentieller Transkriptionsfaktor im Zellkern, der die Entwicklung von naiven T-Zellen zu T_{reg}-Zellen bewirkt. Zudem spielt er eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung und Funktionalität der Zellen. So verhindert er die Entwicklung zu T-Effektor-Zellen und vermittelt die Abhängigkeit von Interleukin 2 (IL-2) sowie anderen Wachstumsfaktoren (Josefowicz und Rudensky, 2009). Er ist spezifisch für regulatorische T-Zellen und kann daher zu deren Nachweis benutzt werden (Beyer und Schultze, 2006; Kryczek et al., 2009; NCBI, 2012b).

1.3.3 CD163

Das Oberflächenantigen CD163 wird exklusiv von bestimmten gewebsansässigen (*resident*) Makrophagen und M2-Makrophagen exprimiert. Nach Aktivierung durch Interleukine vermittelt es die Endozytose von Hämoglobin/Haptoglobin-Komplexen im Blutplasma. Darüber hinaus produzieren diese Makrophagen immunsupprimierende Zytokine und bewirken damit die Regulation von Entzündungsreaktionen (Akila et al., 2012; NCBI, 2012d; van den Heuvel et al., 1999; Zwadlo, 1987). Er kann für den immunhistochemischen Nachweis von M2-Makrophagen bzw. TAMs genutzt werden.

1.3.4 CD31

Das *platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM-1 oder CD31) befindet sich an der Oberfläche von Zellen hämatopoetischer Linien sowie auf Endothelzellen, wo es haptotaktisch die Leukozytenmigration, beispielsweise bei inflammatorischem Geschehen, begünstigt. CD31 dient im Kontext maligner Prozesse vor allem zum Nachweis einer Neoangiogenese (NCBI, 2012c).

1.3.5 D2-40

D2-40 wird spezifisch auf lymphatischem Endothel exprimiert. Es dient als Marker für die Lymphgefäßdichte und unterstützt die Diagnose maligner Lymphgefäßinvasion. Sowohl Sensitivität als auch Spezifität sind höher als bei alleiniger HE-Färbung. So stellt die D2-40-basierte Lymphgefäßinvasion beim Vulvakarzinom einen guten Prädiktor für die inguinale Lymphknotenmetastasierung dar (Braun et al., 2009; Kahn und Marks, 2002; Weber et al., 2012).

1.4 Zielsetzung

Das Vulvakarzinom ist ein seltenes Malignom des weiblichen Genitaltrakts. Dennoch bedeutet seine Diagnose und Therapie oft eine starke Belastung für die betroffene Frau. Es werden daher zunehmend weniger radikale Operationsmethoden und schonendere Therapiemodalitäten entwickelt, die bei gleicher onkologischer Sicherheit die Morbidität reduzieren. Eine auf spezifischen Tumorcharakteristika basierende, individualisierte Therapie könnte die derzeitige Standardtherapie in ihrer Effektivität unterstützen und insbesondere bei fortgeschrittenen und rezidierten Karzinomen eine Hilfe sein.

Trotz einer etablierten Leitlinie zu Diagnose und Therapie ist das Wissen um solche prognostischen Faktoren beschränkt und teilweise inkonsistent (Woelber et al., 2009). Weiterhin sind die der Leitlinie zugrundeliegenden Studien auf klinische und histopathologische Faktoren beschränkt. Erst in den letzten Jahren ermöglichte der Fortschritt der Forschung eine Analyse der Wechselwirkung des Tumors und seines Mikromilieus. Es geraten daher neben den „klassischen“, bereits in der Leitlinie etablierten Diagnose- und Prognoseparametern des Vulvakarzinoms zunehmend molekularpathologische und immunhistochemische Marker ins Blickfeld der Forschung. Wegen der im Vergleich zu

anderen malignen Erkrankungen geringen Inzidenz des Vulvakarzinoms existieren bislang nur wenige Studien zur Beurteilung der diagnostischen und prognostischen Wertigkeit dieser Marker.

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, die Rolle des immunologischen Milieus in der Tumorbilogie des Vulvakarzinoms anhand spezifischer immunsupprimierender Zellpopulationen zu analysieren und deren prognostische Wertigkeit im Vergleich zu bereits etablierten Faktoren zu evaluieren.

2. Material und Methoden

2.1 Kollektiv

Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Studie sind 50 Patientinnen mit invasiven vulvären Plattenepithelkarzinomen, die im Zeitraum von 01/2002 bis 09/2009 in der Frauenklinik des Universitätsklinikums Bonn diagnostiziert und therapiert wurden. Es wurden nur Patientinnen eingeschlossen, die zusätzlich zur Vulvektomie eine inguinale Lymphonodektomie erhalten hatten.

Die histopathologischen Befunde sowie Informationen zu Anamnese, Vorerkrankungen, Risikofaktoren, Operation und Weiterbehandlung wurden aus den archivierten Krankenakten der Patientinnen gewonnen.

Für das klinische Follow-up wurden Nachsorgedaten aus der Universitätsfrauenklinik Bonn, von weiterbehandelnden Haus- und Frauenärzten und in Telefoninterviews eingeholt.

Endpunkte des Follow-ups waren das Auftreten eines Rezidivs, Tod oder der letzte Kontakt. Das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben waren definiert als das Intervall zwischen der Operation und dem Tod der Patientin bzw. dem Auftreten eines Rezidivs. Wenn kein Rezidiv diagnostiziert wurde, wurden die Patientinnen am Todestag oder am Datum des letzten Kontakts zensiert.

2.2 Klinische, histologische und immunhistochemische Variablen

Es wurden folgende klassische Variablen ausgewählt, deren Einfluss auf die Prognose als etablierter Goldstandard analysiert wurde: Alter bei Operation, Risikofaktoren, TNM-Klassifikation, Infiltrationstiefe, chirurgische Resektion und der dabei erreichte tumorfreie Resektionsrand sowie Lymphgefäßinfiltration.

Weiterhin wurden folgende immunhistochemischen Färbungen angewandt und deren prognostische Wertigkeit für das Vulvakarzinom untersucht:

- p16^{INK4a} (CINtec® Histology Kit, Roche, Basel, Schweiz)
- CD163 (Klon 10D6; monoklonaler Maus IgG Isotyp; Verdünnung 1:1250; Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)
- Foxp3 (Klon 236A/E7; monoklonaler Maus IgG Isotyp; Verdünnung 1:150; Abcam, Cambridge, Großbritannien)
- CD31 (Klon JC70A; monoklonaler Maus IgG Isotyp; Verdünnung 1:100; Dako, Hamburg, Deutschland)
- D2-40 (Klon D2-40; monoklonaler Maus IgG Isotyp; Verdünnung 1:50; Covance, Dedham, Massachusetts, USA)

2.3 Färbeverfahren

Das formalinfixierte und in Paraffinblöcken asservierte Tumorgewebe wurde erneut aufbereitet. Anhand von Hämatoxylin-Eosin-gefärbten (H&E) Schnitten wurde für jeden Fall je ein repräsentativer Paraffinblock mit Tumorgewebe ausgewählt. Hiervon wurden 2-3 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Nach Entparaffinisierung und Rehydrierung in der absteigenden Alkoholreihe und anschließendem Überführen in Tris-Puffer wurden die Schnitte mit dem Färbeapparat TechMate 500 der Firma Dako (Hamburg, Deutschland) gefärbt. Als Detektionssystem für p16^{INK4a} diente das CINtec[®] Histology Kit, für die übrigen Färbungen wurde das Streptavidin/HRP-System K5011 von Dako für den TechMate verwendet. Anschließend wurde in allen Fällen mit Hämatoxylin nach Mayer gegengefärbt.

Das CINtec[®] Histology Kit ist ein zweischrittiger immunhistochemischer Assay zum qualitativen Nachweis von p16^{INK4a}. Es verwendet den monoklonalen Maus-Antikörper E6H4TM zur Identifizierung von p16^{INK4}. Nach Epitopdemaskierung werden die Schnitte mit Primärantikörper und anschließend mit dem Polymer-Visualisierungsreagenz inkubiert, die Färbung erfolgt mit einer DAB-Substrat-Chromogenlösung.

Das Detektionssystem K5001 der Firma Dako ist ein dreischrittiges Verfahren, das sich die Labeled streptavidin-biotin (LSAB)-Methode zunutze macht. Es beruht auf der hohen Affinität von Streptavidin zu Biotin. Die Gewebeproben werden nach Epitopdemaskierung zuerst mit Primärantikörper, dann mit biotinmarkierten Sekundärantikörpern und zuletzt mit Streptavidin-Peroxidase inkubiert. Die Färbung erfolgt dann ebenfalls mit einem Substratsystem mit Diaminobenzidin (DAB)-Chromogen.

2.4 Mikroskopie und Bilddokumentation

Die mikroskopische Begutachtung des gefärbten Tumorgewebes wurde mit dem Mikroskop AxioCam MRc und die Bilddokumentation mit der Software AxioVision rel 4.7 durchgeführt. In 400facher Vergrößerung wurden für die Foxp3-Färbung je drei repräsentative intra- und peritumorale/stromale High-Power-Fields (HPFs, Hauptgesichts-

felder) ausgewählt; für CD163, CD31 und D2-40 je drei repräsentative peritumorale/stromale HPFs. Die Analyse von p16^{INK4a} erfolgte am gesamten Tumor.

Zur Erzielung objektiver Ergebnisse wurde die anschließende Auswertung der Färbungen (außer p16^{INK4a}) mit dem Programm AxioVision rel. 4.7 vorgenommen. Dabei musste die auszuwertende Geweberegion zwar manuell umfahren bzw. unerhebliche Stellen ausgeschlossen werden, die quantitative Messung der positiv angefärbten Flächen (sowohl absolut als auch in Relation zur gewerteten Gesamtfläche) erfolgte jedoch automatisiert.

Es wurde für Foxp3, CD31 (Blutgefäßdichte) und D2-40 (Lymphgefäßdichte) die absolute Anzahl positiver Zellen bzw. Gefäße pro HPF erfasst, für CD163 der relative Anteil der positiv angefärbten Zellen an der gewerteten Gesamtfläche. Für p16^{INK4a} wurde semi-quantitativ der Anteil der positiven Zellen an der Gesamtfläche bestimmt.

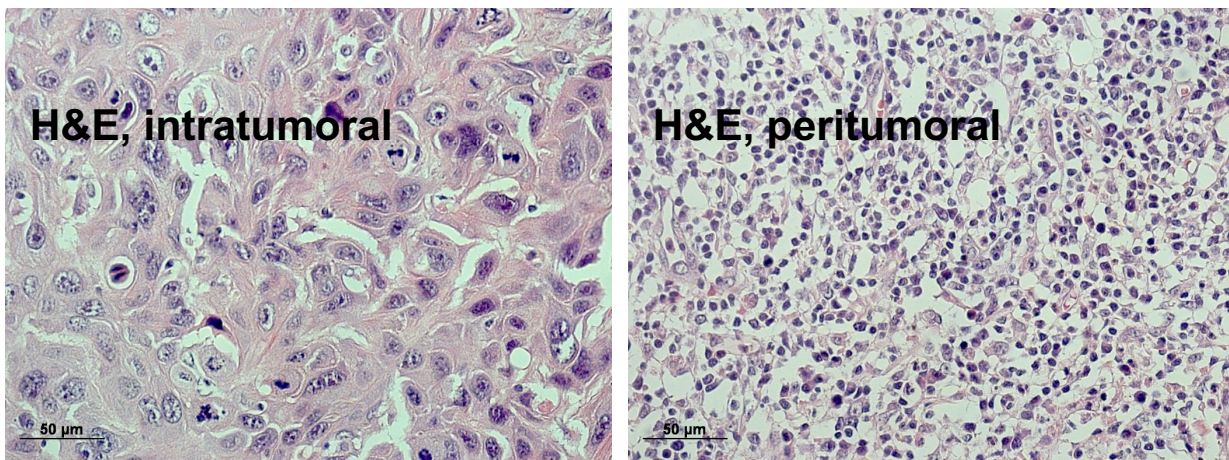


Abb. 2: Repräsentative High-Power-Fields (Hauptgesichtsfelder bei 400facher Vergrößerung) der immunhistochemischen Färbungen (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

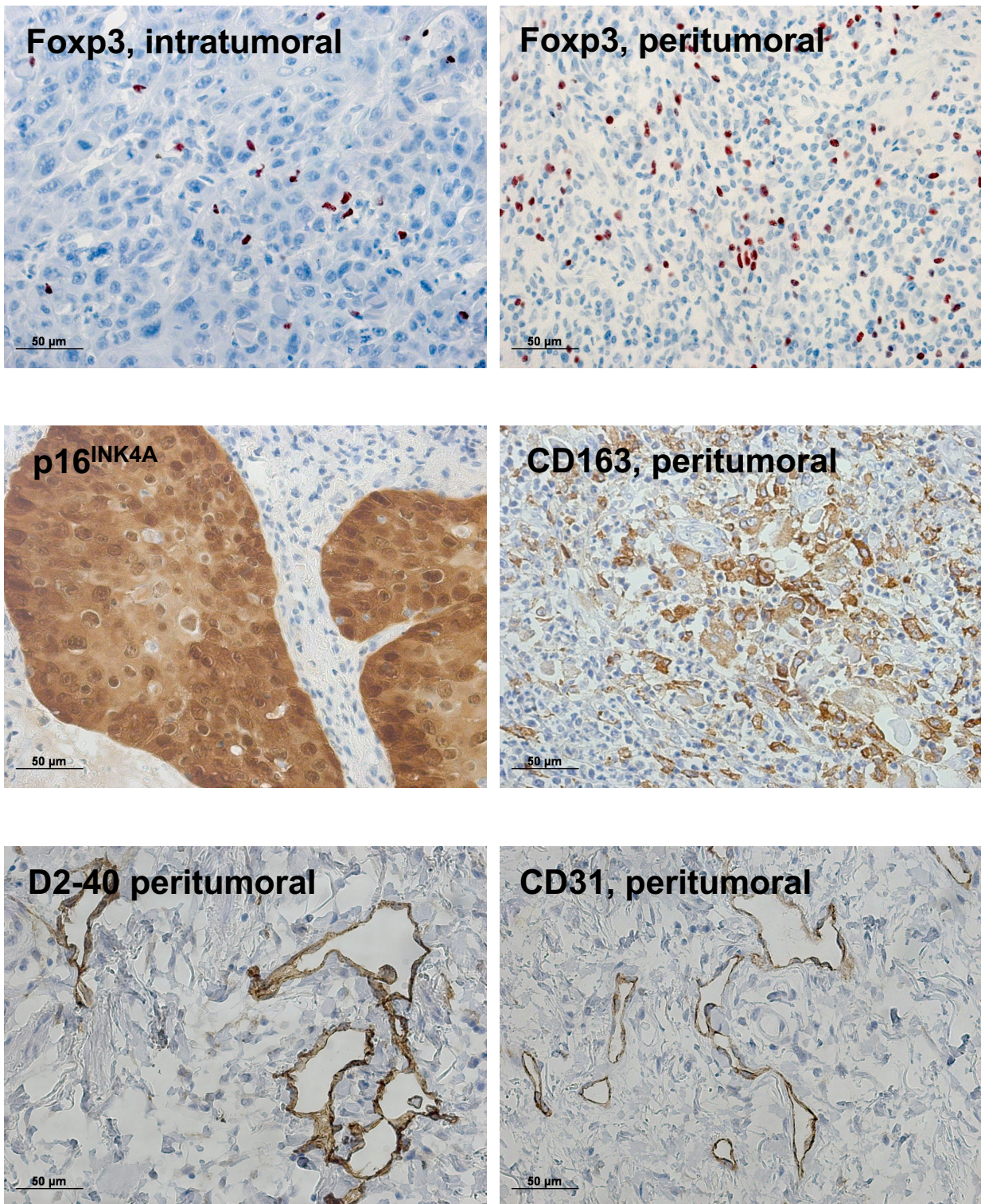


Abb. 2: Repräsentative High-Power-Felder (Hauptgesichtsfelder bei 400facher Vergrößerung) der immunhistochemischen Färbungen (Fortsetzung).

2.5 Statistische Auswertung

Zur Bestimmung der relevanten Einflussgrößen aus den klinischen histopathologischen und immunhistochemischen Variablen auf das Gesamt- und das rezidivfreie Überleben kam für die quantitativen Variablen das Regressionsmodell nach Cox zur Anwendung. Um qualitative Einflussvariablen zu untersuchen, wurden die jeweiligen Kaplan-Meier-Überlebenskurven mit Hilfe des Log-Rank-Tests verglichen. Um den Einfluss der immunhistochemischen Marker grafisch zu veranschaulichen, wurden diese in Binärvariablen gruppiert (ober- bzw. unterhalb des jeweiligen Medians).

In den Signifikanzprüfungen wurde ein p -Wert von $\leq 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

Für die Korrelationsanalyse der immunhistochemischen Marker untereinander wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman verwendet. Hierbei wurde der Zusammenhang in Abhängigkeit vom Korrelationskoeffizienten r_s folgendermaßen interpretiert (vgl. Medistat, 2013):

$0,0 \leq r_s \leq 0,2$	kein bis geringer Zusammenhang
$0,2 < r_s \leq 0,5$	schwacher bis mäßiger Zusammenhang
$0,5 < r_s \leq 0,8$	deutlicher Zusammenhang
$0,8 < r_s \leq 1,0$	hoher bis perfekter Zusammenhang

Die statistische Verarbeitung und Auswertung der klinischen und histologischen Ergebnisse erfolgte mittels der Programme Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA) und SPSS Version 20 (IBM Corp, Armonk, New York, USA).

3. Ergebnisse

3.1 Merkmale des Kollektivs

3.1.1 Verteilung der Fälle im Untersuchungszeitraum

Abbildung 3 zeigt die Verteilung der Fälle über den Untersuchungszeitraum. Es findet sich eine Zunahme der Patientinnen mit der Diagnose eines Vulvakarzinom an der Universitätsfrauenklinik Bonn.

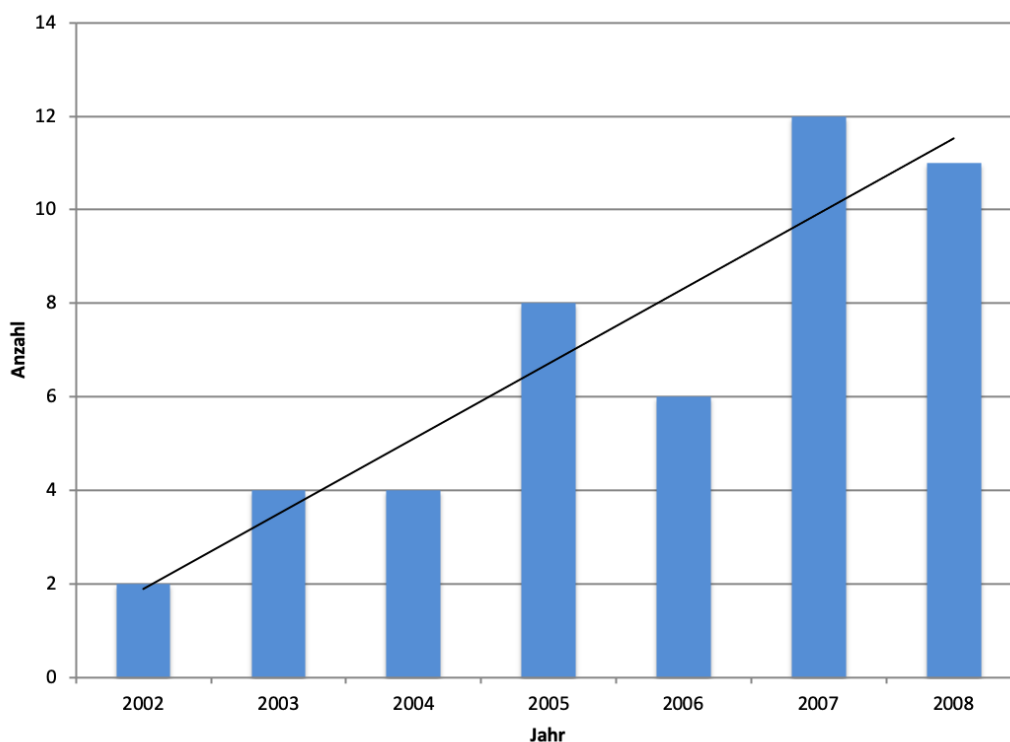


Abb. 3: Verteilung der Fälle im Untersuchungszeitraum mit Trendlinie. Dargestellt sind die Daten von 01/2002 bis 12/2008. Die Daten für das Jahr 2009 werden aufgrund der nicht vollständigen zwölfmonatigen Abdeckung nicht dargestellt.

3.1.2 Alter

Die Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Operation zwischen 33 und 84 Jahre alt. Der Mittelwert und der Median liegen mit 62 bzw. 63 Jahren sehr nah beieinander. Abbildung 4 zeigt die Altersverteilung im Kollektiv mit einem deutlichen Altersgipfel bei 60-69 Jahren.

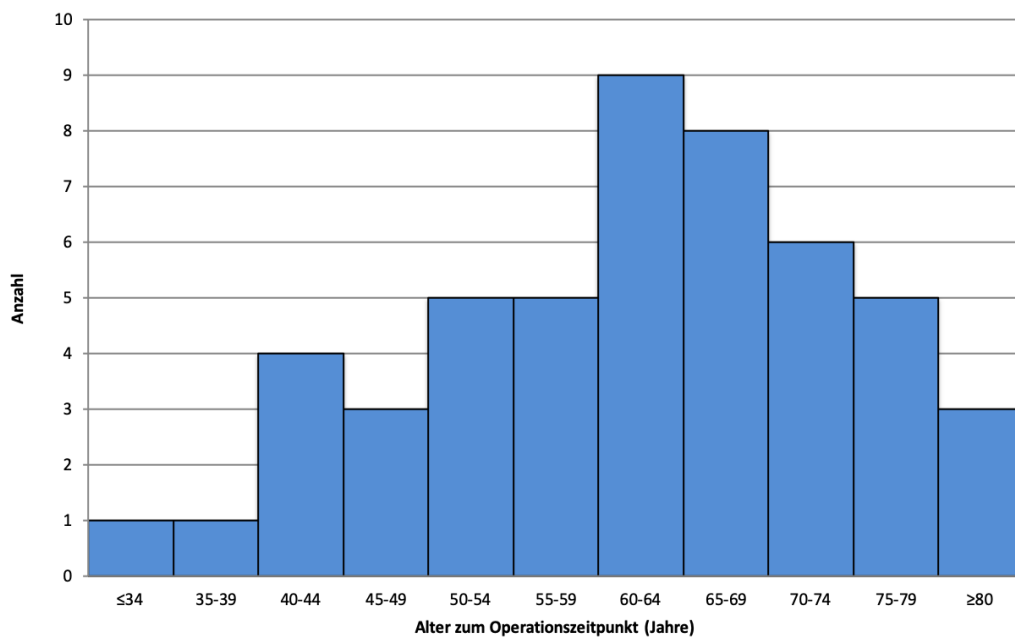


Abb. 4: Altersverteilung im Kollektiv.

Die während des Follow-ups verstorbenen Patientinnen waren im Mittel $67,3 \pm 6,7$ Jahre alt, die überlebenden Patientinnen $60,0 \pm 13,3$ Jahre. Trotz des auch in Abbildung 5 erkennbaren Trends zu erhöhter Letalität im höheren Lebensalter liegt allerdings kein signifikanter Gruppenunterschied zwischen den bei Erstdiagnose jüngeren und den älteren Patientinnen vor.

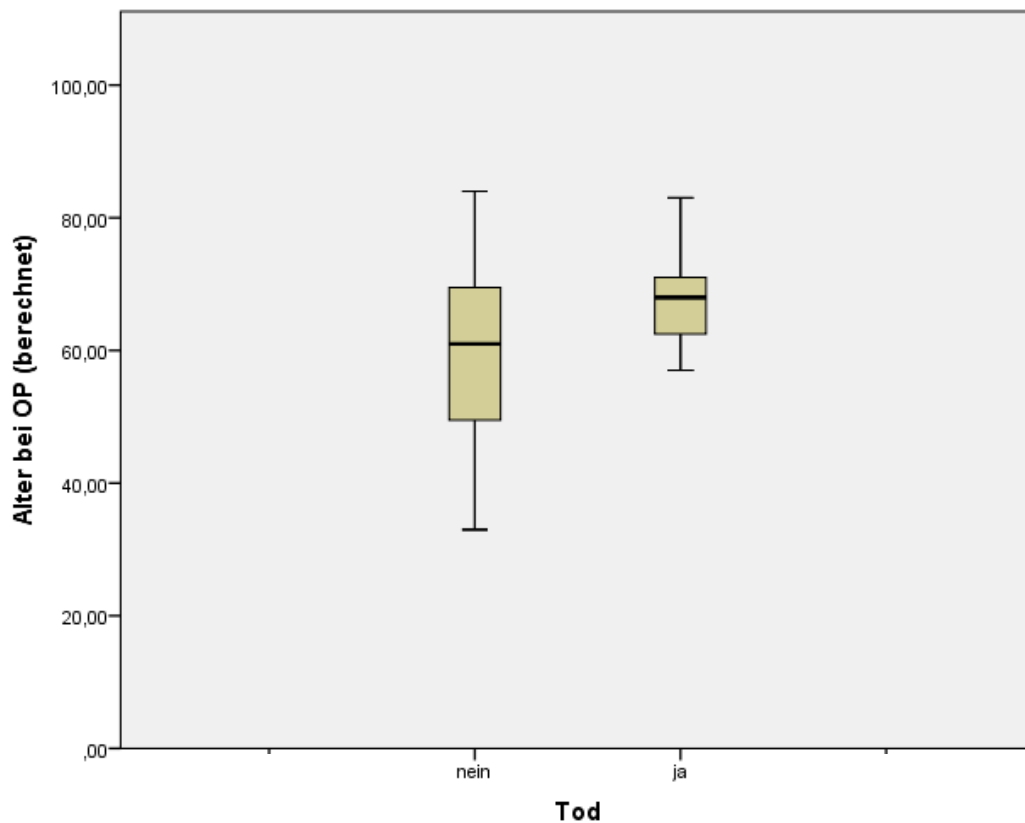


Abb. 5: Altersverteilung der beim letzten Follow-up-Kontakt noch lebenden sowie der verstorbenen Patientinnen.

3.1.3 p16^{INK4a}-positive HPV-Infektion

Bei 15 Patientinnen (30 %) fand sich als Ausdruck einer chronischen HPV-Infektion eine p16^{INK4a}-Positivität.

Die Patientinnen mit einem solchen p16^{INK4a}-positiven Vulvakarzinom waren tendenziell (aber nicht signifikant) jünger als diejenigen ohne p16^{INK4a}-Positivität (59,1 ±11,2 Jahre vs. 63,0 ±12,5 Jahre).

3.1.4 Klinische Parameter

Aus den stationären Unterlagen, Arztbriefen und Anästhesieprotokollen wurden relevante Vorerkrankungen sowie Angaben zu Rauchgewohnheiten gewonnen, aus den OP- und Pathologieberichten die histopathologischen Befunde. Nicht alle Parameter konnten für jede Patientin erfasst werden (Tab. 2).

Tab. 2: Anteil der vollständig erfassten klinischen Parameter am Gesamtkollektiv.

Relevante Vorerkrankungen	100 %
Rauchverhalten	52 %
TNM-Klassifikation	100 %
Lymphgefäßinvasion	88 %
Blutgefäßinvasion	88 %
Minimaler Resektionsrand	98 %
Infiltrationstiefe	80 %
Adjuvante Therapie	100 %

Nur von gut der Hälfte der Patientinnen (52 %) lagen Angaben zu Rauchgewohnheiten vor, von diesen waren 26,9 % Raucherinnen. Im bundesdeutschen Durchschnitt waren im Vergleichszeitraum nur 18,2 % der über 40jährigen Frauen aktive Raucherinnen (Statistisches Bundesamt, 2011).

Als für das Vulvakarzinom relevante Vorerkrankungen wurden Immunsuppression (beispielsweise eine HIV-Infektion oder eine immunsuppressive Medikation nach Transplantation), *Diabetes mellitus*, ein früheres Malignom, *Lichen sclerosus* sowie weitere Dysplasien der Vulva, *Morbus Bowen* und genitale Kondylome erfasst (Tab. 3).

Tab. 3: Anteil der relevanten Vorerkrankungen am Gesamtkollektiv (soweit eruierbar).

Immunsuppression	2 %
Diabetes mellitus	22 %
Malignom in der Anamnese	10 %
Lichen sclerosus	8 %
Vulväre Dysplasie, M. Bowen, Kondylome	10 %
Keine relevanten Vorerkrankungen	54 %

Von den Patientinnen wiesen 27 (54 %) keine dieser Vorerkrankungen auf.

Eine Patientin war immunsupprimiert (2 %); 11 Patientinnen (22 %) litten an einem Diabetes mellitus; 5 Patientinnen (10 %) waren zuvor bereits an einem Malignom erkrankt. Darüber hinaus lag bei 4 Patientinnen bzw. 8 % ein *Lichen sclerosus* der Vulva und bei 5 Patientinnen bzw. 10 % eine Dysplasie der Vulva, ein *M. Bowen* oder Kondylome vor.

3.2 Follow-up

Das klinische Follow-up umfasst ab dem Zeitpunkt der Operation Zeiträume zwischen einem und 108 Monaten, durchschnittlich 34 Monate mit einer Standardabweichung von 27 Monaten, im Median 27 Monate.

3.2.1 Adjuvante Therapie

Etwa die Hälfte der Patientinnen (48 %) unterzog sich einer adjuvanten Strahlentherapie, 14 % erhielten zusätzlich eine Chemotherapie.

3.2.2 Rezidive

Für 32 Patientinnen (64 %) wurde im Follow-up ein rezidivfreies Überleben ermittelt; 13 Patientinnen (26 %) erlitten ein Rezidiv. Wie in Abbildung 6 dargestellt, traten 53,8 % der Rezidive bereits innerhalb des ersten halben Jahres auf. Innerhalb von zwei Jahren wurden etwa drei Viertel (76,9 %) der Rezidive diagnostiziert.

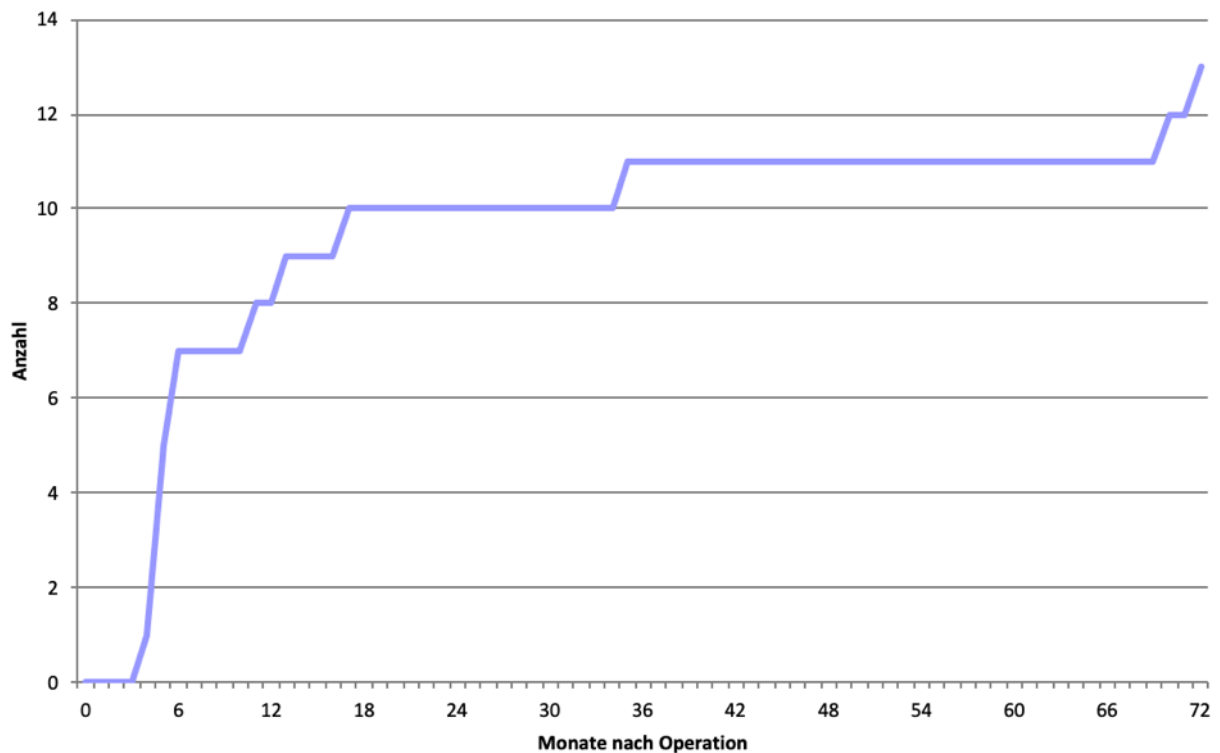


Abb. 6: Auftreten der Rezidive nach der Erstoperation (kumulativ).

Bemerkenswert ist, dass in 2 Fällen das Rezidiv nach etwa 6 Jahren auftrat (70 bzw. 72 Monate nach Erstoperation), obwohl im onkologischen Kontext eine rezidivfreie Überlebenszeit von 5 Jahren als Heilung betrachtet wird. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Nachsorgeuntersuchungen vor allem im ersten Jahr nach Diagnosestellung, aber auch langfristig.

3.2.3 Tod

15 Patientinnen (30 %) starben im Zeitraum des Follow-up. Angaben zu Todesursachen lagen nur in neun Fällen vor. Von diesen wiederum waren nur fünf als karzinomspezifisch beschrieben.

3.3 Selektion der Hauptprognosefaktoren

Die einflussreichsten Prognosefaktoren für das Gesamt- und das rezidivfreie Überleben wurden mittels des Regressionsmodells nach Cox ermittelt. Folgende Variablen wurden berücksichtigt:

- Grading
- Stadium
- Resektionsrand
- Inguinaler Lymphknotenstatus
- Lymphangiosis
- Infiltrationstiefe
- Peritumorale Infiltration mit CD163-positiven TAMs
- Intratumorale Infiltration mit Foxp3-positiven T_{reg}
- Peritumorale Infiltration mit Foxp3-positiven T_{reg}
- Peritumoraler Nachweis CD31-positiver Gefäße (Blutgefäßdichte)
- Peritumoraler Nachweis D2-40-positiver Lymphgefäße (Lymphgefäßdichte)
- Alter zum Operationszeitpunkt

Aufgrund der mit jeweils 4 % sehr niedrigen Prävalenz wurden die Fernmetastasierung und die Gefäßinvasion nicht in die Regressionsanalyse aufgenommen.

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der Signifikanztestung aller eingeschlossenen Variablen jeweils für das Gesamt- und das rezidivfreie Überleben.

Tab. 4: Signifikanztestung des Einflusses verschiedener Variablen auf das Gesamt- und das rezidivfreie Überleben. * $p \leq 0,05$.

Variable			Gesamt- überleben	Rezidivfreies Überleben
			p-Wert	p-Wert
Grading	G1 G2 G3	Log-rank	0,25	0,15
Stadium	T1 T2 T3	Log-rank	0,00007*	0,02*
Minimaler Resektions- rand	R0 \geq 10 mm R0 5-10 mm R0 < 5 mm R1	Log-rank	<0,00001*	0,0002*
Inguinaler Lymphknotenstatus	N0 N1 N2	Log-rank	0,00002*	0,00007*
Lymphangiosis	L0 L1	Kategoriell	0,005*	0,5
Infiltrationstiefe	< 1 mm 1-5 mm 5-10 mm > 10 mm	Log-rank	0,04*	0,04*
CD163 peritumoral (%)		Quantitativ	0,0004*	0,00004*
Foxp3 intratumoral (n)		Quantitativ	0,26	0,49
Foxp3 peritumoral (n)		Quantitativ	0,19	0,74
CD31		Quantitativ	0,23	0,8
D2-40		Quantitativ	0,01*	0,02*
Alter bei OP		Quantitativ	0,06	0,29

Eine Variable wurde als signifikanter Prognosefaktor gewertet, wenn sie einen p -Wert $\leq 0,05$ aufwies. Wie dargestellt waren dies für die Ereignisse Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben folgende Variablen:

Gesamtüberleben	Rezidivfreies Überleben
<ul style="list-style-type: none"> • Stadium • Infiltrationstiefe • Inguinaler Lymphknotenstatus • Resektionsrand • Lymphangiosis • D2-40 (Lymphgefäßdichte) • CD163-positive TAMs peritumoral 	<ul style="list-style-type: none"> • Stadium • Infiltrationstiefe • Inguinaler Lymphknotenstatus • Resektionsrand • D2-40 (Lymphgefäßdichte) • CD163-positive TAMs peritumoral

3.4 Klassische Prognoseparameter

3.4.1 Alter

Das Alter zum Zeitpunkt der Operation ist in der vorliegenden Studie kein signifikanter Prognosefaktor für das Gesamtüberleben ($p=0,06$) und das rezidivfreie Überleben ($p=0,29$).

3.4.2 Stadium

Nur 4 % (entspricht zwei Fällen) der in dieser Studie untersuchten Vulvakarzinome wurden im mikroinvasiven Stadium pT1a diagnostiziert (Abb. 7). Der überwiegende Anteil wurde zu gleichen Teilen im frühinvasiven Stadium (pT1b: 38 %, 19 Fälle; pT1c: 2 %, 1 Fall) sowie im mittlerem Stadium pT2 (40 %, 20 Fälle) entdeckt, zusammen machen diese Stadien 80 % der Fälle aus. Ein ausgedehntes Tumorwachstum (pT3) wurde in 16 % (8 Fälle) diagnostiziert.

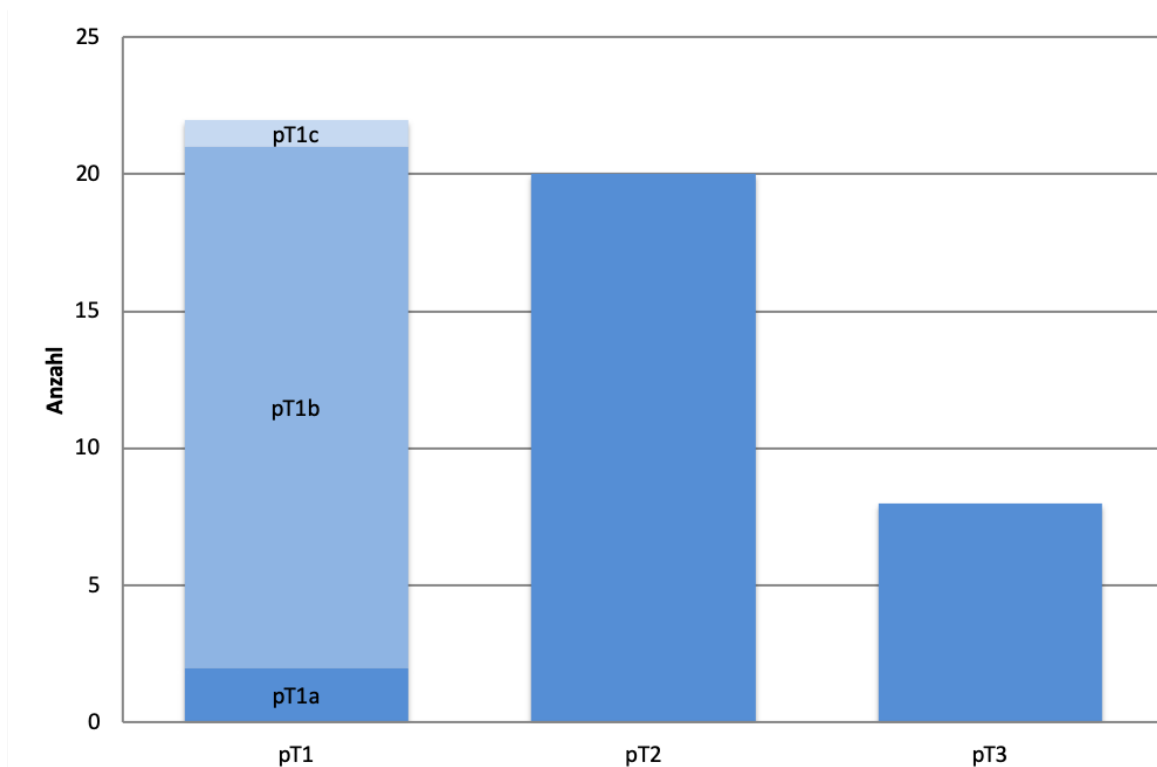


Abb. 7: Häufigkeitsverteilung der Tumorstadien.

Wie in den Abbildungen 8 und 9 erkennbar, ist das Tumorstadium ein signifikanter Parameter sowohl für die Rezidivfreiheit als auch für das Gesamtüberleben. Ein Stadium pT1 weist in unserem Kollektiv ein rezidivfreies Langzeitüberleben von über 90 % auf. Für höhere Stadien beträgt es nur noch um 30 % (rezidivfreies Überleben) bzw. um 50 % (Gesamtüberleben). Das entspricht in etwa den Angaben in der Literatur (vgl. Kapitel 1.1.8 Prognose).

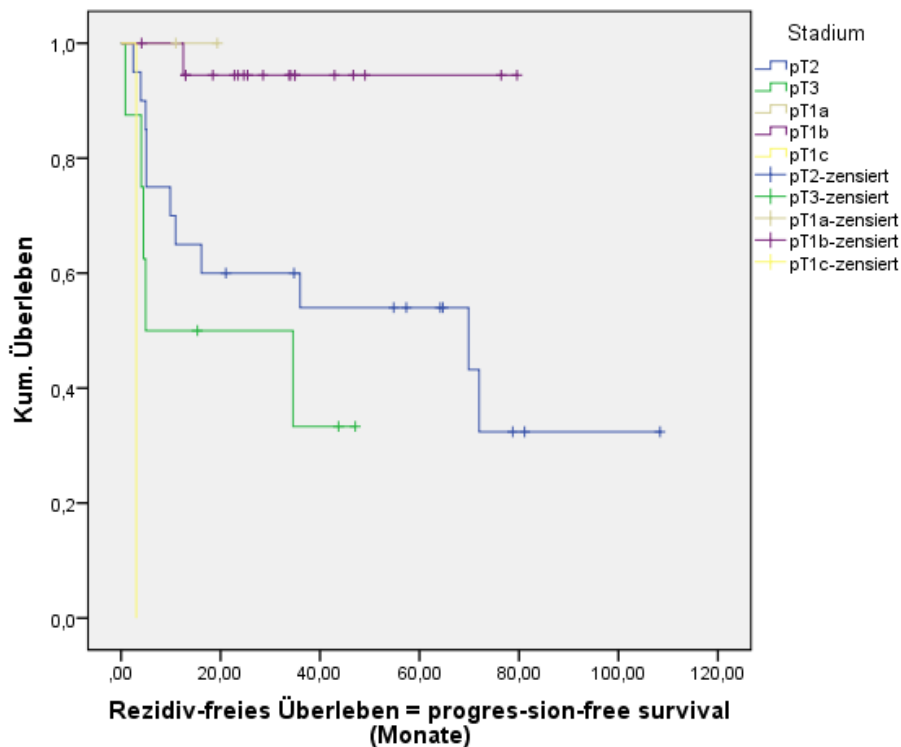


Abb. 8: Überlebensfunktionen (rezidivfreies Überleben) in Abhängigkeit vom Tumorstadium. $p=0,02^*$.

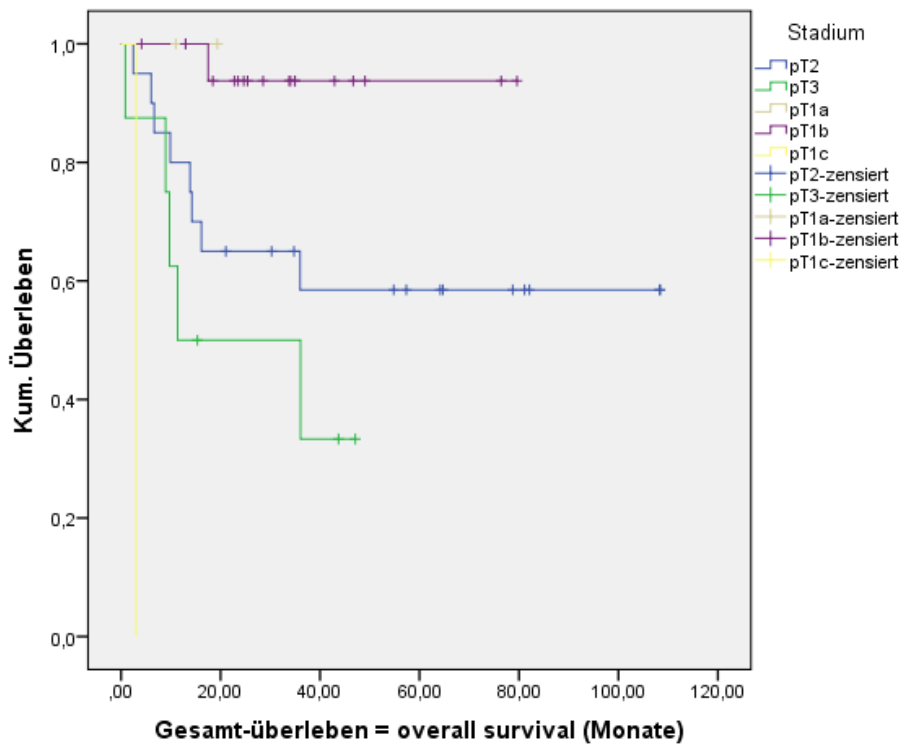


Abb. 9: Überlebensfunktionen (Gesamtüberleben) in Abhängigkeit vom Tumorstadium. $p=0,00007^*$.

3.4.3 Infiltrationstiefe

Analog zu den Tumorstadien zeigt sich ebenfalls eine Häufung der gering invasiven Neoplasien mit der bereits erläuterten Unterrepräsentation der mikroinvasiven Tumoren mit einer Infiltrationstiefe < 1 mm (Abb. 10).

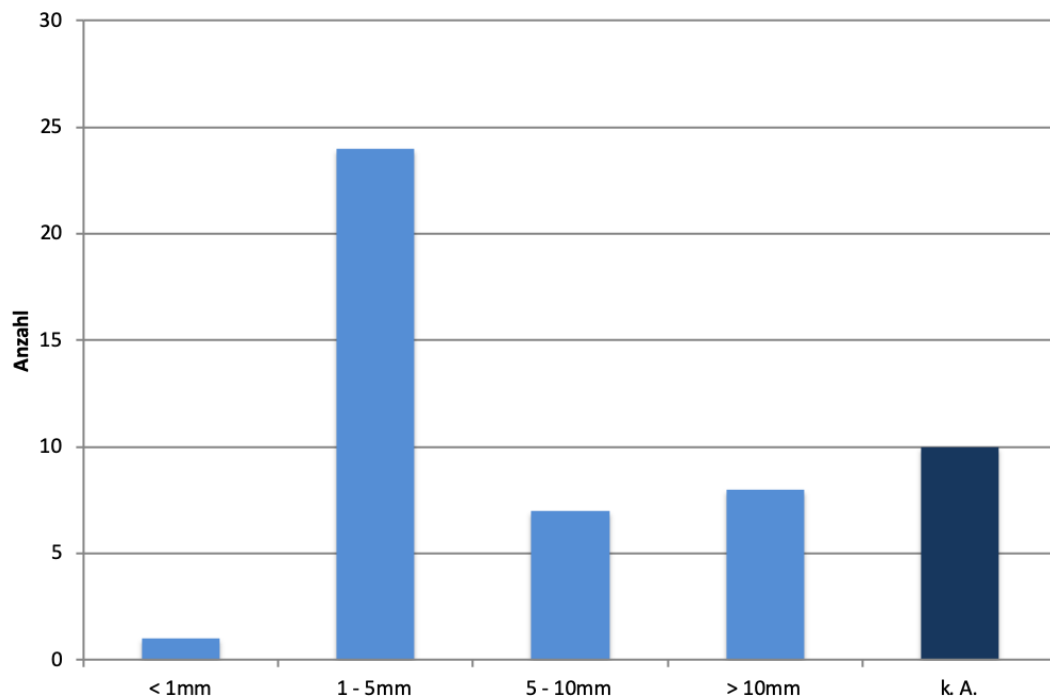


Abb. 10: Häufigkeitsverteilung der maximalen Infiltrationstiefe.

In der Regressionsanalyse ergibt sich für die Variable Infiltrationstiefe auch in Bezug auf das Gesamt- und das rezidivfreie Überleben eine signifikante Korrelation. Die wenigen Fälle mit einer Infiltrationstiefe von > 10 mm wiesen ein deutlich schlechteres Gesamt- und rezidivfreies Überleben auf (Abb. 11 und Abb. 12).

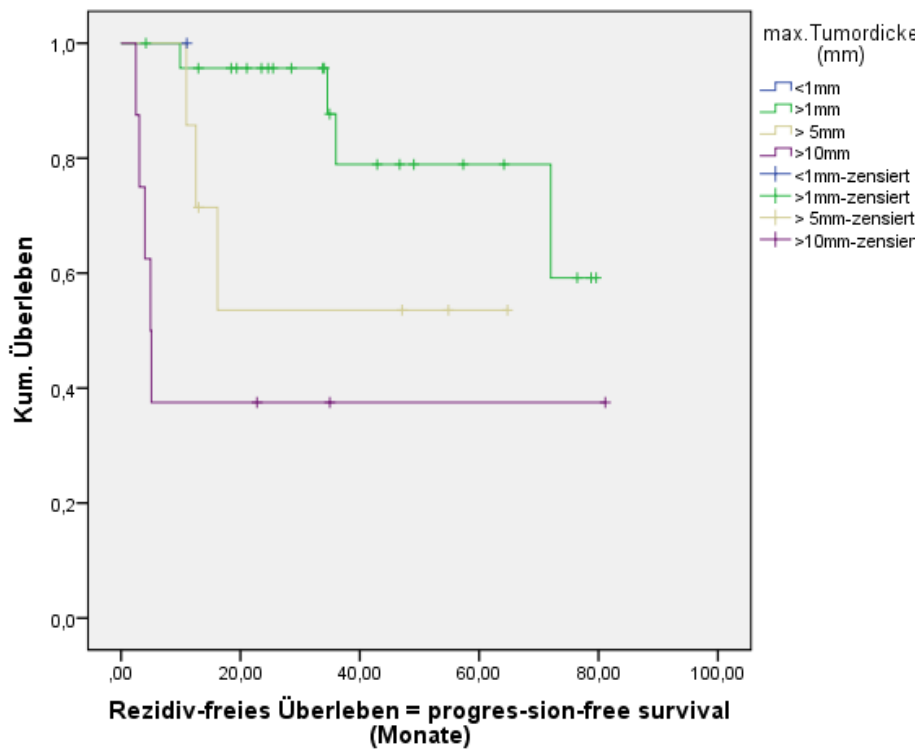


Abb. 11: Überlebensfunktionen (rezidivfreies Überleben) in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe. $p=0,04^*$.

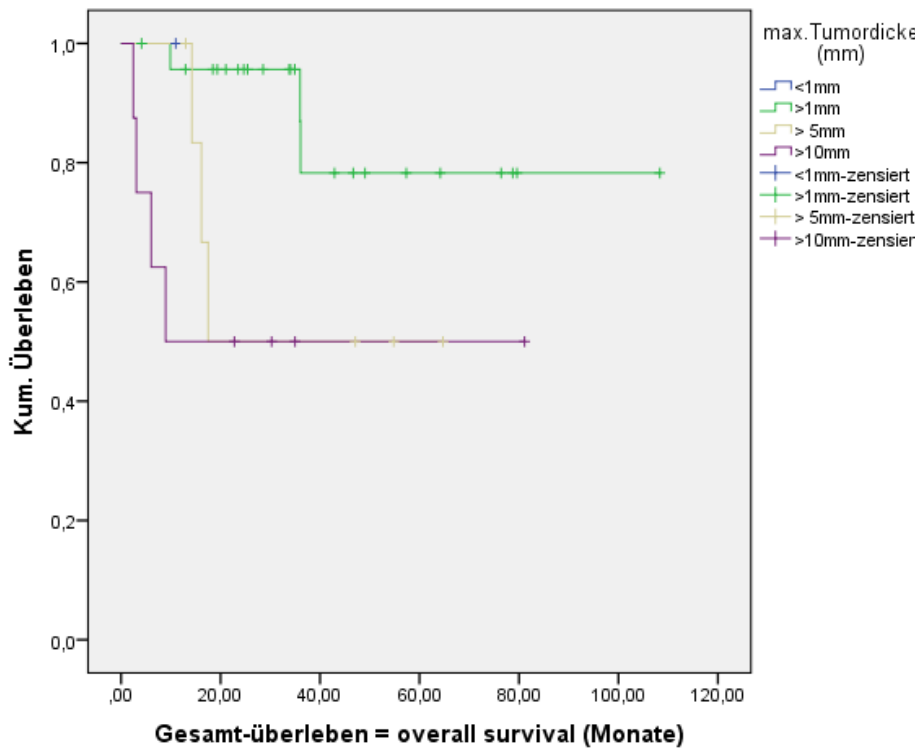


Abb. 12: Überlebensfunktionen (Gesamtüberleben) in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe. $p=0,04^*$.

Eine größere Infiltrationstiefe korreliert deutlich mit einem positiven Nodalstatus. Während kein mikroinvasives Karzinom Lymphknotenmetastasen aufweist, steigt der Anteil der LK-positiven Tumoren stetig mit ihrer Infiltrationstiefe (Tab. 5; vgl. auch DGGG, 2008).

Tab. 5: Häufigkeit der Lymphknotenmetastasierung in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe.

Infiltrations-tiefe	Anzahl	davon N+ (absolut)	davon N+ (relativ)
≤1mm	1	0	0,0%
1-5mm	24	3	12,5%
5-10mm	7	3	42,9%
>10mm	8	5	62,5%
k.A.	10	5	50,0%
Summe	50	16	32,0%

3.4.4 Grading

Die große Mehrheit (70 %, 35 Fälle) der histologisch untersuchten Plattenepithelkarzinome waren mittelgradig differenziert (Abb. 13). 22 % waren wenig und nur 8% hochgradig differenziert (entspricht 11 bzw. 4 Fällen).

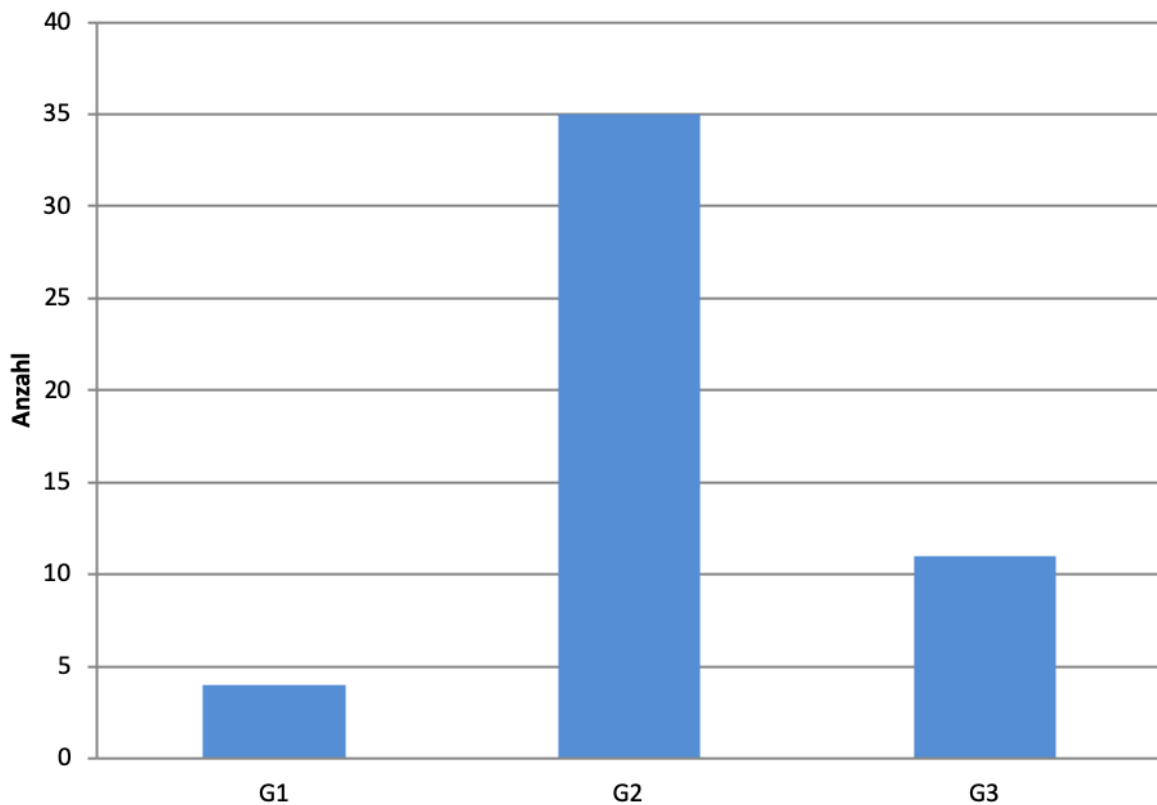


Abb. 13: Häufigkeitsverteilung der Gradings.

Die Kaplan-Meier-Kurven für die Variable Grading (Abb. 14 und Abb. 15) zeigen einen Zusammenhang zwischen hoher Gewebisdifferenzierung und langem Gesamt- sowie rezidivfreien Überleben, dieser ist jedoch statistisch nicht signifikant.

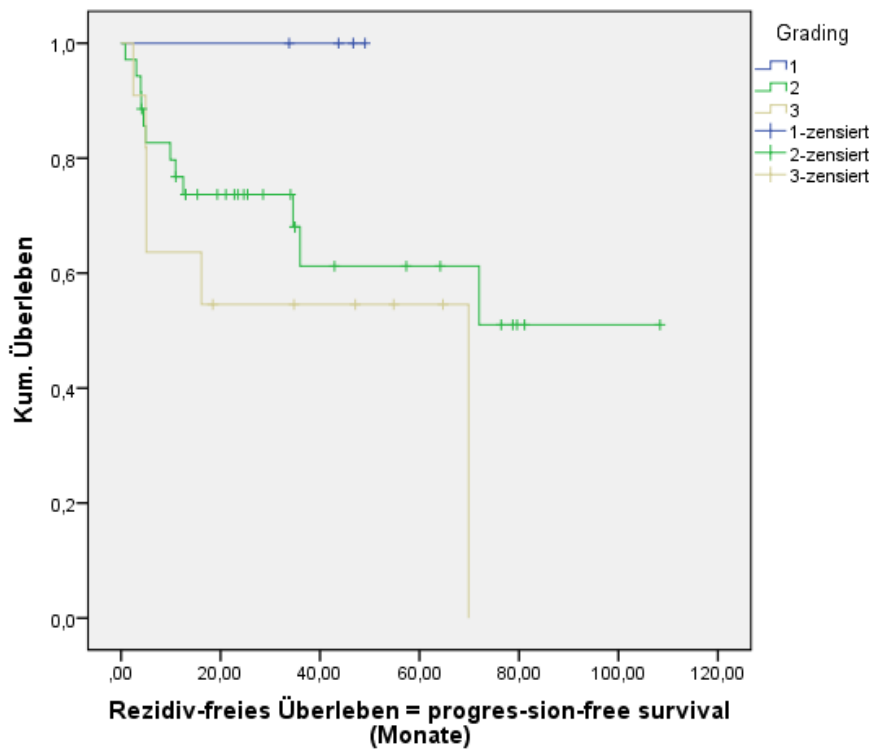


Abb. 14: Überlebensfunktionen (rezidivfreies Überleben) in Abhängigkeit vom Grading. $p=0,15$.

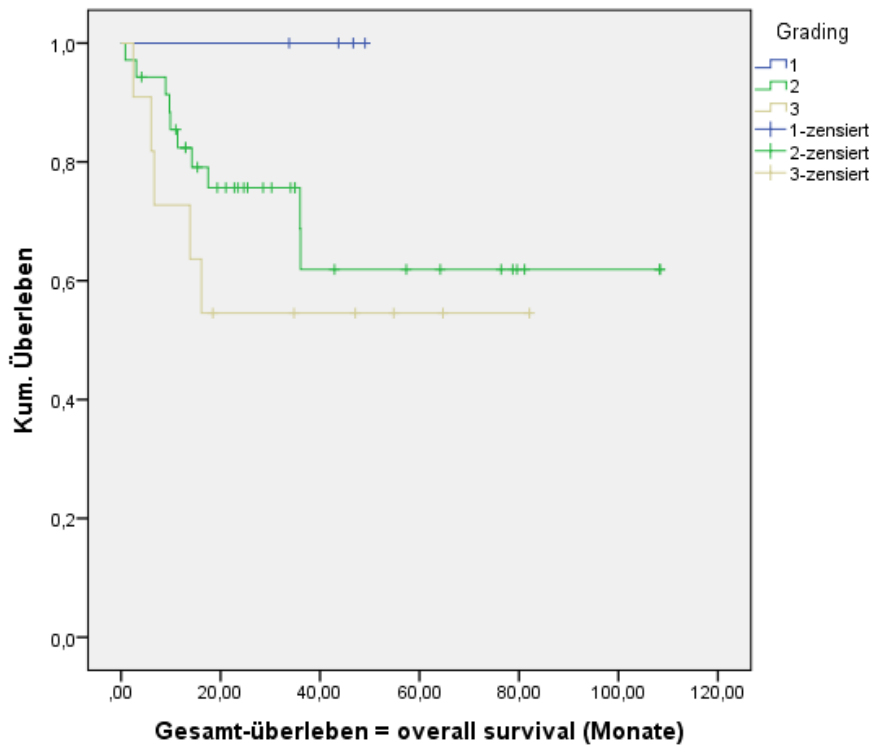


Abb. 15: Überlebensfunktionen (Gesamtüberleben) in Abhängigkeit vom Grading. $p=0,25$.

3.4.5 Resektion

Eine vollständige Resektion im Gesunden gelang in 80 % der Fälle. In weiteren 8 % waren in formal R0-resezierten Präparaten Epitheldysplasien oder Carcinoma-in-situ-Anteile randbildend (Abb. 16).

Alle Tumore im Stadium pT1 konnten R0-reseziert werden. Die 12 % R1-Resektionen verteilen sich zu gleichen Teilen auf Tumore im Stadium pT2 und pT3.

Die leitliniengerechte Einhaltung eines mindestens 10 mm messenden Resektionsrandes gelang bei den R0-Resektion nur in knapp einem Drittel (28 %) der Fälle (Abb. 17). In je etwa einem weiteren Drittel betrug der Sicherheitsabstand 5-10 mm (30 %) bzw. < 5 mm (28 %). In einem Fall lag keine Angabe vor.

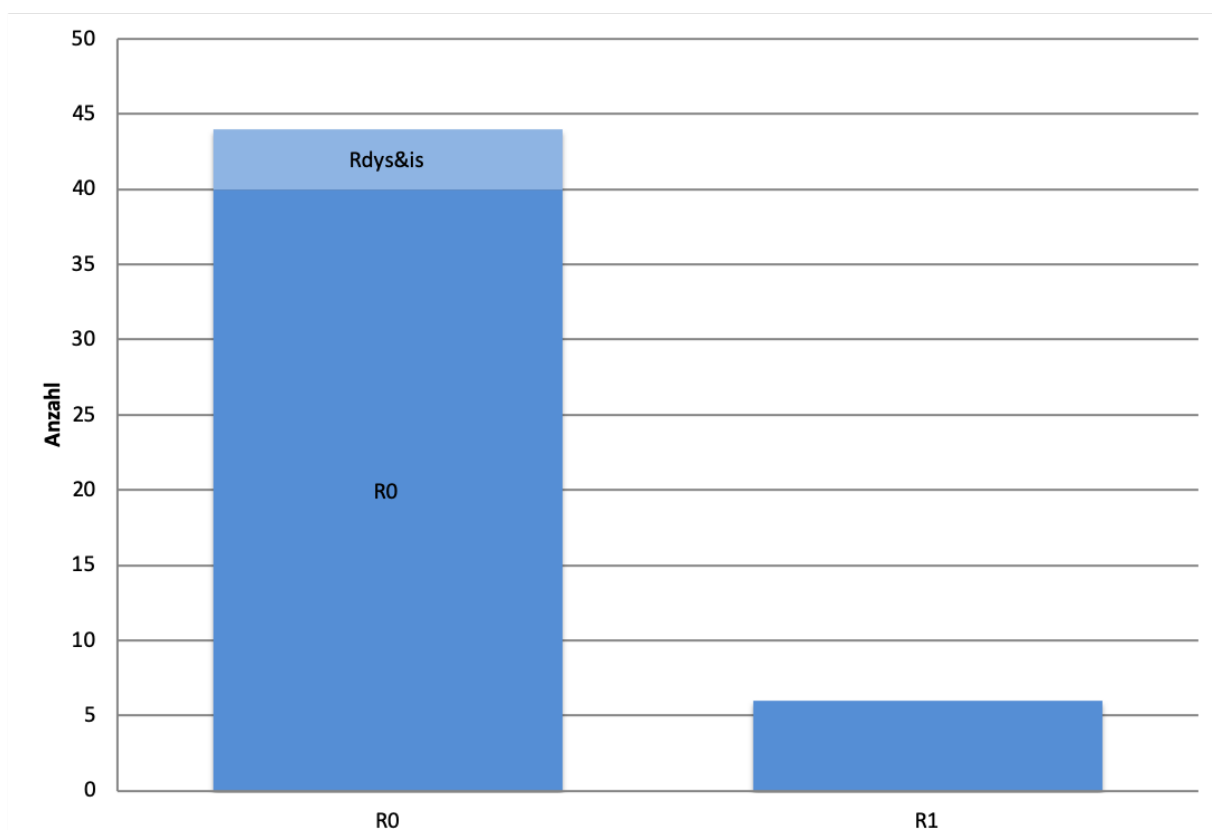


Abb. 16: Häufigkeitsverteilung der Resektionen. $R_{\text{dys\&is}}$ = Resektion mit randbildenden Epitheldysplasien oder randbildendem Carcinoma-in-situ.

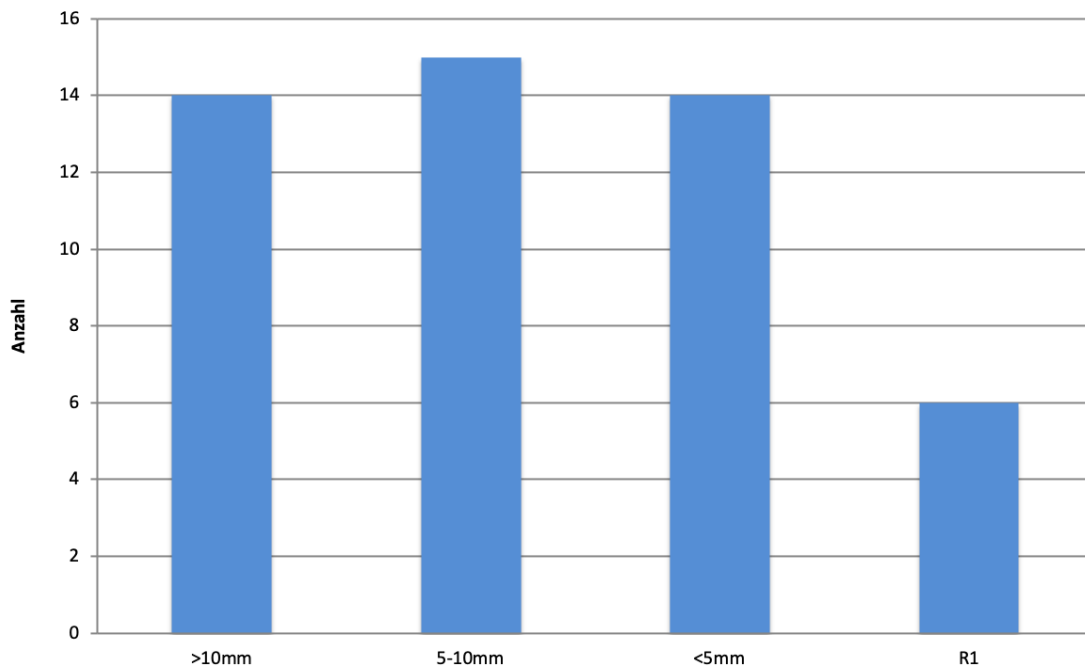


Abb. 17: Häufigkeitsverteilung der Resektionsränder.

Bemerkenswert ist, dass die Entfernung im Gesunden mit ausreichendem Abstand zur Läsion die einzige beeinflussbare Variable für das weitere Überleben ist. Daher ist vom Operateur ein möglichst großer Resektionsabstand zu fordern. Abbildung 18 zeigt die bei den operativen Eingriffen erreichten Resektionsränder im Untersuchungszeitraum. Es ist hier weder eine Entwicklung zu radikaleren Exzisionen noch zu schonenderen Operationsmethoden, die im Gegenzug mit geringeren Resektionsrändern einhergehen, zu verzeichnen. Die Abbildungen 19 und 20 zeigen, dass die unvollständige Tumorresektion (R0) die Prognose drastisch verschlechtert.

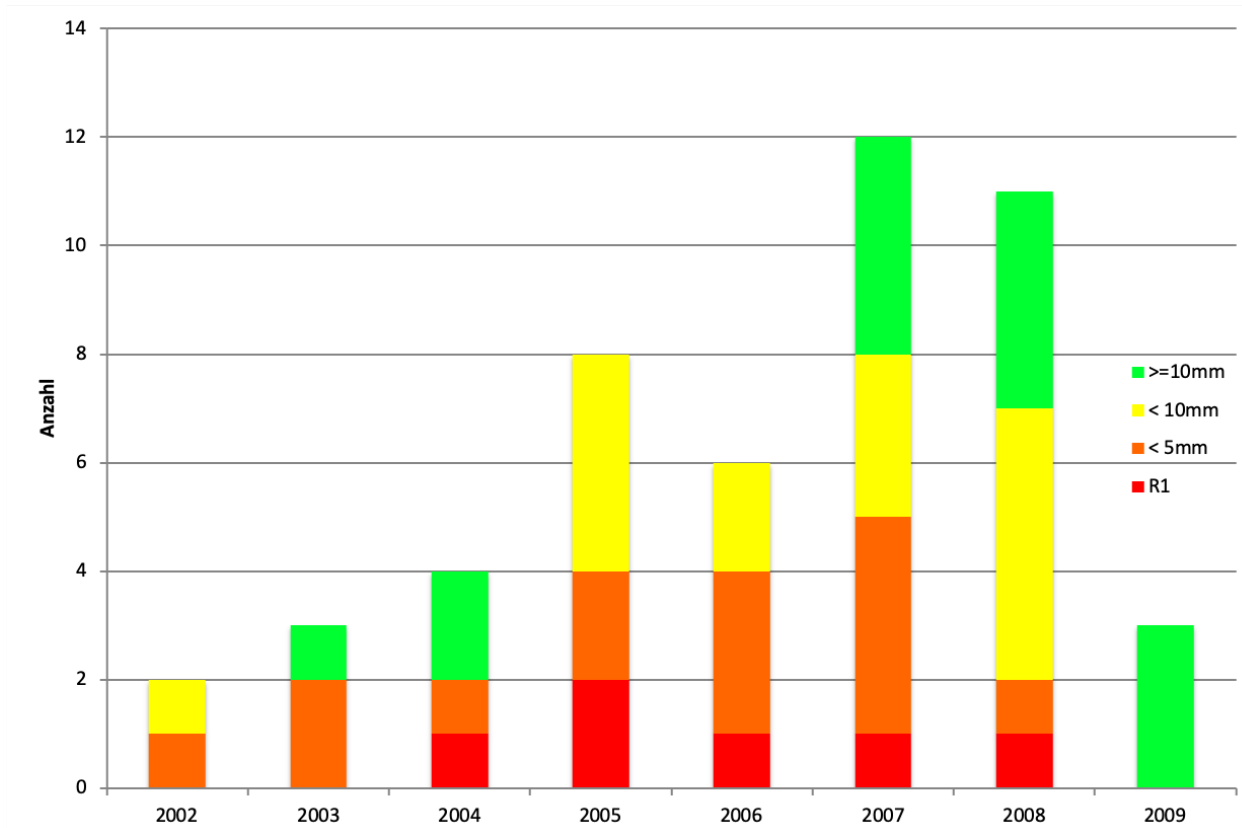


Abb. 18: Erreichter Resektionsrand in Abhängigkeit vom Jahr der Operation.

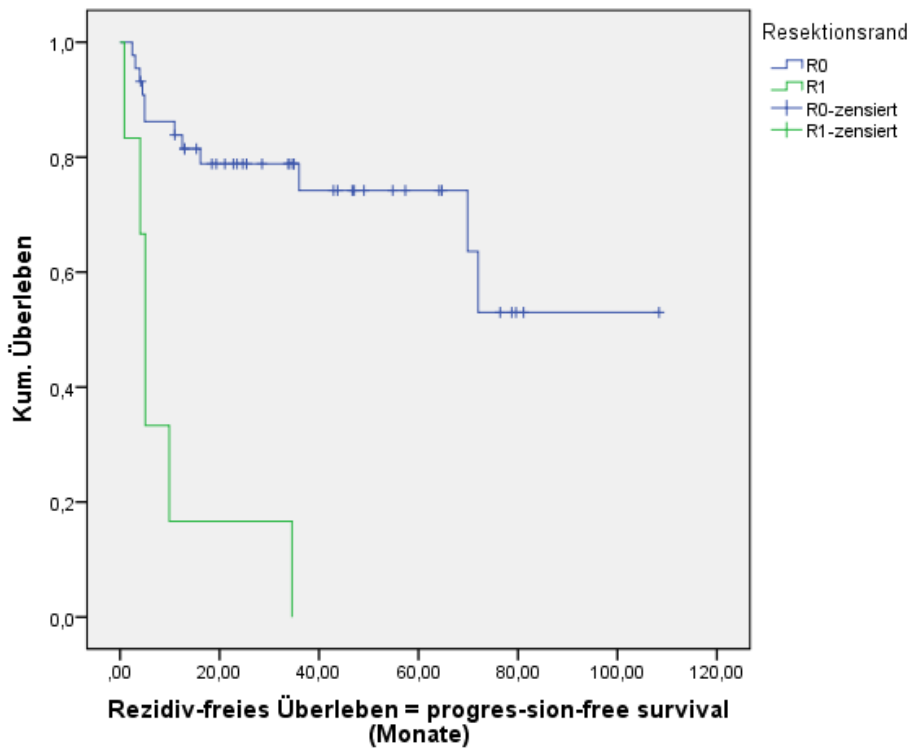


Abb. 19: Überlebensfunktionen (rezidivfreies Überleben) in Abhängigkeit von der Resektion. $p=0,0002^*$.

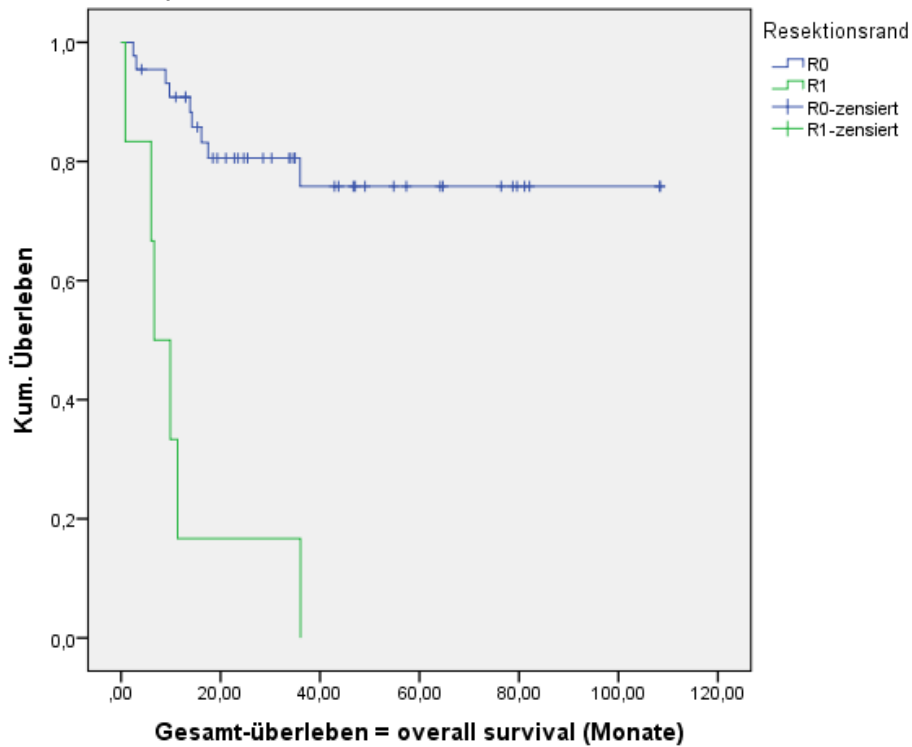


Abb. 20: Überlebensfunktionen (Gesamtüberleben) in Abhängigkeit von der Resektion. $p<0,00001^*$.

3.4.6 Inguinaler Lymphknotenstatus

Alle in der vorliegenden Dissertation berücksichtigten Patientinnen wurden lymphonodektomiert. Die Anzahl der begutachteten Lymphknoten lag zwischen 2 und 49; durchschnittlich wurden 18, im Median 15 Lymphknoten entnommen und histopathologisch untersucht.

Abbildung 21 zeigt die Anzahl der entfernten inguinalen Lymphknoten. Trotz der großen Streubreite in den einzelnen Operationen ist die durchschnittliche Anzahl der untersuchten Lymphknoten über den Untersuchungszeitraum konstant.

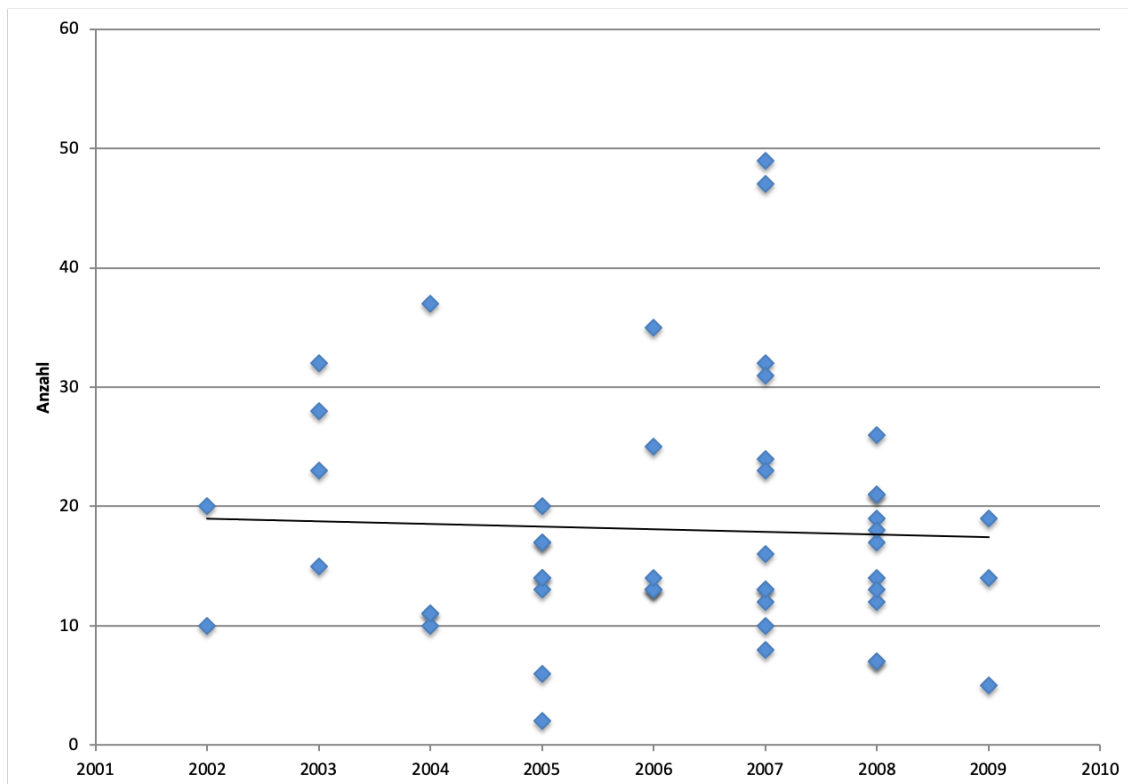


Abb. 21: Anzahl der in den Lymphonodektomien entnommenen Lymphknoten in Abhängigkeit vom Jahr der Operation. Trendlinie: durchschnittliche Anzahl pro Jahr.

Etwa zwei Drittel der Patientinnen (68 %) wiesen keine Lymphknotenmetastasierung auf, bei 24 % fanden sich unilateral (pN1), bei 8 % bilateral (pN2) metastatisch befallene regionäre Lymphknoten (Abb. 22).

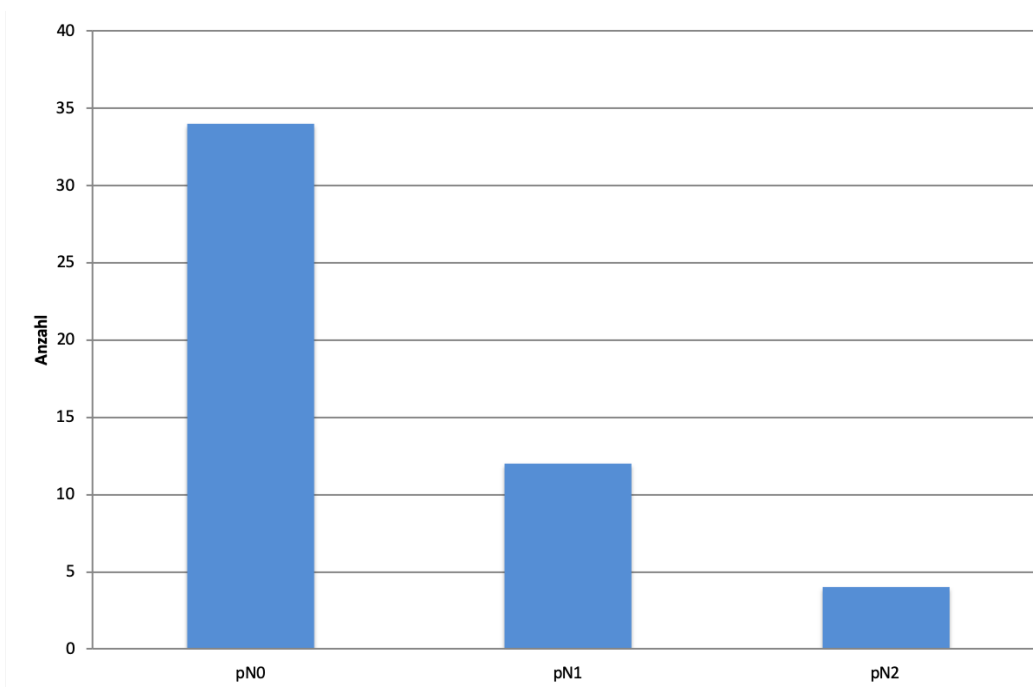


Abb. 22: Häufigkeitsverteilung der inguinalen Lymphknotenmetastasierung.

In der Regressionsanalyse ist der Lymphknotenstatus ein signifikanter Prognosefaktor für das Gesamt- und das rezidivfreie Überleben (Tab. 4). In Abhängigkeit vom Nodalstatus unterscheidet sich sowohl das rezidivfreie als auch das Gesamtüberleben signifikant (Abb. 23 und Abb. 24).

Bei nodalpositiven Tumoren treten Rezidive in der Regel früh auf, in unserem Kollektiv praktisch immer innerhalb der ersten zwei Jahre nach Diagnosestellung. Dies geht mit einer schlechteren Gesamtprognose einher als ein initial nodalnegativer Tumor, der im Verlauf nicht nur seltener, sondern in der Regel auch erheblich später - in unserem Kollektiv nach ca. 6-7 Jahren - rezidiert.

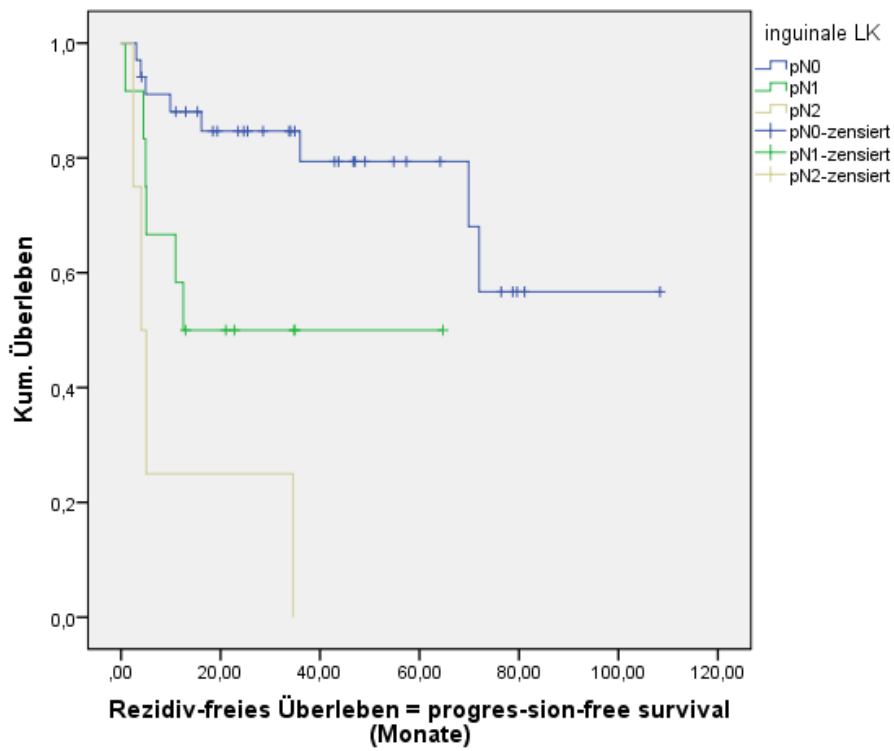


Abb. 23: Überlebensfunktionen (Rezidivfreies Überleben) in Abhängigkeit vom inguinalen Lymphknotenstatus. $p=0,00007^*$.

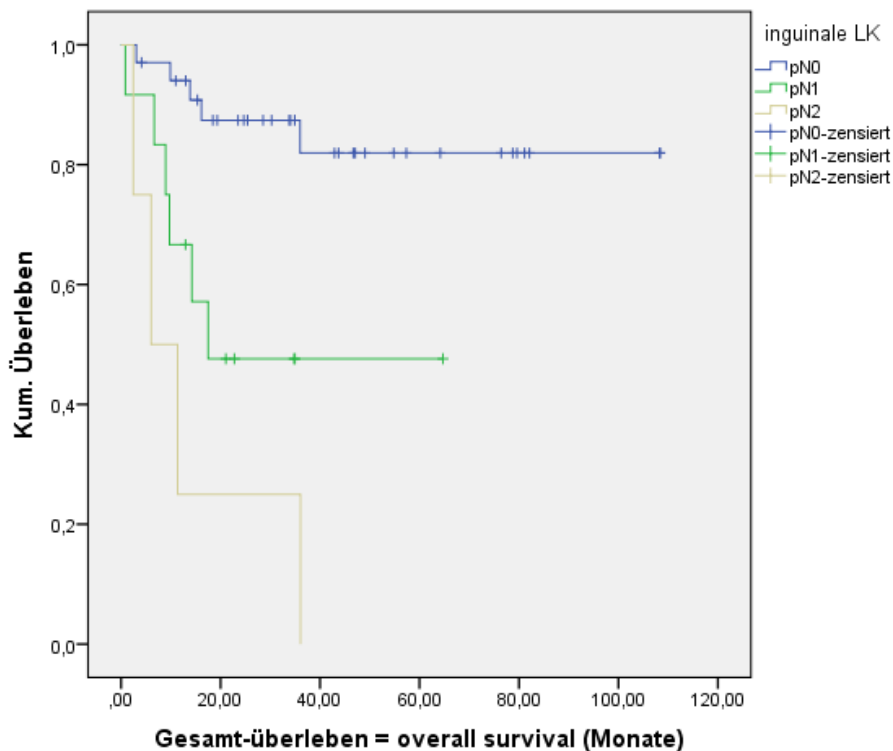


Abb. 24: Überlebensfunktionen (Gesamtüberleben) in Abhängigkeit vom inguinalen Lymphknotenstatus. $p=0,00002^*$.

3.4.7 Lymph- und Blutgefäßinvasion

Es ließ sich in 8 % eine Lymphgefäßinvasion und in 4% eine Blutgefäßinvasion nachweisen. Letztere wurde wegen der geringen Prävalenz nicht in die Analyse aufgenommen.

Für die Lymphinvasion ergibt sich nur für das Gesamtüberleben eine signifikante Korrelation, nicht jedoch für das rezidivfreie Überleben (Abb. 25 und Abb. 26).

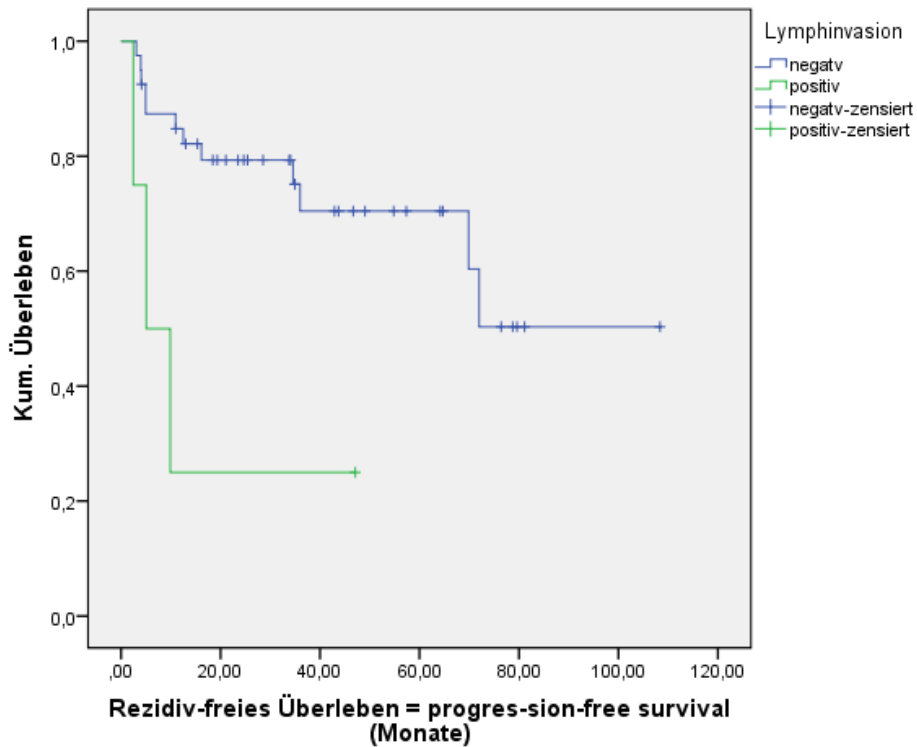


Abb. 25: Überlebensfunktionen (rezidivfreies Überleben) in Abhängigkeit von der Lymphgefäßinvasion. $p=0,49$.

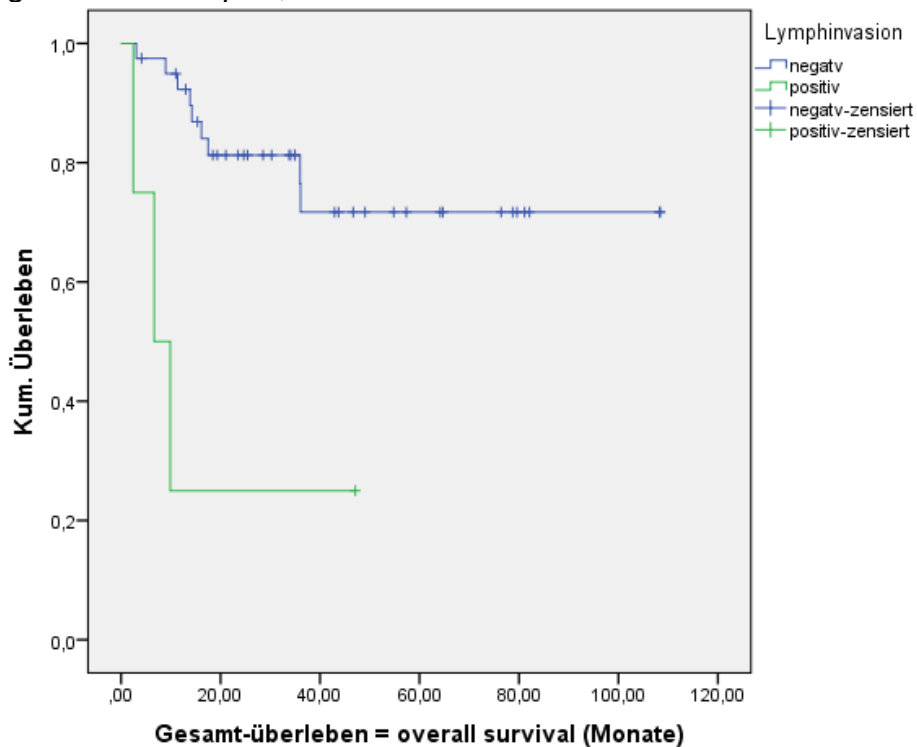


Abb. 26: Überlebensfunktionen (Gesamtüberleben) in Abhängigkeit von der Lymphgefäßinvasion. $p=0,001^*$.

3.4.8 Fernmetastasierung

Eine Fernmetastasierung fand sich nur bei 4 % der Patientinnen (Abb. 27). Diese beiden Patientinnen mit Tumorstadium M1 starben innerhalb eines Jahres nach Erstdiagnose. Daher wurde in Bezug auf die Fernmetastasierung nur eine Analyse für das Gesamtüberleben durchgeführt (Abb. 28). Diese zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren.

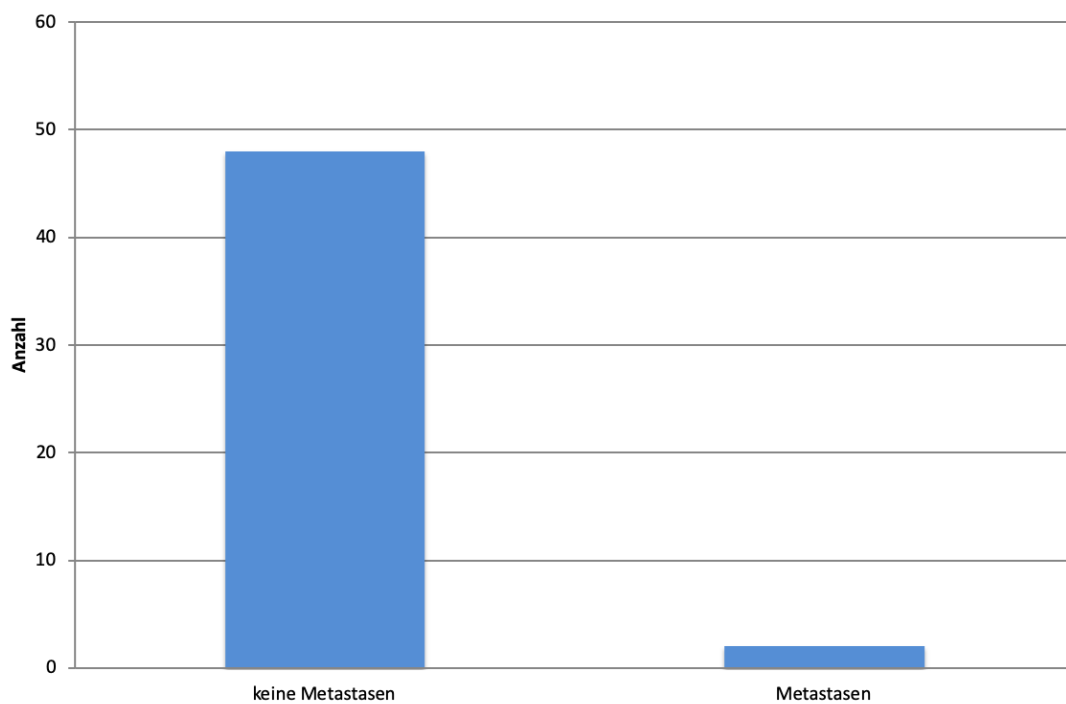


Abb. 27: Häufigkeitsverteilung der Fernmetastasierung.

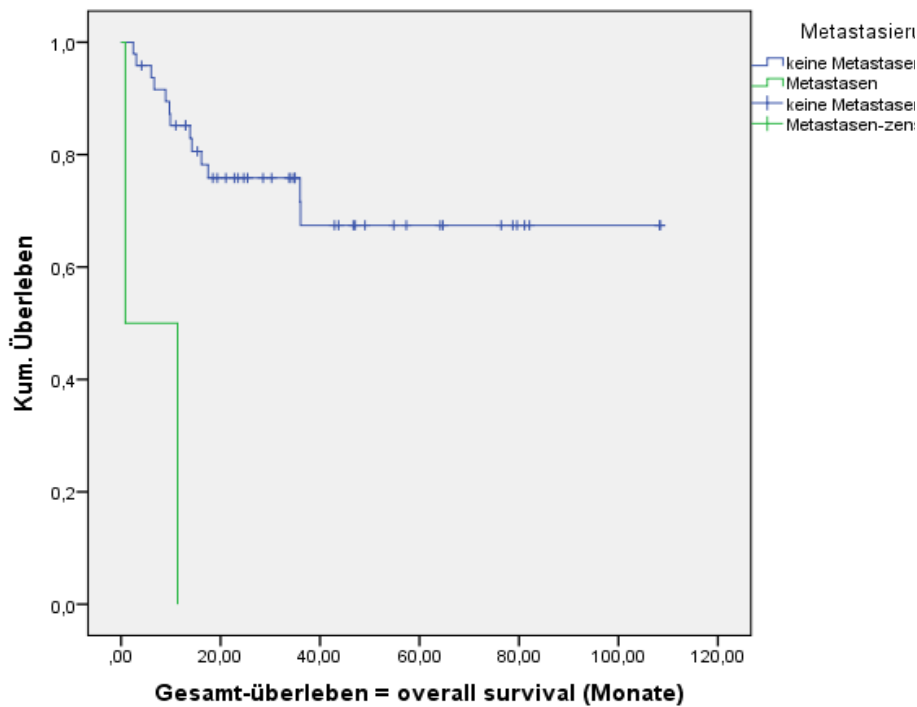


Abb. 28: Überlebensfunktionen (Gesamtüberleben) in Abhängigkeit von der Fernmetastasierung. $p < 0,0001^*$.

3.5 Immunologische und vaskuläre Marker

Tab. 6: Anzahl (n) bzw. relativer Anteil (in %) der immunohistochemisch positiven Zellen an der Gesamtfläche (jeweils Mittelwert aus drei repräsentativen HPF).

Marker	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median	Standardabweichung
CD163-positive Tumor-assoziierte Makrophagen peritumoral (%)	0,06	19,29	6,29	5,10	4,80
Foxp3-positive Regulatorische T-Zellen peritumoral (n)	0,84	219,44	64,03	56,29	46,17
Foxp3-positive Regulatorische T-Zellen intratumoral (n)	0,00	50,83	11,35	8,06	9,85
CD31/Blutgefäßdichte (n)	4,20	54,74	15,70	13,39	10,25
D2-40/Lymphgefäßdichte (n)	1,33	53,00	11,47	6,65	12,53

3.5.1 CD163-positive TAMs

Zum Nachweis der peritumoralen Makrophageninfiltration wurde der prozentuale Anteil der CD163-positiven TAMs an der Gesamtfläche gemessen (Tab. 6). Der Anteil lag zwischen 0,06 % und 19,29 % mit einem Mittelwert von $6,29 \pm 4,80$ % und einem Median von 5,10 %.

Peritumoral nachgewiesene CD163-positive TAMs waren dabei signifikant mit dem Gesamt- und dem rezidivfreien Überleben assoziiert (Tab. 4), wobei eine hohe stromale Infiltration mit CD163-positiven TAMs mit einer ungünstigeren Prognose einherging (Abb. 29 und Abb. 30)

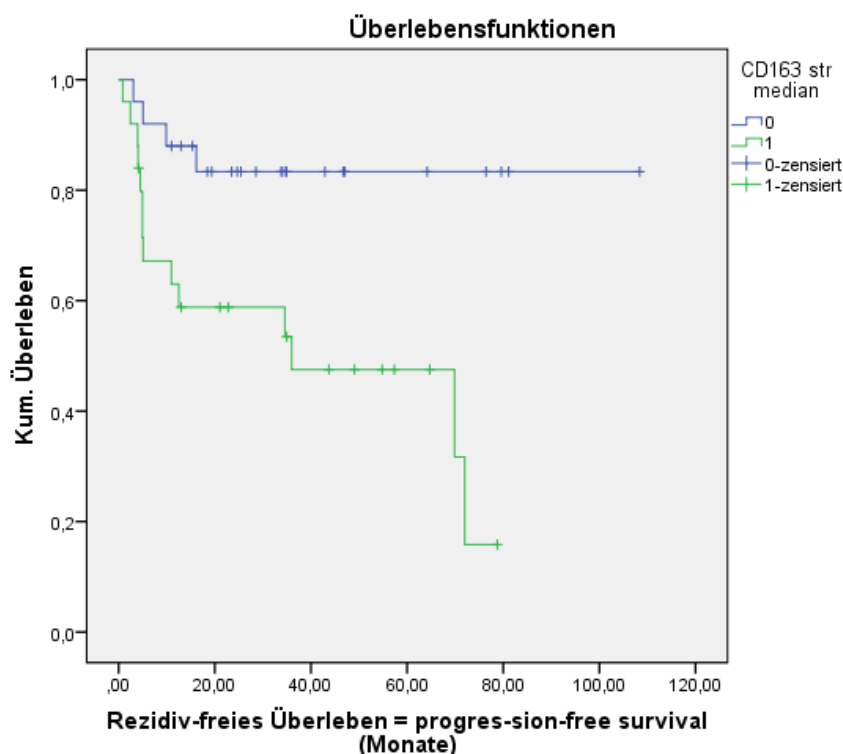


Abb. 29: Überlebensfunktionen (rezidivfreies Überleben) in Abhängigkeit von der peritumoralen Infiltration mit CD163-positiven Tumor-assoziierten Makrophagen (0 = Infiltration unterhalb des Medians, 1 = Infiltration oberhalb des Medians). $p = 0,005^*$.

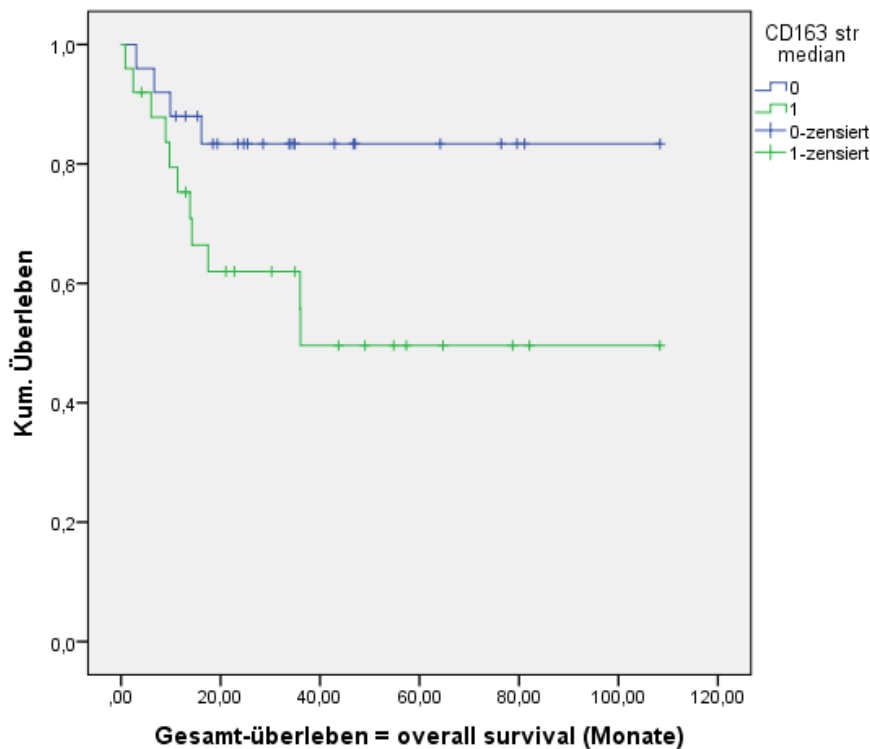


Abb. 30: Überlebensfunktionen (Gesamtüberleben) in Abhängigkeit von der peritumoralen Infiltration mit CD163-positiven Tumor-assoziierten Makrophagen (0 = Infiltration unterhalb des Medians, 1 = Infiltration oberhalb des Medians). $p=0,05^*$.

3.5.2 Foxp3-positive T_{reg}

Für die Färbung mit Foxp3 wurde die Anzahl der positiven Zellen pro HPF ausgewertet und für je drei HPFs gemittelt (Tab. 6). Die Werte im peritumoralen Gewebe variieren zwischen minimal 0,84/HPF und maximal 219,44/HPF (Mittelwert $64,03 \pm 46,17$ /HPF, Median 56,29/HPF), die im intratumoralen zwischen minimal 0/HPF und maximal 50,83/HPF (Mittelwert $11,35 \pm 9,85$ /HPF, Median 8,06/HPF).

Es zeigt sich im Vergleich zur intratumoralen Konzentration eine höhere Infiltration des peritumoralen Gewebes mit Foxp3-positiven T_{reg} . Weder der peri- noch der intratumorale Nachweis von Foxp3 korreliert jedoch signifikant mit dem Gesamt- oder dem rezidivfreien Überleben (Abb. 31 und Abb. 32, Abb. 33 und Abb. 34).

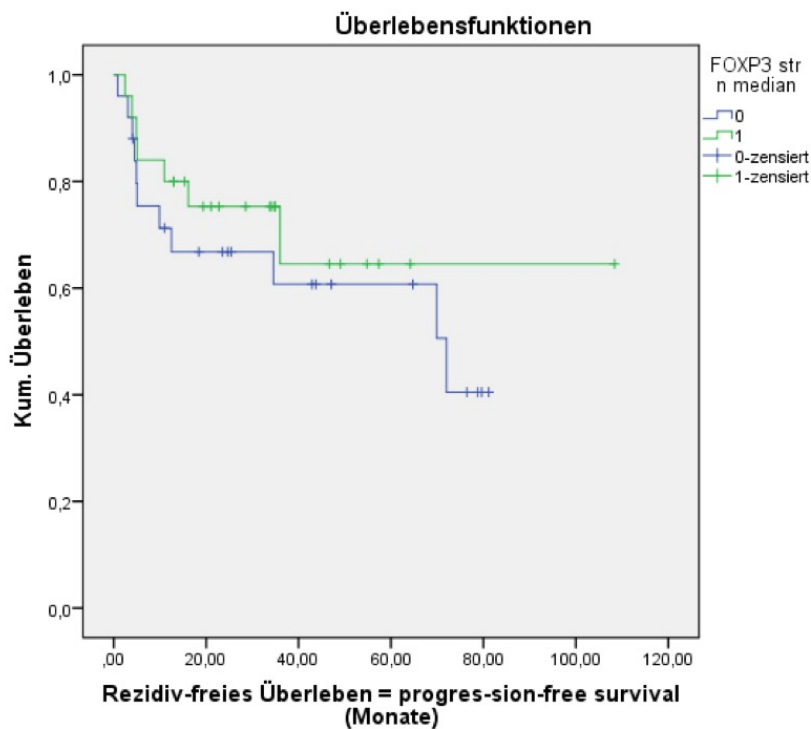


Abb. 31: Überlebensfunktionen (rezidivfreies Überleben) in Abhängigkeit von der peritumoralen Infiltration mit Foxp3 (0 = Infiltration unterhalb des Medians, 1 = Infiltration oberhalb des Medians). $p=0,45$.

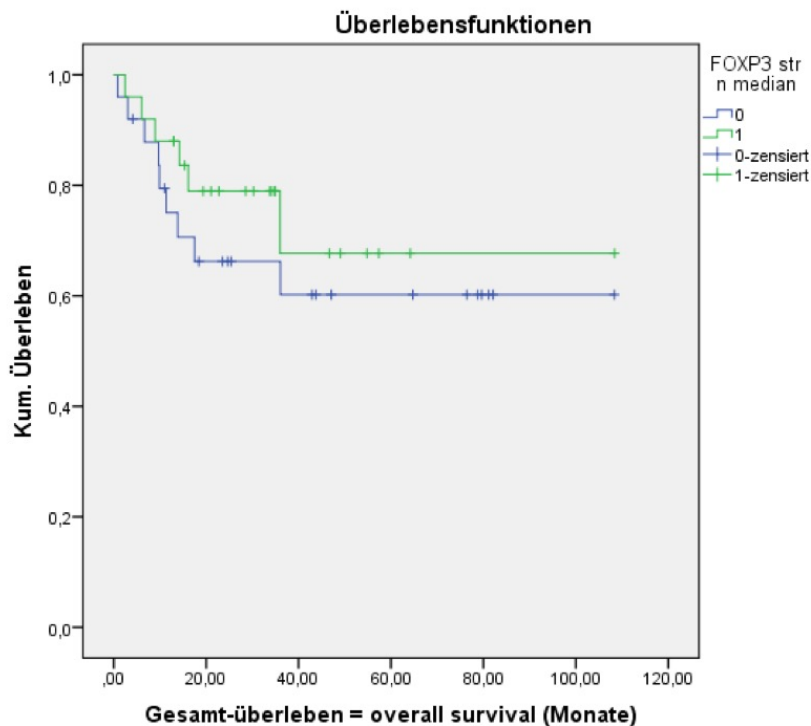


Abb. 32: Überlebensfunktionen (Gesamtüberleben) in Abhängigkeit von der peritumoralen Infiltration mit Foxp3 (0 = Infiltration unterhalb des Medians, 1 = Infiltration oberhalb des Medians). $p=0,43$.

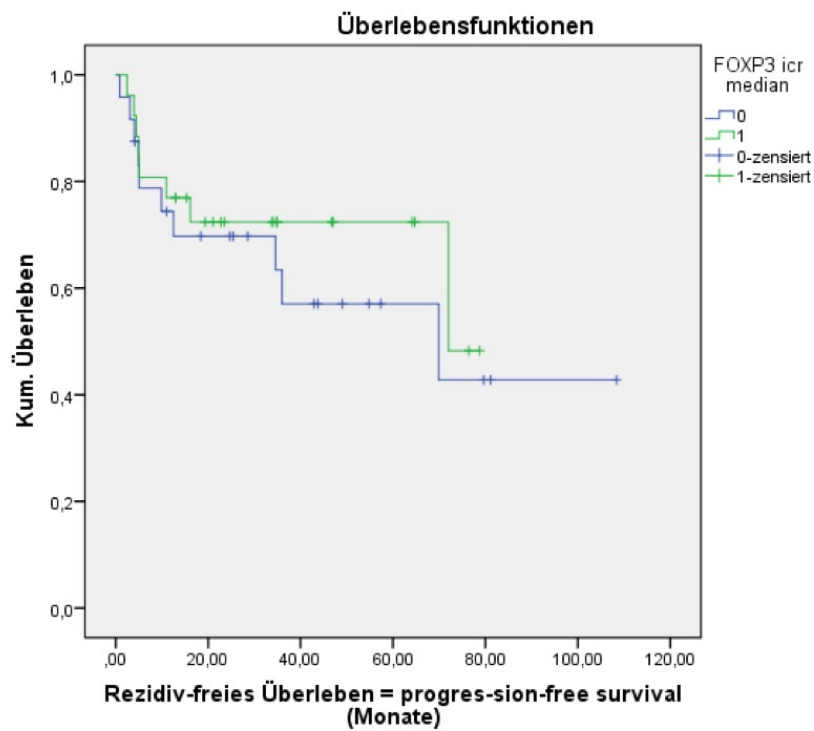


Abb. 33: Überlebensfunktionen (rezidivfreies Überleben) in Abhängigkeit von der intratumoralen Infiltration mit Foxp3 (0 = Infiltration unterhalb des Medians, 1= Infiltration oberhalb des Medians). $p=0,54$.

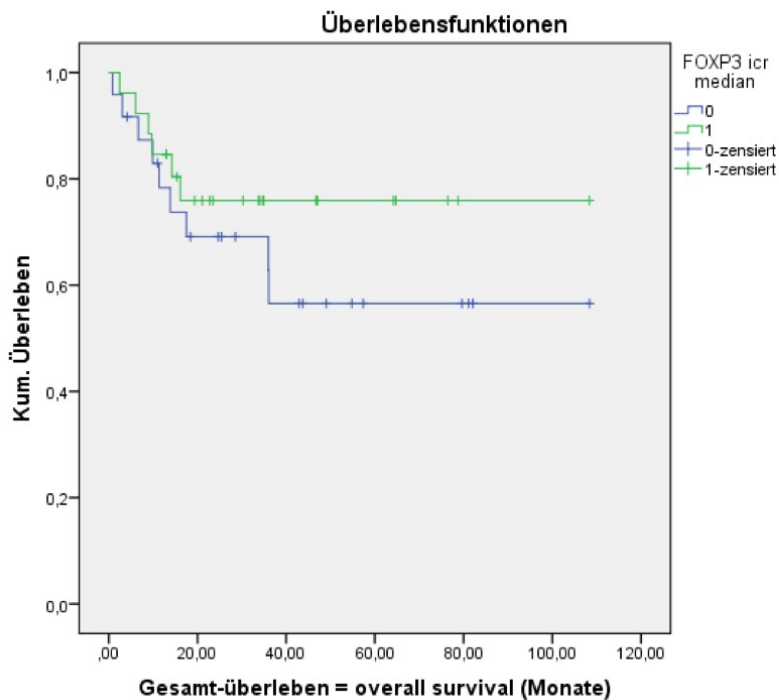


Abb. 34: Überlebensfunktionen (Gesamtüberleben) in Abhängigkeit von der intratumoralen Infiltration mit Foxp3 (0 = Infiltration unterhalb des Medians, 1 = Infiltration oberhalb des Medians). $p=0,37$.

3.5.3 D2-40-positive Lymphgefäßdichte

Für die Färbung mit D2-40 wurden die angefärbten Lymphgefäße pro HPF für je drei repräsentative HPF ausgewertet und gemittelt (Tab. 6). Die Anzahl der D2-40-positiven Lymphgefäße lag zwischen minimal 1,33/HPF und maximal 53,00/HPF, mit einem Mittelwert von 11,47/HPF und einem Median von 6,65/HPF. Die Standardabweichung betrug 12,53/HPF. Betrachtet man den Unterschied zwischen Mittelwert und Median sowie die hohe Standardabweichung, wird deutlich, dass hier einige Ausreißer nach oben vorliegen.

D2-40 als immunhistochemischer Marker für die Lymphgefäßdichte ist nicht signifikant mit der Prognose assoziiert (Abb. 35 und Abb. 36).

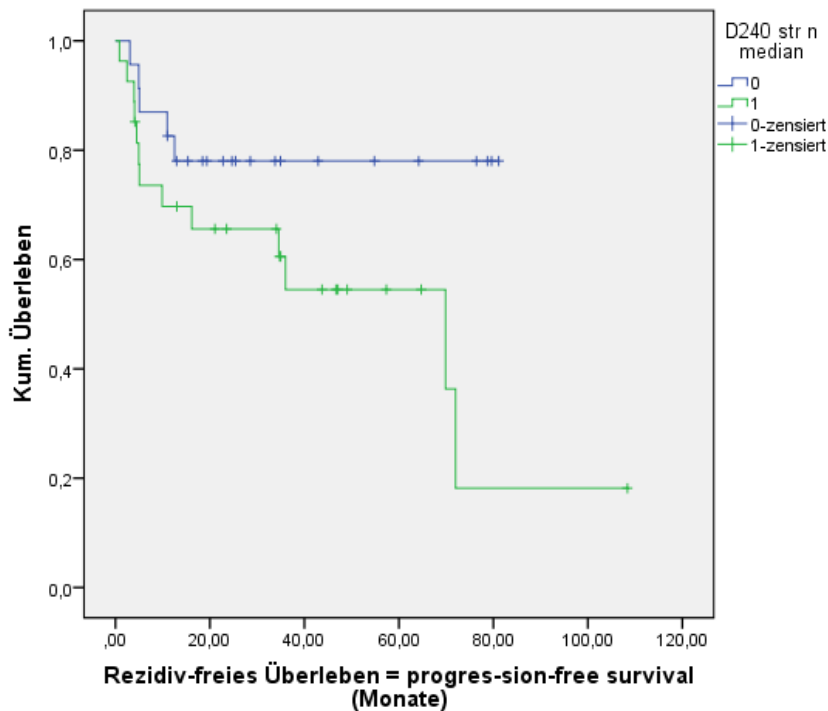


Abb. 35: Überlebensfunktionen (rezidivfreies Überleben) in Abhängigkeit von der peritumoralen D2-40-positiven Lymphgefäßdichte (0 = Infiltration unterhalb des Medians, 1 = Infiltration oberhalb des Medians). $p=0,06$.

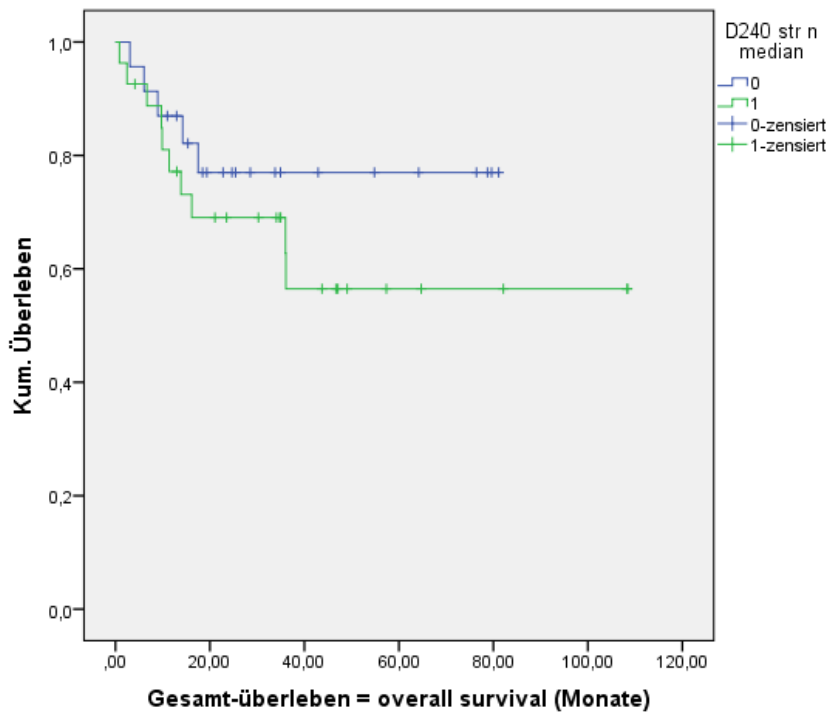


Abb. 36: Überlebensfunktionen (Gesamtüberleben) in Abhängigkeit von der peritumoralen D2-40-positiven Lymphgefäßdichte (0 = Infiltration unterhalb des Medians, 1 = Infiltration oberhalb des Medians). $p=0,3$.

3.5.4 CD31-positive Blutgefäßdichte

Die Anzahl der peritumoralen CD31-positiven Blutgefäße pro HPF betrug minimal 4,20 bis maximal 54,74, mit einem Mittelwert von $15,70 \pm 10,25$ und einem Median von 6,65 (Tab. 6). Die Blutgefäßdichte zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Prognose des Vulvakarzinoms (Abb. 37 und Abb. 38).

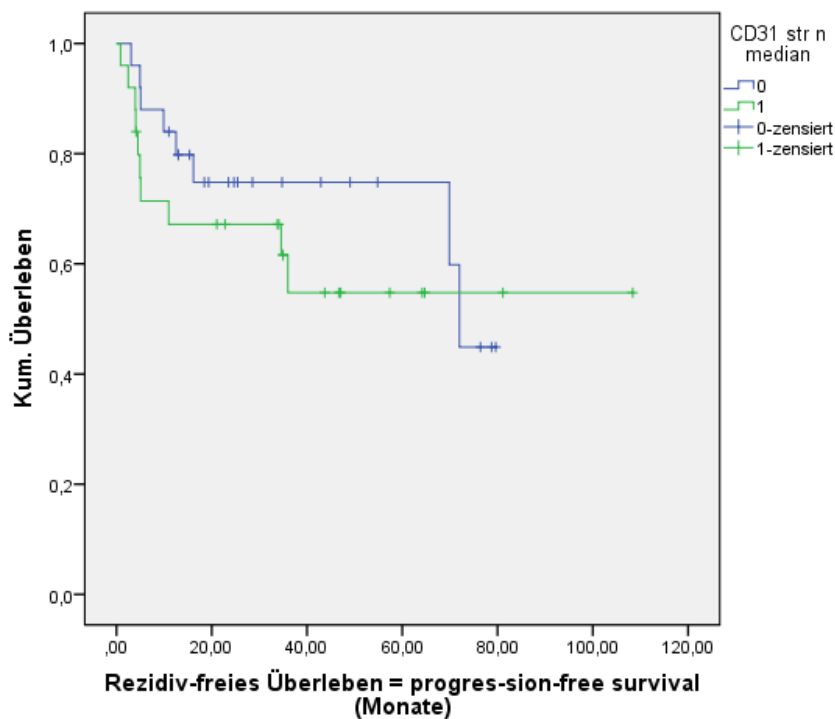


Abb. 37: Überlebensfunktionen (rezidivfreies Überleben) in Abhängigkeit von der peritumoralen CD31-positiven Blutgefäßdichte (0 = Infiltration unterhalb des Medians, 1 = Infiltration oberhalb des Medians). $p=0,39$.

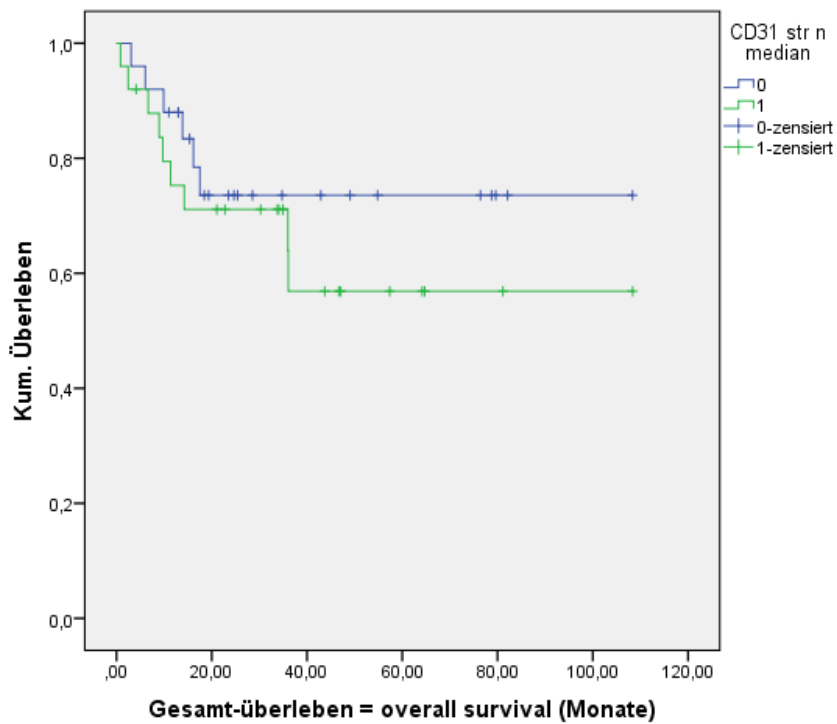


Abb. 38: Überlebensfunktionen (Gesamtüberleben) in Abhängigkeit von der peritumoralen CD31-positiven Blutgefäßdichte (0 = Infiltration unterhalb des Medians, 1 = Infiltration oberhalb des Medians). $p=0,41$.

3.6 Zusammenhänge der immunologischen und vaskulären Marker

Tabelle 7 zeigt die Korrelationen der immunologischen und vaskulären Marker untereinander.

Tab. 7: Korrelation der immunologischen und vaskulären Marker untereinander. r_s = Spearman-Korrelationskoeffizient; $*p \leq 0,05$; blau unterlegt = signifikante Korrelation.

		CD163 peritumoral	Foxp3 intratumoral	Foxp3 peritumoral	CD31 peritumoral	D2-40 peritumoral
CD163 peritumoral	r_s	1				
	p					
Foxp3 intratumoral	r_s		1			
	p					
Foxp3 peritumoral	r_s	0,271	0,647	1		
	p	0,057	<0,001*			
CD31 peritumoral	r_s	0,273	0,123	0,252	1	
	p	0,055	0,395	0,077		
D2-40 peritumoral	r_s	0,418	0,074	-0,021	0,308	1
	p	0,003*	0,612	0,886	0,029*	

3.6.1 Intra- und peritumorale Infiltration mit Foxp3-positiven T_{reg}

Eine signifikante Korrelation weisen die intra- und peritumoralen Nachweise von Foxp3 auf: eine hohe *intratumorale* Infiltration mit Foxp3-positive T_{reg} geht mit einer ebenfalls hohen *peritumoralen* Infiltration einher (Abb. 39).

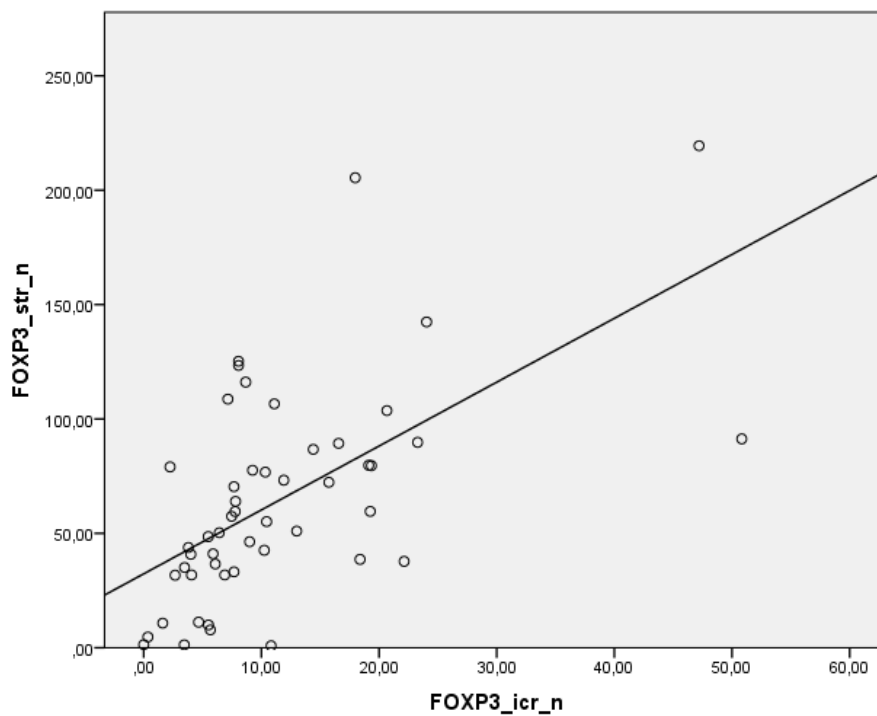


Abb. 39: Korrelation von Foxp3-positiven Regulatorischen T-Zellen intratumoral (ocr) und peritumoral (str), mit Regressionsgerade. $r_s=0,647$; $p<0,001^*$

3.6.2 D2-40-positive Lymphgefäßdichte und CD163-positive TAMs

Es besteht ebenfalls eine Korrelation zwischen der D2-40-positiven Lymphgefäßdichte und der Infiltration mit CD163-positiven TAMs (Tab. 7). Dies gilt sowohl für das peritumorale (Abb. 40) als auch für das intratumorale Gewebe (Abb. 41). Darüberhinaus korreliert die D2-40-positive Lymph- mit der CD31-positiven Blutgefäßdichte (Abb. 42).

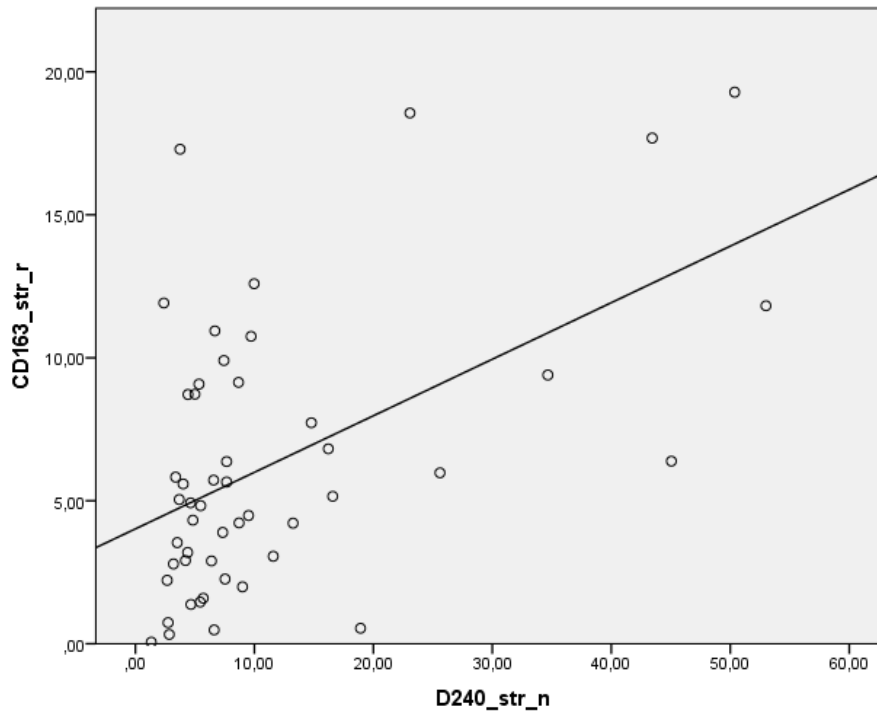


Abb. 40: Korrelation der D2-40-positiven Lymphgefäßdichte und CD163-positiven Tumorassoziierten Makrophagen peritumoral (str), mit Regressionsgerade. $r_s=0,418$; $p=0,003^*$

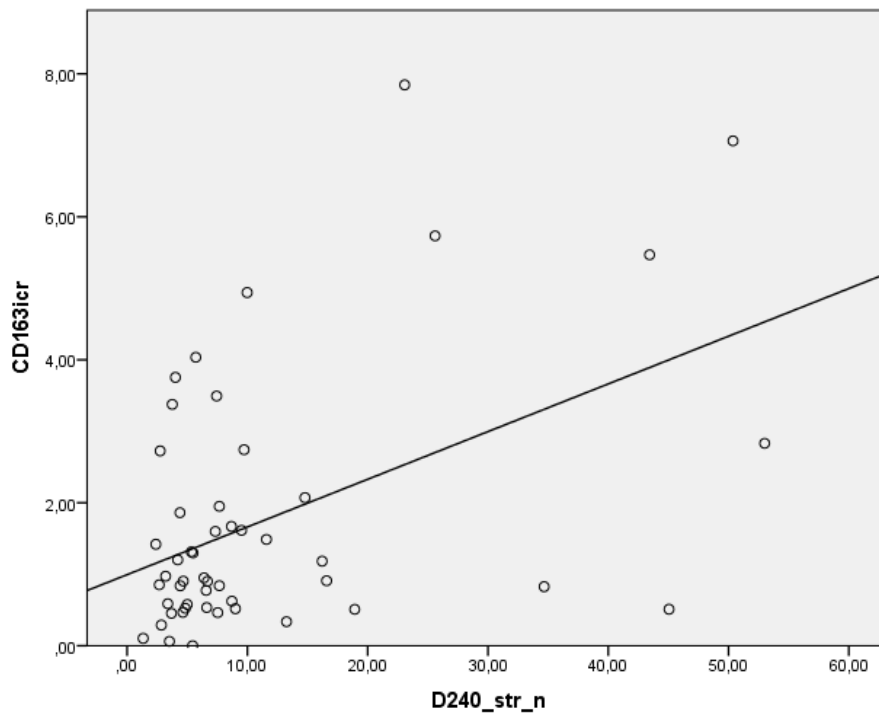


Abb. 41: Korrelation der D2-40-positiven Lymphgefäßdichte und CD163-positiven Tumor-assoziierten Makrophagen intratumoral (icr), mit Regressionsgerade. $r_s=0,313$; $p=0,03^*$

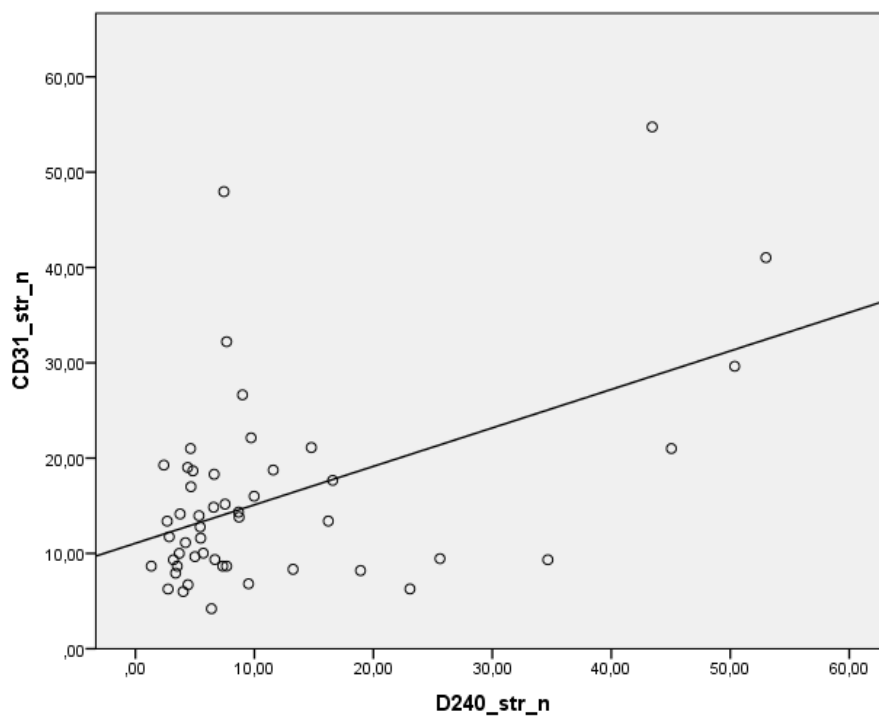


Abb. 42: Korrelation der D2-40-positiven Lymphgefäßdichte mit der CD31-positiven Blutgefäßdichte, mit Regressionsgerade. $r_s=0,308$; $p=0,03^*$

3.6.3 D2-40-positive Lymphgefäßdichte und L1- und N1-Status

Um die Bedeutung der stromalen Lymphgefäßdichte beim Vulvakarzinom weiter zu evaluieren, wurde diese mit der nativhistologisch diagnostizierten Lymphgefäßinvasion (L0 bzw. L1) sowie dem Nodalstatus korreliert. Es zeigte sich ein (jedoch nicht signifikant) erhöhtes Risiko der Lymphinvasion bei einer erhöhten Lymphgefäßdichte (Abb. 43). Analog dazu zeigte sich bei Nachweis einer vermehrten Lymphgefäßdichte mit erhöhter Wahrscheinlichkeit das Vorhandensein von inguinalen Lymphknotenmetastasen (Abb. 44).

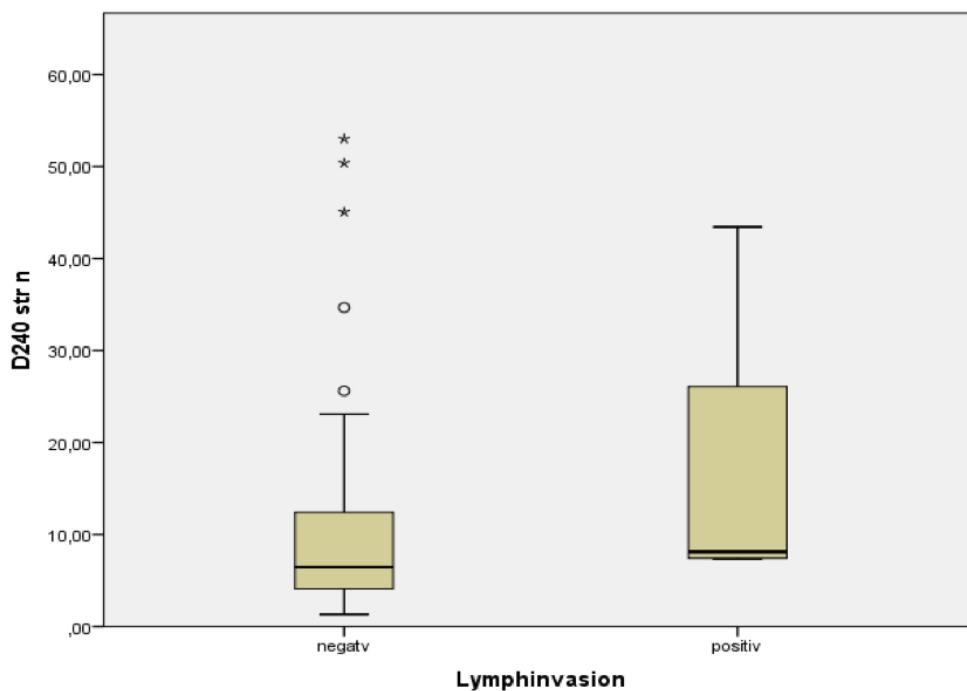


Abb. 43: Die peritumorale D2-40-positive Lymphgefäßdichte in Abhängigkeit von der nativhistologischen Lymphgefäßinvasion. $p=0,11$ (Exakter Test nach Fisher, zweiseitige Signifikanz).

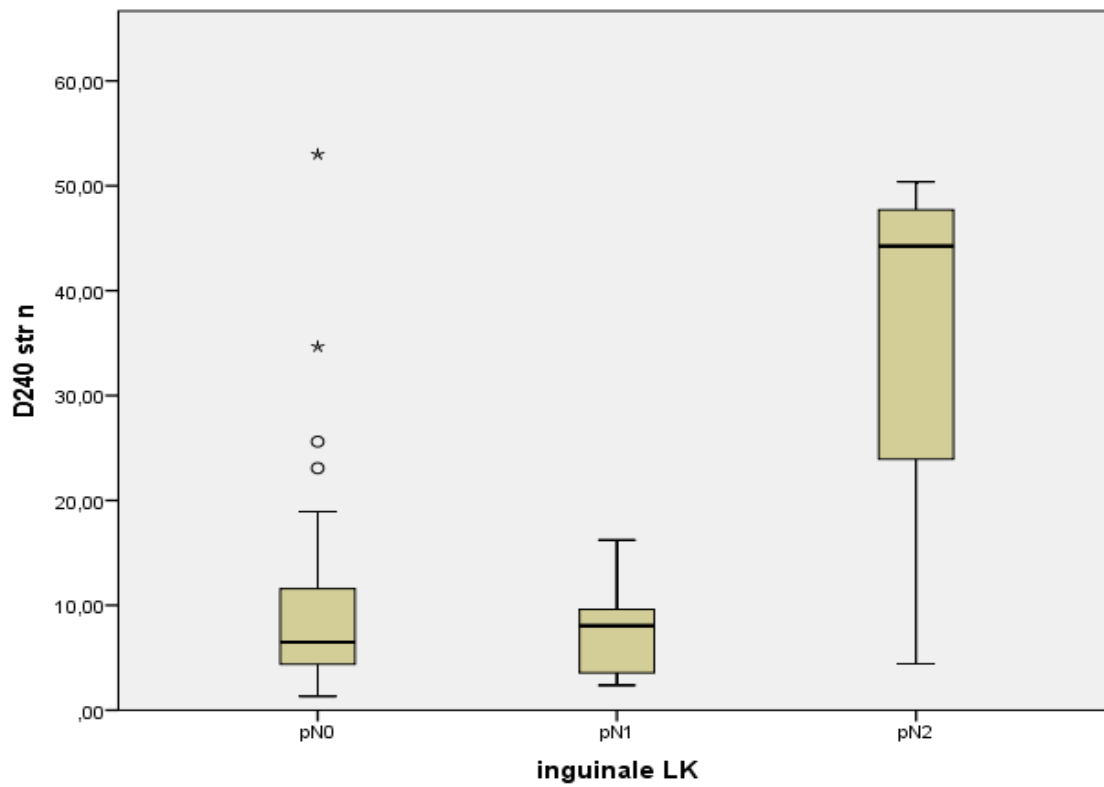


Abb. 44: Die peritumorale D2-40-positive Lymphgefäßdichte in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus. $p=0,73$ (simuliert mit 1.000.000 Replikaten)

4. Diskussion

4.1 Das Studienkollektiv

4.1.1 Größe des Kollektivs

Gegenstand der vorliegenden Untersuchung ist ein Kollektiv aus 50 Patientinnen im Zeitraum 01/2002-08/2009. Bei der sehr niedrigen Inzidenz dieser Neoplasie von 2,5-7/100.000 Frauen ist die Rekrutierung eines ausreichend großen Kollektivs schwierig. Die wenigen thematisch vergleichbaren Studien weisen ähnliche Patientenkollektive auf: Hampl et al., 2008a: 224 Patientinnen in 27,5 Jahren an der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf; Heaps et al., 1990: 135 Patientinnen in 29 Jahren an der University of California; Woelber et al., 2009: 103 Patientinnen in 7 Jahren an der Universitätsfrauenklinik Hamburg-Eppendorf.

4.1.2 Epidemiologische und klinische Befunde

Im hier untersuchten Kollektiv war die jüngste Patientin 33, die älteste 84 Jahre alt. Das mittlere Alter betrug 62 Jahre.

In einer am Universitätsklinikum Düsseldorf durchgeführten Studie lag in einem vergleichbaren Zeitraum (1998-2007) das Altersmittel bei 102 Patientinnen mit 57 Jahren etwas niedriger (Hampl et al., 2008a), in einer Studie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf im Untersuchungszeitraum 1996-2003 mit 63 Jahren minimal darüber (Woelber et al., 2009).

Im Vergleich der Altersverteilung des Kollektivs mit dem von Jones et al. (1997) aus den Jahren 1965-1974 (Abb. 45) zeigt sich eine signifikante Verschiebung des Altersgipfels bei Diagnosestellung. Während bei diesen Autoren ein klarer Gipfel zwischen dem 70. und 80. Lebensjahr liegt, zeigt sich im hier betrachteten Kollektiv ein deutlich niedrigerer Gipfel um das 65. Lebensjahr und eine insgesamt homogenere Verteilung über die Altersklassen. Diese Beobachtung wird speziell für Deutschland auch von Hampl et al. (2008a) beschrieben. Die Ausbildung eines zweiten Altersgipfels um das 50. Lebensjahr herum, wie beispielsweise in der Leitlinie „Vulvakarzinom“ der Deutschen Gesellschaft für

Gynäkologie und Geburtshilfe beschrieben (DGGG, 2008), konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden.

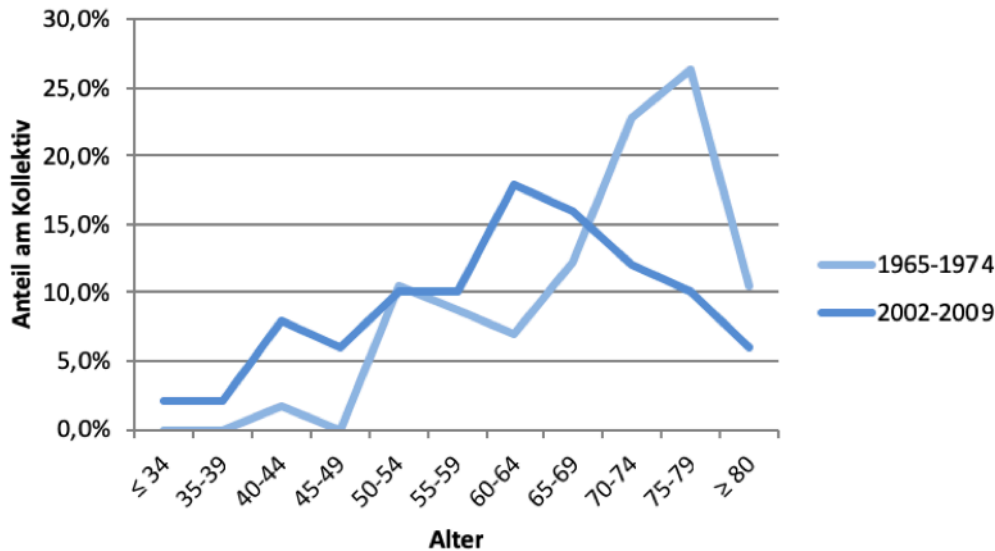


Abb. 45: Altersverteilung 1965-1974 vs. 2002- 2009. Daten von 1965-1974: aus DGGG, 2008, nach Jones et al., 1997. Daten von 2002-2009: eigenes Kollektiv.

Insgesamt entspricht die Altersverteilung in unserer Studie damit publizierten Kollektiven.

Die Literatur berichtet übereinstimmend über eine deutliche Zunahme der jährlichen Neuerkrankungen. In der vorliegenden Studie fand sich im Untersuchungszeitraum ebenfalls ein Anstieg der histopathologischen Diagnosen eines invasiven Vulvakarzinoms von zwei Fällen im Jahr 2002 auf 12 bzw. 11 Fälle in den Jahren 2007 und 2008.

Als nicht-infektionsassoziierte Risikofaktoren für die Entwicklung eines Vulvakarzinoms werden Nikotinabusus und nordeuropäische Abstammung beschrieben.

Zwar war unter den Patientinnen, bei denen Angaben zu Rauchgewohnheiten vorlagen, der Anteil an Raucherinnen höher als der in einer vergleichbaren Altersgruppe unter der Normalbevölkerung (26,9 % vs. 18,2 %) (Statistisches Bundesamt, 2011). Allerdings lagen von nur 52 % der Patientinnen Angaben zu Rauchgewohnheiten vor.

Die Nationalität der Patientinnen im Kollektiv wurde nicht erfasst, bei den Nachnamen handelt es sich jedoch zum Großteil um typisch deutsche Namen, die wenigen Ausnahmen bilden ein türkischer und drei osteuropäisch klingende Namen. Es handelt sich also vermutlich um eine ethnisch sehr homogene Gruppe.

Die Prävalenz eines *Diabetes mellitus* scheint mit 22 % deutlich höher als in den vergleichbaren Altersgruppen der Allgemeinbevölkerung mit 6,8 % der 45-64jährigen und 17,4 % der über 65jährigen Frauen (Robert-Koch-Institut 2011a). Allerdings muss man die unterschiedlichen Erhebungen und die damit eingeschränkte Vergleichbarkeit berücksichtigen. Als eigenständiger Risikofaktor ist Diabetes in der Literatur bisher nicht beschrieben. Über eine einhergehende Immunschwäche könnte er dennoch indirekt Einfluss auf Pathogenese des Vulvakarzinoms nehmen (Dittmer et al., 2011).

4.1.3 p16^{INK4a}-positive HPV-Infektion

In der vorliegenden Studie fand sich bei 30 % der Patientinnen ein p16^{INK4a}- und damit HPV-positives Vulvakarzinom. Dies entspricht, wie im einleitenden Kapitel 1.2.3 zur Rolle der Humanen Papillomviren beschrieben, der erwartbaren Größenordnung.

Diese Patientinnen waren ebenfalls in Übereinstimmung mit der Literatur (siehe Kapitel 1.2.1 Epidemiologie) tendenziell jünger als diejenigen ohne p16^{INK4a}-Positivität, eine Signifikanz ließ sich hier jedoch nicht nachweisen.

4.2 Die klassischen Prognoseparameter

4.2.1 Alter

Ein höheres Alter der Patientin ist in vielen Analysen ein unabhängiger Prognosefaktor für das Vulvakarzinom, wobei der Einfluss in höheren Tumorstadien nachlässt (Beller et al., 2006; Dittmer et al., 2011; Woelber et al., 2009). In der vorliegenden Studie zeigte sich kein prognostischer Einfluss des Alters der Patientin auf das Gesamtüberleben und die Rezidivfreiheit. Woelber et al. (2009) berichten zwar ebenfalls von einer Zunahme der Rezidivhäufigkeit und Gesamtsterblichkeit bei zunehmendem Alter, jedoch nur mit grenzwertiger Signifikanz.

Die Differenz der Daten unserer Studie und publizierter Kollektive kann auf unsere geringe Patientinnenanzahl zurückgeführt werden. Zudem besitzt das Vulvakarzinom typischerweise eine exzellente Prognose. Daher ist das mediane Follow-up in unserer Studie möglicherweise zu kurz, um einen Alterseffekt auf das Überleben identifizieren zu können.

4.2.2 Stadium

84 % der Erstdiagnosen erfolgten in den Tumorstadien T1 und T2. In der vorliegenden Studie liegt mit nur 4 % eine Unterrepräsentation des mikroinvasiven Tumorstadiums pT1a vor. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass nur Patientinnen nach LNE in die Studie eingeschlossen wurden.

Obwohl im Stadium pT1c nur eine Patientin evaluiert wurde und daher das Follow-up hier nicht aussagekräftig ist, zeigen unsere Daten, dass das hier evaluierte Kollektiv publizierten Kohorten entspricht.

4.2.3 Inguinaler Lymphknotenstatus

Kongruent zu publizierten Daten sowie der Leitlinie ist auch in unserer Analyse der inguinale Lymphknotenstatus der aussagekräftigste Prognoseparameter für das Vulvakarzinom. Unabhängig vom Tumorstadium beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate bei nodal-negativen Patientinnen über 80 % (Beller et al., 2006; Raspagliesi et al., 2006; Woelber et al., 2009).

Aktuell wird die onkologische Sicherheit von Sentinellymphonodektomien erforscht. Dieses in der Therapie von Mammakarzinomen bereits etablierte Verfahren verspricht bei gleichbleibender Prognose eine Reduktion der mit der herkömmlichen LNE einhergehenden Morbidität. Die hohe Rate an Wundheilungsstörungen, Lymphozelen und peripheren Lymphödemen ließe sich hierdurch deutlich senken. Das Sentinelverfahren kommt allerdings am ehesten für kleine, unifokale Tumore und auch nur für erfahrene Teams von gynäkologischen Operateuren und Pathologen in Frage, da nur so eine ausreichende Sensitivität und Spezifität erreicht wird (DGGG, 2008; Hampl et al., 2008b; Levenback et al., 2012; van der Zee et al., 2008; Zeppernick et al., 2013). In unserem Kollektiv wurden Sentinellymphonodektomien aufgrund der Neuheit des Verfahrens nicht berücksichtigt, da sich die Patientinnen bereits im Zeitraum 01/2002-8/2009 der Operation unterzogen hatten.

4.2.4 Infiltrationstiefe

Die absolute Infiltrationstiefe (in mm) wird in den histopathologischen Befunden der Vulvakarzinome noch nicht regelhaft angegeben (Daten hierzu lagen nur in 80 % der Fälle vor). Sie eignet sich jedoch zur Ergänzung des standardmäßig angegebenen Stadiums. Sie „weist bei den Plattenepithelkarzinomen der Vulva [...] eine eindeutige Korrelation zur Wahrscheinlichkeit einer Lymphknotenmetastasierung auf“ (DGGG, 2008). Dementsprechend korreliert die Infiltrationstiefe in der vorliegenden Studie mit dem Gesamt- und dem rezidivfreien Überleben.

4.2.5 Resektionsrand

In der Literatur wird die Häufigkeit von Rezidiven mit 30 % bei leitliniengerechtem Resektionsrand von ≥ 10 mm und bis zu 50 % bei geringeren Abständen angegeben. Auch in dieser Studie ist die R0-Resektion ein Prognosefaktor für das Gesamt- und rezidivfreie Überleben. Im Bewusstsein der eingeschränkten operativen Möglichkeiten durch anatomische und tumorbedingte Gegebenheiten unterstreichen unsere Daten damit die Forderung der Leitlinie nach einem möglichst weiten Resektionsrand.

4.3 Die immunologischen und vaskulären Marker

4.3.1 D2-40-basierte Evaluation der peritumoralen Lymphgefäßdichte

Es konnte gezeigt werden, dass D2-40 als Marker für die Lymphgefäßdichte ein signifikanter Prognoseparameter sowohl für das Gesamt- als auch das rezidivfreie Überleben ist. Allerdings ließ sich dieses nur in der quantitativen Analyse belegen, während eine Evaluation mithilfe des Medians zu keiner Signifikanz führte. Dies kann auf die oben beschriebene hohe Variabilität der Lymphgefäßdichte zurückgeführt werden, bei welcher die Verwendung des Medians nicht optimal ist. Bislang wurden nur wenige Studien zur Bedeutung der Lymphgefäßdichte beim Vulvakarzinom unter Verwendung von D2-40 durchgeführt. Es muss aber davon ausgegangen werden, dass eine erhöhte Dichte an peritumoralen Lymphgefäßen die Wahrscheinlichkeit einer Lymphgefäßinvasion erhöht und somit auch, wie bei anderen Tumorentitäten, einen Risikofaktor darstellt (Braun et al., 2009; Imamura et al., 2012; Tomita et al., 2008; Urabe et al., 2006; Weber et al., 2012). In jedem Fall zeigt sich in der Literatur, dass eine Lymphinvasion Aussagekraft bei nodal-negativen Tumoren besitzt (Preti et al., 2000; Raspagliesi et al., 2006).

4.3.2 D2-40-basierte Lymphgefäßdichte und CD31-basierte Blutgefäßdichte

D2-40 als Marker für die Lymphgefäßdichte und CD31 als Marker für Blutgefäßdichte korrelieren signifikant miteinander.

Das Lymphgefäß- dient ebenso wie das Venensystem der kapillären Drainage. Interstitialflüssigkeit und Immunzellen werden in herzwärts gerichteter Strömung aus dem Gewebe abtransportiert und dem Blutkreislauf wieder zugeführt. Das kapilläre Blut- und Lymphgefäßsystem stehen daher in enger anatomischer und funktioneller Beziehung. Dies gilt ebenso für die unmittelbare Umgebung bösartiger Tumoren. Diese induzieren Angiogenese, um eine gute Perfusion ihres stoffwechselaktiven Gewebes sicherzustellen. Weiterhin nutzen sie die Lymphabflusswege zur metastatischen Ausbreitung. Auch in der vorliegenden Studie korreliert das Ausmaß der Lymphangiogenese mit der Blutgefäßdichte in unmittelbarer Umgebung des Tumors.

4.3.3 Nachweis von CD163-positiven TAMs

CD163 ist als Prognoseparameter für das Vulvakarzinom noch nicht etabliert, seine Relevanz als solcher wird aber in jüngster Zeit für verschiedene andere Tumorentitäten evaluiert:

- Ovarialkarzinom: Eine hohe Anzahl CD163-positiver TAMs in malignem Aszites ist mit einem verkürzten rezidivfreien Intervall assoziiert (Reinartz et al., 2013).
- Klarzelliges Nierenkarzinom: Der vermehrte Nachweis von Makrophagen vom M2-Phänotyp mit Expression von CD163 ist mit einem kürzeren Überleben und höheren Tumorstadien assoziiert (Dannenmann et al., 2013).
- Hepatozelluläres Karzinom: Die peritumorale Infiltration von CD163-positiven Makrophagen ist mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert, korreliert jedoch nicht mit dem rezidivfreien Überleben; die intratumorale Infiltration dagegen ist nicht signifikant mit dem Gesamt- oder dem rezidivfreien Überleben assoziiert (Kong et al., 2013).
- Endometriumkarzinom: Eine vermehrte Infiltration mit TAM korreliert mit höheren Tumorstadien und ist ein Prognoseparameter für das rezidivfreie Überleben (Kübler et al., 2014).

Den genannten Publikationen entsprechend konnte in der vorliegenden Studie die prognostische Bedeutung einer Infiltration mit CD163-positiven M2-Makrophagen erstmals beim Vulvakarzinom dargestellt werden. Es ergab sich in den angewandten Selektionsverfahren ein statistisch signifikanter Zusammenhang sowohl mit dem rezidivfreien als auch dem Gesamtüberleben.

Auch die zelluläre Mikroumgebung von Tumoren könnte über die pro- bzw. antiinflammatorischen Wirkungen der TAMs beeinflusst werden. Durch sein distinktes Expressionsmuster und seine Funktion als Endozytose-vermittelnder Rezeptor gilt CD163 als möglicher Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie erkrankter Zellen (*cell-directed therapy*). Da der Rezeptor und seine Liganden während der Endozytose internalisiert werden, könnte dieser Aufnahmemechanismus für den gezielten Transport von Medikamenten oder sogar Genen zu malignen Zellen dienen (Akila et al., 2012).

4.3.4 D2-40-basierte Lymphgefäßdichte und CD163-positive TAMs

Eine weitere interessante Beobachtung unserer Studie ist die Tatsache, dass die Infiltration mit CD163-positiven Makrophagen mit der Anzahl der Lymphgefäße, der Lymphangiogenese sowie dem positiven Nodalstatus korreliert. Makrophagen und Lymphangiogenese beeinflussen sich gegenseitig, sowohl in der embryonalen Entwicklung als auch im Rahmen von pathologischen Prozessen (Böhmer et al., 2011). Lymphgefäße stellen neben Blutgefäßen einen zentralen Transportweg für Immunzellen dar. Die Immunzellen wiederum, und hier insbesondere die Makrophagen, fördern bei Entzündungsreaktionen wie auch neoplastischen Veränderungen das Einsprießen von Lymphgefäßen und bewirken damit eine Steigerung des Lymphflusses. Durch den gesteigerten Transport von Immunzellen in die lokalen Lymphknoten kann eine effektive Immunantwort gewährleistet werden.

Tumor- bzw. TAM-stimulierte Lymphangiogenese resultiert jedoch oft in der Entstehung von abnormalen, durchlässigen Lymphgefäßen. Dies ermöglicht metastatischen Tumorzellen Zugang zum Lymphsystem und erleichtert ihre Aussaat (Harvey und Gordon, 2012).

4.3.5 CD163-positive TAMs und Foxp3-positive T_{reg}

Es fand sich keine signifikante Korrelation zwischen der Menge der peri- und intratumoral nachgewiesenen T_{reg} und der Prognose. Ebenso findet sich keine signifikante Korrelation zwischen TAMs und T_{reg}. Eine Rekrutierung der T_{reg} durch TAMs konnte somit nicht nachgewiesen werden. Dementsprechend postulieren wir, dass die prognostisch ungünstige Wirkung der TAMs beim Vulvakarzinom eher auf deren proangiogenetische Wirkung als auf immunsupprimierende Mechanismen zurückzuführen ist. Tatsächlich wurde für TAMs in anderen Tumorentitäten ein Effekt auf die Angiogenese über eine Sekretion von Interleukin 8 (IL-8) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dargestellt (Fujimoto et al., 2002; Jiang et al., 2012).

4.4 Limitationen der Studie

Eine mögliche Einschränkung der Aussagekraft der vorliegenden Studie ist ihre Retrospektivität und Monozentrität.

Es handelt sich bei der vorliegenden Dissertation um eine retrospektive Studie, da die niedrige Prävalenz des Vulvakarzinoms die Durchführung prospektiver Studien deutlich erschwert.

Im Untersuchungszeitraum von 2002 bis 2009 standen sowohl die Frauenklinik als auch das Institut für Pathologie und die Radiologische Klinik der Universitätsklinik Bonn unter jeweils gleicher chefärztlicher Leitung, was den großen Vorteil einer geringen Variabilität bei der histopathologischen Befundung sowie den operativen und adjuvanten Therapieentscheidungen und -modalitäten bietet.

4.5 Fazit

Diagnose und Therapie von Malignomen haben in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Fortschritte erlebt. Die Prognose vieler Tumorleiden konnte signifikant verbessert werden. Obwohl sich vor allem wegen der steigenden Lebenserwartung immer mehr Menschen Zeit ihres Lebens mit einer Krebsdiagnose konfrontiert sehen, sind die Heilungschancen so hoch wie nie zuvor. Dies ist sowohl der verbesserten Früherkennung als auch den immensen Fortschritten der Krebstherapien zu verdanken.

Das Vulvakarzinom ist ein seltenes Malignom, und vor allem im Vergleich zu deutlich häufigeren gynäkologischen Tumoren wie dem Ovarial-, Zervix- oder Endometriumkarzinom existieren bisher nur wenige Studien zu Diagnostik, Prognoseparametern und Therapie. Aufgrund der steigenden Inzidenz und nicht zuletzt auch wegen der potentiell revolutionären Präventionsmöglichkeiten durch die HPV-Impfung rückt das Vulvakarzinom zur Zeit in den Fokus der Forschung. Vor allem molekular- und immunpathologische Marker sollen diagnostische und therapeutische Entscheidungshilfen bieten.

In der vorliegenden Dissertation konnten die etablierten histopathologischen Prognoseparameter bestätigt werden. Der Nodalstatus, der in der Literatur übereinstimmend als wichtigster Prognosefaktor bezeichnet wird, sowie das Tumorstadium und der operative Resektionsrand hatten entscheidenden Einfluss auf die Rezidivfreiheit und das Gesamtüberleben.

Es wurde weiterhin der Frage nachgegangen, welche immunologischen Mechanismen diagnostisch und therapeutisch genutzt werden können. Besonderes Augenmerk lag hier auf dem Einfluss Tumor-assoziiertes Makrophagen und regulatorischer T-Zellen. TAMs wirken immunsuppressiv und fördern das Tumorwachstum und die Metastasierung.

Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass CD163, das der Identifikation von TAMs dient, ein relevanter Prognosefaktor für das Vulvakarzinom ist, wobei eine hohe peritumorale Infiltration mit einer schlechten Prognose einherging. Zudem war es mit Mechanismen der Lymphknotenmetastasierung assoziiert, wodurch sich der prognostische Einfluss erklären könnte.

T_{reg}-Zellen werden sowohl vom Tumor als auch von TAMs rekrutiert und unterdrücken die gegen den Tumor gerichtete Immunantwort des Organismus. In der vorliegenden Studie war Foxp3 als Marker für T_{reg}-Zellen jedoch kein signifikanter Prognosefaktor, und auch eine Korrelation von CD163 und Foxp3 und somit eine Induktion von T_{reg} durch TAMs ließ sich nicht belegen.

Künftig könnten die bisherigen klinischen und histopathologischen Angaben von Malignomen durch immunhistochemische Befunde ergänzt werden, um exaktere diagnostische und prognostische Aussagen und Therapieentscheidungen zu treffen. Der Nachweis Tumor-assoziiertes Makrophagen könnte zukünftig genutzt werden, um Patientinnen zu identifizieren, die von einer CD163-fokussierten Therapie profitieren könnten.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Das Vulvakarzinom ist ein seltenes Malignom des weiblichen Genitaltrakts, dessen Inzidenz jedoch in den letzten Jahrzehnten stetig zunimmt. Eine auf individuellen Patienten- und Tumorcharakteristika basierende Therapie könnte den Behandlungserfolg steigern. Trotz etablierter Leitlinie ist das Wissen um solche prognostischen Faktoren limitiert und beschränkt sich auf klinische und histopathologische Parameter. Neuere immunologische Marker nehmen bisher keinen Standardplatz in Diagnostik und Therapie ein. Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, den Stellenwert immunsuppressiver Mechanismen im peritumoralen Mikromilieu für die Prognose des Vulvakarzinoms zu evaluieren.

Methodik: Das Studienkollektiv besteht aus einem retrospektiven Kollektiv von 50 Patientinnen, bei denen im Zeitraum von 01/2002 bis 08/2009 an der Universitätsfrauenklinik Bonn ein Plattenepithelkarzinom der Vulva diagnostiziert wurde. Die Anamnese, der pathologische Befund und die Weiterbehandlungsdokumentation wurden aus den Krankenakten der Patientinnen gewonnen sowie teilweise in Telefoninterviews erhoben. Es wurden folgende immunhistochemischen Färbungen durchgeführt: p16^{INK4a} zur Evaluation einer Infektion mit Humanen Papillomaviren, CD163 zur Identifizierung Tumor-assoziiertes Makrophagen, Foxp3 zur Identifizierung regulatorischer T-Zellen, D2-40 zur Analyse der Lymphgefäßdichte und CD31 zur Analyse der Blutgefäßdichte. Die klinischen, histopathologischen und immunhistochemischen Befunde wurden hinsichtlich ihres prognostischen Einflusses auf das Gesamt- sowie das rezidivfreie Überleben analysiert.

Ergebnisse: Als ungünstige Prognoseparameter für das Gesamt- und das rezidivfreie Überleben konnten fortgeschrittenes Tumorstadium, größere Infiltrationstiefe, positiver Lymphknotenstatus, knapper Resektionsrand, vermehrte D2-40-basierte Lymphgefäßdichte sowie eine hohe Anzahl CD163-positiver Tumor-assoziiertes Makrophagen identifiziert werden. Zudem zeigte sich eine Assoziation von CD163-positiven Tumor-assoziiertes Makrophagen mit hoher Lymphgefäßdichte, Lymphgefäßinvasion und positivem Lymphknotenstatus.

Schlussfolgerung: Die etablierten histopathologischen Prognoseparameter konnten bestätigt werden. Tumor-assoziiertes Makrophagen scheinen in der Tumorbilogie des Vulvakarzinoms eine Rolle zu spielen. Ihr Nachweis könnte zukünftig genutzt werden, um

Hochrisikopatientinnen zu identifizieren, die von einer CD163-fokussierten Therapie profitieren könnten.

6. Literaturverzeichnis

- Abang Mohammed DK, Uberoi R, de B Lopes A, Monaghan JM. Inguinal Node Status by Ultrasound in Vulva Cancer. *Gynecol Obstet* 2000; 77 :93-96
- Akila P, Prashant V, Suma MN, Prashant SN, Chaitra TR. CD163 and its expanding functional repertoire. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 669-674
- Alonso I, Fusté V, del Pino M, Castillo P, Torné A, Fusté P, Rios J, Pahisa J, Balasch J, Ordi J. Does human papillomavirus infection imply a different prognosis in vulvar squamous cell carcinoma? *Gynecol Oncol* 2011; 122: 509-514
- Ansink A. Vulvar squamous cell carcinoma. *Semin Dermatol* 1996; 15: 51-59
- Arango HA, Hoffman MS, Roberts WS, DeCesare SL, Fiorica JV, Drake J. Accuracy of Lymph Node Palpation to Determine Need for Lymphadenectomy in Gynecologic Malignancies. *Obstet Gynecol* 2000; 95: 553-556
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 539-545
- Barnes EA, Thomas G. Integrating radiation into the management of vulvar cancer. *Semin Radiat Oncol* 2006; 16: 168-176
- Beller U, Quinn MA, Benedet JL, Creasman WT, Ngan HY, Maisonneuve P, Pecorelli S, Odicino F, Heintz AP. Carcinoma of the vulva. FIGO 6th Annual report on the results of treatment in Gynecological cancer. *Int J Gynecol Obstet* 2006; 95: 7-27
- Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood* 2006; 108: 804-811
- Böhmer R, Neuhaus B, Bühren S, Zhang D, Kiefer F, 2011: Leukozyten regulieren die Entwicklung von Lymphgefäßen. http://www.mpg.de/1195260/Entwicklung_Lymphgefuesse (Zugriffsdatum: 29.12.2013)
- Braun M, Wardelmann E, Debold M, Walgenbach-Bruenagel G, Höller T, Wolfgarten M, Sauerwald A, Rudlowski C, Büttner R, Kuhn W, Pölcher M. Detection of lymphovascular invasion in vulvar cancer by D2-40 (podoplanin) as a predictor for inguinal lymph node metastases. *Onkologie* 2009; 32: 732-738
- Chen JJ, Lin YC, Yao PL, Yuan A, Chen HY, Shun CT, Tsai MF, Chen CH, Yang PC. Tumor-Associated Macrophages: The Double-Edged Sword in Cancer Progression. *J Clin Oncol* 2005; 23: 953-964
- Chung CT, Da Cunha Santos G, Hwang DM, Ludkovski O, Pintilie M, Squire JA, Tsao MS. FISH assay development for the detection of p16/CDKN2A deletion in malignant pleural mesothelioma. *J Clin Pathol* 2010; 63: 630-634

Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10: 942-949

Dannenmann SR, Thielicke J, Stöckli M, Matter C, von Boehmer L, Cecconi V, Hermanns T, Hefermehl L, Schraml P, Moch H, Knuth A, van den Broek M. Tumor-associated macrophages subvert: T-cell function and correlate with reduced survival in clear cell renal cell carcinoma. *Onco Immunology* 2013; 2:e23562

Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. (DGOG) (Hrsg.). Interdisziplinäre S2K-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie des Vulvakarzinoms und seiner Vorstufen (AWMF-Leitlinien-Register Nr. 015/059), 2008

Dittmer C, Katalinic A, Mundhenke C, Thill M, Fischer D. Epidemiology of vulvar and vaginal cancer in Germany. *Arch Gynecol Obstet.* 2011; 284: 169-174

Fujimoto J, Aoki I, Khatun S, Toyoki H, Tamaya T. Clinical implications of expression of interleukin-8 related to myometrial invasion with angiogenesis in uterine endometrial cancers. *Ann Oncol* 2002; 13: 430–434

Ganjoo KN, Witten D, Patel M, Espinosa I, La T, Tibshirani R, van de Rijn M, Jacobs C, West RB. The Prognostic Value of Tumor-Associated Macrophages in Leiomyosarcoma: A Single Institution Study. *Am J Clin Oncol* 2011; 34: 82-86

Ha TY. The Role of Regulatory T Cells in Cancer. *Immune Netw* 2009; 9: 209-235

Hacker NF, Berek JS, Lagasse LD, Leuchter RS, Moore JG. Management of Regional Lymph Nodes and Their Prognostic Influence in Vulvar Cancer. *Obstet Gynecol* 1983a; 61: 408-412

Hacker NF, Nieberg RK, Berek JS, Leuchter RS, Lucas WE, Tamimi HK, Nolan JF, Moore JG, Lagasse LD. Superficially invasive vulvar cancer with nodal metastases. *Gynecol Oncol* 1983b; 15: 65-77

HAMPL M, Sarajuuri H, Wentzensen N, Bender HG, Kueppers V. Effect of human papillomavirus vaccines on vulvar, vaginal, and anal intraepithelial lesions and vulvar cancer. *Obstet Gynecol* 2006; 108: 1361-1368

HAMPL M, Deckers-Figiel S, HAMPL JA, Rein D, Bender HG. New aspects of vulvar cancer: Changes in localization and age of onset. *Gynecol Oncol* 2008a; 109: 340-345

HAMPL M, Hantschmann P, Michels W, Hillemanns P. Validation of the accuracy of the sentinel lymph node procedure in patients with vulvar cancer: results of a multicenter study in Germany. *Gynecol Oncol* 2008b; 111: 282-288

Harvey NL, Gordon EJ. Deciphering the roles of macrophages in developmental and inflammation stimulated lymphangiogenesis. *Vascular Cell* 2012; 4: 15

Heaps JM, Fu YS, Montz FJ, Hacker NF, Berek JS. Surgical-pathologic variables predictive of local recurrence in squamous cell carcinoma of the vulva. *Gynecol Oncol* 1990; 38: 309-314

Horn LC, Beckmann MW, Beller A, Schmidt D, Ulrich U, Hantschmann P, Wittekind C. Änderungen der TNM-Klassifikation gynäkologischer Tumoren. *Pathologe* 2010; 31: 367-373

Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials. *Int J Cancer* 2007; 121: 2373–2380

Imamura Y, Watanabe M, Nagai Y, Baba Y, Hirashima K, Karashima R, Iwatsuki M, Yoshida N, Kinoshita K, Kurashige J, Iyama K, Baba H. Lymphatic vessel invasion detected by the D2-40 monoclonal antibody is an independent prognostic factor in node-negative esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 2012; 105: 277-283

Institut für Krebsepidemiologie Lübeck 2011: Aktuelle Zahlen zum Vulvakarzinom. <http://www.krebsregister-sh.de/datenbank/Vulva2011.pdf> (Zugriffsdatum: 06.08.2011)

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277–300

Jiang XF, Tang QL, Shen XM, Li HG, Chen LH, Wang XY. Tumor-associated macrophages, epidermal growth factor receptor correlated with the triple negative phenotype in endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Pathol Res Pract* 2012; 208: 730–735

Jones RW, Baranyai J, Stables S. Trends in squamous cell carcinoma of the vulva: the influence of vulvar intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 1997; 90: 448-452

Jones RW, Rowan DM, Stewart AW. Vulvar intraepithelial neoplasia: aspects of the natural history and outcome in 405 women. *Obstet Gynecol* 2005; 106: 1319-1326

Josefowicz SZ, Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 2009; 30: 616-625

Judson PL, Habermann EB, Baxter NN, Durham SB, Virnig BA. Trends in the incidence of invasive and in situ vulvar carcinoma. *Obstet Gynecol* 2006; 107: 1018-1022

Kahn HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest* 2002; 82: 1255-1257

Kokka F, Singh N, Faruqi A, Gibbon K, Rosenthal AN. Is differentiated vulval intraepithelial neoplasia the precursor lesion of human papillomavirus-negative vulval squamous cell carcinoma? *Int J Gynecol Cancer* 2011; 21: 1297-1305

Kong LQ, Zhu XD, Xu HX, Zhang JB, Lu L, et al., The Clinical Significance of the CD163+ and CD68+ Macrophages in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE* 2013; 8

Kübler K, Ayub TH, Weber SK, Zivanovic O, Abramian A, Keyver-Paik MD, Mallmann MR, Kaiser C, Serçe NB, Kuhn W, Rudlowski C. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 2014; 135: 176-183

Kryczek I, Liu R, Wang G, Wu K, Shu X, Szeliga W, Vatan L, Finlayson E, Huang E, Simeone D, Redman B, Welling TH, Chang A, Zou W. FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease. *Cancer Res* 2009; 69: 3995-4000

Levenback CF, Ali S, Coleman RL, Gold MA, Fowler JM, Judson PL, Bell MC, De Geest K, Spirtos NM, Potkul RK, Leitao MM Jr, Bakkum-Gamez JN, Rossi EC, Lentz SS, Burke JJ 2nd, Van Le L, Trimble CL. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in women with squamous cell carcinoma of the vulva: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol* 2012; 30: 3786-3791

Lewis AM, Varghese S, Xu H, Alexander HR. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *J Translational Medicine* 2006; 4: 48

Liggett WH, Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1197-1206

Lu H. FOXP3 expression and prognosis: role of both the tumor and T cells. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1735-1736

Lutsiak ME, Tagaya Y, Adams AJ, Schlom J, Sabzevari H. Tumor-induced impairment of TCR signaling results in compromised functionality of tumor-infiltrating regulatory T cells. *J Immunol* 2008; 180: 5871-5881

Madeleine MM, Daling JR, Carter JJ, Wipf GC, Schwartz SM, McKnight B, Kurman RJ, Beckmann AM, Hagensee ME, Galloway DA. Cofactors with human papillomavirus in a population-based study of vulvar cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1516-1523

Madsen BS, Jensen HL, van den Brule AJ, Wohlfahrt J, Frisch M. Risk factors for invasive squamous cell carcinoma of the vulva and vagina--population-based case-control study in Denmark. *Int J Cancer* 2008; 122: 2827-2834

Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* 1992; 13: 265-270

Mantovani A. Tumor-associated macrophages in cancer-related inflammation. *Immunotherapy* 2011; 3: 21-22

Medistat GmbH, 2013: Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman. <http://www.medistat.de/statistik-lexikon-medizin-spearman-korrelation.html> (Zugriffsdatum: 22.09.2013)

Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, Malventano C, Triulzi T, Mènard S, Tagliabue E, Balsari A. FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1746-1752

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-527

National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2012a: Entrez Gene: CDKN2A cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (Homo sapiens). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=1029> (Zugriffsdatum: 14.02.2012)

National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2012b: Entrez Gene: FOXP3 forkhead box P3 (Homo sapiens). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/50943> (Zugriffsdatum: 14.02.2012)

National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2012c: Entrez Gene: PECAM1 platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (Homo sapiens). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5175> (Zugriffsdatum: 14.02.2012)

National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2012d: Entrez Gene: CD163 (Homo sapiens). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9332> (Zugriffsdatum: 17.02.2012)

O'Neill CJ, McCluggage WG. p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol* 2006; 13: 8-15

Özdemir C, Akdis M, Akdis CA. T regulatory cells and their counterparts: masters of immune regulation. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 626-639

Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 2006; 118: 3030-3044

Piura B, Masotina A, Murdoch J, Lopes A, Morgan P, Monaghan J. Recurrent squamous cell carcinoma of the vulva: a study of 73 cases. *Gynecol Oncol* 1993; 48: 189-195

Preti M, Ronco G, Ghiringhello B, Micheletti L. Recurrent squamous cell carcinoma of the vulva. *Cancer* 2000; 88: 1869-1876

Raspagliesi F, Hanozet F, Ditto A, Solima E, Zanaboni F, Vecchione F, Kusamura S. Clinical and pathological prognostic factors in squamous cell carcinoma of the vulva. *Gynecol Oncol* 2006; 102: 333-337

Reinartz S, Schumann T, Finkernagel F, Wortmann A, Jansen JM, Meissner W, Krause M, Schwörer AM, Wagner U, Müller-Brüsselbach S, Müller R. Mixed-polarization phenotype of ascites-associated macrophages in human ovarian carcinoma: Correlation of CD163 expression, cytokine levels and early relapse. *Int J Cancer* 2013; <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.28335/pdf> (Zugriffsdatum: 26.07.2013)

Riethdorf S, Neffen EF, Cviko A, Löning T, Crum CP, Riethdorf L. p16INK4A expression as biomarker for HPV 16-related vulvar neoplasias. *Hum Pathol* 2004; 35: 1477-1483

Robert Koch-Institut (RKI) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V (Hrsg.). Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Berlin, 2010

Robert Koch-Institut (RKI) (Hrsg.). Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie „Gesundheit in Deutschland aktuell 2009“. Berlin: Robert Koch-Institut, 2011a

Robert Koch-Institut (RKI) (Hrsg.). Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut / Stand: August 2011. Epid Bull 2011b; Nr.30

Robert Koch-Institut (RKI) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). Krebs in Deutschland 2007/2008, 8. Ausgabe. Berlin, 2012

Santos M, Landolfi S, Olivella A, Lloveras B, Klostermeier J, Suárez H, Alòs L, Puig-Tintoré LM, Campo E, Ordi J. p16 overexpression identifies HPV-positive vulvar squamous cell carcinomas. Am J Surg Pathol 2006; 30: 1347-1356

Schabowsky RH, Madireddi S, Sharma R, Yolcu ES, Shirwan H. Targeting CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T-cells for the augmentation of cancer immunotherapy. Curr Opin Investig Drugs 2007; 8: 1002-1008

Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. Lancet 2007; 370: 890-907

Shevach EM. Fatal attraction: tumors beckon regulatory T cells. Nat Med 2004; 10: 900-901

Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. Immunity 2009; 30: 636-645

Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S. Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. J Immunol, 2005; 174: 636-645

Solinas G, Schiarea S, Liguori M, Fabbri M, Pesce S, Zammataro L, Pasqualini F, Nebuloni M, Chiabrando C, Mantovani A, Allavena P. Tumor-conditioned macrophages secrete migration-stimulating factor: a new marker for M2-polarization, influencing tumor cell motility. J Immunol 2010; 185: 642-652

Sotlar K. Die Infektion mit humanen Papillomaviren - Pathologie und Molekularpathologie. Pathologie 2008; 29: 153-156

Srodon M, Stoler MH, Baber GB, Kurman RJ. The distribution of low and high-risk HPV types in vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia (VIN and VaIN). Am J Surg Pathol 2006; 30: 1513-1518

Statistisches Bundesamt (Hrsg.). Mikrozensus - Fragen zur Gesundheit - Rauchgewohnheiten der Bevölkerung 2009. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt, 2011

Statistisches Bundesamt (Hrsg.). Todesursachen in Deutschland 2009. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt, 2010

Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, Delaney A, Jones SJ, Iqbal J, Weisenburger DD, Bast MA, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Rimsza LM, Campo E, Delabie J, Braziel RM, Cook JR, Tubbs RR, Jaffe ES, Lenz G, Connors JM, Staudt LM, Chan WC, Gascoyne RD. Tumor-Associated Macrophages and Survival in Classic Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* 2010; 362: 875-885

Sturgeon SR, Brinton LA, Devesa SS, Kurman RJ. In situ and invasive vulvar cancer incidence trends (1973 to 1987). *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 1482-1485

Tomita N, Matsumoto T, Hayashi T, Arakawa A, Sonoue H, Kajiyama Y, Tsurumaru M. Lymphatic invasion according to D2-40 immunostaining is a strong predictor of nodal metastasis in superficial squamous cell carcinoma of the esophagus: algorithm for risk of nodal metastasis based on lymphatic invasion. *Pathol Int* 2008; 58: 282-287

Tumorzentrum Erlangen-Nürnberg, 2011: Gynäkologische Vorsorge: Zervixkarzinom. <http://www.tumorzentrum.uk-erlangen.de/e1846/e4779/e5219/inhalt5297/Brucker.pdf> (Zugriffsdatum: 06.08.2011)

Tumorzentrum München (Hrsg.). Manual Vulvakarzinom. München: W. Zuckschwerdt, 2001

Ueda Y, Enomoto T, Kimura T, Yoshino K, Fujita M, Kimura T. Two distinct pathways to development of squamous cell carcinoma of the vulva. *J Skin Cancer*. 2011; 2011: 951250

Urabe A, Matsumoto T, Kimura M, Sonoue H, Kinoshita K. Grading system of lymphatic invasion according to D2-40 immunostaining is useful for the prediction of nodal metastasis in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Histopathology* 2006; 49: 493-497

Van de Nieuwenhof HP, van der Avoort IA, de Hullu JA. Review of squamous premalignant vulvar lesions. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 68: 131-156

Van den Heuvel MM, Tensen CP, van As JH, Van den Berg TK, Fluitsma DM, Dijkstra CD, Döpp EA, Droste A, Van Gaalen FA, Sorg C, Högger P, Beelen RH. Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 858-866

Van der Zee AG, Oonk MH, De Hullu JA, Ansink AC, Vergote I, Verheijen RH, Maggioni A, Gaarenstroom KN, Baldwin PJ, Van Dorst EB, Van der Velden J, Hermans RH, van der Putten H, Drouin P, Schneider A, Sluiter WJ. Sentinel node dissection is safe in the treatment of early-stage vulvar cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 884-889

Van Seters M, van Beurden M, de Craen AJ. Is the assumed natural history of vulvar intraepithelial neoplasia III based on enough evidence? A systematic review of 3322 published patients. *Gynecol Oncol* 2005; 97: 645-651

Vasievich EA, Huang L. The suppressive tumor microenvironment: a challenge in cancer immunotherapy. *Mol Pharm* 2011; 8: 635-641

Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Paavonen J, Iversen OE, Olsson SE, Høye J, Steinwall M, Riis-Johannessen G, Andersson-Ellstrom A, Elfgren K, Krogh G, Lehtinen M, Malm C, Tamms GM, Giacoletti K, Lupinacci L, Railkar R, Taddeo FJ, Bryan J, Esser MT, Sings HL, Saah AJ, Barr E. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer* 2006; 95: 1459-1466

Virchow R. Zur Diagnose und Prognose des Carcinoms. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 1888; 111: 1–24

Weber SK, Sauerwald A, Pölcher M, Braun M, Debald M, Serce NB, Kuhn W, Brunagel-Walgenbach G, Rudlowski C. Detection of lymphovascular invasion by D2-40 (podoplanin) immunoexpression in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2012; 22: 1442-1448

Woelber L, Mahner S, Voelker K, Eulenburg CZ, Giesecking F, Choschzick M, Jaenicke F, Schwarz J. Clinicopathological prognostic factors and patterns of recurrence in vulvar cancer. *Anticancer Res* 2009; 29: 545-552

Yoder BJ, Rufforny I, Massoll NA, Wilkinson EJ. Stage IA Vulvar Squamous Cell Carcinoma: An Analysis of Tumor Invasive Characteristics and Risk. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 765-772

Zeppernick F, Kupec T, Zalewski M, Papatthemelis T, Maass N. Vulvakarzinom. *Gynäkologie* 2013; 46: 403-414

Zwadlo G, Voegeli R, Schulze Osthoff K, Sorg C. A monoclonal antibody to a novel differentiation antigen on human macrophages associated with the down-regulatory phase of the inflammatory process. *Exp Cell Biol* 1987; 55: 295-304

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Walther Kuhn und Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Gembruch für die freundliche Überlassung des Themas.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Christian Rudlowski für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Leitung anzufertigen.

Herrn Dr. med. Axel Sauerwald danke ich für die gemeinsame Entwicklung der Fragestellung.

Frau Dr. med. Kirsten Kübler danke ich ganz herzlich für die weitere Betreuung und für viele hilfreiche Erklärungen und Anregungen.

Mein Dank gilt weiterhin folgenden Personen, die mich während meiner Promotionsarbeit mit ihrem Wissen und Können unterstützt haben:

Frau Jennifer Nadal (Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie der Universität Bonn), Frau Christiane Esch (Institut für Pathologie der Universität Bonn), Frau Simone Hein (Labor der Unifrauenklinik Bonn), Herrn Andreas Krajak (Archiv der Unifrauenklinik Bonn) und Frau Ariane Cieslak (Medizinisches Dekanat der Universität Bonn).

Ich danke den niedergelassenen Haus- und Frauenärzten in Bonn und Umgebung sowie ganz besonders den Patientinnen und ihren Angehörigen für ihre bereitwilligen Auskünfte.

Ich möchte mich am Ende ganz herzlich bei meiner Familie bedanken.

Bei meinen Eltern Hubert und Theresia Ohlert: ihr habt mir mein Studium ermöglicht, und mir all die Jahre Rückhalt gegeben.

Bei meinem Mann Dr. med. Björn Rohr: für inspirierende Diskussionen, Hilfe beim Formatieren von Text und Grafiken, und vor allem für deine Liebe.

Bei meiner besten Freundin Dr. med. Sarah Grasmeyer: für deine Motivation, viele hilfreiche Tipps, das Korrekturlesen, und vor allem für deine Freundschaft seit Beginn unseres Studiums.

Und bei meinem großen Sohn Benjamin und meinem kleinen Sohn Julian: ihr seid mein ganzer Stolz!