

4 Ergebnisse

4.1 Durchflußzytometrie

4.1.1 Darstellung der endothelialen Vorläuferzellen innerhalb der mononukleären Zellfraktion durch extrazelluläre Mehrfach-Markierung

Nachdem man die Erythrozyten aus der Blutprobe mittels Lyse und anschließenden Waschrissen entfernt hat, erhält man in der FACS-Analyse das typische Bild einer Vollblutzytometrie (siehe Abb. 23). Durch das lineare Auftragen von Zellgröße und Granularität kann man die Zellpopulationen der Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten voneinander unterscheiden.

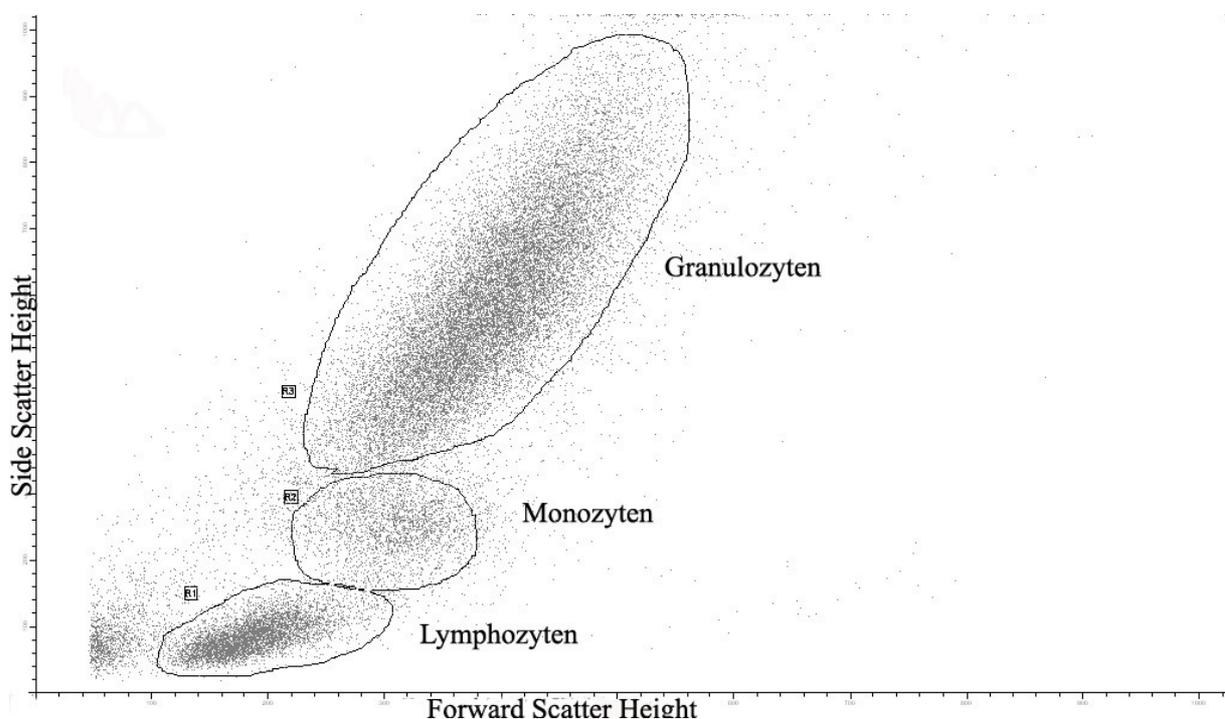


Abb. 23: Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen innerhalb der mononukleären Zellfraktion

Die Abbildung zeigt das typische Bild einer Vollblut-Zytometrie, in der mit Hilfe der Zellgröße (Forward Scatter Height, x-Achse) und der Granularität (Side Scatter Height, y-Achse) eine erste Differenzierung in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten möglich ist.

Eine differenziertere Auswertung separater Zellpopulationen erfolgt durch die vom Anwender definierte Erstellung sogenannter Gates in der FSC/SSC-Darstellung jeder gemessenen Probe. In der vorliegenden Arbeit wurde das Gate um die Lymphozyten-Zellpopulation gesetzt, da sich die zu bestimmenden endothelialen Vorläuferzellen innerhalb dieser Zellgruppe befinden (siehe Abb. 24).

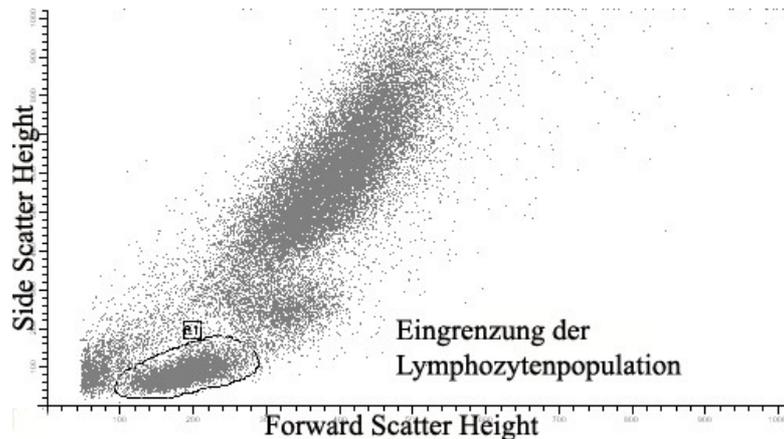


Abb. 24: Setzen des Gates um die Zellpopulation der Lymphozyten

Nachdem ein solches Gate definiert wurde, wertet die Software (Win List, Verity Software House) nur die innerhalb dieser Eingrenzung liegenden Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz aus. Dadurch kann die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle in einer definierten Zellpopulation bestimmt werden.

Beim Einsatz spezifischer monoklonaler Antikörper im Rahmen der Durchflußzytometrie muss man bei der Analyse der Daten dem Background Beachtung schenken. Dieser Hintergrund kann Komponenten enthalten, die in der Lage sind unspezifische Bindungen einzugehen. Da solche Bindungen das Ergebnis verfälschen, ist es notwendig deren Ausmaß zu erkennen, um sie bei der Analyse der Proben berücksichtigen zu können. Um dem Rechnung zu tragen, wurde eine Isotypenkontrolle mit einem monoklonalen Antikörper (IgG1-FITC/IgG1-PE, Immunotech, Marseille, Frankreich) durchgeführt (siehe Abb. 25). Dieser Antikörper teilt sich bestimmte strukturelle Charakteristika mit den Antikörpern die in dieser Studie eingesetzt worden sind ohne aber deren Spezifitäten hinsichtlich der zu untersuchenden Zellpopulation zu besitzen.

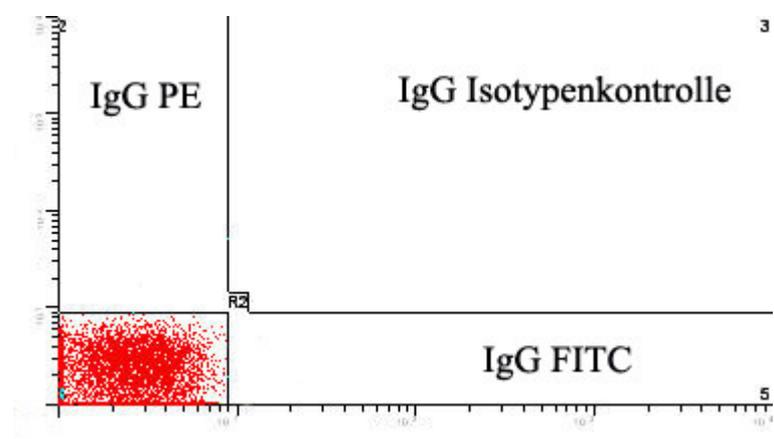


Abb. 25: Darstellung der Isotypenkontrolle

Mit Hilfe der zweifachen Oberflächenmarkierung mit einem CD34 und einen Anti-VEGF Receptor-2 (KDR) Antikörper gelang die differenzierte Darstellung der endothelialen Vorläuferzellen in der FACS-Analyse des bearbeiteten Vollblutes der Patientinnen (siehe Abb. 26). Für jede Analyse wurden 30.000 Zellen gemessen.

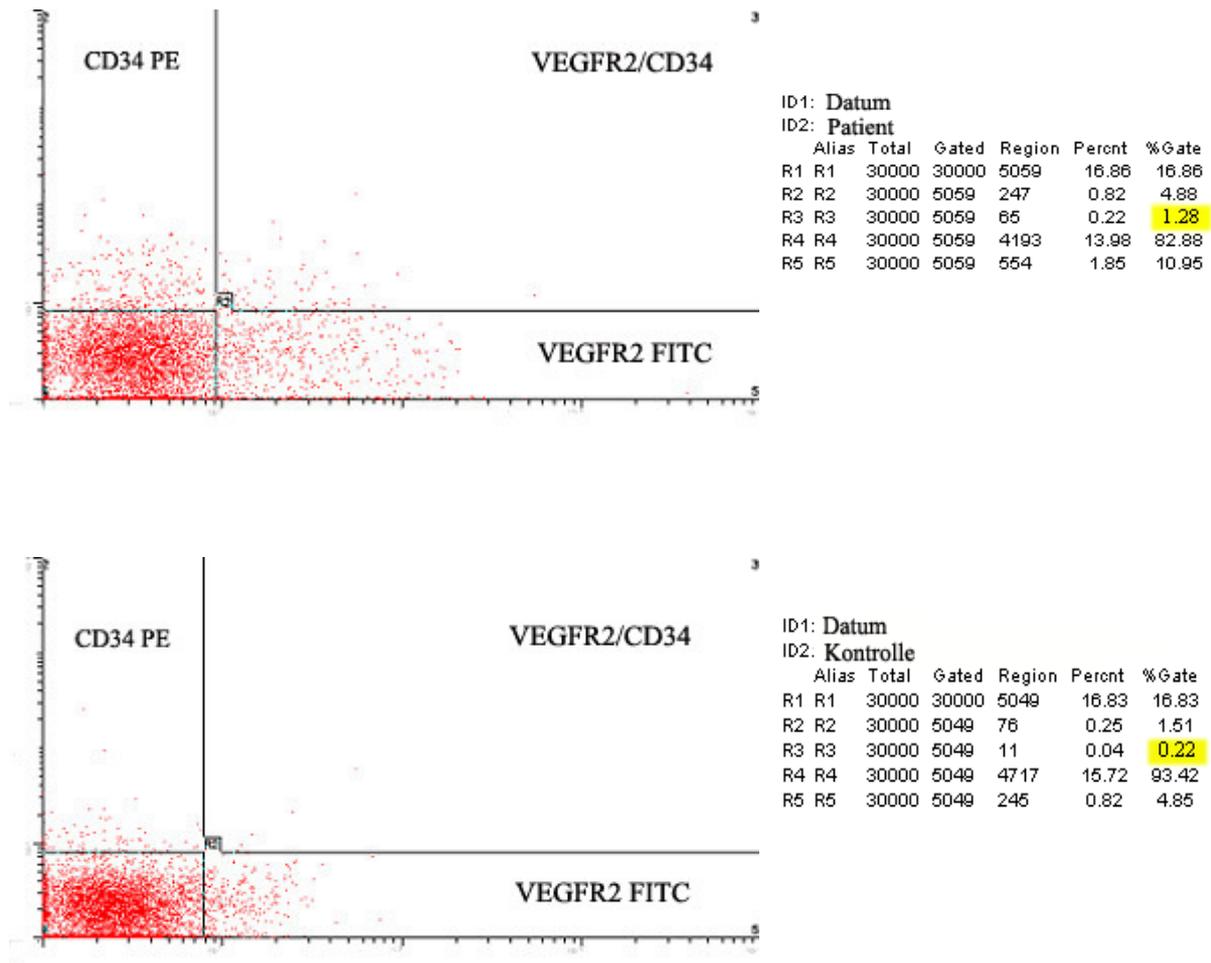


Abb. 26: Direkter Vergleich der FACS-Analyse von einer Karzinompatientin mit einer Probandin aus der Kontrollgruppe

In dieser Abbildung sind zum direkten Vergleich die FACS-Analyse einer Karzinompatientin (oben) sowie einer Probandin aus der Kontrollgruppe (unten) dargestellt. Rechts neben den Diagrammen ist die zugehörige Statistik abgebildet. Die gelb unterlegten Zahlen geben den prozentualen Anteil der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen der im Gate eingeschlossenen Zellpopulation an.

4.1.2 Statistische Auswertung der extrazellulären Mehrfachmarkierung mit CD34 und VEGFR2 Antikörpern

4.1.2.1 Erklärung der Boxplot-Darstellungen

Um die nachfolgenden Boxplot-Darstellungen verständlicher zu machen, ist in den unten gezeigten Abbildungen die verwendete Symbolik beispielhaft beschrieben. Die Quantilen sind dabei im linken Schaubild mit roter Farbe, Mittelwerte und Standardabweichungen im rechten Schaubild mit blauer Farbe erläutert.

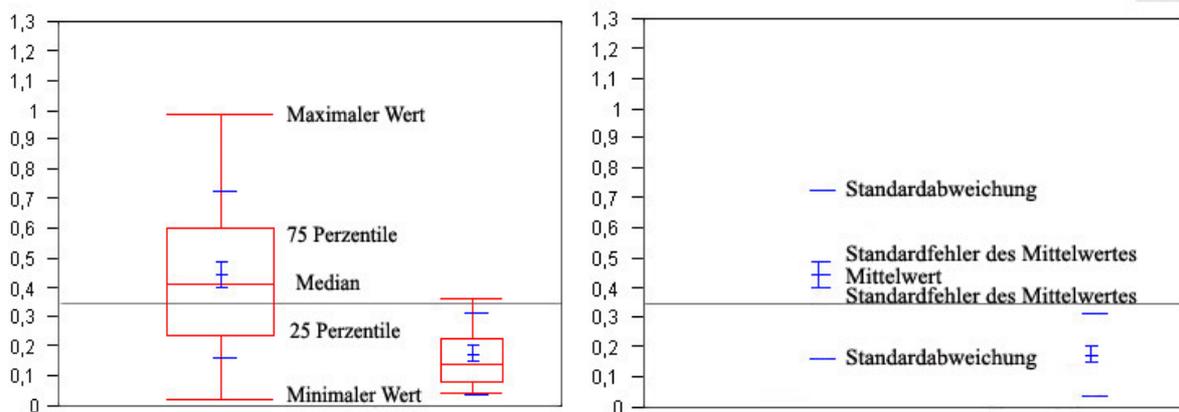


Abb. 27: Erklärung der Boxplot-Darstellungen

4.1.2.2 Vergleich der Diagnose mit dem Anteil der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im peripheren Blut

Zunächst wurde der in den drei Hauptgruppen bestimmte Anteil der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen miteinander verglichen. Die Mittelwerte der drei Kollektive unterschieden sich dabei signifikant voneinander ($p < 0,0001$ zwischen Kontrollgruppe und Karzinompatientinnen, $p = 0,0073$ zwischen der Patientengruppe mit einer benignen Brustdrüsenerkrankung und den Karzinompatientinnen). Der Mittelwert in der Kontrollgruppe lag bei 0,175 %, in der Gruppe der Patientinnen mit einer malignen Brustdrüsenerkrankung bei 0,45 % und in der Patientengruppe mit einer benignen Brustdrüsenerkrankung bei 0,26 %. Ebenso deutlich wurde dieser Unterschied beim Vergleich des Median. Dieser lag in der Kontrollgruppe bei 0,135 %, in der Gruppe der Karzinompatientinnen bei 0,41 % und bei 0,27 % in der Gruppe der Patientinnen mit einer benignen Brustdrüsenerkrankung.

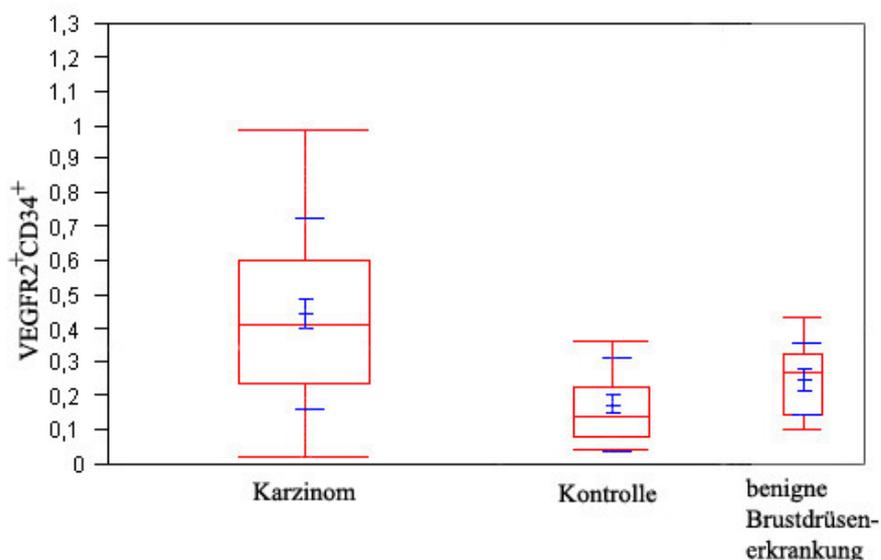


Abb. 28: Boxplot-Darstellung der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im Bezug zur Diagnose

In der Abbildung ist der prozentuale Anteil der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen an der mononukleären Zellpopulation auf der y-Achse gegen die drei Hauptgruppen auf der x-Achse aufgetragen.

Diagnose	Fallzahl	Median	Mittelwert	Standard- Abweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Kontrolle	28	0,135	0,175000	0,136721	0,02584
Benigne B.	12	0,27	0,258333	0,116059	0,03350
Karzinom	47	0,41	0,450638	0,278657	0,04065

Tab. 11: Statistik der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im Bezug zur Diagnose

4.1.2.3 Vergleich des histologischen Typs mit dem Anteil der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im peripheren Blut

Um zu untersuchen, inwieweit der histologische Typ des Mammakarzinoms den Anteil der endothelialen Vorläuferzellen im peripheren Blut beeinflusst, wurde die Gruppe der Karzinompatientinnen in die Subgruppen invasiv-duktales und invasiv-lobuläres unterteilt. Der Mittelwert in der Gruppe der Patientinnen mit einem invasiven duktalem Karzinom lag bei 0,44 % (Median 0,41 %) und in der Gruppe der Patientinnen mit einem invasiven lobulären Karzinom bei 0,51 % (Median 0,44 %). Dieser geringe Unterschied zwischen den beiden Subgruppen war nicht signifikant ($p=0,5$).

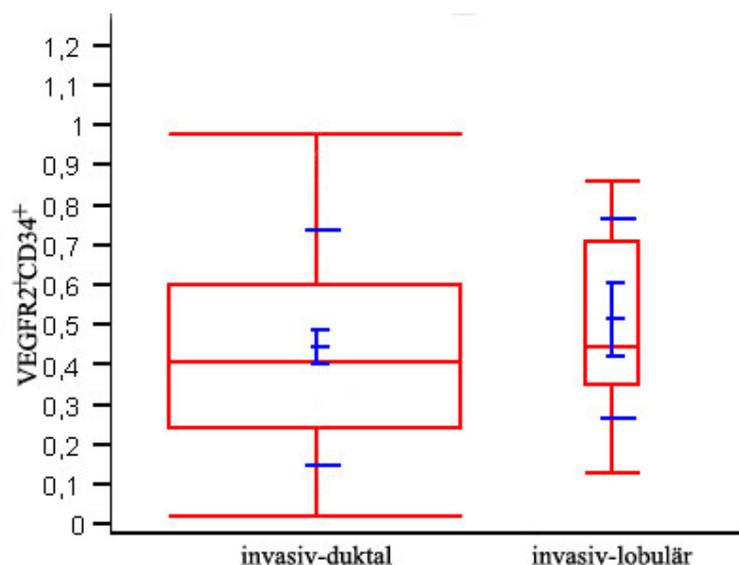


Abb. 29: Boxplot-Darstellung der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im Bezug zur Histologie

In der Abbildung ist der prozentuale Anteil der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen an der mononukleären Zellpopulation auf der y-Achse gegen die beiden histologischen Typen, invasiv-duktal und invasiv-lobulär, auf der x-Achse aufgetragen.

Histologie	Fallzahl	Median	Mittelwert	Standard- abweichung	Standardfehler des Mittelwertes
inv. duktal	40	0,41	0,443171	0,290228	0,04533
inv. lobulär	7	0,44	0,514286	0,250922	0,09484

Tab. 12: Statistik der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im Bezug zur Histologie

4.1.2.4 Vergleich der T-Stadien mit dem Anteil der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im peripheren Blut

Das T-Stadium der Karzinomerkkrankung ist ein Kriterium, nach welchem die Gruppe der Patientinnen mit einer malignen Brustdrüsenerkrankung weiter unterteilt wurde. Im Stadium T1 betrug der Mittelwert 0,36 %, im Stadium T2 0,49 %, im Stadium T3 0,66 % und im Stadium T4 0,39 %. Nur bei 3 Patientinnen war die Erkrankung bis in das T4-Stadium fortgeschritten. Der Mittelwert des Stadiums T1 unterschied sich dabei signifikant ($p=0,0476$) von den Tumorstadien, die mit einer weiter fortgeschrittenen Tumorerkrankung einhergehen. Auch im Vergleich der Mediane erkennt man deutlich den Unterschied zwischen dem Stadium T1 und den Stadien T2, T3 und T4. Im Stadium T1 lag dieser bei 0,35 %, im Stadium T2 bei 0,48 %, im Stadium T3 bei 0,51 % und im Stadium T4 bei 0,38 %.

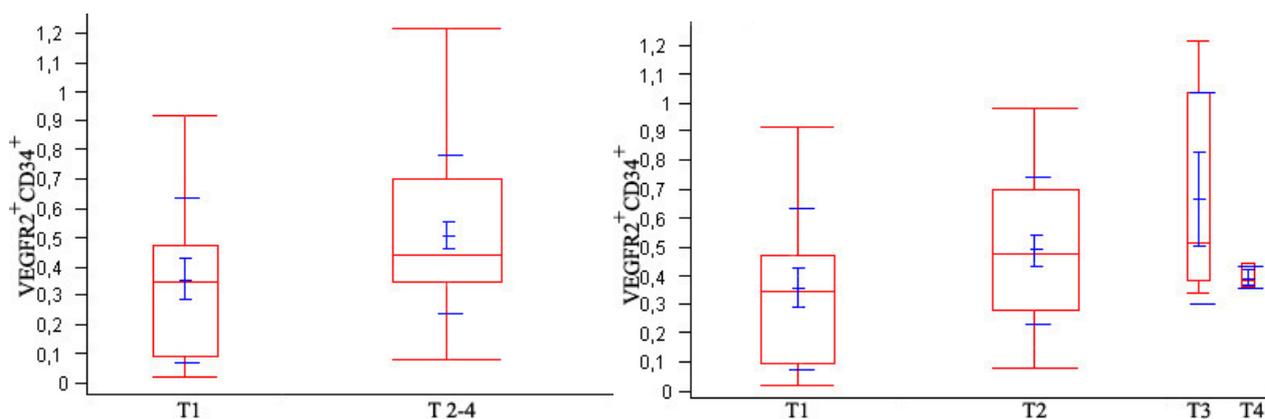


Abb. 30: Boxplot-Darstellung der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im Bezug zum T-Stadium

In den Abbildungen ist der prozentuale Anteil der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen an der mononukleären Zellpopulation auf der y-Achse gegen die T-Stadien auf der x-Achse aufgetragen. Dabei wird in der linken Abbildung der Unterschied zwischen dem Stadium T1 und den restlichen T-Stadien verdeutlicht, während in der rechten Abbildung alle 4 T-Stadien untereinander verglichen werden.

T-Stadium	Fallzahl	Median	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
x	1	0,35	0,350000		
1	17	0,35	0,357059	0,281686	0,06832
2	21	0,48	0,487619	0,258880	0,05649
3	5	0,51	0,668000	0,362174	0,16197
4	3	0,38	0,393333	0,041633	0,02404

Tab. 13: Statistik der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im Bezug zum T-Stadium

4.1.2.5 Vergleich des Lymphknotenstatus mit dem Anteil der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im peripheren Blut

Der Lymphknotenstatus war ein weiteres Kriterium, um die Gruppe der Karzinompatientinnen weiter zu unterteilen. Dies dient der Ermittlung des Einflusses einer lymphogenen Aussaat auf den Anteil der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im peripheren Blut. Zwar differierten die beiden Stadien N0 und N1 im Median (N0 0,385 %, N1 0,47 %), die Mittelwerte unterschieden sich aber nicht signifikant voneinander (N0 0,41 %, N1 0,52 %, $p=0,1445$).

Status	Fallzahl	Median	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
x	4	0,32	0,297500		
0	22	0,385	0,409545	0,288254	0,06146
1	21	0,47	0,522857	0,274466	0,05989

Tab. 14: Statistik der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im Bezug zum Lymphknotenstatus

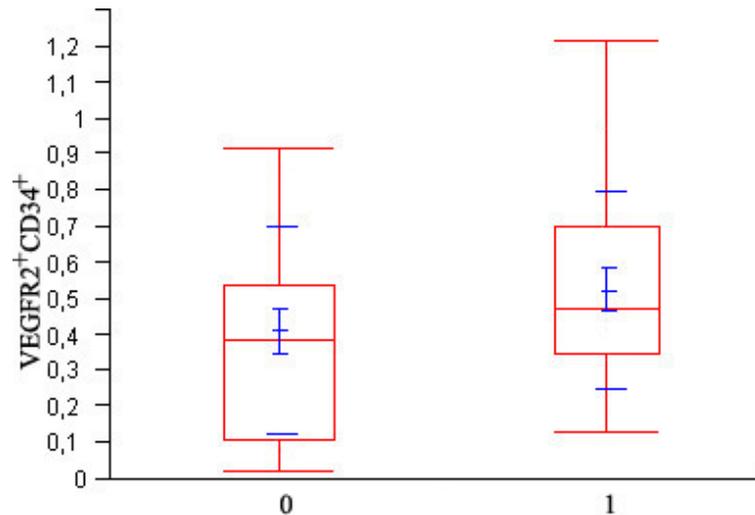


Abb. 31: Boxplot-Darstellung der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im Bezug zum Lymphknotenstatus

In der Abbildung ist der prozentuale Anteil der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen an der mononukleären Zellpopulation auf der y-Achse gegen den Lymphknotenstatus auf der x-Achse aufgetragen.

4.1.2.6 Vergleich des Östrogen-Rezeptorstatus mit dem Anteil der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im peripheren Blut

Um zu zeigen, ob ein positiver Östrogen-Rezeptorstatus eines malignen Tumors der Brustdrüse Einfluss auf die Freisetzung endothelialer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark besitzt, wurde die Gruppe der Karzinompatientinnen hinsichtlich dieser Fragestellung weiter unterteilt. Der Median (negativ 0,49 %, positiv 0,41 %) dieser Subgruppen als auch deren Mittelwerte (negativ 0,54 %, positiv 0,44 %) unterschieden sich allerdings kaum voneinander.

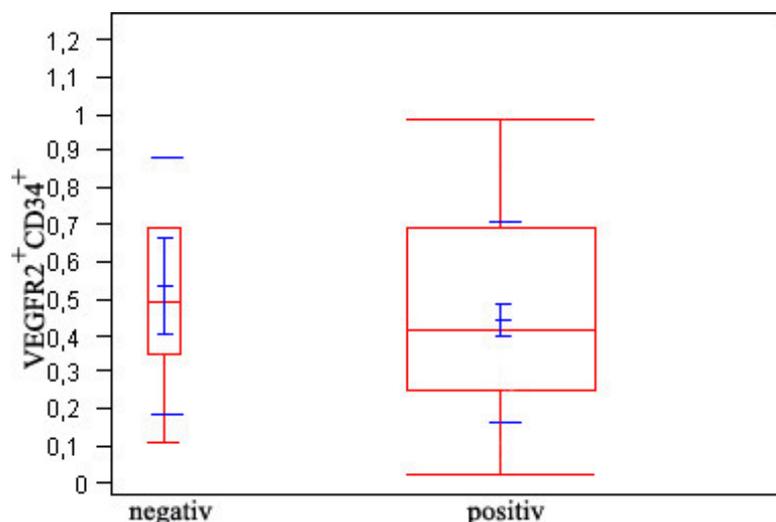


Abb. 32: Boxplot-Darstellung der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im Bezug zum Östrogen-Rezeptorstatus

In der Abbildung ist der prozentuale Anteil der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen an der mononukleären Zellpopulation auf der y-Achse gegen den Östrogen-Rezeptorstatus auf der x-Achse aufgetragen.

Status	Fallzahl	Median	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
negativ	7	0,49	0,535714	0,345005	0,13040
positiv	39	0,41	0,437692	0,271074	0,04341
nicht bestimmt	1	0,36	0,36		

Tab. 15: Statistik der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im Bezug zum Östrogen-Rezeptorstatus

4.1.2.7 Vergleich des HER-2-neu Rezeptorstatus mit dem Anteil der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im peripheren Blut

Bei jedem malignen Tumor der Brustdrüse wurde neben dem Östrogen-Rezeptorstatus auch der HER-2-neu Rezeptorstatus bestimmt. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Überexpression des HER-2-neu Rezeptors und dem Anteil der endothelialen Vorläuferzellen im peripheren Blut nachzuweisen, wurde die Gruppe der Karzinompatientinnen nach dem Grad der Expression weiter unterteilt. Ab dem Grad +2 geht man dabei von einer Überexpression aus. Die Mediane (Grad +1 0,41 %, Grad +2 0,64 %, Grad +3 0,41 %) und Mittelwerte (Grad +1 0,44 %, Grad +2 0,64 %, Grad +3 0,47 %) unterschieden sich zwar geringfügig voneinander, ließen aber nicht die Schlussfolgerung zu, dass eine Überexpression der HER-2-neu Rezeptors den Anteil der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im peripheren Blut beeinflusst.

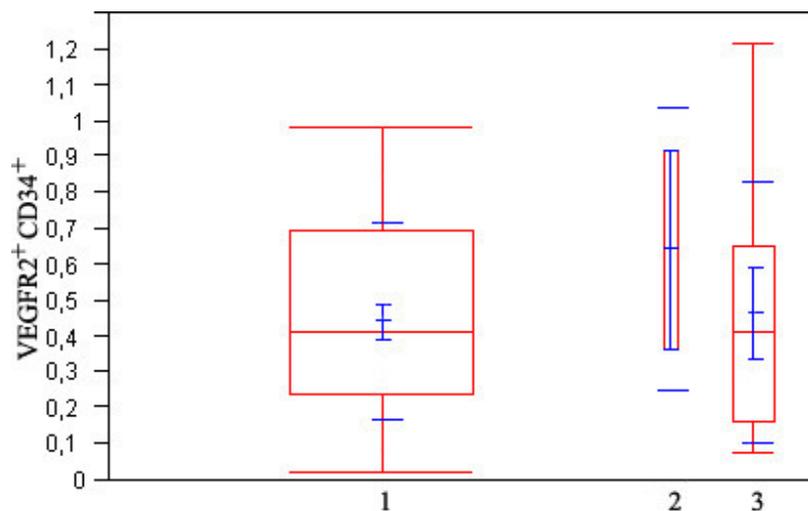


Abb. 33: Boxplot-Darstellung der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im Bezug zum HER-2-neu-Rezeptorstatus

In der Abbildung ist der prozentuale Anteil der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen an der mononukleären Zellpopulation auf der y-Achse gegen den HER-2-neu Rezeptorstatus auf der x-Achse aufgetragen.

Status	Fallzahl	Median	Mittelwert	Standard- abweichung	Standardfehler des Mittelwertes
+1	33	0,41	0,439697	0,273216	0,04756
+2	2	0,64	0,640000	0,395980	0,28000
+3	8	0,41	0,465000	0,365943	0,12938
nicht bestimmt	4	0,415	0,417500		

Tab. 16: Statistik der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im Bezug zum HER-2-neu-Rezeptorstatus

4.1.2.8 Vergleich des Menopausestatus mit dem Anteil der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im peripheren Blut

Um herauszufinden, inwiefern sich der Menopausenstatus auf das Messergebnis der im peripheren Blut bestimmten endothelialen Vorläuferzellen auswirkte, wurden die Hauptgruppen in die Subgruppen prä-, peri- und postmenopausal weiter unterteilt. Innerhalb der Kontrollgruppe schwankte der Mittelwert zwischen 0,14 % und 0,22 % (Median 0,13 % - 0,22 %), in der Gruppe der Patientinnen mit einer benignen Brustdrüsenerkrankung zwischen 0,26 % und 0,29 % (Median 0,26 % - 0,28 %) und innerhalb der Gruppe der Karzinompatientinnen zwischen 0,41 % und 0,49 % (Median 0,395 % - 0,485 %). Wie man anhand dieser Daten erkennen kann, schwanken die Mittelwerte und Mediane innerhalb der drei Hauptgruppen nur geringfügig. Somit zeigt sich, dass der Status der Menopause keinen Einfluss auf die Freisetzung endothelialer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark besitzt.

Diagnose	Status der Menopause	Fallzahl	Median	Mittelwert	Standard- abweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Kontrolle	prä	16	0,13	0,140714	0,085437	0,02283
	peri	1	0,22	0,220000		
	post	11	0,115	0,185000		
Benigne B.	prä	3	0,28	0,290000	0,036056	0,02082
	post	9	0,26	0,258182	0,122867	0,03705
Karzinom	prä	6	0,485	0,493333	0,228444	0,09326
	peri	1	0,41	0,410000		
	post	40	0,395	0,445250		

Tab. 17: Statistische Auswertung vom Einfluss der Menopause auf die Anzahl der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im peripheren Blut

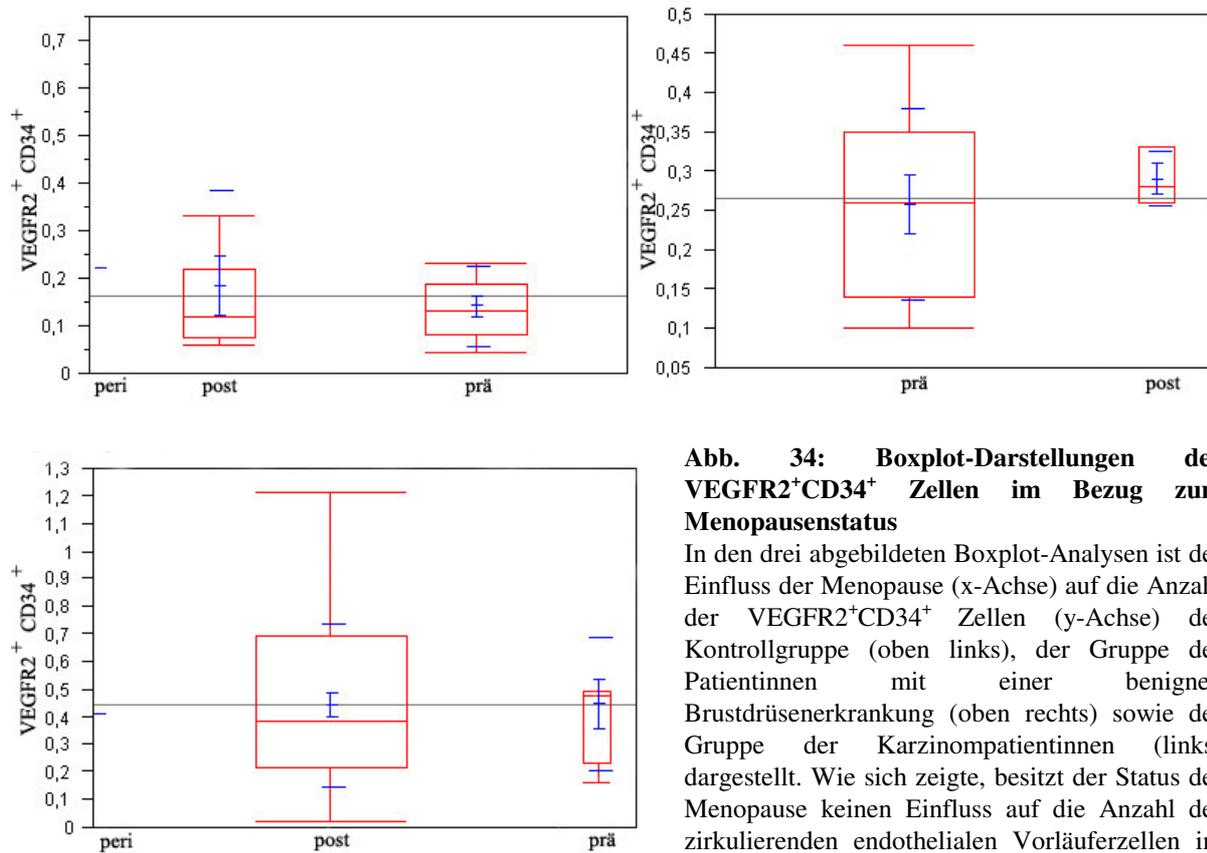


Abb. 34: Boxplot-Darstellungen der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im Bezug zum Menopausenstatus

In den drei abgebildeten Boxplot-Analysen ist der Einfluss der Menopause (x-Achse) auf die Anzahl der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen (y-Achse) der Kontrollgruppe (oben links), der Gruppe der Patientinnen mit einer benignen Brustdrüsenerkrankung (oben rechts) sowie der Gruppe der Karzinompatientinnen (links) dargestellt. Wie sich zeigte, besitzt der Status der Menopause keinen Einfluss auf die Anzahl der zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen im peripheren Blut.

4.1.2.9 Intraindividuelle Verlaufsbeobachtung

Bei 8 Patientinnen wurden die VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im präoperativem Stadium und zu verschiedenen postoperativen Zeitpunkten bestimmt, um den Anteil dieser Zellen im Verlauf der Erkrankung zu beurteilen. Wie man in der folgenden Tabelle und Abbildung erkennen kann ist bei allen Patientinnen schon kurze Zeit nach der Entfernung des Tumors der Anteil der VEGFR2⁺CD34⁺ Zellen im peripheren Blut gefallen. Bis auf eine Patientin (Nr. 8), deren Werte noch im Sinken begriffen waren, sind alle unter die 90. Perzentile der Kontrollgruppe gefallen.

Intraindividuellder Verlauf

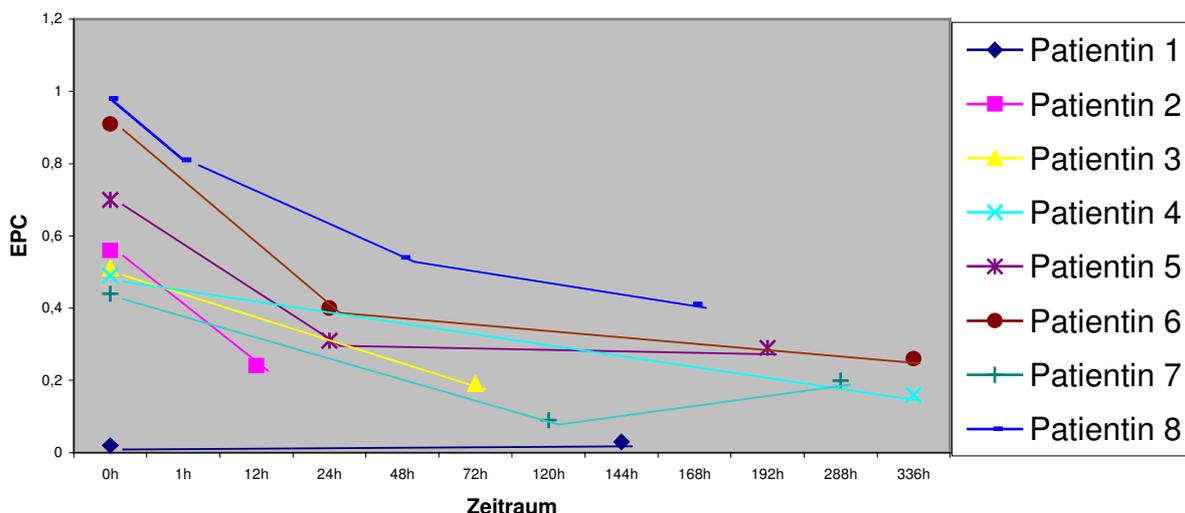


Abb.35: Darstellung der intraindividuellen Verläufe

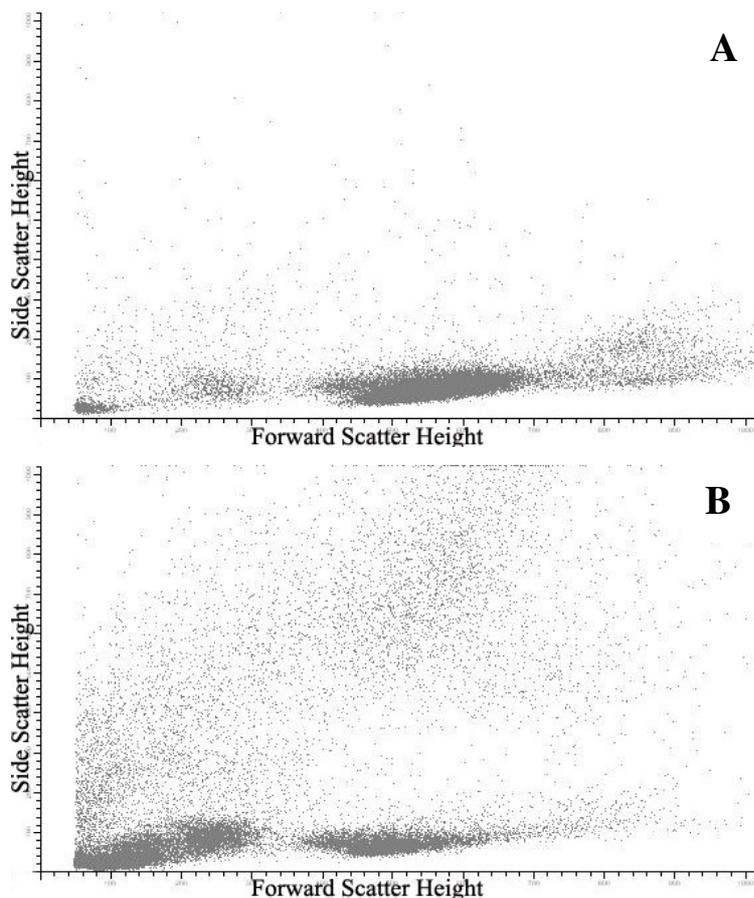
Patientin	Diagnose	1. Entnahme	2. Entnahme	3. Entnahme	4. Entnahme
1	Invasiv- duktal	prä-OP: 0,02 %	6d post-OP: 0,03 %		
2	Invasiv- duktal	prä-OP: 0,56 %	12h post-OP: 0,24 %		
3	Invasiv- duktal	prä-OP: 0,51 %	3d post-OP: 0,19 %		
4	Invasiv- duktal	prä-OP: 0,49 %	14d post-OP: 0,16 %		
5	Invasiv- duktal	prä-OP: 0,7 %	24h post-OP: 0,31 %	8d post-OP: 0,29 %	
6	Invasiv- duktal	prä-OP: 0,91 %	24h post-OP: 0,4 %	14d post-OP: 0,26 %	
7	Invasiv- lobulär	prä-OP: 0,44 %	5d post-OP: 0,09 %	12d post-OP: 0,2 %	
8	Invasiv- duktal	prä-OP: 0,98 %	1h post-Op: 0,81 %	48h post-OP: 0,54 %	7d post-OP: 0,41 %

Tab. 18: Intraindividuelle Verlaufsbeobachtung

4.1.3 Auswertung der durchflußzytometrischen Bestimmung der CD133⁺CD34⁺ Zellen

4.1.3.1 Darstellung der CD133⁺CD34⁺ Zellen innerhalb der mononukleären Zellfraktion

Aufgrund der geringen Anzahl dieser Zellen im peripheren Blut erwies sich eine Charakterisierung mittels extrazellulärer Mehrfach-Markierung im Vollblut als unzureichend. Um diese Zellpopulation also bestimmen zu können, mussten die mononukleären Zellen aus dem Vollblut isoliert werden. Hierfür wurden zwei Verfahren miteinander verglichen, deren beider Prinzip auf den Dichtegradienten der einzelnen Komponenten basiert. Die Isolation durch die Verwendung von Ficoll (Seromed, Dichte 1,077) erwies sich dabei als sehr zeitaufwendig und war mit einem hohen Zellverlust, im Vergleich zu der Isolierung mit Hilfe von Polymorph-Prep (Nycomed, Deutschland), verbunden. In der FACS-Analyse zeigte aber das Isolationsverfahren mittels Ficoll die besseren Ergebnisse, weshalb bei den kommenden Versuchen darauf zurückgegriffen wurde (siehe Abb. 36A: Auftrennung mittels Ficoll, siehe Abb. 36B: Auftrennung mittels Polymorph-Prep).



A

Abb. 36: Typisches Bild von FACS-Analysen nach der Auftrennung des Vollblutes

A: Auftrennung mittels Ficoll

B: Auftrennung mittels Polymorph-Prep

Die Auftrennung des Vollblutes erfolgte über den Dichtegradienten. Dabei wurde das Vollblut über eine Flüssigkeitssäule aus Ficoll (Seromed, Dichte 1,077) oder Polymorph-Prep (Nycomed) geschichtet und anschließend zentrifugiert. Nach der Zentrifugation kam es durch die unterschiedliche Dichte der einzelnen Komponenten zu einer Schichtung. Nach der erfolgten Auftrennung wurde die Interphase, welche Lymphozyten und Monozyten enthält, entnommen und in mehreren Waschschrinen gereinigt.

B

Nach der Isolierung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut wurden die CD34⁺ Vorläuferzellen mittels Positivselektion durch magnetisch konjugierten Antikörper separiert. Im Anschluss daran erfolgte die Oberflächenmarkierung mit dem 2. Antikörper (CD133, Miltenyi Biotech GmbH, D).

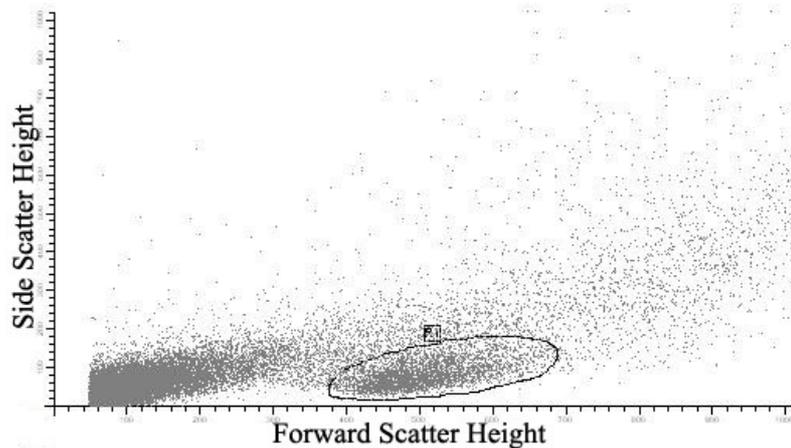


Abb. 37: Eingrenzung der CD34⁺ Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation

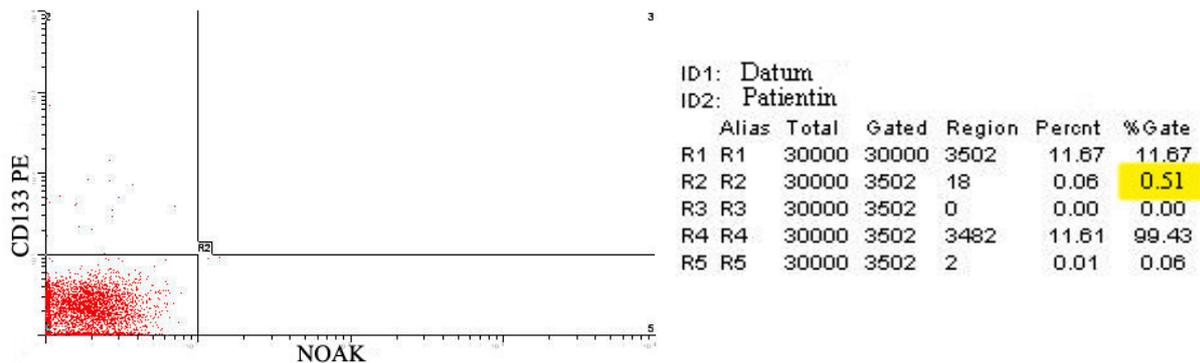


Abb. 38: FACS-Analyse der CD34⁺CD133⁺ Zellen bei einer Karzinompatientin

In dieser Abbildung ist die FACS-Analyse des CD34⁺CD133⁺ Zellanteils innerhalb der mononukleären Zellfraktion bei einer Karzinompatientin beispielhaft dargestellt. Rechts neben dem Diagramm ist die zugehörige Statistik abgebildet. Die gelb unterlegte Zahl gibt den prozentualen Anteil der CD34⁺CD133⁺ Zellen der im Gate (siehe Abb. 37) eingeschlossenen Zellpopulation an.

4.1.3.2 Statistische Auswertung des CD34⁺CD133⁺ Zellanteils innerhalb der mononukleären Zellfraktion

In der Gruppe der Karzinompatienten machten die CD34⁺CD133⁺ Zellen 0,1 - 0,69 % aus. Im Vergleich dazu lag der Schwankungsbereich in der Kontrollgruppe zwischen 0,13 und 0,23 %. Die Mittelwerte dieser beiden Gruppen unterschieden sich zwar voneinander (Karzinomgruppe

0,31, Kontrollgruppe 0,19), der Unterschied war aber nicht signifikant (t-Test $p > 0,73$, χ^2 -Test $p > 0,69$). Der Median war mit 0,2 % in beiden Gruppen gleich groß.

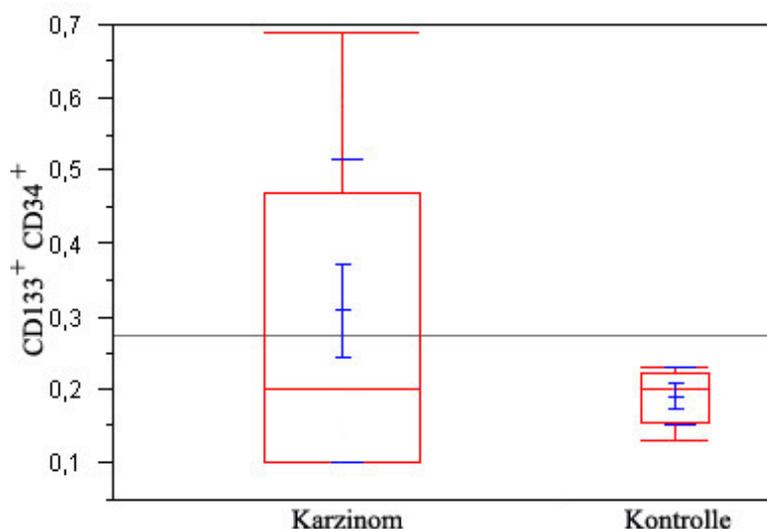


Abb. 39: Boxplot-Darstellungen der CD34⁺CD133⁺ Zellen im Bezug zur Diagnose

In dieser Abbildung ist der prozentuale Anteil der CD133⁺CD34⁺ Zellen an der mononukleären Zellpopulation auf der y-Achse gegen die Karzinom- und Kontrollgruppe auf der x-Achse aufgetragen. Man erkennt deutlich, dass es keinen signifikanten Unterschied im Median beider Kollektive gibt. Er liegt in beiden Gruppen bei 0,2.

Diagnose	Fallzahl	Median	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Kontrolle	5	0,2	0,192000	0,039623	0,01772
Karzinom	11	0,2	0,309091	0,207820	0,06266

Tab. 19: Statistische Auswertung des CD34⁺CD133⁺ Zellenanteil im peripheren Blut im Bezug zur Diagnose

4.1.4 Auswertung der durchflußzytometrischen Bestimmung des von Willebrand Faktors

Um zu zeigen, dass die in dieser Arbeit durch Oberflächenmarkierung identifizierten zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen tatsächlich zu Endothelzellen differenzieren, wurden diese für 3 Wochen kultiviert. Nach dieser Zeit haben diese Zellen ihre Vorläufereigenschaften verloren und konnten mit dem endothelzellspezifischen von Willebrand Faktor (Faktor VIII) nachgewiesen werden. Verwendet wurde dazu die Biotin-Streptavidin-Methode.

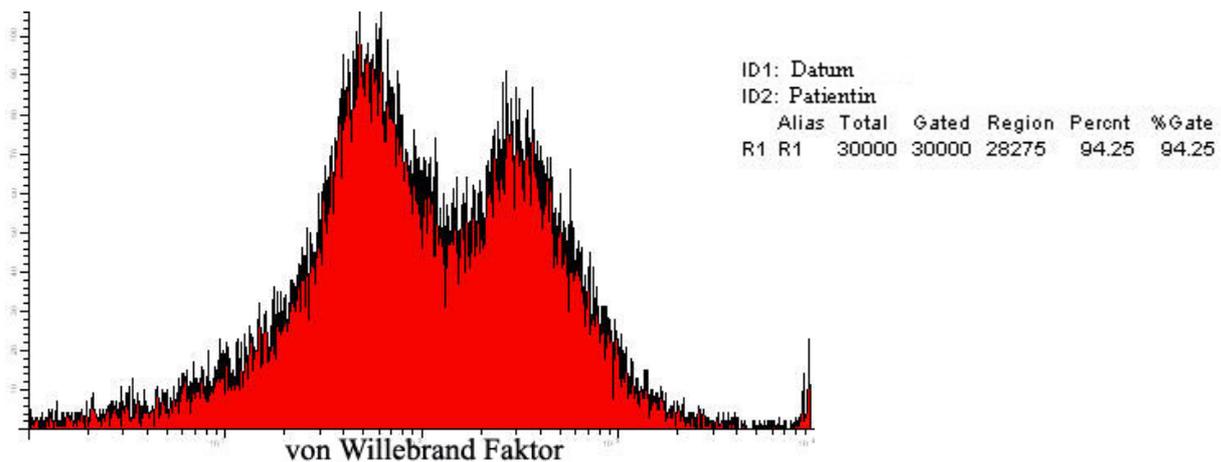


Abb. 40: FACS-Analyse der vWF⁺ Zellen nach 3 Wochen Zellkultur

Ein typischer Marker für ausdifferenzierte Endothelzellen ist unter anderem der von Willebrand Faktor. Nach der Isolation der CD34⁺ Zellen wurden diese für 3 Wochen kultiviert. Das Kulturmedium enthielt spezifische Wachstumsfaktoren (u.a. VEGF, FBS, EGF), welche das Wachstum endothelialer Zellen unterstützen. Die Oberfläche der Kulturflaschen wurde mit Fibronectin beschichtet, auf welchem die EPC's anhaften konnten. Nach diesem Zeitraum hatten die Zellen ihre Vorläufereigenschaften verloren und waren zu Endothelzellen differenziert. In der nebenstehenden Tabelle kann man erkennen, dass 94,25 % der gemessenen Zellen den vWF exprimierten.

Mit der in Abb. 40 exemplarisch dargestellten FACS-Analyse der durchflusszytometrischen Bestimmung des von Willebrand Faktors wurde gezeigt, dass die aus dem Knochenmark stammenden endothelialen Vorläuferzellen sich nach 3wöchiger Kultivierung zu ausdifferenzierten Endothelzellen entwickelten.

4.2 Fluoreszenzmikroskopie

4.2.1 Identifizierung der Endothelzellen durch die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten acetylierten LDL

Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung von Identität und Reinheit der Zellkultur bietet die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der LDL-Aufnahme durch die Endothelzellen. Dafür wurden die Kulturansätze, wie unter 3.7. beschrieben, mit Dil-Ac-LDL inkubiert. Dieses wurde von den Endothelzellen über die LDL-Rezeptoren internalisiert, durch lysosomale Enzyme degradiert und der Fluoreszenzfarbstoff Dil in der intrazellulären Membran angehäuft. Durch den Vergleich von Fluoreszenz- und lichtmikroskopischer Aufnahme (siehe Abb.41) konnte gezeigt werden, dass die Kultur nicht mit glatten Muskelzellen oder Fibroblasten kontaminiert war.

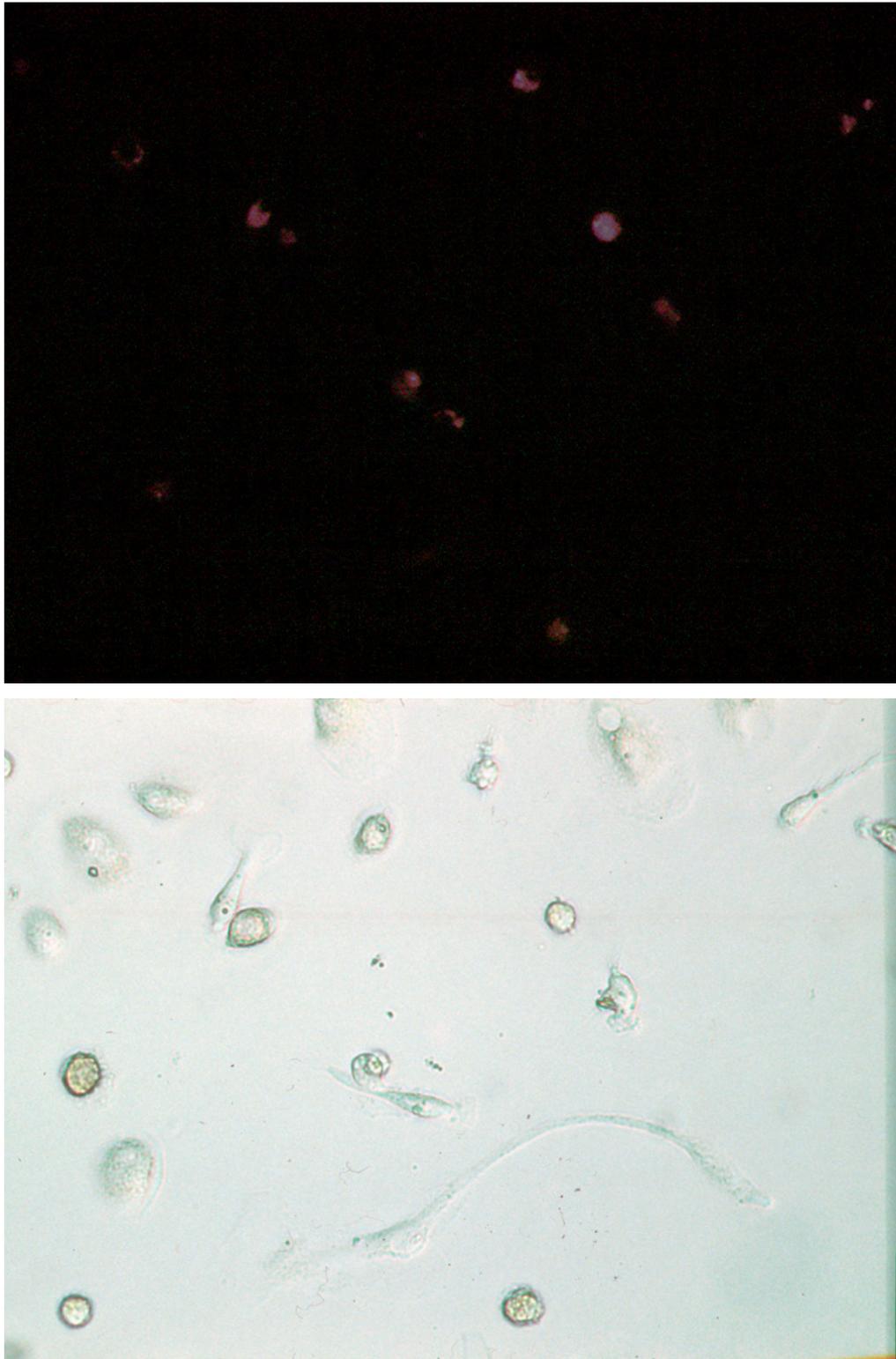


Abb.41: Fluoreszenzaufnahme (oben) und lichtmikroskopische Aufnahme (unten) einer mit Dil-Ac-LDL gefärbten Zellkultur

Beide Aufnahmen erfolgten bei 20facher Vergrößerung. Durch den Vergleich beider Aufnahmen kann man erkennen, dass jede abgebildete Zelle den fluoreszierenden Farbstoff in ihrer intrazellulären Membran angereichert hat. Dadurch sind Kontaminationen mit z.B. glatten Muskelzellen oder Fibroblasten ausgeschlossen, da diese Zellen keine LDL-Rezeptoren besitzen.

4.3 Elisa

Es wurden die Serumkonzentrationen des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und des basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) von 37 Probanden durch eine Doppelbestimmung ermittelt. Davon litten 25 Probandinnen unter einer malignen Erkrankung der Brustdrüse, 4 unter einer benignen Erkrankung der Brustdrüse und 8 Probandinnen bildeten die Kontrollgruppe.

4.3.1 Auswertung der quantitative Bestimmung des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) im Serum

Bei der Auswertung der VEGF-Serumkonzentrationen zeigte sich eine ausgeprägte Streubreite (Range 1,2 - 763,8 pg/ml), welche auch innerhalb der Hauptgruppen nachgewiesen werden konnte. So waren Einzelwerte innerhalb der Kontrollgruppe in einem Bereich von 5 bis 593 pg/ml messbar. Innerhalb der Gruppe mit den malignen Tumoren lag dieser Streubereich zwischen 1,2 - 764 pg/ml und in der Gruppe mit den benignen Brustdrüsenerkrankungen zwischen 8,8 - 120 pg/ml. Trotzdem war ein signifikanter Unterschied ($p=0,0289$) zwischen dem Mittelwerten der Kontrollgruppe (98 pg/ml, Median 30 pg/ml) und der Gruppe mit den malignen Brustdrüsentumoren (156 pg/ml, Median 94 pg/ml) feststellbar. Keine Korrelation ($p=0,219$) war dagegen zwischen der Menge der endothelialen Vorläuferzellen im peripheren Blut und der VEGF-Serumkonzentration nachweisbar.

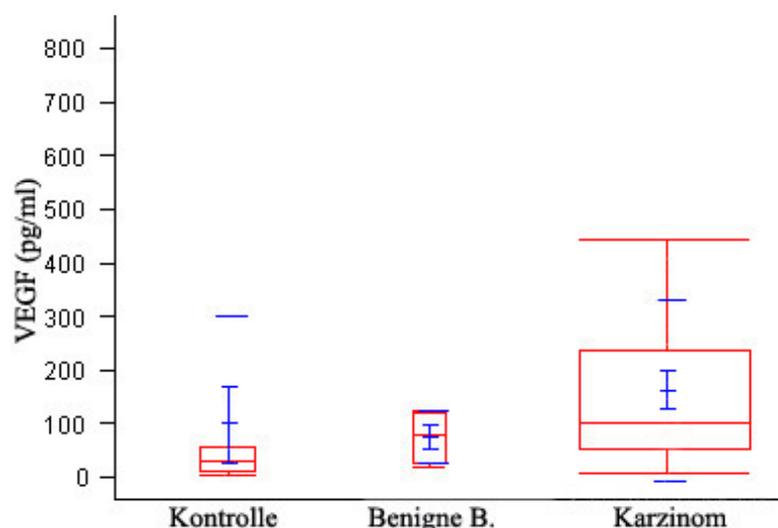


Abb. 42: Boxplot-Darstellungen der VEGF-Serumkonzentration auf der y-Achse im Vergleich der Hauptgruppen auf der x-Achse

Diagnose	Fallzahl	Median	Mittelwert	Standard- abweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Kontrolle	8	30,139	97,681	200,928	71,039
Benigne B.	4	76,81	70,493	49,819	24,910
Karzinom	25	94,42	155,558	171,775	34,355

Tab. 20: Statistische Auswertung der VEGF-Serumkonzentration im Bezug zur Diagnose

4.3.2 Auswertung der quantitative Bestimmung des basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) im Serum

Die Streubreite der bFGF-Serumkonzentration lag im gesamten Patientenkollektiv zwischen 0,17 - 30,96 pg/ml. Die Einzelwerte innerhalb der Kontrollgruppe lagen in einem Streubereich von 1,9 bis 7 pg/ml. Innerhalb der Gruppe mit den malignen Tumoren waren sie in einem Bereich zwischen 0,2 - 31 pg/ml und in der Gruppe mit den benignen Brustdrüsenerkrankungen zwischen 4,6 - 15,7 pg/ml messbar. Es ließen sich weder zwischen den Mittelwerten der Kontrollgruppe (3,7 pg/ml, Median 3,1 pg/ml) und der Gruppe mit den benignen Brustdrüsentumoren (8,5 pg/ml, Median 6,9 pg/ml) oder der Gruppe mit den malignen Brustdrüsentumoren (9,1 pg/ml, Median 9,5 pg/ml) signifikante Unterschiede feststellen. Ebenso wenig war eine Korrelation ($p=0,2265$) zwischen der Menge der endothelialen Vorläuferzellen im peripheren Blut und der bFGF-Serumkonzentration nachweisbar.

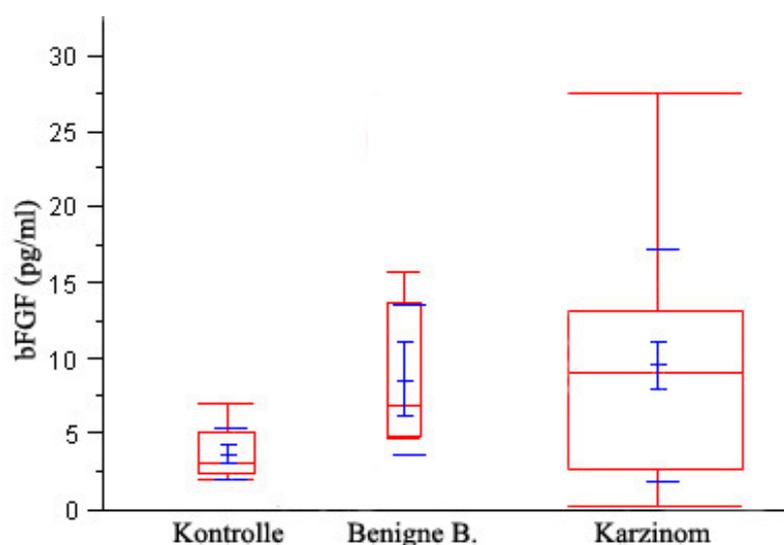


Abb. 43: Boxplot-Darstellungen der bFGF-Serumkonzentration auf der y-Achse im Vergleich der Hauptgruppen auf der x-Achse

Diagnose	Fallzahl	Median	Mittelwert	Standard- abweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Kontrolle	8	3,105	3,68500	1,72663	0,6105
Benigne B.	4	6,905	8,53500	4,96523	2,4826
Karzinom	25	9,06	9,49440	7,65784	1,5316

Tab. 21: Statistische Auswertung der bFGF-Serumkonzentration im Bezug zur Diagnose

4.3.3 Vergleich von bFGF- und VEGF-Serumkonzentration

Um zu untersuchen, ob Zusammenhänge zwischen den Konzentrationen des basic Fibroblast Growth Factor und des Vascular Endothelial Growth Factor im Serum existieren, wurde der Spearmansche Rang-Korrelationskoeffizient bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Konzentrationen beider Faktoren im peripheren Blut nicht miteinander korrelieren ($p=0,1323$).