

Aus dem Medizinischen Zentrum für
Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Boris A. Stuck
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Einsatz digitaler Bildanalyse
zur Unterscheidung
vaskulärer Anomalien im Kopf-Hals-Bereich**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Jovine Ehrenreich

aus Göttingen

Marburg, 2019

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
15. April 2019

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Helmut Schäfer

Referent: apl. Prof. Dr. med. Robert Mandić

1. Korreferent: Prof. Dr. med. Dipl.-Psych. Benjamin Straube

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Vaskuläre Tumoren	3
1.1.1 Benigne Formen	3
1.1.1.1 Hämangiome	3
1.1.1.2 Granuloma pyogenicum	5
1.1.2 Lokal aggressive oder borderline vaskuläre Tumoren.....	5
1.1.2.1 Hämangioendotheliome.....	5
1.1.2.2 Kaposi-Sarkom.....	8
1.1.3 Maligne vaskuläre Tumoren.....	10
1.1.3.1 Angiosarkome.....	10
1.1.3.2 Epitheloide Hämangioendotheliome	10
1.2 Vaskuläre Malformationen	11
1.2.1 Einfache Formen.....	12
1.2.1.1 Kapilläre Malformationen.....	12
1.2.1.2 Venöse Malformationen.....	12
1.2.1.3 Lymphatische Malformationen (Lymphangiome).....	14
1.2.1.4 Arteriovenöse Malformationen.....	15
1.2.1.5 Arteriovenöse Fisteln.....	18
1.2.2 Kombinierte bzw. gemischte vaskuläre Malformationen	18
1.2.3 Paragangliome (Glomustumore).....	19
1.2.4 Anomalien der großen Gefäße.....	19
1.3 Probleme der korrekten Klassifizierung von Gefäßfehlbildungen	20
1.4 Zielsetzung	21
2. Material	22
2.1 Patientengewebe.....	22
2.2 Patientenkollektiv.....	22
2.2.1 Kontrollgewebe	25
2.3 Chemikalien.....	26
2.4 Puffer und Lösungen	27
2.5 Antikörper	27
2.5.1 Primärantikörper	27
2.5.2 Sekundärantikörper.....	27

2.6 Geräte.....	28
2.7 Software und Programme.....	29
3. Methoden	29
3.1 Immunhistochemische Nachweismethoden.....	29
3.1.1 Einsatz der (Strept)Avidin-Biotin-Methode in der Immunhistochemie.....	30
3.1.2 Vorbereitung des Gewebes für die immunhistochemische Färbung	32
3.1.2.1 Gewebefixierung und Paraffineinbettung.....	32
3.1.2.2 Herstellung von Schnittpräparaten	33
3.1.2.3 Entparaffinierung, Rehydrierung und Demaskierung.....	33
3.1.2.4 Inkubation des Primär- und Sekundärantikörpers und Auftragung des Chromogens.....	33
3.1.3 Positiv- und Negativkontrollen.....	34
3.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	35
3.2.1 Fotodokumentation	35
3.2.2 Digitale Bildanalyse.....	35
3.3 Auswertung der digital ermittelten Messwerte	40
3.4 Statistik und Darstellung der Ergebnisse	41
4. Ergebnisse	43
4.1 Expression der Kandidatenproteine in Gefäßmalformationen	43
4.1.1 CD31.....	43
4.1.2 CD34.....	44
4.1.3 Claudin 5 (CLDN5).....	45
4.1.4 Podoplanin (PDPN).....	46
4.1.5 Vimentin (VIM)	47
4.2 Digitale Quantifizierung der DAB-Signale, Darstellung der Kandidatenproteinexpression und der AK-Signalwert-Quotienten.....	48
4.2.1 Lymphangiome	48
4.2.2 Arteriovenöse Malformationen	53
4.2.3 Hämangiome.....	57
4.2.4 Vaskuläre Malformationen (n.n.kl.).....	61
4.2.5 Venöse Malformationen	65
4.2.6 Granuloma pyogenicum.....	69

4.2.7 Paragangliome	73
4.2.8 Kontrollgewebe	77
4.3 Übersicht zu Unterschieden der AK-Signalwert-Quotienten in den untersuchten Geweben.....	81
5. Diskussion	86
5.1 Expression der Kandidatenproteine.....	87
5.1.1 CD31.....	87
5.1.2 CD34.....	88
5.1.3 Claudin 5.....	90
5.1.4 Podoplanin	91
5.1.5 Vimentin	93
5.2 Expression der Gefäßmarker in verschiedenen Gefäßmalformationen ...	95
5.2.1 Lymphangiome	95
5.2.2 Arteriovenöse Malformationen	96
5.2.3 Hämangiome.....	97
5.2.4 Vaskuläre Malformationen (n.n.kl.).....	98
5.2.5 Venöse Malformationen	99
5.2.6 Granuloma pyogenicum.....	100
5.2.7 Paragangliome.....	101
5.2.8 Kontrollgewebe	102
5.3 Betrachtung signifikanter AK-Signal-Quotienten zur Unterscheidung vaskulärer Anomalien.....	104
6. Zusammenfassung	106
7. Summary	106
8. Literaturverzeichnis	110
9. Anhang.....	128
9.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer	128
9.2 Danksagung	129

Abkürzungsverzeichnis

ABC	(Strept)Avidin-Biotin Complex
a.d.	Aqua destillata
AK	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis of variance)
AS	Angiosarkom
AVM	Arteriovenöse Malformationen
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAT#	catalogue number
CBBMR	Comprehensive Biomaterial Bank Marburg
CD31	Cluster of differentiation 31 = PECAM-1
CD34	Cluster of differentiation 34 = Marker endothelialer Vorläuferzellen
CD133	Cluster of differentiation 133 = Prominin-1, Marker hämatopoetischer Stammzellen und endothelialer Vorläuferzellen
CLDN5	Claudin 5
CLOVE	congenital lipomatous overgrowth, vascular malformations, epidermal nevi
CT	Computertomographie
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
et al.	et alterii „und die jeweils anderen“
EHE	epitheloides Hämangioendotheliom
FFPE	formaldehyde-fixed paraffin-embedded tissue
ggf.	gegebenenfalls
GP	Granuloma pyogenicum
Häm	Hämangiom
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin

HCl	Chlorwasserstoff / Salzsäure
HHV-1	Humanes Herpesvirus 1
HHV-8	Humanes Herpesvirus 8
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	horseradish- (Meerrettich) Peroxidase
IHC	Immunhistochemie
ISSVA	International Society for the Study of Vascular Anomalies
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KHE	kaposiformes Hämangioendotheliom
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KM	kapilläre Malformation
KMS	Kasabach-Merritt-Syndrom
Kon	Kontrollen
KS	Kaposi-Sarkom
LA	Lymphangiom (= lymphatische Malformation)
LSAB	Labelled (Strept)Avidin-Biotin-Methode
mg	milligramm
min	Minute
M	Molar (mol/l)
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
MR-Angiographie	Magnetresonanzangiographie
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Nd:YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
n.n.kl.	nicht näher klassifiziert
OK-432	Sklerosant und Immunstimulans, (auch Picibanil)
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDPN	Podoplanin
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule = CD31

PELVIS	perineal hemangioma, external genitalia malformations, lipomyelomeningocele, vesicorenal abnormalities, imperforate anus, skin tag
PG	Paragangliom
pH	pondus Hydrogenii (Gewicht von Wasserstoff)
PHACES	posterior fossa anomalies, hemangiomas, arterial anomalies, cardiac anomalies, eye anomalies, sternal cleft and supraumbilical raphe syndrome
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
RGB	additiver Farbraum aus rot, grün und blau
RH	Retiformes Hämangioendotheliom
SEM	Standard Error of Mean
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
<i>TIE2</i>	Gen für einen Rezeptor der Tyrosinkinase Familie (= Angiopoietin-1 Rezeptor)
TMVCF	transmembrane protein deleted in velo-cardio-facial Syndrome
VA	Vaskuläre Anomalien
VeM	Venöse Malformation
VIM	Vimentin
VM	Vaskuläre Malformation
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Vereinfachte Darstellung der LSAB-Methode.....	32
Abbildung 2	Unbearbeitete Aufnahme der kapillären Malformation ...	36
Abbildung 3	Beispiel zur Festlegung des RGB-Farbeschwellenwertes	37
Abbildung 4	Einstellung des Farbschwellenwertes	37
Abbildung 5	Ergebnisse nach der Messung des weißen gewebefreien Bereichs im Präparat	38
Abbildung 6	Verwendete Einstellung in der " <i>IHC-Toolbox</i> ".....	38
Abbildung 7	Aufnahme des Präparates nach Isolierung des DAB-Signals mittels " <i>IHC-Toolbox</i> "	39
Abbildung 8	Aufnahme des rot markierten zu messenden Bereichs ..	39
Abbildung 9	Ergebnisse der Messung sowie Beispielrechnung zur Auswertung der digital ermittelten Messwerte	40
Abbildung 10	Säulendiagramm zur Darstellung der CD31-Expression in den untersuchten Geweben	43
Abbildung 11	Säulendiagramm zur Darstellung der CD34-Expression in den untersuchten Geweben	44
Abbildung 12	Säulendiagramm zur Darstellung der CLDN5- Expression in den untersuchten Geweben	45
Abbildung 13	Säulendiagramm zur Darstellung der PDPN-Expression in den untersuchten Geweben	46
Abbildung 14	Säulendiagramm zur Darstellung der VIM-Expression in den untersuchten Geweben	47
Abbildung 15	Beispielhafte Darstellung der digitalen Erfassung des DAB-Signals aller 5 AK-Färbungen in Lymphangiomen..	48
Abbildung 16	Säulendiagramm zur Darstellung der DAB-positiven Gewebeanteile für die verschiedenen Marker innerhalb der Lymphangiome	50
Abbildung 17	Kreisflächendiagramm zur Darstellung der Verhältnisse der AK-Signalwerte in Lymphangiomen	51

Abbildung 18	Balkendiagramm mit Darstellung der Verhältnisse der Kandidatenproteinexpression innerhalb der Lymphangiome	52
Abbildung 19	Beispielhafte Darstellung der digitalen Erfassung des DAB-Signals aller 5 AK-Färbungen in arteriovenösen Malformationen	53
Abbildung 20	Säulendiagramm zur Darstellung der DAB-positiven Gewebeanteile für die verschiedenen Marker innerhalb der arteriovenösen Malformationen	54
Abbildung 21	Kreisflächendiagramm zur Darstellung der Verhältnisse der AK-Signalwerte in arteriovenösen Malformationen ..	55
Abbildung 22	Balkendiagramm mit Darstellung der Verhältnisse der Kandidatenproteinexpression innerhalb der arteriovenösen Malformationen	56
Abbildung 23	Beispielhafte Darstellung der digitalen Erfassung des DAB-Signals aller 5 AK-Färbungen in Hämangiomen	57
Abbildung 24	Säulendiagramm zur Darstellung der DAB-positiven Gewebeanteile für die verschiedenen Marker innerhalb der Hämangiome	58
Abbildung 25	Kreisflächendiagramm zur Darstellung der Verhältnisse der AK-Signalwerte in Hämangiomen	59
Abbildung 26	Balkendiagramm mit Darstellung der Verhältnisse der Kandidatenproteinexpression innerhalb der Hämangiome	60
Abbildung 27	Beispielhafte Darstellung der digitalen Erfassung des DAB-Signals aller 5 AK-Färbungen in vaskulären Malformationen (n.n.kl.)	61
Abbildung 28	Säulendiagramm zur Darstellung der DAB-positiven Gewebeanteile für die verschiedenen Marker innerhalb der vaskulären Malformationen (n.n.kl.)	62
Abbildung 29	Kreisflächendiagramm zur Darstellung der Verhältnisse der AK-Signalwerte in vaskulären Malformationen (n.n.kl.)	63
Abbildung 30	Balkendiagramm mit Darstellung der Verhältnisse der Kandidatenproteinexpression innerhalb der vaskulären Malformationen (n.n.kl.).....	64

Abbildung 31	Beispielhafte Darstellung der digitalen Erfassung des DAB-Signals aller 5 AK-Färbungen in venösen Malformationen	65
Abbildung 32	Säulendiagramm zur Darstellung der DAB-positiven Gewebeanteile für die verschiedenen Marker innerhalb der venösen Malformationen	66
Abbildung 33	Kreisflächendiagramm zur Darstellung der Verhältnisse der AK-Signalwerte in venösen Malformationen	67
Abbildung 34	Balkendiagramm mit Darstellung der Verhältnisse der Kandidatenproteinexpression innerhalb der venösen Malformationen	68
Abbildung 35	Beispielhafte Darstellung der digitalen Erfassung des DAB-Signals aller 5 AK-Färbungen beim Granuloma pyogenicum	69
Abbildung 36	Säulendiagramm zur Darstellung der DAB-positiven Gewebeanteile für die verschiedenen Marker im Granuloma pyogenicum	70
Abbildung 37	Kreisflächendiagramm zur Darstellung der Verhältnisse der AK-Signalwerte im Granuloma pyogenicum	71
Abbildung 38	Balkendiagramm mit Darstellung der Verhältnisse der Kandidatenproteinexpression im Granuloma pyogenicum	72
Abbildung 39	Beispielhafte Darstellung der digitalen Erfassung des DAB-Signals aller 5 AK-Färbungen in Paragangliomen..	73
Abbildung 40	Säulendiagramm zur Darstellung der DAB-positiven Gewebeanteile für die verschiedenen Marker innerhalb der Paragangliome	74
Abbildung 41	Kreisflächendiagramm zur Darstellung der Verhältnisse der AK-Signalwerte in Paragangliomen	75
Abbildung 42	Balkendiagramm mit Darstellung der Verhältnisse der Kandidatenproteinexpression innerhalb der Paragangliome	76
Abbildung 43	Beispielhafte Darstellung der digitalen Erfassung des DAB-Signals in den Kontrollgeweben	77

Abbildung 44	Säulendiagramm zur Darstellung der DAB-positiven Gewebeanteile für die verschiedenen Marker innerhalb der Kontrollgewebe	78
Abbildung 45	Kreisflächendiagramm zur Darstellung der Verhältnisse der AK-Signalwerte im Kontrollgewebe	79
Abbildung 46	Balkendiagramm mit Darstellung der Verhältnisse der Kandidatenproteinexpression innerhalb der Kontrollgewebe	80
Abbildung 47A-D	Matrix zur Übersicht der sich unterscheidenden AK-Signalwert-Quotienten in Bezug auf alle acht Gewebetypen	82-85
Abbildung 48	Graphische Übersicht zur Abgrenzung der untersuchten Gewebe voneinander anhand verschiedenen AK-Signal-Quotienten	104

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Klassifikation der Vaskulären Anomalien (entsprechend der <i>International Society for the Study of Vascular Anomalies</i> (ISSVA) 2014).....	3
Tabelle 2	Informationen zu Herkunft, Erkrankung und anatomischer Lokalisation der verwendeten VA-Gewebe.....	23-25
Tabelle 3	Informationen zu Herkunft, Erkrankung und Lokalisation des Kontrollgewebes	25
Tabelle 4	Zusammenfassung der Unterschiede zwischen den Quotienten der Gewebe.....	105

1. Einleitung

Vaskuläre Anomalien (VA) werden zu den seltenen Erkrankungen (*Rare Disease*) gezählt. Trotzdem handelt es sich bei ihnen um die häufigsten angeborenen und frühkindlichen Weichgewebsfehlbildungen im Kopf-Hals-Bereich (Werner et al. 2006; Wassef et al. 2015). Sie stellen nicht nur ein kosmetisches Problem dar, sondern können, je nach Ausprägung, durchaus lebensbedrohliche Ausmaße annehmen. Durch eine ungünstige anatomische Lokalisation dieser Tumoren kommt es nicht selten zur Verlegung des oberen Aerodigestivtraktes (Werner et al. 2001; Buckmiller et al. 2010). Massive Blutungen ausgehend von VA können mitunter letal enden. Aufgrund der genannten Komplikationen sind VA von bedeutender klinischer Relevanz. Infolge ihrer Seltenheit liegen bisher jedoch nur wenige Untersuchungen vor, die Aufschluss über die Entwicklung und Progression der Erkrankung geben. Eine weiterführende Untersuchung der zugrundeliegenden Pathogenese ist daher notwendig (Werner et al. 2001; Boettcher et al. 2010; Cai et al. 2010).

Aktuelle Untersuchungen zeigen einen Zusammenhang zwischen somatischen Mutationen wie beispielsweise im *PIK3CA*-Gen und der Entstehung venöser und lymphatischer Malformationen (Terzi et al. 1997; Limaye et al. 2015; Wassef et al. 2015; Greene and Goss 2018). So konnten unter anderem somatische Mosaikmutationen im *PIK3CA*-Gen sowohl in isolierten lymphatischen und venösen Malformationen, als auch in assoziierten syndromalen Erkrankungen (z.B. Klippel-Trénaunay-Syndrom, CLOVE-Syndrom) nachgewiesen werden (Boscolo et al. 2015; Luks et al. 2015). Ursächlich vermutet wird ein gesteigerter PI3K/Akt/mTOR-Signalweg, der zu vermehrter Zellteilung und Proliferation führt und ebenso in bösartigen Tumoren hochreguliert ist. Diese Beobachtungen unterstreichen die Notwendigkeit weiterführender Untersuchungen der Expression verschiedener Kandidatenproteine durch VA, da diese wichtige Hinweise zu ihrer Entstehung auf genetischer Ebene liefern können.

Die Entwicklung einer klinisch-pathologischen Klassifikation von VA stellte sich aufgrund der Heterogenität der Erkrankung als schwierig dar. Virchow und Wagner orientierten sich an den pathologischen Gefäßveränderungen und

unterteilten 1863 die VA in Lymphangiome und Angiome. Die Hamburger Klassifikation hingegen unterschied nach entwicklungsgeschichtlichen Kriterien (Belov 1990). Sie ordneten die VA in trunkale und extratrunkale Formen, je nach Art der embryologischen Entstehung ein (Belov 1990). Diese Klassifizierungen ließen jedoch pathophysiologische Grundlagen unberücksichtigt und zeigten sich im klinischen Einsatz als unpraktisch, weshalb Anomalien unterschiedlichster Ätiologie und Verlaufsform vereinfachend als „Hämangiome“ bezeichnet wurden (Garzon et al. 2007).

Im Jahre 1982 veröffentlichten Mulliken und Glowacki eine Einteilung der VA in Hämangiome und vaskuläre Malformationen (VM) (Mulliken and Glowacki 1982). Hierbei erfolgte eine Unterscheidung von VA anhand ihres klinischen Verhaltens, der histologischen Parameter und ihrer Flusseigenschaften. Diese Herangehensweise stellte sich als praktisch dar und erlaubte Schlüsse auf den klinischen Verlauf. Im Jahr 1996 wurde sie daher von der *International Society for the Study of Vascular Anomalies* (ISSVA) als offizielle Klassifikation anerkannt. Die letzte Aktualisierung erfolgte 2014 (Tabelle 1) (Morrow et al. 2016). Kernpunkt dieser Klassifikation ist die konsequente Unterteilung von VA in VM und vaskuläre Tumoren, in die auch die Hämangiome einbezogen wurden. Diese Neuerung erweist sich als sinnvoll, da es sich bei Hämangiomen mitunter um eine heterogene Gruppe von Anomalien mit unterschiedlichem Verlauf handelt. Klinisch besteht der entscheidende Unterschied zwischen Hämangiomen und VM vor allem in der spontanen Involution, die ausschließlich bei Hämangiomen auftritt und sich in den ersten fünf bis zehn Jahren nach deren Entstehung vollzieht (Fishman and Mulliken 1993). Diese Einteilung, basierend auf den Kenntnissen der unterschiedlichen Eigenschaften von VA, bildet die Grundlage einer wirksamen Therapie (Chiller et al. 2003).

Tabelle 1. Klassifikation der Vaskulären Anomalien (entsprechend der *International Society for the Study of Vascular Anomalies (ISSVA) 2014*).

Vaskuläre Anomalien				
Vaskuläre Tumoren	Vaskuläre Malformationen			
Benigne (inkl. Hämangiome und Granuloma pyogenicum)	Einfach	Kombiniert*	Anomalien der großen Gefäße („trunkale“ VM)	Assoziiert mit anderen Anomalien
Lokal aggressiv oder borderline	Kapilläre Malformation	CVM, CLM	Betreffen: - Lymphgefäße - Venen - Arterien	Klippel-Trénaunay-Syndrom
Maligne	Lymphatische Malformation	LVM, CLVM	Beinhalten: - Kongenitale arteriovenöse Fisteln - Persistierende embryonale Gefäße	Servelle-Martorell-Syndrom
	Venöse Malformation	CAVM**		Sturge-Weber-Syndrom
	Arteriovenöse Malformation**	CLAVM**		Parkes-Weber-Syndrom
	Arteriovenöse Fistel**	andere		Maffucci-Syndrom weitere

*zwei oder mehr VM in einer Läsion; **high-flow-Läsionen; CVM: kapillär-venöse Malformation; CLM: kapillär-lymphatische Malformation; LVM: lymphatisch-venöse Malformation; CLVM: kapillär-lymphatisch-venöse Malformation; CAVM: kapillär-arteriovenöse Malformation; CLAVM: kapillär-lymphatische-arteriovenöse-Malformation.

1.1 Vaskuläre Tumoren

1.1.1 Benigne Formen

1.1.1.1 Hämangiome

Bei Hämangiomen (Häm) handelt es sich um benigne Gefäßtumore, die definitionsgemäß erst nach der Geburt auftreten (Marchuk 2001). Sie entwickeln sich aus Endothelzellen und sind charakterisiert durch ihr schnelles, überproportionales Wachstum innerhalb der ersten Lebensmonate (Eichenfeld

1998). 60% der Häm entwickeln sich im Kopf-Hals-Bereich, der Rest verteilt sich auf Extremitäten und Rumpf (Finn et al. 1983). Es handelt sich überwiegend um isoliert auftretende Häm. Sie können aber auch multipel und in Assoziation mit dem PHACES-Syndrom (*posterior fossa anomalies–hemangiomas–arterial anomalies–cardiac anomalies–eye anomalies–sternal cleft and supraumbilical raphe syndrome*) der benignen neonatalen Hämangiomatose oder dem PELVIS-Syndrom (*perineal hemangioma, external genitalia malformations, lipomyelomeningocele, vesicorenal abnormalities, imperforate anus, skin tag*) auftreten. Die Pathogenese der Häm ist weitgehend unbekannt. Bei einem Verhältnis von 3:1 treten sie jedoch häufiger bei weiblichen Patienten auf, weshalb eine hormonelle Beeinflussung vermutet wird. Bisherige Studien konnten diese Annahme jedoch nicht belegen (Nichols et al. 1992; Lamovec and Bracko 1996).

Nach der Proliferationsphase gehen Häm typischerweise in eine spontan einsetzende Phase der Involution über, die in ca. 50% der Fälle im Alter von fünf Jahren abgeschlossen ist (Bowers et al. 1960). Etwa die Hälfte der Patienten weist danach Residuen in Form von Teleangiektasien, Vernarbungen, Atrophien oder Abblässung der Haut auf (Smolinski 2005). Aufgrund der starken Rückbildungstendenz der Häm, ist bei der Behandlung ein abwartendes Verhalten (*wait and see*) angebracht. Entscheidend für eine Therapieindikation ist hierbei das Wachstumsverhalten der Läsion sowie deren Lokalisation. So ist gerade beim Auftreten von Häm im Gesichtsbereich, die eine Proliferationstendenz zeigen, eine Therapie zu empfehlen. Mögliche kosmetische und funktionelle Folgen können so vermieden werden (Batta et al. 2002). Systemische Therapiekonzepte sind die Gabe von Propranolol (Léauté-Labrèze et al. 2008) oder Kortikosteroiden. Laut aktueller Datenlage ist bei einer Therapie mit Propranolol, im Vergleich zu einer Therapie mit Prednison, mit geringeren Nebenwirkungen bei zugleich besserem Behandlungserfolg und Ansprechen auszugehen (Bertrand et al. 2011). Weitere Optionen stellen die Kryotherapie, Lasertherapie und/oder die konventionelle Chirurgie dar (Marler and Mulliken 2005; Werner et al. 2006).

1.1.1.2 Granuloma pyogenicum

Bei dem Granuloma pyogenicum handelt es sich um einen häufigen benignen vaskulären Tumor der Haut und der Schleimhäute. Er ist erworben und kann in jedem Alter auftreten, wird aber bevorzugt bei Kindern und jungen Erwachsenen beobachtet (Sud and Tan 2010). Nicht selten tritt er als Granuloma gravidarum in der Schwangerschaft vornehmlich an der Gingiva auf, bildet sich postpartal aber wieder zurück. Synonyme Bezeichnungen sind eruptives Hämangiom oder Granuloma teleangiectaticum. Die Terminologie ist allerdings irreführend, da es sich weder um eine granulomatöse, noch um eine pyogene Läsion handelt und es mitunter zu Verwechslungen mit dem Begriff des infantilen Hämangioms kommen kann (Chang 2003). Auch wenn die Ätiologie noch nicht vollständig geklärt ist, konnte ein Zusammenhang mit Faktoren wie Traumata, weiblichem Geschlecht und dem zusätzlichen Auftreten von *Port-Wine-Stains* beobachtet werden (Pagliai and Cohen 2004). Vermutet wird außerdem ein zugrundeliegendes Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren, welches vermutlich durch den Einfluss weiblicher Sexualhormone entsteht (Yuan et al. 2002). Das Granuloma pyogenicum präsentiert sich als rote bis bläuliche Veränderung, die schnell wächst und leicht blutet. Meist tritt sie an den Akren oder in der Kopf-Hals-Region auf (Szeimies 2010). Sie verursacht vor allem kosmetische, aber auch funktionelle Beeinträchtigungen wie Blutungen oder Größenzunahme. Traditionell kommt die chirurgische Entfernung als Therapie zum Einsatz (Alam et al. 2006), ebenfalls Kryotherapie, Applikation von Silbernitrat sowie Lasertherapie (Pagliai and Cohen 2004).

1.1.2 Lokal aggressive oder borderline vaskuläre Tumoren

1.1.2.1 Hämangioendotheliome

Hämangioendotheliome stellen eine heterogene Gruppe vaskulärer Tumoren dar, die sich in ihrem histologischen Bild und ihrer klinischen Ausprägung stark unterscheiden können. Sie werden als sogenannte intermediäre Tumoren angesehen, deren biologisches Verhalten zwischen dem benignen Hämangiome und malignen Angiosarkome eingestuft wird (Requena and Kutzner 2013). Unterschieden werden weiterhin das kaposiforme und das retiforme Hämangioendotheliom, sowie der Dabska-Tumor.

Das kaposiforme Hämangioendotheliom (KHE) ist sehr selten und tritt im Säuglingsalter oder frühen Kindesalter auf. Anders als infantile Hämangiome zeigt es aber keine Neigung zur Involution. Es zeichnet sich aus durch seine lokale Aggressivität und kann sowohl oberflächlich in der Haut, meist an den Extremitäten, als auch in tieferen Schichten des Weichteilgewebes entstehen. Selten tritt es auch im Retroperitoneum, Mediastinum, den inneren Organen oder den Knochen auf. Meist zeigt es sich als leicht erhabene, rötlich-livide, subkutane Erhebung, die zunächst wie ein Hämatom erscheinen kann (Gruman et al. 2005). In schwereren Fällen kommt es zum Wachstum und zur Induration der Läsion mit Entstehung von Petechien und Ekchymosen. Die schwerste Komplikation dieses Tumors ist das Kasabach-Merritt-Syndrom (KMS), eine lebensbedrohliche Koagulopathie, die mit Thrombozytopenie und erhöhtem Verbrauch an Fibrinogen einhergeht. Über 70% der Patienten mit einem KHE entwickeln das genannte Syndrom, wobei das Risiko bei großen, kongenitalen, extrakutan gelegenen Läsionen am größten ist (Croteau et al. 2013). Histopathologisch zeigen sich Lappchen von spindelzellig bis abgerundeten Endothelzellen, umgeben von fibrotischen Arealen und dünnwandigen Gefäßen, die infiltrativ in das Nachbargewebe einwachsen. Zudem sind häufig abnormale lymphatische Gefäße und Nester epitheloider Zellen innerhalb der Läsion zu finden (Lyons et al. 2004).

Die Pathogenese des KHE ist bisher nicht vollständig geklärt. Da in Endothelzellen von KHEs vaskuläre Marker wie CD31 und CD34, aber auch lymphatische Marker (Podoplanin) nachgewiesen werden können, wird eine Entartung von lymphatischem Endothel als Ursache vermutet, ähnlich wie es bei Kaposi-Sarkomen postuliert wurde (Zuckerberg et al. 1993; Arai et al. 2006). Im Unterschied zum Kaposi-Sarkom gibt es allerdings keine Evidenz für die Assoziation mit dem humanen Herpesvirus 8 (Lyons et al. 2004).

Therapeutisch wird bei Patienten, ohne Vorliegen eines KMS, die chirurgische Exzision bevorzugt. Ist diese nicht möglich, wird die Einnahme von Aspirin und/oder Prednison empfohlen, an die sich eine chirurgische Behandlung anschließen kann. Auch für Patienten mit einem bestehenden KMS ist bei einer kleinen resektablen Läsion die chirurgische Exzision Mittel der Wahl. Bei

größeren KHE wird die intravenöse Gabe des Zytostatikums Vincristin, kombiniert mit systemischer Gabe von Prednison oder Sirolimus, empfohlen (Shin et al. 2000; Jahnelt et al. 2012; Drolet et al. 2013; Wang et al. 2015).

Das endovaskuläre papilläre Angioendotheliom, auch als Dabska-Tumor bezeichnet, wurde erstmals im Jahre 1969 von Maria Dabska anhand von sechs pädiatrischen Fällen beschrieben (Dabska 1969). Seither wurden 30 weitere Fälle in der Literatur dokumentiert, wobei 12 davon bei Erwachsenen auftraten. Viele dieser Neoplasien waren im Kopf-Hals-Bereich und den Extremitäten lokalisiert, weitere im Bereich von Knochen und Milz (Katz et al. 1988; Takaoka et al. 2003; Nakayama et al. 2004). In einigen Fällen entwickelte sich der Tumor aus zuvor bestehenden vaskulären Läsionen (Quecedo et al. 1996; Argani and Athanasian 1997). Die Ausprägung des Tumors kann zwischen einer rot-bläulichen Plaque bis hin zu einem tastbaren Knoten mit dermalen Atrophien variieren. Hinzukommen können Ulzerationen, Schmerzen und Blutungen aus der Läsion (Neves et al. 2011). Histopathologisch besteht die Neoplasie aus intraluminalen papillären Proliferationen umgeben von lymphozytären Infiltraten. Die Expression des lymphatischen Endothelmarkers PDPN deutet auf eine Verwandtschaft zu lymphatischen vaskulären Tumoren hin (Fukunaga 2005), demgegenüber konnten auch vaskuläre Endothelmarker wie CD34, CD31 und Vimentin immunhistochemisch nachgewiesen werden (Coindre 2003). Im Jahre 2000 veröffentlichte Dabska eine Studie zum Outcome der erstmals beschriebenen sechs Fälle. Nach einer großzügigen chirurgischen Exzision, zeigten drei Patienten eine Invasion des Tumors in tiefere Gewebestrukturen. Ein Patient verstarb an, bereits bei Erstvorstellung bestehenden, pulmonalen Metastasen (Schwartz et al. 2000). Die potentielle Malignität des endovaskulären papillären Angioendothelioms sollte daher nicht unterschätzt werden. Ebenfalls sollte sich eine Wiedervorstellung nach erfolgter Therapie anschließen, auch wenn bisher kein offizielles Protokoll zum Follow-up vorliegt (Neves et al. 2011).

Das retiforme Hämangioendotheliom (RH) wird auch als eine Variante des Angiosarkoms mit niedrigem Malignitätspotential beschrieben. Diese vaskuläre Neoplasie tritt vor allem an den Extremitäten junger Erwachsener auf und weist ein exophytisches Wachstum mit dermalen oder subkutanen Knoten auf. Es ist

lokal aggressiv und zeigt, bei insuffizienter Therapie, eine hohe Rezidivneigung (Calonje et al. 1994). Die Ätiologie ist bisher ungeklärt, wobei eine Assoziation zum Humanen Herpesvirus 8 (HHV-8), nur in einem Fall beschrieben wurde (Schommer et al. 2000). Histologisch zeichnet sich das RH durch elongierte Blutgefäße aus, die an die Samenkanälchen des Rete testis des Hodens erinnern, woraus sich auch der Name der Neoplasie ableitet. Weitere Charakteristika sind eine hyaline Sklerose und ein lymphozytäres Infiltrat in der Umgebung der Gefäße. Zur Beschreibung der Histopathologie des RH sowie des Dabska-Tumors schlugen Weiss und Goldblum auch den Terminus „Hobnail Hämangioendotheliom“ vor, da sie zwischen diesen Geweben eine Verwandtschaft vermuteten (Folpe et al. 2001). Aufgrund der erhöhten Rezidivrate ist die chirurgische Exzision, mit kompletter Entfernung des Tumors im Gesunden, die Therapie der Wahl. Wichtig ist hier in erster Linie die histologische Abgrenzung zum Angiosarkom, das zur Metastasierung neigt und eine schlechte Prognose aufweist (Tan et al. 2005).

1.1.2.2 Kaposi-Sarkom

Das Kaposi-Sarkom (KS) ist eine multifokale, angioproliferative Erkrankung. Typisch ist ein perivaskuläres Wachstum spindelförmiger Zellen, eine verstärkte Neoangiogenese und Entzündung sowie Ödembildung (Ramírez-Amador et al. 2009). Unterschieden werden vier Manifestationsformen des KS. Die „klassische“ Form, die „afrikanische Form“, das Kaposi-Sarkom bei iatrogener Immunsuppression und das epidemische HIV-assoziierte Kaposi-Sarkom.

Die klassische Form tritt überwiegend bei Männern mittleren Alters in Südosteuropa und im Mittelmeerraum, vorwiegend in Italien, auf. Das Verhältnis Männer zu Frauen beträgt 10:1. Es handelt sich um eine prognostisch günstigere, indolente Form, die in erster Linie in der Haut der unteren Extremitäten auftritt, seltener auch an Händen und Armen. Multifokal bilden sich violett bis rot-braune Plaques und Knoten. Diese können bluten und ulzerieren (Ramírez-Amador et al. 2010).

Die „afrikanische Form“ ist endemisch in Zentralafrika und macht hier bis u 10% aller malignen Neoplasien aus. Vor allem in Uganda und Sambia wurde von

sehr aggressiven Formen berichtet. Das Verhältnis von Männern zu Frauen wandelt sich von ca. 1,7:1, bei Patienten unter 15 Jahren, bis zu 15:1 nach der Pubertät (Schwartz et al. 2008).

Das iatrogene KS entwickelt sich vor allem bei bestehender Immunsuppression im Rahmen einer Organtransplantation. Es kann einen schnellen Progress zeigen oder sich chronifizieren. Nach Beendigung der immunsuppressiven Therapie kommt es typischerweise zu einer Regression der KS (Schwartz et al. 2008).

Seit Beginn der 80er Jahre wurde bei jungen, homosexuellen HIV-Patienten eine epidemische Variante des KS beobachtet. Diese weist eine schnellere Progredienz auf und befällt gleichermaßen Haut, Schleimhäute und Lymphknoten, sowie innere Organe (Friedman-Kien 1981). Seit der Einführung einer wirksamen antiretroviralen Therapie (HAART) im Jahre 1996 hat die Inzidenz des KS signifikant abgenommen. Laut einer Studie betrug diese 2004 unter HIV-infizierten Europäern weniger als 10% der Inzidenz im Jahre 1994 (Mocroft et al. 2004). In Entwicklungsländern in Mittel- und Ostafrika ist die Situation jedoch weiterhin besorgniserregend, da hier die Inzidenz bei 20 zu 100 000 Einwohner liegt (Ramírez-Amador et al. 2009).

Die Pathogenese ist bei allen genannten Formen noch nicht abschließend geklärt. Eine Rolle spielen aber eine Störung des Immunsystems sowie eine Infektion mit dem HHV-8, das bei allen Patienten nachgewiesen werden kann (Ramírez-Amador et al. 2009). Auch ein Protein des Humanen Herpesvirus 1 (HHV-1) scheint ein KS zu induzieren (Ensoli et al. 1994). Vermutet wird ein Zusammenspiel von Zytokinen und angiogenen Faktoren, die entlang des Gefäßsystems Neoplasien induzieren können (Samaniego et al. 1998). Aufgrund der Heterogenität der Zellen, die das KS ausmachen, wird außerdem ein lymphangischer oder endothelialer Ursprung diskutiert. Da es bisher kein anerkanntes Staging gibt, richtet sich die Therapie nach der klinischen Ausprägung des KS. Bei einer langsam wachsenden indolenten Läsion sind verschiedene Therapieformen möglich. Diese reichen von klinischer Beobachtung über eine Behandlung der Lymphödeme mit Stützstrümpfen, bis

hin zur chirurgischen Exzision, Radiotherapie oder intraläsionaler Chemotherapie mit Vincristin. Patienten mit schnell wachsenden Tumoren oder Komplikationen erhalten eine systemische Therapie. Hierbei werden derzeit Chemotherapien mit Interferon alpha-2b, Taxanen oder liposomalem Doxorubicin eingesetzt (Di Lorenzo 2008).

1.1.3 Maligne vaskuläre Tumoren

1.1.3.1 Angiosarkome

Das Angiosarkom (AS) ist ein seltener hochmaligner Gefäßtumor der, mit einem Anteil von 2-3%, nur eine kleine Gruppe der Weichteiltumoren ausmacht. Dennoch ist die korrekte Diagnose dieses Tumors aus prognostischer Sicht von großer Bedeutung. Klinisch kann sich das AS sehr heterogen präsentieren und in jeder Körperregion auftreten. Am häufigsten findet sich die kutane Lokalisation vor allem im Kopf-Hals-Bereich, von der insbesondere hellhäutige Männer um die 6. Lebensdekade betroffen sind (Penel et al. 2011). Weitere Tumoren treten in tieferen Zonen des Weichgewebes und in den inneren Organen auf (Fury et al. 2005). Das AS kann in Form von multiplen Flecken auftreten, bereits tief infiltrierend wachsen, ulzerieren und zu intermittierenden Blutungen führen. Vor allem AS im Kopf-Hals-Bereich neigen zu diffusem Wachstum, wodurch ihre Entdeckung oft erschwert wird. Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen zudem ca. 5% der Patienten zervikale Lymphknotenmetastasen auf. Die Therapie der Wahl stellt die umfassende chirurgische Resektion des Tumors dar, die nach Möglichkeit R0 (Entfernung des Tumors im Gesunden, ohne histopathologisch nachweisbares Tumorgewebe am Resektionsrand) erfolgen sollte. Dies ist aber nur in 20-30% der Fälle möglich, weshalb es häufig zu lokalen Rezidiven (75% der Fälle) kommt (Pawlik et al. 2003). Bei vorliegenden Metastasen, die meist pulmonal lokalisiert sind, und bei lokal aggressiv wachsenden AS, wird auch eine Therapie mit Doxorubicin und Paclitaxel eingesetzt (Abraham et al. 2007).

1.1.3.2 Epitheloide Hämangioendotheliome

Bei dem epitheloiden Hämangioendotheliom (EHE) handelt sich um einen seltenen vaskulären Tumor mit metastatischem Potenzial. 1982 benannten Weiss und Enzinger den Tumor nach seinem klinischen Verlauf und dessen

Histologie, die sowohl einem Hämangiom als auch einem Angiosarkom ähneln (Weiss and Enzinger 1982).

Das EHE wächst in einem angiozentrischen und zentrifugalen Muster um ein Gefäß, bei dem es sich meist um eine kleine Vene handelt. Dies verleiht dem Tumor eine knotenartige Erscheinung. Typisch sind außerdem Zellnester bestehend aus epitheloid und histiozytär erscheinenden atypischen Endothelzellen. Die Zellen erscheinen hierbei plump, polygonal oder spindelzellig und weisen teilweise zytoplasmatische Vakuolen auf (Bollinger et al. 1994). Klinisch präsentiert es sich oft als solitäre schmerzhafte Läsion, die oberflächlich oder in tieferen Schichten des Weichgewebes auftreten kann. Aufgrund seiner vaskulären Genese kann es zu Symptomen wie Ödembildung und Thrombophlebitis kommen (Fletcher et al. 2002). Bisher existieren keine Leitlinien zur Therapie des EHE. Abhängig von der Lokalisation, dem Stadium und Ausmaß des Tumors sowie von der Verfassung des Patienten, bieten sich therapeutisch Maßnahmen, wie lokale chirurgische Exzision, teilweise in Kombination mit Radio/Chemotherapie, an (Mentzel et al. 1997).

1.2 Vaskuläre Malformationen

Anders als Hämangiome sind vaskuläre Malformationen bereits bei Geburt vorhanden und treten bei weiblichen und männlichen Patienten gleich häufig auf. Je nach Art der Malformation können die eigentlichen Läsionen allerdings auch erst im Laufe der Zeit sichtbar werden. Definitionsgemäß wachsen sie proportional zur Größenzunahme des Kindes und gehen, im Gegensatz zu Hämangiomen, nie in eine spontane Involution über (Garzon et al. 2000). Eingeteilt werden sie anhand des beteiligten Gefäßsystems und dem Aufbau der Gefäßwand, wobei venöse, kapilläre, lymphatische, arterielle und arteriovenöse bzw. gemischte Formen voneinander unterschieden werden können. In einigen Fällen bestehen auch Verbindungen zwischen Arterien und Venen in Form einer arterio-venösen Fistel. Weiterhin werden unterschieden: Niederfluss(*Low-Flow*)-Läsionen (kapilläre, lymphatische und venöse Malformationen) und Hochfluss(*High-Flow*)-Läsionen (arterielle und arteriovenöse Malformationen sowie arteriovenöse Fisteln) (Mulliken 1993). Im Kopf-Hals-Bereich treten vor allem Low-Flow-Malformationen auf. Bei High-

Flow-Malformationen besteht ein höheres Risiko von Komplikationen, da sie eher zu Blutungen führen können und das Blutungsrisiko mit dem Alter des Patienten zunimmt (Kaban and Mulliken 1986; Werner et al. 2006). Vaskuläre Malformationen können außerdem in Verbindung mit syndromalen Erkrankungen auftreten. Auf die einzelnen Formen der Malformationen soll in den folgenden Abschnitten kurz eingegangen werden.

1.2.1 Einfache Formen

1.2.1.1 Kapilläre Malformationen

Kapilläre Malformationen (KM) treten bei ca. 0,3% der Neugeborenen auf und können am ganzen Körper entstehen, wobei sie vor allem im Kopf-Hals-Bereich vorkommen (Choi et al. 2009). Sie bestehen aus dilatierten kapillären Gefäßen. Diese Malformationen sind bei Geburt vorhanden und präsentieren sich als rote, im Hautniveau liegende Flecken mit meist unscharfer Begrenzung. Eine Form der kapillären Malformation stellt der Naevus flammeus (auch Feuermal oder port-wine-stain genannt) dar, der oft entlang des Nervus trigeminus auftritt und der sich mit zunehmendem Alter dunkler verfärbt (Werner et al. 2006). Unterhalb dieser Läsion kann sich eine tieferreichende Malformation verstecken, es kann aber auch eine Assoziation mit einer syndromalen Erkrankung vorliegen (Rössler et al. 2005). Bei Vorkommen einer kapillären Malformation im Gesichtsbereich, speziell im Versorgungsgebiet des Nervus trigeminus, sollte beispielsweise auch an ein Sturge-Weber-Krabbe-Syndrom gedacht werden, da hierbei zusätzlich intrazerebrale Gefäßmalformationen auftreten können (Enjolras et al. 1985). Führt die Gefäßfehlbildung zu funktionellen Störungen oder kosmetischer Beeinträchtigung, kann diese mittels Farbstofflaser („*flashlamp pulsed dye laser*“) in mehreren Sitzungen therapeutisch behandelt werden (Alster and Wilson 1994).

1.2.1.2 Venöse Malformationen

Bei den venösen Malformationen handelt es sich um angeborene Läsionen, die häufig bereits bei der Geburt als Vorwölbung sichtbar sind, für gewöhnlich aber erst bei älteren Kindern oder jungen Erwachsenen symptomatisch werden. Sie stellen mit etwa 50% die häufigsten unter den vaskulären Anomalien dar und treten zu 60% im Kopf-Hals-Bereich auf (Vikkula et al. 1998). Weiterhin

kommen sie an den Gliedmaßen, am Rumpf und im Bereich der Viszera, im Knochen und der Muskulatur vor (Hein et al. 2002). Die klinische Manifestation ist abhängig von der Tiefe und Ausbreitung der Malformation und gestaltet sich deshalb sehr unterschiedlich. Da während der Schwangerschaft, bei der Einnahme von Kontrazeptiva und während der Pubertät, ein verstärktes Auftreten beobachtet werden kann, wird ein hormonabhängiges Wachstum vermutet. Hierbei könnten Progesteronrezeptoren eine Rolle spielen (Duyka et al. 2009). Auch nach Traumata kommt es nicht selten zu einem massiven Wachstum der Malformationen.

In der Regel präsentieren diese sich als livide, leicht komprimierbare, nichtpulsierende Wucherungen (Werner et al. 2001). Typischerweise kommt es zu einer Größenzunahme bei Erhöhung des venösen Drucks, z.B. beim Wechsel der Körperposition, beim Schreien oder der Durchführung eines Valsalva-Manövers (Legiehn and Heran 2008). Ein mögliches Symptom ist die Schmerzhaftigkeit der Läsion, die vorwiegend morgens vor dem Aufstehen auftritt und bereits bei kleinen Malformationen sehr ausgeprägt sein kann. Da es sich um geweitete venöse Gefäße mit reduziertem Blutfluss handelt, kommt es zu Stase und Entstehung von Thrombosen. Erhärtet werden kann die Diagnose durch den Nachweis von Phlebolithen in der Bildgebung. Die Ausdehnung kann mit Hilfe der Magnetresonanztomographie (MRT) beurteilt werden (Legiehn and Heran 2008). Histologisch sind venöse Malformationen aus dysplastischen Venen aufgebaut, die aufgrund einer Störung in der embryonalen Entwicklung entstehen. Die dünnwandigen Gefäße sind von einem reifen, flachen Endothel ausgekleidet, das einen nur geringen Anteil glatter Muskelzellen aufweist. Hieraus bilden sich ektatische vaskuläre Hohlräume, die ein irreguläres Lumen aufweisen (Vikkula et al. 1998).

Venöse Malformationen treten häufig im Rahmen vaskulärer Syndrome auf. Sie können beispielsweise mit dem „blue rubber bleb nevus syndrom“ assoziiert sein, bei dem zugleich Gefäßläsionen im Gastrointestinaltrakt vorliegen können (Hofhuis et al. 1990). Auch das Klippel-Trénaunay-Syndrom sowie das Parkes-Weber-Syndrom sind bekannt für die Assoziation mit venösen oder gemischten Gefäßfehlbildungen, bei denen es zur Volumenzunahme einer Extremität bis

hin zu einem verstärkten Längenwachstum kommen kann (Rössler et al. 2005). Venöse Malformationen können auch im Rahmen des seltenen Maffucci-Syndroms auftreten. Nicht selten werden venöse Malformationen von der Deformierung des Gesichtsschädels, Fehlstellungen des Kiefers und Invasion der Orbita begleitet. Große Läsionen im Bereich des Pharynx oder Larynx können die Atemwege einengen und, aufgrund erheblicher Atembeschwerden, eine Indikation für eine Tracheotomie darstellen (Eivazi et al. 2009).

Die meisten venösen Malformationen treten sporadisch auf. Auf genetischer Ebene konnte allerdings eine Mutation auf dem Chromosom 9p nachgewiesen werden, die möglicherweise zu der Entwicklung von vaskulären Anomalien beiträgt (Boon et al. 1994). Bei vielen solitären und multiplen venösen Malformationen konnte außerdem eine Mutation im Angiopoetin-Rezeptor-Gen *TIE2* nachgewiesen werden (Soblet et al. 2013).

Die Therapieform der Wahl ist abhängig von der Tiefe, der Ausdehnung und der anatomischen Lokalisation der venösen Malformation. Generell können sie, wie auch andere Low-Flow-Malformationen, mit Hilfe interstitieller Nd:YAG-Lasertherapie in mehreren Sitzungen erfolgreich behandelt werden (Werner et al. 2001). Ziel ist das Auslösen einer Nekrose und folglich einer Involution der Malformation. Da bei venösen Malformationen eine spontane Involution ausbleibt, ist eine komplette Resektion der Läsion zu empfehlen. Hierbei sollte zunächst die Ausdehnung der Anomalie mittels MRT oder CT festgestellt werden. Die chirurgische Entfernung stellt, aufgrund des Erhalts funktionell wichtiger Organe, der Schwierigkeit der Blutstillung und einem kosmetisch wünschenswerten Ergebnis, eine große Herausforderung dar.

1.2.1.3 Lymphatische Malformationen (Lymphangiome)

Die lymphatischen Malformationen (Lymphangiome, LA) bestehen aus mit Lymphendothelzellen ausgekleideten Zysten unterschiedlicher Größe (mikro- oder makrozystische und kombinierte Lymphangiome). In den meisten Fällen treten sie primär als angeborene Läsion auf, können aber auch sekundär nach einer Bestrahlung oder einem Trauma entstehen. Die Malformationen können sich auch erst in Folge einer Einblutung, oder einer Infektion entwickeln.

Makrozystische Lymphangiome können mitunter bereits pränatal in der Ultraschalldiagnostik diagnostiziert werden (Chervenak et al. 1983). 75% der Lymphangiome sind allerdings bis zum Erreichen des zweiten Lebensjahres als solche identifizierbar (Werner et al. 2006). Häufig sind sie im Kopf-Hals-Bereich lokalisiert und präsentieren sich klinisch als hautfarbene, indolente Schwellungen, die jedoch durch Volumenzunahme des Gewebes zur Verdrängung benachbarter Organe führen können (Cohen and Thompson 1986). Für die Lymphangiome in der Kopf-Hals-Region wurde ein Staging entwickelt, das die Läsionen in fünf Stadien einteilt. Es orientiert sich an deren anatomischer Lage (supra-/infrahyoidal, uni-/bilateral) (De Serres et al. 1995). Je weiter der Tumor fortgeschritten ist, desto notwendiger ist eine chirurgische Intervention, die wiederum mit einer höheren Komplikationsrate verbunden ist (Hamoir et al. 2001).

Die Therapie der Wahl stellt die chirurgische Entfernung dar. Da allerdings eine komplette Resektion der Läsion nur in 40% der Fälle gelingt, ohne wichtige angrenzende Strukturen zu schädigen und oftmals mehrere Operationen notwendig sind, werden vermehrt alternative Maßnahmen in Betracht gezogen. Hierbei rückt der Fokus immer mehr auf die Sklerosierung mittels OK-432 (gefriergetrockneter und niedrig-virulenter Stamm des *Streptococcus pyogenes*, der mit Penicillin G und H₂O₂ vorbehandelt wurde) oder Bleomycin. Durch Induktion einer Immunreaktion, kommt es zu einer Verkleinerung der Läsion (Ogita et al. 1991). Diese Therapieform ist vielversprechend bei makrozystischen Lymphangiomen und hat sich auch bei der Behandlung mikrozystischer Formen, mitunter in Kombination mit einer chirurgischen Teilresektion, als wirkungsvoll erwiesen (Eivazi et al. 2009).

1.2.1.4 Arteriovenöse Malformationen

Arteriovenöse Malformationen (AVM) gehören zu den sogenannten High-flow-Malformationen. Sie haben einen Nidus aus dysplastischen Gefäßen, die Kurzschlussverbindungen zwischen arteriellem und venösem Kreislauf bilden, ohne Ausbildung eines zwischengeschalteten Kapillarnetzes (Ernemann et al. 2003). Histologisch bestehen sie aus Arterien und Venen, die hohe Kaliberschwankungen aufweisen und ungeordnet in einem fibrösen oder

fibromyxomatösen Bett zusammen liegen. Die Venen weisen oft eine irreguläre Hyperplasie der Intima und Fibrose der Adventitia auf (North and Mihm 2001).

AVM sind kongenitale Anomalien, die bereits bei der Geburt nachweisbar sind, klinisch allerdings meist erst nach Jahren auffällig werden und dann an Größe proportional mit dem Wachstum des Kindes zunehmen. Häufig liegt dem Auftreten ein Stimulus zugrunde, wie beispielsweise ein Trauma, eine Infektion oder hormonelle Einflüsse (Ernemann et al. 2003). Mitunter können auch iatrogene Eingriffe wie chirurgische Interventionen oder Biopsien eine Progression auslösen (Konez and Burrows 2004). Die Diagnose wird primär durch die klinische Untersuchung unter Berücksichtigung der Anamnese gestellt. Charakteristisch ist hierbei eine rote, überwärmte, pulsierende Schwellung, die eine Vergrößerung des betroffenen Gewebes oder der Extremität mit sich bringen kann. Zur weiterführenden Diagnostik gehört die farbkodierte Duplexsonographie, mit der vaskuläre Shunts nachgewiesen werden können. Um die Ausdehnung und die Hämodynamik der beteiligten Gefäße vollständig darstellen zu können wird, neben der konventionellen MRT-Diagnostik, eine hochauflösende MR-Angiographie eingesetzt (Ernemann et al. 2010). Betroffene Patienten beobachten Hautveränderungen und klagen häufig über Schmerzen, ausgelöst durch eine dermale Ischämie. Im fortgeschrittenen Stadium kann es zu Ulzerationen und Destruktion des umliegenden Gewebes kommen. Auch starke Blutungen und ein arterielles Steal-Syndrom können auftreten (Ernemann et al. 2010). Von allen vaskulären Anomalien bringen arteriovenöse Malformationen das höchste potentielle Gesundheitsrisiko mit sich. Auch deshalb werden sie, mit Hilfe der Schobinger Klassifikation (1990 akzeptiert durch die ISSVA), anhand ihres klinischen Schweregrades in vier Stadien eingeteilt, die zugleich die Entwicklung der Malformation aufzeigen.

1. Ruhephase: hierbei liegt keine Gewebeschädigung vor und die Läsion ist asymptomatisch. Zu beobachten ist ggf. eine lokale Übererwärmung und eine livide Macula.

2. Progression: im Rahmen eines vernetzten Blutflusses kommt es zu einer Expansion. Auskultatorisch ist ein vermehrtes Schwirren zu hören. Ein verstärktes Pulsieren ist tastbar.

3. Destruktion: es treten dystrophische Hautveränderungen, Ulzerationen, Hämorrhagien und Schmerzen auf. Mitunter können auch lytische Knochendestruktionen nachgewiesen werden. Diese Phase entwickelt sich meist nach Jahren der progressiven Verschlechterung.

4. Dekompensation: Fortschreiten der Ulzerationen und Blutungen. Hinzu kommt eine kardiale Dekompensation. Durch den verstärkten Blutfluss in großen Malformationen ist ein kardiales „High-output“-Herzversagen möglich.

Lokalisiert sind AVM vor allem im Gesicht, in der Mundhöhle und an den Extremitäten. Nahezu 70% der Läsionen befinden sich im Kopf-Hals-Bereich besonders im Mittelgesicht. Wangen, Ohren, Nase, Stirn, Nacken und Unterkiefer sind häufige Entstehungsorte (Kohout et al. 1998). Gerade in diesen Bereichen können die Läsionen durch ihr aggressives Wachstum zu starken Deformierungen, funktionellen Beeinträchtigungen der Organe und lebensbedrohlichen sekundären Blutungen führen. Hinzu kommt, dass ihre Behandlung sich meist komplex und schwer gestaltet. Bei Teilbehandlungen kommt es häufig zu Rezidiven, die oft schwerer zu behandeln sind als die initiale Malformation. Einige Autoren empfehlen bei asymptomatischen Malformationen in der Ruhephase lediglich eine engmaschige Beobachtung, um eine verfrühte Teilintervention zu vermeiden (Garzon et al. 2007). Andere plädieren für eine Behandlung von AVM in der Ruhephase, da sie zu diesem Zeitpunkt eine höhere Erfolgsrate beobachteten und somit mögliche Folgeschäden vermieden werden konnten (Kohout et al. 1998).

Die Therapie besteht meist aus Embolisierung mit oder ohne Operation. Das therapeutische Ziel ist dabei die Okklusion des Nidus. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn die Embolisierung von distal nach proximal erfolgt (Werner et al. 2006). In den vergangenen Jahren wurden verschiedenste Substanzen zur Embolisierung genutzt. Alkohol gilt dabei als effektivstes Mittel (Jeong et al. 2006). Allerdings kann es bei der Behandlung mit Alkohol zu Komplikationen kommen, wie der Entwicklung starker Schwellungen im behandelten Areal, Ulzerationen der Haut oder Mukosa, Nervenlähmungen und kardiovaskulärem Kollaps.

Allgemein ist die Wahl des embolisierenden Materials von der weiterführenden Therapie abhängig. In Fällen von präoperativer Embolisierung kann beispielsweise *Gelfoam*-Puder genutzt werden, um eine vorübergehende Okklusion zu erlangen und, in der sich anschließenden operativen Resektion, Blutungen zu minimieren. Für einen dauerhaften Verschluss extrakranieller Malformationen wird seit einigen Jahren vermehrt Onyx (flüssiges Polyvinyl-Alkohol-Kopolymer) eingesetzt, das zuvor vor allem in der Behandlung intrakranieller Läsionen zur Anwendung kam (Taki et al. 1990).

Hiermit ließen sich bisher gute Erfolge erzielen. Allerdings besteht bei der Embolisierung das Risiko des Rückflusses des Polymers mit der Folge einer Nekrose von gesundem Gewebe.

1.2.1.5 Arteriovenöse Fisteln

Bei den arteriovenösen Fisteln besteht ein direkter Kurzschluss zwischen Arterie und Vene. Prinzipiell können die Fisteln in allen Organen auftreten, werden aber häufig im Gehirn beobachtet. Letztere können mit akuten Blutungen oder venösem Bluthochdruck einhergehen (Burrows et al. 1998). Die arteriovenösen Fisteln sind schon bei Geburt angelegt und nehmen im Laufe des Lebens, bedingt durch hämodynamischen Stress, an Größe zu. Klinische Befunde sind ein starkes Pulsieren und lautes Schwirren über der Läsion, was nach körperlicher Anstrengung verstärkt wahrnehmbar ist. Der Therapieansatz gleicht dem der AVM.

1.2.2 Kombinierte bzw. gemischte vaskuläre Malformationen

Finden sich zwei oder mehrere vaskuläre Malformationen in einer Läsion, definiert man diese als kombinierte vaskuläre Malformation. Bezeichnet werden sie je nach den beteiligten Formen der Malformationen. Beispiele hierfür sind die kapillär-venösen, kapillär-lymphatischen, kapillär-arteriovenösen oder die lymphatisch-venösen Malformationen. Hierbei können sogenannte High-Flow- und Low-Flow-Malformationen gemeinsam auftreten.

1.2.3 Paragangiome (Glomustumore)

Paragangiome sind seltene, meist benigne Tumoren des peripheren Nervensystems. Aus der Bezeichnung des Tumors ist zu schließen, dass er von Paraganglien, Ansammlungen von neuroendokrinen Zellen, ausgeht. Paragangiome können grob in zwei Gruppen eingeteilt werden: adrenale Paragangiome, beispielsweise im Nebennierenmark, die auch als Phäochromozytome bezeichnet werden, und extra-adrenale Paragangiome. Von den extra-adrenalen treten 70% in der Kopf-Hals-Region auf und werden hier auch Glomustumore oder nicht-chromaffine Tumore genannt und von der WHO zu den „Tumoren des paraganglionären Systems“ gezählt (Gilbo et al. 2014). Sie kommen im Kopf-Hals-Bereich an vier Prädilektionsstellen vor: im Verlauf des Nervus vagus, an der Karotidgabel, in der Paukenhöhle und im Bereich des Foramen jugulare. Die Glomustumore der Paraganglien des Mittelohrs (Glomus tympanicum und Glomus jugulare) stellen die häufigsten Tumoren des Mittelohrs dar (Axmann et al. 2004). Die Patienten leiden unter einem pulssynchronen Ohrgeräusch oder einer Hörminderung. Schmerzen treten meist nicht auf. In seltenen Fällen kann es als Spätsymptom zu Blutungen aus dem betroffenen Ohr kommen. Auch in der Otoskopie kann ein pulssynchron pulsierender Prozess, der rötlich oder bläulich durch das Trommelfell sichtbar ist, beobachtet werden (Braun et al. 2004). Tumore des Glomus caroticum präsentieren sich als schmerzlose, langsam wachsende Schwellungen an der Bifurkation der Arteria carotis. Breiten diese sich in den parapharyngealen Spalt aus, kann es zu Ausfällen von kranialen Nerven oder Beeinträchtigung des sympathischen Grenzstrangs kommen.

Histologisch wird mitunter ein angiomatöses Wachstum der Tumorgefäße beschrieben, da diese dazu neigen sinusoidale Kanäle zu bilden und für eine starke Vaskularisierung des Paraganglioms sorgen (Ellison and Parham 2001). Als effektive therapeutische Maßnahmen kommen Chirurgie, Radiotherapie und stereotaktische Radiochirurgie zum Einsatz (Gilbo et al. 2014).

1.2.4 Anomalien der großen Gefäße

In diese Kategorie fallen unter anderem trunkale vaskuläre Malformationen, bei denen es sich um Malformationen anatomisch definierter Gefäße handelt.

Extratrukale Läsionen hingegen haben einen anderen embryologischen Ursprung. Sie kommen in anatomisch nicht definierten Gefäßen vor, die während der Embryogenese und somit noch vor Anlage des endgültigen Gefäßsystems in anatomisch inkorrekt Lage wachsen (Lee et al. 2004). Für extratrukale Malformationen entscheidend ist der klinisch schlecht vorhersehbare Verlauf und das fortbestehende Wachstumspotenzial. Dieses kann zur plötzlichen Ausdehnung der Anomalie, ausgelöst durch Traumata oder Hormontherapie, führen (Willenberg 2011).

1.3 Probleme der korrekten Klassifizierung von Gefäßfehlbildungen

Bei Gefäßfehlbildungen handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe von Malformationen und Tumoren, das Vorkommen von Mischformen erschwert eine sichere Differenzierung zusätzlich. Mit der modifizierten Klassifikation durch die ISSVA erfolgte bereits ein großer Schritt hin zu einem standardisierten Klassifikationssystem. In der Klinik ist eine Unterscheidung der Fehlbildungen jedoch durch das heterogene klinische Bild erschwert, wodurch es nicht selten zu einer fehlerhaften initialen Diagnosestellung kommt. Ferner wird häufig eine inkorrekte Nomenklatur verwendet.

Histopathologische Unterschiede bieten eine gute Möglichkeit zur genaueren Zuordnung von Gefäßfehlbildungen zu den einzelnen Untergruppen (Al-Adnani et al. 2006). Vaskuläre Tumoren zeigen beispielsweise eine anhaltende Proliferation von Endothelzellen, wohingegen vaskuläre Malformationen nur eine begrenzte postnatale mitotische Aktivität aufweisen (North and Mihm 2001). Je nach Entwicklungsstadium finden sich z.B. bei Hämangiomen in der Proliferationsphase kompakte Kapillaren mit plumpen Endothelzellen, sowie eine erhöhte mitotische Aktivität des Endothels. Während der Involution werden die Kapillaren durch fettig-fibröses Gewebe ersetzt und es finden sich vermehrt Mastzellen im Gewebe. Pyogene Granulome enthalten dagegen mehr epitheliale Anteile, normale Mastzellpopulationen und vornehmlich fibröse Septen zwischen den Kapillaren. Venöse Malformationen bestehen meist aus dünnwandigen, dilatierten Venen variabler Größe und können, als Folge des verlangsamten Blutflusses, Phlebolithen aufweisen (North and Mihm 2001; Gupta and Kozakewich 2011).

Überschneidungen der histopathologischen Merkmale sind jedoch nicht selten und können je nach Stadium der Läsionen vorkommen. Vor allem komplexere, gemischte Gefäßfehlbildungen enthalten häufig mehrere Gefäßtypen, was eine korrekte Zuordnung zu einer Gruppe erschwert. Die Immunphänotypisierung vaskulärer Anomalien mit Hilfe von immunhistochemischen Markern, bietet hier eine Möglichkeit zur Unterscheidung der Gefäßfehlbildungen.

1.4 Zielsetzung

Die korrekte Klassifizierung von Gefäßfehlbildungen im Kopf-Hals-Bereich stellt ein erhebliches Problem bei der histopathologischen Diagnostik dar. Standardisierte Verfahren zur Beurteilung von VA-Gewebeproben fehlen weitgehend. Um diese weiterzuentwickeln sollen immunhistochemisch gefärbte VA-Präparate digital erfasst und mittels digitaler Bildanalysesoftware quantitativ ausgewertet werden. Ziel der Arbeit ist zu prüfen, ob diese Methode bei der Zuordnung eines VA-Präparates zu einer der definierten VA-Untergruppen unterstützend eingesetzt werden kann. Im positiven Fall kann eine solche digitale Bildanalyse dem Pathologen bei der Zuordnung verschiedener VA zu der jeweiligen VA-Untergruppe assistieren.

2. Material

2.1 Patientengewebe

Für die Untersuchung an Patientengeweben liegt ein positives Votum der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg vor (AZ: 111/12). Gewebeproben wurden im Rahmen regulär geplanter medizinisch indizierter Operationen entnommen. Es wurden nur Gewebe verwendet, die nicht für die Diagnosefindung des Instituts für Pathologie benötigt wurden. In keinem Fall wurden Versuche direkt am Patienten durchgeführt.

2.2 Patientenkollektiv

Das Gewebe von 45 Patienten wurde immunhistochemisch untersucht (Tab. 2 und 3). Die Patienten wurden im Zeitraum 2000 - 2004 sowie 2012 - 2014 im Medizinischen Zentrum für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Universität Marburg behandelt. 22 FFPE-Gewebeproben wurden von dem Institut für Pathologie des UKGM Standort Marburg zur Verfügung gestellt. 23 weitere stammen aus der Comprehensive Biomaterial Bank Marburg (CBBMR, Leiterin: Prof. Dr. Dr. P. I. Pfefferle). Unter den Patienten befanden sich 5 mit der Diagnose eines Hämangioms (Häm), 4 mit einer venösen Malformation (VeM), 7 mit einer arteriovenösen Malformation (AVM), 5 mit einem Lymphangiom (LA), 6 mit einem Paragangliom (PG), 6 mit einem Granuloma pyogenicum (GP) und 7 mit der nicht näher klassifizierten Diagnose einer vaskulären Malformation (VM n.n.kl.). 5 weitere Gewebeproben dienten als Kontrollgewebe (Tabelle 3).

Die histopathologische Diagnoseerhebung erfolgte am Institut für Pathologie (UKGM GmbH, Standort Marburg, Direktor: Prof. Dr. R. Moll). Die mit Fallnummern gekennzeichneten Präparate wurden aus datenschutzrechtlichen Gründen pseudonymisiert.

Tabelle 2. Informationen zu Herkunft, VA-Typ und anatomischer Lokalisation der verwendeten VA-Gewebe.

Patient	Präparat	VA-Typ	Lokalisation	Geschlecht
1	10947	AVM	Oberlippe links	männlich
2	15678/13	AVM	Oberlippe	männlich
3	11944/13	AVM	Glandula parotis	weiblich
4	696/12	AVM	fazial rechtsseitig/Nase	männlich
5	4381/14	AVM	Stirn (+ intra- und extrakranielle „Feeder“)	weiblich
6	8194	AVM	Wange und Glandula parotis	männlich
7	1748/14	AVM	linke Gesichtshälfte	männlich
8	19076/12	Lymphangiom	Oberlippe / linke Wange	weiblich
9	10357/12 Probe 2	lymphatische Hyperplasie mit Lymphangiektasien	Zungengrund	männlich
10	9851/12 Probe 1	mikrozystisches Lymphangiom	Zungenrücken	weiblich
11	20686/13	Lymphangiom	perimandibulär links	männlich
12	11302/12	venös-lymphatische Malformation mit Lymphangiomenteilen	Zungenunterseite rechts	männlich
13	10408/13	Venöse low-flow Malformation	Oro-/ und Hypopharynx	männlich
14	20978/12	Venöse Malformation	rechts zervikal	weiblich
15	14211/14	Venöse Malformation (Cavernom)	Orbita links	weiblich

16	12030/12	Venöse Malformation	Musculus sternocleidomastoideus links	weiblich
17	11389/13	Hämangiom mit Narbengewebe	periorbital	weiblich
18	9469/14	Hämangiom	Musculus sternocleidomastoideus links	weiblich
19	11139/12	Hämangiom	linke Ohrmuschel	weiblich
20	3475	Kapilläres Hämangiom	k.A.	männlich
21	12312	Kavernöses Hämangiom	Wange links	weiblich
22	10330	Vaskuläre Malformation	k.A.	männlich
23	10718	Vaskuläre Malformation	Glandula Parotis	weiblich
24	6569	Vaskuläre Malformation	Nasenhaupthöhle	weiblich
25	7489	Vaskuläre Malformation	endonasal	weiblich
26	1873	Vaskuläre Malformation	Oberlippe	weiblich
27	10584/14	kapilläre Malformation	rechte Gesichtshälfte / Unterlippe	weiblich
28	16804/12	kapilläre Malformation	Unterlippe links	weiblich
29	18652/12	Paragangliom (Glomus caroticum)	Glomus caroticum links	männlich
30	2649	Paragangliom	Glomus tympanicum	weiblich
31	12542	Rezidiv eines Paraganglioms	rechts zervikal	männlich
32	2898	Rezidiv eines Paraganglioms	rechts zervikal	männlich
33	16566	Paragangliom	interaortocaval	weiblich

34	9645/13	Paragangliom	Glomus tympanicum	weiblich
35	6867	Granuloma pyogenicum	k.A.	weiblich
36	7421	Granuloma pyogenicum	Stimm lippe	weiblich
37	7595	Granuloma pyogenicum	k.A.	weiblich
38	12315	Granuloma pyogenicum	k.A.	männlich
39	6409	Granuloma pyogenicum	Zunge	weiblich
40	12070/13	Granuloma pyogenicum	Zungenunterseite	weiblich

AVM: arteriovenöse Malformationen, k.A.: keine Angabe

2.2.1 Kontrollgewebe

Um eine Aussage über die Expression der Kandidatenproteine in den untersuchten vaskulären Anomalien machen zu können, wurden nicht-Gefäß-assoziierte Erkrankungen der Haut immunhistochemisch ebenfalls mit den genannten Antikörpern (siehe 2.5.1) gefärbt und als Normalkontrollen verwendet. Die Herkunft der Referenzgewebe ist der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 3. Informationen zu Herkunft, Erkrankung und Lokalisation des Kontrollgewebes.

Patient	Präparat	Erkrankung	Lokalisation	Geschlecht
1	10715/13	tumorfremie Nasenschleimhaut	nasal	männlich
2	923/14	seborrhoische Warze	zervikal links	weiblich
3	14938/14	benigner mesenchymaler Tumor (Fibrom)	Kopfhaut	weiblich
4	6864/13	Tumorfrees Weichteilgewebe	präaurikulär links	männlich
5	12154/14	Haut mit subkutaner Fibrose	präaurikulär	weiblich

2.3 Chemikalien

Produkt	CAT#	Firma
Antibody Diluent with Background Reducing components	S3022	Dako, Glostrup, Dänemark
Corbit-Balsam	-	I. Hecht, Stadtrade
3,3'-Diaminobenzidine (DAB)	D7304	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ethanol	9065.1	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	104003	Merck, Darmstadt
Hämalaun	109249	Merck, Darmstadt
Hematoxylin Lösung	105175	Merck, Darmstadt
Methanol	106012	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	9265.1	Roth, Karlsruhe
Phosphate buffered saline (PBS)	L1825	Biochrom KG, Berlin
Roti-Histol®	6640.4	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Super PAP PEN IM3580	1056	Immunotech, Marseille, France
Tris-buffered saline (TBS)-Spülpuffer	1245.1	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tris Base	T1378	Sigma, Steinheim
Tris-HCL	9090.1	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	154563	Sigma, München
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat-Puffer	3580.1	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Universal Dako Labelled (Strept) Avidin-Biotin System, Horseradish Peroxidase (LSAB, HRP)	K0673	Dako, Glostrup, Dänemark
Wasserstoffperoxid (30%)	107209	Merck, Darmstadt

2.4 Puffer und Lösungen

Tris-Buffer-Saline (50 mM Tris-Cl, pH 7.4, 150 mM NaCl)

53 g NaCl, 12 g Tris, in 1000 ml a.d. 1:10 verdünnen und auf pH 7,4 einstellen

Tris-HCL-Puffer-Stammlösung 0,5 M (pH 7,4)

60,75 g Tris in ca. 500 ml a.d. lösen und mit 1 N HCL auf pH 7,4 einstellen, in 1000ml a.d. lösen

PBS-Puffer (phosphate buffer saline) 0,15 M (pH 7,4)

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH₂PO₄, 1,16 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O in 1000 ml a.d. lösen und auf pH 7,4 einstellen

Tri-Natriumcitrat-Dihydrat-Puffer 0,01 M (pH 6,0)

29,41 g in 1000 ml a.d. lösen und mit 1N HCL auf pH 6,0 einstellen

2.5 Antikörper

2.5.1 Primärantikörper

Antikörper	Klon/PAD	Dilution	CAT#	Firma
Anti-CD31 'mouse' monoklonal	JC70A	1:50	M0823	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti-CD34 'mouse' monoklonal	QBEnd-10	1:50	M7165	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti-Claudin 5 'rabbit' polyklonal	Z43.JK	1:300	34-1600	Zymed Laboratories, San Francisco, USA
Anti-PDPN 'mouse' monoklonal	D2-40	1:200	M361929-2	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti-Vimentin 'goat' monoklonal	clone V9	1:400	sc-6260	Santa Cruz, Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

2.5.2 Sekundärantikörper

Als Sekundärantikörper wurde das Universal Labelled (Strept)Avidin-Biotin2 System, HRP (Horseradish Peroxidase) von Dako, Glostrup, Dänemark verwendet, das am Primärantikörper aus Kaninchen und Mäusen bindet.

2.6 Geräte

Produkt	Firma
AxioCam HRc Zeiss Imager.M2	Carl Zeiss AG, Schweiz
Automatische Pipettierhilfe	Thermo Scientific, Braunschweig
Fedegari FVA3 Autoklav	Fedegari Autoklaven AG, Schweiz
Ceran-Laborkocher SLK 6	Schott Instruments GmbH, Mainz
Deckgläser 24x50mm	Thermo Scientific, Braunschweig
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Glasküvetten	Kobe, Marburg
Kochtopf Clipso	Tefal, Group SEB Deutschland GmbH, Frankfurt am Main
Labor-Spülautomat, G 7883 CD	Miele, Gütersloh
Lichtmikroskop	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Manuelle Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Objekträger Superfrost PLUS	Thermo Scientific, Braunschweig
Objekträger geschnitten, matttrand	Thermo Scientific, Braunschweig
Pasteur-Pipetten	Hirschmann Laborgeräte, Eberstad
Schlittenmikrotom RM2135	Leica, Bensheim
Tissue cool plate Cop20	Medite Medizintechnik, Burdorf
Ultra Tiefkühlschrank -86°C, MDF-U71V	Sanyo Fisher Sales GmbH, München
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
Wärmeschrank	Heraeus Instruments
Zentrifuge (Labofuge 400 R)	Medifuge Heraeus, Hanau
Zentrifuge Universal (30 RF)	Hettich, Tuttlingen

2.7 Software und Programme

Adobe Photoshop CS3, Version 10.0.1

AxioVision, Release 4.8 Zeiss Software

Fiji/ImageJ, Version 2.0.0 Open Source Image Processing Software

GraphPad Prism 7, Version 7.0a, GraphPad Software

Mendeley, Free Reference Manager, Version 1.16.3

Microsoft Excel 2011, Version 14.6.9

Microsoft Word 2011, Version 14.6.9

3. Methoden

3.1 Immunhistochemische Nachweismethoden

Mit der Methode der Immunhistochemie wird die Verteilung und das Vorkommen von spezifischen Antigenen in histologischen Gewebeschnitten untersucht. Dabei wird die Antigenspezifität von Antikörpern bzw. die Antigen-Antikörper-Interaktion durch Markierung des Antikörpers, z.B. mit einem Enzym oder einem Fluoreszenzfarbstoff, sichtbar gemacht. Abhängig von der Herstellungsart wird zwischen monoklonalen und polyklonalen Antikörpern unterschieden. Polyklonale Antikörper sind Antikörper, die im Zuge der natürlichen Immunreaktion gegen verschiedene Determinanten eines Antigens von klonal verschiedenen B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen gebildet werden. Die Herstellung polyklonaler Antikörper erfolgt durch die Injektion eines Antigens in ein Tier (typischerweise Kaninchen oder Ziege), wodurch die Bildung spezifischer Antikörper gegen das fremde Protein angeregt wird. Die Antikörper werden danach aus dem Antiserum des Tieres gewonnen. Ein Nachteil polyklonaler Antikörper stellt das relativ breite Reaktionsspektrum dar, da sie an unterschiedliche Oberflächenstrukturen, sogenannte Epitope, eines Antigens binden können. Dies kann zu unerwünschten Kreuzreaktionen mit ähnlichen Antigenstrukturen im Gewebe führen. Sie sind allerdings nicht selten weniger anfällig gegenüber Veränderungen am Antigen nach

Behandlung des Gewebes (z.B. Fixierung) als monoklonale Antikörper, da sie mehrere Antigenstrukturen erkennen.

Monoklonale Antikörper sind Klone eines einzelnen B-Lymphozyten. Sie weisen eine höhere Spezifität auf, da sie sich gegen ein einzelnes Epitop und damit nur gegen einen kurzen Abschnitt eines Antigens richten. Ihre Herstellung ist komplexer und erfolgt mit Hilfe der Hybridom-Technik. Auch hierbei wird, typischerweise einer Maus, zunächst ein Antigen injiziert. Werden nach einigen Wochen erhöhte Antikörper-Titer gemessen, erfolgt die Entnahme der Milz, da diese besonders viele B-Lymphozyten enthält. Die isolierten B-Lymphozyten werden hiernach durch Fusionierung mit Myelomzellen "unsterblich" gemacht, wobei sie im Folgenden als Hybridomazelle bezeichnet werden. Bei den Myelomzellen handelt es sich um maligne entartete Plasmazellen, die unter anderem ihre Fähigkeit zur Apoptose verloren haben. Somit ermöglichen sie der Hybridomazelle eine uneingeschränkte Proliferation und Produktion monoklonaler Antikörper. Durch Zugabe eines speziellen HAT-Mediums (enthält Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin), in dem nur Hybridomazellen überleben können, erfolgt deren Selektion. Mittels eines Screenings werden genau die Zellklone isoliert, die den gewünschten Antikörper produzieren. Die isolierten Zelllinien können anschließend kultiviert werden, um eine größere Menge des gewünschten Antikörpers zu produzieren (Plattner and Hentschel 2011).

3.1.1 Einsatz der (Strept)Avidin-Biotin-Methode in der Immunhistochemie

Bei der LSAB-Methode (Labelled (Strept)Avidin-Biotin) handelt es sich um ein modifiziertes Verfahren mit enzymmarkiertem Avidin-Biotin. Es ist eine in der Immunhistochemie eingesetzte sensitive Methode zum qualitativen Nachweis Antigen bindender Antikörper. Hierbei nutzt man die hohe Bindungsaffinität zwischen Avidin bzw. Streptavidin für Biotin Moleküle, die eine der stärksten bekannten nichtkovalenten biologischen Bindungen darstellt. Avidin ist ein basisches Hühnereiweiß-Glykoprotein mit vier hydrophoben Taschen an der Oberfläche, die als spezifische Biotin-Bindungsstellen dienen. Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin (Vitamin H), das nach der Bindung an Avidin inaktiviert wird. Zwei Grundprinzipien sind für dieses Verfahren von Bedeutung. Erstens

bindet Biotin an eine Vielzahl von Makromolekülen wie Enzyme, Antikörper oder Nukleinsäuren, ohne deren Eigenschaften zu verändern (Biotinylierung). Zweitens ermöglicht Biotin die Markierung von Avidin mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen, Schwermetallen oder Enzymen wie der Peroxidase. Für die Markierung wird in der LSAB-Methode die sogenannte Meerrettichperoxidase (HRP) verwendet. Avidin kann eine Brücke zwischen zwei biotinylierten Molekülen bilden. Um die Bindung eines Primärantikörpers an ein gesuchtes Epitop im Gewebe indirekt nachzuweisen, wird ein biotinylierter Sekundärantikörper genutzt, der den Primärantikörper detektiert (siehe Abbildung 1). Der Sekundärantikörper ist hierbei immer spezifisch für Immunglobuline der Spezies, in der der Primärantikörper hergestellt wurde. Avidin bindet an den biotinylierten Sekundärantikörper, der als Brückenantikörper zwischen dem Primärantikörper und dem Avidin-Biotin-Enzymkomplex dient. Avidin ist mit einer biotinylierten Horse-Radish-Peroxidase (HRP; Meerrettichperoxidase) gekoppelt, die der katalytischen Umsetzung eines Chromogens dient, wodurch spezifische Antigene sichtbar gemacht werden können (Viale et al. 1985). Die LSAB-Methode reagiert vier bis achtmal sensitiver, als die ebenfalls verbreitete ABC-Methode. Die höhere Sensitivität ist zurückzuführen auf die geringere Größe des enzymmarkierten (Strept)Avidin-Komplexes, im Vergleich zur Größe des Komplexes der ABC-Methode (Giorno 1984).

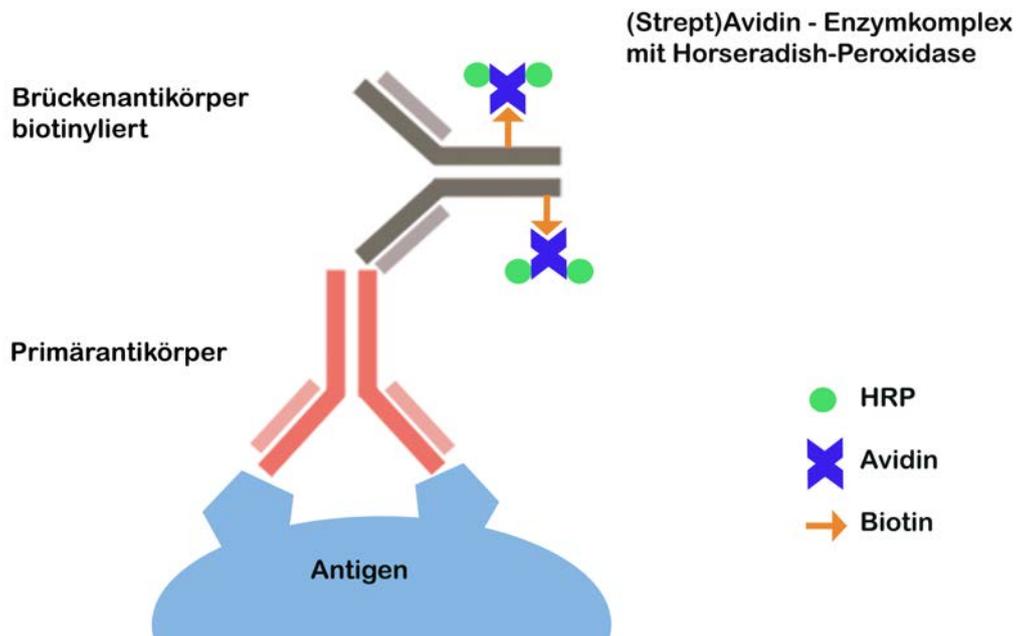


Abbildung 1. Vereinfachte Darstellung der LSAB-Methode. Zu sehen ist die Bindung des Primärantikörpers (rot) an ein Antigen im Gewebe. Danach erfolgt die Bindung eines sekundären biotinylierten Brückenantikörpers (grau) an den Primärantikörper. Das enzymmarkierte Avidin bindet über das Biotin am Sekundärantikörper. Die Horseradish-Peroxidase-Aktivität führt in Folge zur Bildung des Chromogens. HRP: Horseradish-Peroxidase. (Modifiziert nach <http://www.pathologie-online.de/methoden/immunhistologie>)

3.1.2 Vorbereitung des Gewebes für die immunhistochemische Färbung

3.1.2.1 Gewebefixierung und Paraffineinbettung

Das im Rahmen regulärer Operationen entnommene und fixierte Gewebe wird in Paraffin eingebettet, um einheitlich dünne, histologische Schnitte anfertigen zu können. Hierbei wird Gewebe 24 h in 4%iger gepufferter (pH 7,4) Formalinlösung fixiert. Eine Voraussetzung für die Paraffineinbettung stellt die Entwässerung mittels aufsteigender Alkoholreihe (bei 35 °C zweimal 2 h in 70%igem Alkohol, einmal 1 h in 90%igem Alkohol, bei +4 °C ca. 12 h in 100%igem Alkohol und zuletzt, zweimal 5 h in 100%igem Alkohol) dar. Danach wird das Gewebe für ca. 12 h bei +4 °C, anschließend zweimal für 5 h bei 35 °C in Roti-Histol inkubiert. Dieser Vorgang ist nötig um den Alkohol durch ein Intermedium, zu ersetzen, da Paraffin in Alkohol nicht löslich ist. Die Gewebeprobe wird nun einmal für 12 h und danach erneut für 24 h in flüssigem Paraffin eingelegt. Im letzten Schritt wird das Paraffin in Blockschalen ausgegossen wodurch ein Gewebblock der fixierten Gewebeprobe entsteht.

3.1.2.2 Herstellung von Schnittpräparaten

Mit einem Serienmikrotom werden die Schnitte vorgekühlter (-20°C) Paraffinblöcke in einer Stärke von 4–6 µm angefertigt und zum Strecken in ein warmes (36°C) Wasserbad gelegt. Anschließend werden diese auf Objektträger aufgezogen und bei 60 °C im Wärmeschrank für 1-2 h getrocknet.

3.1.2.3 Entparaffinierung, Rehydrierung und Demaskierung

Um das Paraffin wieder vollständig herauszulösen, werden die Präparate für 30 min in Roti-Histol inkubiert. Zur effektiven Rehydrierung der Gewebeschnitte müssen diese anschließend eine absteigende Alkoholreihe (100% - 90% - 70%) durchlaufen. Sie werden dann 30 min in 200 ml Methanol, versetzt mit 6 ml 30%igem H₂O₂, inkubiert, um endogene Peroxidasen im Gewebe zu blockieren. Nach fünfminütigem Spülen in Reinstwasser erfolgt eine Vorbehandlung, bei der durch die Formalinfixierung verborgene Epitope demaskiert und somit zugänglich gemacht werden. Hierzu werden die Schnittpräparate in einer Küvette, die 10 mM Na-Citrat-Puffer (pH 6) enthält, in einem Schnellkochtopf platziert, wobei mit Hilfe eines Thermometers kontrolliert wird, ob der Puffer die notwendige Temperatur (92-95 °C) erreicht hat. Nach einer Inkubation von 20 min verbleiben die Schnittpräparate für weitere 15 min in der Küvette um abzukühlen. Danach erfolgt für 30 min eine Spülung des Gewebes in TBS-Puffer und 5 min in Reinstwasser. Anschließend wird das Präparat auf den Objektträgern mit einem Fettstift umrandet, um zu gewährleisten, dass die im folgenden Schritt aufbrachten Reagenzien und Puffer auf dem Zielpräparat verbleiben.

3.1.2.4 Inkubation des Primär- und Sekundärantikörpers und Auftragung des Chromogens

Der Primärantikörper wird zunächst im angegebenen Verhältnis mit *Antibody Diluent-Lösung* verdünnt. Danach werden die Schnittpräparate mit dem jeweiligen Primärantikörper über Nacht in einer Feuchtkammer bei 7°C inkubiert. Vor Inkubation mit dem Sekundärantikörper werden die Schnittpräparate für eine Stunde bei 37 °C im Wärmeschrank erwärmt und für 15 min in PBS-Puffer gespült. Die Inkubationszeit mit dem Sekundärantikörper beträgt 30 min, wonach eine 15-minütige Spülung in PBS-Puffer erfolgt.

Anschließend wird der ABC-Komplex aufgetragen und 30 min auf den Präparaten belassen. Nach Spülung (5 min) in PBS-Puffer schließt sich die Inkubation in DAB-Substrat-Chromogen-Lösung an. Nach kurzer Spülung in H₂O (15 min) erfolgt die Gegenfärbung durch mehrmaliges Eintauchen der Schnitte in Hämatoxylin und nachfolgender Spülung in H₂O für 1 min. In einer aufsteigenden Alkoholreihe werden die Präparate dehydriert und nach zehnminütiger Inkubation in Roti-Histol in Corbit-Balsam eingedeckt.

3.1.3 Positiv- und Negativkontrollen

Zum Nachweis der Spezifität bzw. Validität der beobachteten Signale werden bei immunhistochemischen Untersuchungen Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt. Positivkontrollen dienen dem Ausschluss falsch negativer Ergebnisse, Negativkontrollen dem Ausschluss falsch positiver Ergebnisse. Für die Herstellung der Negativkontrollen wird größtenteils ein wichtiger Reaktionsschritt des Protokolls ausgelassen oder ersetzt. Hier wurde anstelle des Primärantikörpers ein unspezifisches Negativserum des gleichen Isotyps, wie das des Primärantikörpers, auf ein zweites Schnittpräparat auf dem Objektträger appliziert, das dann als Negativkontrolle dient. Um die Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion zu gewährleisten, wurde dieser Vorgang bei allen Präparaten durchgeführt. Kommt es hierbei zu einer positiven Reaktion, handelt es sich um eine unspezifische Reaktion, die durch eine fehlerhafte Vorbereitung der Proben, fehlerhafte Ausführung des Färbeprozesses oder fehlerhafte Anwendung der Reagenzien entstehen kann. Als interne Positivkontrollen werden Präparate aus dem Bereich der Haut verwendet, die viele Gefäßendothelien einschließlich Lymphendothelien aufweisen. Die positive Reaktion in diesen Geweben bestätigt die technisch korrekte Anwendung der Reagenzien, die Sensitivität der Antikörper und die richtige Behandlung der Präparate.

3.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

3.2.1 Fotodokumentation

Die histologischen Schnitte werden zur fotografischen Dokumentation mit einer Zeiss HRC Kamera an einem Axio Imager 2 Mikroskop mit Hilfe der Mikroskopie-Software Axiovision Rel 4.8 aufgenommen.

3.2.2 Digitale Bildanalyse

Das Ziel der Bildanalyse ist es, eine möglichst objektive und statistisch auswertbare Messung der Fläche der Signalintensitäten durchzuführen. Hierbei wird das Open-Source-Programm Fiji eingesetzt, das eine optimierte Form des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ darstellt, ursprünglich entwickelt von Wayne Rasband. Es wird bei zahlreichen biologischen Fragestellungen zur Analyse von Bilddaten eingesetzt (Schindelin et al. 2012). Fiji/ImageJ ist ein plattformunabhängiges Programm, das in Java programmiert wurde und auf einer öffentlichen Domain kostenlos und frei (Freeware) zugänglich ist (<http://imagej.net/Fiji/Downloads>).

Der Einsatz von Fiji/ImageJ wird im Folgenden an einem Präparat (10584 kapilläre Malformation) veranschaulicht:

Das Präparat wird bei 20-facher Vergrößerung mikroskopisch erfasst. Es werden hierbei jeweils zehn, sich nicht überlappende Bereiche innerhalb des Präparates mittels einer Digitalkamera beurteilt. Hierbei werden Bereiche gewählt, die pathologische Gewebestrukturen enthalten, beispielsweise Gefäße innerhalb der kapillären Malformation. Abbildung 2 zeigt eine typische mikroskopische Aufnahme der kapillären Malformation.



Abbildung 2. Unbearbeitete Aufnahme der kapillären Malformation. Zuvor wurde das Präparat mit einem Antikörper gegen CD31 gefärbt.

Nach digitaler Erfassung des histologischen Bildes (Abbildung 2) wird im Programm Fiji über die Symbolleiste unter *“Analyze → set scale”* eine Skalierung festgelegt. Mit Auswahl *“global”* werden auch alle weiteren Aufnahmen skaliert. Unter *“Image → Adjust”* mit *„Threshold Color“* wird der Farbschwellenwert festgelegt. Somit werden Bereiche ausgewählt, die oberhalb einer bestimmten Farbschwelle liegen. Im nächsten Schritt werden lediglich helle, gewebefreie Bereiche gemessen. Hierbei werden Farbton, Sättigung und Helligkeit so manuell eingestellt, dass lediglich die weißen, gewebefreien Bereiche ausgewählt sind. Ein Beispiel der Einstellung der Parameter ist in Abbildung 3 wiedergegeben. Das ausgewählte Gewebe wird rot dargestellt (siehe Abbildung 4). Die Anwendung *Dark background* ist für die erforderliche Messung nicht relevant.

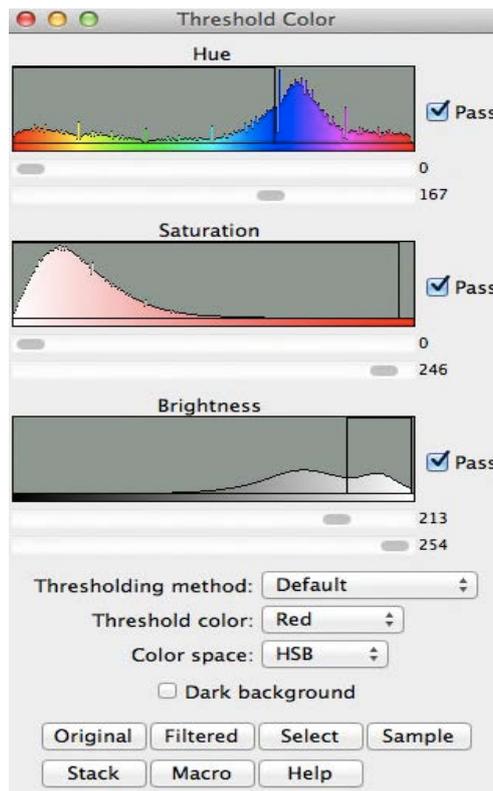


Abbildung 3. Beispiel zur Festlegung des RGB-Farbschwellenwertes (Threshold Color), Fiji/ImageJ.

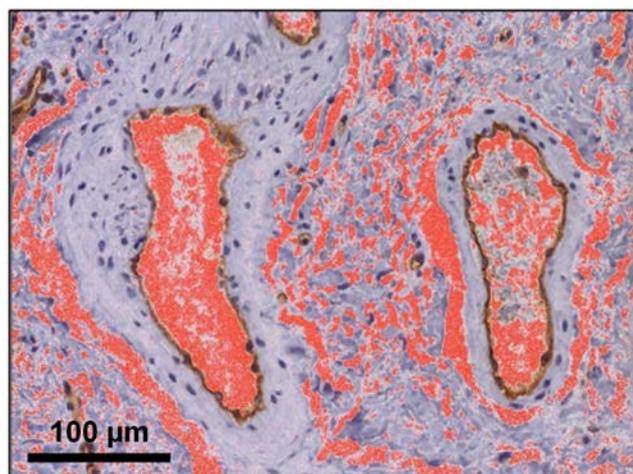


Abbildung 4. Einstellung des Farbschwellenwertes. Rot markiert ist der zu messende weiße, gewebefreie Bereich des Präparates. Braune Bereiche stellen DAB-positive Anteile dar.

Die markierten Areale werden quantitativ erfasst. Mit “*Analyze* → *Analyze Particles*“ werden die Signale dieser Bereiche gemessen. Die quantitative Darstellung der Ergebnisse ist in Abbildung 5 beispielhaft dargestellt.



Slice	Count	Total Area	Average Size	%Area	Mean
10584_CD31_20xA.jpg.tif	38827	37755.801	0.972	25.135	192.817

Abbildung 5. Ergebnisse nach der Messung des weißen gewebefreien Bereichs im Präparat. *Count*: Partikelanzahl in einem Bild; *Total Area*: Gesamtfläche aller Partikel; *Average Size*: Durchschnittliche Größe einer Fläche; *%Area*: Prozentualer Flächenanteil aller Partikel im Bild.

Im Folgenden schließt sich die Erfassung der braunen Signalbereiche des Präparates an (Antigenreaktionen). Diese Bereiche entsprechen dem positiven Signal, das durch die immunhistochemische DAB-Färbung entsteht und die Expression des untersuchten Proteins, in diesem Fall CD31, darstellt. Die Messung der braunen Bereiche erfolgt mit Hilfe eines Plugins, das von Jie Shu von der North China University of Technology entwickelt wurde (Shu et al. 2013). Aufgerufen wird es über Plugins → *“IHC Toolbox“* (siehe Abbildung 6).

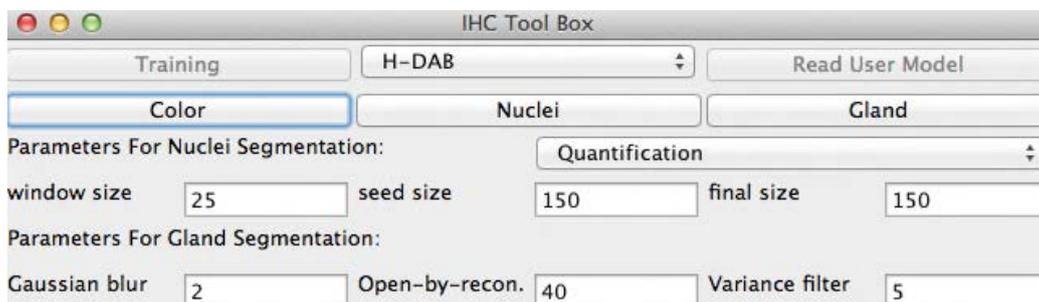


Abbildung 6. Verwendete Einstellung in der *“IHC-Toolbox“*. Sie dient der Hervorhebung der DAB-positiven Bereiche. (Das Plugin ist als Download erhältlich unter: <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/ihc-toolbox/index.html>).

In der *Toolbox* wird das H-DAB Modell ausgewählt, wie in Abbildung 6 zu sehen ist, da die Schnitte mit der DAB-Methode gefärbt wurden. Durch Wahl des Menüpunktes *„Color“*, werden die bei der DAB-Methode positiv gefärbten Bereiche extrahiert und in einem neuen Bild geöffnet (Abbildung 7).



Abbildung 7. Aufnahme des Präparates nach Isolierung des DAB-Signals mittels “IHC-Toolbox”. Das DAB-Signal stellt sich braun dar. DAB-negatives Gewebe wird nicht mehr erfasst.

Es wird ausschließlich der verbleibende braune Bereich gemessen. Die Vorgehensweise erfolgt, wie bei Messung der weißen Bereiche, mit “Image → Adjust → Threshold Color” (Abbildung 8)

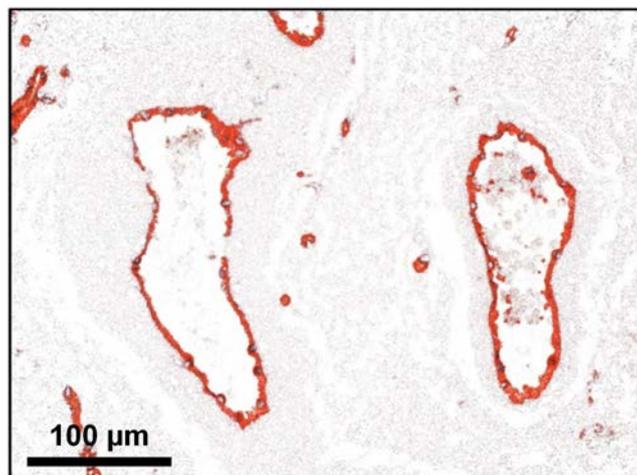


Abbildung 8. Aufnahme des rot markierten zu messenden Bereichs. Die Auswahl erfolgt durch Einstellung des Farbschwellenwertes, wie oben beschrieben.

Die Messung der Farbpartikel erfolgt wie o.g. über “Analyze → Analyze Particles”.

3.3 Auswertung der digital ermittelten Messwerte

Für die Auswertung ist der DAB-positiv gefärbte Bereich relevant. Dieser wird in der Spalte *%Area* (Abbildung 9) angegeben. Der DAB-positive Bereich zeigt den Anteil des Gewebes an, der durch den Antikörper angefärbt wird und das jeweilige Protein exprimiert. Es muss davon ausgegangen werden, dass die angefärbten Präparate nicht nur Gewebe der Gefäßfehlbildungen enthalten, sondern auch Bereiche aufweisen, die kein Gewebe enthalten. Vor allem enthalten Präparate vaskulärer Anomalien zahlreiche leere Gefäßlumina. Ebenso kann es zu Artefakten, in Form von Gewebeverlusten bei der chirurgischen Entnahme des Tumorgewebes, kommen. Diese Areale stellen sich in den Aufnahmen als weiße, gewebefreie Bereiche dar. Um eine Aussage über den Anteil des spezifischen Signals an der Gesamtfläche des Gewebes machen zu können, wird die Gesamtpräparatefläche durch Abzug des weißen, gewebefreien Bereichs nach unten korrigiert. Eine Beispielberechnung ist in Abbildung 9 dargestellt.



Slice	Count	Total Area	Average Size	%Area	Mean
10584_CD31_20xA.jpg.tif	38827	37755.801	0.972	25.135	192.817
Stain Color Detection	81751	16625.208	0.203	11.068	137.847

%Area: 25,135 = gemessener weißer, gewebefreier Bereich

11,068 = gemessener DAB-positiver Bereich

$100 - 25,135 = 74,865$ (tatsächliche Gewebefläche [%])

$100 \times 11,068 / 74,865 = \underline{14,784}$ (DAB-positiv gefärbtes Gewebe [%])

Abbildung 9. Ergebnisse der Messung sowie Beispielrechnung zur Auswertung der digital ermittelten Messwerte. Obere Zeile: weißer, gewebefreier Bereich; Untere Zeile: brauner Bereich = DAB-Signal als Zeichen der positiven Farbreaktion. *Count*: Punkte- bzw. Partikelanzahl in einem Bild; *Total Area*: Summe der Pixel aller Punkte; *Average Size*: Durchschnittliche Größe jedes Punktes in Pixeln; *%Area*: Prozentualer Flächenanteil aller Punkte im Bild.

Diese Berechnungen werden für alle Aufnahmen von sich nicht überlappenden Arealen durchgeführt, wodurch ein repräsentativer mittlerer Expressionswert eines Kandidatenproteins ermittelt werden kann. Durch Berechnung der Mittelwerte ergibt sich für jeden Antikörper ein bestimmter Zahlenwert pro Präparat. Für alle gefärbten Präparate wird der Standard Error of Mean (SEM) ermittelt (siehe Abbildungen 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44).

In die Beurteilung einbezogen werden ebenfalls die Verhältnisse (Quotienten) der Färbeergebnisse verschiedener Antikörper zueinander. Soll beispielsweise der Quotient der CD34 zu CD31 Signalwerte für Hämangiome ermittelt werden, wird er für jedes der beurteilten Präparate einzeln berechnet. Aus den einzelnen Quotienten, sämtlicher untersuchten Hämangiompräparate, wird der Mittelwert sowie der SEM gebildet. Daraus ergibt sich der Gesamtquotient CD34/CD31 für diesen Gewebetyp (siehe Abbildung 18), der anschließend für den Vergleich zwischen entsprechenden Gesamtquotienten anderer Gefäßfehlbildungen eingesetzt werden kann. Diese Quotienten werden im folgenden AK-Signalwert-Quotienten genannt.

3.4 Statistik und Darstellung der Ergebnisse

Aufgrund der Seltenheit der untersuchten Tumore (*Rare Disease*) stand lediglich eine limitierte Fallzahl für die Untersuchungen zur Verfügung. Für die statistische Auswertung wurde die GraphPad Prism 7 Software eingesetzt. Zur Berechnung statistischer Unterschiede zwischen den Gruppen wurde ein multipler Vergleichstest mittels einseitiger ANOVA-Analyse durchgeführt. Zur Korrektur wurde ein Post-Hoc-Tukey-Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ angewendet. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant erachtet.

Aufgrund der Art der Mittelwertberechnung der Quotienten stellen sich in den Balkendiagrammen (Abbildungen 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46) die berechneten Quotienten und ihre dazugehörigen inversen Quotienten nicht gespiegelt dar. Beispielsweise ergibt der Quotient aus Claudin 5 und Vimentin (CLDN5/VIM) den zweithöchsten Wert innerhalb der AVM, der inverse Quotient VIM/CLDN5 ergibt jedoch nicht den zweitniedrigsten Wert (Abbildung 22).

Berechnet wurde zuerst der Quotient für jedes einzelne Präparat. Aus diesen Quotienten wurde der Mittelwert für einen bestimmten Gewebetyp ermittelt. Dieses Vorgehen stellt sicher, dass der individuelle Quotient des Präparates berücksichtigt wird.

4. Ergebnisse

4.1 Expression der Kandidatenproteine in Gefäßmalformationen

Im Folgenden wird die Expression der fünf untersuchten Gefäßmarker in den verschiedenen Geweben betrachtet. Dargestellt ist der prozentuale DAB-positive Gewebeanteil, der sich nach Durchführung der Antikörperfärbungen in den jeweiligen Gewebetypen ergab.

4.1.1 CD31

In Geweben der arteriovenösen und der venösen Malformationen, der pyogenen Granulome und der Lymphangiome wurde ein nahezu gleich starkes CD31-Signal (15-16%) beobachtet. In Paragangliomen wurde ein durchschnittlicher Anteil von 13,2% CD31-positiven Gewebes gemessen. Das Kontrollgewebe und die vaskulären Malformationen weisen eine CD31-Expression in 9% des Gesamtgewebes auf. Die niedrigsten (7,4%) CD31-Expressionswerte zeigen sich bei den Hämangiomen. Die gemessenen Signalunterschiede erreichten keine statistische Signifikanz (Abbildung 10).

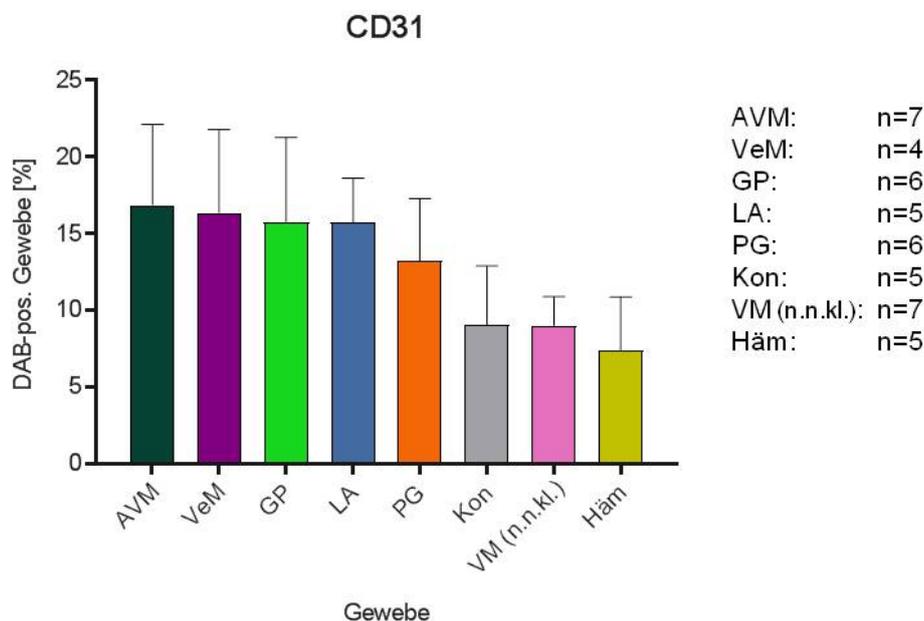


Abbildung 10. Säulendiagramm zur Darstellung der CD31-Expression in den untersuchten Geweben. Dargestellt sind die Gesamtmittelwerte des prozentualen DAB-positiven Gewebeanteils mit SEM. Die Prozentwerte geben das Verhältnis des CD31-Signals zum Gesamtgewebe an. AVM = arteriovenöse Malformation, VeM = venöse Malformation, GP = Granuloma pyogenicum, LA = Lymphangiom, PG = Paragangliom, Kon = Kontrolle, VM (n.n.kl.) = vaskuläre Malformation (nicht näher klassifiziert), Häm = Hämangiom.

4.1.2 CD34

Mit einem DAB-positiven Anteil von 38,7%, wurde bei Paragangliomen die höchste Expression des Endothelmarkers CD34 gemessen. Innerhalb der venösen und arteriovenösen Malformationen sowie in den Hämangiomen zeigte sich eine CD34-positive Reaktion in ca. 30% des Gewebes. Die Lymphangiome weisen einen positiven Gewebeanteil von 26% auf. In vaskulären Malformationen und pyogenen Granulomen färbten sich ca. 23% des Tumorgewebes positiv an. Mit einem 20%igen positiven Anteil zeigt das Kontrollgewebe den niedrigsten Wert. Zusammengefasst ergibt der Vergleich der Messungen eine relativ homogene CD34-Expression innerhalb der Gewebe (Abbildung 11). Die Werte zeigen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

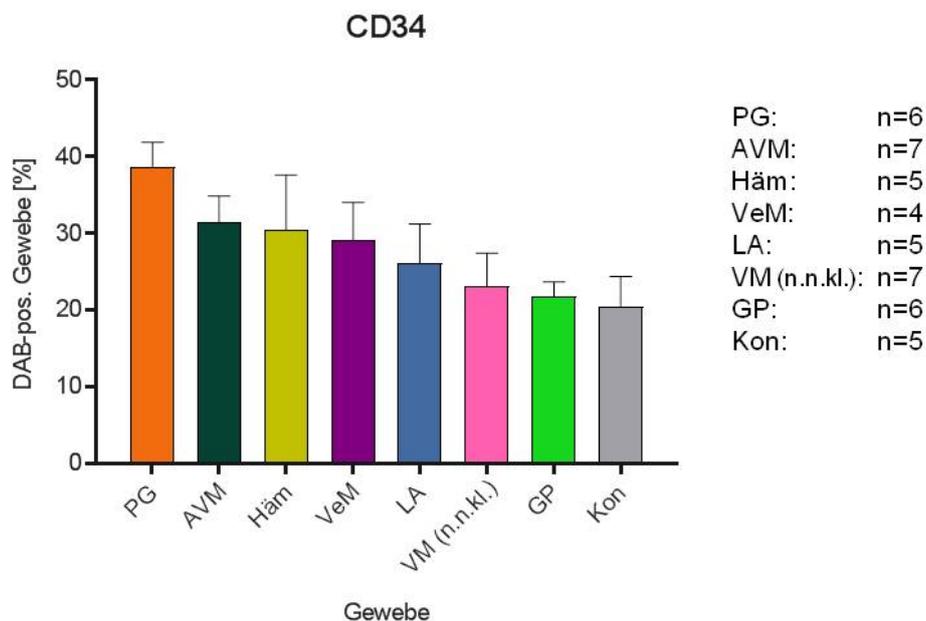


Abbildung 11. Säulendiagramm zur Darstellung der CD34-Expression in den untersuchten Geweben. Dargestellt sind die Gesamtmittelwerte des prozentualen DAB-positiven Gewebeanteils mit SEM. Die Prozentwerte geben das Verhältnis des CD34-Signals zum Gesamtgewebe an. PG = Paragangliom, AVM = arteriovenöse Malformation, Häm = Hämangiom, VeM = venöse Malformation, LA = Lymphangiom, VM (n.n.kl.) = vaskuläre Malformation (nicht näher klassifiziert), GP = Granuloma pyogenicum, Kon = Kontrolle.

4.1.3 Claudin 5 (CLDN5)

Wie in Abbildung 12 dargestellt, zeigen die pyogenen Granulome mit 18,5% den größten Anteil CLDN5-positiven Gewebes. In Paragangliomen und venösen Malformationen zeigen 14% des Gewebes eine positive Reaktion. Die Ergebnisse für arteriovenöse Malformationen und Kontrollen weisen mit 11% ähnliche Expressionswerte auf. Ein DAB-positiver Gewebeanteil von 9% ergibt sich für vaskuläre Malformationen sowie für Lymphangiome. Der niedrigste positive Anteil wurde in Hämangiomen nachgewiesen (7,7%). Die beobachteten Unterschiede erreichen jedoch keine statistische Signifikanz.

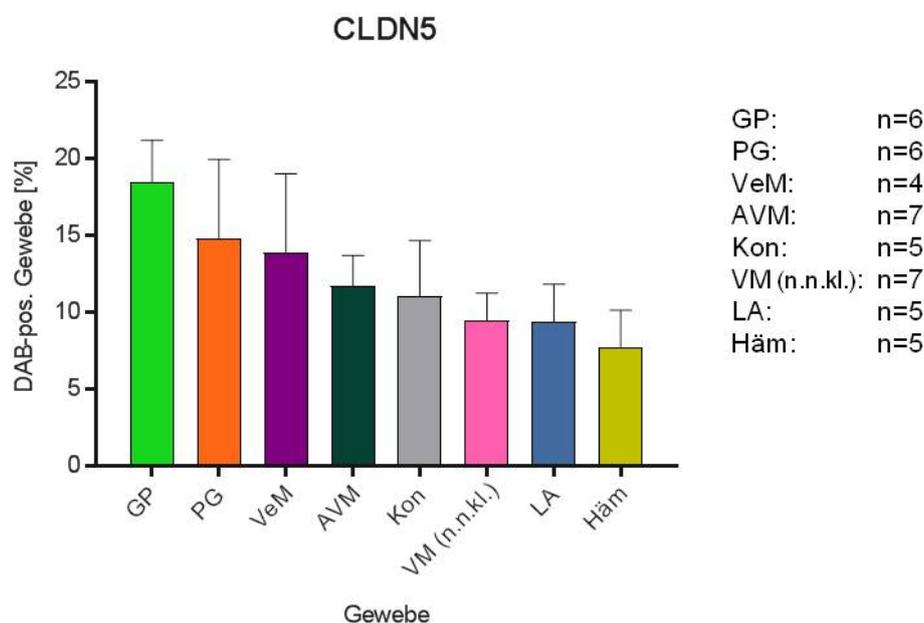


Abbildung 12. Säulendiagramm zur Darstellung der CLDN5-Expression in den untersuchten Geweben. Dargestellt sind die Gesamtmittelwerte des prozentualen DAB-positiven Gewebeanteils mit SEM. Die Prozentwerte geben das Verhältnis des CLDN5-Signals zum Gesamtgewebe an. GP = Granuloma pyogenicum, PG = Paragangliom, VeM = venöse Malformation, AVM = arteriovenöse Malformation, Kon = Kontrolle, VM (n.n.kl.) = vaskuläre Malformation (nicht näher klassifiziert), LA = Lymphangiom, Häm = Hämangiom.

4.1.4 Podoplanin (PDPN)

Färbungen mit dem Anti-PDPN Antikörper D2-40 zeigen mit 20% den höchsten DAB-positiven Gewebeanteil bei Lymphangiomen (Abbildung 13). Damit wurde im Vergleich zu Paragangiomen, vaskulären Malformationen, Kontrollen, venösen Malformationen und Hämangiomen signifikant mehr Gewebe angefärbt ($p < 0,01$). In pyogenen Granulomen und arteriovenösen Malformationen wurden ca. 12% PDPN-positives Gewebe nachgewiesen. In einem niedrigeren Wertebereich liegen Paragangiome, n.n.kl. vaskulären Malformationen und die Kontrollgewebe. Bei diesen Geweben wurde in 6-7% eine positive Reaktion beobachtet, was signifikant weniger ist als bei Lymphangiomen. Messungen für venöse Malformationen und Hämangiome ergeben einen positiven Gewebeanteil von ca. 4,5%. Dies stellt im Vergleich zu den Ergebnissen für Lymphangiome den signifikant niedrigsten Anteil dar.

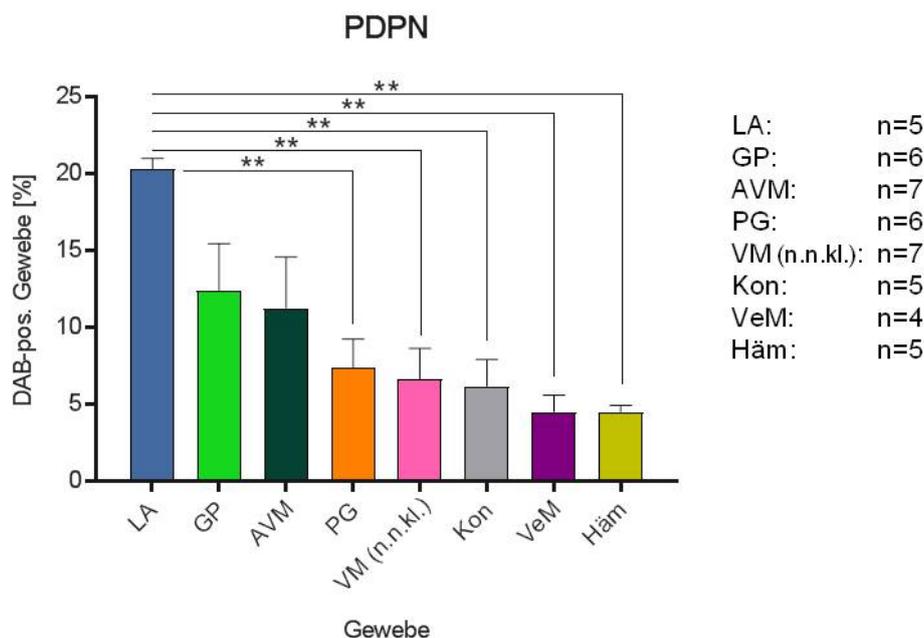


Abbildung 13. Säulendiagramm zur Darstellung der PDPN-Expression in den untersuchten Geweben. Dargestellt sind die Gesamtmittelwerte des prozentualen DAB-positiven Gewebeanteils mit SEM und die statistisch signifikanten Unterschiede der PDPN-Signale zwischen den verschiedenen Gewebetypen, $**=p < 0,01$. Die Prozentwerte geben das Verhältnis des PDPN-Signals zur Gesamtgewebefläche an. LA = Lymphangiom, GP = Granuloma pyogenicum, AVM = arteriovenöse Malformation, PG = Paragangiom, VM (n.n.kl.) = vaskuläre Malformation (nicht näher klassifiziert), Kon = Kontrolle, VeM = venöse Malformation, Häm = Hämangiom.

4.1.5 Vimentin (VIM)

Die VIM-Expression in den untersuchten Geweben ist in Abbildung 14 dargestellt. Bei pyogenen Granulomen wurde mit einem Anteil von 26,5% des Gesamtgewebes der größte DAB-positive Gewebebereich für VIM gemessen. Der geringste Anteil zeigt sich bei Lymphangiomen, mit einem VIM-positiven Anteil von lediglich 8%. Alle weiteren Messungen für arteriovenöse Malformationen, Paragangliome, venöse Malformationen Kontrollgewebe, vaskuläre Malformation (n.n.kl.), und Hämangiome ergeben 14-17% positive Gewebeareale. Die Expression von VIM stellt sich somit sehr homogen in den untersuchten Geweben dar.

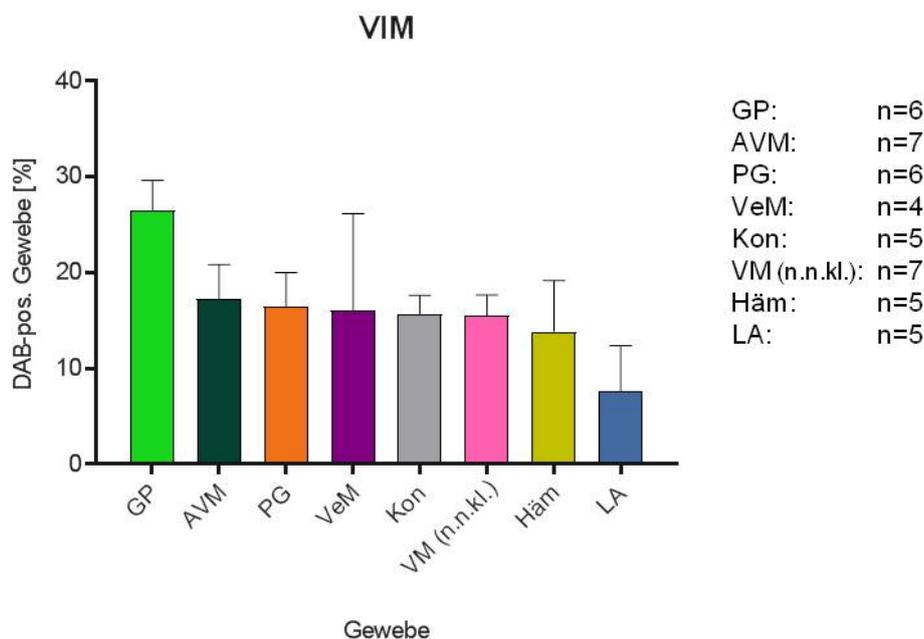


Abbildung 14. Säulendigramm zur Darstellung der VIM-Expression in den untersuchten Geweben. Dargestellt sind die Gesamtmittelwerte des prozentualen DAB-positiven Gewebeanteils mit SEM. Die Prozentwerte geben das Verhältnis der VIM-Signale zum Gesamtgewebe an. GP = Granuloma pyogenicum, AVM = arteriovenöse Malformation, PG = Paragangliom, VeM = venöse Malformation, Kon = Kontrolle, VM (n.n.kl.) = vaskuläre Malformation (nicht näher klassifiziert), Häm = Hämangiom, LA = Lymphangiom.

4.2 Digitale Quantifizierung der DAB-Signale, Darstellung der Kandidatenproteinexpression und der AK-Signalwert-Quotienten

4.2.1 Lymphangiome

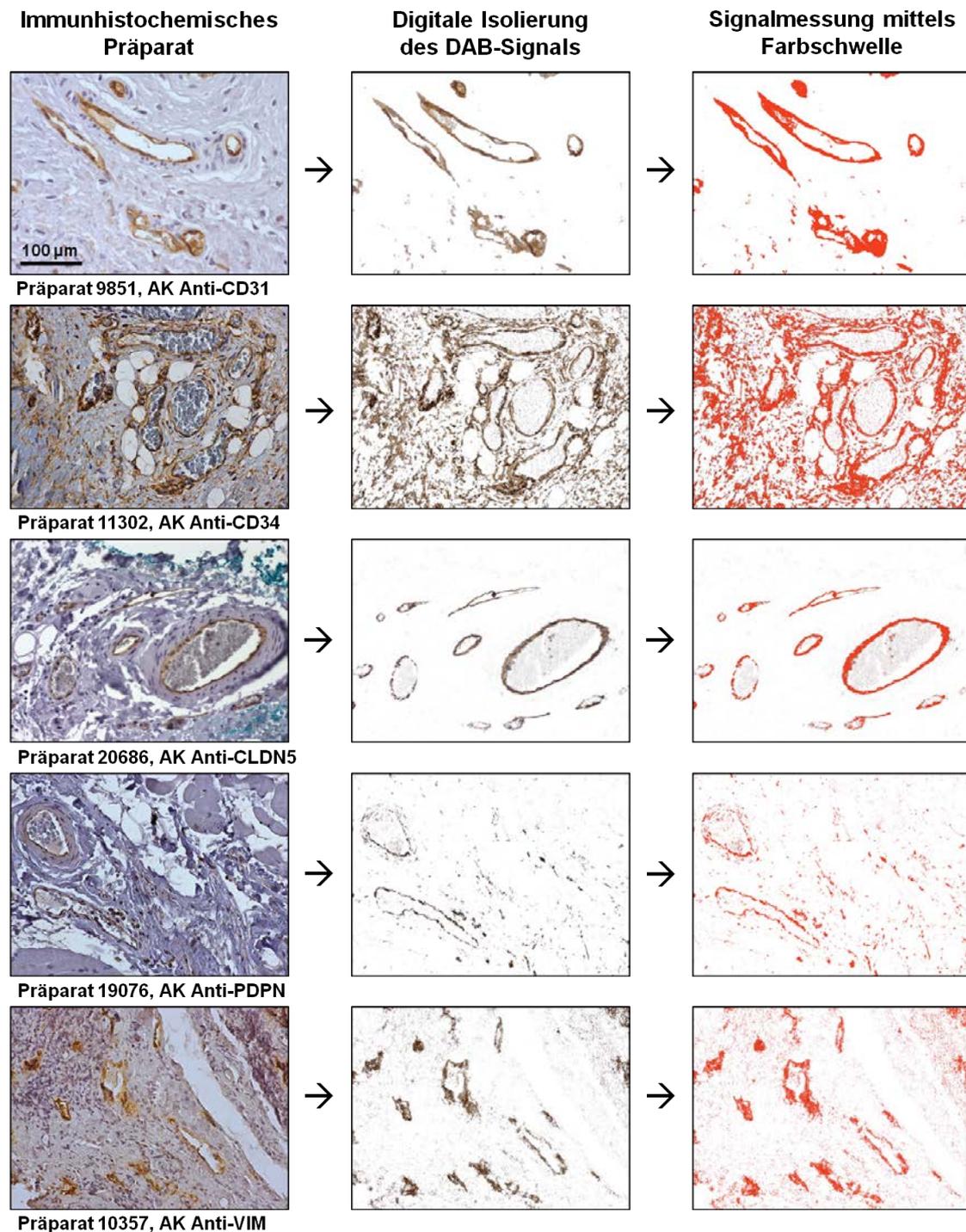


Abbildung 15. Beispielhafte Darstellung der digitalen Erfassung des DAB-Signals aller 5 AK-Färbungen in Lymphangiomen. Von links nach rechts sind die Arbeitsschritte der digitalen Auswertung eines Präparates mit Hilfe des Programms ImageJ/Fiji dargestellt. Beispielhaft sind fünf Präparate in 20-facher Vergrößerung aufgezeigt, gefärbt mit dem jeweils angegebenen AK, wobei sich eine positive Färbereaktion braun darstellt. Die Bilder in der Mitte zeigen die Isolierung des DAB-positiven Gewebes mit Hilfe der ImageJ/Fiji-IHC-Toolbox. In der rechten Bildspalte ist die sich anschließende Signalmessung durch Einstellung des Farbschwellenwertes (*Threshold Color*) abgebildet. Die Rotfärbung zeigt an, welche Bereiche bei der Messung erfasst wurden.

Abbildung 15 zeigt Beispiele zur Auswertung der Expression von Kandidatenproteinen in Lymphangiomen mit dem Programm ImageJ/Fiji und gibt einen Einblick in die quantitative Bildanalyse. Die Aufnahmen der linken Spalte (immunhistochemisches Präparat) zeigen die angefertigten immunhistochemischen Färbungen verschiedener Lymphangiompräparate, in denen sich eine positive Reaktion braun darstellt. Die verwendeten Antikörper gerichtet gegen CD31, CD34, CLDN5, PDPN und VIM sind beispielhaft dargestellt. Die zweite Bildspalte zeigt die Präparate im Anschluss an die digitale Isolierung des braunen DAB-positiven Signals unter Verwendung der *IHC-Toolbox*. Dies verdeutlicht, wie präzise die positive Antikörperreaktion aus dem Gesamtgewebe herausgefiltert werden kann. Somit wurde sichergestellt, dass nur das spezifische DAB-Signal gemessen wurde. Im letzten Schritt erfolgt die Messung mit Hilfe der Einstellung des Farbschwellenwertes. In der rechten Spalte sind die gemessenen, rot markierten DAB-Signale aufgeführt, die schließlich als Messwert erfasst wurden.

Abbildung 16 zeigt die ausgewerteten Ergebnisse. Hier ist der Nachweis der Kandidatenproteinsignale innerhalb der Lymphangiome dargestellt. Gezeigt ist der Gesamtmittelwert der prozentualen Anteile des DAB-positiven Gewebes bezogen auf das gesamte Gewebe.

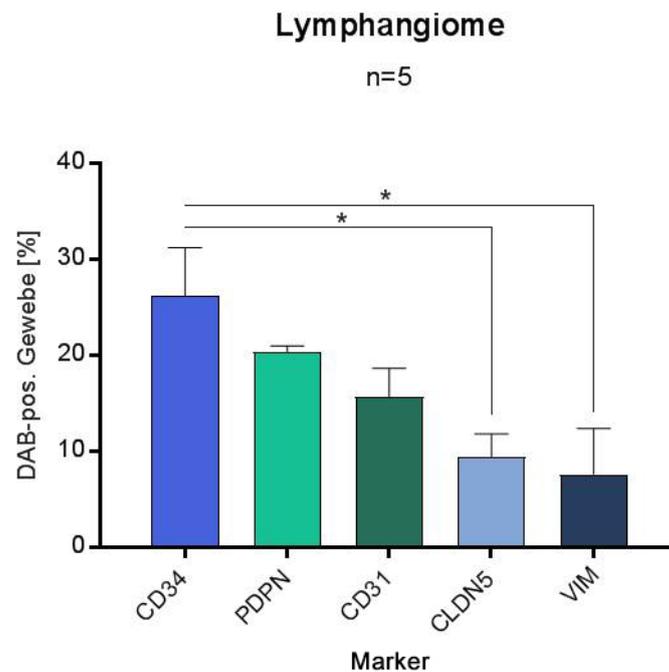


Abbildung 16. Säulendiagramm zur Darstellung der DAB-positiven Gewebeanteile für die verschiedenen Marker innerhalb der Lymphangiome. Dargestellt sind Gesamtmittelwerte mit SEM. * $p < 0,05$.

Der größte Anteil DAB-positiv gefärbten Lymphangiomgewebes ergibt sich nach Färbung mit dem Anti-CD34 AK. Dieser färbt mit 26% einen signifikant höheren Anteil des Gewebes an, als die Anti-CLDN5 (9,4%) und Anti-VIM (7,6%) AK ($p < 0,05$). Durch den Anti-Podoplanin AK wurde ein Anteil von 20% des Gewebes positiv angefärbt. Dieser unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von den Werten der anderen AK. 15,7% DAB-positives Gewebe zeigt sich nach Färbung mit dem Anti-CD31 AK, die sich damit von CLDN5 und VIM abhebt. VIM weist den geringsten DAB-positiv gefärbten Anteil auf.

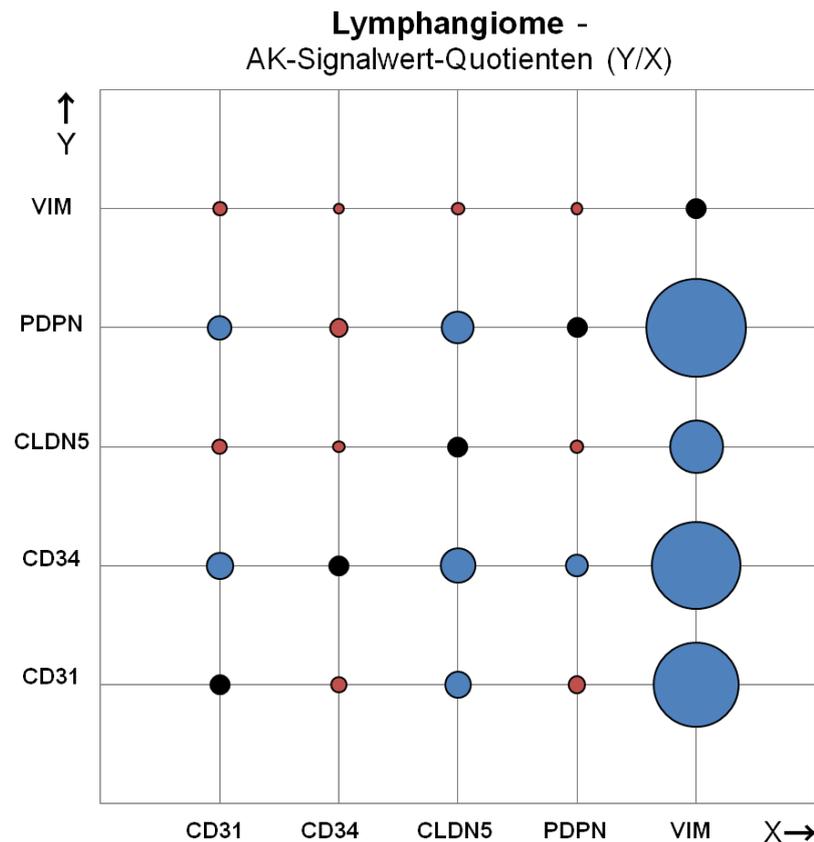


Abbildung 17. Kreisflächendiagramm zur Darstellung der Verhältnisse der AK-Signalwerte in Lymphangiomen. Die hier als Kreisfläche dargestellten AK-Signalwert-Quotienten sind Mittelwerte aus den Quotienten einzelner Präparate. So repräsentiert die Kreisfläche unten rechts das Verhältnis von CD31 zu VIM, das sich aus der Mittelwertbildung der Quotienten CD31/VIM aller Lymphangiom-Präparate ergibt. Schwarz: Wert = 1 (Bsp. CD31/CD31); Blau: Werte > 1; Rot: Werte < 1.

Abbildung 17 zeigt ein Flächendiagramm zur Veranschaulichung der Quotienten der AK-Signalwerte innerhalb der Lymphangiome. Auffällig sind vor allem die Verhältnisse der Marker Podoplanin, CD34 und CD31 zu dem Marker VIM. Durch die Größe der Kreisflächen ist ersichtlich, dass sie einen weitaus höheren Wert als 1 aufweisen. Das sich ergebende Muster der unterschiedlich großen Kreisflächen steht für eine charakteristische Anfärbung der Lymphangiome durch die fünf AK. Für PDPN ergeben sich weitere Quotienten mit Werten größer eins im Verhältnis zu CD31 und CLDN5. Es liegen sowohl die Quotienten CD34/CD31, CD34/CLDN5 und CD34/PDPN knapp über eins, als auch der Quotient CD31/CLDN5. Die signifikanten Unterschiede der Quotienten sind in Abbildung 18 im Balkendiagramm dargestellt.

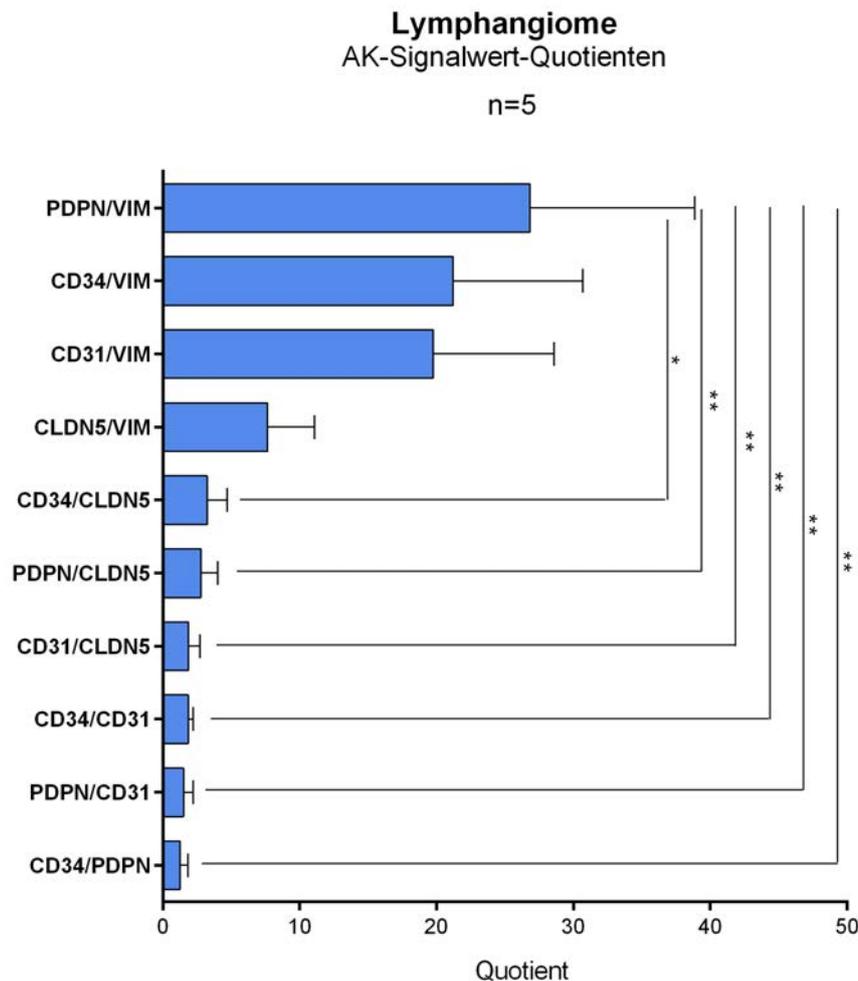


Abbildung 18. Balkendiagramm mit Darstellung der Verhältnisse der Kandidatenprotein-expression innerhalb der Lymphangiome. Die hier dargestellten AK-Signalwert-Quotienten sind Mittelwerte aus den Quotienten einzelner Präparate. Betrachtet werden signifikante Quotienten ≥ 1 . * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Verglichen werden Quotienten mit Werten ≥ 1 . Im Gewebe der Lymphangiome ist der Quotient zwischen PDPN und VIM besonders groß. Er hebt sich mit $p < 0,01$ signifikant ab von den Quotienten CD34/PDPN, PDPN/CD31, CD34/CD31, CD31/CLDN5 und PDPN/CLDN5 und mit $p < 0,05$ von dem Quotienten CD34/CLDN5. Die Verhältnisse von CD34 und CD31 zu VIM zeigen ähnlich hohe Werte, sind jedoch nicht signifikant im Vergleich zu den anderen Quotienten. Niedrige Quotienten ergeben sich für die CD34-, PDPN- und CD31 Signalwerte im Verhältnis zu CLDN5.

4.2.2 Arteriovenöse Malformationen

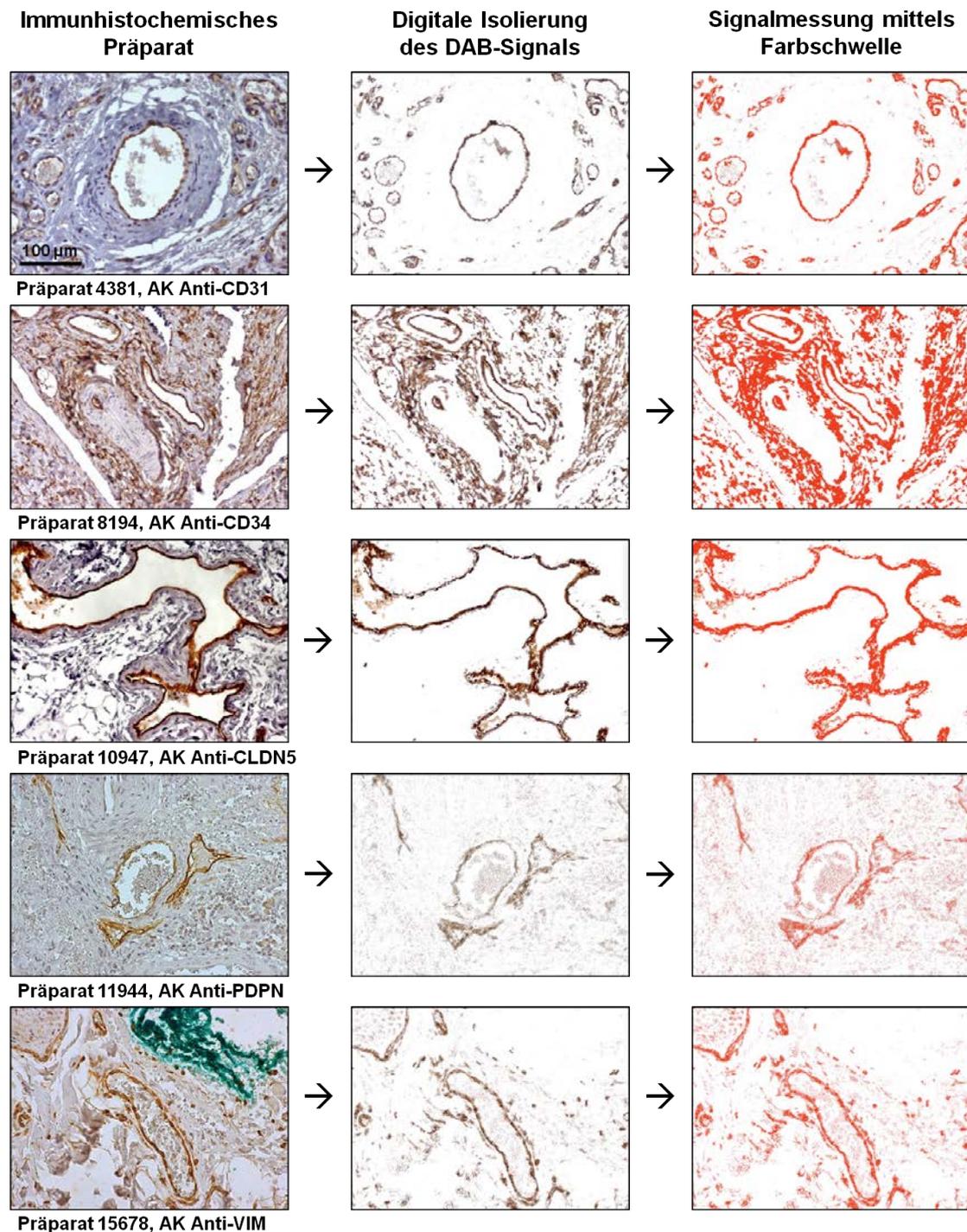


Abbildung 19. Beispielhafte Darstellung der digitalen Erfassung des DAB-Signals aller 5 AK-Färbungen in arteriovenösen Malformationen. Von links nach rechts sind die Arbeitsschritte der digitalen Auswertung eines Präparates mit Hilfe des Programms ImageJ/Fiji dargestellt. Beispielhaft sind fünf Präparate in 20-facher Vergrößerung aufgezeigt, gefärbt mit dem jeweils angegebenen AK, wobei sich eine positive Färbereaktion braun darstellt. Die Bilder in der Mitte zeigen die Isolierung des DAB-positiven Gewebes mit Hilfe der ImageJ/Fiji-IHC-Toolbox. In der rechten Bildspalte ist die sich anschließende Signalmessung durch Einstellung des Farbschwellenwertes (*Threshold Color*) abgebildet. Die Rotfärbung zeigt an, welche Bereiche bei der Messung erfasst wurden.

Eine Darstellung des Vorgehens zur Messung des spezifischen Signals innerhalb der AVM ist in Abbildung 19 gezeigt. In Abbildung 20 sind die Signalintensitäten für die fünf untersuchten Marker dargestellt.

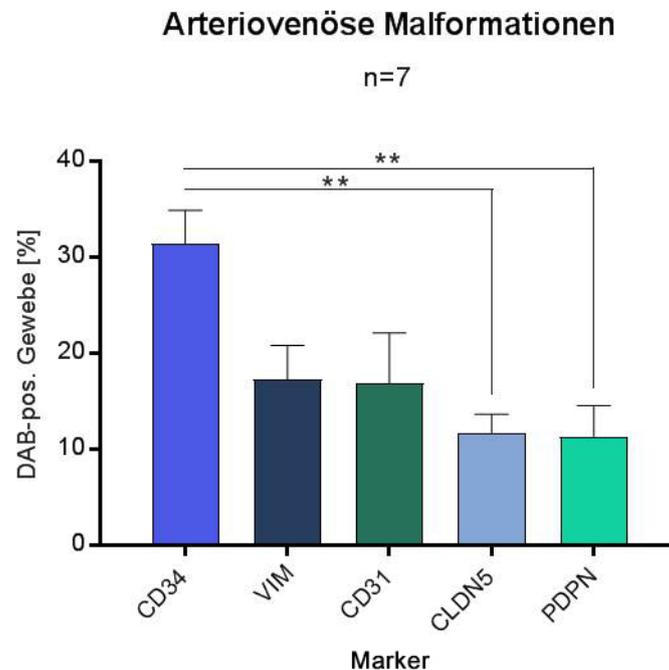


Abbildung 20. Säulendiagramm zur Darstellung der DAB-positiven Gewebeanteile für die verschiedenen Marker innerhalb der arteriovenösen Malformationen. Dargestellt sind Gesamtmittelwerte mit SEM. $**p < 0,01$.

Innerhalb der AVM entfällt der größte Anteil DAB-positiv gefärbten Gewebes auf den Endothelmarker CD34. Hierbei ist der positive Anteil von 31,4% signifikant höher als der von CLDN5 und PDPN ($p < 0,01$). Die Antikörper Anti-CD31 und Anti-VIM färben mit ca. 17% einen nahezu gleich großen Anteil des AVM-Gewebes positiv an, jedoch ohne Signifikanzniveau verglichen mit den Signalen der anderen AK. Mit 11% zeigen die Marker CLDN5 und PDPN die niedrigsten Färbewerte innerhalb der AVM.

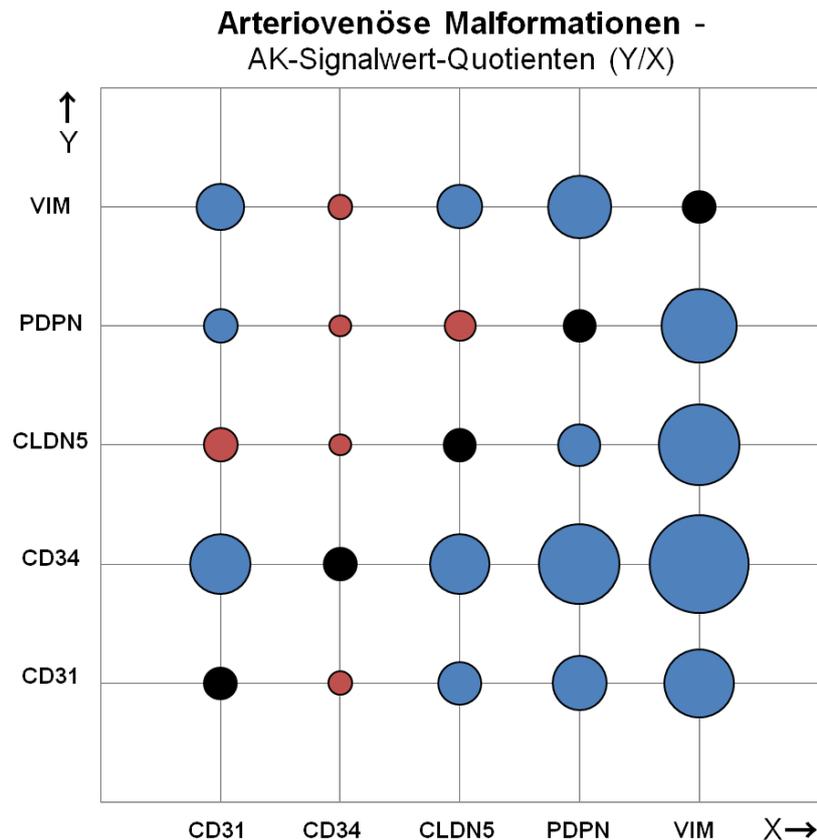


Abbildung 21. Kreisflächendiagramm zur Darstellung der Verhältnisse der AK-Signalwerte in arteriovenösen Malformationen. Die hier als Kreisfläche dargestellten AK-Signalwert-Quotienten sind Mittelwerte aus den Quotienten einzelner Präparate. So repräsentiert die Kreisfläche unten rechts das Verhältnis von CD31 zu VIM, das sich aus der Mittelwertbildung der Quotienten CD31/VIM aller Präparate der arteriovenösen Malformationen ergibt. Schwarz: Wert = 1 (Bsp. CD31/CD31); Blau: Werte > 1; Rot: Werte < 1.

Abbildung 21 zeigt das für diese Gewebe charakteristische Muster der Kandidatenproteinexpression. Die Größen der Quotienten sind im Diagramm als Kreisflächen dargestellt. Besonders erhöht zeigen sich die Quotienten der CD34, CLDN5 und PDPN Signale zu VIM. Ebenfalls hoch zeigt sich der Quotient von CD34 zu PDPN bzw. CD31. Nahezu gleichgroße Quotienten wurden für VIM/PDPN, CD34/CD31 und CD31/VIM nachgewiesen. Kleinere Quotienten, aber dennoch mit Werten größer eins, ergeben sich für CD31 zu CLDN5 und PDPN. Auch die Quotienten VIM/CD31, VIM/CLDN5 und CLDN5/PDPN sind größer als eins. In Abbildung 22 sind die statistisch signifikanten Unterschiede dieser Quotienten in einem Balkendiagramm dargestellt.

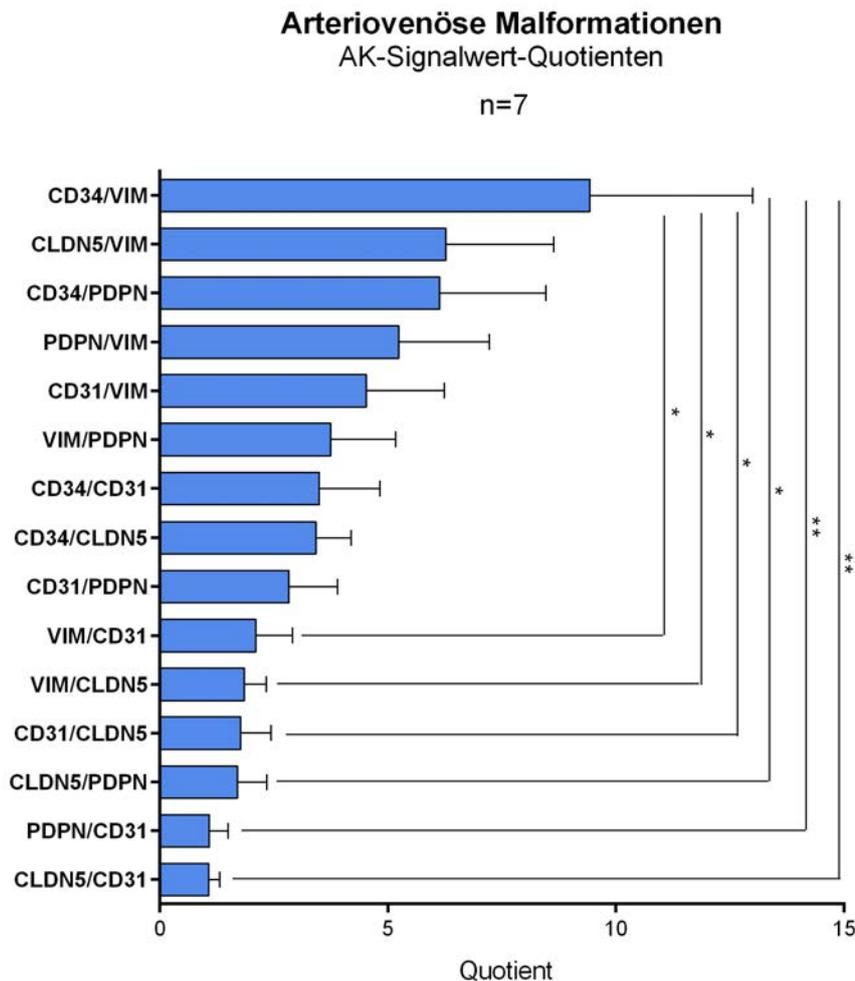


Abbildung 22. Balkendiagramm mit Darstellung der Verhältnisse der Kandidatenprotein-expression innerhalb der arteriovenösen Malformationen. Die hier dargestellten AK-Signalwert-Quotienten sind Mittelwerte aus den Quotienten einzelner Präparate. Betrachtet werden signifikante Quotienten ≥ 1 . * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Verglichen wurden auch bei diesem Gewebe Quotienten mit Werten größer eins. Besonders hoch ist der Quotient zwischen CD34/VIM, der signifikant größere Werte ergibt als die Quotienten CLDN5/CD31 und PDPN/CD31 ($p < 0,01$). Von den Quotienten CLDN5/PDPN, CD31/CLDN5, VIM/CLDN5 sowie VIM/CD31 hebt er sich ebenfalls signifikant ($p < 0,05$) ab. Weitere Quotienten mit deutlich größeren Werten über eins, ergeben sich für CLDN5, PDPN und CD31 im Verhältnis zu VIM und für CD34/PDPN. Diese Quotienten unterscheiden sich jedoch nicht signifikant von den anderen Quotienten. Die niedrigsten Quotientenwerte ergeben sich für PDPN und CLDN5 zu CD31.

4.2.3 Hämangiome

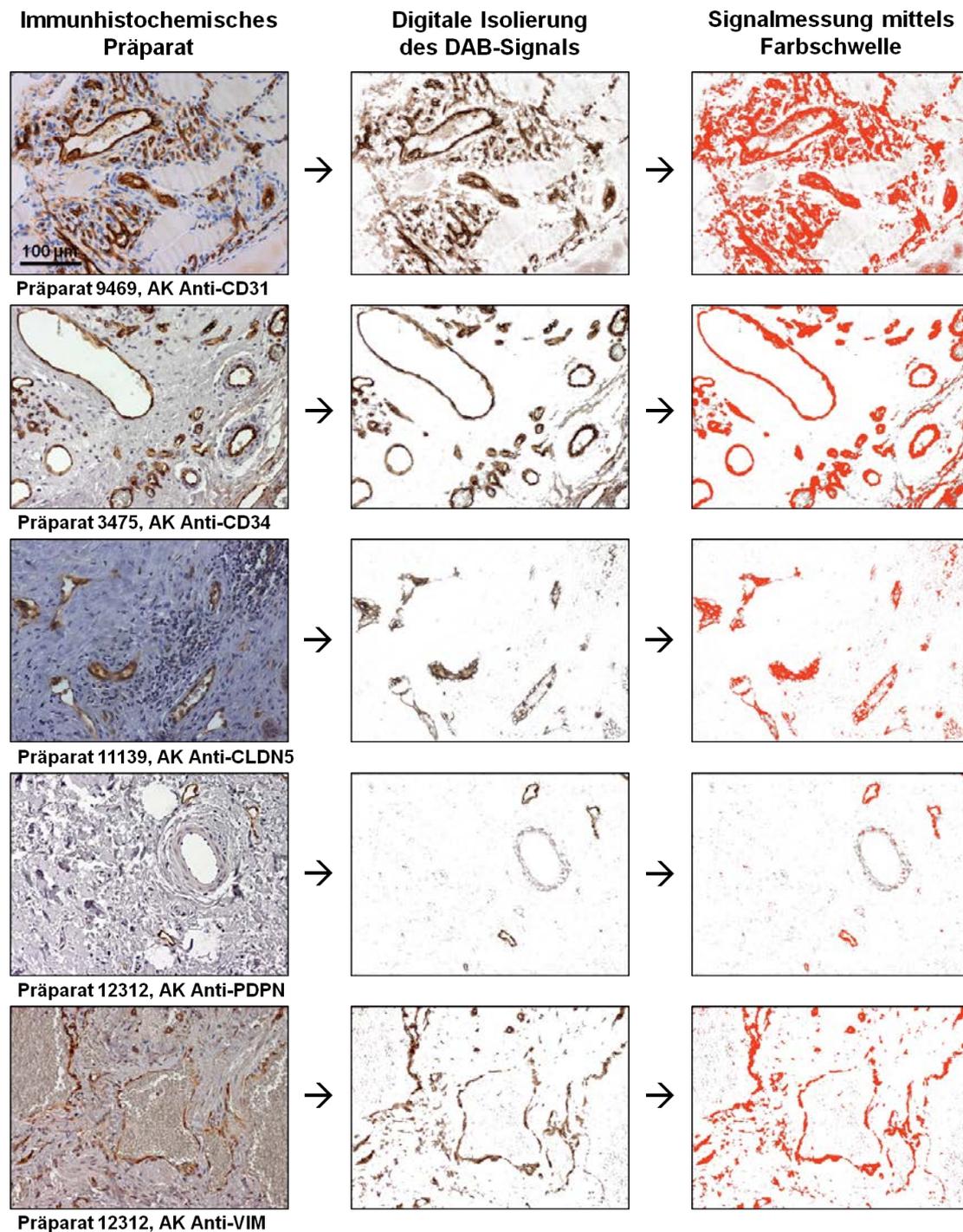


Abbildung 23. Beispielhafte Darstellung der digitalen Erfassung des DAB-Signals aller 5 AK-Färbungen in Hämangiomen. Von links nach rechts sind die Arbeitsschritte der digitalen Auswertung eines Präparates mit Hilfe des Programms ImageJ/Fiji dargestellt. Beispielhaft sind fünf Präparate in 20-facher Vergrößerung aufgezeigt, gefärbt mit dem jeweils angegebenen AK, wobei sich eine positive Färbereaktion braun darstellt. Die Bilder in der Mitte zeigen die Isolierung des DAB-positiven Gewebes mit Hilfe der ImageJ/Fiji-IHC-Toolbox. In der rechten Bildspalte ist die sich anschließende Signalmessung durch Einstellung des Farbschwellenwertes (*Threshold Color*) abgebildet. Die Rotfärbung zeigt an, welche Bereiche bei der Messung erfasst wurden.

In der Abbildung 23 sind Beispiele zur quantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen dargestellt. Das Säulendiagramm in Abbildung 24 zeigt die ausgewerteten Ergebnisse.

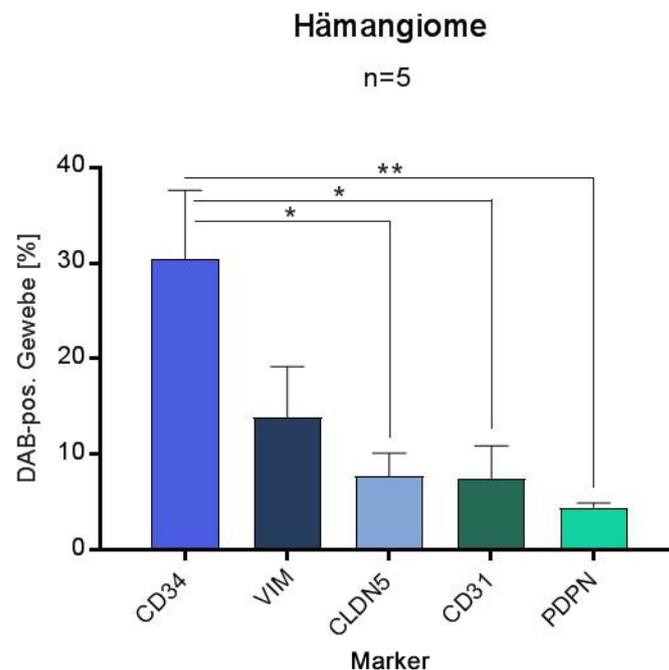


Abbildung 24. Säulendiagramm zur Darstellung der DAB-positiven Gewebeanteile für die verschiedenen Marker innerhalb der Hämangiome. Dargestellt sind Gesamtmittelwerte mit SEM. $*=p<0,05$; $**=p<0,01$.

Abgebildet ist der prozentuale Anteil der Hämangiomgewebefläche, die durch den jeweiligen AK angefärbt wurde, im Verhältnis zur Gesamtgewebefläche. Von den fünf verwendeten AK zeigt Anti-CD34 den größten Signalanteil. Hierbei wird in bis zu 30% des Gewebes eine positive immunhistochemische Reaktion nachgewiesen. Er stellt damit einen signifikant höheren Anteil an DAB-positivem Gewebe dar, verglichen mit den Markerproteinen CLDN5, CD31 ($p<0,05$) und PDPN ($p<0,01$). VIM färbt, mit circa 15% DAB-positivem Anteil, nur einen etwa halb so großen Gewebeanteil an als CD34. Durch CLDN5 und CD31 werden, bei Werten um 7%, nahezu gleichgroße Anteile des Hämangiomgewebes angefärbt. Lediglich 5% Immunintensität zeigt sich nach Färbung mit dem gegen PDPN gerichteten AK.

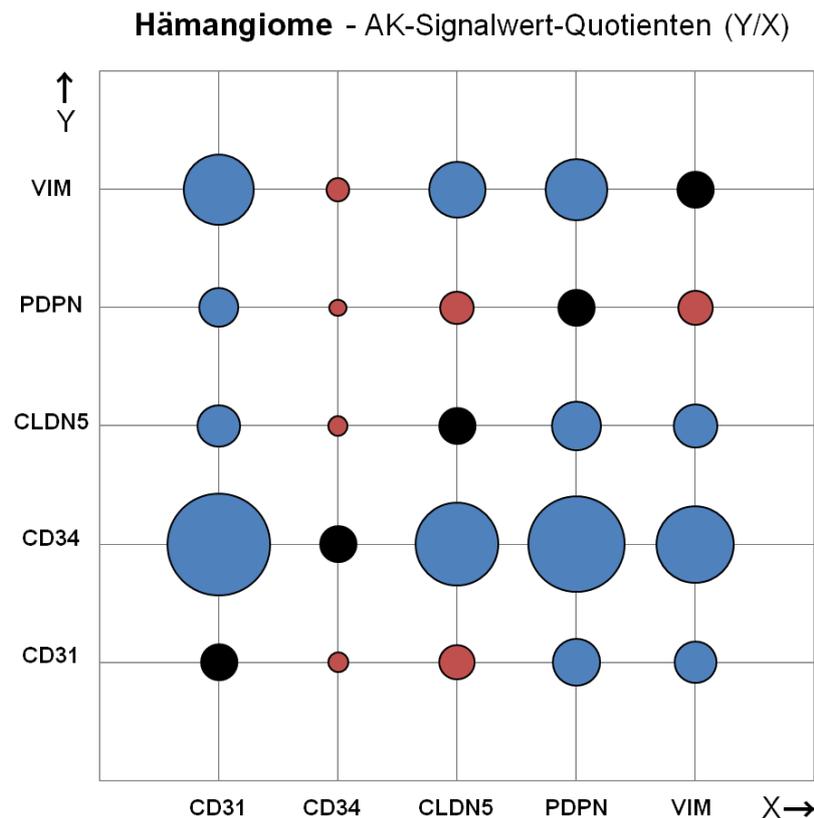


Abbildung 25. Kreisflächendiagramm zur Darstellung der Verhältnisse der AK-Signalwerte in Hämangiomen. Die hier als Kreisfläche dargestellten AK-Signalwert-Quotienten sind Mittelwerte aus den Quotienten einzelner Präparate. So repräsentiert die Kreisfläche unten rechts das Verhältnis von CD31 zu VIM, das sich aus der Mittelwertbildung der Quotienten CD31/VIM aller Hämangiom-Präparate ergibt. Schwarz: Wert = 1 (Bsp. CD31/CD31); Blau: Werte > 1; Rot: Werte < 1.

Zur besseren Übersicht über die charakteristischen Quotienten der AK-Färbungssignalwerte bei Hämangiomen, sind diese in Abbildung 25 als Kreisflächendiagramm dargestellt. Betrachtet werden sollen hierbei vor allem die Quotienten mit Werten größer eins, die durch die blauen Kreisflächen repräsentiert werden. Im Diagramm heben sich vor allem die Quotienten, die CD34 als Dividend haben, hervor. Dies bestätigt, dass Anti-CD34 innerhalb der Hämangiome den größten Anteil DAB-positiven Gewebes anfärbt (siehe Abbildung 24). Darüber hinaus weist VIM in Relation zu CD31, CLDN5 und PDPN hohe Quotientenwerte auf. Werte größer eins ergeben sich außerdem für die Quotienten CLDN5 zu PDPN und VIM, CD31 zu PDPN und VIM sowie für PDPN und CLDN5 zu CD31.

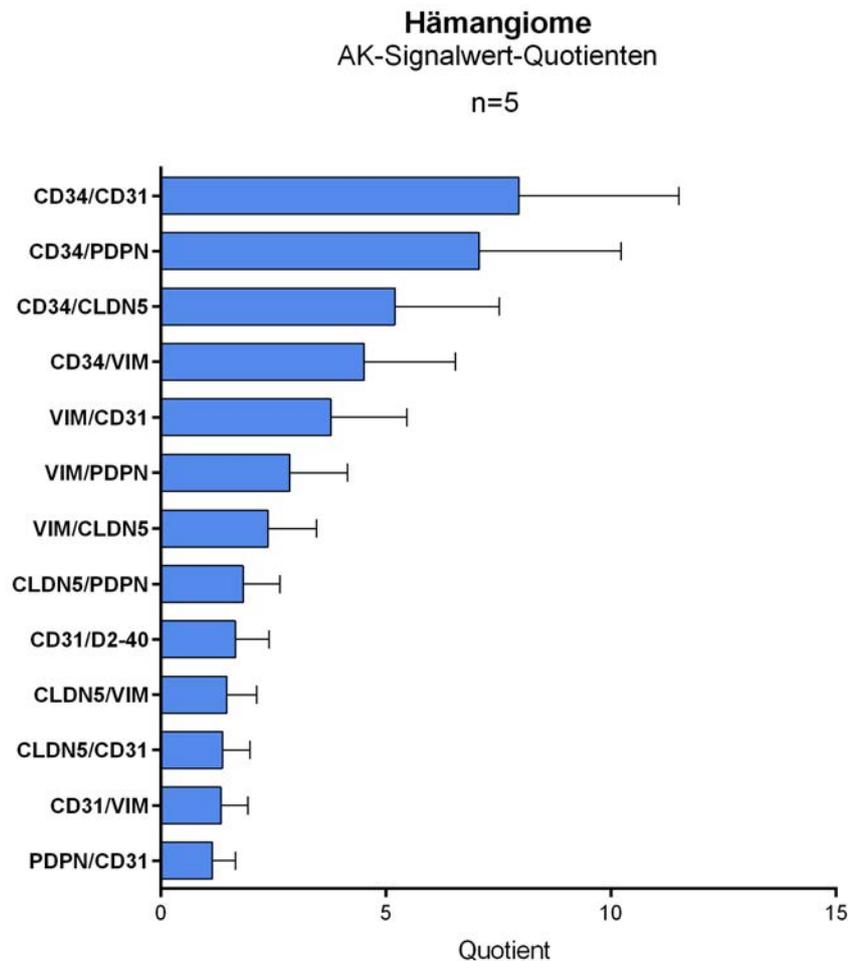


Abbildung 26. Balkendiagramm mit Darstellung der Verhältnisse der Kandidatenprotein-expression innerhalb der Hämangiome. Die hier dargestellten AK-Signalwert-Quotienten sind Mittelwerte aus den Quotienten einzelner Präparate.

Der Vergleich der Quotienten mit Werten größer eins ergibt keine statistisch signifikanten Unterschiede. Diese sind im Balkendiagramm (Abbildung 26) blau dargestellt. Trotz des fast siebenfachen Größenunterschiedes zwischen den Quotienten CD34/CD31 und PDPN/CD31 konnte keine Signifikanz erreicht werden. Somit wurden keine charakteristischen Quotienten innerhalb der Hämangiome gefunden.

4.2.4 Vaskuläre Malformationen (n.n.kl.)

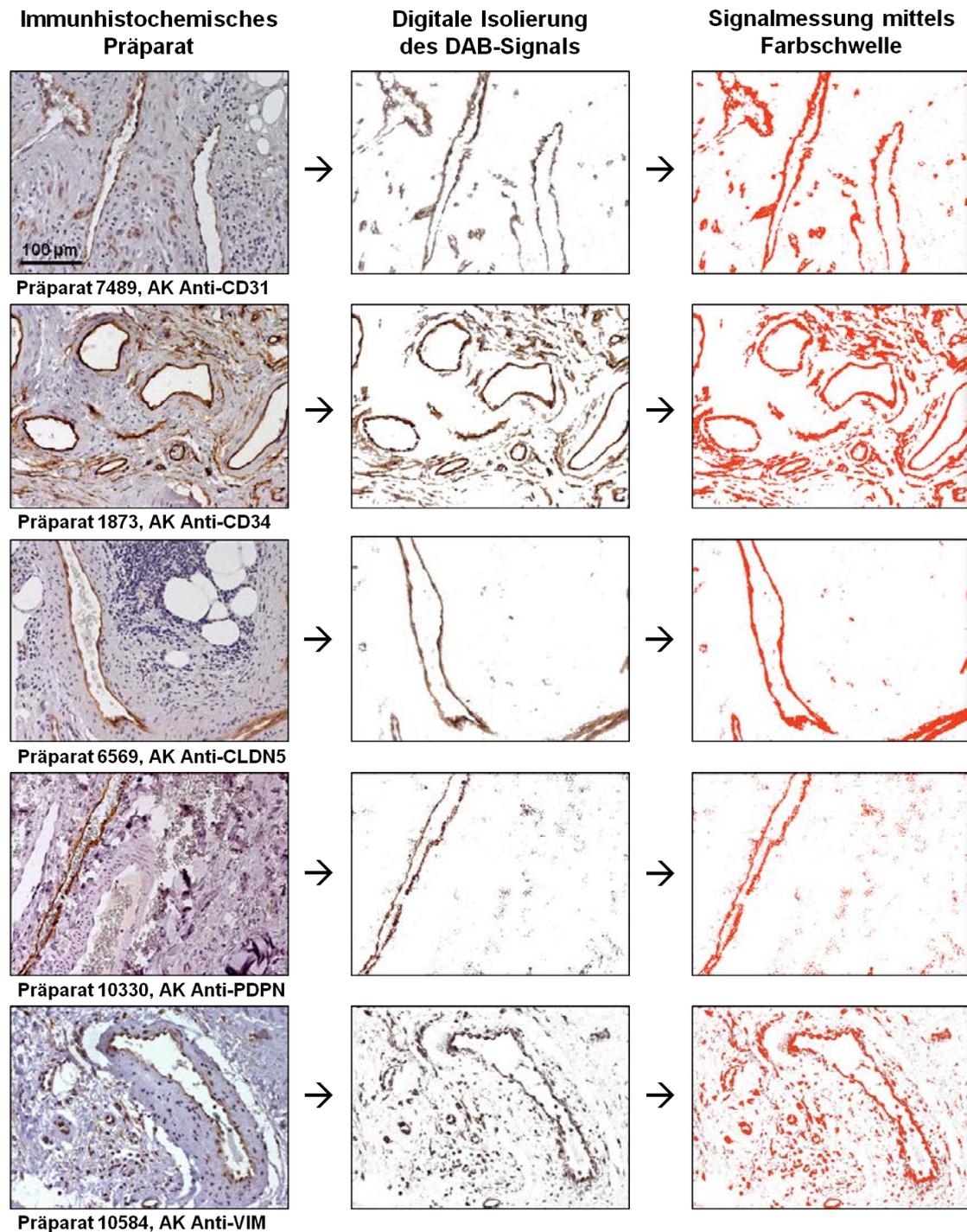


Abbildung 27. Beispielhafte Darstellung der digitalen Erfassung des DAB-Signals aller 5 AK-Färbungen in vaskulären Malformationen (n.n.kl.). Von links nach rechts sind die Arbeitsschritte der digitalen Auswertung eines Präparates mit Hilfe des Programms ImageJ/Fiji dargestellt. Beispielhaft sind fünf Präparate in 20-facher Vergrößerung aufgezeigt, gefärbt mit dem jeweils angegebenen AK, wobei sich eine positive Färbereaktion braun darstellt. Die Bilder in der Mitte zeigen die Isolierung des DAB-positiven Gewebes mit Hilfe der ImageJ/Fiji-IHC-Toolbox. In der rechten Bildspalte ist die sich anschließende Signalmessung durch Einstellung des Farbschwellenwertes (*Threshold Color*) abgebildet. Die Rotfärbung zeigt an, welche Bereiche bei der Messung erfasst wurden.

Beispiele zur Messung des spezifischen Signals in den Präparaten der n.n.kl. vaskulären Malformationen sind in der Abbildung 27 aufgeführt. Die linksseitigen Aufnahmen zeigen jeweils eine repräsentative immunhistochemische Färbung mit den fünf Antikörpern CD31, CD34, CLDN5, PDPN und VIM, in denen sich eine positive Färbereaktion braun darstellt. Die Abbildungen in der zweiten und dritten Bildspalte sind in Abschnitt 3.2 beispielhaft näher beschrieben. Die Ergebnisse der Signalstärken sind in der Abbildung 28 dargestellt. Abgebildet ist der prozentuale Anteil des DAB-positiven Gewebes, bezogen auf das Gesamtgewebe.

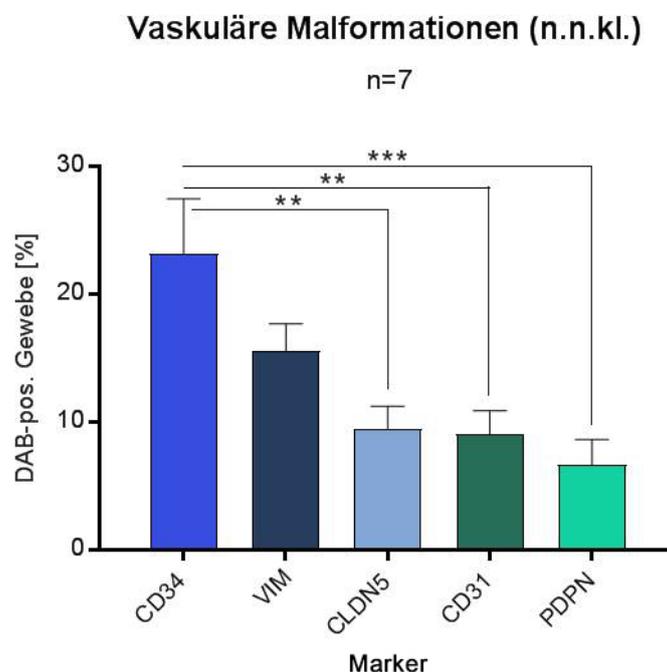


Abbildung 28. Säulendiagramm zur Darstellung der DAB-positiven Gewebeanteile für die verschiedenen Marker innerhalb der vaskulären Malformationen (n.n.kl.). Dargestellt sind Gesamtmittelwerte mit SEM. **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$.

Mit durchschnittlich 23,3% zeigt CD34 den größten Anteil an DAB-positivem Gewebe. Dieser Anteil ist signifikant höher verglichen mit PDPN ($p < 0,001$), CLDN5 und CD31 ($p < 0,01$). 15,6% des Gewebes zeigt sich VIM positiv. Dieses Ergebnis zeigt jedoch keine Signifikanz. Die AK Anti-CLDN5 und Anti-CD31 färben mit ca. 9% ähnlich hohe Anteile des VM-Gewebes an. Eine geringe positive Reaktion zeigt sich bei PDPN, welches in 6,7% der untersuchten Gewebefläche eine Expression aufweist.

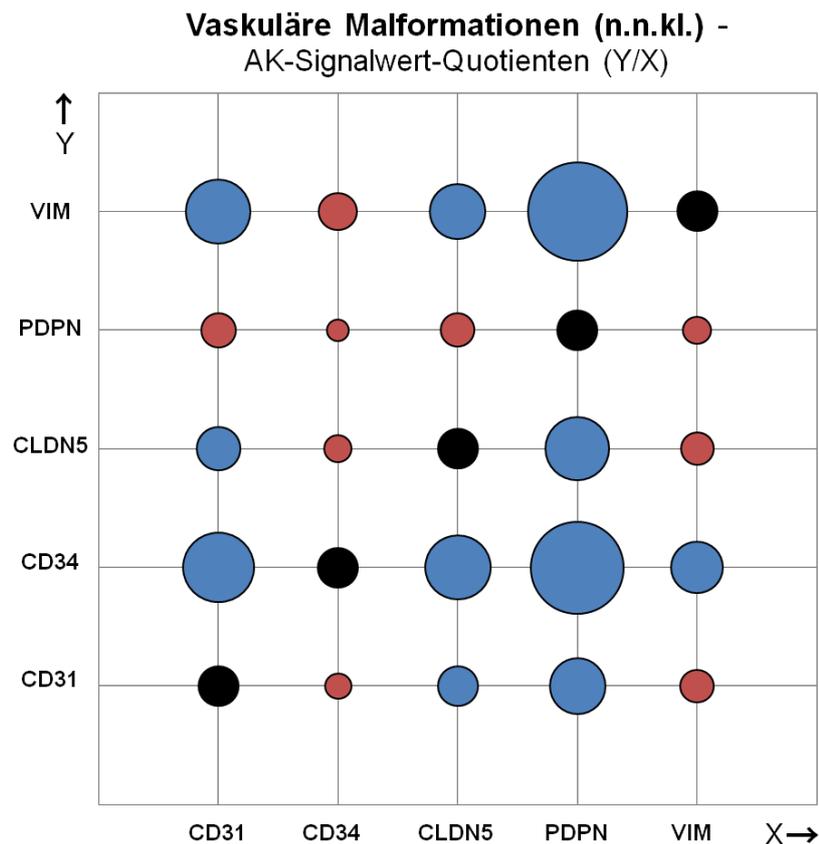


Abbildung 29. Kreisflächendiagramm zur Darstellung der Verhältnisse der eingesetzten AK-Signalwerte in vaskulären Malformationen (n.n.kl.). Die hier als Kreisfläche dargestellten AK-Signalwert-Quotienten sind Mittelwerte aus den Quotienten einzelner Präparate. So repräsentiert die Kreisfläche unten rechts das Verhältnis von CD31 zu VIM, das sich aus der Mittelwertbildung der Quotienten CD31/VIM aller Präparate der vaskulären Malformationen (n.n.kl.) ergibt. Schwarz: Wert = 1 (Bsp. CD31/CD31); Blau: Werte > 1; Rot: Werte < 1.

Zur Veranschaulichung der Verhältnisse unterschiedlicher positiver Färbereaktionen sind in Abbildung 29 alle verwendeten Marker in Relation dargestellt. Die Größe der Kreisfläche repräsentiert dabei die Größe des Quotienten zweier Antikörpersignalwerte. Damit können relevante Unterschiede zwischen den positiv gefärbten Gewebeanteilen besser veranschaulicht werden. Der Fokus wurde auf Quotienten mit einem Wert größer eins gelegt, die hier blau dargestellt sind. Auffallend große Quotienten finden sich zwischen VIM und CD34 im Verhältnis zu PDPN. Relativ hoch sind ebenfalls Quotienten von VIM und CD34 zu CD31. Hohe Quotienten finden sich auch bei CLDN5/PDPN und CD34/CLDN5. Werte über eins ergeben sich außerdem für die Quotienten VIM/CLDN5, CLDN5/CD31, CD34/VIM und CD31 zu CLDN5 und PDPN. Analog zu Abbildung 28 lässt sich aus dem Kreisflächendiagramm entnehmen, dass Anti-PDPN einen weitaus niedrigeren Gewebeanteil

vaskulärer Malformationen anfärbt, als die anderen Antikörper. Statistisch signifikante Unterschiede der Quotienten sind in Abbildung 30 dargestellt.

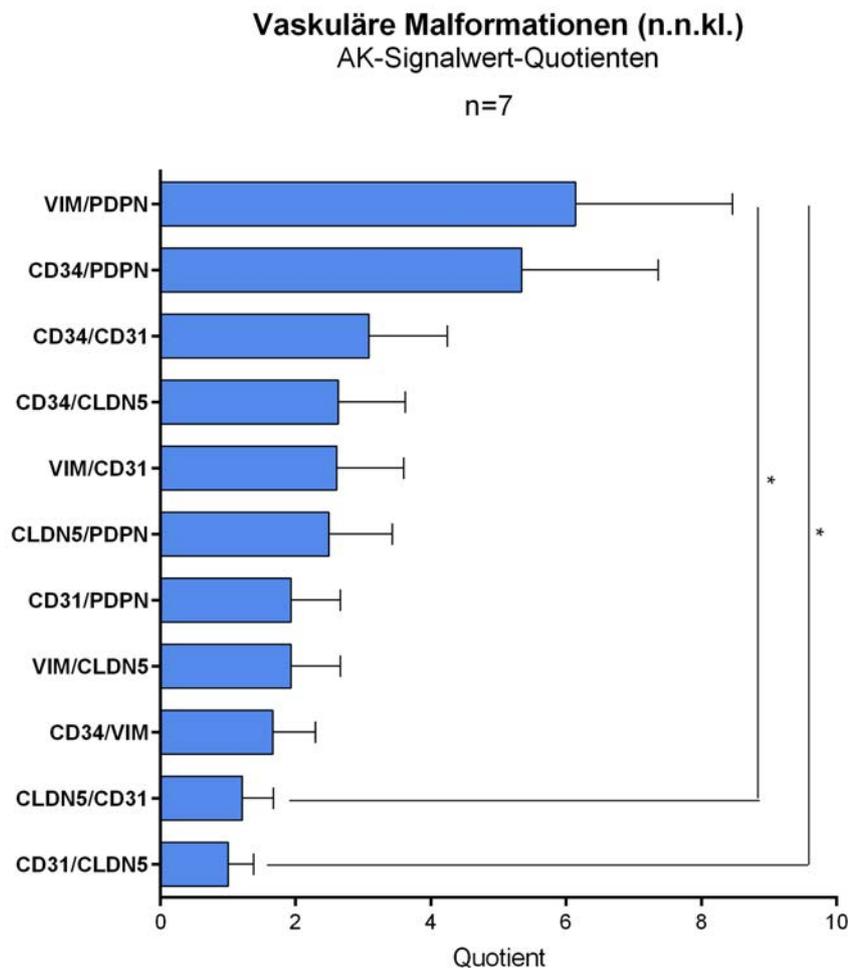


Abbildung 30. Balkendiagramm mit Darstellung der Verhältnisse der Kandidatenprotein-expression innerhalb der vaskulären Malformationen (n.n.kl.). Die hier dargestellten AK-Signalwert-Quotienten sind Mittelwerte aus den Quotienten einzelner Präparate. Betrachtet werden signifikante Quotienten ≥ 1 . * $p < 0,05$.

Verglichen wurden Quotienten größer eins. Im Diagramm zeigt sich, dass der Quotient VIM/PDPN signifikant größer ist als der von CD31/CLDN5 und dem dazugehörigen inversen CLDN5/CD31-Quotient ($p < 0,05$). Auch CD34/PDPN weist einen hohen Quotienten auf, der sich aber nicht statistisch signifikant von den anderen Quotienten abhebt. Mit niedrigeren aber vergleichbaren Quotientenwerten präsentieren sich CD34/CLDN5, VIM/CD31 und CLDN5/PDPN. Es ergaben sich weitere Quotienten mit Werten größer eins, für die aber ebenfalls kein signifikanter Unterschied nachzuweisen ist.

4.2.5 Venöse Malformationen

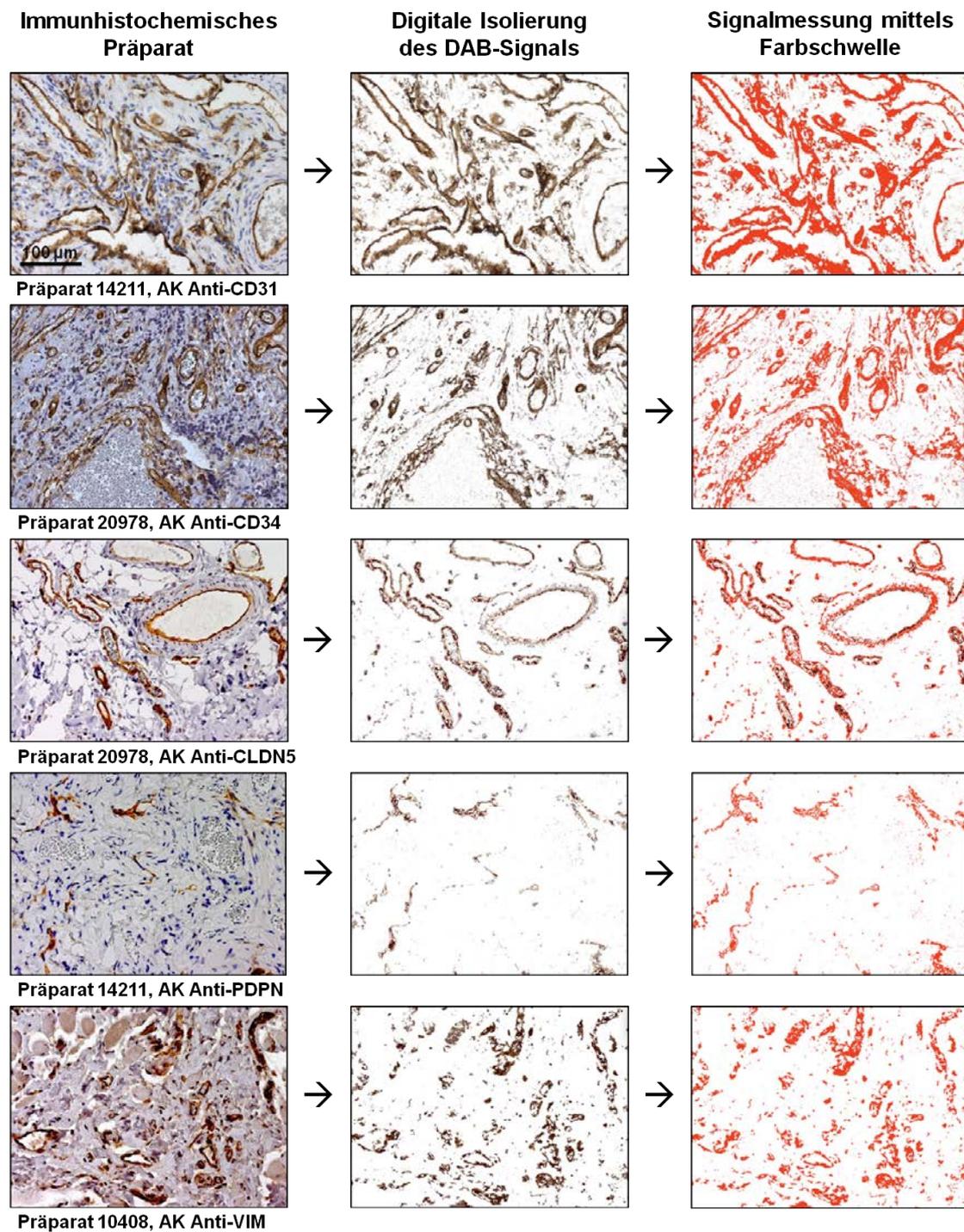


Abbildung 31. Beispielhafte Darstellung der digitalen Erfassung des DAB-Signals aller 5 AK-Färbungen in venösen Malformationen. Von links nach rechts sind die Arbeitsschritte der digitalen Auswertung eines Präparates mit Hilfe des Programms ImageJ/Fiji dargestellt. Beispielhaft sind fünf Präparate in 20-facher Vergrößerung aufgezeigt, gefärbt mit dem jeweils angegebenen AK, wobei sich eine positive Färbereaktion braun darstellt. Die Bilder in der Mitte zeigen die Isolierung des DAB-positiven Gewebes mit Hilfe der ImageJ/Fiji-IHC-Toolbox. In der rechten Bildspalte ist die sich anschließende Signalmessung durch Einstellung des Farbschwellenwertes (*Threshold Color*) abgebildet. Die Rotfärbung zeigt an, welche Bereiche bei der Messung erfasst wurden.

In Abbildung 31 ist das Vorgehen der quantitativen Bildanalyse bei venösen Malformationen beispielhaft dargestellt. Zu sehen ist jeweils eine Färbung mit AK gegen CD34, CD31, CLDN5, PDPN und VIM, in denen sich eine DAB-positive Reaktion durch die Braunfärbung des Gewebes zeigt. Eine detaillierte Beschreibung des Vorgehens ist Kapitel 3.2 zu entnehmen. Die Ergebnisse der digitalen Messung sind in Abbildung 32 aufgezeigt. Dargestellt sind die Gesamtmittelwerte der prozentualen Anteile des DAB-positiven Gewebes im Verhältnis zu dem Gesamtgewebe.

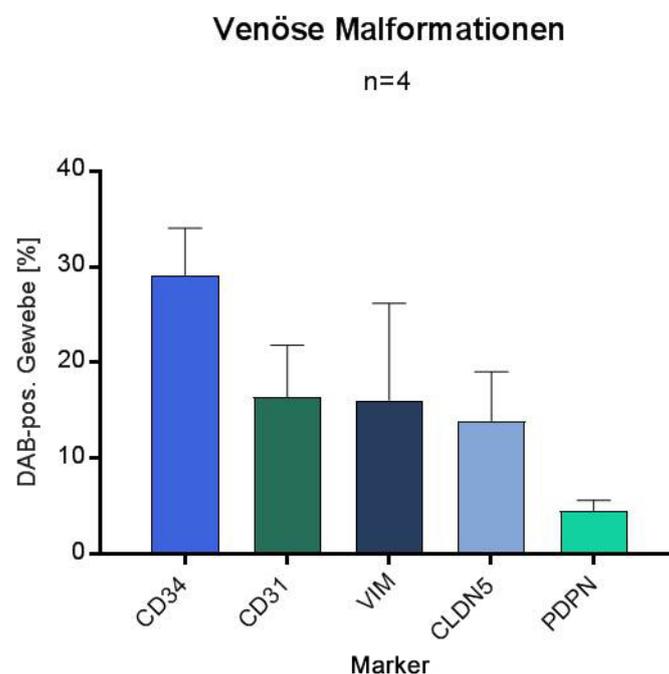


Abbildung 32. Säulendiagramm zur Darstellung der DAB-positiven Gewebeanteile für die verschiedenen Marker innerhalb der venösen Malformationen. Dargestellt sind Gesamtmittelwerte mit SEM.

Der Endothelmarker CD34 zeigt mit einem Anteil von 29% die höchste Gewebefärbung. Dieser Wert erreicht jedoch keine Signifikanz zu den Färbungen mit den anderen AK. Generell liefert keiner der verwendeten AK einen signifikant größeren oder kleineren DAB-Signalwert. Dennoch fällt auf, dass die PDPN-Färbung mit 4,5% den geringsten Wert bei den venösen Malformationen aufweist. AK gegen CD31, VIM und CLDN5 führten in 14-16% des Gewebes zu einer positiven Reaktion.

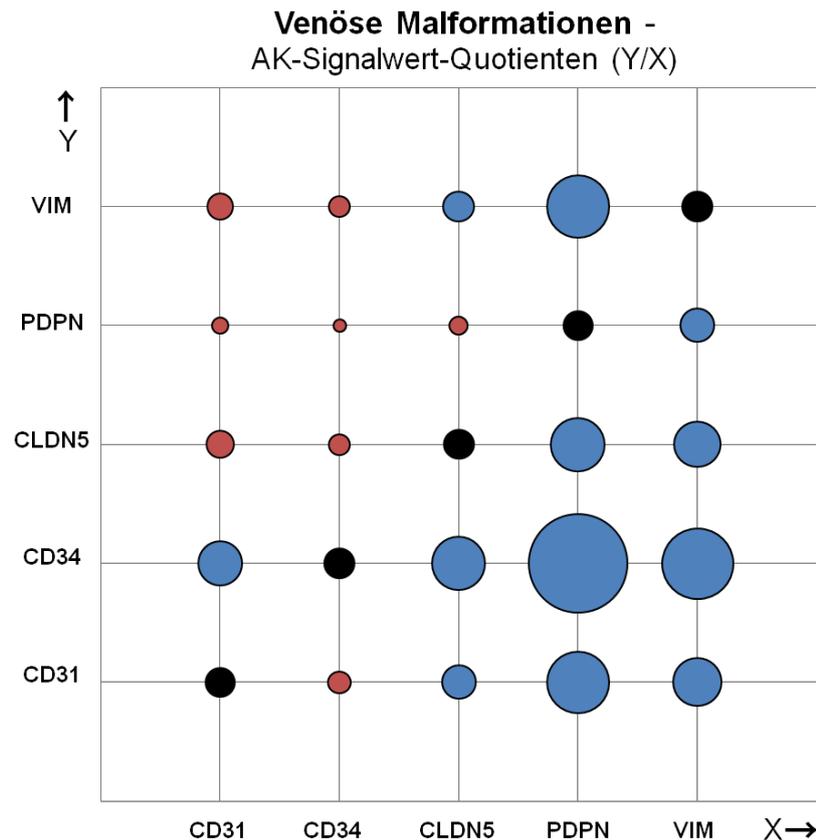


Abbildung 33. Kreisflächendiagramm zur Darstellung der Verhältnisse der AK-Signalwerte in venösen Malformationen. Die hier als Kreisfläche dargestellten AK-Signalwert-Quotienten sind Mittelwerte aus den Quotienten einzelner Präparate. So repräsentiert die Kreisfläche unten rechts das Verhältnis von CD31 zu VIM, das sich aus der Mittelwertbildung der Quotienten CD31/VIM aller Präparate der venösen Malformationen ergibt. Schwarz: Wert = 1 (Bsp. CD31/CD31); Blau: Werte > 1; Rot: Werte < 1.

In Abbildung 33 sind die erhobenen AK-Signalwerte im Verhältnis zueinander abgebildet. Die Darstellung im Flächendiagramm ermöglicht eine bessere Übersicht über die charakteristischen Verhältnisse innerhalb der venösen Malformationen, da sich hohe Quotienten entsprechend besser voneinander unterscheiden lassen. Besonders auffällig zeigte sich hierbei der CD34/PDPN Quotient. Dies hebt den großen Unterschied zwischen den prozentualen Anteilen der positiv gefärbten Gewebe durch CD34 und PDPN hervor.

Die VIM, CLDN5 und CD31 Signale zeigen im Vergleich zu PDPN alle einen Quotient größer eins. In allen Färbungen zeigt Anti-CD34 als einziger AK durchgehend einen Quotienten >1. Vergleichbare Werte ergeben bei den VIM/CLDN5, CD31/CLDN5, PDPN/VIM und CD31/VIM Quotienten. Zur Verdeutlichung der statistisch signifikanten Unterschiede der Quotienten werden diese in Abbildung 34 mit einem Balkendiagramm dargestellt.

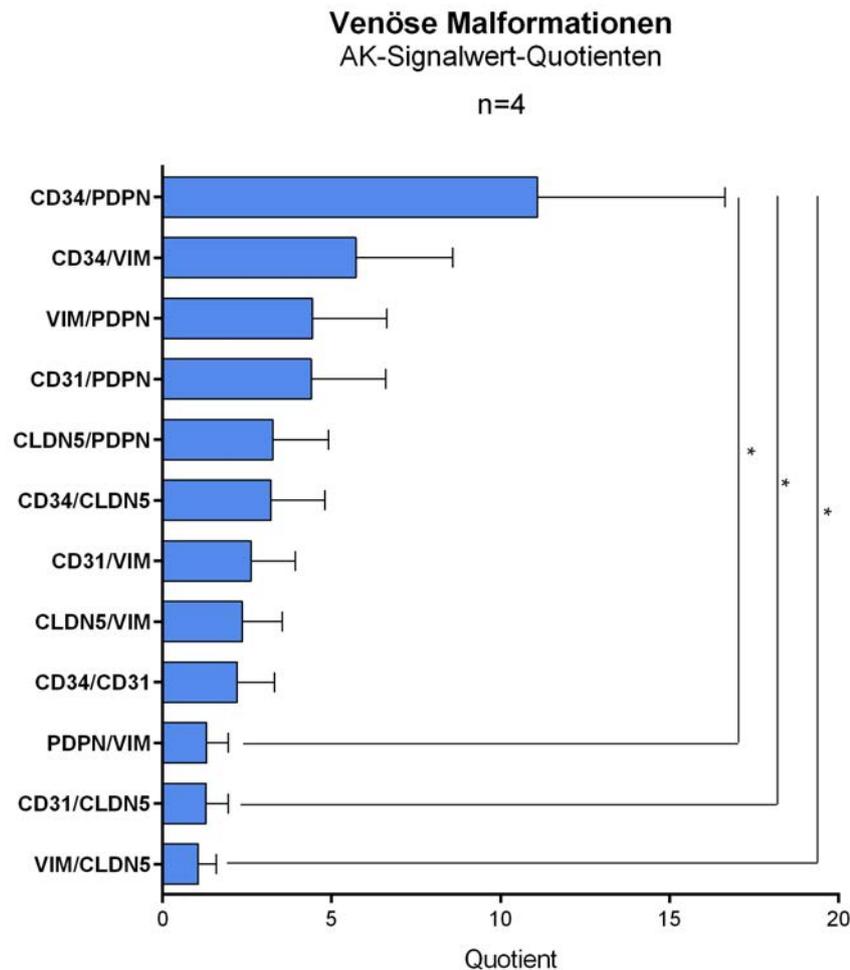


Abbildung 34. Balkendiagramm mit Darstellung der Verhältnisse der Kandidatenprotein-expression innerhalb der venösen Malformationen. Die hier dargestellten AK-Signalwert-Quotienten sind Mittelwerte aus den Quotienten einzelner Präparate. Betrachtet werden signifikante Quotienten ≥ 1 . * $p < 0,05$.

Der Quotient CD34/PDPN ist bei den venösen Malformationen am höchsten und unterscheidet sich signifikant von den Quotienten PDPN/VIM, CD31/CLDN5 und VIM/CLDN5 (alle $p < 0,05$). CD34/VIM ist der zweithöchste Quotient, hebt sich aber nicht signifikant von den anderen Quotienten ab. Die Verhältnisse von VIM und CD31 zu PDPN ergeben ähnlich hohe Werte, zeigen aber keine statistische Signifikanz. Dies ist auch der Fall bei CLDN5/PDPN und CD34/CLDN5. Niedrigere Quotienten zeigen sich bei CD31/VIM, CLDN5/VIM und CD34/CD31.

4.2.6 Granuloma pyogenicum

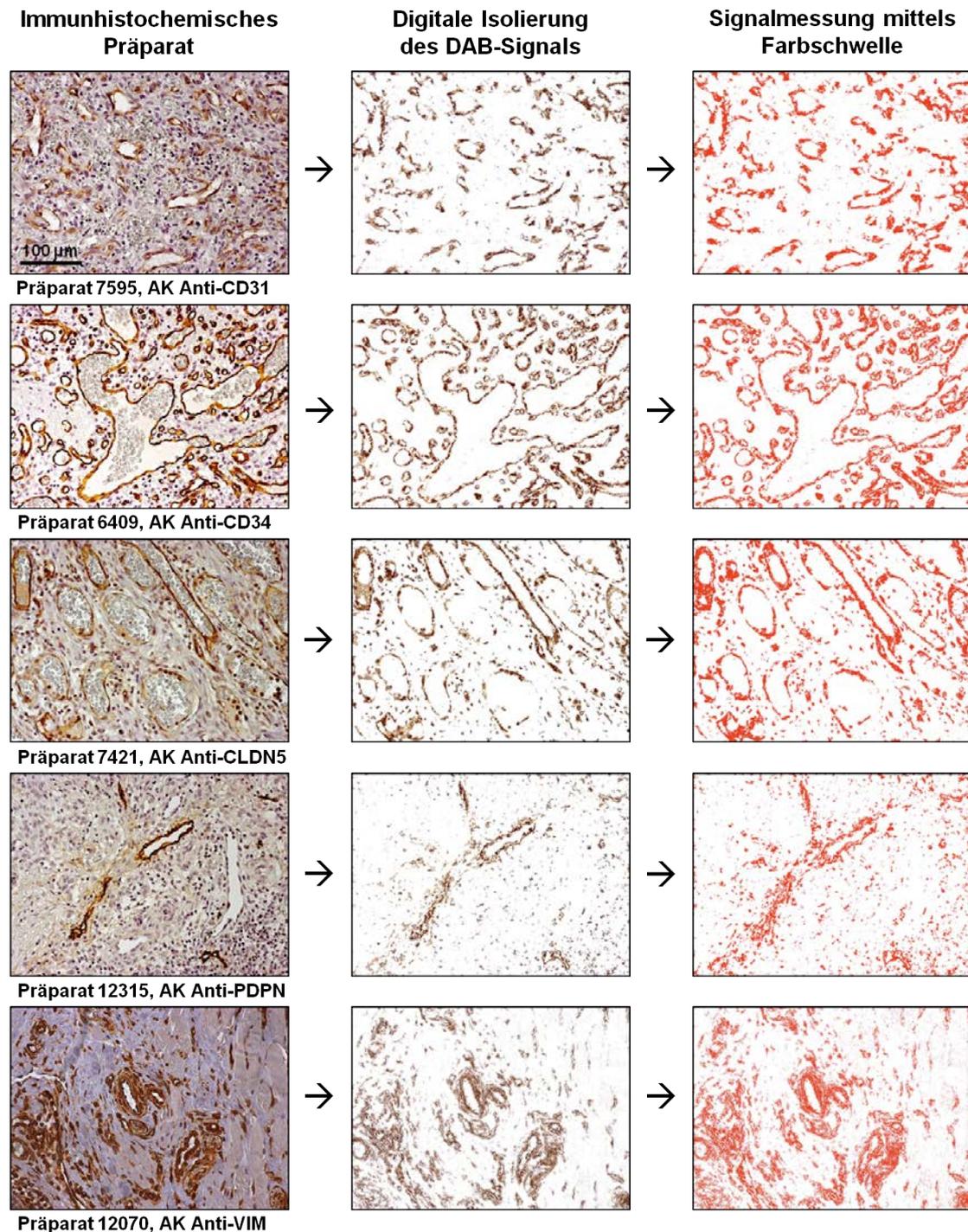


Abbildung 35. Beispielhafte Darstellung der digitalen Erfassung des DAB-Signals aller 5 AK-Färbungen beim Granuloma pyogenicum. Von links nach rechts sind die Arbeitsschritte der digitalen Auswertung eines Präparates mit Hilfe des Programms ImageJ/Fiji dargestellt. Beispielhaft sind fünf Präparate in 20-facher Vergrößerung aufgezeigt, gefärbt mit dem jeweils angegebenen AK, wobei sich eine positive Färbereaktion braun darstellt. Die Bilder in der Mitte zeigen die Isolierung des DAB-positiven Gewebes mit Hilfe der ImageJ/Fiji-IHC-Toolbox. In der rechten Bildspalte ist die sich anschließende Signalmessung durch Einstellung des Farbschwellenwertes (*Threshold Color*) abgebildet. Die Rotfärbung zeigt an, welche Bereiche bei der Messung erfasst wurden.

Abbildung 35 zeigt Beispiele zur quantitativen Auswertung mit dem Programm ImageJ/Fiji. Abgebildet ist eine Auswahl von Präparaten der pyogenen Granulome. Dargestellt sind die Fälle, die mit den verwendeten AK CD31, CD34, CLDN5, PDPN und VIM immunhistochemisch gefärbt wurden. Eine genauere Beschreibung der Abbildung, sowie der Ablauf des Verfahrens zur quantitativen Bildanalyse, ist Kapitel 3.2 zu entnehmen.

Aufgeführt sind die ermittelten Ergebnisse in Abbildung 36. Für jeden AK sind die Gesamtmittelwerte der prozentualen Anteile des DAB-positiven Gewebes am Gesamtgewebe dargestellt.

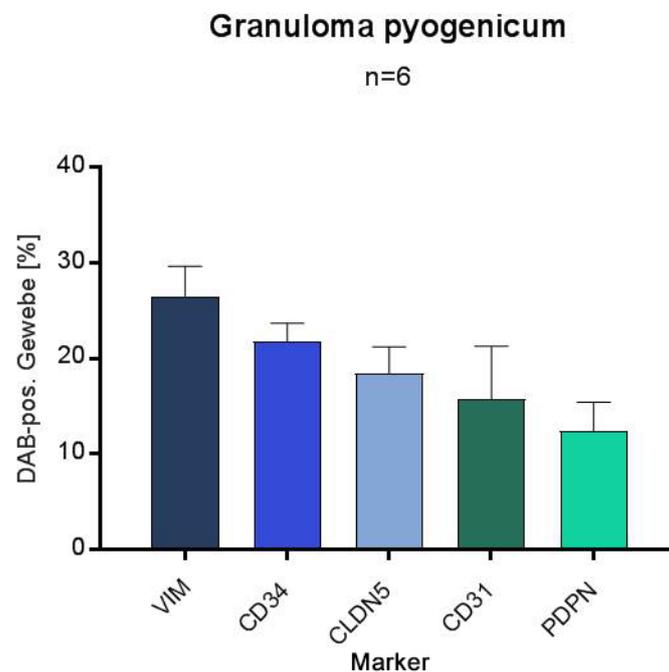


Abbildung 36. Säulendiagramm zur Darstellung der DAB-positiven Gewebeanteile für die verschiedenen Marker im Granuloma pyogenicum. Dargestellt sind Gesamtmittelwerte mit SEM.

Bei pyogenen Granulomen stellt sich ein Gewebeanteil von 26,5% als VIM positiv dar. Dabei handelt es sich um den höchsten ermittelten DAB-positiven Anteil im Vergleich zu den anderen Antikörperfärbungen. Mit 21,6% zeigt der Endothelmarker CD34 geringere Signalwerte als VIM im Bereich der pyogenen Granulome. Für CLDN5 und CD31 werden 18% bzw. 15,7% DAB-positive Anteile ermittelt. Eine Färbung mit Anti-PDPN führt in 12% des Gewebes zu einer positiven Färbereaktion. Signifikante Unterschiede zeigen sich hierbei jedoch nicht.

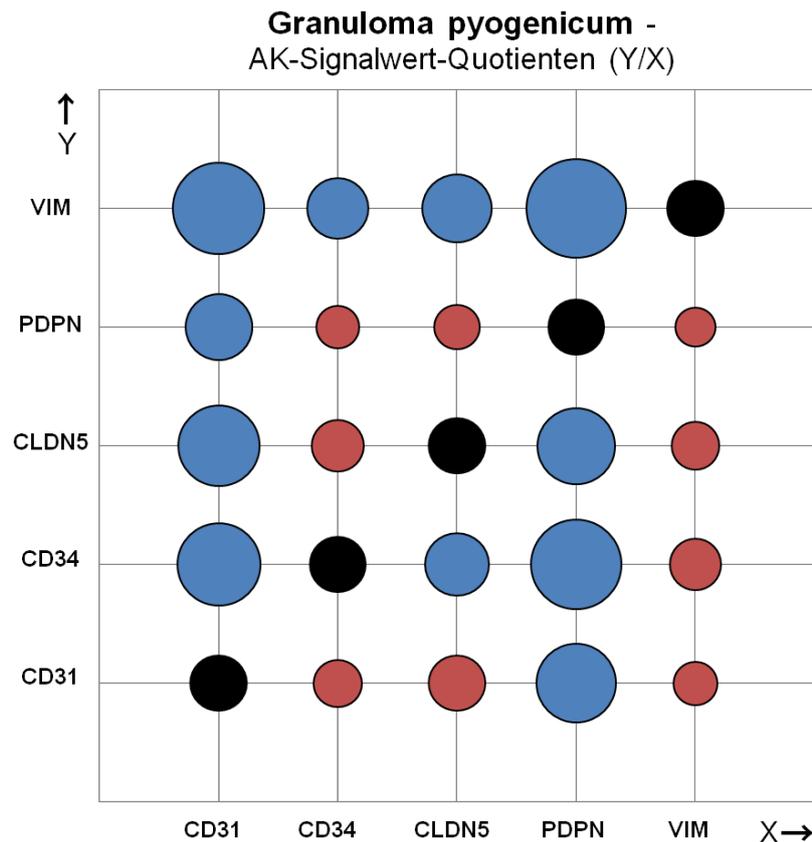


Abbildung 37. Kreisflächendiagramm zur Darstellung der Verhältnisse der AK-Signalwerte im Granuloma pyogenicum. Die hier als Kreisfläche dargestellten AK-Signalwert-Quotienten sind Mittelwerte aus den Quotienten einzelner Präparate. So repräsentiert die Kreisfläche unten rechts das Verhältnis von CD31 zu VIM, das sich aus der Mittelwertbildung der Quotienten CD31/VIM aller Granuloma pyogenicum -Präparate ergibt. Schwarz: Wert = 1 (Bsp. CD31/CD31); Blau: Werte > 1; Rot: Werte < 1.

Abbildung 37 veranschaulicht die Quotientenwerte der untersuchten Markerproteine bei den pyogenen Granulomen. Hierbei werden nur Quotienten mit Werten >1 (blau) betrachtet. Die Kreisflächengröße korreliert in der Darstellung mit dem Quotientenwert. Für die Quotienten >1 im Granulomgewebe ergibt sich eine relativ homogene Größenverteilung. Die größten Quotienten sind hierbei VIM/CD31, VIM/PDPN, CD34/CD31 und CD34/PDPN. In den Relationen zu Anti-CD31 und Anti-PDPN ergeben sich ausschließlich Quotienten >1, da diese AK nur einen geringen Gewebeanteil positiv anfärben. Zwischen den anderen Quotienten zeigt sich kein deutlicher Unterschied.

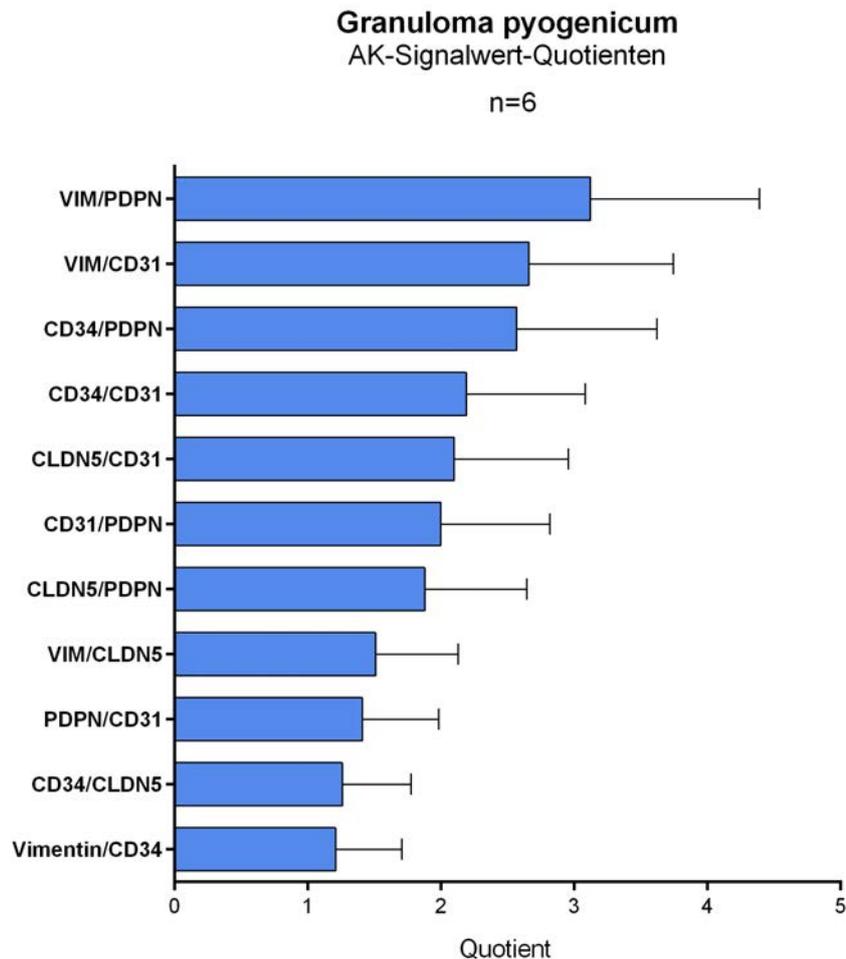


Abbildung 38. Balkendiagramm mit Darstellung der Verhältnisse der Kandidatenprotein-expression im Granuloma pyogenicum. Die hier dargestellten AK-Signalwert-Quotienten sind Mittelwerte aus den Quotienten einzelner Präparate.

Verhältnisse der Kandidatenproteinexpression im GP werden in Abbildung 38 mit einem Balkendiagramm dargestellt. Bei der statistischen Überprüfung der Quotienten zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Es ist jedoch zu erkennen, dass das Verhältnis von VIM/PDPN den größten Quotienten ergibt. Die Quotienten VIM/CD31 und CD34/PDPN weisen ähnlich hohe Werte auf, sowie auch CD34/CD31 und CLDN5/CD31, die vergleichbare Werte zeigen. Ebenso unterscheiden sich die Quotienten CD31/PDPN und CLDN5/PDPN nicht wesentlich. Niedrigere Werte werden für VIM/CLDN5, PDPN/CD31 und CD34/CLDN5 beobachtet. Den geringsten Wert zeigt der Quotient VIM/CD34.

4.2.7 Paragangliome

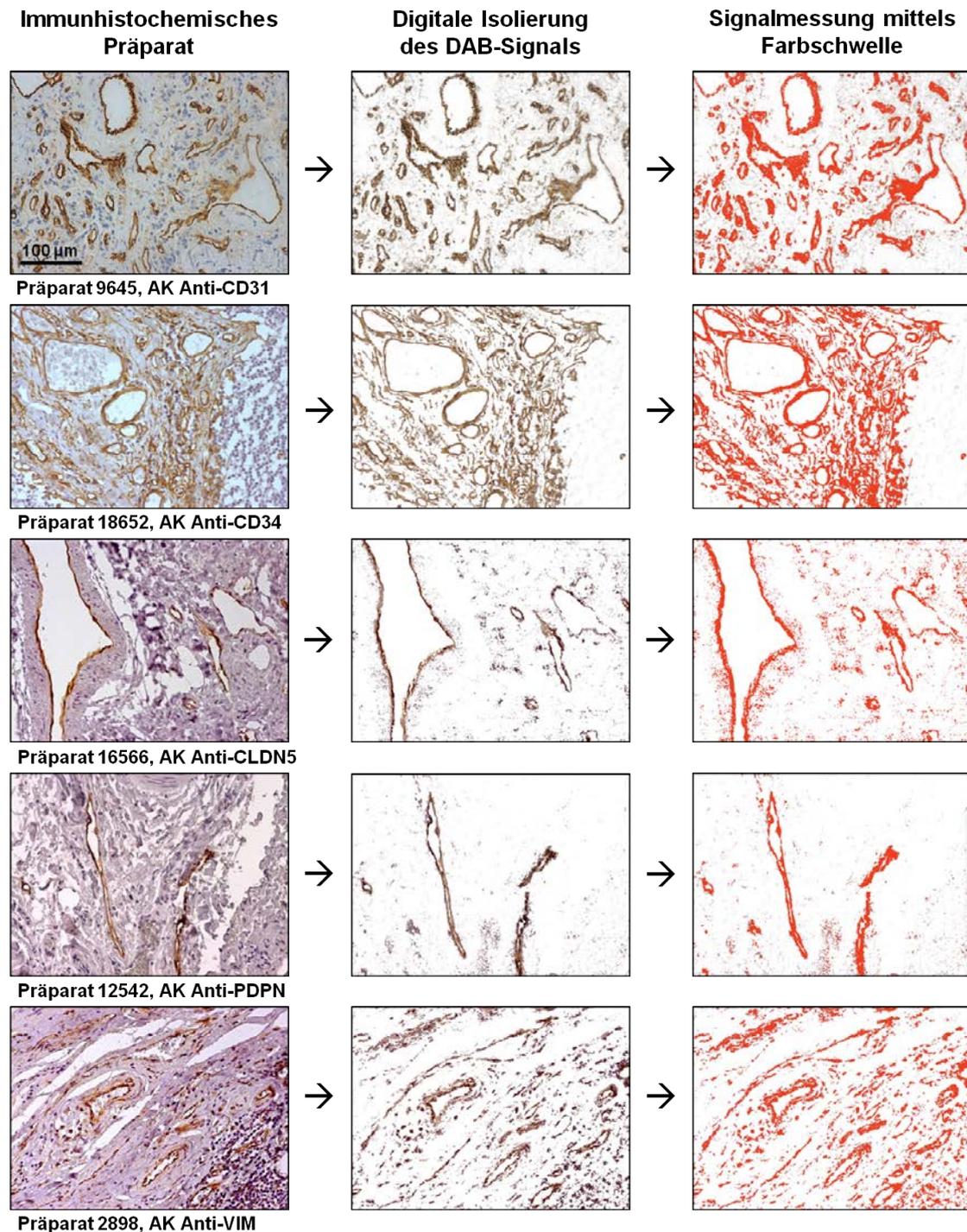


Abbildung 39. Beispielhafte Darstellung der digitalen Erfassung des DAB-Signals aller 5 AK-Färbungen in Paragangliomen. Von links nach rechts sind die Arbeitsschritte der digitalen Auswertung eines Präparates mit Hilfe des Programms ImageJ/Fiji dargestellt. Beispielhaft sind fünf Präparate in 20-facher Vergrößerung aufgezeigt, gefärbt mit dem jeweils angegebenen AK, wobei sich eine positive Färbereaktion braun darstellt. Die Bilder in der Mitte zeigen die Isolierung des DAB-positiven Gewebes mit Hilfe der ImageJ/Fiji-IHC-Toolbox. In der rechten Bildspalte ist die sich anschließende Signalmessung durch Einstellung des Farbschwellenwertes (*Threshold Color*) abgebildet. Die Rotfärbung zeigt an, welche Bereiche bei der Messung erfasst wurden.

Abbildung 39 zeigt beispielhaft die digitale Erfassung des DAB-Signals in Paragangliomen mit Hilfe des Programms ImageJ/Fiji. Dargestellt sind verschiedene Paragangliompräparate, die zunächst immunhistochemisch mit fünf gegen CD31, CD34, CLDN5, PDPN und VIM gerichteten AK gefärbt wurden. Eine positive Antikörperreaktion stellt sich hier braun dar. Die detaillierte Beschreibung ist Kapitel 3.2 zu entnehmen. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Abbildung 40 dargestellt. Das Säulendiagramm zeigt die Gesamtmittelwerte der prozentualen Anteile des DAB-positiven Gewebes für jeden AK.

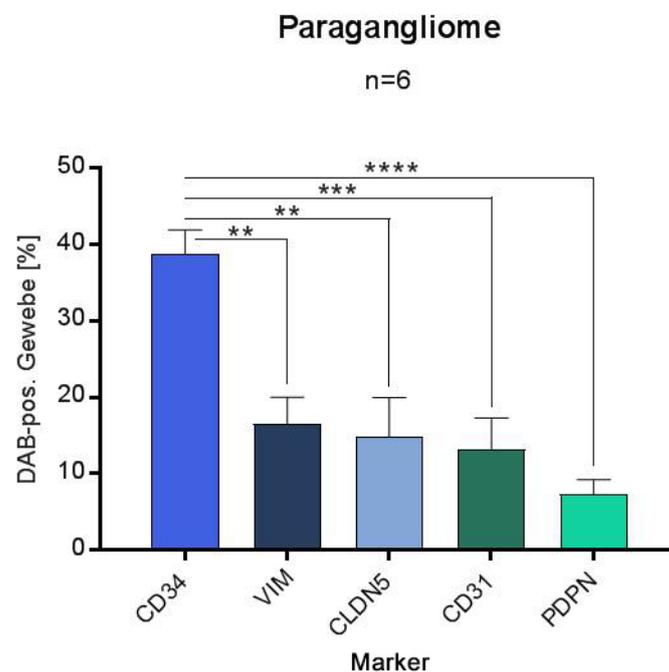


Abbildung 40. Säulendiagramm zur Darstellung der DAB-positiven Gewebeanteile für die verschiedenen Marker innerhalb der Paragangliome. Dargestellt sind Gesamtmittelwerte mit SEM. **= $p<0,01$; ***= $p<0,001$; ****= $p<0,0001$.

Mit einem Anteil von 38% des Gesamtgewebes weist der Endothelmarker CD34 den mit Abstand größten Anteil DAB-positiven Gewebes auf. Er hebt sich damit signifikant von den Färbungen der AK gegen VIM, CLDN5 ($p<0,01$), CD31 ($p<0,001$) und PDPN ($p<0,0001$) ab. Der Anti-VIM AK ergibt einen Anteil positiv reagierenden Gewebes von 16,5%, gefolgt von Anti-CLDN5 mit 14,8% und Anti-CD31 mit 13%. Die geringste positive Reaktion zeigt der Anti-PDPN-AK mit einem DAB-positiven Gewebeanteil von 7,4% (Abbildung 36).

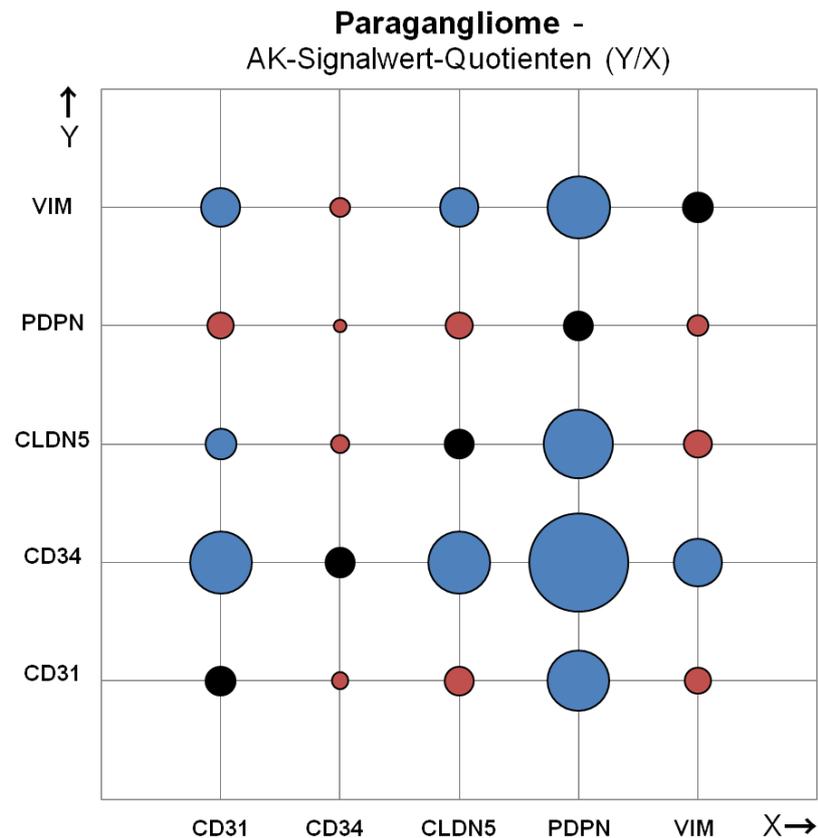


Abbildung 41. Kreisflächendiagramm zur Darstellung der Verhältnisse der AK-Signalwerte in Paragangliomen. Die hier als Kreisfläche dargestellten AK-Signalwert-Quotienten sind Mittelwerte aus den Quotienten einzelner Präparate. So repräsentiert die Kreisfläche unten rechts das Verhältnis von CD31 zu VIM, das sich aus der Mittelwertbildung der Quotienten CD31/VIM aller Paragangliom-Präparate ergibt. Schwarz: Wert = 1 (Bsp. CD31/CD31); Blau: Werte > 1; Rot: Werte < 1.

Das Kreisflächendiagramm in Abbildung 41 veranschaulicht die Quotienten innerhalb der Paragangliome. Die Quotienten zeigen das Verhältnis der DAB-positiv gefärbten Bereiche im Gewebe. Betrachtet werden die Quotienten >1, die hier blau dargestellt sind. Den größten Quotienten ergibt das Verhältnis von CD34 zu PDPN, das sich dementsprechend durch die größte Kreisfläche von den anderen Quotienten abhebt. Beim Marker CD34 fällt auf, dass es durchgehend einen größeren Quotienten als eins bildete. Die Quotienten VIM/PDPN, CLDN5/PDPN und CD31/PDPN sind annähernd gleich groß. Quotienten größer eins weisen auch VIM/CD31, VIM/CLDN5 und CLDN5/CD31 auf. Die Darstellung in Abbildung 42 verdeutlicht die Signifikanzen zwischen den Quotienten.

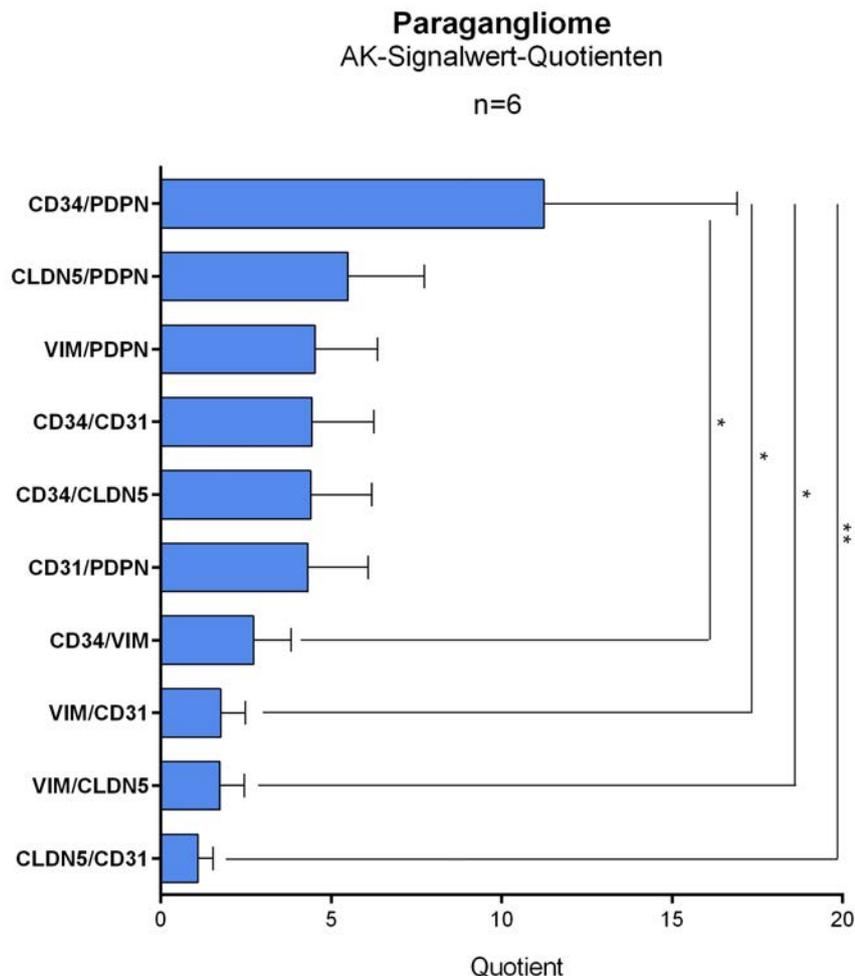


Abbildung 42. Balkendiagramm mit Darstellung der Verhältnisse der Kandidatenprotein-expression innerhalb der Paragangliome. Die hier dargestellten AK-Signalwert-Quotienten sind Mittelwerte aus den Quotienten einzelner Präparate. Betrachtet werden signifikante Quotienten ≥ 1 . * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Es werden Werte > 1 betrachtet, wobei die inversen Quotienten < 1 nicht mit in die statistische Auswertung einbezogen wurden, um Redundanzen zu vermeiden. Im Gewebe der Paragangliome ist der CD34/PDPN Quotient am größten. Dieser weist einen statistisch signifikant höheren Wert verglichen mit CLDN5/CD31 ($p < 0,01$) und VIM/CLDN5, VIM/CD31 und CD34/VIM (alle $p < 0,05$) auf. Die Quotienten VIM/PDPN, CD34/CD31, CD34/CLDN5 und CD31/PDPN sind vergleichbar hoch aber nicht signifikant unterschiedlich zu den übrigen Quotienten. Der Quotient CLDN5/CD31 zeigt den niedrigsten Wert.

4.2.8 Kontrollgewebe

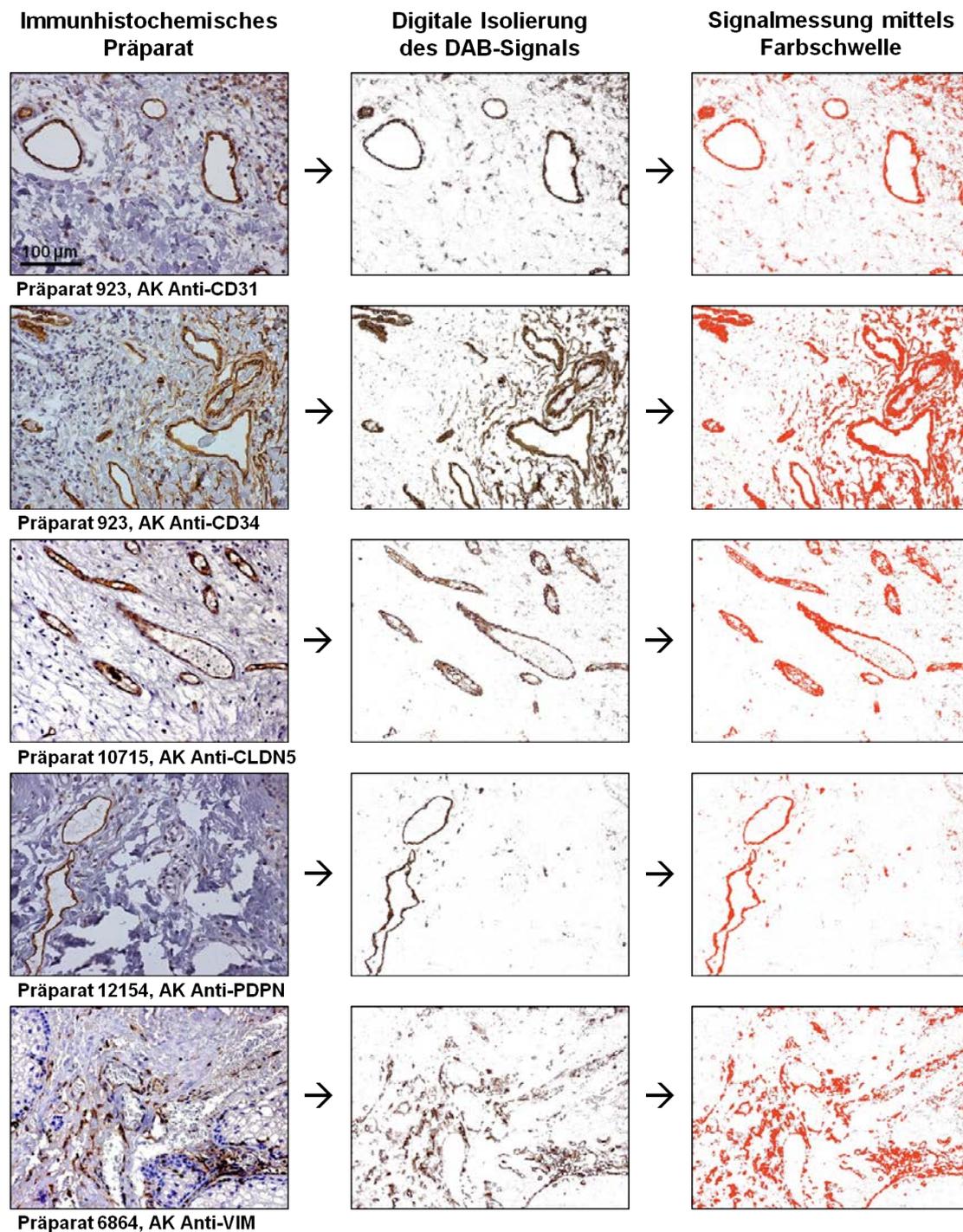


Abbildung 43. Beispielhafte Darstellung der digitalen Erfassung des DAB-Signals aller 5 AK-Färbungen in den Kontrollgeweben. Von links nach rechts sind die Arbeitsschritte der digitalen Auswertung eines Präparates mit Hilfe des Programms ImageJ/Fiji dargestellt. Beispielhaft sind fünf Präparate in 20-facher Vergrößerung aufgezeigt, gefärbt mit dem jeweils angegebenen AK, wobei sich eine positive Färbereaktion braun darstellt. Die Bilder in der Mitte zeigen die Isolierung des DAB-positiven Gewebes mit Hilfe der ImageJ/Fiji-IHC-Toolbox. In der rechten Bildspalte ist die sich anschließende Signalmessung durch Einstellung des Farbschwellenwertes (*Threshold Color*) abgebildet. Die Rotfärbung zeigt an, welche Bereiche bei der Messung erfasst wurden.

Zur Veranschaulichung der Messung des DAB-positiven Signals der Antikörperreaktion, unter Verwendung des Programms ImageJ/Fij, sind in Abbildung 43 beispielhafte Aufnahmen der Kontrollgewebe dargestellt. Die zu Beginn angefertigten immunhistochemischen Färbungen sind in den Fotos der linken Spalte zu sehen. Es sind jeweils Aufnahmen für die Antikörperfärbungen gegen CD31, CD34, CLDN5, PDPN und VIM abgebildet, in denen sich die positive (braune) Färbereaktion darstellt. Eine genauere Beschreibung der Abbildung sowie des Verfahrens kann Kapitel 3.2 entnommen werden. Die Ergebnisse der Antikörperfärbungen in den Kontrollen verdeutlicht Abbildung 44. Dargestellt sind die Gesamtmittelwerte der prozentualen Anteile des Kontrollgewebes im Verhältnis zum Gesamtgewebe, die durch die fünf verwendeten AK angefärbt wurden.

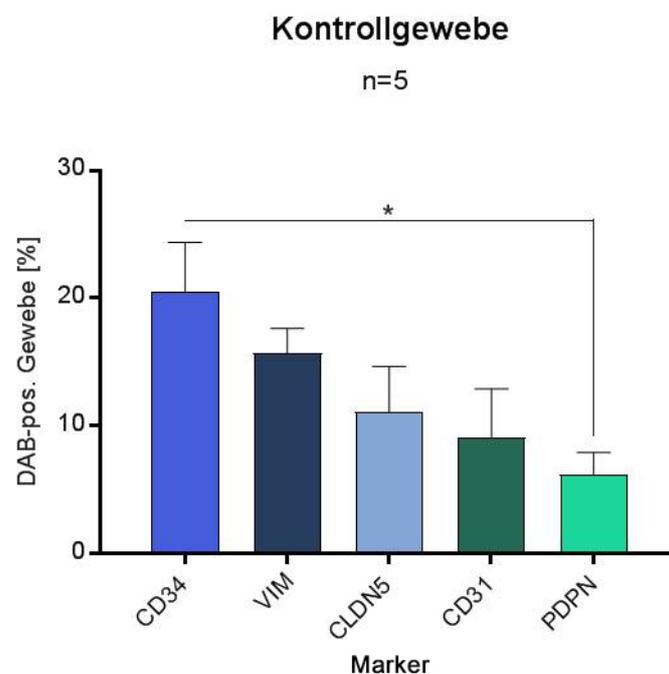


Abbildung 44. Säulendiagramm zur Darstellung der DAB-positiven Gewebeanteile für die verschiedenen Marker innerhalb der Kontrollgewebe. Dargestellt sind Gesamtmittelwerte mit SEM. * $p < 0,05$.

Anti-CD34 färbt einen Anteil von 20,5% innerhalb der Kontrollgewebe positiv an. Dies ist der höchste DAB-positive Anteil innerhalb aller AK, der eine Signifikanz von $p = 0,05$ gegenüber PDPN aufweist. Nach CD34 folgt VIM an zweiter Stelle, der in 15,7% des Kontrollgewebes zu einer positiven Reaktion führt, sich aber nicht statistisch signifikant von den anderen Ergebnissen

abhebt. CLDN5 und CD31 ergeben mit 11,8% und 9% einen ähnlich hohen Signalwert. Bei der Färbung mit PDPN wurde lediglich ein Anteil von 6,1% ermittelt.

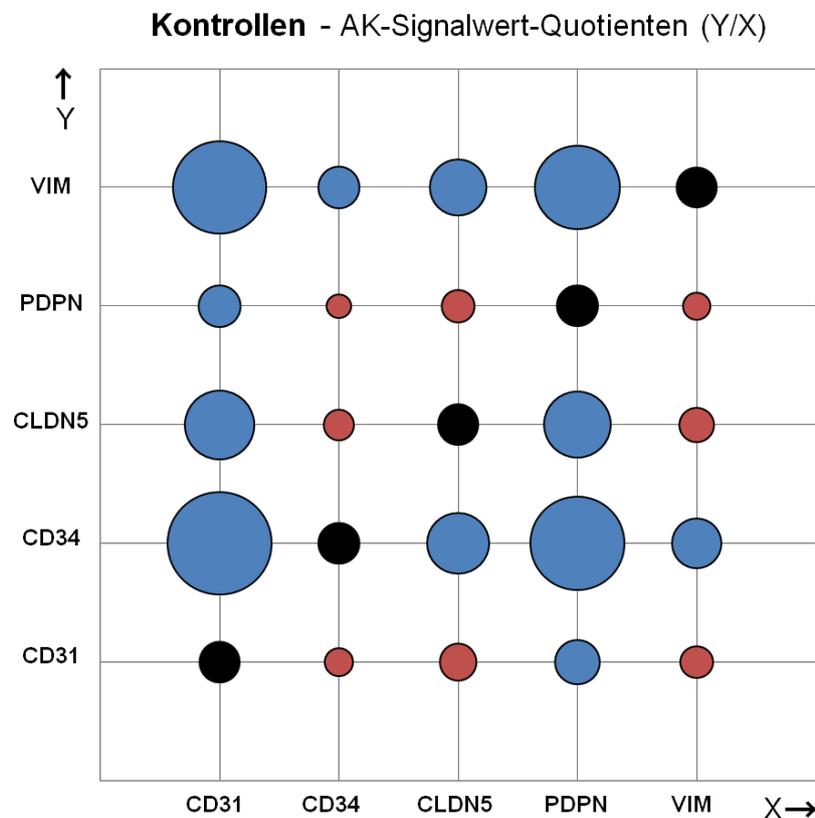


Abbildung 45. Kreisflächendiagramm zur Darstellung der Verhältnisse der AK-Signalwerte im Kontrollgewebe. Die hier als Kreisfläche dargestellten AK-Signalwert-Quotienten sind Mittelwerte aus den Quotienten einzelner Präparate. So repräsentiert die Kreisfläche unten rechts das Verhältnis von CD31 zu VIM, das sich aus der Mittelwertbildung der Quotienten CD31/VIM aller Präparate der Kontrollgewebe ergibt. Schwarz: Wert = 1 (Bsp. CD31/CD31); Blau: Werte > 1; Rot: Werte < 1.

Die Verhältnisse der AK-Signalwerte zueinander sind in Abbildung 45 anhand von Quotienten dargestellt. Die Größe der Kreisflächen repräsentiert dabei den Wert der Quotienten. Betrachtet werden Quotienten mit einem Wert > 1 (blau). Auffallend groß sind die vier Quotienten der VIM und CD34 Signale zu den CD31 und PDPN Signalen. Ähnliche Verhältnisse zeigten CLDN5/CD31, CLDN5/PDPN, VIM/CLDN5 und CD34/CLDN5. Ebenfalls größer eins sind die Quotienten CD34/VIM, CD31/PDPN, VIM/CD34 und PDPN/CD31.

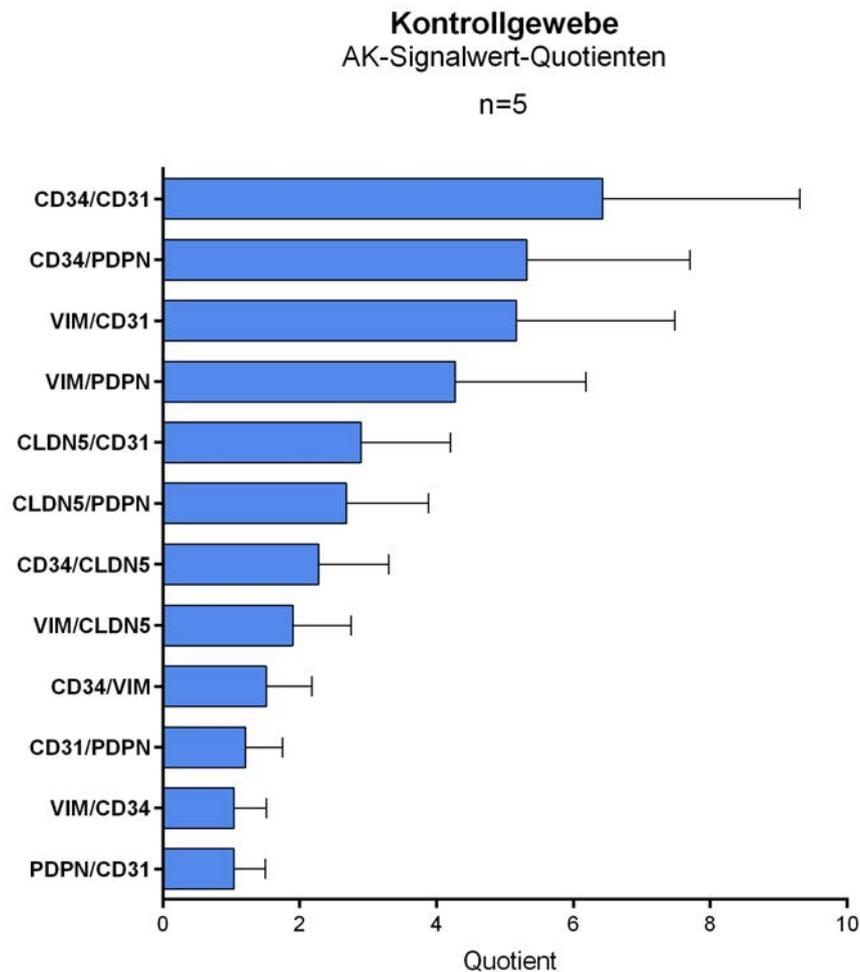


Abbildung 46. Balkendiagramm mit Darstellung der Verhältnisse der Kandidatenprotein-expression innerhalb der Kontrollgewebe. Die hier dargestellten AK-Signalwert-Quotienten sind Mittelwerte aus den Quotienten einzelner Präparate.

Wie in Abbildung 46 dargestellt, hebt sich der Quotient CD34/CD31 von allen anderen ab. Auch CD34/PDPN, VIM/CD31 und VIM/PDPN weisen hohe Werte auf. Die niedrigsten Quotienten zeigen VIM/CD34 und PDPN/CD31. Insgesamt zeigt sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Quotienten im Kontrollgewebe.

4.3 Übersicht zu Unterschieden der AK-Signalwert-Quotienten in den untersuchten Geweben

Die errechneten Quotienten aus den Mittelwerten der DAB-positiv gefärbten Gewebeanteile wurden auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen VA-Geweben untersucht. Abbildung 47A - D gibt einen Überblick über alle berechneten Quotienten der untersuchten Gewebetypen. Ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen zwei Geweben, wurde der Quotient grau dargestellt. Zeigte sich ein signifikanter Unterschied, ist der entsprechende Quotient blau hervorgehoben; dunkelblau, wenn der Quotient des Gewebes im Zähler signifikant größer ist als der Quotient des Gewebes im Nenner; hellblau, wenn der Quotient des Gewebes im Zähler signifikant kleiner ist als der des Gewebes im Nenner. Zum Beispiel ergab ein Vergleich der Quotienten, dass VIM/CD34-Quotient in den pyogenen Granulomen höher ist als in den Lymphangiomen. Entsprechend ist der Quotient der Lymphangiome kleiner als der bei pyogenen Granulomen (Abbildung 47A und C).

In Abbildung 47A - D werden daher auch inverse Quotienten betrachtet, die bislang nicht beschrieben wurden. Dies soll verdeutlichen, dass auch signifikant kleinere Werte im Hinblick auf eine Unterscheidung der Gewebe herangezogen werden können und nicht ausschließlich signifikant größere Quotienten. Diese Darstellung ermöglicht eine schnellere Zuordnung der Quotienten, die zur Unterscheidung der Gewebetypen eingesetzt werden können.

Zur Unterscheidung der Lymphangiome von den anderen VA sowie vom Kontrollgewebe kann der Quotient PDPN/CLDN5 herangezogen werden. Für diesen ergab sich bei den Lymphangiomen im Vergleich zu allen anderen Geweben ein signifikant höherer Wert. Auch PDPN/CD34 war bei den Lymphangiomen signifikant größer gegenüber den Hämangiomen, vaskulären Malformationen, Paragangliomen, venösen Malformationen und Kontrollgeweben. Pyogene Granulome wiesen einen höheren CLDN5/CD34-Quotienten auf, verglichen mit Lymphangiomen, Hämangiomen, arteriovenösen Malformationen, vaskulären Malformationen (n.n.kl.) und Paragangliomen. Ein signifikant höherer Quotient innerhalb der pyogenen Granulome konnte zudem für VIM/CD34 im Vergleich zu den Lymphangiomen berechnet werden.

A

LA/LA	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	LA/HÄM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN
HÄM/LA	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	HÄM/HÄM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN
AVM/LA	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	AVM/HÄM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN
VM (n.n.kl.) /LA	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	VM (n.n.kl.) /HÄM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN
GP/LA	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	GP/HÄM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN
PG/LA	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	PG/HÄM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN
VeM/LA	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	VeM/HÄM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN
KON/LA	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	KON/HÄM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN

Quotienten-Vergleiche zwischen unterschiedlichen Geweben.

- Der AK-Signalwert-Quotient des Gewebes im Zähler ist signifikant größer als der des Gewebes im Nenner
- Der AK-Signalwert-Quotient des Gewebes im Zähler ist signifikant kleiner als der des Gewebes im Nenner
- Der AK-Signalwert-Quotient des Gewebes im Zähler ist nicht signifikant größer oder kleiner als der des Gewebes im Nenner

Quotienten-Vergleiche innerhalb eines Gewebes.

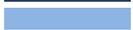
- Der AK-Signalwert-Quotient ist signifikant größer als andere Quotienten innerhalb desselben Gewebes
- Der AK-Signalwert-Quotient ist signifikant kleiner als andere Quotienten innerhalb desselben Gewebes

Abbildung 47A-D. Matrix zur Übersicht der sich unterscheidenden AK-Signalwert-Quotienten in Bezug auf alle acht Gewebetypen. Jeder der insgesamt 20 Quotienten eines Gewebetyps wurde mit dem entsprechenden Quotienten der anderen Gewebetypen auf statistisch signifikante Unterschiede hin überprüft. Als signifikant galt ein Wert von $p < 0,05$. In der Matrix kann z.B. abgelesen werden, dass ein signifikant höherer Quotient von CLDN5/CD34 sich beim Vergleich von Granuloma pyogenicum Geweben mit Hämangiomen ergeben hat. Für alle anderen signifikanten Unterschiede wird auf die Balkendiagramme der Kapitel unter 4.2 verwiesen. LA = Lymphangiome; HÄM = Hämangiome; AVM = arteriovenöse Malformationen; VM = vaskuläre Malformationen (n.n.kl.); GP = Granuloma pyogenicum; PG = Paragangliom; VeM = venöse Malformationen; KON = Kontrollen.

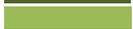
B

LA/AVM (n.n.kl.)	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	LA /VM (n.n.kl.)	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN
HÄM/AVM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	HÄM /VM (n.n.kl.)	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN
AVM/AVM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	AVM /VM (n.n.kl.)	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN
VM (n.n.kl.) /AVM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	VM (n.n.kl.) /VM (n.n.kl.)	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN
GP/AVM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	GP /VM (n.n.kl.)	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN
PG/AVM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	PG /VM (n.n.kl.)	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN
VeM/AVM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	VeM /VM (n.n.kl.)	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN
KON/AVM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	KON /VM (n.n.kl.)	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN

Quotienten-Vergleiche zwischen unterschiedlichen Geweben.

-  Der AK-Signalwert-Quotient des Gewebes im Zähler ist signifikant größer als der des Gewebes im Nenner
-  Der AK-Signalwert-Quotient des Gewebes im Zähler ist signifikant kleiner als der des Gewebes im Nenner
-  Der AK-Signalwert-Quotient des Gewebes im Zähler ist nicht signifikant größer oder kleiner als der des Gewebes im Nenner

Quotienten-Vergleiche innerhalb eines Gewebes.

-  Der AK-Signalwert-Quotient ist signifikant größer als andere Quotienten innerhalb desselben Gewebes
-  Der AK-Signalwert-Quotient ist signifikant kleiner als andere Quotienten innerhalb desselben Gewebes

C

LA/GP	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	LA/PG	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN
HÄM/GP	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	HÄM/PG	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN
AVIM/GP	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	AVIM/PG	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN
VM (n.n.kl.) /GP	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	VM (n.n.kl.) /PG	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN
GP/GP	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	GP/PG	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN
PG/GP	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	PG/PG	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN
VeM/GP	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	VeM/PG	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN
KON/GP	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN	KON/PG	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN PDPN/CLDN5 VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM VIM/PDPN

Quotienten-Vergleiche zwischen unterschiedlichen Geweben.

- Der AK-Signalwert-Quotient des Gewebes im Zähler ist signifikant größer als der des Gewebes im Nenner
- Der AK-Signalwert-Quotient des Gewebes im Zähler ist signifikant kleiner als der des Gewebes im Nenner
- Der AK-Signalwert-Quotient des Gewebes im Zähler ist nicht signifikant größer oder kleiner als der des Gewebes im Nenner

Quotienten-Vergleiche innerhalb eines Gewebes.

- Der AK-Signalwert-Quotient ist signifikant größer als andere Quotienten innerhalb desselben Gewebes
- Der AK-Signalwert-Quotient ist signifikant kleiner als andere Quotienten innerhalb desselben Gewebes

D

LA/VeM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM	LA/KON	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM
HÄM/VeM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM	HÄM/KON	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM
AVM/VeM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM	AVM/KON	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM
VM (n.n.kl.) /VeM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM	VM (n.n.kl.) /KON	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM
GP/VeM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM	GP/KON	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM
PG/VeM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM	PG/KON	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM
VeM/VeM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM	VeM/KON	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM
KON/VeM	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM	KON/KON	CD34/CD31 CD31/CD34 CLDN5/CD31 PDPN/CD31 VIM/CD31	CD34/CLDN5 CD31/CLDN5 CLDN5/CD34 PDPN/CD34 VIM/CD34	CD34/PDPN CD31/PDPN CLDN5/PDPN VIM/CLDN5	CD34/VIM CD31/VIM CLDN5/VIM PDPN/VIM

Quotienten-Vergleiche zwischen unterschiedlichen Geweben.

- Der AK-Signalwert-Quotient des Gewebes im Zähler ist signifikant größer als der des Gewebes im Nenner
- Der AK-Signalwert-Quotient des Gewebes im Zähler ist signifikant kleiner als der des Gewebes im Nenner
- Der AK-Signalwert-Quotient des Gewebes im Zähler ist nicht signifikant größer oder kleiner als der des Gewebes im Nenner

Quotienten-Vergleiche innerhalb eines Gewebes.

- Der AK-Signalwert-Quotient ist signifikant größer als andere Quotienten innerhalb desselben Gewebes
- Der AK-Signalwert-Quotient ist signifikant kleiner als andere Quotienten innerhalb desselben Gewebes

5. Diskussion

Dank des Klassifikationssystems der ISSVA (*International Society for the Study of Vascular Anomalies*) existiert eine standardisierte Nomenklatur der vaskulären Anomalien. Diese basiert vorwiegend auf der Einteilung nach Mulliken und Glowacki (Mulliken and Glowacki 1982). Eine Diagnosestellung wird allerdings durch das heterogene klinische Bild der Anomalien erschwert. So ist die initiale Diagnose in bis zu 69% der Fälle inkorrekt. Ebenso häufig wird im Rahmen der Therapie eine nicht zutreffende Terminologie verwendet (MacFie and Jeffery 2007). Die frühzeitige Anwendung einer optimalen Therapie der Gefäßmalformationen ist ausschlaggebend für den weiteren Verlauf der Erkrankung, das Therapieansprechen und die Entstehung möglicher Folgeschäden. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, die Diagnosestellung so weit wie möglich zu präzisieren. Die Klassifikation der ISSVA folgt sowohl klinischen Kriterien, als auch histopathologischen Befunden. Letztere haben sich bei einer exakteren Zuordnung vaskulärer Anomalien im Hinblick auf die Untergruppen der vaskulären Malformationen und vaskulären Tumoren bewährt (Dadras et al. 2004; Al-Adnani et al. 2006).

Es stellt sich nicht nur die Frage der korrekten Diagnosestellung, sondern auch der Entstehung von VA. Über den Nachweis immunhistochemischer Marker lassen sich mitunter auch Hinweise zur Expression und somit möglichen Störung der Genfunktion in VA beobachten (Greene and Goss 2018). Einen Ansatz bilden hier aktuelle Erkenntnisse über den Einfluss von Mutationen wie z.B. im *PIK3CA*-Gen auf die Entstehung von venösen und lymphatischen Malformationen bzw. mit ihnen assoziierten Syndromen (Luks et al. 2015)

In der vorliegenden Arbeit wird an einer Auswahl vaskulärer Anomalien die Expression von Gefäßmarkern herausgearbeitet. Des Weiteren wird die digitale quantitative Bildanalyse als Instrument zur Unterstützung der histopathologischen Diagnosestellung bewertet. Die digitale Bildanalyse soll zu einer verbesserten Subklassifizierung der Gefäßanomalien beitragen und somit zu einer frühzeitigen, auf das spezifische VA-Gewebe abgestimmten, Therapie führen.

5.1 Expression der Kandidatenproteine

Aufgrund der großen Anzahl immunhistochemischer Marker, die bei der Untersuchung von Gefäßmalformationen von Interesse sind, musste eine begrenzte Auswahl getroffen werden. Aus einer größeren Anzahl von Markern wurden nur diejenigen weiterverwendet, die ein gutes immunhistochemisches Ergebnis lieferten und in wiederholten Färbungen spezifisch Gefäße darstellten. Bei den ausgewählten Markern handelt es sich zum Teil sowohl um etablierte Endothelmarker (CD31, CD34, PDPN) als auch um Marker zellulärer Intermediärfilamente (VIM) und Zell-Zell-Verbindungen (CLDN5).

5.1.1 CD31

CD31 (Cluster of Differentiation 31) ist ein transmembranes Glykoprotein mit einer Größe von 130 kDa und Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie. Es wird auch als PECAM-1 (Platelet-endothelial-cell-adhesion-molecule-1) bezeichnet und dient als Zelladhäsionsmolekül, das auf Endothelzellen, Thrombozyten, Granulozyten, einigen T-Zellen sowie Monozyten exprimiert wird. In Endothelzellen findet man es vor allem an interzellulären Verbindungen. Es spielt unter anderem eine Rolle bei der Steuerung der Leukozyten-Transmigration (Muller et al. 1993; Muller and Randolph 1999), der Aufrechterhaltung der Zellbarriere des Endothels (Mei et al. 2014; Ren et al. 2015) und der Angiogenese (Delisser et al. 1997; Matsumura et al. 1997). CD31 stellt, aufgrund seiner hohen Spezifität und Sensitivität, einen sicheren Endothelmarker dar, der in benignen sowie malignen vaskulären Tumoren nachgewiesen wurde (DeYoung et al. 1995; Fanburg-Smith et al. 2003; Liu et al. 2015).

Die homogene Verteilung der CD31-Expression innerhalb der untersuchten Gewebe unterstreicht die Rolle von CD31 als panendothelialen Marker (Vermeulen et al. 2002). Dieser ist in allen endothelial differenzierten Zellen nachweisbar (DeYoung et al. 1998). CD31 zeigt in dieser Arbeit sowohl in vaskulären Malformationen (n.n.kl.), z.B. den Lymphangiomen, venösen Malformationen, AVM und Paragangiomen eine positive Reaktion, als auch im Kontrollgewebe und in vaskulären Tumoren wie den Hämangiomen und Granuloma pyogenicum. Die breitgefächerte Expression dieses Proteins in

Endothelien unterschiedlichen Ursprungs lässt sich auch durch die Rolle von CD31 in der Gefäßneubildung und Angiogenese erklären (Marszalek et al. 2000). Ein Problem bei der Auswertung der CD31-positiven Gewebeareale stellt die positive Färbung von Makrophagen dar. Diese sind häufig in entzündetem Gewebe aber auch in Tumorgeweben in hoher Zahl nachweisbar. Vermehrt zu finden sind Makrophagen auch in vaskulären Anomalien, in denen ein Flüssigembolisat wie z.B. Onyx zur perkutanen Embolisierung zur Anwendung kommt, da sie diese Fremdkörper phagozytieren. Aufgrund einer verstärkten Expression kann es zu einer Fehlinterpretation der CD31-Anreicherung in intratumoralen Makrophagen und folglich zu einer Fehldiagnose einer Gefäßmalformation kommen (McKenney et al. 2001).

5.1.2 CD34

Bei CD34 handelt es sich um ein integrales Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 105-120 kDa. Es ist unter anderem an der Oberfläche von hämatopoetischen Stammzellen, Kapillarendothelien und Fibroblasten aufzufinden. Eine weitere Zellreifung führt zu einer Abnahme der CD34-Expression. In der Immunhistochemie stellt es einen gut etablierten Endothelzellmarker dar und weist, vor allem in Kombination mit CD31, eine hohe Spezifität für vaskuläre Differenzierung auf (Miettinen et al. 1994).

In diversen Studien konnte das Protein im Rahmen der Tumorangiogenese, vorrangig auf Mikrogefäßen, von Kopf-Hals-Tumoren nachgewiesen werden (Kukreja et al. 2013). Yu et al. konnten zirkulierende CD133⁺/CD34⁺ endotheliale Vorläuferzellen in Hämangiomen aber auch im Blut von Patienten nachweisen. Dies unterstützt die Theorie zur Entstehung vaskulärer Tumoren aus endothelialen Vorläuferzellen (Yu et al. 2004). Nachfolgende Untersuchungen zeigen, dass die Menge der zirkulierenden CD34⁺-Zellen mit dem Stadium der AVM zunimmt und somit in high-stage AVM am größten ist (Lu et al. 2011).

Signifikante Unterschiede in der CD34-Expression zwischen den untersuchten Geweben konnten nicht festgestellt werden. Diese Beobachtung wird gestützt durch die Tatsache, dass es sich bei CD34 um einen etablierten

immunhistochemischen Marker für hämatopoetische Vorläuferzellen, Endothelzellen und vaskuläre Differenzierung handelt (Miettinen et al. 1994). Somit war eine starke Anfärbung des Endothels in allen vaskulären Anomalien zu erwarten. Aufgrund der Tatsache, dass nur benigne Formen vaskulärer Anomalien untersucht wurden, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob CD34 sich als Marker des Differenzierungsgrades einer Gefäßmalformation eignet. Die wenig differierenden Messwerte für die Expression von CD34 sind somit möglicherweise auch auf die durchgehend gutartige Dignität der Gewebe zurückzuführen. Bisherige Studien weisen darauf hin, dass die CD34-Expression mit der Abnahme der Differenzierung sinkt und somit in malignen Gefäßtumoren verringert ist (Suster and Wong 1994).

Der größte CD34-positive Gewebeanteil wurde bei Paragangliomen nachgewiesen. Diese Beobachtung kann begründet werden mit der starken Vaskularisierung dieser Tumoren durch die Tumorgefäße. In Paragangliomen bzw. Glomustumoren der Extremitäten ist bereits eine CD34-Positivität beschrieben (Hatori et al. 1997; Mentzel and Kutzner 2002). Zudem zeigte sich auch in zwei Fällen der seltenen, nasalen Glomustumoren eine CD34, sowie VIM-Expression (Chu et al. 1999). Histologische Untersuchungen an Paragangliomen konnten bisher keinen Zusammenhang zwischen dem immunhistochemischen Profil und der Malignität der Tumoren feststellen (Lee et al. 2002).

Die CD34-Expression in den hier untersuchten Lymphangiomen war geringer als in AVM, venösen Malformationen und Hämangiomen, jedoch ebenfalls deutlich nachweisbar. Bereits in anderen Untersuchungen wurde eine CD34-Expression in Tumoren lymphatischen Ursprungs und Tumor-Lymphgefäßen beobachtet (Mentzel and Kutzner 2002; Arai et al. 2006; Fiedler et al. 2006). Das Kontrollgewebe wies die niedrigste CD34-Expression auf, wobei diese sich nicht signifikant von der in anderen Geweben unterschied. Dies ist insofern nicht überraschend, da die Haut gut vaskularisiert ist und viele normale gut differenzierte Gefäße aufweist, die sich CD34-positiv darstellen (Pusztaszeri et al. 2006; Tardío 2009).

5.1.3 Claudin 5

Claudin 5 (CLDN5) ist ein Mitglied der Claudin-Familie, einer Gruppe von kleinen Transmembranproteinen, die eine wichtige Strukturkomponente in *Tight-Junctions* bilden. Hier tragen sie zur Barrierenbildung zwischen benachbarten Zellen bei und regulieren so den Austausch von Molekülen durch den Zellzwischenraum. CLDN5 wird auch als TMVCF (*transmembrane-protein-deleted-in-velo-cardio-facial-syndrome*) bezeichnet, da bei dieser Erkrankung ein Defekt im *CLDN5*-Gen vorliegt.

Expressiert werden Claudine sowohl in epithelialen als auch in endothelialen Zellen. Sie treten auch in Blutgefäßen der Niere, des Gastrointestinaltraktes und der Lunge auf (Morita et al. 1999). In dermalen Blutgefäßen zeigt CLDN5 eine inkonstante und heterogene Expression, was auf eine spezifische Funktion im Rahmen der vaskulären Differenzierung hindeuten könnte, die bisher aber noch unklar ist (Morita et al. 2003). Studien zur Blut-Hirn-Schranke schreiben dem Protein eine essentielle Funktion bei der Aufrechterhaltung dieser Barriere zu (Nitta et al. 2003). Sie beobachteten einen Einfluss von Hypoxie auf die Expression von CLDN5 in neuralen Blutgefäßen, wobei ein Lokalisationswechsel des Claudins innerhalb der Endothelzelle zu einer Störung der Zellbarriere führte (Koto et al. 2007). Aktuelle Befunde lassen jedoch vermuten, dass es sich bei Claudinen nicht nur um „Barriereproteine“ handelt, sondern dass sie auch eine Rolle im Zellwachstum und der Transition von epithelialelem zu mesenchymalem Gewebe spielen (Ohkubo and Ozawa 2004).

Die Ergebnisse zur CLDN5-Expression in vaskulären Anomalien decken sich zum Teil mit Beobachtungen früherer Arbeiten. Hervorzuheben sind hier Untersuchungsbefunde von Miettinen et al. im Hinblick auf die Beteiligung von CLDN5 an der Entwicklung von Blutgefäßen (Miettinen et al. 2011). Sie untersuchten das Transmembranprotein bezüglich seiner Expression in malignen sowie benignen vaskulären Anomalien. Die Befunde unterstreichen die Vermutung, dass CLDN5 eine Rolle bei der vaskulären Differenzierung und somit für die Pathogenese vaskulärer Anomalien, spielt. Beobachtet wurde eine starke und konstante Expression in malignen vaskulären Tumoren, wie Angiosarkomen, Kaposi-Sarkomen und Hämangioendotheliomen. Bei benignen

vaskulären Anomalien, wie kapillären, kavernösen und venösen Hämangiomen sowie Lymphangiomen, zeigte sich ebenfalls eine durchgehende Expression, wobei sich noch unvollständig geformte Lumina negativ darstellten. Auch juvenile Hämangiome mit mäßiger Differenzierung wiesen eine variable Expression auf (Miettinen et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden keine malignen vaskulären Anomalien untersucht. Es zeigte sich jedoch, dass benigne Gefäßtumoren wie gutartige Paragangiome, venöse Malformationen, AVM, vaskuläre Malformationen (n.n.kl.) und Lymphangiome ähnliche CLDN5-Expressionsmuster aufwiesen. Auch in Hämangiomen zeigte sich ein geringer Prozentsatz des Gewebes positiv für CLDN5. Eine Expression in Endothelzellen von Hämangiomen und Lymphangiomen konnten auch Jakab et al. nachweisen (Jakab et al. 2009). Die Autoren untersuchten Gewebeproben von Hunden und beobachteten eine verstärkte CLDN5-Expression in benignen und malignen Tumoren vaskulären Ursprungs, im Vergleich zu Anomalien nicht-vaskulären Ursprungs. CLDN5 erscheint somit als vielversprechender Marker für eine neoplastische Proliferation endothelialer Zellen und für fortgeschrittene vaskuläre Anomalien.

Der größte prozentuale Anteil wurde in pyogenen Granulomen gemessen. Die starke CLDN5-Positivität dieses Gewebes könnte in ihrer ausgeprägten Gefäßanzahl und ihrer hohen Gefäßproliferationsrate begründet sein. Das Granuloma pyogenicum wird, wie bereits beschrieben, auch als Granuloma gravidarum bezeichnet, da es vermehrt in der Schwangerschaft auftritt. Bei erhöhten Östrogenspiegeln wurde in aktuellen Untersuchungen eine verstärkte Expression von CLDN5 in Endothelzellen nachgewiesen. Es wird vermutet, dass durch die verstärkte CLDN5-Expression eine verbesserte Gefäßstabilität und Barrierefunktion gewährleistet wird (Burek et al. 2010). In diesem Zusammenhang könnte CLDN5 bei der Entstehung pyogener Granulome eine Rolle spielen. Diese Hypothese wird durch die in dieser Arbeit beobachtete starke CLDN5-Expression in pyogenen Granulomen gestützt.

5.1.4 Podoplanin

D2-40 ist ein monoklonaler Antikörper aus der Maus, der spezifisch an ein Epitop des humanen Podoplanins (PDPN) bzw. des M2A-Antigens bindet. Bei

Podoplanin handelt es sich um ein ausgeprägt glykosyliertes Protein vom Muzintyp mit einer Größe von ~38 kD das auf lymphatischen Endothelien exprimiert wird. Es erhielt seinen Namen aufgrund zahlreicher Untersuchungen an Podozyten der Niere (Breiteneder-Geleff et al. 1997). Seine Expression wurde erstmals im Jahre 1996 beschrieben. Hierbei zeigte sich, dass ein Antikörper gegen PDPN, neben Osteoblasten und Osteozyten, auch lymphangische Endothelien und Alveolarzellen vom Typ I anfärbt (Wetterwald et al. 1996). Weitere Untersuchungen ergaben, dass PDPN nicht in Blutgefäßendothelien zu finden ist. Es zeigte sich jedoch eine Expression in normalem sowie Tumor assoziiertem lymphatischen Endothel und einer Vielzahl weiterer nicht-endothelialer Gewebe, wie Keratinozyten der Basalzellschicht der Haut, Nervenfasern und Keimzelltumoren (Schacht et al. 2005). Die Funktion von Podoplanin ist noch nicht abschließend geklärt. Schacht et al. konnten an Podoplanin-defizienten Mäusen eine Entwicklung von Lymphödemen und respiratorischer Insuffizienz beobachten. Vermutlich spielt PDPN eine Rolle bei der Reifung der Lunge und der Funktion und Bildung des Lymphgefäßsystems (Schacht et al. 2003).

Auch wenn PDPN insbesondere als Marker für lymphangisches Endothel bekannt ist, etablieren neuere Untersuchungen ihn zunehmend auch als Marker für Neoplasien unterschiedlichsten Ursprungs. So eignet er sich z.B. für die Erkennung von Hämangioblastomen des ZNS, Schwannomen und zur Detektion einer Lymphgefäßinvasion bei Tumoren (Kalof and Cooper 2009).

In Übereinstimmung mit bisherigen Untersuchungen, wurde die signifikant höchste PDPN-Expression in Lymphangiomen gemessen ($p < 0,01$). PDPN dient als Marker lymphangischer Endothelien. In Bezug auf vaskuläre Tumoren überwiegt deshalb der Einsatz dieses Markers zur sensitiven und spezifischen Erkennung von Lymphangiomen (Kalof and Cooper 2009). Zahlreiche Studien unterstreichen seinen Beitrag z.B. zur Differenzierung kaposiformer Hämangioendotheliome und büschelartiger kapillärer Hämangiome (im Englischen: *tufted angioma*) (Fukunaga 2005; Arai et al. 2006). PDPN bietet sich somit auch zur Klassifizierung verschiedener vaskulärer Tumoren hinsichtlich ihres lymphatischen Ursprungs an. Bei venösen Malformationen und Hämangiomen zeigten sich in der vorliegenden Arbeit die geringsten

Expressionsgrade, was bisherige Beobachtungen stützt (Fukunaga 2005; Arai et al. 2006).

5.1.5 Vimentin

Vimentin (VIM) gehört zu den Intermediärfilamenten, die der strukturellen Integrität von Zellen und dem Zusammenhalt von Geweben dienen. Es handelt sich um ein 57 kDa großes Protein, das charakteristisch ist für mesenchymale Zellen gutartigen als auch bösartigen Ursprungs. Eine zunehmende VIM-Expression markiert die Transition von epithelialelem zu mesenchymalem Gewebe, die im Rahmen der Embryogenese und Metastasierung von Tumoren beobachtet werden kann. Übereinstimmend damit konnte gezeigt werden, dass die Stärke der VIM-Expression mit der Verformung, Adhäsion und Motilität von Zellen korreliert (Mendez et al. 2010). VIM steht außerdem in Verbindung mit Tumorwachstum und Tumorprogression und wird in diversen Tumoren überexprimiert. Beispielhaft zu nennen sind hierbei Prostata- und Mammakarzinome, sowie Tumoren des Gastrointestinaltraktes, des Zentralnervensystems und der Lunge. Seine genaue Rolle in der Progression von Tumoren ist allerdings noch unzureichend geklärt (Satelli and Li 2011).

Bisherige Untersuchungen beschreiben es als ein multifunktionelles Protein, da bei VIM-defizienten Mäusen Pathologien beobachtet wurden, die verschiedene Organsysteme betreffen. So zeigte sich bei diesen Tieren unter anderem eine beeinträchtigte Wundheilung, die einer Insuffizienz von Fibroblasten zugeschrieben wird (Eckes et al. 2000). Ferner starben VIM-Knockout-Mäuse an terminaler Niereninsuffizienz und wiesen ein vermindertes arterielles *Remodelling* auf (Terzi et al. 1997; Schiffers et al. 2000).

Eine ausgeprägte VIM-Färbung zeigte sich in pyogenen Granulomen. Ein Zusammenhang mit dem starken Zellwachstum dieser Gefäßstrukturen, die eine ausgeprägte Gefäßproliferation zeigen, ist möglich. In anderen Arbeiten wurde beobachtet, dass pyogene Granulome eine Expression des Fibroblasten-Wachstumsfaktors (FGF engl. *Fibroblast Growth Factor*) aufweisen. Dies spricht auch für eine rasche Wachstumstendenz der Granulome. Über die Fibroblasten als Hauptvertreter mesenchymaler Zellen wird so auch eine

Verbindung zur VIM-Expression hergestellt (Yuan et al. 2000). Da Lymphangiome eine niedrigere Proliferationsrate aufweisen und zudem wenig Blutgefäßendothelien enthalten, überrascht es nicht, dass in diesem Gewebe der geringste VIM-positive Gewebeanteil gemessen wurde (Kalisa et al. 2001).

Es ist bekannt, dass VIM vermehrt in endothelialen Zellen exprimiert wird. Analysen hierzu zeigen, dass es sich bei dem vorherrschenden Intermediärfilament in glatten Gefäßmuskelzellen um VIM handelt. Untersucht wurde hierbei Gewebe aus der Aorta sowie kleinere arterielle und venöse Gefäße. Die starke VIM-Expression legt eine enge Beziehung der Endothelzellen zu anderen mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten nahe. Dies unterstreicht das proliferative und kontraktile Potential von Gefäßzellen unter pathologischen und physiologischen Bedingungen (Franke et al. 1979; Gabbiani et al. 1981; Fujimoto 1986). Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Nachweis von VIM in AVM, Paragangliomen, venösen Malformationen, vaskulären Malformationen (n.n.kl.) und Hämangiomen, kann somit durch eine verstärkte Proliferation der Gefäße in diesen Anomalien erklärt werden. Überraschend ist der ebenso hohe VIM-positive Gewebeanteil im Kontrollgewebe. Bei dem Kontrollgewebe handelt es sich überwiegend um Präparate aus der Haut und um benigne Hauttumoren wie Fibrome oder Atherome. Die VIM-Expression kann folglich in der hohen Fibroblastenzahl und dem gesteigerten Wachstum dieser Läsionen begründet sein (Magnusson and Rasmusson 1995; Bhagalia et al. 2012). Wie bereits beschrieben ist VIM auch in gesunden Endothelien nachweisbar. Durch eine gute Vaskularisierung der Haut und mitunter verstärkte Durchblutung auch bei benignen Hauttumoren, kann die VIM-Expression im untersuchten Kontrollgewebe erklärt werden. Bei der Interpretation von VIM-Färbungen muss allerdings in Betracht gezogen werden, dass es sich um einen allgemeinen unspezifischen Marker mesenchymalen Gewebes handelt, der in zahlreichen mesenchymalen Weichgewebstumoren nachweisbar ist. Da zudem nahezu alle Gewebe, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, einen hohen Gefäßreichtum aufweisen und VIM in der glatten Gefäßmuskulatur nachweisbar ist, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der relativen Expression. Folglich kann

eine alleinige Färbung mit VIM nicht für die Unterscheidung vaskulärer Anomalien herangezogen werden.

5.2 Expression der Gefäßmarker in verschiedenen Gefäßmalformationen

5.2.1 Lymphangiome

In der Gruppe der Lymphangiome wurde für CD34 eine signifikant höhere Expression gemessen als für CLDN5 und VIM ($p < 0,05$) (Abbildung 16). PDPN-Färbungen ergaben den zweithöchsten positiven Gewebeanteil. Die höhere CD34-Expression beruht vermutlich darauf, dass es sich hierbei um einen panendothelialen Marker handelt, der sowohl Blut-, als auch Lymphgefäße anfärbt. Da bei der Messung der CD34-Färbung auch Blutgefäße erfasst werden, die das Lymphangiom umgeben oder durchziehen, ergibt sich ein höherer Expressionswert. Der Anti-PDPN-Antikörper färbt dagegen nur lymphangisches Endothel an. Diese bekannten Eigenschaften der Marker werden bereits routinemäßig in der Pathologie zur Unterscheidung der Lymph- und Blutgefäßinvasion von Tumoren eingesetzt (Van den Eynden et al. 2006).

Erwartungsgemäß wurde PDPN, als etablierter Marker lymphatischen Endothels, in einem Großteil des Lymphangiomgewebes nachgewiesen. Die vorhandenen Ergebnisse unterstreichen somit die Bedeutung von PDPN als zuverlässigen Marker von Lymphgefäßen, die in vielen zurückliegenden Studien beobachtet wurde (Evangelou et al. 2005).

Miettinen et al. wiesen eine positive Reaktion auf CLDN5 in Lymphangiomen nach (Miettinen et al. 2011). Diese Ergebnisse decken sich insofern mit den Untersuchungen dieser Arbeit, da auch hier eine CLDN5-Expression nachzuweisen war. Der positive CLDN5-Gewebeanteil war jedoch relativ gering. Am schwächsten exprimiert zeigte sich VIM in lymphatischen Endothelien (Abbildung 16), wobei Blutgefäßendothelien eine deutliche Expression aufwiesen, was mit Beobachtungen anderer Gruppen übereinstimmt (Liu et al. 2010).

Bei Lymphangiomen wurde z.B. der Quotient PDPN/VIM als signifikant höchster Quotient, verglichen z.B. mit CD34/PDPN, PDPN/CD31, CD34/31 ($p < 0,01$) (Abbildung 18) nachgewiesen. Der signifikant kleinste Quotient war VIM/CD34 ($p < 0,01$). Diese Expressionskonstellation würde daher, bei Färbung eines unbekanntes Präparates mit den hier verwendeten Markern, die Diagnose eines Lymphangioms nahelegen. Zusätzlich veranschaulicht das Muster des Kreisflächendiagramms (Abbildung 17) durch die hohen Werte in der Spalte für VIM diese Diagnose, das durch die niedrigen Signalwerte für VIM entsteht. Mit Hilfe dieser Quotienten ist es daher möglich, zur Diagnosestellung von VA beizutragen.

5.2.2 Arteriovenöse Malformationen

Bei den arteriovenösen Malformationen (AVM) zeigte sich regelmäßig eine starke Anfärbung mit CD34 (Abbildung 20). Hierbei handelt es sich um einen in der Immunhistochemie fest etablierten Endothelzellmarker, der als Indikator einer vaskulären Differenzierung dient (Miettinen et al. 1994). Dies macht die hohe CD34-Expression in gefäßreichen AVM nachvollziehbar. CD34 färbte signifikant mehr Gewebereiche an, als CLDN5 und PDPN ($p < 0,01$). Für den lymphangischen Marker PDPN wurde hingegen kein hohes Färbesignal im AVM-Gewebe erwartet, obwohl lymphatische Gefäße in AVM teilweise nachzuweisen sind (Boettcher et al. 2010). Dies wurde durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt, wobei ebenfalls bestätigt werden konnte, dass PDPN als zuverlässiger Marker lymphangischen Endothels einsetzbar ist (Fukunaga 2005).

CLDN5 wies eine vergleichbare (niedrige) Expression wie PDPN auf (Abbildung 20). Andere Arbeitsgruppen beobachteten eine konstante CLDN5-Expression in benignen und malignen vaskulären Anomalien, wobei in Letzteren diese allerdings höher ausfiel (Miettinen et al. 2011). Da nur benigne vaskuläre Anomalien untersucht wurden, kann keine Aussage über die Spezifität von CLDN5 bezüglich des Differenzierungsgrades der Anomalie gemacht werden.

VIM ist eines der Hauptintermediärfilamente in Blutgefäßendothelien und reagiert positiv in Geweben mesenchymalen Ursprungs. VIM zeigte ein

vergleichbares Expressionsmuster wie der Endothelmarker CD31. Dieses Ergebnis bestätigt Arbeiten anderer Gruppen, in denen gezeigt wurde, dass menschliche Gefäßendothelien VIM-positiv sind (Stosiek et al. 1990).

5.2.3 Hämangiome

In Hämangiomen zeigte sich ein Großteil des Gewebes CD34 positiv (Abbildung 24), wobei signifikant mehr Gewebe angefärbt wurde als bei CLDN5, CD31 ($p < 0,05$) und PDPN ($p < 0,01$). Aufgrund des Gefäßreichtums dieses vaskulären Tumors ist die hohe CD34-Expression nicht überraschend. Auch in der Literatur ist die Expression dieses Endothelmarkers in Hämangiomen beschrieben (Bohle et al. 1998), wobei CD34 ebenso wie CD31 auch in der histopathologischen Routine zur Untersuchung von vaskulären Fehlbildungen eingesetzt wird. Suster und Wong beobachteten eine starke Anfärbung in erster Linie bei gut differenzierten, reifen Gefäßen in Hämangiomen und keine bis schwache Positivität in den Endothelien unreifen Granulationsgewebes (Suster and Wong 1994). Unsere Untersuchungsergebnisse unterstreichen die Expression von CD34 in reifen Hämangiom-Endothelzellen.

Im Gegensatz zu CD34 färbte VIM nur etwa die Hälfte des Gewebes an. Auch Kang et al. beobachteten eine positive Reaktion des mesenchymalen Markers VIM in einem Hämangiom (Kang et al. 2014). In einer anderen Arbeit zeigten sich ebenfalls Endothelzellen einer Unterform des Hämangioms, dem lobulären kapillären Hämangiom, VIM positiv. Eine VIM-Expression wurde dabei in reifen sowie unreifen Gefäßen beobachtet (Nichols et al. 1992).

Färbungen mit CD31 und CLDN5 zeigten vergleichbare Färbegrade. Andere Arbeiten zeigten eine positive CD31-Reaktion des Endothels in epitheloiden, kavernösen und kapillären Hämangiomen (DeYoung et al. 1995; Sun et al. 2006). Takahashi et al. untersuchten die CD31-Expression abhängig vom Entwicklungsstadium des Hämangioms. Sie beobachteten vor allem in der Proliferationsphase bzw. im Übergang vom unreifen zum reifen Endothel, eine starke CD31-Reaktion (Takahashi et al. 1994).

Übereinstimmend mit bisherigen Untersuchungen konnte lediglich ein geringes Färbesignal des lymphangischen Markers PDPN nachgewiesen werden (Fukunaga 2005) (Abbildung 24).

Aufgrund der ausgeprägten Expression von CD34 im Vergleich zu den anderen Kandidatenmarkern, sticht CD34 erneut als zuverlässiger Endothelmarker hervor, der stark und spezifisch in Hämangiomgeweben exprimiert wird.

5.2.4 Vaskuläre Malformationen (n.n.kl.)

Auch Gewebe n.n.kl. vaskulärer Malformationen zeigten größtenteils CD34 positive Gewebeareale. Diese waren signifikant größer verglichen mit PDPN ($p < 0,001$), CLDN5 und CD31 ($p < 0,01$) (Abbildung 28). Dass es sich bei CD34 um einen etablierten Endothelmarker handelt, wurde bereits in zahlreichen Studien belegt (Miettinen et al. 1994). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen damit überein und unterstreichen die Rolle von CD34 als zuverlässigen Endothelmarker, die auch von Guttman et al. hervorgehoben wird (Guttman et al. 2004).

Der hohe Anteil VIM-positiven VM-Gewebes ist vermutlich auf den Gefäßreichtum in diesen Malformationen zurückzuführen. VIM wurde bereits in anderen Arbeiten als eines der vorherrschenden Intermediärfilamente im tierischen und im menschlichen Endothel beschrieben (Bloise and Meltzer 1981; Gabbiani et al. 1981).

Da es sich bei Anti-CD31 um einen panendothelialen AK handelt, der in Endothelien diversen Ursprungs positiv reagiert, wurde für diesen AK ein höherer positiver Gewebeanteil erwartet. Dieses konnte nicht bestätigt werden, da CD31 vergleichbare Gewebefärbungen zeigte wie z.B. CLDN5. Andere Arbeiten beobachteten CLDN5 vor allem in malignen VM, was den relativ niedrigen positiven Anteil von 9% in den hier untersuchten benignen VM erklärt (Miettinen et al. 2011).

Es muss berücksichtigt werden, dass es sich bei der Gruppe der n.n.kl. VM um Gewebe handelt, deren Diagnose nicht enger definiert wurde. Da unter die

Kategorie der n.n.kl. VM verschiedene Gewebe fallen, können aus den jeweiligen Markersignalmesswerten nur eingeschränkt Schlussfolgerungen gezogen werden, die eine Aussage zu charakteristischen VM-Expressionsmustern zulassen. Die geringe Anfärbung mit einem PDPN-Antikörper kann darauf zurückgeführt werden, dass sich unter den untersuchten VM nur wenige Gewebe lymphatischen Ursprungs befanden und folglich der Anteil lymphangischen Endothels insgesamt niedrig war.

5.2.5 Venöse Malformationen

Venöse Malformationen (VeM) zeigten sich stark positiv für den Endothelmarker CD34 (Abbildung 32). Diese Beobachtung bestätigt immunhistochemische Untersuchungen venöser Malformationen im Bereich des Mittelgesichts sowie bei periokulären und konjunktivalen Läsionen (Jakobiec et al. 1972; Zhong et al. 2012). Färbungen auf PDPN zeigten nur wenige positive PDPN-Gewebeareale, was auf den niedrigen Anteil lymphatischer Gefäße innerhalb venöser Malformationen zurückgeführt werden kann. Übereinstimmend mit unseren Messungen beobachteten Jakobiec et al. eine negative Reaktion von PDPN zu VeM-Endothelien und hielten lediglich eine Anfärbung kleiner subepithelialer Lymphgefäße im umgebenden Gewebe der VeM fest (Jakobiec et al. 1972).

Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen CD31, VIM und CLDN5 ergaben vergleichbar große positive Gewebeanteile innerhalb der VeM. Eine CD31-Reaktivität der Endothelien und der Nachweis von VIM in glatten Muskelzellen der Blutgefäße wurden auch durch andere Gruppen nachgewiesen (Jakobiec et al. 1972; Gabbiani et al. 1981). Weniger Untersuchungen gibt es zur Expression von CLDN5 in VeM. Bisher konnte zwar eine positive Reaktion des *Tight-Junction*-Proteins CLDN5 in Endothelien vaskulärer Anomalien nachgewiesen werden, das untersuchte Gewebe fiel hier jedoch unter die Kategorie „venöses Hämangiom“, eine Bezeichnung, die mittlerweile überholt ist und keine klare Zuordnung zu VeM zulässt (Miettinen et al. 1994).

5.2.6 Granuloma pyogenicum

Gewebe pyogener Granulome (GP) zeigte eine ausgeprägte VIM-Färbung (Abbildung 36). Wie zuvor beschrieben handelt es sich bei GP um eine stark proliferierende Läsion, die ein starkes Gefäßwachstum aufweist und eine hohe Anzahl an Fibroblasten enthält. VIM als Marker mesenchymalen Gewebes, ist sowohl in Fibroblasten als auch in Endothelzellen innerhalb der GP exprimiert, was auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet wurde (Yuan et al. 2000; Kang et al. 2014). Dies erklärt den hohen positiven VIM-Anteil in diesem Gewebetyp. Auch der hohe Anteil an CD34-positiven Bereichen innerhalb des GP-Gewebes deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen und weist auf eine starke Gefäßproliferation hin (Vasconcelos et al. 2011).

Bei GP zeigten sich deutliche CD31 und CLDN5 positive Areale. CD31 ist als spezifischer Endothelmarker etabliert und auch CLDN5 wird eine Rolle bei der Angiogenese zugeschrieben. Somit spricht der hier gemessene, im Vergleich zu CD31 vergleichbar hohe Expressionswert von CLDN5, für seinen Nutzen als Endothelmarker (Miettinen et al. 2011). Der Nachweis von CLDN5 in GP, die sich häufig während einer Schwangerschaft entwickeln, unterstützt zudem neue Erkenntnisse über den positiven Einfluss von Östrogen auf die CLDN5-Expression (Tantinikorn et al. 2003; Burek et al. 2010).

Auch bei Hämangiomen ergaben Färbungen mit Antikörpern gegen CD31 bzw. CLDN5 vergleichbar große positive Gewebeareale (Abbildung 24). Dies unterstreicht zum einen die ähnliche Histologie von GP und Häm, deutet aber auch an, dass die Quantifizierung der Angiogenese, bzw. des Gefäßreichtums einer Läsion, nicht allein zur Stellung einer Differentialdiagnose ausreicht. Ähnliche Schlussfolgerungen machten Freitas et al. beim Vergleich der CD31-Positivität zwischen GP und Häm (Freitas et al. 2005).

PDPN, das in erster Linie als Marker lymphangischen Endothels verwendet wird, zeigte nur eine geringe Färbung in GP (Abbildung 36). Dies wurde bereits in anderen Arbeiten beobachtet und bestätigt den histologischen Aufbau dieses gutartigen Tumors aus Blutgefäßen mit nur vereinzelt auftretenden Lymphgefäßen (Arai et al. 2006).

Verglichen mit LA, Häm, AVM, VM (n.n.kl.) und PG war der Quotient CLDN5/CD34 bei den GP signifikant höher ($p < 0,01$) (Abbildung 47A-C). Dieser Quotient ist daher differentialdiagnostisch einsetzbar und kann die Erkennung eines pyogenen Granuloms erleichtern.

5.2.7 Paragangiome

In Paragangiomen (PG) zeigte sich eine starke Färbung des Endothelzellmarkers CD34 (Abbildung 40). Diese starke CD34 Expression wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben, in denen Glomustumore der Extremitäten und der Nasenhaupthöhle untersucht wurden (Hatori et al. 1997; Chu et al. 1999; Mentzel et al. 2002). Eine Erklärung dieser erhöhten CD34-Reaktion ist die starke Vaskularisierung dieser Läsionen sowie eine starke fokale Anfärbung der Tumorzellen, wie sie von Chu et al. gesehen wurde (Chu et al. 1999). Die Zellen der Glomustumore werden auch als modifizierte glatte Muskelzellen beschrieben, was durch positive Reaktionen auf CD34, VIM und SM-Actin (*Smooth-Muscle Actin*) AK unterstützt wird (Dervan et al. 1989). Eine CD34-, CD31- und VIM-Positivität konnte auch in zwei glomuvenösen Malformationen der Wange nachgewiesen werden (Yoruk et al. 2010). Diese Beobachtungen konnten bestätigt werden, wobei CD31-Färbungen wesentlich schwächer ausfielen als Färbungen des CD34-Proteins.

In Bezug auf CLDN5 finden sich bisher nur wenige Untersuchungen an Paragangiomen. Dieser Marker wies eine ebenso hohe Expression auf wie der etablierte Endothelmarker CD31. Auch in anderen Arbeiten zeigten CLDN5 und CD31 gleich hohe Spezifität in der Anfärbung von endothelialeem Gewebe. In Glomustumoren zeigte CLDN5 eine gute Sensitivität für Endothelzellen, während sich andere Zellanteile des Tumors negativ darstellten (Miettinen et al. 2011). Die vorliegenden Ergebnisse unterstreichen somit den Nutzen dieses Markers zur Erkennung endothelialen Gewebes.

Da sich Paragangiome vornehmlich aus Gefäßendothelien zusammensetzen und nur wenig oder keine Lymphgefäße aufweisen, überrascht die hier beobachtete geringe PDPN-Expression nicht.

Bei Paragangliomen waren CD34/PDPN und PDPN/CD34 die signifikant höchsten bzw. niedrigsten Quotienten ($p < 0,001$) (Abbildung 42). Da diese Quotienten ebenfalls in der Gruppe venöser Malformationen als signifikant herausgearbeitet wurden, können PG und VeM nicht durch die alleinige Betrachtung dieser zwei Quotienten unterschieden werden. Als zusätzliche Hilfestellung im weiteren diagnostischen Prozess sollte hier der Quotient CLDN5/CD34 mit einbezogen werden. Dieser Quotient ist im Gewebe der PG signifikant kleiner als in den GP ($p < 0,05$) (Abbildung 47C).

5.2.8 Kontrollgewebe

Im Kontrollgewebe zeigte der Endothelmarker CD34 eine signifikant höhere Expression als PDPN ($p < 0,05$) (Abbildung 44). Weitere signifikante Unterschiede zwischen den anderen Markern ergaben sich nicht. Eine positive CD34-Reaktion ist typischerweise auch in Gefäßendothelien gesunder Normalgewebe zu erwarten. Da die Anzahl an Lymphgefäßen, im Verhältnis zu Blutgefäßen, in gesundem Gewebe niedriger ist, erscheint die signifikant höhere CD34-Expression plausibel (Fukunaga 2005). Insgesamt war der durch CD34 angefärbte Gewebeanteil, verglichen mit den in anderen Geweben, im Kontrollgewebe am niedrigsten. Dies ist mit der deutlich niedrigeren Gefäßdichte im gesunden Gewebe im Vergleich zu vaskulären Anomalien zu erklären. Über die Methode der digitalen Quantifizierung des DAB-positiven Gewebeanteils können hier Rückschlüsse auf die Vaskularisierung der Gewebe gezogen werden.

VIM zeigte ebenfalls eine deutliche Expression in den Kontrollgeweben (Fibrome, gesunde Haut mit lokaler Fibrose und tumorfreies Weichteilgewebe) (Abbildung 44). Der hohe Anteil an mesenchymalem Gewebe in diesen Proben war für einen Großteil der VIM-Expression verantwortlich.

Die beobachtete CLDN5- und CD31-Expression in tumorfreiem Gewebe resultiert vermutlich aus der Anzahl an *Tight-Junctions* im Epithel der Haut sowie aus der Reaktion von CD31 mit Endothelzellen dermalen Gefäße.

Innerhalb der Kontrollen fanden sich keine signifikant hohen oder niedrigen Quotienten (Abbildung 46). Ein möglicher Grund hierfür ist die Heterogenität der Gewebe in dieser Gruppe. Es gestaltet sich im Allgemeinen schwierig, ein passendes Kontrollgewebe für den Vergleich der Antikörperreaktionen in gesundem Gewebe gegenüber pathologischem Gewebe zu finden. Wie bereits beschrieben, ist auch nicht pathologisches Gewebe gut durchblutet und enthält somit Endothelien unterschiedlichen Ursprungs, die durch etablierte Endothelmarker angefärbt werden. Ein Unterschied in der Expression der Kandidatenproteine in gesunden Gefäßen zu Gefäßen in vaskulären Anomalien konnte nachgewiesen werden. Insgesamt zeigte sich, dass der positive Gewebeanteil innerhalb der Kontrollen bei allen Antikörperfärbungen häufig niedriger ist als in den anderen untersuchten Geweben. Diese Beobachtung stellt sich nur bei Verwendung des Anti-PDPN AK als signifikant heraus, zeigt aber, dass sich die untersuchten Marker im Gewebe vaskulärer Anomalien stärker anfärbten als in nicht-VA Geweben. Verantwortlich für den niedrigeren positiven Anteil im Kontrollgewebe kann die kleinere Gefäßanzahl, sowie Unterschiede bei der Expression in Endothelzellen sein.

5.3 Betrachtung signifikanter AK-Signal-Quotienten zur Unterscheidung vaskulärer Anomalien

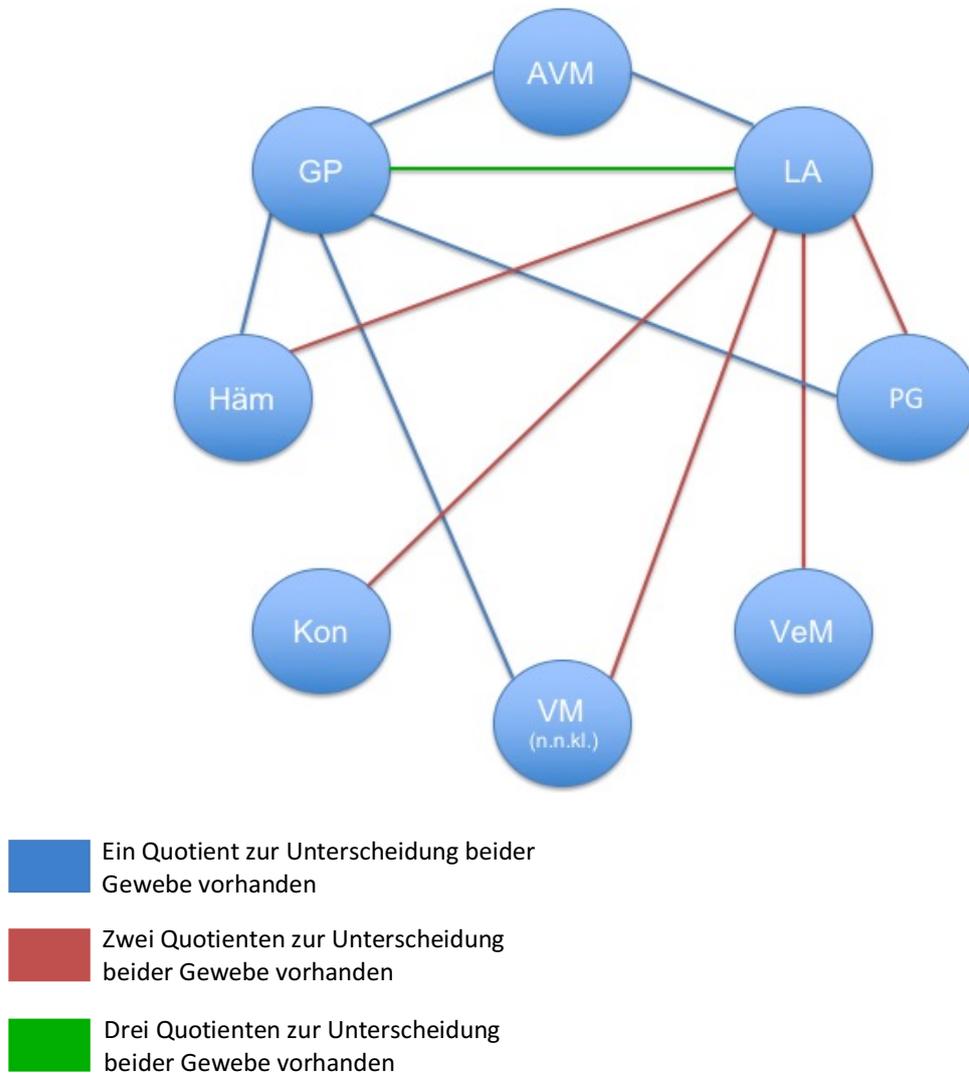


Abbildung 48. Graphische Übersicht zur Abgrenzung der untersuchten Gewebe voneinander anhand verschiedener AK-Signal-Quotienten. Dargestellt ist die Gegenüberstellung aller acht Gewebe zueinander. Verbunden sind die Gewebe, welche sich durch ein, zwei oder drei Quotienten unterscheiden lassen. Dadurch ist die Abgrenzung eines Gewebes von einem anderen durch ein signifikant unterschiedliches Verhältnis ($p < 0,05$) zweier Antikörperfärbungen möglich. Die Legende gibt an, wie viele Quotienten zur Unterscheidung der Gewebe eingesetzt werden konnten. Hierbei wurden nur statistisch signifikante Quotienten betrachtet. AVM = arteriovenöse Malformation, LA = Lymphangiom, PG = Paragangliom, VeM = venöse Malformation, VM (n.n.kl.) = vaskuläre Malformation (nicht näher klassifiziert), Kon = Kontrolle, Häm = Hämangiom, GP = Granuloma pyogenicum.

Abbildung 48 fasst AK-Signal-Quotienten zusammen, die zur Unterscheidung der untersuchten Gewebe genutzt werden können. Die Gegenüberstellung der acht Gewebetypen veranschaulicht, wie viele Quotienten aus AK-Signalwerten

sich zwischen ihnen signifikant unterscheiden. Die höchste Anzahl unterschiedlicher Quotienten findet sich zwischen pyogenen Granulomen und Lymphangiomen, da sich hier drei Quotienten signifikant unterscheiden (Abbildung 47A und C). Die Lymphangiome weisen jeweils zwei Quotienten auf, die eine signifikante Abgrenzung zu Paragangliomen, venösen Malformationen, vaskulären Malformationen (n.n.kl.), Hämangiomen und den Kontrollen möglich machen. Arteriovenöse Malformationen lassen sich durch einen signifikanten Quotienten von Lymphangiomen unterscheiden. Bei pyogenen Granulomen findet sich jeweils ein signifikanter Quotient zur Abgrenzung von arteriovenösen Malformationen, Paragangliomen, n.n.kl. vaskulären Malformationen und Hämangiomen. Wie in Abbildung 48 zu sehen ist, grenzen sich Lymphangiome von den anderen Geweben am deutlichsten ab, da hier die höchste Zahl an signifikanten Quotienten gefunden wurde. Diese und weitere Unterschiede sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4. Zusammenfassung der Unterschiede zwischen den Quotienten der Gewebe.

Zusammenfassung der Unterschiede zwischen den Quotienten der Gewebe		
LA	≠	GP, Häm, Kon, VM, VeM, PG, AVM
GP	≠	LA, Häm, VM, PG, AVM
Häm	≠	LA, GP
PG	≠	LA, GP
VM (n.n.kl.)	≠	LA, GP
AVM	≠	LA, GP
VeM	≠	LA
Kon	≠	LA

Gelistet ist, von welchen Tumorarten sich jeder Gewebetyp durch signifikante Quotienten ($p < 0,05$) unterscheidet. "≠" steht für "signifikanter Unterschied zu".

6. Zusammenfassung

Die histologische Abgrenzung verschiedener Typen vaskulärer Anomalien, wie Lymphangiome, Hämangiome, Paragangiome, venöse und arteriovenöse Malformationen, Granuloma pyogenicum, gestaltet sich aufgrund der Heterogenität dieser Fehlbildungen als sehr schwierig. In dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern eine immunhistologische Quantifizierung von Präparaten vaskulärer Anomalien mittels digitaler Bildanalyse eine genauere Zuordnung der Gefäßmalformationen in ihre Subtypen ermöglicht. Hierzu wurden Gewebe vaskulärer Anomalien von 40 Patienten immunhistologisch untersucht, wobei fünf ausgewählte gefäßendothelassoziierte Marker (CD31, CD34, CLDN5, PDPN, VIM) eingesetzt wurden. Die Färbungen wurden mikroskopisch dokumentiert und eine digitale Bildanalyse und Quantifizierung der Kandidatenmarkerproteine innerhalb der untersuchten Gewebe durchgeführt. Ziel war hierbei, die Beurteilung der digitalen Bildanalyse als Methode zur Unterscheidung von Gefäßmalformationen.

Durch die Betrachtung der Verhältnisse (Quotienten) der digital erfassten und quantifizierten immunhistochemischen Signalwerte, konnten Unterschiede im Expressionsmuster der Kandidatenproteine erkannt werden. In der Gruppe der pyogenen Granulome zeigten sich Quotienten aus CLDN5/CD34 ($p < 0,01$) und VIM/CD34 ($p < 0,05$) als einsetzbar, um eine Abgrenzung zu anderen vaskulären Anomalien zu erreichen (Abbildung 47A-C). Über die Quotienten PDPN/CLDN5 ($p < 0,001$) und PDPN/CD34 ($p < 0,01$) war hingegen eine Unterscheidung von Lymphangiomen zu allen anderen untersuchten vaskulären Anomalien möglich (Abbildung 47A-D).

Der Einsatz der weit etablierten Endothelmarker CD34 und CD31 zeigte erwartungsgemäß eine deutliche Immunreaktivität der Gefäßendothelien. Der Nutzen von PDPN zur Abgrenzung von vaskulären Anomalien lymphatischen Ursprungs von anderen Malformationen konnte aufgezeigt werden. Dies unterstreicht die Zuverlässigkeit von PDPN als lymphangischen Marker, der im Rahmen der histopathologischen Untersuchung vaskulärer Anomalien eine Differentialdiagnose erlaubt. Der Nachweis von CLDN5 im Endothel vaskulärer Anomalien unterstützt dessen zuvor postulierte Rolle bei der vaskulären Differenzierung und Aufrechterhaltung der Gefäßstruktur. Hervorzuheben sind

die Ergebnisse des möglichen diagnostischen Nutzens einer digitalen Quantifizierung der Markerproteinexpressionsmuster. Im Hinblick auf zukünftige diagnostische Methoden ist zu erwarten, dass der Einsatz digitaler Hilfsmittel in der klinisch pathologischen Diagnostik weiter zunehmen wird. Ziel sollte es daher sein, digitale Verfahren zur histologischen Auswertung von Gewebeproben zu etablieren.

Die digitale Bildanalyse erweist sich als vielversprechendes Werkzeug zur Erfassung der Expressionsunterschiede der eingesetzten Gefäßmarker im Gewebe vaskulärer Anomalien. Da sich nach digitaler Quantifizierung deutliche Unterschiede im Expressionsgrad der untersuchten Kandidatenproteine innerhalb der vaskulären Anomalien zeigten, eignet sich diese Methode, die sehr heterogene Gruppe der Gefäßfehlbildungen genauer zu klassifizieren. Zu betonen ist allerdings, dass deren Anwendung nicht die Diagnose eines erfahrenen Pathologen ersetzen, sondern vielmehr als diagnostisches Hilfsmittel dienen soll. Wichtig ist hierbei, dass die immunhistochemischen Ergebnisse im Zusammenhang mit dem klinischen Bild betrachtet werden. Noch finden sich häufig Widersprüche zwischen der histopathologischen und der klinischen Zuordnung der Anomalien zu einer der jeweiligen Untergruppen. Dies kann zu Fehldiagnosen beitragen, die sich negativ auf die Wahl der Therapie und deren rechtzeitige Anwendung auswirken. In diesem Zusammenhang kann die digitale Quantifizierung eine Hilfestellung bieten, um die Diagnostik zu objektivieren und zu optimieren. Dass dies möglich ist, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden.

Es wurde zudem deutlich, dass sich die Diagnostik der Gefäßfehlbildungen nicht auf einzelne immunhistochemische Marker beschränken kann. Ziel ist es, ein „Expressionsprofil“ für jedes Gewebe zu erstellen, das auf charakteristischen Proteinexpressionsmustern der Marker beruht. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass bereits unter Einsatz von fünf Markerproteinen eine Abgrenzung innerhalb dieser vaskulären Anomalien möglich ist. Weiterführende Studien mit einer höheren Anzahl vaskulärer Anomalien und zusätzlicher Markerproteine sollten sich anschließen, da hierdurch eine Unterscheidung aller Gefäßfehlbildungen zu erwarten ist. Dies wird das Ziel zukünftiger Untersuchungen sein.

7. Summary

The histological differentiation of different types of vascular anomalies, such as lymphangioma, hemangioma, paraganglioma, venous malformations, arteriovenous malformations, pyogenic granuloma, and (not otherwise specified) vascular malformations is very difficult due to the heterogeneity of these anomalies. The present study therefore investigated whether an immunohistological quantification of vascular anomaly tissues by means of digital image analysis, allows a more accurate assignment into their different subtypes. Vascular anomaly tissues of 40 patients were examined immunohistologically by staining the samples with a selection of five vascular endothelial-associated markers (CD31, CD34, CLDN5, PDPN, VIM). The staining was documented microscopically followed by digital image analyses and quantification of the candidate-marker-proteins within the tissues. The aim of the study was to evaluate digital image analysis as a potential method to distinguish vascular anomalies.

Differences in the expression pattern of the candidate proteins could be detected by the ratios (quotients) of the digitally recorded and quantified immunohistochemical signal values. In the group of pyogenic granulomas, quotients of CLDN5/CD34 ($p < 0.01$) and VIM/CD34 ($p < 0.05$) were found to differentiate this tissue entity from other vascular anomalies (Figure 47 A-C). In contrast, PDPN/CLDN5 ($p < 0.001$) and PDPN/CD34 ($p < 0.01$) were useful for differentiation of lymphangiomas from all other tissues of vascular anomalies (Figure 47 A-D).

As expected, the use of the well-established endothelial markers CD34 and CD31 exhibited major immune reactivity of vascular endothelia. The usefulness of PDPN to distinguish vascular anomalies of lymphatic origin from other malformations could be demonstrated. This underlines the reliability of PDPN as a lymphatic marker, that allows differentiation of vascular anomalies. The detection of CLDN5 in the endothelium of vascular anomalies supports its previously postulated role in differentiation and maintenance of vascular structures. With regards to future diagnostic methods, it can be expected that

the use of digital image analysis will continue to increase. The aim should therefore be to establish digital methods for histological evaluation of tissue samples.

Digital image analysis proves to be a promising tool for measuring differences in the expression of markers such as those used in vascular anomaly tissues. Results of this study support the usefulness of digital analysis for classification of the heterogeneous group of vascular anomalies. However, it should be emphasized, that its potential application cannot replace an experienced pathologist, but rather assist in the diagnosis. In addition it is important to note, that the immunohistochemical results regularly have to be considered in the context of the overall clinical picture. There are still many inconsistencies among the histopathological and clinical classifications of anomalies in each subgroup. This can lead to misdiagnosis that negatively affects the choice of therapy. In this context, digital quantification can help optimizing diagnosis and make it more objective.

Furthermore, it became obvious that diagnosis of vascular anomalies should not be restricted to one or a few immunohistochemical markers. Rather it is necessary to create an "expression profile" for each tissue, based on characteristic protein expression-patterns of the markers. In this study we were able to show that stratification of vascular anomaly tissues can already be achieved by deploying five marker proteins. Further studies which include a higher number of vascular anomaly tissues and additional marker proteins should follow, to complete the stratification of all vascular anomalies. This will be the goal of future investigations.

8. Literaturverzeichnis

Abraham JA, Hornicek FJ, Kaufman AM, Harmon DC, Springfield DS, Raskin KA, Mankin HJ, Kirsch DG, Rosenberg AE, Nielsen GP, Deshpande V, Suit HD, DeLaney TF, Yoon SS. Treatment and Outcome of 82 Patients with Angiosarcoma. *Ann. Surg. Oncol.* Springer-Verlag; 2007;14(6):1953–67

Al-Adnani M, Williams S, Rampling D, Ashworth M, Malone M, Sebire NJ. Histopathological reporting of paediatric cutaneous vascular anomalies in relation to proposed multidisciplinary classification system. *J. Clin. Pathol.* BMJ Publishing Group Ltd and Association of Clinical Pathologists; 2006;59(12):1278–82

Alam M, Posten W, Martini MC, Wrone DA, Rademaker AW. Aesthetic and functional efficacy of subcuticular running epidermal closures of the trunk and extremity: a rater-blinded randomized control trial. *Arch. Dermatol.* 2006;142(10):1272–8

Alster TS, Wilson F. Treatment of port-wine stains with the flashlamp-pumped pulsed dye laser: extended clinical experience in children and adults. *Ann. Plast. Surg.* 1994;32(5):478–84

Arai E, Kuramochi A, Tsuchida T, Tsuneyoshi M, Kage M, Fukunaga M, Ito T, Tada T, Izumi M, Shimizu K, Hirose T, Shimizu M. Usefulness of D2-40 immunohistochemistry for differentiation between kaposiform hemangioendothelioma and tufted angioma. *J. Cutan. Pathol.* 2006;33(7):492–7

Argani P, Athanasian E. Malignant endovascular papillary angioendothelioma (Dabska tumor) arising within a deep intramuscular hemangioma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1997;121(9):992–5

Axmann C, Dorenbeck U, Reith W. Glomustumoren der Kopf-Hals-Region. *Radiologe.* Springer-Verlag; 2004;44(4):389–400

Batta K, Goodyear HM, Moss C, Williams HC, Hiller L, Waters R. Randomised controlled study of early pulsed dye laser treatment of uncomplicated childhood haemangiomas: results of a 1-year analysis. *Lancet.* 2002;360(9332):521–7

Belov S. Classification of congenital vascular defects. *Int. Angiol.* 1990;9(3):141–6

Bertrand J, McCuaig C, Dubois J, Hatami A, Ondrejchak S, Powell J. Propranolol versus prednisone in the treatment of infantile hemangiomas: a retrospective comparative study. *Pediatr. Dermatol.* 2011;28(6):649–54

Bhagalia S, Jain M, Pardhe N, Sireesha SK. Collagenous fibroma (desmoplastic fibroblastoma) of the oral cavity. *J. Oral Maxillofac. Pathol. Medknow Publications;* 2012;16(2):277–9

Blose SH, Meltzer DI. Visualization of the 10-nm filament vimentin rings in vascular endothelial cells in situ. *Exp. Cell Res.* 1981;135(2):299–309

Boettcher MC, Eivazi B, Roessler M, Bette M, Cai C, Wiegand S, Güldner C, Werner JA, Mandic R. Involvement of LYVE-1-positive endothelial cells in the formation of non-lymphatic vascular malformations. *Histopathology. Blackwell Publishing Ltd;* 2010;57(5):764–8

Bohle RM, Klöpffer B, Franke FE. CD 143 expression in benign and malignant vascular tumors. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* 1998;82:202–6

Bollinger BK, Laskin WB, Knight CB. Epithelioid hemangioendothelioma with multiple site involvement. Literature review and observations. *Cancer. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company;* 1994;73(3):610–5

Boon LM, Mulliken JB, Vikkula M, Watkins H, Seidman J, Olsen BR, Warman ML. Assignment of a locus for dominantly inherited venous malformations to chromosome 9p. *Hum. Mol. Genet.* 1994;3(9):1583–7

Boscolo E, Coma S, Luks VL, Greene AK, Klagsbrun M, Warman ML, Bischoff J. AKT hyper-phosphorylation associated with PI3K mutations in lymphatic endothelial cells from a patient with lymphatic malformation. *Angiogenesis. Springer Netherlands;* 2015;18(2):151–62

Bowers RE, Graham EA, Tomlinson KM. The Natural History of the Strawberry Nevus. *Arch. Dermatol. American Medical Association;* 1960;82(5):667

Braun S, Riemann K, Pusch CM, Sotlar K, Pfister M, Kupka S. Paraganglioma in the area of the head and neck. A review of molecular genetic research. *HNO.* 2004;52(1):11–7

Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, Schaffner G, Kerjaschki D. Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am. J. Pathol.* 1997;151(4):1141–52

Buckmiller LM, Richter GT, Suen JY. Diagnosis and management of hemangiomas and vascular malformations of the head and neck. *Oral Dis.* 2010;16(5):405–18

Burek M, Arias-Loza PA, Roewer N, Förster CY. Claudin-5 as a Novel Estrogen Target in Vascular Endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010;30(2)

Burrows PE, Laor T, Paltiel H, Robertson RL. Diagnostic imaging in the evaluation of vascular birthmarks. *Dermatol. Clin.* 1998;16(3):455–88

Cai C, Böttcher MC, Werner JA, Mandic R. Differential expression of VEGF121, VEGF165 and VEGF189 in angiomas and squamous cell carcinoma cell lines of the head and neck. *Anticancer Res.* 2010;30(3):805–10

Calonje E, Fletcher CD, Wilson-Jones E, Rosai J. Retiform hemangioendothelioma. A distinctive form of low-grade angiosarcoma delineated in a series of 15 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 1994;18(2):115–25

Chang MW. Updated classification of hemangiomas and other vascular anomalies. *Lymphat. Res. Biol.* 2003;1(4):259–65

Chervenak FA, Isaacson G, Blakemore KJ, Breg WR, Hobbins JC, Berkowitz RL, Tortora M, Mayden K, Mahoney MJ. Fetal cystic hygroma. Cause and natural history. *N. Engl. J. Med.* 1983;309(14):822–5

Chiller KG., Frieden IJ., Arbiser JL. Pathogenesis of Vascular Anomalies: Classification into Three Categories Based upon Clinical and Biochemical Characteristics. *Lymphat. Res. Biol.* 2003;1(4):267–81

Choi DJ, Alomari AI, Chaudry G, Orbach DB. Neurointerventional management of low-flow vascular malformations of the head and neck. *Neuroimaging Clin. N. Am.* 2009;19(2):199–218

Chu PG, Chang KL, Wu AY, Weiss LM. Nasal glomus tumors: Report of two cases with emphasis on immunohistochemical features and differential diagnosis. *Hum. Pathol.* W.B. Saunders; 1999;30(10):1259–61

Cohen SR, Thompson JW. Lymphangiomas of the larynx in infants and children. A survey of pediatric lymphangioma. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. Suppl.* 1986;127:1–20

Coindre JM. Immunohistochemistry in the diagnosis of soft tissue tumours. *Histopathology.* 2003;43(1):1–16

Croteau SE, Liang MG, Kozakewich HP, Alomari AI, Fishman SJ, Mulliken JB, Trenor CC. Kaposiform Hemangioendothelioma: Atypical Features and Risks of Kasabach-Merritt Phenomenon in 107 Referrals. *J. Pediatr.* 2013;162(1):142–7

Dabska M. Malignant endovascular papillary angioendothelioma of the skin in childhood. Clinicopathologic study of 6 cases. *Cancer.* Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 1969;24(3):503–10

Dadras SS, North PE, Bertocini J, Mihm MC, Detmar M. Infantile hemangiomas are arrested in an early developmental vascular differentiation state. *Mod. Pathol.* Nature Publishing Group; 2004;17(9):1068–79

Delisser HM, Christofidou-solomidou M, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM. Involvement of Endothelial PECAM-1/CD31 in Angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 1997;151(3):671–7

Dervan PA, Tobbia IN, Casey M, O'Loughlin J, O'Brien M. Glomus tumours: an immunohistochemical profile of 11 cases. *Histopathology.* Blackwell Publishing Ltd; 1989;14(5):483–91

DeYoung BR, Frierson HF, Ly MN, Smith D, Swanson PE. CD31 immunoreactivity in carcinomas and mesotheliomas. *Am. J. Clin. Pathol.* 1998;110(3):374–7

DeYoung BR, Swanson PE, Argenyi ZB, Ritter JH, Fitzgibbon JF, Stahl DJ, Hoover W, Wick MR. CD31 immunoreactivity in mesenchymal neoplasms of the skin and subcutis: report of 145 cases and review of putative immunohistologic markers of endothelial differentiation. *J. Cutan. Pathol.* 1995;22(3):215–22

Drolet BA, Trenor CC, Brandão LR, Chiu YE, Chun RH, Dasgupta R, Garzon MC, Hammill AM, Johnson CM, Tlougan B, Blei F, David M, Elluru R, Frieden IJ, Friedlander SF, Iacobas I, Jensen JN, King DM, Lee MT, Nelson S, Patel M, Pope E, Powell J, Seefeldt M, Siegel DH, Kelly M, Adams DM. Consensus-Derived Practice Standards Plan for Complicated Kaposiform Hemangioendothelioma. *J. Pediatr.* 2013;285–91

Duyka LJ, Fan CY, Coviello-Malle JM, Buckmiller L, Suen JY. Progesterone receptors identified in vascular malformations of the head and neck. *Otolaryngol. Head. Neck Surg.* 2009;141(4):491–5

Eckes B, Colucci-Guyon E, Smola H, Nodder S, Babinet C, Krieg T, Martin P. Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J. Cell Sci.* 2000;113(13):2455–62

Eichenfeld LF. Evolving knowledge of hemangiomas and vascular malformations. *Arch. Dermatol.* 1998;134:740–2

Eivazi B, Ardelean M, Bäuml W, Berlien HP, Cremer H, Elluru R, Koltai P, Olofsson J, Richter G, Schick B, Werner JA. Update on hemangiomas and vascular malformations of the head and neck. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology.* 2009. p. 187–97

Ellison DA, Parham DM. Tumors of the autonomic nervous system. *Am. J. Clin. Pathol.* 2001;115 Suppl:S46-55

Enjolras O, Riche MC, Merland JJ. Facial port-wine stains and Sturge-Weber syndrome. *Pediatrics.* 1985;76(1):48–51

Ensoli B, Gendelman R, Markham P, Fiorelli V, Colombini S, Raffeld M, Cafaro A, Chang H-K, Brady JN, Gallo RC. Synergy between basic fibroblast growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma. *Nature.* Nature Publishing Group; 1994;371(6499):674–80

Ernemann U, Hoffmann J, Grönewäller E, Breuninger H, Rebmann H, Adam C, Reinert S. Hemangiomas and vascular malformations in the area of the head and neck. *Radiologe.* 2003;43(11):958–66

Ernemann U, Kramer U, Miller S, Bisdas S, Rebmann H, Breuninger H, Zwick C, Hoffmann J. Current concepts in the classification, diagnosis and treatment of vascular anomalies. *Eur. J. Radiol.* 2010;75(1):2–11

Evangelou E, Kyzas PA, Trikalinos TA. Comparison of the diagnostic accuracy of lymphatic endothelium markers: Bayesian approach. *Mod. Pathol.* 2005;18:1490-7

Van den Eynden GG, Van der Auwera I, Van Laere SJ, Colpaert CG, van Dam P, Dirix LY, Vermeulen PB, Van Marck EA. Distinguishing blood and lymph vessel invasion in breast cancer: a prospective immunohistochemical study. *Br. J. Cancer.* 2006;94(11):1643–9

Fanburg-Smith JC, Furlong MA, Childers ELB. Oral and salivary gland angiosarcoma: a clinicopathologic study of 29 cases. *Mod. Pathol.* 2003;16(3):263–71

Fiedler U, Christian S, Koidl S, Kerjaschki D, Emmett MS, Bates DO, Christofori G, Augustin HG, Saharinen P, Tammela T, Karkkainen M, Alitalo K, Banerji S, Ni J, Wang S, Clasper S, Su J, Tammi R, Jones M, Ristamaki R, et al. The sialomucin CD34 is a marker of lymphatic endothelial cells in human tumors. *Am. J. Pathol. Elsevier*; 2006;168(3):1045–53

Finn MC, Glowacki J, Mulliken JB. Congenital vascular lesions: clinical application of a new classification. *J. Pediatr. Surg.* 1983;18(6):894–900

Fishman SJ, Mulliken JB. Hemangiomas and Vascular Malformations of Infancy and Childhood. *Pediatr. Clin. North Am. Elsevier*; 1993;40(6):1177–200

Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F (eds). Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. 2002; WHO Classification of Tumours, 3rd Edition, Volume 5

Folpe AL, Chand EM, Goldblum JR, Weiss SW. Expression of Fli-1, a nuclear transcription factor, distinguishes vascular neoplasms from potential mimics. *Am. J. Surg. Pathol.* 2001;25(8):1061–6

Franke WW, Schmid E, Osborn M, Weber K. Intermediate-sized filaments of human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 1979;81(3):570–80

Freitas TMC, Miguel MCC, Silveira ÉJD, Freitas RA, Galvão HC. Assessment of angiogenic markers in oral hemangiomas and pyogenic granulomas. *Exp. Mol. Pathol.* 2005;79(1):79–85

Friedman-Kien AE. Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men. *J. Am. Acad. Dermatol. Mosby*; 1981;5(4):468–71

Fujimoto T. Immunocytochemical studies of endothelial cells in vivo. I. The presence of desmin only, or of desmin plus vimentin, or vimentin only, in the endothelial cells of different capillaries of the adult chicken. *J. Cell Biol.* 1986;103(6):2775–86

Fukunaga M. Expression of D2-40 in lymphatic endothelium of normal tissues and in vascular tumours. *Histopathology.* 2005;46(4):396–402

Fury MG, Antonescu CR, Van Zee KJ, Brennan ME, Maki RG. A 14-Year Retrospective Review of Angiosarcoma: Clinical Characteristics, Prognostic Factors, and Treatment Outcomes with Surgery and Chemotherapy. *Cancer J.* 2005;11(3):241–7

Gabbiani G, Schmid E, Winter S, Chaponnier C, de Ckhashtonay C, Vandekerckhove J, Weber K, Franke WW. Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1981;78(1):298–302

Garzon MC, Enjolras O, Frieden IJ. Vascular tumors and vascular malformations: evidence for an association. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2000;42(2 Pt 1):275–9

Garzon MC, Huang JT, Enjolras O, Frieden IJ. Vascular malformations. Part I. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2007;56(3):353–70

Gilbo P, Morris CG, Amdur RJ, Werning JW, Dziegielewski PT, Kirwan J, Mendenhall WM. Radiotherapy for benign head and neck paragangliomas: A 45-year experience. *Cancer.* 2014;120(23):3738-43

Giorno R. A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagn. Immunol.* 1984;2(3):161–6

Greene AK, Goss JA. Vascular Anomalies: From a Clinicohistologic to a Genetic Framework. *Plast. Reconstr. Surg.* 2018;141(5):709e–17e

Gruman A, Liang MG, Mulliken JB, Fishman SJ, Burrows PE, Kozakewich HPW, Blei F, Frieden IJ. Kaposiform hemangioendothelioma without Kasabach-Merritt phenomenon. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2005;52(4):616–22

Gupta A, Kozakewich H. Histopathology of vascular anomalies. *Clin. Plastic Surg.* 2011;38(1):31–44

Guttman D, Stern Y, Shpitzer T, Ulanovski D, Druzd T, Feinmesser R. Expression of MMP-9, TIMP-1, CD-34 and factor-8 as prognostic markers for squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Oncol.* 2004;40(8):798–803

Hamoir M, Plouin-Gaudon I, Rombaux P, Francois G, Cornu AS, Desuter G, Clapuyt P, Debauche C, Verellen G, Beguin C. Lymphatic malformations of the head and neck: a retrospective review and a support for staging. *Head Neck.* 2001;23(4):326–37

Hatori M, Aiba S, Kato M, Kamiya N, Kokubun S. Expression of CD34 in Glomus Tumors. *Tohoku J. Exp. Med. Tohoku University Medical Press;* 1997;182(3):241–7

Hein KD, Mulliken JB, Kozakewich HPW, Upton J, Burrows PE. Venous malformations of skeletal muscle. *Plast. Reconstr. Surg.* 2002;110(7):1625–35

Hofhuis WJD, Oranje AP, Bouquet J, Sinaasappel M. Blue rubber-bleb naevus syndrome: Report of a case with consumption coagulopathy complicated by manifest thrombosis. *Eur. J. Pediatr.* 1990;149(8):526–8

Jahnel J, Lackner H, Reiterer F, Urlsberger B, Urban C. Kaposiform Hemangioendothelioma with Kasabach-Merritt Phenomenon: From Vincristine to Sirolimus. *Klin. Pädiatrie.* © Georg Thieme Verlag KG; 2012;224(06):395–7

Jakab C, Halász J, Kiss A, Schaff Z, Rusvai M, Gálfi P, Abonyi TZ, Kulka J. Claudin-5 protein is a new differential marker for histopathological differential diagnosis of canine hemangiosarcoma. *Histol. Histopathol.* 2009;24(7):801–13

Jakobiec FA, Werdich XQ, Chodosh J, Freitag SK, Allen PW, Enzinger FM, Augsburger JJ, Goldberg RE, Shields JA, Al. E, Awdry P, Belliveau MJ, Brownstein S, Jackson WB, et al, Biberstein HH, Jessner M, Bullock JD, Goldbert SH, Thakker MM, et al. An analysis of conjunctival and periorcular venous malformations: clinicopathologic and immunohistochemical features with a comparison of racemose and cirroid lesions. *Surv. Ophthalmol.* Elsevier; 1972;59(2):236–44

Jeong H-S, Baek C-H, Son Y-I, Kim TW, Lee BB, Byun HS. Treatment for extracranial arteriovenous malformations of the head and neck. *Acta Otolaryngol.* 2006;126(3):295–300

Kaban LB, Mulliken JB. Vascular anomalies of the maxillofacial region. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1986;44(3):203–13

Kalisa P, Van Zielegem B, Roux P, Meire F. Orbital lymphangioma: clinical features and management. *Bull. Soc. Belge Ophtalmol.* 2001;(282):59–68

Kalof AN, Cooper K. D2-40 Immunohistochemistry--So Far! 2009;16(1):62–4

Kang Y-H, Byun J-H, Choi M-J, Lee J-S, Jang J-H, Kim Y-I, Park B-W, Kalpidis C, Setayesh R, Dojcinovic I, Richter M, Lombardi T, Olmedo D, Paparella M, Brandizzi D, Cabrini R, Peñarrocha-Diago M, Cervera-Ballester J, Maestre-Ferrín L, Hafemeister A, et al. Co-development of pyogenic granuloma and capillary hemangioma on the alveolar ridge associated with a dental implant: a case report. *J. Med. Case Rep. BioMed Central;* 2014;8(1):192

Katz JA, Mahoney DH, Shukla LW, Smith CW, Gresik M V, Hawkins HK. Endovascular papillary angioendothelioma in the spleen. *Pediatr. Pathol.* 1988;8(2):185–93

Kohout MP, Hansen M, Pribaz JJ, Mulliken JB. Arteriovenous malformations of the head and neck: natural history and management. *Plast. Reconstr. Surg.* 1998;102(3):643–54

Konez O, Burrows PE. An appropriate diagnostic workup for suspected vascular birthmarks. *Cleve. Clin. J. Med.* 2004;71(6):505–10

Koto T, Takubo K, Ishida S, Shinoda H, Inoue M, Tsubota K, Okada Y, Ikeda E. Hypoxia disrupts the barrier function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin-5 in endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 2007;170(4):1389–97

Kukreja I, Kapoor P, Deshmukh R, Kulkarni V. VEGF and CD 34: A correlation between tumor angiogenesis and microvessel density-an immunohistochemical study. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 2013;17(3):367–73

Lamovec J, Bracko M. Epithelioid hemangioma of small tubular bones: a report of three cases, two of them associated with pregnancy. *Mod. Pathol.* 1996;9(8):821–7

Léauté-Labrèze C, Dumas de la Roque E, Hubiche T, Boralevi F, Thambo J-B, Taïeb A. Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N. Engl. J. Med.* 2008;358(24):2649–51

Lee JH, Barich F, Karnell LH, Robinson RA, Zhen WK, Gantz BJ, Hoffman HT. National Cancer Data Base report on malignant paragangliomas of the head and neck. *Cancer.* 2002;94(3):730–7

Lee B-B, Do YS, Yakes W, Kim DI, Mattassi R, Hyon WS. Management of arteriovenous malformations: a multidisciplinary approach. *J. Vasc. Surg.* 2004;39(3):590–600

Legiehn GM, Heran MKS. Venous malformations: classification, development, diagnosis, and interventional radiologic management. *Radiol. Clin. North Am.* 2008;46(3):545–97, vi

Limaye N, Kangas J, Mendola A, Godfraind C, Schlögel MJ, Helaers R, Eklund L, Boon LM, Vikkula M. Somatic Activating PIK3CA Mutations Cause Venous Malformation. *Am. J. Hum. Genet. Elsevier;* 2015;97(6):914–21

Liu T, Guevara OE, Warburton RR, Hill NS, Gaestel M, Kayyali US. Regulation of vimentin intermediate filaments in endothelial cells by hypoxia. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* American Physiological Society; 2010;299(2):C363-73

Liu Q, Jiang L, Wu D, Kan Y, Fu F, Zhang D, Gong Y, Wang Y, Dong C, Kong L. Clinicopathological features of Kaposiform hemangioendothelioma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015;8(10):13711–8

Di Lorenzo G. Update on classic Kaposi sarcoma therapy: New look at an old disease. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2008;68(3):242–9

Lu L, Bischoff J, Mulliken JB, Bielenberg DR, Fishman SJ, Greene AK. Increased endothelial progenitor cells and vasculogenic factors in higher-staged arteriovenous malformations. *Plast. Reconstr. Surg.* 2011;128(4):260e–9e

Luks VL, Kamitaki N, Vivero MP, Uller W, Rab R, Bovee JVMG, Rialon KL, Guevara CJ, Alomari AI, Greene AK, Fishman SJ, Kozakewich HPW, Maclellan RA, Mulliken JB, Rahbar R, Spencer SA, Trenor CC, Upton J, Zurakowski D, Perkins JA, Kirsh A, Bennett JT, Dobyns WB, Kurek KC, Warman ML, McCarroll SA, Murillo R. Lymphatic and other vascular malformative/overgrowth disorders are caused by somatic mutations in PIK3CA. *J. Pediatr. Mosby;* 2015;166(4):1048–54.e1-5

Lyons LL, North PE, Mac-Moune Lai F, Stoler MH, Folpe AL, Weiss SW. Kaposiform hemangioendothelioma: a study of 33 cases emphasizing its pathologic, immunophenotypic, and biologic uniqueness from juvenile hemangioma. *Am. J. Surg. Pathol.* 2004;28(5):559–68

MacFie CC, Jeffery SLA. Diagnosis of vascular skin lesions in children: an audit and review. *Pediatr. Dermatol.* 2007;25(1):7–12

Magnusson BC, Rasmusson LG. The giant cell fibroma A review of 103 cases with immunohistochemical findings. *Acta Odontol. Scand.* Taylor & Francis; 1995;53(5):293–6

Marchuk DA. Pathogenesis of hemangioma. *J. Clin. Invest.* 2001;107(6):665–6

Marler JJ, Mulliken JB. Current management of hemangiomas and vascular malformations. *Clin. Plast. Surg.* 2005;32(1):99–116, ix

Marszalek A, Daa T, Kashima K, Nakayama I, Yokoyama S. Ultrastructural and morphometric studies related to expression of the cell adhesion molecule PECAM-1/CD31 in developing rat lung. *J. Histochem. Cytochem.* SAGE Publications; 2000;48(9):1283–9

Matsumura T, Wolff K, Petzelbauer P. Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin. *J. Immunol. American Association of Immunologists*; 1997;158(7):3408–16

McKenney JK, Weiss SW, Folpe AL. CD31 Expression in Intratumoral Macrophages: A Potential Diagnostic Pitfall. *Am. J. Surg. Pathol.* 2001;25(9):1167–73

Mei H, Campbell JM, Paddock CM, Lertkiatmongkol P, Mosesson MW, Albrecht R, Newman PJ. Regulation of endothelial cell barrier function by antibody-driven affinity modulation of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1). *J. Biol. Chem.* 2014;289(30):20836–44

Mendez MG, Kojima S-I, Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J.* 2010;24(6):1838–51

Mentzel T, Beham A, Calonje E, Katenkamp D, Fletcher CD. Epithelioid Hemangioendothelioma of Skin and Soft Tissues: Clinicopathologic and Immunohistochemical Study of 30 Cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 1997;21(4):363–74

Mentzel T, Hügel H, Kutzner H. CD34-positive glomus tumor: clinicopathologic and immunohistochemical analysis of six cases with myxoid stromal changes. *J. Cutan. Pathol.* 2002;29(7):421–5

Mentzel T, Kutzner H. Tumors of the lymphatic vessel of the skin and soft tissue. *Pathologe.* 2002;23(2):118–27

Merrow AC, Gupta A, Patel MN, Adams DM. 2014 Revised Classification of Vascular Lesions from the International Society for the Study of Vascular Anomalies: Radiologic-Pathologic Update. *Radiographics.* 2016;36(5):1494–516

Miettinen M, Lindenmayer AE, Chaubal A. Endothelial cell markers CD31, CD34, and BNH9 antibody to H- and Y-antigens--evaluation of their specificity and sensitivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Willebrand factor. *Mod. Pathol.* 1994;7(1):82–90

Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Wang ZF. Claudin-5 as an immunohistochemical marker for angiosarcoma and hemangioendotheliomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 2011;35(12):1848–56

Mocroft A, Kirk O, Clumeck N, Gargalianos-Kakolyris P, Trocha H, Chentsova N, Antunes F, Stellbrink H-J, Phillips AN, Lundgren JD. The changing pattern of Kaposi sarcoma in patients with HIV, 1994-2003. *Cancer*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2004;100(12):2644–54

Morita K, Sasaki H, Furuse K, Furuse M, Tsukita S, Miyachi Y. Expression of claudin-5 in dermal vascular endothelia. *Exp. Dermatol.* 2003;12(3):289–95

Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J. Cell Biol.* 1999;147(1):185–94

Muller WA, Randolph GJ. Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 1999;66(5):698–704

Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.* 1993;178(2):449–60

Mulliken JB. Cutaneous vascular anomalies. *Semin. Vasc. Surg.* 1993;6(4):204–18

Mulliken JB, Glowacki J. Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: a classification based on endothelial characteristics. *Plast. Reconstr. Surg.* 1982;69(3):412–22

Nakayama T, Nishino M, Takasu K, Hayakawa K, Toguchida J, Tanaka C. Endovascular papillary angioendothelioma (Dabska tumor) of bone. *Orthopedics.* 2004;27(3):327–8

Neves RI, Stevenson J, Hancey MJ, Vangelisti G, Miraliakbari R, Mackay D, Clarke L. Endovascular papillary angioendothelioma (Dabska tumor): underrecognized malignant tumor in childhood. *J. Pediatr. Surg.* 2011;46(1):e25-8

Nichols GE, Gaffey MJ, Mills SE, Weiss LM. Lobular capillary hemangioma. An immunohistochemical study including steroid hormone receptor status. *Am. J. Clin. Pathol.* 1992;97(6):770–5

Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* 2003;161(3):653–60

North PE, Mihm MC. Histopathological diagnosis of infantile hemangiomas and vascular malformations. *Facial Plast. Surg. Clin. North Am.* 2001;9(4):505–24

Ogita S, Tsuto T, Deguchi E, Tokiwa K, Nagashima M, Iwai N. OK-432 therapy for unresectable lymphangiomas in children. *J. Pediatr. Surg.* 1991;26(3):263–70

Ohkubo T, Ozawa M. The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *J. Cell Sci.* 2004;117(Pt 9):1675–85

Pagliai KA, Cohen BA. Pyogenic Granuloma in Children. *Pediatr. Dermatol.* 2004;21(1):10–3

Pawlik TM, Paulino AF, Mcginn CJ, Baker LH, Cohen DS, Morris JS, Rees R, Sondak VK. Cutaneous angiosarcoma of the scalp. *Cancer.* Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2003;98(8):1716–26

Penel N, Marréaud S, Robin Y-M, Hohenberger P. Angiosarcoma: State of the art and perspectives. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2011;80(2):257–63

Plattner H, Hentschel J. *Zellbiologie.* Georg Thieme Verlag; 2011.

Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 2006;54(4):385–95

Quecedo E, Martínez-Escribano JA, Febrer I, Oliver V, Velasco M, Aliaga A. Dabska tumor developing within a preexisting vascular malformation. *Am. J. Dermatopathol.* 1996;18(3):302–7

Ramírez-Amador V, Anaya-Saavedra G, Martínez-Mata G. Kaposi's sarcoma of the head and neck: A review. *Oral Oncol.* 2010;46(3):135–45

Ramírez-Amador V, Martínez-Mata G, González-Ramírez I, Anaya-Saavedra G, De Almeida OP. Clinical, histological and immunohistochemical findings in oral Kaposi's sarcoma in a series of Mexican AIDS patients. Comparative study. *J. Oral Pathol. Med.* Blackwell Publishing Ltd; 2009;38(4):328–33

Ren Q, Ren L, Ren C, Liu X, Dong C, Zhang X. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) plays a critical role in the maintenance of human vascular endothelial barrier function. *Cell Biochem. Funct.* 2015;33(8):560–5

Requena L, Kutzner H. Hemangioendothelioma. *Semin. Diagn. Pathol.* 2013;30(1):29–44

Rössler J, Salfeld P, Niemeyer CM. Diagnostik und Therapie von Gefäßfehlbildungen. *Monatsschrift Kinderheilkd.* 2005;153(4):364–72

Samaniego F, Markham PD, Gendelman R, Watanabe Y, Kao V, Kowalski K, Sonnabend JA, Pintus A, Gallo RC, Ensoli B. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor present in Kaposi's sarcoma (KS) are induced by inflammatory cytokines and synergize to promote vascular permeability and KS lesion development. *Am. J. Pathol. American Society for Investigative Pathology*; 1998;152(6):1433–43

Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011;68(18):3033–46

Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong Y-K, Detmar M, Jain R, Huarte J, Montesano R, Jackson D, Orci L, Alitalo K, Christofori G, Pepper M. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am. J. Pathol. Williams & Wilkins, Baltimore*; 2005;166(3):913–21

Schacht V, Ramirez MI, Hong Y-K, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, Williams M, Dvorak AM, Dvorak HF, Oliver G, Detmar M. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J.* 2003;22(14):3546–56

Schiffers PMH, Henrion D, Boulanger CM, Colucci-Guyon E, Langa-Vuves F, van Essen H, Fazzi GE, Levy BI, De Mey JGR. Altered Flow-Induced Arterial Remodeling in Vimentin-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;20(3):611–6

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Meth. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.*; 2012;9(7):676–82

Schommer M, Herbst RA, Brodersen JP, Kiehl P, Katenkamp D, Kapp A, Weiss J. Retiform hemangioendothelioma: Another tumor associated with human herpesvirus type 8? *J. Am. Acad. Dermatol.* 2000;42(2):290–2

Schwartz RA, Dabski C, Dąbska M. The Dąbska Tumor: A Thirty-Year Retrospect. *Dermatology. Karger Publishers*; 2000;201(1):1–5

Schwartz, Micali G, Nasca MR, Scuderi L. Kaposi sarcoma: A continuing conundrum. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2008;59(2):179–206

de Serres LM, Sie KC, Richardson MA. Lymphatic malformations of the head and neck. A proposal for staging. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg.* 1995;121(5):577–82

Shin HY, Ryu KH, Ahn HS. Stepwise multimodal approach in the treatment of Kasabach-Merritt syndrome. *Pediatr. Int.* Blackwell Science Pty; 2000;42(6):620–4

Shu J, Qiu G, Mohammad I. A Semi-automatic Image Analysis Tool for Biomarker Detection in Immunohistochemistry Analysis. 2013 Seventh Int. Conf. Image Graph. IEEE; 2013. p. 937–42

Smolinski KN. Hemangiomas of Infancy: Clinical and Biological Characteristics. *Clin. Pediatr. (Phila).* 2005;44(9):747–66

Soblet J, Limalye N, Uebelhoer M, Boon LM, Vikkula M. Variable Somatic TIE2 Mutations in Half of Sporadic Venous Malformations. *Mol. Syndromol.* 2013;4(4):179–83

Stosiek VP, Kasper M, Conrad K. Immunhistochemische Untersuchungen zur Cytokeratin-Expression in menschlichen Gefäßendothelien unter besonderer Berücksichtigung des Gelenkbindegewebes. *Acta Histochem. Urban & Fischer;* 1990;89(1):61–6

Sud AR, Tan ST. Pyogenic granuloma-treatment by shave-excision and/or pulsed-dye laser. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 2010;63(8):1364–8

Sun Z-J, Zhang L, Zhang W-F, Alsharif MJ, Chen X-M, Zhao Y-F. Epithelioid hemangioma in the oral mucosa: a clinicopathological study of seven cases and review of the literature. *Oral Oncol.* 2006;42(5):441–7

Suster S, Wong TY. On the discriminatory value of anti-HPCA-1 (CD-34) in the differential diagnosis of benign and malignant cutaneous vascular proliferations. *Am. J. Dermatopathol.* 1994;16(4):355–63

Szeimies R-M. Tumoren der Haut: Grundlagen, Diagnostik und Therapie in der dermatologischen Onkologie ; 167 Tabellen. Georg Thieme Verlag; 2010.

Takahashi K, Mulliken JB, Kozakewich HP, Rogers RA, Folkman J, Ezekowitz RA. Cellular markers that distinguish the phases of hemangioma during infancy and childhood. *J. Clin. Invest.* 1994;93(6):2357–64

Takaoka K, Sakurai K, Noguchi K, Hashitani S, Urade M. Endovascular papillary angioendothelioma (Dabska tumor) of the tongue: report of a case. *J. Oral Pathol. Med.* 2003;32(8):492–5

Taki W, Yonekawa Y, Iwata H, Uno A, Yamashita K, Amemiya H. A new liquid material for embolization of arteriovenous malformations. *AJNR. Am. J. Neuroradiol.* 1990;11(1):163–8

Tan D, Kraybill W, Cheney RT, Khoury T. Retiform hemangioendothelioma: a case report and review of the literature. *J. Cutan. Pathol.* Munksgaard International Publishers; 2005;32(9):634–7

Tantinikorn W, Uprasertkul M, Assanasen P. Nasal granuloma gravidarum presenting with recurrent massive epistaxis. *J. Med. Assoc. Thai.* 2003;86(5):473–6

Tardío JC. CD34-reactive tumors of the skin. An updated review of an ever-growing list of lesions. *J. Cutan. Pathol.* 2009;36(1):89–102

Terzi F, Henrion D, Colucci-Guyon E, Federici P, Babinet C, Levy BI, Briand P, Friedlander G. Reduction of renal mass is lethal in mice lacking vimentin. Role of endothelin-nitric oxide imbalance. *J. Clin. Invest.* 1997;100(6):1520–8

Vasconcelos MG, Alves PM, Vasconcelos RG, da Silveira ÉJD, Medeiros AMC, de Queiroz LMG. Expression of CD34 and CD105 as markers for angiogenesis in oral vascular malformations and pyogenic granulomas. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology.* Springer-Verlag; 2011;268(8):1213–7

Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, Beliën JAM, de Waal RMW, Van Marck E, Magnani E, Weidner N, Harris AL, Dirix LY, Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, al. et, Folkman J, Pezzella F, al. et, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur. J. Cancer.* Elsevier; 2002;38(12):1564–79

Viale G, Dell'Orto P, Braidotti P, Coggi G. Ultrastructural localization of intracellular immunoglobulins in Epon-embedded human lymph nodes. An immunoelectron microscopic investigation using the immunogold staining (IGS) and the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) methods. *J. Histochem. Cytochem. Histochemical Society Inc.;* 1985;33(5):400–6

Vikkula M, Boon LM, Mulliken JB, Olsen BR. Molecular basis of vascular anomalies. *Trends Cardiovasc. Med.* 1998;8(7):281–92

Wang Z, Li K, Dong K, Xiao X, Zheng S. Successful Treatment of Kasabach-Merritt Phenomenon Arising From Kaposiform Hemangioendothelioma by Sirolimus. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2015;37(1):72–3

Wassef M, Blei F, Adams D, Alomari A, Baselga E, Berenstein A, Burrows P, Frieden IJ, Garzon MC, Lopez-Gutierrez J-C, Lord DJE, Mitchel S, Powell J, Prendiville J, Vikkula M. Vascular Anomalies Classification: Recommendations From the International Society for the Study of Vascular Anomalies. *Pediatrics.* 2015;136(1):e203-14

Weiss SW, Enzinger FM. Epithelioid hemangioendothelioma a vascular tumor often mistaken for a carcinoma. *Cancer.* Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 1982;50(5):970–81

Werner JA, Dünne AA, Folz BJ, Rochels R, Bien S, Ramaswamy A, Lippert BM. Current concepts in the classification, diagnosis and treatment of hemangiomas and vascular malformations of the head and neck. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 2001;258(3):141–9

Werner JA, Eivazi B, Folz BJ, Dünne A-A. „ State of the Art “ zur Klassifikation , Diagnostik und Therapie von zervikofazialen Hämangiomen und vaskulären Malformationen. 2006;1:883–91

Wetterwald A, Hofstetter W, Cecchini MG, Lanske B, Wagner C, Fleisch H, Atkinson M. Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by Rat Osteoblasts and Osteocytes. *Bone.* 1996;18(2):125–32

Willenberg T. Angiodysplasien. *Zeitschrift für Gefäßmedizin.* 2011;8 (1): 5-10

Yoruk O, Ucuncu H, Aktan B, Calik M, Kilic K. Glomuvenous Malformations in the Buccal Area. *J. Craniofac. Surg.* 2010;21(6):2001–3

Yu Y, Flint AF, Mulliken JB, Wu JK, Bischoff J. Endothelial progenitor cells in infantile hemangioma. *Blood.* American Society of Hematology; 2004;103(4):1373–5

Yuan K, Jin Y-T, Lin MT. The Detection and Comparison of Angiogenesis-Associated Factors in Pyogenic Granuloma by Immunohistochemistry. *J. Periodontol.* American Academy of Periodontology 737 N. Michigan Avenue, Suite 800 Chicago, IL 60611-2690 USA ; 2000;71(5):701–9

Yuan K, Wing L-YC, Lin MT. Pathogenetic Roles of Angiogenic Factors in Pyogenic Granulomas in Pregnancy Are Modulated by Female Sex Hormones. *J. Periodontol. American Academy of Periodontology* 737 N. Michigan Avenue, Suite 800 Chicago, IL 60611-2690 USA ; 2002;73(7):701–8

Zhong L, Ow A, Yang W, Hu Y, Wang L, Zhang C. Surgical management of solitary venous malformation in the midcheek region. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 2012;114(2):160–6

Zukerberg LR, Nickoloff BJ, Weiss SW. Kaposiform hemangioendothelioma of infancy and childhood. An aggressive neoplasm associated with Kasabach-Merritt syndrome and lymphangiomatosis. *Am. J. Surg. Pathol.* 1993;17(4):321-8

9. Anhang

9.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer waren

in Marburg: Bartsch, Baum, Baumann, Becker, Bette, Bösner, Brehm, Cetin, Czubayko, Decher, del Rey, Dodel, Donner-Banzhoff, Görg, Gress, Grimm, Grundmann, Hegele, Höffken, Hoyer, Jacobsohn, Jerrentrup, Kann, Kill, Kinscherf, Kircher, Klose, König, Koolman, Kühnert, Lill, Lohoff, Maier, Mittag, Moll, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Oertel, Oliver, Pagenstecher, Plant, Preisig-Müller, Renz, Richter, Roeßler, Röhm, Rosenow, Rost, Ruchholtz, Samland, Schäfer H., Schäfer J., Schieffer, Schmidt, Schu, Seifart, Seitz, Sevinc, Steiniger, Stiewe, Strik, Tackenberg, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wilhelm, Wrocklage, Wulf, Zemlin

in Fulda: Adamski, Bösch, Buhl, Hessmann, Six

in Paarl, Südafrika: Georgiou, de Klerk

in Berlin: Geißler, Haist, Hildebrandt, Schröer, Stofft, Triestram

in Münster: Berssenbrügge, Rudack, Savvas, Stenner, Weiß

9.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. Robert Mandic, Leiter des HNO-Forschungslabors, bedanken. Er hat mir ermöglicht, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen und stand mir bei der Umsetzung stets hilfreich und unterstützend zur Seite. Besonderer Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. med. Boris A. Stuck, Chefarzt und Direktor der Hals-Nasen-Ohrenklinik Marburg und an Herrn Prof. Dr. med. Afshin Teymoortash, Universitäts-Chefarzt der HNO-Klinik bis März 2017.

Ebenso bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn PD Dr. rer. nat. Michael Bette für seine Hilfe, Geduld und Betreuung bei den mikroskopischen Aufnahmen und im Rahmen der statistischen Auswertung der Daten. Mein Dank gilt zudem Frau Dr. med. Marion Rößler, stellvertretend für das Institut für Pathologie des UKGM, für ihre hilfreiche Unterstützung und Dr. rer. nat. Ansgar Schmidt, Leiter der Molekularpathologie des UKGM, für die Bereitstellung des Claudin 5-Antikörpers.

Besonderen Dank richte ich außerdem an Frau Roswitha Peldzsus und Frau Grazyna Sadowski, die mir im Labor immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Ebenfalls bedanke ich mich bei meinen Freunden und „Mit-Doktoranden“ Laura, Philipp, Chris und Philip, die immer für gute Stimmung im Labor und ein gutes Arbeitsklima gesorgt haben.

Meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich an dieser Stelle für ihre liebevolle und uneingeschränkte Unterstützung während des gesamten Studiums und ihrem emotionalen Beistand während der Durchführung dieser Dissertation danken. Unerwähnt darf auch mein Freund Hendrik nicht bleiben, der in dieser Zeit geduldig so manche „Unausgeglichenheiten“ meinerseits akzeptiert hat und diese auszubalancieren wusste.