

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik
für Dermatologie und Venerologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

(Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Ch. Marsch)

Makrophagen-vermittelte VEGF-C-Expression bei Lymphkapillarhyperplasie nach Strahlentherapie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Susanne Jackowski

geboren am 23.11.1980 in Halle (Saale)

Betreuer: Prof. Dr. P. Helmbold

Gutachter: Prof. Dr. P. Helmbold, Prof. Dr. J.Dunst

Datum der Verteidigung: 28.01.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000013223

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013223>]

Referat und bibliographische Beschreibung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer Strahlentherapie auf das Lymphgefäßsystem der menschlichen Haut untersucht. Aufgrund von Vorarbeiten, bei denen eine Hyperplasie von Lymphkapillaren nach einer Strahlentherapie in der Haut festgestellt wurde, tat sich die Frage nach den Pathomechanismen auf.

Ziel dieser Arbeit waren Veränderungen des Lymphgefäßwachstum in humaner Haut nach Bestrahlung im Zusammenhang mit Makrophagen und VEGF-C-Expression zu untersuchen.

Methoden und Ergebnisse: Von 40 Patienten (Alter $58,22 \pm 11,36$ Jahre) wurden nach einer abgeschlossenen Strahlentherapie (50 Gy, Fraktionen von 2 Gy; äquivalente Hautdosis 30-35 Gy) Hautproben aus der vorderen Axillarlinie im bestrahlten Areal und dem kontralateralen unbestrahlten Areal entnommen. Davon angefertigte Schnitte wurden immunhistochemisch mit CD68- und VEGF-C-Antikörper untersucht. Die Bestimmung der Dichten der CD68-positiven Zellen und der VEGF-C-positiven Zellen ergaben eine signifikant höhere Anzahl in dem bestrahlten Gebiet im Vergleich zu dem unbestrahlten Gebiet. Zu diesen Ergebnissen wurden Daten der Promotionsarbeit von M. Janusch der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg hinzugezogen, bei denen in den selben Hautproben eine Zunahme der Lymphgefäßdichte nach der Radiation auf der bestrahlten Seite beobachtet wurde.

Schlussfolgerungen: In Folge einer Bestrahlung mit 50 Gy (30-35 Gy äquivalente Hautdosis) kommt es zu einer Erhöhung der Makrophagendichte im oberen horizontalen dermalen Gefäßplexus, wovon ein Teil VEGF-C auf ihrer Oberfläche exprimieren. VEGF-C als ein Wachstumsfaktor für Lymphgefäße kann daraufhin die Lymphangiogenese aktivieren.

Jackowski, Susanne: Makrophagen-vermittelte VEGF-C-Expression bei Lymphkapillarhyperplasie nach Strahlentherapie

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 52 Seiten, 2006

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Lymphgefäße	1
1.2 Lymphödem und lymphogene Metastasierung	2
1.3 Strahlentherapie und Lymphgefäße	3
1.4 Vorarbeiten an der Klinik für Dermatologie in Halle	5
1.5 Wissenschaftliche Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen	5
1.6 Makrophagen	6
2 Zielstellung	8
3 Material und Methoden	9
3.1 Material	9
3.1.1 Patientencharakterisierung und Biopsiegewinnung	9
3.1.2 Vorarbeiten	11
3.2 Methoden	11
3.2.1 Schnitte	11
3.2.2 Immunhistochemische Färbemethode CD68- und VEGF-C-Antikörper	13
3.2.3 Mikroskopische Analyse	13
3.2.4 Datenerfassung	15
3.3 Statistische Analysen	15
4 Ergebnisse	17
4.1 Evaluierung der Methode	17
4.2 Allgemeine Beobachtungen	17
4.3 CD68-positive Zellen	17
4.4 VEGF-C-positive Zellen	21
4.5 Zusammenhangsanalysen	23

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	III
4.6 Weitere Zusammenhänge	24
5 Diskussion	25
5.1 Evaluierung der Methode	28
5.2 Objektivität, Reliabilität, Validität	28
5.3 Studiendesign	30
6 Zusammenfassung und Ausblick	32
7 Literaturverzeichnis	34
8 Anhang	40
8.1 Legende zu den Mikrophotographien	40
8.2 Arbeitstabelle CD68- und VEGF-C-positive Zellen	42
8.3 Stadieneinteilung nach dem AJCC	44
8.4 Auswertung der Vorarbeiten an Lymph- und Blutgefäßen	45
9 Thesen	49
Tabellarischer Lebenslauf	50
Publikation	51
Selbstständigkeitserklärung	52

Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AK	Antikörper
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DNA	Desoxyribonucleic Acid
HE	Hämatoxylin-Eosin
ICRU	International Commission on Radiation Units and Measurements
IL	Interleukin
INF α	Interferon α
Mak	Makrophagen
mAK	Monoklonaler Antikörper
MW	Mittelwert
n	Anzahl
n.d.	nicht definiert
n.s.	nicht signifikant
p	Signifikanzniveau
SD	Standardabweichung
TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
tPE	Probeentnahmezeit
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Abbildungsverzeichnis

1	Dichte der CD68-positiven Zellen in bestrahlter und unbestrahlter Haut	18
2	Dichte der CD68-positiven Zellen in bestrahlter und unbestrahlter Haut im Zeitverlauf	20
3	Dichte der VEGF-C-positiven Zellen in bestrahlter und unbestrahlter Haut	21
4	Dichte der VEGF-C-positiven Zellen in bestrahlter und unbestrahlter Haut im Zeitverlauf	22
5	Mikrophotographien des oberen horizontalen Plexus der bestrahlten und unbestrahlten Haut	41
6	Vergleich Lymphgefäße bestrahlt und unbestrahlt	46
7	Vergleich Blutgefäße bestrahlt und unbestrahlt	47
8	Vergleich gesamte Lymphgefäße bestrahlt und unbestrahlt über die Zeit	47
9	Vergleich gesamte Blutgefäße bestrahlt und unbestrahlt über die Zeit	48

Tabellenverzeichnis

1	Patientencharakterisierung	12
2	Arbeitstabelle CD68- und VEGF-C-positive Zellen	43
3	Stadieneinteilung nach AJCC	44

1 Einleitung

In diesem Abschnitt wird zunächst allgemein auf den Aufbau, Funktion und die Entstehung der Lymphgefäße eingegangen. Folgend wird der klinische Bezug dieser Arbeit dargestellt. In Abschnitt 1.3 erfolgt ein Einstieg in die bis jetzt bekannten Erkenntnisse zum Einfluss von Bestrahlung auf Lymphgefäße. Diese Ausführungen werden im Abschnitt 1.4 durch neuere Daten aus der Klinik für Dermatologie in Halle ergänzt [25]. Im Abschnitt 1.5 wird die Grundhypothese dieser Arbeit, die makrophagenvermittelte VEGF-C-Stimulation der Lymphogenese nach Strahlentherapie, vorgestellt. Abschließend wird eine kurze Einführung über Einteilung und Funktion von Makrophagen gegeben.

1.1 Lymphgefäße

Schon in der antiken Medizin waren Strukturen bekannt, die wir heute als Lymphgefäße bezeichnen [27]. Wissenschaftlich dokumentiert wurden Beobachtungen über ein „Milchgefäß“ erstmals im 17. Jahrhundert von dem Anatomen Gaspar Asellius (1581-1626), der an der norditalienischen Universität Pavia tätig war [2]. Zur selben Zeit beschrieb William Harvey das Blutgefäßsystem [21]. Im Gegensatz zur Erforschung des Blutgefäßsystems war die Erforschung des Lymphgefäßsystems nicht so intensiv. Somit sind viele Fragen, die die Biologie der Lymphgefäße betreffen, noch immer unbeantwortet. Der Nachweis von Molekülen, die relativ spezifisch von lymphatischen Endothel exprimiert werden, wie Podoplanin, LYVE-1, VEGFR-3, PROX-1, Desmoplakin [28] und beta-Chemokine Rezeptor D6, ermöglichte einen neuen Einblick in die molekularen Mechanismen, die die Lymphgefäßentwicklung und -funktion kontrollieren. Es folgten viele Forschungen, die das Lymphgefäßsystem neben dem Blutkreislauf als einen wichtigen Bestandteil in unserem Körper erkennen ließen.

Das Lymphgefäßsystem ist ein unidirektionales Drainagesystem, welches in anatomischer Beziehung zum Blutgefäßsystem steht. Es dient dem Transport von Lymphe, als Filterstation und der Antigenpräsentierung. Die Lymphe enthält in Gewebsspalten angesammelte Stoffe wie Wasser, Eiweiße, Zelltrümmer, Fremd-

körper, Fette und Bakterien. Ihre Bildung erfolgt im initialen Lymphsinus. Über nachgeschaltete Stationen wie die Präkolektoren, Kolektoren, Lymphknoten und Lymphstämme mündet die Lymphe in den Venenwinkel und wird somit in den Blutkreislauf eingegliedert.

Eine Neuentstehung von Lymphgefäßen wird bei erhöhter Lymphlast, nach Traumata, in ischämischen Geweben, in chronischen Entzündungen und durch Tumoren angeregt [46, 45, 30, 29].

Als ein Wachstumsfaktor für Gefäße wurde der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) identifiziert [16]. VEGF reguliert nicht nur die Gefäßentstehung und Proliferation von Blut- und Lymphgefäßen, sondern auch Hämatopoese und Gefäßpermeabilität. Weiterhin ist VEGF in verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen einbezogen [28, 16].

Zwei Mitglieder der VEGF Familie, VEGF-C und VEGF-D, sind wichtig für die Induktion von Lymphgefäßwachstum [28, 26]. Diese Faktoren sind Liganden für den Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 (VEGFR-3), welcher von Lymphendothelzellen und Monozyten exprimiert wird [53, 52, 28]. VEGF-C wird gebildet von Makrophagen, dendritische Zellen, Blutplättchen, Endothelzellen, basophile Granulozyten, Lymphozyten und Tumoren [45, 54].

1.2 Lymphödem und lymphogene Metastasierung

Lymphödeme werden in primäre und sekundäre Form unterteilt. Das primäre Lymphödem entwickelt sich aufgrund einer Aplasie, Hypo- oder Hyperplasie von Lymphgefäßen. Das sekundäre Lymphödem entwickelt sich auf der Grundlage eines Traumas, einer Entzündung oder durch Tumorinfiltration. Hierzu gehört auch die Ausbildung eines Lymphödems nach Strahlentherapie [22]. Im Falle des Mammakarzinoms tritt nach alleiniger chirurgischer Intervention ein Lymphödem in 7-22% aller Fälle auf und nach Kombination mit einer Bestrahlung der Axilla und angrenzender Bereiche in bis zu 40% der Patienten. Es wird ein akutes und ein chronisches Lymphödem unterschieden. Das akute Lymphödem bildet sich in den ersten 3 Wochen und geht meistens innerhalb der nächsten Wochen wieder zurück. Dieses Lymphödem ist druckdolent und gut komprimierbar. Pathogene-

tisch scheint eine Bildung von Fibrinthromben in den Lymphgefäßen eine Rolle zu spielen, als auch die Erhöhung der Filtrationsrate der Blutkapillaren [23]. Das chronische Lymphödem tritt nach einem halben Jahr auf und bildet sich selten wieder zurück. Es ist weniger schmerzhaft, aber schwer komprimierbar. Dies entspricht einem fibrotischen Endzustand mit Rarefizierung der Lymphgefäße und Vermehrung von kollagenen Fasern [23]. Untersuchungen des Lymphgefäßsystems könnten neue Behandlungsmöglichkeiten für Lymphödeme, sowohl strahleninduziert als auch anderer Genese, bieten.

Neben der Lymphödementstehung ist die lymphogene Karzinomausbreitung und Metastasierung von Bedeutung. Krebs breitet sich aus durch Invasion des umliegenden Gewebes, via Blutgefäßen und via Lymphgefäßen. Eine Invasion von Tumorzellen in peritumorale Lymphgefäße ist signifikant assoziiert mit Lymphmetastasen [45]. Die Entstehung von Metastasen geht mit einer schlechten klinischen Prognose einher.

Es konnte gezeigt werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen einer transgenen Überproduktion von VEGF-C und VEGF-D in experimentellen Tumoren und einer erhöhten Lymphgefäßdichte sowie Lymphmetastasen besteht [47, 29, 35]. Diese Studien erfolgten in humanen Mammakarzinomen, in Mäusen implantierten Melanomen und in murinen Sarkomen [47, 46, 34].

Eine Unterbrechung der Lymphgefäße oder eine Verhinderung von Lymphgefäßwachstum im umliegenden Tumorgewebe kann eine Metastasenentstehung durch Tumorzellverbreitung über das Lymphsystem präventieren und somit eine klinisch günstigere Prognose für Krebspatienten darstellen [30]. Daher ist es wichtig, Lymphgefäßwachstum beeinflussende Faktoren zu erkennen und zu verstehen.

1.3 Strahlentherapie und Lymphgefäße

Je nach Strahlenart, Bestrahlungstechnik, Dauer, Dosis, Disposition und Hautregion kommt es zur Zerstörung von Proteinen und DNA, nekrobiotischen, entzündlichen, chronisch degenerativen und atrophischen Veränderungen. Selbst bei Anwendung moderner Techniken zur Planung und Durchführung einer Strah-

lenthherapie, verursacht eine Strahlentherapie von bösartigen Tumoren auch eine Belastung von normalen und gesundem Gewebe. Diese Nebenwirkungen werden teilweise bewusst eingegangen, um ein bestmögliches Ergebnis zu erhalten.

Beobachtungen von Veränderungen an Blutgefäßen nach Bestrahlung finden schon seit dem 19. Jahrhundert statt [18], während die Strahlenbiologie der Lymphgefäße erst seit den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts sporadisch erforscht wird.

Es zeigte sich, dass Lymphgefäße gegenüber höher dosierten Lokalbestrahlungen unempfindlicher sind als Blutgefäße, obwohl ähnliche morphologische und physiologische Veränderungen beobachtet wurden [51], wie Permeabilitätssteigerung mit gleichzeitiger Abnahme des Lymphflusses, Zellschwellung, Vakuolen im Zytoplasma, Endothelzellablösung von der Basalmembran und Zellpolymorphie. Weiterhin wurde beobachtet, dass Lymphangiektasien ohne lymphodynamischen Schäden innerhalb 8 Wochen nach Bestrahlung mit 60 *Gy* entstehen, während lymphodynamisch wirksame Schäden erst bei über 80 *Gy* auftreten. Eine fortschreitende Verödung der Lymphgefäße stellt sich im Spätstadium ein [9].

Als ein häufiger Effekt von Strahlentherapie in der Haut ist Atrophie und Fibrose anzutreffen mit zunächst Verminderung der Endothelzellzahl, Vergrößerung der Gefäßdurchmesser und Abnahme der Gefäßzahl. Einige Jahre nach der Exposition wurden Neoplasien und Dysplasien in der Epidermis beobachtet, charakterisiert durch Kernatypie mit Hyperchromatismus, ein Fehlen von Polarität, Ploidie und Verringerung der Gefäßdurchmesser und daraus entstehende Mangelversorgung mit Atrophie [12, 15].

Strahlenschäden an der Haut teilt man ein in akute, die innerhalb der ersten 90 Tage entstehen, und chronische Schäden, die nach Monaten bis Jahren entstehen. Die akuten Schäden sind direkte Folgen durch den Verlust von funktionsfähigen Parenchymzellen. Zunächst entwickelt sich nach Stunden bis Tagen ein Erythem auf der Grundlage einer Entzündung mit perivaskulärer Infiltration von Entzündungszellen. Es konnte eine Expression von Mediatoren wie Zytokine, Zelladhäsionsmoleküle, Prostaglandine und Stickoxidsynthetasen durch Makrophagen, Keratinozyten und Endothelzellen nachgewiesen werden [12].

Die chronischen Strahlenschäden sind gekennzeichnet durch eine erhöhte Kollagenbildung durch Fibrozyten und daraus resultierender Fibrose. Es entstehen Teleangiektasien und eine Abnahme der Kapillardichte mit darauf folgender Parenchymatrophie [12].

1.4 Vorarbeiten an der Klinik für Dermatologie in Halle

Neuere Untersuchungen zum Thema Strahlentherapie und Lymphgefäße gibt es von der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg [25]. Die Untersuchungen wurden an den selben Hautproben unternommen, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung der Lymphgefäße (Darstellung mit Podoplanin) wurde eine signifikant höhere Dichte der gesamten Lymphgefäßzahl auf der bestrahlten Seite beobachtet im Vergleich zu Kontrollen von der unbestrahlten Seite. Diese Steigerung der Lymphgefäßzahl ging besonders von den kleinen Lymphgefäßen mit einem Durchmesser von 2-9 μm aus.

Gleichzeitig wurden auch die Blutgefäße untersucht. Es wurden keine Veränderungen in der Dichte der Blutgefäße beobachtet.

1.5 Wissenschaftliche Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen

An der Universität in Wien wurden Untersuchungen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Kerjaschki an humanen Karzinomen der Zervix vorgenommen, die zeigen, dass eine Unterart von Monocyten eine Quelle für VEGF-C und VEGF-D sind [45]. Diese Monocyten werden chemotaktisch aus den Blutgefäßen zum Tumor gelockt. Durch Stoffe wie $TNF\alpha$ und Lipopolysaccharide [24] kommt es zur Umdifferenzierung zu tumorassoziierten Makrophagen (TAMs), welche in der Lage sind, VEGF-C und -D zu synthetisieren. Folgedessen kommt es zu einer Lymphgefäßproliferation. Dadurch ist es möglich, eine anti-Tumorimmunantwort über Antigenpräsentierung in den sekundären lymphatischen Geweben in Gang zu setzen. Es gibt Hinweise darauf, dass VEGF-C als chemotaktische Substanz

für Makrophagen wirkt [46], welches unter anderem von Tumoren gebildet und durch proinflammatorische Zytokine reguliert wird [42].

Die Dichte der TAMs, welche auch VEGFR-3 exprimieren, korreliert mit der regionalen Lymphgefäßproliferation. Man fand sie angehäuft in Clustern um Lymphgefäße nahe der Tumoroberfläche. Jedoch wurden weder TAMs noch Lymphgefäße im Tumorrinneren gefunden [45].

Die Tatsache, dass es eine Subklasse von Makrophagen gibt, welche den Lymphgefäßwachstumsfaktor VEGF-C produziert, veranlasste die Überprüfung, ob es auch in den in dieser Arbeit verwendeten Präparaten einen Zusammenhang zwischen Lymphgefäßdichte und VEGF-C-produzierenden Makrophagen gibt. Weiterhin soll untersucht werden, ob die Hypothese einer Makrophagen induzierten VEGF-C-Expression mit Stimulation der Lymphangiogenese haltbar ist.

1.6 Makrophagen

Makrophagen, so genannte Fresszellen, sind eine Untergruppe der Monozyten. Sie zirkulieren im Blut, bevor sie in verschiedene Gewebe einwandern und sich dort zu gewebespezifischen Makrophagen differenzieren (z. B. Alveolarmakrophagen in der Lunge, Kupffer Sternzellen in der Leber, Histozyten in Bindegewebe, Deckzellen in der Synovialis, Osteoklasten im Knochen, Mikrogliazellen im Zentralnervensystem, Langerhans Zellen in der Epidermis und Mundschleimhaut, Pleura und Peritoneal Makrophagen in den serösen Höhlen) [40].

Makrophagen sind an Entzündungsreaktionen beteiligt, sind zur Phagozytose und Pinozytose fähig und können so unter anderem Makromoleküle, Zelltrümmer, Fremdkörper, Bakterien, apoptotisches Material und Tumorzellen aufnehmen und mittels Lysozymen verdauen. Sie wirken bei der spezifischen Immunantwort mit, insbesondere durch die Antigenpräsentation und durch die Stimulation von T-Helfer-Zellen durch Zytokine [20].

Makrophagen können in drei verschiedenen Aktivitätszuständen auftreten. Den niedrigsten Aktivitätsgrad haben die residenten Gewebsmakrophagen. Sie können Stoffe sezernieren und phagozytieren. Einen Aktivierungsgrad höher stellen die Entzündungsmakrophagen dar. Sie entwickeln sich entweder aus den Ge-

websmakrophagen oder aus frisch eingewanderten Monozyten. Sie haben eine gesteigerte Phagozytose und zeigen eine erhöhte Produktion an reaktiven Sauerstoffmetaboliten und Proteasen. Die höchste Aktivierungsstufe haben die aktivierten Makrophagen. Dies sind ehemalige Entzündungsmakrophagen, die sich mittels Zytokine in aktivierte Makrophagen umgewandelt haben. Sie produzieren Wasserstoffperoxid und dienen der Abtötung von Tumorzellen, intrazellulären Krankheitserregern und zur Antigenpräsentation [20].

Diese Funktionen werden vermittelt und umgesetzt durch verschiedene wichtige Mediatoren, die die Makrophagen produzieren. Hierzu gehören saure Hydro-lasen (zum Abbau verschiedener Makromoleküle), Lysozym (zur Verdauung von bakteriellen Bestandteilen), Komplementkomponenten (Inaktivierung von eingedrungenen Fremdstoffen), verschiedene Interleukine (IL1, IL10, IL12), Chemokine (Anlockung von Entzündungszellen), $\text{TNF}\alpha$ (Zytolyse von Tumorzellen, bei Kachexie und Sepsis), $\text{INF}\alpha$ (antiviral), reaktive Sauerstoff- und Stickstoffmetaboliten (tumorzid und antibakteriell), Arachidonsäuremetabolite (Entzündungsmediatoren und Immunregulatoren) und VEGF-C (Lymphangiogenese) [20].

Die Komplexität der Funktion und Wirkungsweise der Makrophagen ist noch nicht vollständig geklärt. Dieser Abschnitt gibt nur einen kurzen Einblick darüber. In der vorliegenden Arbeit wird versucht, eine weitere Rolle der Makrophagen zu erkennen – der Einfluss auf das lymphatische System nach einer Strahlentherapie.

2 Zielstellung

Hauptziel dieser Arbeit war es, Zusammenhänge zwischen einer bereits aus einer Vorarbeit bekannten Hyperplasie kleiner Lymphkapillaren nach Bestrahlung, Makrophagen und VEGF-C-Expression zu erkennen. Im Mittelpunkt stand dabei die Untersuchung von Hautpräparaten aus einem bestrahlten Areal. Folgende Fragen sollten an einem standardisierten humanen Modell geklärt werden:

1. Gibt es Unterschiede in der Dichte an Makrophagen zwischen bestrahlter und unbestrahlter Haut?
2. Wie entwickelt sich die durchschnittliche Makrophagendichte im zeitlichen Verlauf nach erfolgter Strahlentherapie?
3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der durchschnittlichen Lymphgefäßdichte bzw. Blutgefäßdichte und der Makrophagendichte? Gibt es Unterschiede in bestrahlter und unbestrahlter Haut?
4. Gibt es Zellen, die VEGF-C im untersuchten Material exprimieren?
5. Gibt es Unterschiede zwischen bestrahlter und unbestrahlter Haut in Bezug auf die Dichte von VEGF-C-exprimierenden Makrophagen?
6. Wie entwickelt sich die Dichte der VEGF-C-positiven Makrophagen im zeitlichen Verlauf nach erfolgter Strahlentherapie? Gibt es Unterschiede zwischen bestrahlter und unbestrahlter Haut?
7. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der durchschnittlichen Lymphgefäßdichte bzw. Blutgefäßdichte und der Dichte VEGF-C-positiver Makrophagen in bestrahlter und unbestrahlter Haut?
8. Hat das Patientenalter oder haben allgemeine oder spezielle das Lymphsystem betreffende Erkrankungen einen Einfluss auf die durchschnittliche Makrophagendichte bzw. deren VEGF-C-Expression in unbestrahlter und bestrahlter Haut?

3 Material und Methoden

Im Abschnitt Material und Methoden wird zunächst im Abschnitt 3.1 darauf eingegangen, nach welchen Kriterien die Patienten für diese Studie ausgewählt wurden und welche Behandlung zuvor erfolgte. Im Abschnitt Methoden (3.2) werden die Färbemethoden näher und die Art und Weise der Auswertung der Schnitte erläutert. Es wird weiterhin eine Übersicht über die Daten gegeben, die zu den Patienten aufgenommen und auch verarbeitet wurden. Die statistische Auswertung wird in Kapitel 3.3 wiedergegeben.

3.1 Material

3.1.1 Patientencharakterisierung und Biopsiegewinnung

Die Untersuchungen wurden durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt. Die Patienten wurden über Ziel und Zweck der Studie und über die Risiken des operativen Eingriffs aufgeklärt.

Das untersuchte Patientenkollektiv rekrutiert sich aus 40 Patienten (im Alter von 38 bis 79 Jahre, MW = $58,22 \pm 11,36$), die aufgrund eines Mammakarzinoms im Zeitraum von Februar 1988 bis September 2001 an der Universitätsklinik und Poliklinik für Strahlentherapie Halle-Wittenberg bestrahlt wurden. Sie erhielten eine Standardstrahlentherapie mit 6-10 MeV-Photonen durch tangenziale Felder. Die totale Dosis im Zielgebiet, berechnet nach der ICRU¹, betrug hauptsächlich 50,4 Gy (siehe Tabelle 1), aufgeteilt in fünf Fraktionen pro Woche mit einer Einzeldosis von 1,8 Gy. Die geschätzte Hautdosis betrug 60-70% der gesamten Dosis (also 30-35 Gy). Die Stadieneinteilung des Brustkrebses erfolgte nach dem American Joint Committee on Cancer (AJCC 2002). 6 Patientinnen hatten ein duktales Carcinoma insitu (DCIS), 17 Patientinnen befanden sich im Stadium I, 8 im Stadium IIA und 9 im Stadium IIB. Dies bedeutet, der Tumor war bei allen Patienten lokal abgegrenzt und nicht mit umliegenden Strukturen verwachsen, sie hatten alle keine Lymphknotenmetastasen entlang der Arterie mammaria interna

¹International Commission on Radiation Units and Measurements

und keine Fernmetastasen. Nähere Erläuterungen zu den Stadien nach dem AJCC finden sich im Anhang 8.3 auf Seite 44. Zu der Zeit der Probeentnahme waren alle Patienten frei von lokalen Rezidiven und Metastasen.

Nach abgeschlossener Strahlentherapie wurde aus einem bestrahlten Hautareal (aber außerhalb des Operationsgebietes) und aus dem korrespondierenden unbestrahlten Hautareal der Gegenseite eine Hautprobe entnommen. Für den direkten zeitlichen Verlauf bezüglich der Lymphgefäßdichte, erfolgten die Probeentnahme von den unterschiedlichen Patienten zu unterschiedlichen Zeiten nach der Bestrahlung.

Der Zeitpunkt der Biopsieentnahme befand sich bei dem einzelnen Patienten zwischen 0,5 und 157 Monaten (MW = $19,59 \pm 26,68$ Monate) nach erfolgter letzter Strahlentherapie.

Die Exzision erfolgte unter Lokalanästhesie (Xylocain 1%) mit einer 6 mm Stanze aus der vorderen Axillarlinie im bestrahlten Areal und dem kontralateralen unbestrahlten Areal. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Proben in 4% Formalinlösung für 24 Stunden fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Die Patientenauswahl erfolgte nach folgenden Ein- und Ausschlusskriterien:

- Abgeschlossene Strahlenatherapiebehandlung
- Patienten, bei denen ein bestrahltes Hautareal sowie ein korrespondierendes unbestrahltes kontralaterales Hautareal vorhanden war
- Die Einwilligung des Patienten und dessen Geschäftsfähigkeit

Ausschlusskriterien der Probanden:

- Patienten mit Diabetes mellitus, Sklerodermie, Sharp-Syndrom, Lupus Erythematodes, Dermatomyositis, Raynaud-Syndrom und anderen inflammatorischen Erkrankungen des Exzisionsgebietes mit schwerwiegenden generalisierten Hautveränderungen
- Patienten mit Kontraindikation zu einer Stanzbiopsie (erhöhte Blutungsneigung; Einnahme von blutungsfördernden Medikamenten; vorbekannte

Neigung zu hypertrophen Narben oder Keloiden; Unverträglichkeiten gegenüber Nahtmaterial oder Verbandsmitteln; schwere Herzerkrankung, Unverträglichkeit oder andere Krankheiten, die eine Kontraindikation für die Anwendung eines Lokalanästhetikum darstellen)

- Akute Strahlendermatitis
- Akute Dermatosen im Bereich des Exzisionsgebietes
- Patienten mit bekannter HIV-Infektion
- Patienten mit reduziertem Allgemeinzustand (Karnofsky-Index unter 80%)
- keine Volljährigkeit

3.1.2 Vorarbeiten

Als vorbekannte Daten sind die Ergebnisse über Lymph- und Blutgefäße einer Arbeitsgruppe der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zu werten [25]. Die erhobenen Daten wurden freundlicherweise für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

3.2 Methoden

3.2.1 Schnitte

Die Proben wurden mittels eines Mikrotoms 5 μm dick geschnitten, auf dem Objektträger mit Poly-L-Lysin fixiert und 1 *h* im Brutschrank bei 60°C inkubiert. Von den 80 Proben (40 Patientinnen, bestrahlte und unbestrahlte Seite) wurden jeweils 2 bis 4 konsekutive Schnitte angefertigt und auf einen Objektträger für die CD68-Antikörperfärbung fixiert.

Von den 80 Proben wurden nur 44 Proben mit dem VEGF-C-Antikörper gefärbt. Die Auswahl der Präparate erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Für die Färbung mit dem VEGF-C-Antikörper wurden jeweils 3 konsekutive Schnitte angefertigt und auf einem Objektträger fixiert.

mittleres Alter	58,22 ± 11,36 Jahre
Geschlecht	weiblich n = 40 männlich n = 0
Menopause	n = 29
Östrogenrezeptorstatus	positiv n = 23 negativ n = 10 n.d. n = 7
Progesteronrezeptorstatus	positiv n = 24 negativ n = 9 n.d. n = 7
Tumorstadien	DCIS n = 6 I n = 17 IIA n = 8 IIB n = 9
Operationstechnik	Brusterhaltende Operation n = 33 Mastektomie n = 7
Axilladisektion	n = 34
Vollständige Tumorentfernung vor der Strahlentherapie	n = 40
Strahlentherapie Totaldosis	50,4 Gy n = 38 54,0 Gy n = 1 44,8 Gy n = 1
Strahlentherapie Einzeldosis	1,8 Gy n = 39 1,6 Gy n = 1
Adjuvante Chemotherapie	n = 17
Adjuvante Hormontherapie	n = 25

Tabelle 1: Patientencharakterisierung

3.2.2 Immunhistochemische Färbemethode CD68- und VEGF-C-Antikörper

Es wurde als Antikörper der Monoclonal Mouse Anti-Human CD68 Antibody, Clone KP1, Isotype IgG1, kappa (DAKO) und der Rabbit Anti-Human VEGF-C Antibody (Zymed Inc., South San Francisco, USA) verwendet.

Zur Identifizierung der Makrophagen/VEGF-C-Expression wurden die Präparate mit Anti-CD68/Anti-VEGF-C nach der Avidin-Biotin-Komplex Methode behandelt und mit Hämalaun gegengefärbt [6, 4].

Zunächst wurde die Entparaffinierung der Präparate mittels absteigender Alkoholreihen in Xylol vorgenommen. Die endogene Peroxidase wurde mit einem Methanol-Gemisch geblockt (0,3% H_2O_2 in Methnol). Darauf erfolgte für die Antigen-Demaskierung eine Mikrowellenbehandlung der Schnitte (10 Mm Citratpuffer, pH 6,0, 4 x 5 min, 600 W). Die Schnitte wurden mit Anti-CD68 (1:50) bzw. mit Anti-VEGF-C (1:150, 1:100 und 1:50) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Weitere Schritte erfolgten mit dem Elite-ABC-Kit (Vector, Burlingame, USA) gemäß der Herstellerangaben. Die Färbung erfolgte mit dem AEC Substratsystem (DAKO) für 10 min bei Raumtemperatur. Im letzten Arbeitsschritt wurde zur Gegenfärbung 25% Hämalaun (3 min, Merck, Darmstadt, Deutschland) für 5-10 sek hinzugegeben, gespült und eingedeckt (Gelatin-Mounting-Medium, DAKO).

Zusätzlich wurde von jedem Präparat eine Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung angefertigt.

3.2.3 Mikroskopische Analyse

Die Auswertung der Präparate mit der CD68-Antikörperfärbung erfolgte lichtmikroskopisch bei 40-facher Vergrößerung und verblindet, d. h. dem Untersucher war nicht bekannt, ob es sich um ein Präparat aus dem bestrahlten oder unbestrahlten Gebiet handelte. Pro Hautprobe wurden 2 bis 4 konsekutive Schnitte pro Objektträger angefertigt. Bei drei Schnitten auf einem Objektträger wurde der mittlere Schnitt, bei zwei Schnitten der linke und bei vier Schnitten der zweite von links ausgewertet. War der jeweilige Schnitt unbrauchbar, wurde auf einen

benachbarten Schnitt zurückgegriffen. Es wurden jeweils von 3 Blickfeldern die absolute Anzahl der angefärbten CD68-positiven Zellen bestimmt. Dazu wurde die Länge des Hautschnittes im jeweiligen Blickfeld mit Hilfe eines Okularlineals ausgemessen (angegeben in μm). Im Folgenden wird immer die Dichte angegeben. Dies ist die absolute Zahl der gemessenen Zellen im Verhältnis zu der Länge des Hautschnittes. Eine Längeneinheit des Rasters entspricht 0,02 mm bzw. 20 μm bei 40-facher Vergrößerung. Es wurde der obere Plexusbereich ausgezählt².

Analog wurde mit den 44 Präparaten mit dem VEGF-C-Antikörper verfahren. Hier wurden pro Hautprobe 2 Schnitte in verschiedener Verdünnung des Antikörpers auf einem Objektträger angefertigt. Zur Auswertung wurde die Verdünnung 1:100 gewählt. Ein dritter Schnitt auf dem Objektträger wurde mit Anti-CD68 gefärbt. Da es sich um konsekutive Schnitte handelt, konnte so gezeigt werden, dass die VEGF-C-positiven Zellen auch CD68 exprimieren (Abbildung 5 auf Seite 41). Es konnten nicht beide Färbungen an einem Schnitt vorgenommen werden, da jeweils beide Antikörper eine Rotfärbung verursachten und somit eine Unterscheidung nicht mehr möglich gewesen wäre.

Zur Ermittlung der Messgenauigkeit wurde der mittlere Variationskoeffizient bestimmt [5]. Zur Bestimmung wurden 18 Präparate je 5-mal einer Bestimmung der Dichte der CD68- bzw. VEGF-C-positiven Zellen unterzogen. Der mittlere Variationskoeffizient berechnet sich nach folgender Formel:

$$\bar{V} = \frac{V_1 + V_2 + V_3 + \dots + V_n}{m} \quad (1)$$

Der Variationskoeffizient ergibt sich aus:

$$V = \frac{SD}{MW} \quad (2)$$

\bar{V} ... Mittlerer Variationskoeffizient

V ... Variationskoeffizient

m ... Zahl der untersuchten Schnitte

SD ... Standardabweichung

MW ... Mittelwert

²Die Lymphgefäße und das Blutgefäßsystem bilden in enger anatomischer Beziehung zwei Plexus in der Haut [44].

3.2.4 Datenerfassung

Es wurden für jeden Probanden die quantitativ skalierte Dichte der CD68-positiven Zellen pro mm Haut und der VEGF-C-positiven pro mm Haut in bestrahlter sowie unbestrahlter Haut angegeben. Zur Beschreibung der zeitlichen Veränderungen wurde eine Gruppeneinteilung vorgenommen, die den Abstand vom Ende der Strahlentherapie zu der Probenentnahme wiedergibt (Probeentnahmezeit tPE). Die Gruppeneinteilung erfolgte in: 0-2 Monaten (MW = 1; n = 26 Proben), 10-18 Monaten (MW = 12,5; n = 24 Proben) und mehr als 19 Monaten (MW = 41,33; n = 30 Proben). Für den Zeitraum von 3-9 Monaten gibt es keine Daten. In die Arbeitstabelle wurde für jeden Probanden das Alter (in Jahren), Tumorstadium, Therapie, Medikamente, allgemeine Erkrankungen der Probanden, welche nicht vorher als Ausschlusskriterien erfasst worden waren (Lymphödem (n = 10), Hypertonie (n = 8), Herzrhythmustörungen (n = 3), Asthma bronchiale (n = 2) und behandelte Tuberkulose (n = 2), siehe auch 3.1.1), aufgenommen. Neben der Tumorthherapie wurden die Patienten mit L-thyroxin (n = 4), Acetylsalicylsäure (n = 3), β -Blockers (n = 2), ACE-Hemmer (n = 2) oder Kalzium-Antagonisten (n = 2) behandelt.

Zusätzlich erfolgte die Angabe des Verhältnisses der VEGF-C-positiven Zellen zu der absoluten Zahl der CD68-positiven Zellen bestrahlter zu unbestrahlter Haut.

3.3 Statistische Analysen

Für die statistische Auswertung wurde das Programm SPSS in Version 11.0.1 verwendet. Im ersten Schritt wurden die Daten mittels deskriptiver Statistik ausgewertet und eine graphische Darstellung erfolgte in Box-Plots. Im nächsten Schritt wurden statistische Tests angewendet. Mittelwertvergleiche erfolgten mit dem t-Test (t) für abhängige und unabhängige Stichproben. Hierzu muss eine Normalverteilung vorausgesetzt werden. Die Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte mittels dem Q-Q-Diagramm und dem Kolmogorov-Smirnov-Test [48, 13]. Korrelationsanalysen wurden nach Pearson (r) berechnet [38].

Die Signifikanzanalyse erfolgte immer zweiseitig mit einem Signifikanzniveau

von $\alpha = 0,05$. Dies bedeutet, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% der festgestellte Unterschied besteht [55].

4 Ergebnisse

4.1 Evaluierung der Methode

Variationskoeffizient

Zur Ermittlung der Messgenauigkeit wurde der mittlere Variationskoeffizient bestimmt [5]. Zur Bestimmung wurden 18 Präparate je 5-mal einer Bestimmung der Dichte der CD68- bzw. VEGF-C-positiven Zellen unterzogen. Nach der Formel 1 auf Seite 14 beträgt der mittlere Variationskoeffizient $0,22 \pm 0,096$.

Test auf Normalverteilung

Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem Q-Q-Diagramm und dem Kolmogorov-Smirnov-Test [48, 13]. Es konnte eine Normalverteilung festgestellt werden ($p = 0,904$ bzw. $p = 0,995$ für CD68-positive Zellen be- bzw. unbestrahlt, $p = 0,847$ bzw. $p = 0,875$ für VEGF-C-positive Zellen be- bzw. unbestrahlt, Kolmogorov-Smirnov-Test).

4.2 Allgemeine Beobachtungen

In den HE gefärbten Präparaten konnte 0-2 Monate nach dem Ende der Strahlentherapie perivaskulär ein Monozyteninfiltrat und eine strahlenbedingte Degeneration der Mikrogefäße, Haarfollikeln und Talgdrüsen beobachtet werden (Abbildung 5 auf Seite 41). Weiterhin war der mittlere Querschnitt postkapillärer Venuolen erweitert. Vereinzelt Zellnekrosen wurden in der Epidermis auch zu späteren Zeitpunkten bis zu 157 Monate nach der Strahlentherapie gefunden.

4.3 CD68-positive Zellen

Hierzu wurde für die Dichte der CD68-positiven Zellen für die bestrahlten und unbestrahlten Präparate die Mittelwerte bestimmt. Für die bestrahlte Seite ergab sich ein Mittelwert von 85,12 CD68-positiven Zellen pro mm Haut mit einer Standardabweichung von $\pm 28,60$ (im folgenden wird die Standardabweichung immer angegeben in der Form: $85,12 \pm 28,60$). Für die unbestrahlte Seite ergab sich ein Mittelwert von $64,39 \pm 25,21$ CD68-positiven Zellen pro mm Haut.

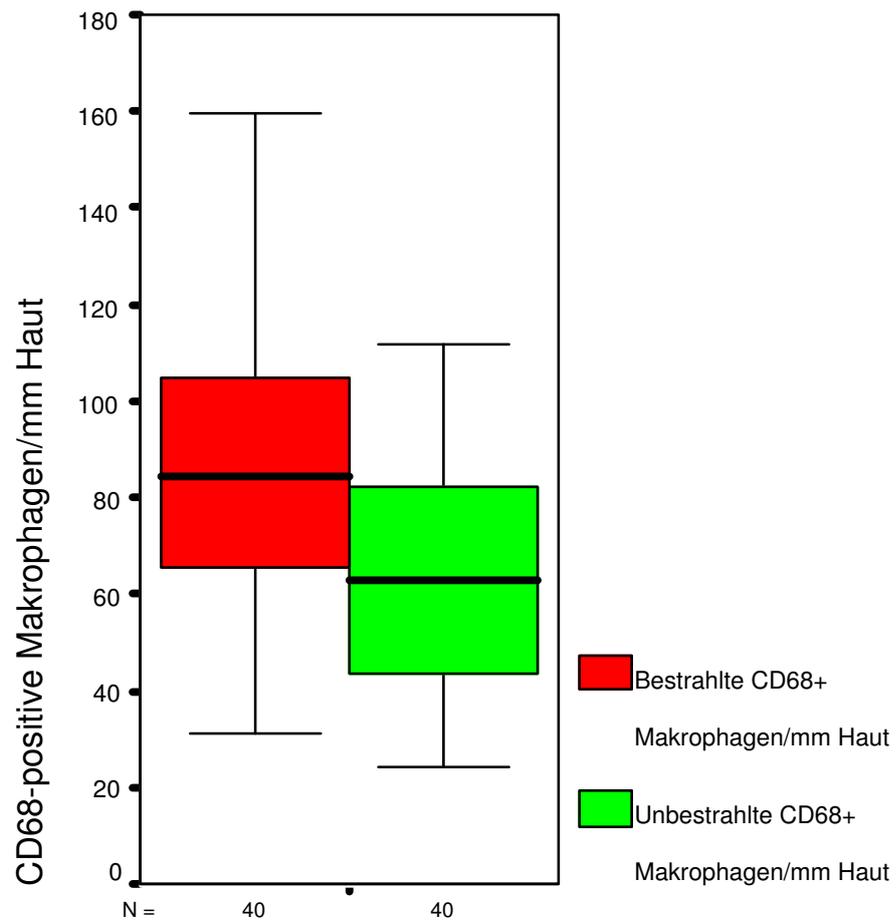


Abbildung 1: Dichte der CD68-positiven Zellen in bestrahlter und unbestrahlter Haut

Im Box-Plot in Abbildung 1 lassen sich Lage- und Streuungsmaße der beiden Stichproben miteinander vergleichen. Aufgrund der Lage des Box-Plots ist eine deutliche Differenz zwischen der Dichte CD68-positiver Zellen der bestrahlten und unbestrahlten Seite erkennbar. Dieser Unterschied war signifikant ($t = 6,08$, $p \leq 0,001$, $n = 40$, t-Test für abhängige Stichproben). Die Werte waren symmetrisch verteilt.

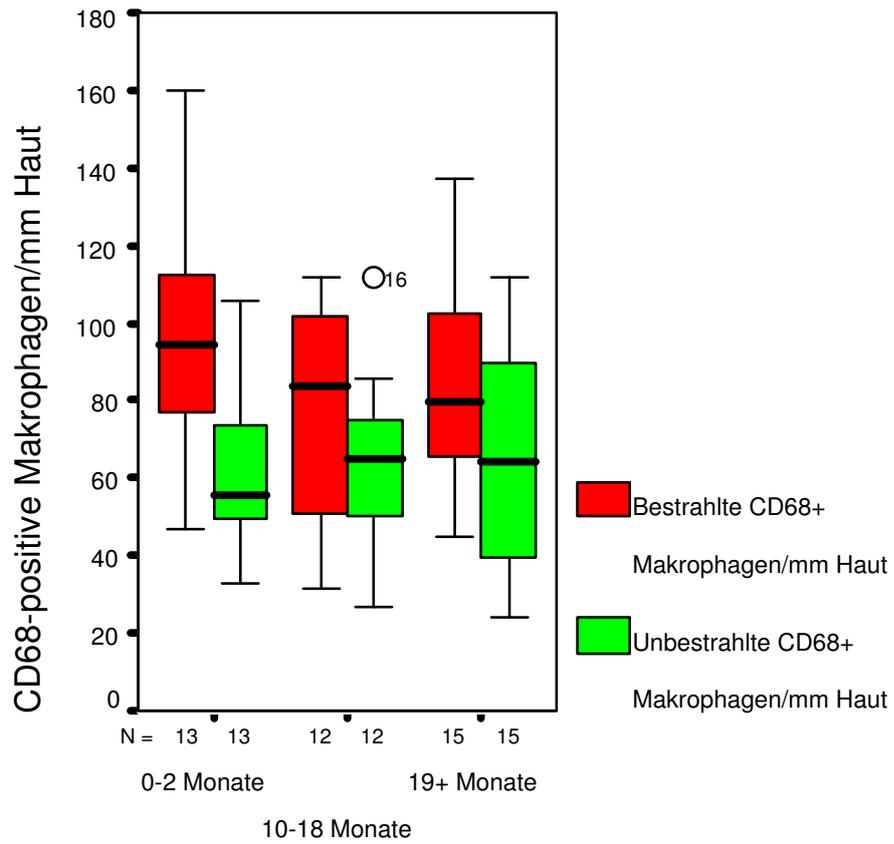
Zeitverlauf der CD68-positiven Zellen

Die Verteilung über die Zeit ist in Abbildung 2 graphisch dargestellt. Der Unterschied zwischen bestrahlter und unbestrahlter Seite war im Zeitraum 0-2 Monate signifikant ($t = 5,73$, $p \leq 0,001$, $n = 13$, t-Test für abhängige Stichproben). Der Unterschied zwischen beiden Seiten war für die Zeiträume 10-18 Monate und ≥ 19 Monate ebenfalls signifikant ($t = 2,98$, $p = 0,013$, $n = 12$ bzw. $t = 2,71$, $p = 0,017$, $n = 15$, t-Test für abhängige Stichproben).

Bei der Betrachtung der Werte der bestrahlten Seite fällt ein dezenter Abfall von 14% von der Dichte der CD68-positiven Zellen über die Zeit auf. Im Vergleich dazu bleibt die Dichte der CD68-positiven Zellen auf der unbestrahlten Seite über die Zeit weitgehend konstant bzw. von dem Zeitraum 0-2 Monate zum Zeitraum 10-18 Monate ist ein leichter Anstieg zu vermerken. Diese Veränderungen waren jedoch nicht signifikant.

Lymphödem und CD68-positive Zellen

Zum Zeitpunkt der Exzision wiesen einige Patienten ein klinisches Lymphödem auf, wobei hier nicht zwischen chronischen und temporären Lymphödem unterschieden wurde. Die Patienten mit einem Lymphödem hatten bei dem Vergleich der Mittelwerte mehr CD68-positive Zellen als Patienten ohne Lymphödem. Dies war jedoch nicht signifikant ($t = -0,677$, $p = 0,502$, $n = 40$, t-Test für unabhängige Stichproben).



Abstand Bestrahlung zur Probeentnahme

Abbildung 2: Dichte der CD68-positiven Zellen in bestrahlter und unbestrahlter Haut im Zeitverlauf

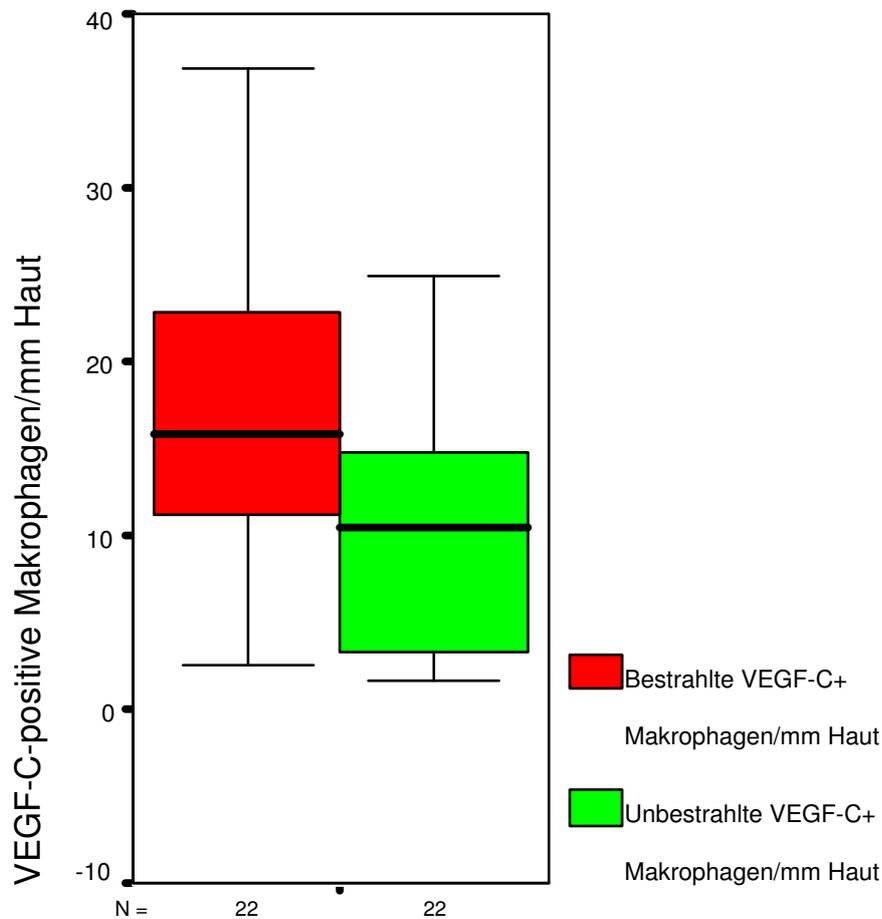
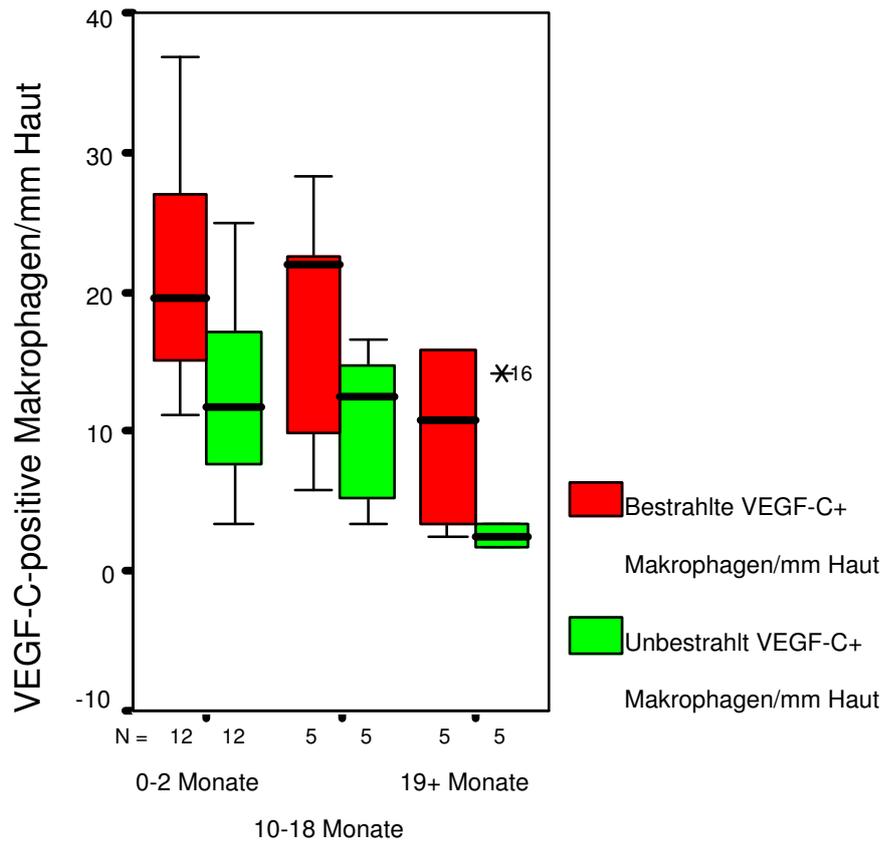


Abbildung 3: Dichte der VEGF-C-positiven Zellen in bestrahlter und unbestrahlter Haut

4.4 VEGF-C-positive Zellen

Für die Auswertung der Schnitte mit dem VEGF-C-Antikörper wurden zunächst die Dichte der VEGF-C-positiven Zellen für die bestrahlten und unbestrahlten Präparate die Mittelwerte bestimmt. Für die bestrahlte Seite ergab sich ein Mittelwert von $17,73 \pm 8,82$ VEGF-C-positiver Zellen pro mm Haut. Für die unbestrahlte Seite ergab sich ein Mittelwert von $10,21 \pm 6,54$ VEGF-C-positiver Zellen pro mm Haut.

Im der Abbildung 3 lassen sich Lage- und Streuungsmaße der beiden Stichproben miteinander vergleichen. Aufgrund der Lage des Box-Plots ist eine deutliche Differenz zwischen der Dichte VEGF-C-positiver Zellen der bestrahlten und un-



Abstand Bestrahlung zur Probeentnahme

Abbildung 4: Dichte der VEGF-C-positiven Zellen in bestrahlter und unbestrahlter Haut im Zeitverlauf

bestrahlten Seite erkennbar. Diese war signifikant ($t = 4,35$, $p \leq 0,001$, $n = 22$, t-Test für abhängige Stichproben). Die Werte waren leicht rechts bzw. links schief verteilt. Ausreißer waren nicht vorhanden.

Zeitverlauf der VEGF-C-positiven Zellen

Die Entwicklung der Dichte der VEGF-C-positiven Zellen über die Zeit ist in Abbildung 4 dargestellt. Im Vergleich der bestrahlten Seite gegen die unbestrahlte Seite über die Zeit waren in allen drei Zeitgruppen deutlich höhere Werte auf der bestrahlten Seite vorhanden.

Bei der Betrachtung der Werte der bestrahlten Seite fällt ein Abfall der Dichte der VEGF-C-positiven Zellen über die Zeit auf. Aufgrund zu geringer Fallzahl der Subgruppen ($n = 5$) wurde keine statistische Analyse vorgenommen.

Lymphödem und VEGF-C-positiv Zellen

Die Patienten mit einem Lymphödem wiesen auf der bestrahlten Seite bei dem Vergleich der Mittelwerte weniger VEGF-C-positiv Zellen auf als Patienten ohne Lymphödem. Dies war jedoch nicht signifikant ($t = 0,752$, $p = 0,461$, $n = 22$, t-Test für unabhängige Stichproben).

4.5 Zusammenhangsanalysen

Korrelation der CD68-positiv Zellen mit Lymphgefäßen und Blutgefäßen

Die Dichte der CD68-positiven Zellen korreliert (Pearson) nicht mit der Dichte der gesamten Lymphgefäße als auch nicht mit den verschiedenen Gefäßdurchmessern. Jedoch ist in den ersten 2 Monaten nach der Strahlentherapie die Zahl der CD68-positiven Zellen auf der bestrahlten Seite erhöht und in den nachfolgenden Monaten steigt die Dichte der Lymphgefäße, insbesondere die der kleinen Lymphgefäße $2-9 \mu m$ (Vergleich Abbildung 2 auf Seite 20 mit Abbildung 8 auf Seite 47).

Bei der Korrelation der CD68-positiven Zellen mit den großen Blutgefäßen ($\geq 16 \mu m$) der bestrahlten Seite ist eine signifikante Korrelation vorhanden ($r = 0,455$, $p = 0,003$, $n = 40$, Pearson). Mit den anderen Gefäßdurchmessern

der Blutgefäße korreliert die Dichte der CD68-positiven Zellen nicht.

Korrelation der VEGF-C-positive Zellen mit Lymphgefäßen und Blutgefäßen

Die Dichte der VEGF-C-positiven Zellen korreliert (Pearson) sowohl nicht mit den Lymphgefäßen als auch nicht mit den Blutgefäßen (jeweils für die verschiedenen Gefäßparameter). Auch hier ist in den ersten 2 Monaten nach der Strahlentherapie die Dichte der VEGF-C-positiven Zellen auf der bestrahlten Seite erhöht und in den nachfolgenden Monaten steigt die Dichte der Lymphgefäße, insbesondere die der kleinen Lymphgefäße 2-9 μm . Während in den folgenden Monaten die Dichte der VEGF-C-positiven Zellen die Tendenz zeigt abzunehmen, steigt die Zahl der Lymphgefäße tendenziell weiter (Vergleich Abbildung 4 auf Seite 22 mit Abbildung 8 auf Seite 47).

4.6 Weitere Zusammenhänge

Koexpression von CD68 und VEGF-C

Es ist von Interesse zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen den CD68-positiven Zellen und den VEGF-C-positiven Zellen gibt. Von der Theorie ausgehend, sollten die Zellen, die VEGF-C exprimieren, auch CD68-positiv sein.

Dies lässt sich mikroskopisch in verschiedenen Schnitten zeigen. In der Abbildung 5 (I-J) auf Seite 41 kann gezeigt werden, dass VEGF-C-positive Zellen auch CD68-positiv sind. Die Pfeile kennzeichnen die korrespondierende Position. Rein rechnerisch ergibt sich, dass nicht alle CD68-positiven Zellen auch VEGF-C-positiv sind. Im Detail bedeutet dies, dass 20,62% der gesamten CD68-positiven Zellen auf der unbestrahlten Seite VEGF-C-positiv sind und 22,38% der gesamten CD68-positiven Zellen auf der bestrahlten VEGF-C positiv sind.

Korrelation mit anderen Patienten Eigenschaften

Es zeigt sich kein Zusammenhang zwischen dem Alter und der Dichte der CD68- bzw. VEGF-C-positiven Zellen, sowohl auf der bestrahlten, als auch auf der unbestrahlten Seite (Pearson). Weiterhin ist kein Einfluss von Medikamenten oder Komorbiditäten auf die CD68- und VEGF-C-positiven Zellen zu beobachten.

5 Diskussion

In der Promotionsarbeit von Janusch fand sich ein Jahr nach einer Strahlentherapie eine signifikante Hyperplasie von Lymphkapillaren mit Verdopplung der Dichte der kleinen Lymphgefäße [25]. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob die Lymphgefäßhyperplasie mit VEGF-C-produzierenden Makrophagen zusammenhängt. Grundlage für die Annahme war eine beschriebene Korrelation der Makrophagendichte mit der Lymphgefäßproliferation [45].

Bei den Untersuchungen fand sich ein Anstieg der Dichte der CD68- und VEGF-C-positiven Zellen. Dies konnte vor allem kurz nach dem Ende der Strahlentherapie beobachtet werden, wobei ca. 20% der Makrophagen auch VEGF-C-positiv sind. Eine ähnliche Häufigkeit von VEGF-C-Expression wurde in tumorassoziierten Makrophagen in peritumoralen Gewebe beobachtet [45]. In konsekutiven Schnitten konnte eine Kolo-kalisation von VEGF-C- und CD68-exprimierenden Zellen demonstriert werden (Abbildung 5 auf Seite 41). Zeitversetzt zu dem Anstieg der CD68- und VEGF-C-positiven Zellen, stieg auch die Lymphgefäßdichte nach mehr als 2 Monaten an. Dies ist ein starkes Indiz, dass die makrophageninduzierte VEGF-C-Expression die Lymphgefäßproliferation anregt.

Die genauen Mechanismen der Lymphgefäßentstehung sind noch nicht bekannt. Es existieren Beobachtungen von einer Beeinflussung der Lymphgefäßentstehung durch Kostimulation mit VEGF-C und anderen Zytokinen [10, 19, 3]. So wurde eine Lymphgefäßproliferation bei Mäusen mit einer transgenetischen VEGF-C-Überproduktion beobachtet [26, 52, 35]. Die Rolle der Stimulation der Lymphgefäßentstehung durch VEGF-C konnte erst kürzlich durch die Blockade von VEGFR-3 demonstriert werden, welcher ein Rezeptor für VEGF-C ist [41].

Makrophagen scheinen die Lymphgefäßentstehung auf zwei verschiedenen Wegen zu fördern. Einerseits vermögen sie als Quelle für VEGF-C ein Wachstum oder eine Hyperplasie von Lymphgefäßen durch Stimulation einer Teilung von schon existierenden lokalen Lymphendothelzellen zu fördern [31]. Andererseits vermögen die Makrophagen dies über eine Differenzierung zu Lymphendothelzellen und anschließender Integration in die Endothelschichten [36]. Auf welchem Weg die Lymphgefäßproliferation in den vorliegenden Untersuchungen erfolgte,

ist nicht geklärt.

Es wird darauf hingewiesen, dass diese Ergebnisse nach einer Gesamtdosis von weniger als 35 Gy mit einer Einzeldosis von weniger als 1,4 Gy beobachtet wurden. Dies ergab sich, da die Strahlendosis an der Hautoberfläche 30-40% geringer ist, als die Referenzdosis im Zielgebiet. Diese Dosis ist weitaus niedriger als die gegenwärtig angenommene Strahlentoleranz für Gefäße. Demnach können signifikante und persistierende Veränderungen in Hinsicht auf die Lymphgefäßentstehung durch weitaus niedrigere Strahlendosen ausgelöst werden, als bisher angenommen [9]. In Gegensatz zu Studien mit höheren Dosen [8, 1], sind hier weder Blut- noch Lymphgefäße kurz nach der Strahlentherapie in der Tumorumgebung reduziert, sondern vermehrt. Dies könnte zusammen mit der Beobachtung von steigender VEGF-C-Dichte und deren bekannten regulatorischen Effekten in Tumorzellen für die Entstehung von lokalen Rezidiven und Metastasen im Fall von verbleibenden Tumorzellen in der Tumorumgebung wichtig sein [17, 50, 49].

Dies wirft die Frage auf, warum es zu einem Einstrom der CD68-positiven Makrophagen und somit zu einer Lymphgefäßproliferation in der Haut kommt. Unter dem Einfluss von Strahlen erfolgt eine Ansammlung von nekrotischem Gewebe, welches von anderen Zellen phagozytiert wird – unter anderem von Makrophagen. Diese Phagozytose ist in normaler Haut fast nicht zu sehen [43]. Allerdings kann die dadurch entstandene Entzündungsreaktion, worauf auch eine Strahlendermatitis hinweist, nicht allein durch den vermehrten Abbau von toten Zellen erklärt werden, sondern ist wahrscheinlich ein viel komplexeres Geschehen, welches noch nicht in seinen Einzelheiten erkundet ist [12]. So exprimieren Makrophagen und auch Endothelzellen proinflammatorische Zytokine und Zelladhäsionsmoleküle. Mit deren Hilfe können noch mehr Entzündungszellen angelockt und in das Parenchym übergehen. Aufgrund der Zerstörung von Zellen ist der Körper bestrebt, Gewebe zu regenerieren. So gibt es Beobachtungen, dass nach Einzelbestrahlungen (2 Gy, 6 Wochen lang) nach 30 Tagen die ursprüngliche Zellzahl wieder hergestellt wurde [12].

Die Lymphgefäße sind unter einer Strahlentherapie einer besonderen Belastung durch vermehrte Resorption und Transportfunktion ausgesetzt. Zum einen

fallen mehr Zelldetritus und aus dem Verband gelöste Zellen an, andererseits muss der Lymphstrom infolge eines durch die Blutkapillarschädigung verursachten gesteigerten interstitiellen Flüssigkeits- und Proteingehaltes verstärkt werden [22]. Daraufhin kann es zur Bildung von proinflammatorischen Substanzen wie IL1 oder $\text{TNF}\alpha$ kommen, die wiederum chemotaktisch für Makrophagen [42] und somit indirekt mittels VEGF-C für Lymphangiogenese verantwortlich sind. Weiterhin ist VEGF-C chemotaktisch für Makrophagen, vermittelt über VEGFR-3. VEGF-C stimuliert somit eine Rekrutierung von Makrophagen [46].

Ferner wurde in den vorliegenden Untersuchungen bei 9 von 40 Patientinnen ein klinisch messbares Lymphödem beobachtet. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Patientinnen mit Lymphödem bzw. ohne Lymphödem in Bezug auf CD68-, VEGF-C-positiven Zellen sowie Lymph- und Blutgefäßen ermittelt werden. Lediglich eine Tendenz zu beeinträchtigter Lymphentwicklung, besonderes der kleinen Lymphgefäße, ist zu erkennen. Bei Patienten mit Brustkrebs tritt bei 40% der Patienten nach einer chirurgischen Intervention kombiniert mit einer Strahlentherapie ein Lymphödem auf [37]. Die radiogenen Effekte beeinträchtigen die Funktion des Lymphgefäßsystems durch Reduzierung der Transportkapazität und begünstigen somit die Ausbildung eines Lymphödem [11].

Bei der Untersuchung von Blutgefäßen konnte vorübergehend eine Erweiterung des Gefäßdurchschnittes der großen Blutgefäße ($\geq 16 \mu\text{m}$) innerhalb weniger Monate nach der Strahlentherapie beobachtet werden, welche in Korrelation zu der Dichte der CD68-positiven Makrophagen steht [25]. Dies ist wahrscheinlich ein Effekt von erhöhter Gewebsperfusion in der postinflammatorischen Phase kurz nach der Strahlentherapie [7].

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine strahleninduzierte Lymphangiogenese höchstwahrscheinlich durch VEGF-C-exprimierende Makrophagen vermittelt wird. Sowohl Lymphangiogenese als auch das direkte Tumorzellen stimulierende Potenzial von VEGF-C könnte zu der Entwicklung von lokalen Rezidiven oder Metastasen im Fall von überlebenden Tumorzellen in der bestrahlten Umgebung beitragen.

5.1 Evaluierung der Methode

In der vorliegenden Studie hat sich der Einsatz mit dem CD68-Antikörper (KD1) bewährt, welcher als guter Makrophagenmarker gilt [39]. KD1 ist ein monoklonaler Antikörper, der mit dem CD68-Antigen reagiert, ein Glykoprotein von 110 kDa. Es wird vornehmlich als ein interzelluläres Molekül exprimiert und ist mit lysosomalen Granula assoziiert, die von Makrophagen in einer Vielzahl von Geweben exprimiert werden³.

Mit KD1 lassen sich auch Monozyten, Mastzellen, neutrophile und Plasmazytoide T-Zellen darstellen [14]. In den in dieser Studie verwendeten Präparaten wurden auch vereinzelt Endothelzellen und Zellen der Epidermis mit angefärbt, wie auch schon anders beschrieben wurde [32].

5.2 Objektivität, Reliabilität, Validität

Für empirische Untersuchungen stellen Objektivität, Reliabilität und Validität Gütekriterien dar. Diese bauen aufeinander auf. Ohne Objektivität keine Reliabilität, ohne Reliabilität keine Validität [5].

Von Objektivität spricht man, wenn Aussagen oder Theorien nicht durch subjektive Wünsche, Meinungen, Neigungen oder Vorurteile beeinflusst sind, sondern sich allein auf Sachverhalte beziehen. Dies wurde im vorliegenden Experiment durch Verblindung des Untersuchers sichergestellt. Dem Untersucher war bei der mikroskopischen Auswertung nicht bekannt, ob es sich um Präparate der bestrahlten oder der unbestrahlten Seite handelt. So wurde vermieden, dass bewusst oder unbewusst z. B. auf der bestrahlten Seite mehr Strukturen als Makrophagen gewertet wurden als auf der unbestrahlten Seite.

Die Reliabilität (Zuverlässigkeit) bezeichnet die Genauigkeit wissenschaftlicher Untersuchungen. Bei Wiederholung eines Experimentes unter gleichen Rahmenbedingungen würde das gleiche Messergebnis erzielt werden. Dies würde bedeuten, dass das Experiment frei von zufälligen Fehlern ist. Dies ist nicht gegeben, da die Auszählung der CD68- und VEGF-C-positiven Zellen individuell vom Untersucher abhängig ist. So kann z. B. die Breite des Bereiches des oberen

³<http://www.lid-berlin.de/lid/ak/cd68.htm>, Dako-Cytomation

horizontalen Plexus nicht exakt definiert werden, teils sind CD68-positive Zellen übereinander gelagert oder es befinden sich Artefakte im Präparat aufgrund von Behandlungsfehlern der Schnitte (Qualitätsverbesserung der Schnitte durch geschultes Personal). Zur Objektivierung der Messgenauigkeit wurde der mittlere Variationskoeffizient bestimmt (siehe 3.2.3). Dieser lag bei $0,22 \pm 0,096$. Ein Variationskoeffizient von bis zu 0,30 ist in den Biowissenschaften keine Seltenheit [55]. Wenn er jedoch größer ist, ist dies ein Hinweis darauf, dass die Verteilung extrem schief ist, oder dass zwei inhomogene Gruppen, deren Verteilung sich überlappen, gemeinsam untersucht werden [55].

Das dritte Gütekriterium ist die Validität (Gültigkeit). Sie ist ein Maß für die Belastbarkeit einer bestimmten Aussage. Es wird in eine externe und interne Validität unterteilt. Die externe Validität erfasst, inwieweit die Ergebnisse einer Untersuchung generalisierbar sind. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Gruppe von Frauen untersucht. Es ist nicht sichergestellt, dass die erhobenen Ergebnisse auch bei einer Gruppe von Männern oder Kindern erzielt werden könnten. Genauso wenig kann generalisiert werden, dass die beobachteten Vorgänge in der Axillarhaut nach Bestrahlung auch in der Haut einer anderen Körperstelle (z. B. Fußsohle oder behaarte Kopfhaut) vorhanden sind. So weiß man aus Untersuchungen des Blutgefäßsystems des Menschen, dass es große Unterschiede der Mikrogefäße in verschiedenen Körperoberflächen gibt [7].

Unter einer internen Validität versteht man, wenn Veränderungen in der Ausprägung der untersuchten Variable eindeutig auf die bewusste Veränderung der unabhängigen Variable (Bestrahlung) zurückzuführen sind. Um dies zu gewährleisten, müssen Störvariablen kontrolliert bzw. ausgeschaltet werden. So wurden in der vorliegenden Untersuchung Patientinnen u. a. mit Erkrankungen im Exzisionsgebiet und mit schwerwiegenden generalisierten Hautveränderungen ausgeschlossen. Auch bekamen alle Patientinnen eine gleiche Strahlentherapie nach einem Standardprotokoll und der Tumor war bei allen Patienten lokal abgegrenzt und nicht mit umliegenden Strukturen verwachsen. Sie hatten alle keine Lymphknotenmetastasen entlang der Aterie mammaria interna und keine Fernmetastasen.

5.3 Studiendesign

Für die Untersuchung der gewünschten Parameter gab es verschiedene Ansätze [55].

1. Man könnte zwei Stichproben, bestehend aus bestrahlten und nicht bestrahlten Patienten, bezüglich der Lymphgefäßdichte bzw. der Makrophagendichte vergleichen. Die Fall- und Kontrollgruppe sollte sich bezüglich aller wichtigen Merkmale weitgehend ähnlich sein und sich nur bezüglich der abgeschlossenen bzw. nicht vorhandenen Bestrahlung unterscheiden. So muss nach der matched-pairs-Technik zu jedem Fall eine Kontrolle, die mit dem Fall bezüglich des Geschlechts, Alter und weiterer wichtiger Merkmale weitgehend übereinstimmt, existieren.

Vorteil: Jeder Proband müsste sich nur einmal dem kleinem chirurgischen Eingriff unterziehen.

Nachteil: Es müsste eine Strukturgleichheit der Stichproben vorhanden sein. Um die Veränderungen im zeitlichen Verlauf zu beobachten, müssten von verschiedenen Patienten, zu unterschiedlichen Zeiten nach der Bestrahlung, die Proben entnommen werden.

2. Man könnte Versuchstiere einer Strahlenexposition aus- bzw. nicht aussetzen und dann entnommene Hautproben bezüglich der Lymphgefäßdichte bzw. Makrophagendichte untersuchen.

Vorteil: Mehrere Hautproben von einem Versuchstier in bestimmten Zeitabständen nach der Exposition sind ethisch vereinbar. Unterschiedliche Dosierungsreihen der Strahlendosis wären möglich.

Nachteil: Eine Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen muss nicht gegeben sein.

3. Man könnte Proben von jedem Patienten vor und nach der Bestrahlung entnehmen und auf das betreffende Merkmal untersuchen.

Vorteil: Es wäre ein direkter Vergleich innerhalb eines Individuums vor und nach der Bestrahlung möglich. Man bräuchte nur eine halb so große Anzahl

an Probanden, da die Kontrolle vom selben Patienten entstammt und eine Strukturgleichheit gegeben ist.

Nachteil: Der Patient müsste sich mindestens 2-mal, und um das Merkmal im zeitlichen Verlauf zu beobachten, mehrmals einem kleinen chirurgischen Eingriff unterziehen. Weiterhin ist eine Begleitung des Patienten über längere Zeit notwendig, womit das Risiko eines Datenverlustes steigt.

Es wurde sich für die erste Methode in abgewandelter Form entschieden. Anstatt eine Fall- und Kontrollgruppe zu bilden, wurde die Kontrollprobe aus dem selben Individuum entnommen. Dies entspricht einer Kohortenstudie. Somit sind verbundene Stichproben vorhanden und die Strukturgleichheit ist gewährleistet. Es ermöglicht einen direkten Vergleich innerhalb eines Individuums zur selben Zeit und somit selben physischen und psychischen Zustands. Dies ist ein enormer Vorteil gegenüber anderen Studienansätzen. Der Nachteil bleibt allerdings bestehen. Man hat keinen direkten zeitlichen Verlauf innerhalb eines Individuums bezüglich der Lymphgefäßdichte, sondern es muss die Probenentnahme von unterschiedlichen Patienten zu unterschiedlichen Zeiten nach der Bestrahlung erfolgen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer Strahlentherapie auf das Mikrogefäßsystem der menschlichen Haut untersucht. Aufgrund von Vorarbeiten, bei denen eine Hyperplasie von Lymphkapillaren nach einer Strahlentherapie in der Haut festgestellt wurde [25], tat sich die Frage nach den Pathomechanismen auf. Ziel dieser Arbeit waren Veränderungen des Lymphgefäßwachstums in humaner Haut nach Bestrahlung im Zusammenhang mit Makrophagen und VEGF-C-Expression zu untersuchen. Grundlage für die Annahme war eine beschriebene Korrelation der Makrophagendichte mit der Lymphgefäßproliferation [45].

Zur Erreichung des Forschungsziels wurden von 40 Patienten (Alter $58,22 \pm 11,36$ Jahre), die aufgrund eines Mammakarzinoms bestrahlt wurden, nach der Strahlentherapie Hautproben aus der vorderen Axillarlinie im bestrahlten Areal und dem kontralateralen unbestrahlten Areal entnommen. Die Strahlendosis betrug $50 Gy$ ($30-35 Gy$ äquivalente Hautdosis). Davon angefertigte Schnitte wurden immunhistochemisch mit CD68- und VEGF-C-Antikörper untersucht. Die Bestimmung der Dichte der CD68- und der VEGF-C-positiven Zellen ergab eine signifikant höhere Anzahl in dem bestrahlten Gebiet im Vergleich zu dem unbestrahlten Gebiet. Die erhöhte Dichte an CD68-positiven Zellen bleibt über den beobachteten Zeitraum bestehen, während sich die Dichte der VEGF-C-Expression innerhalb des zweiten Jahres auf Kontrollwerte reduziert. Es ist keine signifikante Korrelation zwischen den Lymphgefäßen und den CD68-positiven Zellen vorhanden. In den ersten 2 Monaten nach der Strahlentherapie ist die Zahl der CD68-positiven Zellen erhöht und in den nachfolgenden Monaten steigt die Anzahl der Lymphgefäße, insbesondere die der kleinen ($2-9 \mu m$), an. Dieser Sachverhalt trifft auch auf die VEGF-C-positiven Zellen zu.

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Patientinnen mit Lymphödem bzw. ohne Lymphödem in Bezug auf CD68-, VEGF-C-positiven Zellen sowie Lymph- und Blutgefäße ermittelt werden. Lediglich eine Tendenz zur beeinträchtigten Lymphentwicklung, besonders der kleinen Lymphgefäße, ist zu erkennen.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen der durchschnittlichen Blutgefäß-

dichte und den CD68- bzw. VEGF-C-positiven Zellen festgestellt werden.

Ein Einfluss von Alter, Medikamenten oder Komorbiditäten auf die Dichte der CD68- bzw. VEGF-C-positiven Zellen war nicht nachweisbar.

Es lässt sich schlussfolgern, dass es in Folge einer Bestrahlung mit 50 *Gy* (30-35 *Gy* äquivalente Hautdosis) zu einer Erhöhung der Makrophagendichte im oberen horizontalen dermalen Gefäßplexus kommt, wobei ein Teil der Makrophagen VEGF-C auf ihrer Oberfläche exprimieren. VEGF-C, als ein Wachstumsfaktor für Lymphgefäße, kann daraufhin die Lymphangiogenese aktivieren.

Sowohl Lymphangiogenese als auch das direkte Tumorzellen stimulierende Potenzial von VEGF-C könnte zu der Entwicklung von lokalen Rezidiven oder Metastasen im Fall von überlebenden Tumorzellen in der bestrahlten Umgebung beitragen. Es ist wichtig, den Mechanismus für Lymphgefäßentwicklung zu verstehen. Dies könnte Auswirkung für Antilymphgefäßtherapien in der Behandlung von Tumorrezidiven und verschiedenen Krankheiten, die das Lymphgefäßsystem betreffen, haben. Die Anwendung von Inhibitoren gegen Lymphgefäßproliferation und Migration von Endothelzellen als Versuch Krebs zu kontrollieren, wird bereits erprobt. So konnte erst kürzlich durch eine Blockade von VEGFR-3 und durch LyP-1 Peptid die Lymphgefäßentwicklung inhibiert werden [41, 33].

7 Literaturverzeichnis

- [1] Archambeau JO, Ines A, Fajardo LF: Response of swine skin microvasculature to acute single exposures of X rays: quantification of endothelial changes. *Radiat. Res.* 98 (1984), 37–51
- [2] Asellius G: *Gasparii Asellii Cremonensis anatomici Ticinensis, de lactibus sive lacteis venis quarto vasorum mesaraicorum genere, novo invento, dissertatio, qua sententiae anatomicae multae, vel perperam receptae conuellantur, vel parum perceptae illustrantur.* Apud Io. Baptistam Bidellium, Mediolani, 1627
- [3] Baluk P, Tammela T, Ator E, Lyubynska N, Achen MG, Hicklin DJ, Jeltsch M, Petrova TV, Pytowski B, Stacker SA, Ylä-Herttuala S, Jackson DG, Alitalo K, McDonald DM: Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 115 (2005), 247–257
- [4] Boenisch T, Naish SJ: *Handbuch II der Immunhistochemischen Färbemethoden.* DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, 1989, S. 9–37
- [5] Bortz J: *Statistik: Für Sozialwissenschaftler.* 4. Aufl. Springer, Berlin, 1993
- [6] Bourne JA: *Handbuch I der Immunperoxidase Färbemethode.* DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, 1983, S. 7–37
- [7] Braverman IM, Keh-Yen A: Ultrastructure of the human dermal microcirculation. IV. Valve-containing collecting veins at the dermal-subcutaneous junction. *J. Invest. Dermatol.* 81 (1983), 438–442
- [8] Brown WR, Thore CR, Moody DM, Robbins ME, Wheeler KT: Vascular damage after fractionated whole-brain irradiation in rats. *Radiat. Res.* 164 (2005), 662–668
- [9] Cottier H: *Handbuch der medizinischen Radiologie.* Springer, Berlin, 1966, S. 139–144

- [10] Cursiefen C, Chen L, Borges LP, Jackson D, Cao J, Radziejewski C, D'Amore PA, Dana MR, Wiegand SJ, Streilein JW: VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J. Clin. Invest.* 113 (2004), 1040–1050
- [11] Donachy JE, Christian EL: Physical therapy intervention following surgical treatment of carpal tunnel syndrome in an individual with a history of postmastectomy lymphedema. *Phys. Ther.* 82 (2002), 1009–1016
- [12] Dörr W: *Nebenwirkungen in der Radioonkologie: klinisches Kompendium*. Urban & Vogel, München, 2000, S. 114ff
- [13] Eckstein PP: *Repetitorium Statistik*. 5. Aufl. Gabler, Wiesbaden, 2003, S. 307ff
- [14] Erdösová B, Hlávková L, Procházková J, Lichnovský V: Part of CD68+ macrophages in the clearance of apoptotic bodies in human metanephros. *Biomed. Papers* 146 (2002), 41–45
- [15] Fajardo LF: The pathology of ionizing radiation as defined by morphologic patterns. *Acta Oncol.* 44 (2005), 13–22
- [16] Ferrara N: VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11 (2002), 617–624
- [17] Fukumoto S, Morifuji M, Katakura Y, Ohishi M, Nakamura S: Endostatin inhibits lymph node metastasis by a down-regulation of the vascular endothelial growth factor C expression in tumor cells. *Clin. Exp. Metastasis* 22 (2005), 31–38
- [18] Gassmann A: Zur Histologie der Röntgenulcera. *Fortschr. Geb. Roentgenstr.* 2 (1899), 199–207
- [19] Goldman J, Le TX, Skobe M, Swartz MA: Overexpression of VEGF-C causes transient lymphatic hyperplasia but not increased lymphangiogenesis in regenerating skin. *Circ. Res.* 96 (2005), 1193–1199

- [20] Hahn H, Kaufmann SHE: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 5. Aufl. Springer, Berlin, 2005, S. 113–118
- [21] Harvey W: *Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus*. Sumpt. Guilielmi Fitzeri, Francofurti, 1628
- [22] Herberhold C, Werner JA, Walther EK: *Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis. Band 3: Hals*. Thieme, Stuttgart, 1995, S. 174–179
- [23] Herrmann A, Helmbold P, Becker A, Stadie V, Hellmann A, Weigel C, Marsch WC, Dunst J: Lymphgefäßsystem und Strahlentherapie. *Lymph-Forsch* 3 (1999), 85–88
- [24] Itaya H, Imaizumi T, Yoshida H, Koyama M, Suzuki S, Satoh K: Expression of vascular endothelial growth factor in human monocyte/macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Thromb. Haemost.* 85 (2001), 171–176
- [25] Janusch M: *Persönliche Mitteilung*. 2006
- [26] Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K: Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 276 (1997), 1423–1425
- [27] Jetter D: *Geschichte der Medizin: Einführung in die Entwicklung der Heilkunde aller Länder und Zeiten*. Thieme, Stuttgart, New York, 1992
- [28] Jussila L, Alitalo K: Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol. Rev.* 82 (2002), 673–700
- [29] Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Ylä-Herttuala S, Jäättelä M, Alitalo K: Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res.* 61 (2001), 1786–1790
- [30] Karpanena T, Alitalo K: Lymphatic vessels as targets of tumor therapy? *J. Exp. Med.* 194 (2001), 37–42

- [31] Kerjaschki D: The crucial role of macrophages in lymphangiogenesis. *J. Clin. Invest.* 115 (2005), 2316–2319
- [32] Kunisch E, Fuhrmann R, Roth A, Winter R, Lungershausen W, Kinne RW: Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry. *Ann. Rheum. Dis.* 63 (2004), 774–784
- [33] Laakkonen P, Åkerman ME, Biliran H, Yang M, Ferrer F, Karpanen T, Hoffman RM, Ruoslahti E: Antitumor activity of a homing peptide that targets tumor lymphatics and tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004), 9381–9386
- [34] Leu AJ, Berk DA, Lymboussaki A, Alitalo K, Jain RK: Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res.* 60 (2000), 4324–4327
- [35] Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G, Pepper MS: Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J.* 20 (2001), 672–682
- [36] Maruyama K, Ii M, Cursiefen C, Jackson DG, Keino H, Tomita M, Van Rooijen N, Takenaka H, D’Amore PA, Stein-Streilein J, Losordo DW, Streilein JW: Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages. *J. Clin. Invest.* 115 (2005), 2363–2372
- [37] Morrell RM, Halyard MY, Schild SE, Ali MS, Gunderson LL, Pockaj BA: Breast cancer-related lymphedema. *Mayo Clin. Proc.* 80 (2005), 1480–1484
- [38] Pearson K: On further methods of determining correlation. *Draper’s Company Memoirs* Biometric Series IV (1907), 11–12
- [39] Peter HH: *Klinische Immunologie*. 2. Aufl. Urban & Schwarzenberg, München, 1996

- [40] Pschyrembel W, Dornblüth O: *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 258. Aufl. De Gruyter, Berlin, 1998
- [41] Pytowski B, Goldman J, Persaud K, Wu Y, Witte L, Hicklin DJ, Skobe M, Boardman KC, Swartz MA: Complete and specific inhibition of adult lymphatic regeneration by a novel VEGFR-3 neutralizing antibody. *J. Natl. Cancer Inst.* 97 (2005), 14–21
- [42] Ristimäki A, Narko K, Enholm B, Joukov V, Alitalo K: Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor C. *J. Biol. Chem.* 273 (1998), 8413–8418
- [43] Rudolph R, Arganese T, Woodward M: The ultrastructure and etiology of chronic radiotherapy damage in human skin. *Ann. Plast. Surg.* 9 (1982), 282–92
- [44] Ryan TJ: Structure and function of lymphatics. *J. Invest. Dermatol.* 93 (1989), 18–24
- [45] Schoppmann SF, Birner P, Stöck J, Kalt R, Ullrich R, Kriehuber E, Nagy K, Alitalo K, Kerjaschki D: Tumor associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am. J. Pathol.* 161 (2002), 947–956
- [46] Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T, Schirner M, Wolf GL, Alitalo K, Detmar M: Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor C in melanoma. *Am. J. Pathol.* 159 (2001), 893–903
- [47] Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M: Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat. Med.* 7 (2001), 192–198
- [48] Stahel WA: *Statistische Datenanalyse. Eine Einführung für Naturwissenschaftler*. 4. Aufl. Vieweg, Braunschweig, Wiesbaden, 2002, S. 236ff

- [49] Tsai PW, Shiah SG, Lin MT, Wu CW, Kuo ML: Up-regulation of vascular endothelial growth factor C in breast cancer cells by heregulin-beta 1. *J. Biol. Chem.* 278 (2003), 5750–5759
- [50] Ueda M, Hung YC, Terai Y, Kanda K, Kanemura M, Futakuchi H, Yamaguchi H, Akise D, Yasuda M, Ueki M: Vascular endothelial growth factor C expression and invasive phenotype in ovarian carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 11 (2005), 3225–3232
- [51] van den Brenk HAS: The effect of ionizing radiation on the regeneration and behavior of mammalian lymphatics: in vivo studies in Sandison Clark chambers. *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.* 78 (1957), 837–849
- [52] Veikkola T, Jussila L, Makinen T, Karpanen T, Jeltsch M, Petrova TV, Kubo H, Thurston G, McDonald DM, Achen MG, Stacker SA, Alitalo K: Signalling via vascular endothelial growth factor receptor 3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 20 (2001), 1223–1231
- [53] Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K: Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res.* 60 (2000), 203–212
- [54] Wartiovaara U, Salven P, Mikkola H, Lassila R, Kaukonen J, Joukov V, Orpana A, Ristimäki A, Heikinheimo M, Joensuu H, Alitalo K, Palotie A: Peripheral blood platelets express VEGF-C and VEGF which are released during platelet activation. *Thromb. Haemost.* 80 (1998), 171–175
- [55] Weiß C: *Basiswissen Medizinische Statistik*. 2. Aufl. Springer, Berlin, 2002

8 Anhang

8.1 Legende zu den Mikrophotographien

In folgender Aufzählung werden die Teilbilder von Abbildung 5 auf Seite 41 näher erläutert:

- **Bild A-C:** Hämatoxylin-Eosin Färbung; Kontrolle mit physiologischen Mikrogefäßen (**A**) und 4 Wochen nach Bestrahlung, perivaskuläres Monozyten-Infiltrat (Pfeil) und geschrumpfte Talgdrüsen (*) (**B**). Höhere Vergrößerung zeigt Degeneration von Mikrogefäßen (Pfeil) und eine hohe Dichte von erweiterten Venuolen (**C**).
- **Bild D-E:** VEGF-C Färbung; Kontrolle (**D**) und 4 Wochen nach Bestrahlung (**E**)
- **Bild F-H:** CD68 Färbung; niedrige Dichte von CD68-positiven Zellen in Kontrolle (**F**) und hohe Dichte von CD68-positiven Zellen 4 Wochen nach Bestrahlung (**G,H**)
- **Bild I-J:** Koexpressionsanalyse in konsekutiven Schnitten zeigt, dass VEGF-C-positive Zellen (**I**) CD68-positive sind (**J**).
- Maßstab: A, B, F, G = 100 μm ; C, D, E, H = 50 μm ; I, J = 25 μm .

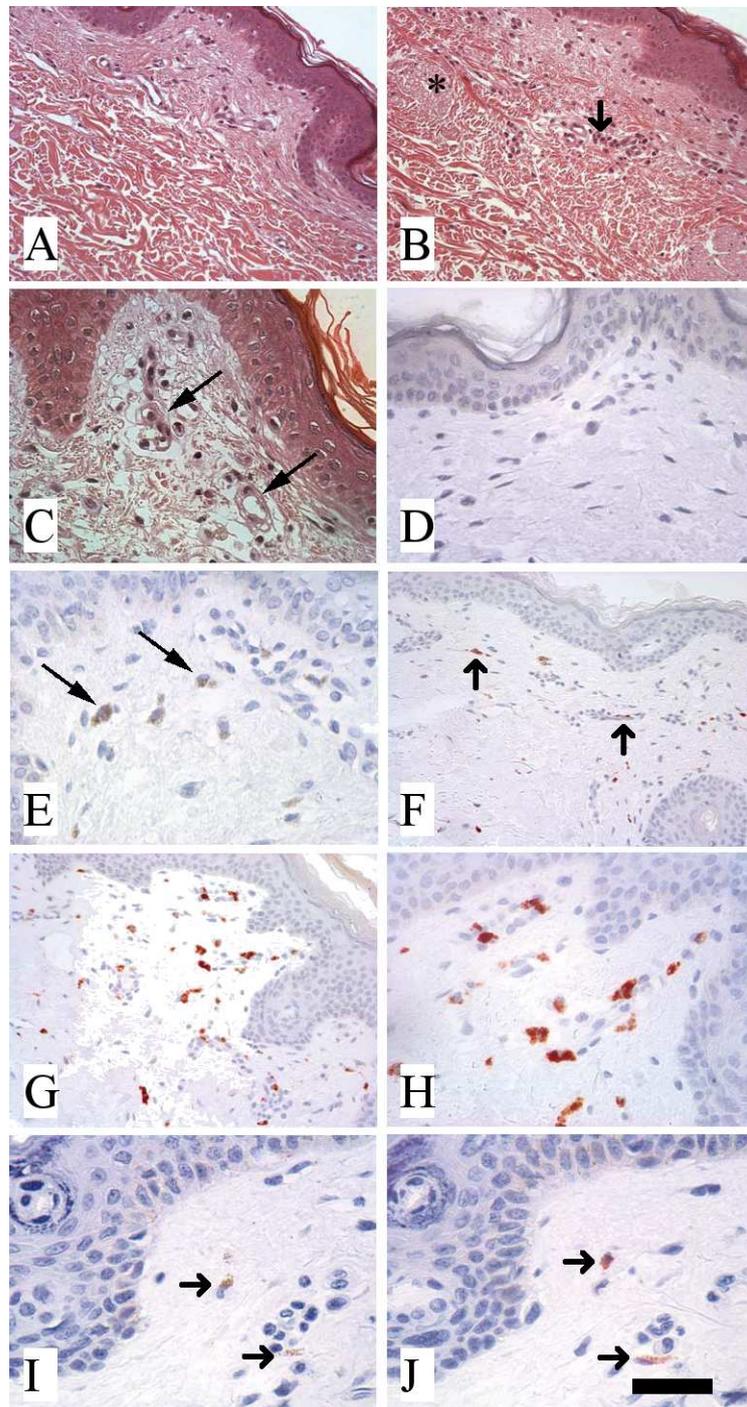


Abbildung 5: Mikrophotographien des oberen horizontalen Plexus der bestrahlten und unbestrahlten Haut

8.2 Arbeitstabelle CD68- und VEGF-C-positive Zellen

Die in der nachfolgenden Tabelle mit dem Zusatz *a* gekennzeichneten Fälle wiesen zum Probeentnahmezeitpunkt ein Lymphödem auf.

Fall	tPE (Monate)	Alter (Jahre)	CD68+Zellen(n/mm)		VEGF-C+Zellen(n/mm)	
			Radiatio	Kontrolle	Radiatio	Kontrolle
33 ^a	0,5	38	66,5	32,5	15,8	15,8
4	1	62	112,8	71,2	36,8	18,3
6 ^a	1	60	159,6	101,6		
9	1	46	84,6	49,6	14,2	11,7
10	1	74	117,9	106,0		
27	1	60	126,5	54,0	29,6	7,5
28	1	78	49,2	45,0	20,7	8,0
31 ^a	1	79	46,8	39,8	11,3	25,0
32	1	63	99,2	55,7	18,3	3,3
34 ^a	1	65	92,9	78,2	25,9	13,6
35	1	39	94,0	54,2	15,8	11,7
38	1	69	104,9	73,4	14,2	5,8
39	2	44	76,9	55,8	22,8	19,1
22	10	71	50,0	63,3		
2 ^a	11	61	92,0	79,3	5,8	3,3
8	11	39	111,7	111,6	28,0	9,2
15 ^a	11	58	105,0	59,2		
20	12	47	84,8	66,8		
41	12	48	73,0	59,3	21,9	16,7
12	13	51	106,4	85,6		
21	13	43	38,8	41,7	9,9	5,2
25	13	60	52,1	27,0	22,5	12,5
36 ^a	13	62	82,5	69,2		
23	14	75	31,3	29,2		
16	17	63	97,8	70,0		

Fall	tPE (Monate)	Alter (Jahre)	CD68+Zellen(n/mm)		VEGF-C+Zellen(n/mm)	
			Radiatio	Kontrolle	Radiatio	Kontrolle
18	23	43	45,0	26,7	2,5	1,7
37	23	47	79,5	64,4		
11	24	67	137,5	85,6	28,3	14,8
17	24	62	100,8	90,8		
7	25	52	81,7	111,7		
19	25	61	67,0	24,2	10,8	1,7
24	25	57	77,8	60,1	15,8	14,2
26	37	56	53,6	73,4		
3 ^a	38	65	115,2	89,1		
40	39	39	84,6	26,8	3,3	3,3
13	43	72	111,3	110,8		
29	44	65	74,3	41,0	15,8	2,5
30 ^a	44	67	64,6	62,7		
14	49	62	103,3	90,5		
1	157	59	51,4	38,4		

Tabelle 2: Arbeitstabelle CD68- und VEGF-C-positive Zellen

8.3 Stadieneinteilung nach dem AJCC

Nach dem American Joint Committee on Cancer für Brustkrebs (2002) werden die Tumorstadien des Brustkrebs in Stadium I-IV eingeteilt. Die Einteilung orientiert sich nach der TNM- Klassifikation. Dabei beschreibt T den Primärtumor, N den regionalen Lymphknotenbefall und M die Fernmetastasen.

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T3	N1	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Any T	N3	M0
IV	Any T	Any N	M1

Tabelle 3: Stadieneinteilung nach AJCC

T0 keine Evidenz für einen Primärtumor

Tis präinvasives Karzinom (Carcinoma in situ)

T1 Tumor 2 *cm* oder kleiner

T2 Tumor mehr als 2 *cm*, aber weniger als 5 *cm*

T3 Tumor mehr als 5 *cm*

T4 Tumor jeder Größe mit Ausdehnung auf a) Brustwand oder b) Haut

N0 keine Evidenz für einen Befall der regionalen Lymphknoten

N1 Metastasen in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten

N2 Metastasen in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander verbacken oder in anderen Strukturen fixiert

N3 Metastasen in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna

M0 keine Evidenz für Fernmetastasen

M1 Evidenz für Fernmetastasen

8.4 Auswertung der Vorarbeiten an Lymph- und Blutgefäßen

Die Dissertation von Janusch [25] ist Grundlage der vorliegenden Arbeit. Deshalb soll an dieser Stelle eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse der Dissertation erfolgen, um ein besseres Verständnis zu gewährleisten.

Die Darstellung der Lymphgefäße erfolgte mit einem Antikörper für Podoplanin. Die Blutgefäße wurden mit einem CD34-Antikörper angefärbt. Bei der Auswertung wurden sowohl die Lymphgefäße als auch die Blutgefäße in Gruppen eingeteilt, um die unterschiedlichen Gefäßdurchmesser zu berücksichtigen.

Für die Lymphgefäße: 2-9 μm , 10-17 μm , 18-24 μm und $\geq 25 \mu m$

Für die Blutgefäße: $\leq 11 \mu m$, 12-15 μm und $\geq 16 \mu m$

Die durchschnittliche Dichte der Lymphgefäße der bestrahlten Haut ist 18% höher als in der unbestrahlten Haut. Der Unterschied ist nach Überprüfung mit dem t-Test für abhängige Stichproben signifikant (Abbildung 6). Die Analyse der verschiedenen Gefäßdurchmessergruppen zeigt, dass dies hauptsächlich eine Folge des Anstieges der kleinen Lymphgefäße (2-9 μm) auf der bestrahlten Seite um 44% ist. Sowohl die größeren Lymphgefäße ($\geq 10 \mu m$), als auch die CD34-positiven

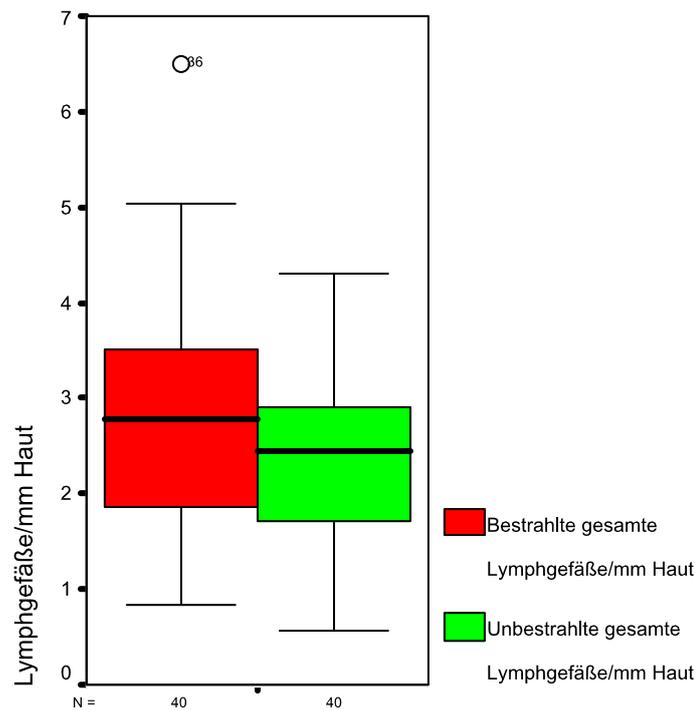


Abbildung 6: Vergleich Lymphgefäße bestrahlt und unbestrahlt

Blutgefäße zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen der bestrahlten und der unbestrahlten Seite (Abbildung 7).

In Abbildung 8 und 9 wird die Gesamtzahl der Mikrogefäße der bestrahlten und unbestrahlten Seite über die Zeit dargestellt. Bei den Lymphgefäßen ist auf der bestrahlten Seite ein Anstieg über die Zeit zu beobachten. Auf der unbestrahlten Seite ist erst ein Abfall und dann ein Anstieg vorhanden. Diese Veränderungen sind mit Hilfe des t-Test nicht zu verifizieren. Im Vergleich der bestrahlten Seite gegen die unbestrahlte Seite über die Zeit sind deutlich höhere Werte auf der bestrahlten Seite in allen drei Zeitgruppen vorhanden. Der Unterschied ist jedoch nur für den Zeitraum 10-18 Monate signifikant.

Bei den CD34-positiven Gefäßen konnten keine Unterschiede über die Zeit zwischen bestrahlter und unbestrahlter Haut festgestellt werden.

Bei allen Patienten mit Lymphödem blieb die Lymphgefäßdichte niedrig. Es war kein Einfluss von Medikamenten oder Komorbiditäten auf die Lymph- und Blutgefäße zu beobachten.

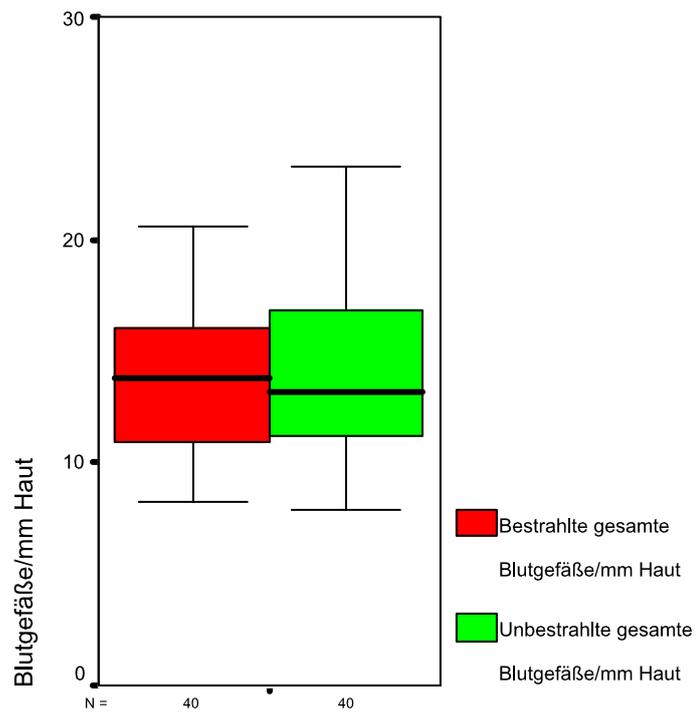


Abbildung 7: Vergleich Blutgefäße bestrahlt und unbestrahlt

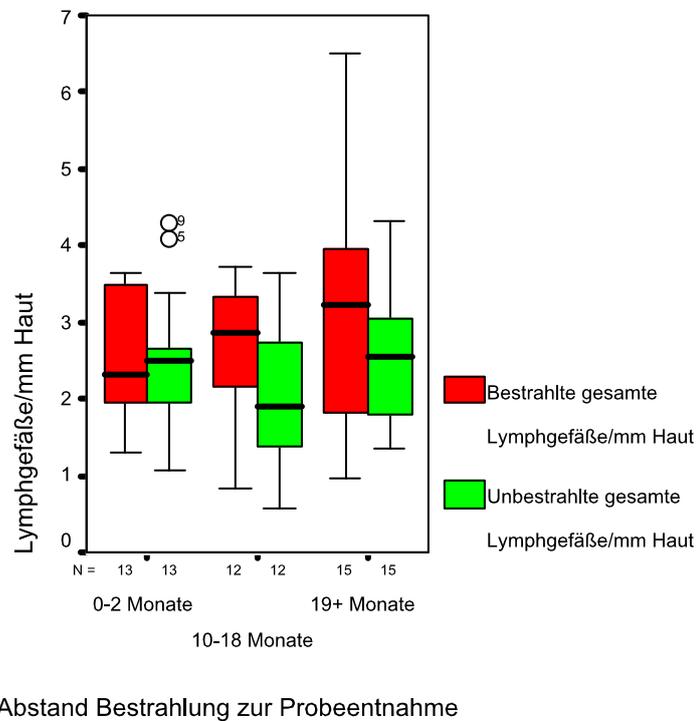


Abbildung 8: Vergleich gesamte Lymphgefäße bestrahlt und unbestrahlt über die Zeit

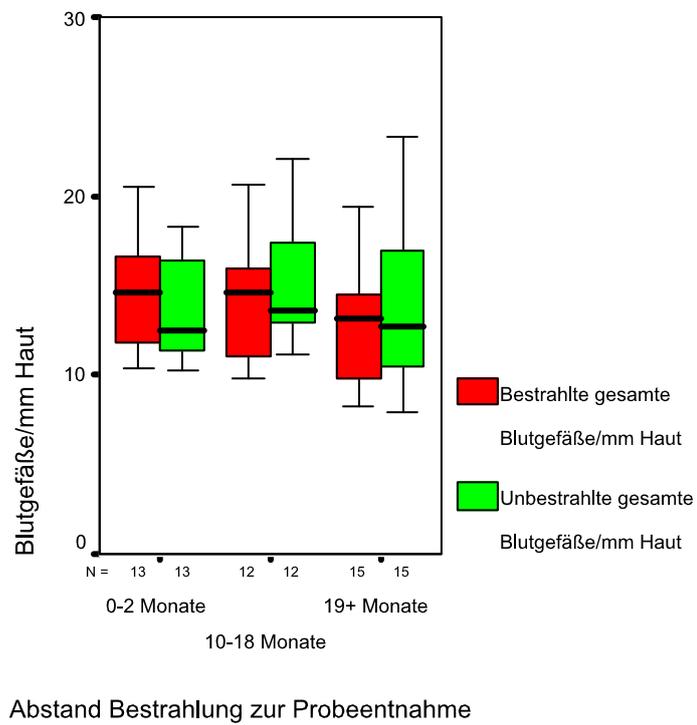


Abbildung 9: Vergleich gesamte Blutgefäße bestrahlt und unbestrahlt über die Zeit

9 Thesen

1. Vorarbeiten zeigen eine Hyperplasie von Lymphkapillaren nach einer Strahlentherapie in der Haut.
2. Ziel dieser Arbeit waren Veränderungen des Lymphgefäßwachstums in humaner Haut nach Bestrahlung im Zusammenhang mit Makrophagen und VEGF-C-Expression zu untersuchen.
3. Von 40 Patienten wurden nach einer abgeschlossenen Strahlentherapie Hautproben aus der vorderen Axillarlinie im bestrahlten Areal und dem kontralateralen unbestrahlten Areal entnommen.
4. Die immunhistochemische Darstellung erfolgte mit Anit-CD68 und Anti-VEGF-C.
5. Anit-CD68 ist ein spezifischer Makrophagenmarker.
6. Nach einer Bestrahlung steigt die Dichte der CD68- und VEGF-C-positiven Zellen.
7. Ca. 20% der Makrophagen in beiden Stichproben sind VEGF-C positiv.
8. Kurz nach der Strahlentherapie steigt die Dichte der CD68- bzw. VEGF-C-positiven Zellen und zeitversetzt wird nach einem Jahr eine erhöhte Lymphgefäßdichte beobachtet.
9. Es gibt keinen Unterschied in der Dichte der CD68- bzw. VEGF-C-positiven Zellen zwischen Patienten mit Lymphödem und Patienten ohne Lymphödem.
10. Alter und Komorbiditäten haben keinen Einfluss auf die Dichte der CD68- bzw. VEGF-C-positiven Zellen.
11. Nach einer Bestrahlung mit 50 Gy (30-35 Gy äquivalente Hautdosis) erfolgt eine Lymphgefäßhyperplasie durch VEGF-C-exprimierende Makrophagen.

Tabellarischer Lebenslauf

Name	Susanne Jackowski
Geburtsdatum	23. November 1980
Geburtsort	Halle (Saale)
Postadresse	Susanne Jackowski Ginsterweg 12 D-06120 Lieskau
E-Mail	sjackowski@hpfc.de
Ausbildung	1987-1991 Valentina Tereschkova (Grundschule) Halle 1991-1999 Frieden-Gymnasium Halle
Studium	2000-2006 an der MLU Halle-Wittenberg, Human- medizin 2006-2007 an der Universität des Saarlandes, Hu- manmedizin

Publikation

Jackowski S, Janusch M, Fiedler E, Marsch WC, Ulbrich EJ, Gaisbauer G, Dunst J, Kerjaschki D, Helmbold P: Radiogenic lymphangiogenesis in the skin. *Am. J. Pathol.* 171 (2007), 338–348

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Alle Stellen im Text, die anderen Werken im Wortlaut oder sinngemäß entnommen sind, wurden als Entlehnung kenntlich gemacht. Gleiches gilt für alle beigegebenen Abbildungen, Tabellen und Anlagen. Diese Promotion ist an keiner weiteren Fakultät eingereicht bzw. abgelehnt worden. Ein früherer Promotionsversuch ist nicht erfolgt.

Halle, den

.....

Susanne Jackowski