

Quantifizierung histologischer Strukturen bei Vaskulären Anomalien des Kopf-Hals-Bereiches mittels digitaler Bildanalyse

Jovine Ehrenreich, Michael Bette, Behfar Eivazi, Susanne Wiegand, Marion Roessler, Jochen A. Werner, Robert Mandic
Universitäts-Hals-Nasen-Ohrenklinik Marburg, Institut für Anatomie und Zellbiologie und Institut für Pathologie der Philipps-Universität Marburg

Einleitung. Vaskuläre Anomalien (VAs) gehören zu den häufigsten angeborenen und frühkindlichen Weichgewebs-Fehlbildungen im Kopf-Hals-Bereich^{1,2}. Unterschieden werden hierbei vaskuläre Malformationen (VMs), wie beispielsweise arteriovenöse und lymphatische Malformationen (AVMs und LMs) sowie Hämangiome. Die (immun)histologische Abgrenzung der verschiedenen VA-Typen innerhalb der genannten Gruppen gestaltet sich aufgrund der ausgeprägten Heterogenität der Fehlbildungen als äußerst schwierig³⁻⁶. Das Ziel des vorliegenden Projektes war es zu beurteilen, inwiefern eine Quantifizierung immunhistologischer VA-Präparate mittels digitaler Bildanalyse eine genauere Einteilung verschiedener VA Subtypen ermöglichen kann.

Material & Methoden. Untersuchungen an VA Geweben wurden nach schriftlicher Einwilligung der Patienten entsprechend eines positiven Votums der Ethikkommission des FB Medizin durchgeführt. 22 VA-Gewebe wurden immunhistologisch unter Einsatz von Antikörpern gegen CD31, CD34, D2-40, CK1, CK19, Vimentin, Claudin-5 und β -Actin untersucht. Das Expressionsmuster der Kandidatenproteine innerhalb der untersuchten Gewebe wurde digital mit Hilfe des Programms ImageJ (*National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*) analysiert. Vier Präparate wurden, aufgrund einer starken Hintergrundfärbung bei einem Antikörper nicht in die aktuelle Auswertung mit einbezogen. Zur statistischen Berechnung von Unterschieden der Flächenanteile der einzelnen untersuchten Kandidatenproteine zwischen den 18 analysierten Gewebeproben wurde ein einseitiger ANOVA Test mit anschließendem Dunnett's multiplum Vergleichstest durchgeführt. Als Referenzwert wurde der durchschnittliche Flächenanteil aller Gewebeproben ermittelt (rote Linie). Statistische Unterschiede sind dargestellt mit: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$. Die Berechnung erfolgte mittels der GraphPad Prism Version 6.00 Software für Windows (*La Jolla, CA, USA*).

Tabelle 1. Klinische Angaben der untersuchten VA Gewebe.

Fall #	Diagnose	Anatomische Lokalisation	Geschlecht	Alter bei Diagnose [Jahre]
1	Lymphangiom	Oberlippe, Wange links	weiblich	27
2	Paragangliom (Glomus caroticum)	Karotisbifurkation links	männlich	49
3	hypertrophe kapilläre Malformation	Unterlippe links	weiblich	37
4	AVM	Oberlippe links	männlich	57
5	Pyogenes Granulom	Zungenunterseite mittig	weiblich	9
6	Vaskuläre Malformation	Zervikal links (M. Sternocleidomastoideus)	weiblich	16
7	AVM	Glandula Parotis rechts	weiblich	8
8	VM mit Lymphangiomenteilen	Zungenunterseite rechts	männlich	22
9	kapilläre Malformation	Unterlippe gesamt	weiblich	78
10	Lymphangiom	Perimandibulär links	männlich	17
11	Vaskuläre Malformation	Oro- und Hypopharynx rechts	männlich	30
12	mikrozystischen Lymphangiom	Zungenrücken gesamt	weiblich	2
13	Venöse Malformation / Hämangiom	Zervikal links (M. Sternocleidomastoideus)	weiblich	20
14	AVM	Stirn	weiblich	15
15	epitheloides Hämangiom / VM	Ohrmuschel links	weiblich	31
16	AVM	Gesicht links	männlich	41
17	AVM	Gesicht rechts, Nase	männlich	33
18	Venöse Malformation (Kavernom)	Augenhöhle links	weiblich	35

Ergebnisse. Die Auswertung des spezifischen Signals (braunes Präzipitat) erfolgte entsprechend der Darstellung in Abb. 1. Die so erhaltenen Expressionswerte für jedes Kandidatenprotein wurden zwischen den eingesetzten 18 VA Geweben verglichen (Abb. 2). Hierbei zeigen sich teilweise hochsignifikante Abweichungen der Expressionswerte zum Mittelwert der Gesamtgruppe. Beispielsweise zeigen die zwei venösen Malformationen (Fall #13 und 18) beide eine signifikant höhere Expression für CD31, Vimentin und Claudin-5. Weiterhin zeigte die Probe #5 (Pyogenes Granulom) eine auffällig höhere Expression von CK19, welches u.a. bei proliferierenden Stammzellen hoch exprimiert sein kann. Dies ist in Übereinstimmung mit dem klinisch-histopathologischen Bild eines Pyogenen Granuloms, welches durch eine ausgeprägte Gefäßproliferation charakterisiert ist. Bei einer anderen Gewebeprobe (Fall #12) hingegen fand sich eine signifikant niedrigere CK19 Expression. Hierbei handelte es sich um ein mikrozystisches Lymphangiom. Dies ist ebenfalls übereinstimmend mit der niedrigen Proliferationsrate dieses VA Typs. Überraschend hingegen war die relativ höhere Expression von Podoplanin bei einer AVM (Fall #17), welches eher bei einer LM zu erwarten wäre.

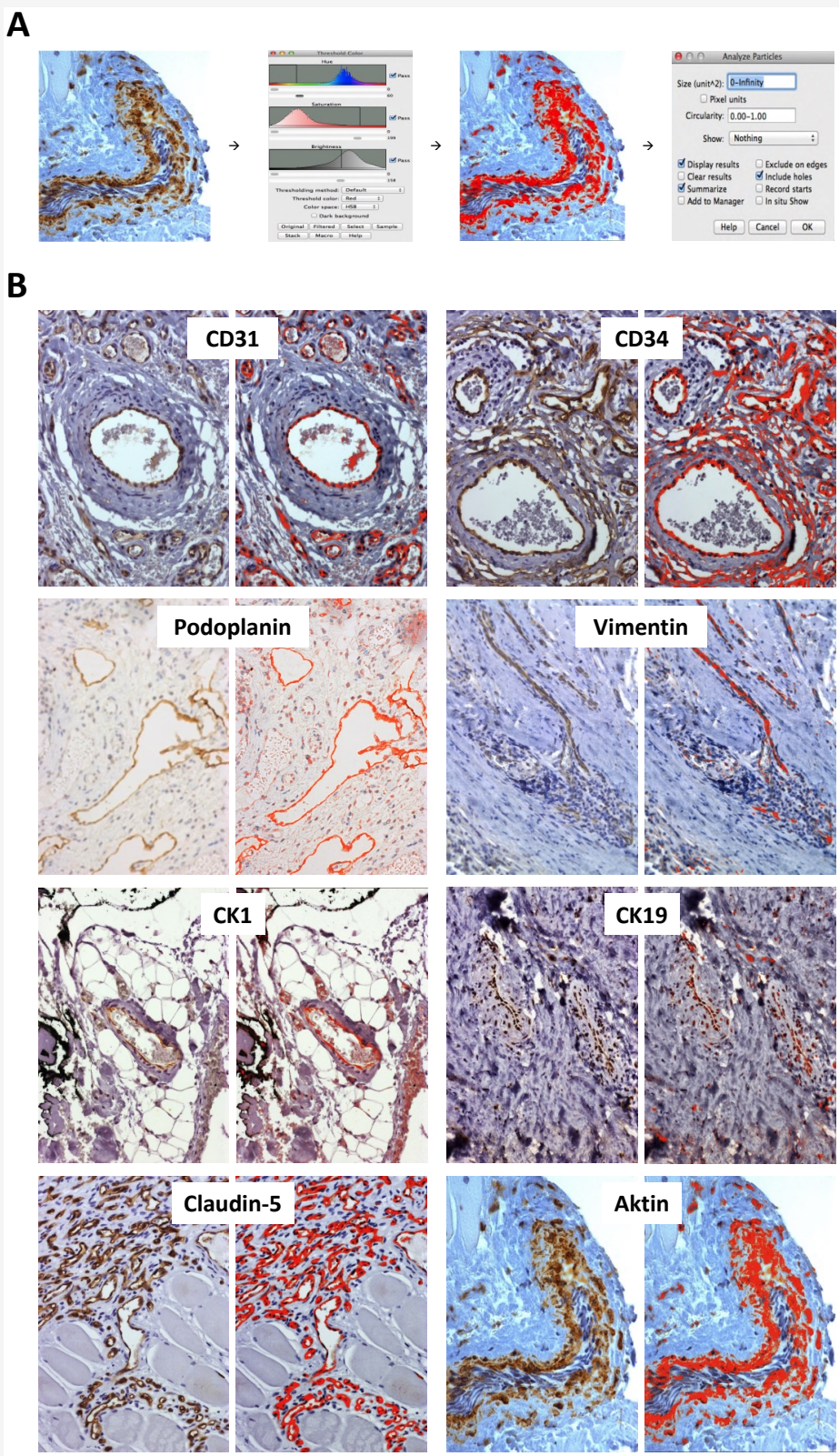


Abbildung 1. (A) Die Auswertung der immunhistologischen Signale erfolgte mittels des Programms ImageJ. (B) Beispielhafte Darstellung der Detektion der immunhistologischen Signale für jeden der 8 eingesetzten Antikörper wie in A dargestellt. Für jede Antikörperfärbung wurden pro Präparat 10 unabhängige Messungen in sich nicht überlappenden Arealen der VA durchgeführt, um repräsentative mittlere Expressionswerte zu erhalten.

Literatur.

- Mulliken and Glowacki. *Plast Reconstr Surg.* 1982 Mar;69(3):412-22.
- Eivazi and Werner. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2014 Dec 1;13:Doc02.
- Gupta and Kozakewich. *Clin Plast Surg.* 2011 Jan;38(1):31-44.
- Dai et al.. *Laryngoscope.* 2011 Nov;121(11):2435-42.
- Werdich et al.. *Am J Ophthalmol.* 2014 Oct;158(4):816-826.
- Abuelatta et al. *Head Neck.* 2014 Jul;36(7):1052-7.

<http://www.angiome.de>

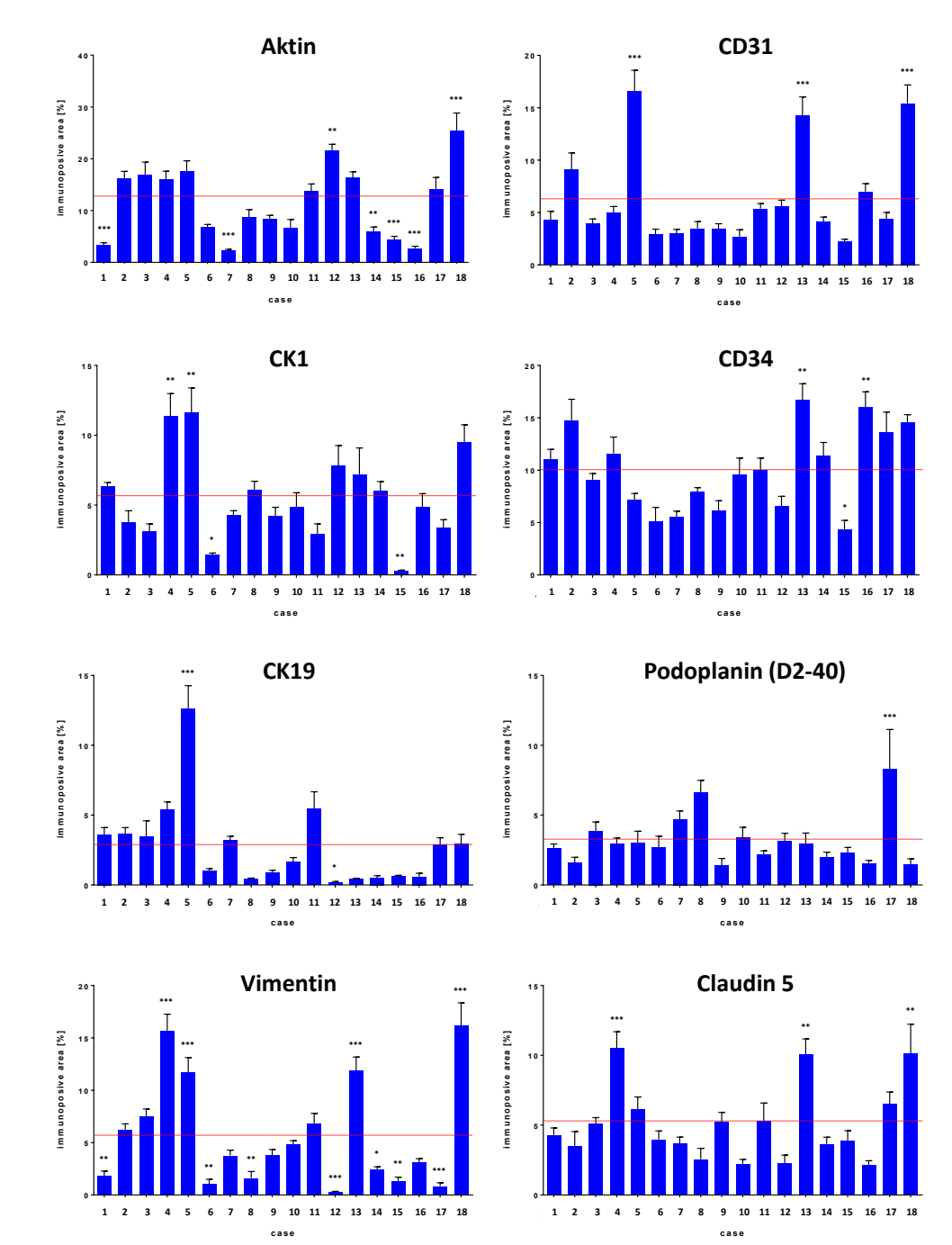


Abbildung 2. Die statistische Auswertung der Expression der 8 Kandidatenproteine wurde wie in M&M beschrieben durchgeführt. Es zeigen sich signifikante Unterschiede bezüglich der Expression einzelner Kandidatenproteine in den jeweiligen VAs verglichen mit dem Durchschnitt der gesamten Gruppe (rote Linie). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$. Nummern 1-18 entsprechen den Fällen #1-18 in Tabelle 1

Zusammenfassung. Es zeigten sich deutliche Unterschiede im Expressionsgrad der untersuchten Kandidatenproteine nach digitaler Quantifizierung zwischen den verschiedenen VAs. Die immunhistologische Beurteilung und Quantifizierung VA-assoziiierter Kandidatenproteine mittels digitaler Bildanalyse könnte daher dazu beitragen die sehr heterogene Gruppe dieser Gefäßfehlbildungen genauer zu klassifizieren. Weiterführende Untersuchungen haben zum Ziel die Zahl der untersuchten VA-Gewebe zu erhöhen und weitere relevante Kandidatenproteine in die Beurteilung mit einzubeziehen