

Aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Detlef Zillikens

Einfluss der Kompressionstherapie auf die Expression der Proteine
Tenascin C, Fibrillin 2 und α -Smooth Muscle Actin bei chronischer
venöser Insuffizienz

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin-

vorgelegt von
Okka Gerdes
aus Leer
Lübeck 2012

1. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Birgit Kahle
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Limmer
Tag der mündlichen Prüfung: 11.01.2013
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 11.01.2013
-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Begriffe.....	V
Kapitel: Einleitung	1
1.1 Chronische venöse Insuffizienz	1
1.2 Lipodermatosklerose (LDS)	6
1.3 Tenascin C	8
1.4 Fibrillin 2	9
1.5 α -Smooth Muscle Actin (α -SMA)	11
1.6 Kompressionstherapie	12
1.7 Entwicklung der Fragestellung	16
1.7.1 Fragestellung	17
Kapitel: Material und Methoden	18
2.1 Untersuchung: Expression der EZM Proteine in den klinischen Stadien C0, C2, C4, C6	18
2.1.1 APAAP- Färbungen	20
2.1.1.1 <i>Protokoll der Färbungen</i>	21
2.1.1.2 <i>Verwendete Antikörper</i>	23
2.1.2 Auswertung	23
2.2 Untersuchung: Einfluss der Kompressionstherapie auf die Expression der EZM Proteine	24
2.2.1 Ablauf der Untersuchung zum Einfluss der Kompression	25
2.2.2 Entnahme der Hautproben	27
2.2.3 Kompressionstherapie	29
2.2.4 Volumenmessung mittels Image 3D	29
2.2.5 Befragung der Patienten	30
Kapitel: Ergebnisse	31
3.1 Expression der EZM Proteine im Stadium C0, C2, C4 und C6	31
3.1.1 Tenascin C	31
3.1.2 Fibrillin 2	35
3.1.3 α -Smooth Muscle Actin	39
3.2 Einfluss der Kompressionstherapie auf die Expression der EZM Proteine in den Stadien C2 und C4	41
3.2.1 Einfluss der Kompressionstherapie auf Tenascin C	41
3.2.2 Einfluss der Kompressionstherapie auf Fibrillin 2	44
3.2.3 Einfluss der Kompressionstherapie auf α -Smooth Muscle Actin	47

3.3 Image 3D Volumenmessung	48
3.4 Patientenbefragung	51
Kapitel: Diskussion	56
4.1 Expression der EZM Proteine im Stadium C0, C2, C4 und C6	56
4.1.1 Tenascin und Fibrillin	56
4.1.2 α -Smooth Muscle Actin	59
4.2 Einfluss der Kompressionstherapie auf die Expression der EZM Proteine in den Stadien C2 und C4	60
4.2.1 Tenascin C und Fibrillin 2	60
4.2.2 α -Smooth Muscle Actin	62
4.3 Image 3D Volumenmessung	63
4.4 Patientenbefragung	64
Kapitel: Zusammenfassung	66
Literaturverzeichnis	68
Anhang	74
7.1 Verwendete Chemikalien	74
7.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen der Stadien C2 und C4	76
Danksagung	90
Lebenslauf	91
Eigene Publikationen	92

Abkürzungen und Begriffe

APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
BMP	bone morphogenetic protein
CVI	chronische venöse Insuffizienz
EDA	extra domain A
EZM	Extrazellularmatrix
FKS	fetales Kälber Serum
GATA-6	Guanin-Adenin-Thymin-Adenin binding protein 6
GMEM	glia/mesenchymal extracellular matrix protein
HCL	Salzsäure
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
kDa	kilo-Dalton
KKL	Kompressionsklasse
kPa	Kilopascal
LDS	Lipodermatosklerose
MKS	medizinischer Kompressionsstrumpf
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger ribonucleic acid
PBS	phosphate buffered saline
SMA	Smooth Muscle Actin
TGF- β	transforming growth factor- β
TNF- α	Tumor-Nekrose Faktor- α

VSM	Vena saphena magna
VSP	Vena saphena parva
ZNS	Zentrales Nervensystem
PE	Probenentnahme

1. Kapitel: Einleitung

1.1 Chronische venöse Insuffizienz

Erkrankungen der Venen sind sehr weit verbreitet und werden oft als Volkskrankheit bezeichnet. In Folge einer bestehenden Venenerkrankung kann sich eine chronische venöse Insuffizienz (CVI) entwickeln. Laut der Bonner Venenstudie leidet jeder sechste Mann und jede fünfte Frau an einer fortgeschrittenen Venenerkrankung (Rabe et al., 2003). Lediglich 9,6% der Bevölkerung wiesen in dieser Querschnittsstudie keine Beschwerden und Veränderungen im Bereich der Venen auf. 59% der Befragten klagten über Teleangiektasien oder retikuläre Venen, 14,3% hatten Kampfadern ohne weitere Zeichen einer CVI, bei 13,4% lag ein prätibiales Ödem vor und 3,3% wiesen fortgeschrittene Zeichen einer CVI auf. Ein akutes oder abgeheiltes Ulcus cruris venosum konnte bei 0,7% der Befragten gezeigt werden (Rabe et al., 2003).

Unter dem Begriff der chronischen venösen Insuffizienz werden alle klinischen Veränderungen, die als Folge eines chronischen Venenleidens auftreten können, zusammengefasst. Der Begriff CVI ist seit Jahren etabliert und geht auf van der Molen zurück (van Molen et al., 1957).

Das klinische Bild der CVI ist vielgestaltig und reicht von der Corona phlebectatica paraplantis, über Hyperpigmentierungen und Stauungsekzeme bis hin zum Ulcus cruris venosum.

Eine früher verwendete Stadieneinteilung der CVI ist die international gültige Klassifikation nach Widmer (Widmer, 1978), siehe Tabelle 1. Mittlerweile ist die gebräuchliche Klassifikation „CEAP“, siehe Tabelle 2 und 3. Diese Klassifikation wurde von einer internationalen Expertengruppe erarbeitet und berücksichtigt neben klinischen Symptomen auch hämodynamische, pathophysiologische, ätiologische und anatomische Aspekte (Kistner et al., 1996).

Tabelle 1: Klassifikation der CVI nach Widmer (Widmer 1978)

Stadium I	Corona phlebectatica paraplantaris, Phleb-Ödem
Stadium II	zusätzliche trophische Störungen mit Ausnahme des Ulcus cruris (z.B. Dermatoliposklerose, Pigmentveränderungen, Atrophie blanche)
Stadium III	Ulcus cruris venosum (Stadium IIIa: abgeheilt, Stadium IIIb: floride)

Tabelle 2: CEAP Klassifikation der CVI (Kistner et al., 1996)

C	Clinical Signs für klinische Zeichen (Grad 0-6), ergänzt durch (A) für asymptomatische und (S) für symptomatische Präsentation
E	Etiological Classification für ätiologische Klassifizierung (congenital, primär, sekundär)
A	Anatomic Distribution für anatomische Verteilung (superficial, deep, Perforanten) allein oder in Kombination
P	Pathophysiological Dysfunction für pathophysiologischeDysfunktion (Reflux oder Obstruktion) allein oder in Kombination

Tabelle 3: klinische Klassifikation (Kistner et al., 1996)

** die Unterteilung der Gruppe 4 erfolgte nachträglich im Rahmen einer Revision der CEAP-Klassifikation (Eklöf et al., 2004)*

C0	keine sichtbaren oder tastbaren Veränderungen einer Venenerkrankung
C1	Teleangiektasien oder retikuläre Varizen
C2	Varizen
C3	Ödem
C4	Veränderungen der Haut und des Unterhautfettgewebes verursacht durch venöse Erkrankungen
C4a*	Pigmentierung, Ekzem
C4b*	Lipodermatosklerose, Atrophie blanche
C5	Hautveränderungen wie oben beschrieben mit abgeheilter Ulzeration
C6	Hautveränderungen wie oben beschrieben mit aktivem Ulkus



Abbildung 1: Stadium C2, stark ausgeprägte Varizen ohne Stauungszeichen



Abbildung 2: Stadium C4a, stark ausgeprägte Varizen deutliche Hyperpigmentierung



*Abbildung 3: Rechts: Stadium C4b, Dermatliposklerose
Links: Stadium C6, aktives Ulcus cruris venosum*

Als relevant für die Ausbildung einer CVI gilt das Versagen der venösen Pumpfunktion, die häufig auf einer Insuffizienz der Venenklappen beruhen, und die daraus resultierende ambulatorische venöse und kapilläre Hypertonie (Partsch, 1985). Dabei bewirkt die Aktivierung der Muskel- und Gelenkpumpen unter Belastung keinen adäquaten Druckabfall in den betroffenen Venenabschnitten. Daraus resultiert, dass der venöse Druck in den unteren Extremitäten nicht mehr ausreichend reduziert werden kann und es so zu stauungsbedingten Mikrozirkulationsstörungen kommt. Im Rahmen der chronischen Druckerhöhung kommt es zu einer Elongation und Dilatation der Kapillaren und somit zu einem vermehrten Austritt von Proteinen und Erythrozyten in das perivaskuläre Gewebe (Rabe, 2006). Weiterhin zeigen sich morphologische Veränderungen an den Kapillaren in den betroffenen Regionen. Hierzu gehören Kaliberschwankungen und eine vermehrte Schlingelung der Gefäße (Ladwig, 2008).

Der Verlauf der fortschreitenden Venenerkrankung ist gut nachvollziehbar anhand typischer Veränderungen des kutanen Kapillarbettes, die relevant für Störungen der Mikrozirkulation sein können. Zu Beginn der venösen

Erkrankung besteht eine Dilatation und Torquierung der Gefäße. Im weiteren Verlauf kann es zu glomerulumartigen Gefäßformationen kommen und zuletzt liegt nur noch ein stark rarifiziertes Kapillarsystem vor (Gschwandtner und Ehringer, 2001).

Für die Entstehung der Hautveränderungen bis hin zum Ulcus cruris venosum können nach heutigem Wissenstand verschiedene Faktoren verantwortlich sein, in deren Folge es zu einer chronischen Entzündung in Hautorganen kommt.

Burnand et al. postulierten 1982 die Theorie der perikapillären Fibrinmanschette. Sie vermuteten, dass es durch die Fibrinmanschette zu veränderten Druckverhältnissen kommen kann und dadurch zu einer Aufweitung der Endothelporen. Dieses führe ihrer Meinung nach zu einer Diffusionsstörung für Sauerstoff und letztendlich zu einer Minderversorgung des betroffenen Gewebes (Burnand et al., 1982).

Im Gegensatz dazu stehen die Erkenntnisse von Michel et al. (1990). Sie zeigten in ihren Untersuchungen, dass Fibrinmanschetten keine wirkliche Diffusionsbarriere darstellen und somit nicht ursächlich für die Veränderungen im Verlauf der CVI sein könnten.

Ähnliches ergaben die Studien von Veraart et al. (1993), die solche Fibrinmanschetten nur bei Ulzerationen fanden und diese somit als Folge venöser Ulzera und nicht als deren Ursache deklarierten.

Herrick et al. konnten 1992 bei Patienten mit Ulcus cruris venosum zeigen, dass Fibrinmanschetten hochorganisierte Strukturen sind, die aus Laminin, Fibronectin, Tenascin und Kollagen I und III aufgebaut sind. Häufig enthalten sie zusätzlich eingewanderte Monozyten, Makrophagen und polymorphkernige Leukozyten. Auf Grund ihrer Studien stellten sie die These auf, dass Fibrinmanschetten durch aktive Prozesse der lokalen Zellen entstehen und nicht ausschließlich durch Akkumulation von aus dem Blut ausgetretenen Stoffen (Herrick et al., 1992).

Eine andere Erklärung gibt die so genannte „Leukozytenfalle“ (Coleridge Smith et al., 1988). Durch die modifizierten Gefäße und den verlangsamten Blutfluss scheint es zu einer Aktivierung und Akkumulation der Granulozyten zu kommen.

Die gesteigerte Adhäsion der Leukozyten an das Endothel kann ein verkleinertes Lumen und somit eine Okklusion von Mikrogefäßen verursachen (Gschwandtner und Ehringer, 2001). Das wiederum führt zu einer Mikrozirkulationsstörung und Minderdurchblutung in den betroffenen Arealen. Zusätzlich setzen die Leukozyten proteolytische Enzyme und Radikale frei, die ihrerseits zu einer weiteren Schädigung der Gefäßwand beitragen. Laut der Theorie der „Leukozytenfalle“ (Coleridge Smith et al., 1988) kommt es zu einer Endothelschädigung und einer daraus resultierenden chronischen Entzündung. Diese chronischen Entzündungsvorgänge können bei weiterem Fortschreiten der Erkrankung zu einer Lipodermatosklerose und einem Ulcus cruris venosum führen.

1.2 Lipodermatosklerose (LDS)

Wie oben erwähnt kann es im fortgeschrittenen Stadium der CVI zu einer Sklerose der Unterschenkelhaut kommen. Prädilektionsort für die Entstehung ist die Region am Unterschenkel über dem Malleolus medialis. Im klinischen Bild zeigt sich eine Induration, die sowohl lokal als auch die gesamte Zirkumferenz betreffend auftreten kann (Rabe, 2006).

Die Lipodermatosklerose selbst ist ein chronischer entzündlicher Prozess, der die papilläre und retikuläre Dermis, aber auch die Subkutis und das Fettgewebe betrifft. Durch die chronische Entzündung kommt es zu Neovaskularisationen, zur Nekrose des Fettgewebes und zur Fibrose. Dieser Zustand wird durch die Aktivität verschiedener Zytokine und proteolytischer Enzyme, vor allem Metalloproteinasen, sowie durch eine gesteigerte Aktivität der Fibroblasten aufrecht erhalten (Herouy et al., 1998).

Vignale et al. (2004) konnten zeigen, dass es in der Dermis und Subkutis zu deutlichen vaskulären Veränderungen, wie einem vermehrten Auftreten von pathologisch veränderten venösen Gefäßen, einem verstreuten Auftreten von Entzündungszellen und einer ausgeprägten Fibrose mit einem Verlust von Fettgewebe und pseudomembranöser Nekrose des Fettgewebes kommt.

Die Gefäßveränderungen führen zu einer Lumenverengung, sowie einer Fibrose und Hyperplasie der Intima der venösen Gefäße. Gelegentlich finden sich Lymphozyten in der Adventitia und im perivaskulären Gewebe. Hieraus resultiert eine Hypoxie, eine Endothelschädigung und eine chronische Entzündung (Vignale et al., 2004).

Für die Ausbildung einer LDS sind entzündliche Prozesse verantwortlich. In der verhärteten Haut findet sich faserreiches Narbengewebe in der Dermis, welches aus Kollagenbündeln und einem verminderten Anteil elastischer Fasern besteht und einen Verlust der zellulären Komponenten aufweist. Durch Fibroblastenaktivierung kommt es zu einer vermehrten Synthese von Bindegewebsproteinen. Hierzu zählen in erster Linie Kollagene, mit einem relativen Anstieg des Gehalts an Kollagen III, Fibronectin, Tenascin C und Fibrillin 2, wie es auch für andere Fibrosen und in der Wundheilung bekannt ist (Brinckmann et al., 2010). Brinckmann et al. (1999) konnten zeigen, dass es im Rahmen von sklerosierenden Erkrankungen der Haut zu einer Änderung des Vernetzungsmusters der Kollagenmoleküle kommt. So finden sich in normaler Haut Lysin-Aldehyd abhängige Verbindungen. Im Gegensatz dazu liegen in der Haut von Patienten mit Sklerodermie, hypertrophen Narben und LDS vermehrt Hydroxylysin-Aldehyd abhängige Verbindungen vor. Die Änderungen des Kollagengerüsts führen zu einer gesteigerten mechanischen Stabilität der Extrazellulärmatrix (EZM). Ferner kommt es zu einem vermehrten Auftreten von Fibroblasten, sogenannten Myofibroblasten, die mit einem Antikörper gegen α -Smooth Muscle Actin angefärbt und auf diese Weise dargestellt werden können. Myofibroblasten sind im Verlauf der Wundheilung für die Kontraktion der Narbe verantwortlich.

Neben der vermehrten Bindegewebssynthese ist auch ein Anstieg von Proteasen in den betroffenen Hautarealen beschrieben. Es kommt zu einem signifikanten Anstieg der mRNA und der Proteinexpression von Metalloproteinasen. Diese Matrix-Metalloproteinasen sind in der Lage, Kollagene und Fibrinmanschetten zu degradieren. Daraus resultiert eine proteolytische Matrixzerstörung, die mit verantwortlich ist für die Entstehung

eines dermoepidermalen Hautdefektes wie beim Ulcus cruris venosum (Herouy et al.,1998).

1.3 Tenascin C

Tenascin C ist ein Protein der Extrazellulärmatrix (EZM), das vor mehr als 20 Jahren in Gliagewebe, Muskelgewebe und im Nervensystem entdeckt wurde. Aufgrund seines ubiquitären Vorkommens gibt es viele Synonyme, wie Myotendinous Antigen, glial/mesenchymal extracellular matrix protein (GMEM) cytotactin, neuronectin und hexabrachion, J1 220/200 (Midwood und Orend, 2009).

Tenascin C ist der bekannteste Vertreter der Tenascin Familie, zu der auch Tenascin -X, -W und -R zählen. Je nach Splicevariante hat Tenascin C ein Molekulargewicht von 190 – 330kDa. Supramolekular bilden sechs Tenascinmoleküle ein Hexamer aus (Hexabrachion), das über Disulfidbrücken stabilisiert wird (Erickson und Iglesias, 1984). Tenascin C kann mit verschiedenen Molekülen interagieren, hierzu gehören zum Beispiel Fibronectin, Heparin oder Perlecan (Midwood und Orend, 2009).

Tenascin C spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung, bei Wundheilungs- und Reparaturvorgängen sowie bei chronischen Entzündungen und der Tumorentwicklung. Tenascin C besitzt sowohl adhäsive als auch anti-adhäsive Eigenschaften. Es ist beteiligt an der Regulation von Zellmigration und -proliferation. Tenascin C ist durch die Aktivierung von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6) und IL-8, ein wichtiger Bestandteil zellulärer Signalkaskaden (Midwood und Orend, 2009). In fast allen Arealen, die eine hohe Dichte an Abwehrzellen aufweisen, ist Tenascin C vermehrt nachweisbar. Weiterhin gibt es Hinweise, dass Tenascin C auch direkt die Aktivität von Lymphozyten beeinflussen kann. Eine weitere mögliche Funktion ist die gesteigerte Rekrutierung und Aktivierung von Myofibroblasten (Tamaoki et al., 2005).

Die Expression von Tenascin C kann durch verschiedene pro- und anti-inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert werden ebenso

wie durch mechanischen Stress, Hypoxie und vaskuläre Hypertension. Durch GATA-6 (Guanin-Adenin-Thymin-Adenin binding protein 6) und Glucocorticoide hingegen wird die Expression vermindert. Durch Matrix-Metalloproteasen und Serinproteasen wird Tenascin C gespalten. Zusätzlich interagiert Tenascin C mit vielen anderen EZM Molekülen (Midwood und Orend, 2009).

In normaler Haut befindet sich Tenascin C in der papillären Dermis, bevorzugt als schmaler zumeist diskontinuierlicher Streifen im Bereich der dermo-epidermalen Junctionzone, jedoch mit starken individuellen Unterschieden. Es befindet sich ebenfalls in der Basalmembran dermalen Gefäße und in Hautanhangsorganen, wie Drüsen und Haarfollikeln (Latijnhouwers et al., 1996, Lightner et al., 1989).

Costa et al. (1999) konnten belegen, dass Tenascin C in hypertrophem Narbengewebe in der gesamten Dermis nachweisbar ist. Wird das Gewebe jedoch mit Druck behandelt, zeigt sich nach der Therapie ein Tenascin C Muster wie in normaler Haut.

2001 konnte von Schild nachgewiesen werden, dass die Tenascin C Expression im Verlauf der CVI in der Unterschenkelhaut kontinuierlich zunimmt. Ähnliches konnte von Peschen und Vanscheidt (1999) und Brinckmann et al. (2010) gezeigt werden. Sie beschrieben die Tenascin C Expression bei Lipodermatosklerose als intensives Signal an der Basalmembran und im Bereich der gesamten Dermis. Im Vergleich dazu zeigte sich die Expression bei Hautproben entnommen aus dem Ulkusrand noch stärker und homogener. Bei den anderen klinischen Erscheinungsbildern der CVI zeigte sich für sie nur ein gering bis gar nicht verändertes Expressionsmuster im Vergleich zu gesunder Haut.

1.4 Fibrillin 2

Fibrillin 2 ist ein zysteinreiches Glykoprotein der EZM, das zusammen mit Fibrillin -1 und -3 die Fibrillinfamilie bildet. Fibrilline werden von Fibroblasten gebildet. Die Fibrilline sind wesentlicher Bestandteil der 10 – 12nm großen Mikrofibrillen, welche ein Gerüst für die Synthese von Elastin darstellen. Sie

bilden zusammen mit Elastin das elastische Fasergewebe. Fibrilline sind ubiquitär in allen Bindegewebsarten vorhanden. Alle Mitglieder der Fibrillinfamilie, die sich untereinander sehr ähneln, haben eine Größe von ca. 350kDa und besitzen einen hohen Anteil an Cystein (12 – 13%), das durch die Ausbildung von Disulfidbrücken maßgeblich zur Stabilität beiträgt (Ramirez und Pereira, 1999, Ramirez und Sakai, 2010).

Vor allem in der embryonalen Entwicklung sind Fibrilline von zentraler Bedeutung. Sie sind verantwortlich für die biomechanischen Eigenschaften der meisten Gewebe und Organe, da sie den Hauptbestandteil der extrazellulären Mikrofibrillen darstellen (Ramirez und Pereira, 1999). Weiterhin spielen sie eine wichtige Rolle im Rahmen der Regulation und Speicherung von Wachstumsfaktoren wie Tumor growth factor- β (TGF- β) und bone morphogenetic protein (BMP). Es konnte gezeigt werden, dass die Fibrillin 2 Expression durch Serum, IL-4 und TGF- β getriggert wird, während Hypoxie keinen signifikanten Einfluss auf die Expression aufweist (Brinckmann et al., 2010). Fibrillin 1 wird sowohl während der embryonalen Entwicklung als auch postnatal exprimiert. Fibrillin 2 hingegen wird hauptsächlich während der Organentwicklung und -differenzierung gebildet und lässt sich beim Erwachsenen fast nur noch in elastischem Gewebe und bei Umbauvorgängen nachweisen (Ramirez und Sakai, 2010). Während der embryo-fetalen Periode findet sich häufig eine Koexpression von Fibrillin 1 und Fibrillin 2 in Geweben wie Haut, Lunge, Herz, Aorta, Zentralnervensystem (ZNS) (Brinckmann et al., 2010).

Fibrillin 2 befindet sich vor allem in elastischem Gewebe, wie elastischem Knorpel, in der Tunica media der Aortenwand und des Bronchialsystems. Weiterhin ist es an der Aufhängung der Linse an den Ziliarkörper beteiligt und besitzt eine verankernde Funktion (Zhang et al., 1994).

Mutationen im Fibrillin 1 Gen sind beim Marfan Syndrom nachgewiesen worden. Eine Mutation im Fibrillin 2 Gen ist verantwortlich für das Auftreten des Beal Syndroms und der Arachnodactylie, einer Bindegewebserkrankung ähnlich dem Marfan Syndrom (Chaudhry et al., 2001).

Im Rahmen der Wundheilung, bei der Ausbildung von Narben und bei sklerotischen Umbauvorgängen verschiedener Genese werden die Fibrilline verstärkt exprimiert. Eine gesteigerte Fibrillin 2 Expression kann somit als Zeichen einer erhöhten Fibroblastenaktivierung verstanden werden. Fibrillin 2 wird sowohl in der Wundheilung, speziell in der Granulationsphase, als auch bei sklerotisch veränderten Hauterkrankungen wie Lipodermatosklerose und Sklerodermie in der gesamten Dermis vermehrt exprimiert. In Keloiden und bei Lichen sclerosus und atrophicus findet sich ebenfalls eine vermehrte Expression von Fibrillin 2. Bei diesen Erkrankungen kommt es zu einer Koexpression von Tenascin C und Fibrillin 2 (Brinckmann et al., 2010).

In gesunder Haut ist Fibrillin 2 nur spärlich vorhanden. Es ist im Bereich der epidermalen Junctionzone, entlang der dermalen Gefäße und im Bereich von Haarfollikeln und Schweißdrüsen zu finden (Sakai et al., 1986).

1.5 α -Smooth Muscle Actin (α -SMA)

Die Aktinfamilie besteht aus 6 Mitgliedern. α -Smooth Muscle Actin, α -Cardiac Actin, α -Skeletal Actin und γ -Smooth Muscle Actin bilden die Gruppe der gewebsspezifischen Aktinisoformen. γ - und β - non-Smooth Muscle Actin stellen die Gruppe der cytoplasmatischen Aktine dar. Die verschiedenen Aktine stimmen zu 95% in ihrer Aminosäure Sequenz überein, wobei sich die Gruppenmitglieder der non-Smooth Muscle Actine stärker ähneln als die der Muskelaktine. α -Smooth Muscle Actin wird normalerweise in den glatten Muskelzellen der Gefäße produziert. Es kann aber auch von Myofibroblasten in anderen Geweben gebildet werden (Wang et al., 2006).

Das α -Smooth Muscle Actin Gen ist vor allem in der frühen embryonalen kardiovaskulären Entwicklung aktiviert und in späteren Entwicklungsstadien wieder abgeschaltet. α -Smooth Muscle Actin entsteht weiterhin während der vaskulären Entwicklung. Es wird zum Hauptprotein in glatten Muskelzellen und ist die Isoform, die in vaskulärem Gewebe vorherrschend ist (Wang et al., 2006, Hinz et al., 2007).

α -SMA ist der gängige Marker für das Vorhandensein von Myofibroblasten (Hinz, 2010). Es wird als bedeutender Faktor zur Steigerung der kontraktile Aktivität verschiedener Gewebe betrachtet. Myofibroblasten werden vor allem in der Granulationsphase bei Wundheilungsprozessen, in Narbengewebe und bei der Ausbildung von Fibrose nachgewiesen (Wang et al., 2006).

Myofibroblasten entstehen hauptsächlich aus Fibroblasten der Dermis und Subkutis. Eine weitere Quelle zur Bereitstellung von Myofibroblasten stellen die glatten Muskelzellen der Gefäße dar. Die Entwicklung von Fibroblasten zu Myofibroblasten beginnt in der Regel mit der Umwandlung in einen Protomyeloblasten, deren zytoplasmatische Fasern nur β - und γ -Aktin enthalten. Aus diesem entwickelt sich schließlich der differenzierte Myofibroblast. Die Differenzierung wird sowohl durch Zytokine, wie TGF- β , als auch durch EZM Komponenten, wie EDA-Fibronectin, reguliert. Weiterhin induzieren Endothelin-1 und Thrombin die Myofibroblastenbildung (Desmoulière et al., 2005).

Nach einer Gewebeverletzung differenzieren sich die dortigen Fibroblasten in kontraktile und sekretorische Myofibroblasten, die an den Reparaturvorgängen beteiligt sind. Auch bei Fibrosen können vermehrt Myofibroblasten nachgewiesen werden, wie zum Beispiel in hypertrophen Narben, bei Sklerodermie, Morbus Dupuytren und fibrotischen Vorgängen in einzelnen Organen, wie Herz und Niere (Hinz et al., 2007).

Bei Untersuchungen von Hautbiopsien aus dem Randbereich eines Ulcus cruris venosum konnte gezeigt werden, dass sich α -SMA produzierende Myofibroblasten in der retikulären Dermis nachweisen lassen. Bei Hautbiopsien aus einer Dermatoliposklerose zeigten sich vereinzelt Myofibroblasten in der Tiefe. In gesunder Haut hingegen fand sich α -SMA nur entlang der dermalen Gefäße (Bandemir, 2003).

1.6 Kompressionstherapie

Die Kompressionstherapie bildet die nicht-invasive Grundlage der Behandlung von akuten und chronischen Erkrankungen des Venensystems und ist in jedem

Stadium der Erkrankung indiziert. Durch die Kompression kommt es zu einer Reduzierung des Venenquerschnitts, einer Beschleunigung des venösen und lymphatischen Rückstroms, einer Verbesserung der Venenklappenfunktion und einer Reduktion und Prävention des Extremitätenödems (Wienert et al., 2006). Eine Verbesserung der strukturell veränderten Venenwand konnte durch Hammersen und Hesse 1990 nachgewiesen werden.

Zielsetzung der Kompressionstherapie ist (Jünger und Sippel, 2003) :

- Besserung der subjektiven Beschwerden im Rahmen der CVI
- Verringerung des Ödems
- Verringerung der trophischen Störungen
- Verhindern des Fortschreitens der CVI

Angewandt werden der phlebologische Kompressionsverband, der medizinische Kompressionsstrumpf (MKS) und die apparative intermittierende Kompression.

In der Kompressionstherapie unterscheidet man einen Arbeitsdruck und einen Ruhedruck. Der Ruhedruck beschreibt den Druck, der durch die Binde oder den Strumpf in Ruhe auf das Bein ausgeübt wird, der Arbeitsdruck beschreibt den Druck, der der Ausdehnung während der Muskularbeit des Beines entgegenwirkt (Wienert et al., 2006).

Die zur Verfügung stehenden Materialien unterscheiden sich in ihrer Elastizität. Es gibt unelastische Binden, Ultrakurzbinden mit einer Dehnbarkeit bis 30%, Kurzzugbinden mit einer Dehnbarkeit von 40 – 90%, Mittelkurzbinden mit einer Dehnbarkeit von 100 – 130% und Langzugbinden mit einer Dehnbarkeit über 150 – 200%. Je niedriger die Elastizität des verwendeten Materials ist, desto höher ist der Arbeitsdruck und je höher die Elastizität und somit die Rückstellkraft des Materials, desto größer ist der Ruhedruck. Wichtig bei der phlebologischen Kompressionstherapie ist, dass das Material einen hohen Arbeitsdruck bei Bewegung und Aktivierung der Muskelpumpen aufweist, jedoch einen niedrigen Ruhedruck besitzt. (Kecelj Leskovec et al., 2008). Daher werden bei der Behandlung von phlebologischen Erkrankungen vor allem Kurzzugmaterialien verwendet, die diese Anforderungen am besten erfüllen. Die

medizinische Kompressionstherapie entfaltet ihre Hauptwirkung während der Aktivierung der Muskel-Gelenkpumpen. Auf Grund der besseren Alltagstauglichkeit und der daraus resultierenden besseren Compliance wird die Behandlung in Form von MKS durchgeführt (Jünger und Sippel, 2003).

Die MKS können auf verschiedene Arten gestrickt werden und unterscheiden sich dadurch in ihrer Kompressionsstärke (Wienert et al., 2006).

- „Flachgestrickte mit Naht, maschinengeformt, mit mindestens je einem verstrickten und einem eingelegten elastischen Faden in jeder zweiten Maschenreihe: Diese Strümpfe können sehr passgenau mit großer Kompressionsstärke hergestellt werden.“
- „Ein- und doppelflächig rundgestrickt, nahtlos, maschinengeformt, mit mindestens je einem verstrickten und einem eingelegten elastischen Faden in jeder zweiten Maschenreihe: Dem rundgestrickten Strumpf sind bei der Formgebung Grenzen gesetzt. So können Extremitäten mit sehr kleinen Umfängen und extremen Umfangsänderungen nicht optimal versorgt werden.“

Der MKS ist ein elastischer Strumpf, der einen kontinuierlichen Druck auf die Extremität und somit auf das Venensystem ausübt. Es stehen verschiedene Kompressionsklassen (KKL 1 – 4) zur Verfügung, welche sich im Anpressdruck in Ruhe, gemessen in Höhe des B-Maßes (Fesselbereich), auf die Extremität unterscheiden. Der MKS muss eine kontinuierliche Druckabnahme von distal 100% nach proximal 40% aufweisen. Tabelle 4 zeigt die Eigenschaften der vier Kompressionsklassen (Wienert et al., 2006).

Tabelle 4: Einteilung der Kompressionsklassen (KKL) (Wienert et al., 2006)

KKL	Intensität	Druck in mmHg	Druck in kPa
1	leicht	18 – 21	2,4 – 2,8
2	mittel	23 – 32	3,1 – 4,3
3	kräftig	34 – 46	4,5 – 6,1
4	sehr kräftig	49 und größer	6,5 und größer

Die Umfänge definieren sich am Bein aus den Maßen A bis G, ermittelt an den Längenmesspunkten A bis G. Die Norm fordert für Serienstrümpfe eine Reihe von Umfangmaßen für das schlanke, normale und kräftige Bein.

Für den klinischen Gebrauch stehen vier Ausführungsformen zur Verfügung (Wienert et al., 2006):

- Wadenstrumpf (AD)
- Halbschenkelstrumpf (AF)
- Schenkelstrumpf (AG)
- Strumpfhose (AT)

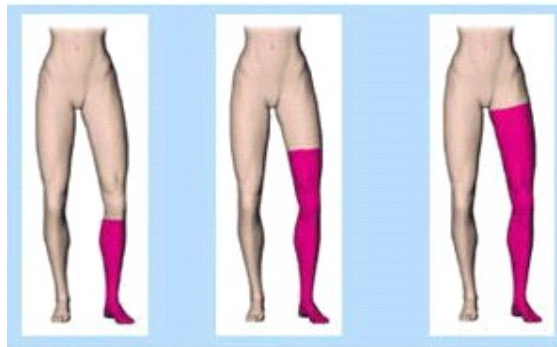


Abbildung 4: Darstellung der verschiedenen Ausführungsformen der MKS. Links der Wadenstrumpf (AD), in der Mitte der Halbschenkelstrumpf (AF), rechts der Schenkelstrumpf (AG) (REHADAT - Informationssystem zur beruflichen Rehabilitation, 2010)

Laut der Bonner Venenstudie stellen die MKS mit 14,6% (20,3% der Frauen, 7,5% der Männer) die häufigste Therapieform in der phlebologischen Behandlung dar. Im Stadium C0 der CEAP Klassifikation werden in 1% der Fälle Kompressionsstrümpfe verordnet, in den Stadien C5/6 liegt die Verordnungshäufigkeit bei 82% (Rabe et al., 2003).

Patienten, die unter frühen Stadien der CVI leiden und mit MKS der Klasse I behandelt wurden, gaben schon nach einer vierwöchigen Behandlung eine Verbesserung ihrer Beschwerden und Lebensqualität an. Partsch et al. (2004) beschrieben, dass bereits leichte Kompressionsstrümpfe, die einen Druck zwischen 11 und 21mmHg erzeugen, in der Lage sind ein Ödem der Beine zu reduzieren und einer abendlichen Beinschwellung entgegenzuwirken. Jedoch sind solche MKS nicht in der Lage, eine venöse Hypertension bei einer

stehenden Person zu reduzieren. Hierfür benötigt man einen Anpressdruck, der größer als 40mmHg ist.

Weiterhin findet die Kompressionstherapie Anwendung in der Behandlung von hypertrophen Narben, vor allem infolge von Verbrennungen. Dort werden speziell angefertigte elastische Bandagen verwendet, die einen Druck von ca. 24 mmHg erzeugen. Unter dieser Therapie kommt es zu einer deutlichen Rückbildung des Narbengewebes. Hypertrophe Narben lassen sich hierdurch verringern und eventuell ganz verhindern (Bruck et al., 2002).

1.7 Entwicklung der Fragestellung

Bei der chronischen venösen Insuffizienz kommt es im Verlauf der Erkrankung zu Veränderungen in der EZM. Es ist bekannt, dass es im Stadium der Dermatoliposklerose zu einer vermehrten Expression von Tenascin C und Fibrillin 2 kommt (Brinckmann et al., 2010). Für Tenascin C liegen weiterhin Untersuchungen für frühere Stadien der CEAP Klassifikation vor, die beschreiben, dass die Expression mit dem Fortschreiten der CVI zunimmt (Peschen und Vanscheidt, 1999; Schild, 2001).

Untersuchungen zur Fibrillin 2 Expression während der einzelnen Stadien liegen bislang nicht vor. Es konnte jedoch von Brinckmann et al. (2010) eine erhöhte Fibrillin 2 Expression bei Lipodermatosklerose nachgewiesen werden. Außerdem zeigte diese Arbeitsgruppe, dass bei sklerotischen Veränderungen der Haut eine Koexpression von Tenascin C und Fibrillin 2 auftritt.

Für Myofibroblasten ist bekannt, dass es zu einem vermehrten Vorkommen in der Haut von Patienten mit Ulcus cruris venosum kommt. Des Weiteren ist belegt, dass sich eine gesteigerte Anzahl von Myofibroblasten in fibrotisierenden Veränderungen nachweisen lässt (Hinz et al., 2007). Ab welchem klinischen Schweregrad der venösen Erkrankung es zu einem vermehrten Vorkommen von Myofibroblasten in den betroffenen Hautarealen kommt, ist jedoch nicht bekannt. Ebenfalls noch unklar ist, in welchem Bereich eine verstärkte Expression zuerst auftritt und wodurch sie getriggert wird.

Ein weiterer interessanter Aspekt, der es wert ist genauer untersucht zu werden ist, ob sich die Expression von EZM Proteinen durch Kompression beeinflussen lässt. Man weiß, dass die Proteine Tenascin C und α -Smooth Muscle Actin in hypertrophem Narbengewebe vermehrt vorhanden sind. Es zeigt sich also histologisch ein ähnliches Bild wie bei der Dermatoliposklerose. Costa et al. (1999) konnten zeigen, dass sich die veränderte Expression von Tenascin C und α -Smooth Muscle Actin in hypertrophen Narben wieder normalisieren lässt, wenn man diese mit Druck behandelt. Es stellt sich somit die Frage, ob sich diese Regeneration der EZM durch Kompression auf die pathologischen Veränderungen bei der CVI übertragen lässt. Sollte dies zutreffen, ist weiterhin von Interesse, ob es einen Unterschied macht, welche Kompressionsklasse verwendet wird und ob eine Therapiedauer von zwei oder vier Wochen ausreichend ist um einen Effekt zu erzielen.

1.7.1 Fragestellung

Zusammenfassend ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Unterscheiden sich die klinischen Stadien der CVI (CEAP Klassifikation) C0, C2, C4 und C6 hinsichtlich ihrer Expression der extrazellulären Proteine Tenascin C, Fibrillin 2 und α -Smooth Muscle Actin in der Haut?
- Wird die Expression der Proteine Tenascin C, Fibrillin 2 und α -Smooth Muscle Actin in Hautorganen im Stadium C2 und C4 der CVI Klassifikation durch Kompressionstherapie beeinflusst?
 - Ist die Kompressionsklasse relevant für die Veränderung der Expression?
 - Hat die Behandlungsdauer einen Einfluss auf die Veränderung der Expression?
 - Kommt es unter der Kompressionstherapie zu einer Abnahme des Beinvolumens, gemessen mit Image 3D?
 - Kommt es unter der Kompressionstherapie zu einer subjektiven Verbesserung der Beschwerden?

2. Kapitel: Material und Methoden

2.1 Untersuchung: Expression der EZM Proteine in den klinischen Stadien C0, C2, C4, C6

Alle Patienten, die in diese Studie eingeschlossen wurden, waren Patienten der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie, UKSH Campus Lübeck. Dort wurden im Rahmen der phlebologischen Sprechstunde alle Patienten einer detaillierten Anamnese und klinischen und apparativen Diagnostik der unteren Extremität unterzogen. Nach ausführlicher phlebologischer Abklärung mittels Duplex-Sonographie wurden die Patienten in klinische Stadien der CEAP Klassifikation eingeteilt und für die Studie ausgewählt. Alle Patienten wurden über den Ablauf der Studie und mögliche gesundheitliche Schädigungen aufgeklärt. Die Patienten im Stadium C0 und C6 gaben ihr schriftliches Einverständnis, dass die anlässlich einer anderen Behandlung entnommene Haut für wissenschaftliche Zwecke untersucht werden dürfe. Die Patienten im Stadium C2 und C4 gaben ihr schriftliches Einverständnis, dass ihnen drei Hautproben am Unterschenkel entnommen werden dürfen. Die Genehmigung durch die Ethikkommission wurde im Vorfeld eingeholt (Antragsnummer: 08-014).

Zur Beantwortung der Frage, ab welchem Stadium es zu einer vermehrten Expression der untersuchten Proteine kommt, wurde die Unterschenkelhaut im Bereich des Malleolus medialis von Patienten mit einer CVI im klinischen Stadium C0, C2, C4 und C6 zu Grunde gelegt.

Tabelle 5: Patientenkollektiv

Stadium	Anzahl der Patienten	verwendete Hautprobe	Durchschnittsalter
C0	4	Reste entnommener Unterschenkelhaut bei Nävusexzision	60
C2	12	3 PEs vom Unterschenkel, an Tag 1, 14, 28	62
C4	12	3 PEs vom Unterschenkel, an Tag 1, 14, 28	59
C6	5	Reste entnommener Unterschenkelhaut bei einer Shave-OP	80

Von vier Patienten, drei Frauen und einem Mann, mit einer CVI im klinischen Stadium C0, wurde die Unterschenkelhaut untersucht. Das Durchschnittsalter der Probanden lag bei 60 Jahren. Diese Personen wiesen keinerlei Zeichen einer Venenerkrankung auf. Bei den verwendeten Hautproben handelte es sich um Hautspindeln, die bei Routineeingriffen, zum Beispiel einer Nävusexzision, am Unterschenkel vor Defektverschluss entnommen wurden und ansonsten verworfen worden wären. Es wurde der gesunde Randbereich der entnommenen Hautspindel untersucht.

Im klinischen Stadium C2 wurde bei 12 Patienten jeweils an einem Bein Unterschenkelhaut entnommen. Es handelte sich um neun Frauen und drei Männer, mit einem Durchschnittsalter von 62 Jahren. Die Patienten wiesen alle sonographisch nachgewiesene Varizen, größer als 5mm, auf. Bei diesen Patienten wurde eine 3mm Stanzbiopsie aus der Haut oberhalb des Malleolus medialis entnommen.

Weiterhin wurden elf Patienten mit einer CVI im klinischen Stadium C4 untersucht, fünf Frauen und sechs Männer, deren Durchschnittsalter bei 59 Jahren lag. Bei einem Patienten wurde aus beiden Beinen eine Hautprobe entnommen. Bei sieben Patienten stand die Hyperpigmentierung im Vordergrund, wobei zwei der Patienten schon geringe Zeichen einer beginnenden Sklerose zeigten. Bei zwei Patienten lag klinisch ein Stauungsekzem vor. Somit wurden neun Patienten dem klinischen Stadium C4a zugeordnet. Bei drei Patienten bestimmte die Dermatoliposklerose das klinische Erscheinungsbild, es handelte sich also um das Stadium C4b. Auch hier wurde eine 3mm Stanzbiopsie aus der Haut oberhalb des Malleolus medialis entnommen.

Im klinischen Stadium C6 wurde von fünf Patienten Hautreste verwendet, die im Rahmen einer Ulkusoperation, zum Beispiel einer Shave-OP, angefallen waren. Es handelt sich hierbei um ein Mann und vier Frauen, mit einem Durchschnittsalter von 80 Jahren.

2.1.1 APAAP- Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten mit Hilfe der APAAP-Methode. Hierbei handelt es sich um eine Enzym-anti-Enzymtechnik. Die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode (APAAP) ermöglicht einen indirekten Nachweis der Bindung eines Primärantikörpers. Es werden lösliche „Enzym-Immunkomplexe“ als Tertiär-Reagenz verwendet. Hierbei handelt es sich um vorgefertigte Komplexe aus Enzymmolekülen und Antikörpern gegen dieselben Enzyme. Diese Enzym-Immunkomplexe binden an unmarkierte Sekundärantikörper, wodurch es durch Erhöhung der Zahl an Enzymmolekülen pro gebundenem Antikörper zu einer Signalverstärkung kommt. Man benötigt für diese Färbereaktion also drei Antikörper. Der erste, primäre Antikörper ist gegen das nachzuweisende Antigen, hier zum Beispiel Tenascin C, gerichtet. Der sekundäre Antikörper, ein Brückenantikörper, bindet an den primären Antikörper, im Beispiel an den Anti Tenascin C Antikörper, und wird vom tertiären Antikörper, dem monoklonalen Maus-anti-alkalische-Phosphatase-Antikörper, gebunden. Dieser dritte Antikörper bindet anschließend die hinzu gegebene alkalische Phosphatase des APAAP Komplexes. Nach der Bindung des letzten Antikörpers gibt man Naphthol-AS-Biphosphat und anschließend Neufuchsin hinzu, wodurch ein roter Niederschlag produziert wird.

Zur Überprüfung der Färbung wurde je eine Positiv- und Negativkontrolle mitgefärbt.

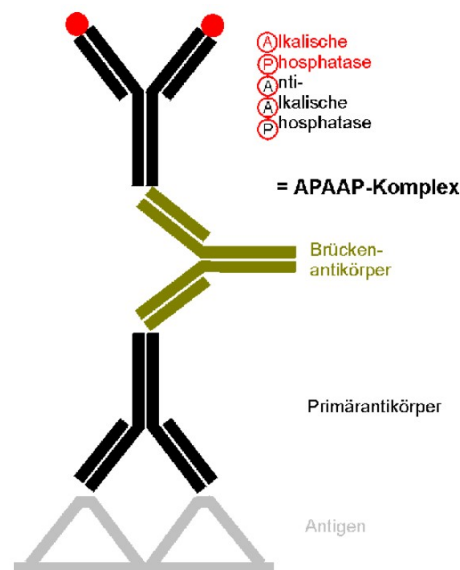


Abbildung 5: Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP) Methode (Herbst & Hübner, 1998-2003)

2.1.1.1 Protokoll der Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach dem folgenden Protokoll durchgeführt. Die einzelnen Schritte sind stichwortartig aufgelistet.

1. Schnitte entparaffinieren in Xylol für 20min und dann in der absteigenden Alkoholreihe waschen
2. Spülen in PBS (phosphate buffered saline)
3. **Tenascin C:** Andauen mit Protease 1mg/ml, Verdünnung 1:10 mit PBS für 15min bei 37°C (Protease, gelöst in 10mmol Na-Acetat und 5mmol Ka-Acetat, pH=7,5 bei 25°C)

Fibrillin 2: Andauen mit Elastase 1mg/ml, Verdünnung 1:2 mit PBS für 45min bei Raumtemperatur (0,2 – 0,5 Units Elastase, gelöst in kaltem 100mmol Tris-HCL-Puffer, pH=8,0 bei 25°C)

4. Spülen mit PBS
5. Primärer Antikörper

Tenascin C: Verdünnung 1:100, gelöst in 10% FKS (fetales Kälber Serum) für 1h

Fibrillin 2: Verdünnung 1:500, gelöst in 10% FKS für 1h

α -Smooth Muscle Actin: Verdünnung 1:200, gelöst in PBS für 30min

6. Spülen mit PBS
7. **Fibrillin 2:** Brückenantikörper (Mouse-anti-rabbit), Verdünnung 1:50 in PBS für 30min
8. Sekundär-Antikörper (Rabbit-anti-mouse Immunglobulin), Verdünnung 1:20 in Dako ChemMate, Antibody Diluent für 30min
9. Spülen mit PBS
10. APAAP Komplex, Verdünnung 1:50 in PBS für 30min
11. Spülen mit PBS
12. Wiederholung des Sekundär-Antikörper Schrittes, Verdünnung 1:20 in Dako ChemMate, Antibody Diluent für 10min
13. Spülen mit PBS
14. Wiederholung des APAAP Komplex Schrittes, Verdünnung 1:50 in PBS für 10min
15. Spülen mit PBS
16. Farbansatz:
 - Lösung 1: 4,35g NaCl
0,75g Tris-HCl
2,45g Tris-Base
in 87,5ml Aqua
+31,25ml Propandiol (21g Propandiol in 1l Aqua lösen, 4°C)
+50mg Levamisole
 - Lösung 2: 25mg Na-Nitrit in 625 μ l Aqua
 - Lösung 3: 62,5mg Naphthol-AS-Biphosphat in 750 μ l Dimethylformamid

17. In Lösung 2 250µl Neufuchsin geben und 1min reagieren lassen. In Lösung 1 erst Lösung 2 geben, dann Lösung 3 dazu und pH auf 8,8 einstellen.
18. Farblösung filtrieren und die Schnitte 5 – 10min unter Schütteln inkubieren, anschließende Mikroskopierkontrolle
19. Spülen in Leitungswasser
20. Gegenfärbung mit Hämatoxylin
21. Spülen in Leitungswasser
22. Eindeckeln mit Glyceringelatine

2.1.1.2 *Verwendete Antikörper*

Antikörper	Firma	Verdünnung
Monoclonal mouse Anti Tenascin C	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland, clone DB7 Produktnummer: TG6044-0100	1:200
Polyclonal rabbit Anti Fibrillin 2	Prof. Dieter Reinhardt, Mc Gill University, Montreal Kanada	1:500
Monoclonal mouse Anti Human Actin (Smooth Muscle)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland, clone 1A4 Produktnummer: M085101-2	1:100

2.1.2 **Auswertung**

Die Auswertung der Färbungen erfolgte deskriptiv am Mikroskop, Axioplan 2, Fa. Zeiss. Zuerst wurden die Proben aus gesunder Haut begutachtet, wobei speziell der Bereich der dermo-epidermalen Junctionzone und der perikapilläre Bereich betrachtet wurden. Anschließend erfolgte die Beurteilung der Färbungen der Gruppen C2, C4 und C6 in analoger Weise, wobei hier zusätzlich verstärkt die papilläre Dermis begutachtet wurde.

Die Schnitte wurden mit der AxioCam Kamera der Firma Zeiss und dem Programm Axiovision, Software Vision 4.6 fotodokumentiert.

2.2 Untersuchung: Einfluss der Kompressionstherapie auf die Expression der EZM Proteine

Für die Untersuchung, ob die Kompression einen Einfluss auf die Expression der zuvor gemessenen Proteine hat, wurden Patienten mit einer Erkrankung des Venensystems im Stadium C2 und C4 der CEAP Klassifikation untersucht. Bei den Patienten im Stadium C0 handelt es sich um venengesunde Patienten, die keiner Kompressionstherapie bedurften. Die Patienten im Stadium C6 erhielten bereits alle eine konsequente Kompressionsbehandlung. Daher wurden Patienten, die diese Stadien aufwiesen, nicht in die Untersuchung mit eingeschlossen. Die Probanden wurden wie in Kapitel 2.1 beschrieben, im Rahmen der phlebologischen Sprechstunde der Poliklinik der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie, UKSH Campus Lübeck rekrutiert und ausführlich aufgeklärt.

Der Einfluss der Kompression wurde bei 23 Patienten untersucht. Bei einem Probanden wurden beide Beine in die Studie eingeschlossen, bei allen anderen nur ein Bein, so dass insgesamt die Haut von 24 Unterschenkeln untersucht wurde. Es handelte sich um 15 weibliche und acht männliche Probanden, das Durchschnittsalter lag bei 61 Jahren, der jüngste Patient war 38 Jahre, der älteste 74 Jahre alt. In 14 Fällen wurde das rechte Bein in die Studie eingeschlossen, in zehn Fällen das linke. Ein Patient brach die Studie nach der ersten Probeentnahme ab, da er die medizinischen Kompressionstrümpfe nicht tragen konnte.

Die Patienten im Stadium C2 wiesen alle sonographisch nachgewiesene Varizen, größer als 5mm, auf (Abbildung 6). Bei den Patienten im Stadium C4 stand bei sieben Patienten die Hyperpigmentierung im Vordergrund, wobei zwei der Patienten schon geringe Zeichen einer beginnenden Sklerose zeigten. Bei zwei Patienten lag klinisch ein Stauungsekzem vor, bei drei Patienten eine Dermatoliposklerose (Abbildung 7). Es handelte sich hier um neun Patienten im klinischen Stadium C4a und um drei Patienten im klinischen Stadium C4b.



Abbildung 6: Stadium C2, sichtbare Varizen



Abbildung 7: Stadium C4b, Dermatoliposklerose

2.2.1 Ablauf der Untersuchung zum Einfluss der Kompression

Die insgesamt 23 Probanden wurden per Los in drei Untergruppen (A, B, C) eingeteilt. Jede Untergruppe bestand aus acht Patienten, je vier Patienten im Stadium C2 und im Stadium C4. Die einzelnen Untergruppen unterschieden sich in der Kompressionsklasse der getragenen Strümpfe bzw. in der Dauer der

Anwendungszeit der Kompressionsstrümpfe. Die Patienten wurden aufgefordert den MKS mindestens acht Stunden am Tag zu tragen.

Patienten der Untergruppe A erhielten ihre MKS der Marke VenoTrain® micro, Kompressionsklasse II, im Anschluss an die zweite Probenentnahme, für **zwei** Wochen.

Patienten der Untergruppe B erhielten ihre MKS der Marke VenoTrain® micro, Kompressionsklasse II, im Anschluss an die erste Probenentnahme, für **vier** Wochen.

Patienten der Untergruppe C erhielten ihre MKS VenoTrain® delight, Kompressionsklasse III, ebenfalls im Anschluss an die erste Probenentnahme, für **vier** Wochen.

Der genaue Ablauf ist in den Tabellen 6 – 8 noch einmal zusammengefasst ersichtlich.

Tabelle 6: Untersuchungsablauf der Gruppe A

	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4
Tag	0	1	14	28
Screening	x			
Studieneinschluss	x			
PE		x	x	x
Anpassen der MKS	x			
MKS VenoTrain® micro			x	x
Image 3D Messung	x		x	x

Tabelle 7: Untersuchungsablauf der Gruppe B

	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4
Tag	0	1	14	28
Screening	x			
Studieneinschluss	x			
PE		x	x	x
Anpassen der MKS	x			
MKS VenoTrain® micro		x	x	x
Image 3D Messung	x		x	x

Tabelle 8: Untersuchungsablauf der Gruppe C

	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4
Tag	0	1	14	28
Screening	x			
Studieneinschluss	x			
PE		x	x	x
Anpassen der MKS	x			
MKS VenoTrain® delight		x	x	x
Image 3D Messung	x		x	x

2.2.2 Entnahme der Hautproben

Bei allen Patienten wurden drei Hautbiopsien mittels einer 3mm durchmessenden Stanze entnommen, jeweils an Tag 1, Tag 14 und Tag 28. Die Probenentnahme erfolgte am Malleolus medialis, im Bereich des B-Maßes (Fesselbereich), in einem 1x1cm großen Areal. Die Bestimmung der einzelnen Entnahmepunkte erfolgte mittels einer selbst erstellten Schablone aus Varihesive® „extra dünn“ (Abbildung 8). So wurde gewährleistet, dass die Abstände der einzelnen Entnahmestellen in einem möglichst engen Bereich lagen und bei allen Patienten gleich waren.

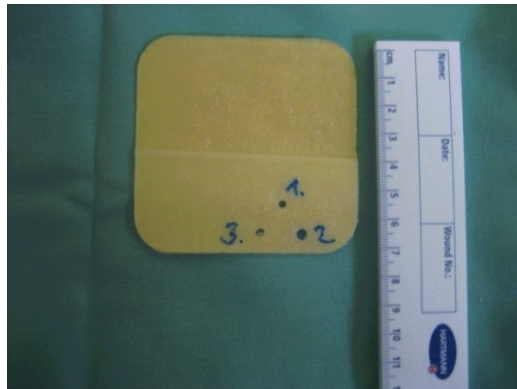


Abbildung 8: Die für die Probenentnahme verwendete Schablone aus Varihesive®

Die Probenentnahmen fanden unter sterilen Bedingungen im Operationssaal der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie, UKSH Campus Lübeck statt. Das betroffene Hautareal wurde mit 1ml Xylonest® 1% mit Adrenalin lokal betäubt, anschließend wurde eine 3mm Stanzbiopsie entnommen. Die Versorgung der Wunde wurde mit einem lokalen Antiseptikum und einem Druckverband durchgeführt, dieser wurde am nächsten Tag durch den Patienten selbst entfernt.



Abbildung 9: Stadium C2, vor der dritten Hautbiopsie; zu erkennen sind die Stellen, der zuvor entnommenen Stenzen

Die immunhistochemische Auswertung erfolgte wie oben beschrieben. Es wurde ein deskriptiver Vergleich der drei entnommenen Hautproben durchgeführt, um einen Unterschied in der Expression beschreiben zu können.

2.2.3 Kompressionstherapie

In der Studie wurden die Strümpfe VenoTrain® micro und VenoTrain® delight der Firma Bauerfeind AG, Zeulenroda-Triebes, als Oberschenkelstrumpf (AG) verwendet. In zwei Ausnahmen wurde eine Kompressionsstrumpfhose (AT) angefertigt.

Der VenoTrain® micro Strumpf besteht aus einem weichen Gestrick mit hohem Microfaseranteil (50%). Hierbei handelt es sich um einen MKS der KKL II, bestehend aus 55% Polyamid und 45% Elasthan.

Der VenoTrain® delight Strumpf ist ein flachgestrickter MKS der KKL III, bestehend aus 79% Polyamid und 21% Elasthan.

2.2.4 Volumenmessung mittels Image 3D

Die computerunterstützte exakte Anpassung der Kompressionsstrümpfe wurde im Sanitätshaus Goldmann und Becker, Kronsfordter Allee 25, Lübeck, mit dem Programm Image 3D der Firma Bauerfeind AG, Zeulenroda-Triebes durchgeführt. Die Vermessung der Beine vollzog sich folgendermaßen: nach dem Anziehen genormter Messstrümpfe wurden die Beine der Patienten, die auf einem drehbaren Messplateau standen, von allen Seiten fotografiert. Aus den so ermittelten Daten wurde per Software ein 3D Modell der Beine erstellt. Anhand dieses Modells wurde der passende Strumpf ausgewählt und online bei der Firma Bauerfeind geordert. Der fertige MKS wurde direkt an die Hautklinik der Universität zu Lübeck geschickt und den Probanden an den entsprechenden Terminen ausgehändigt.

Mit dem Image 3D System wurde das Beinvolumen der Patienten jedes Mal vor der Probenentnahme gemessen, um den Volumen verringernden Effekt der Kompressionsstrümpfe nachzuweisen. Es wird eine Verminderung des Beinvolumens, die am Unterschenkel ausgeprägter als am Oberschenkel ist, erwartet. Die Veränderung bei den Patienten, die mit VenoTrain® delight behandelt werden, sollte ausgeprägter sein, als bei denen, die VenoTrain® micro tragen. Die Patienten, die für vier Wochen mit MKS therapiert werden,

sollen eine deutlichere Volumenabnahme zeigen, als die Patienten, die sich für zwei Wochen in Therapie befinden.

2.2.5 Befragung der Patienten

Um die subjektive Bewertung der Kompressionstherapie einschätzen zu können, wurde circa ein Jahr nach Ablauf der Studie eine telefonische Befragung der Probanden durchgeführt. Folgende Fragen wurden gestellt:

1. Werden weiterhin Kompressionsstrümpfe getragen?
2. Liegen Schmerzen in den Beinen vor?
3. Liegt ein Schweregefühl in den Beinen vor?
4. Wird die Lebensqualität durch das Tragen der MKS verbessert?

Zur Beurteilung der Schmerzen und des Schweregefühls wurde eine Skala von 1-10 verwendet. Die Patienten mussten angeben, wie groß der Schmerz bzw. das Schweregefühl in den Beinen ohne Strümpfe ist und wie sehr sich der Schmerz und das Schweregefühl durch das Tragen der Kompressionsstrümpfe verändert.

Bei der Beantwortung der vierten Frage konnten die Probanden zwischen den Antwortmöglichkeiten „gar nicht - leicht – ziemlich – stark – sehr stark“ wählen.

Es wurden 19 der 23 beteiligten Patienten befragt. Drei der Patienten konnten telefonisch nicht erreicht werden, ein Patient fiel auf Grund des Studienabbruchs aus der Befragung heraus.

3. Kapitel: Ergebnisse

3.1 Expression der EZM Proteine im Stadium C0, C2, C4 und C6

3.1.1 Tenascin C

In der Haut von venengesunden Patienten (C0) zeigte sich eine bandförmige, diskontinuierliche Expression unterhalb der Basalmembran und eine geringe Expression in den Gefäßwänden, in Nervenfasern und im Bereich von Hautanhangsorganen.

Im Stadium C2 nach der CEAP Klassifikation zeigte sich in der Mehrzahl der Fälle ein diskontinuierlich angefärbter Streifen im Bereich der dermo-epidermalen Junctionzone von unterschiedlich starker Ausprägung. In einigen Fällen war auch die gesamte Basalmembran kontinuierlich angefärbt, wie man in Abbildung 10 sehen kann. In der Gefäßwand der dermalen Gefäße und entlang der Hautanhangsorgane zeigte sich ein Expressionsmuster wie in normaler Haut. Nur in einer Probe ließ sich ein kleines perivaskuläres Areal in der papillären Dermis anfärben (Abbildung 12).

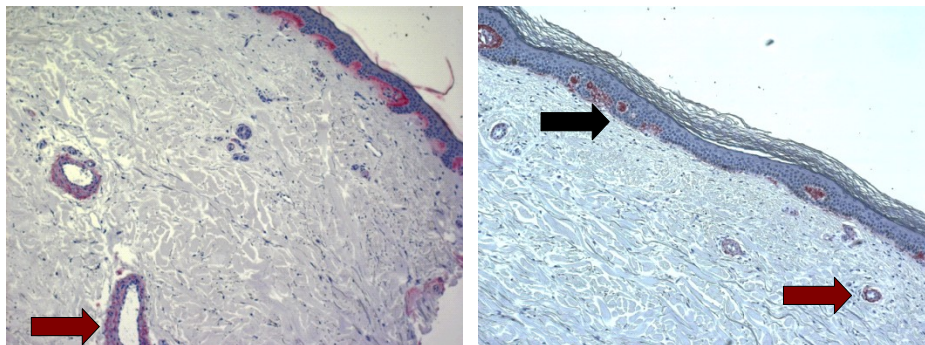


Abbildung 10: Tenascin C Expression im Stadium C2, 10 fache Vergrößerung

Links erkennt man eine kontinuierliche bandförmige Expression im Stratum Papillare unterhalb der Basalmembran. ➡

Rechts ist eine diskontinuierliche Expression sichtbar, ➡ weiterhin sind in beiden Hautproben die Gefäßwände gefärbt. ➡

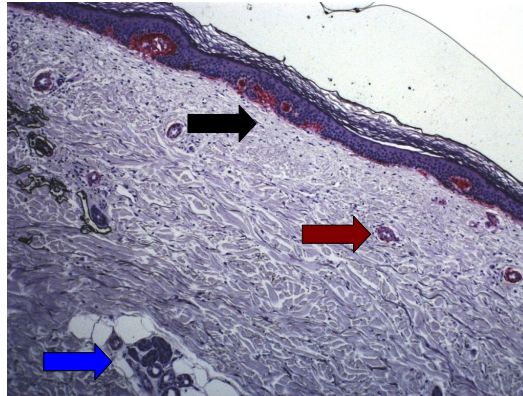


Abbildung 11: Tenascin C Expression im Stadium C4, 10 fache Vergrößerung

Man erkennt einen diskontinuierlichen Streifen unterhalb der Basalmembran → und eine Expression in der Gefäßwand → und in den Schweißdrüsen. →

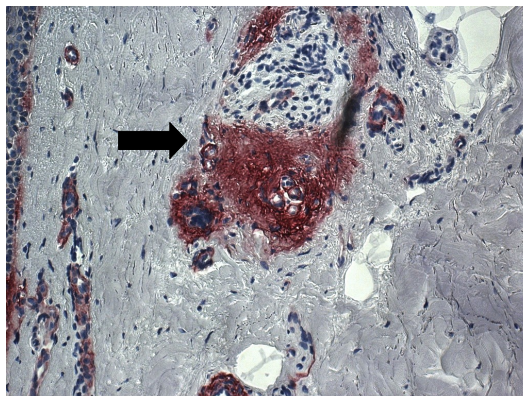


Abbildung 12: Tenascin C Expression im Stadium C2, 20 fache Vergrößerung

Man erkennt perivaskulär eine verstärkte Anfärbung. →

Im Stadium C4 der CEAP Klassifikation zeigte sich ein inhomogenes Bild. In der Hälfte der Proben zeigte sich ein Expressionsmuster ähnlich dem in Stadium C2, wie in Abbildung 11 sichtbar, zum Teil war der Streifen entlang der Basalmembran verglichen mit dem Bild im Stadium C2, verbreitert (Abbildung 13). Zusätzlich zeigte sich in fünf Gewebeschnitten eine verstärkte perivaskuläre Färbung in der papillären Dermis (Abbildung 13 und 14). Bei fünf Patienten konnte eine vermehrte Expression in der papillären Dermis und der

retikulären Dermis nachgewiesen werden. Die Dermis präsentierte sich bei drei dieser Patienten inhomogen angefärbt. Einerseits zeigte sich eine vermehrte Expression in der papillären Dermis als breiter Streifen unterhalb der Basalmembran und andererseits fand sich eine fibrilläre Expression in der tiefen Dermis. Bei zwei Patienten konnte eine stark vermehrte homogene Expression in der gesamten Dermis nachgewiesen werden (Abbildung 15).

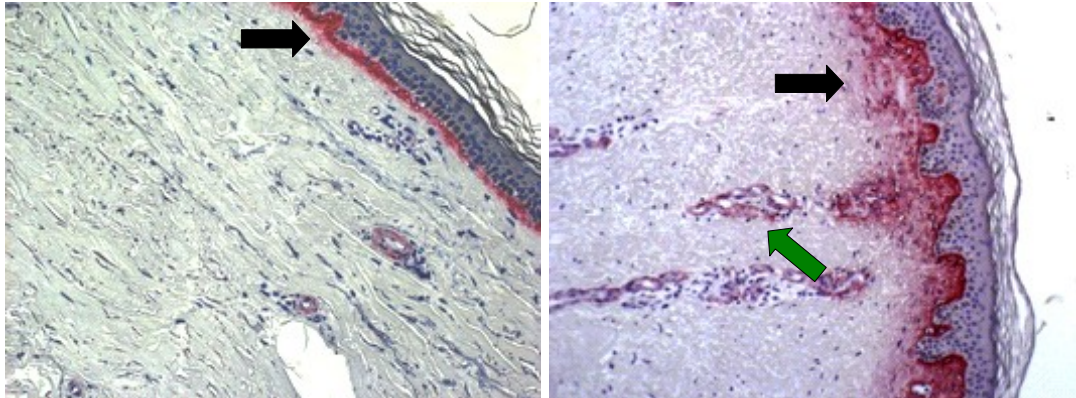


Abbildung 13: Tenascin C Expression, 10 fache Vergrößerung

Links Stadium C2, man erkennt einen dünnen Streifen unterhalb der Basalmembran ➡ und eine Anfärbung der Gefäßwand.

Rechts Stadium C4, man erkennt einen verbreiterten Streifen unterhalb der Basalmembran ➡ und eine stärkere perivaskuläre Anfärbung als im Stadium C2. ➡

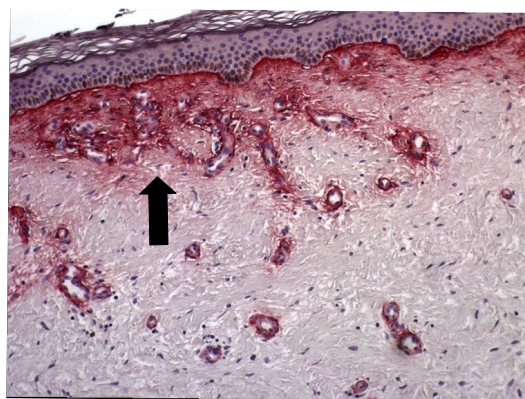
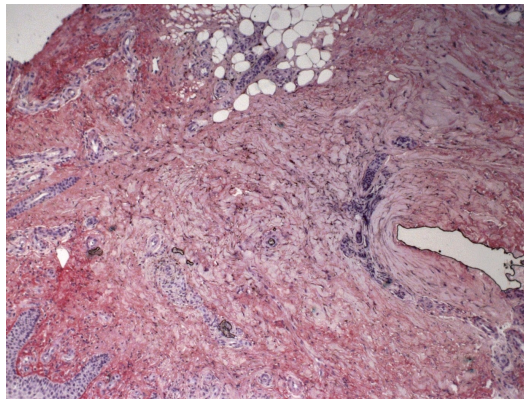


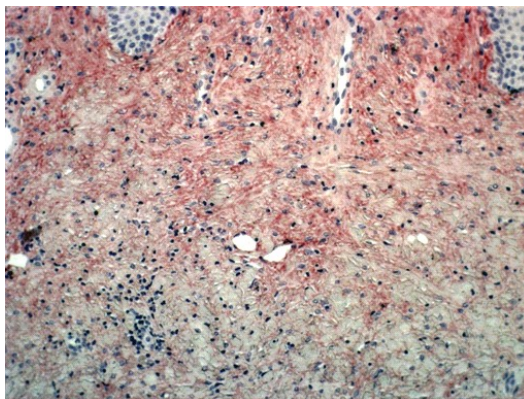
Abbildung 14: Tenascin C Expression im Stadium C4, 20 fache Vergrößerung

Man erkennt perikapillär und in der papillären Dermis eine vermehrte Expression. ➡



*Abbildung 15: Tenascin C Expression im Stadium C4, 10 fache Vergrößerung
Man erkennt eine vermehrte Expression in der gesamten Dermis.*

Im Stadium C6 zeigte sich in allen Hautproben ein verstärktes fibrilläres Expressionsmuster, das in den meisten Fällen die gesamte Dermis homogen durchzog und bis in die Subkutis reichte (Abbildung 16). Die dermo-epidermale Junctionzone war weiterhin kontinuierlich angefärbt ebenso wie die Gefäßwände und die Hautanhangsorgane.



*Abbildung 16: Tenascin C Expression im Stadium C6, 10 fache Vergrößerung
Man erkennt eine verstärkte Expression in der gesamten Dermis.*

3.1.2 Fibrillin 2

Für Fibrillin 2 zeigte sich in normaler Haut im Bereich der dermo-epidermalen Junctionzone ein schmaler diskontinuierlicher Streifen. In der Gefäßwand und entlang der Hautanhangsorgane war eine geringe Expression nachweisbar.

Ein vergleichbares Bild zeigte sich in den Hautproben der Patienten im Stadium C2, siehe Abbildungen 17 und 18. Hier war in der überwiegenden Anzahl der Fälle ein kontinuierlicher Saum entlang der Basalmembran sichtbar. Weiterhin war eine Fibrillin 2 Expression in der Gefäßwand der dermalen Gefäße und entlang der Hautanhangsorgane nachweisbar (Abbildung 17). In einer Hautprobe zeigte sich an einer Stelle eine vermehrte perivaskuläre Anfärbung in der papillären Dermis, wie man in Abbildung 19 erkennen kann.

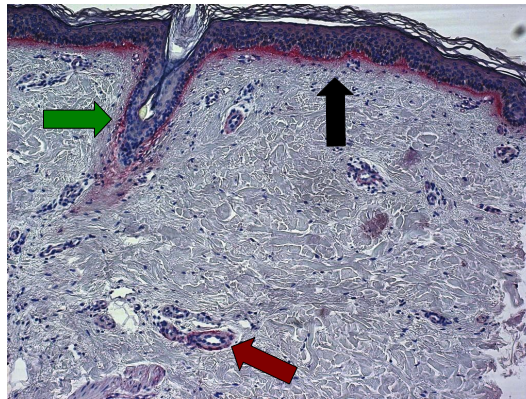


Abbildung 17: Fibrillin 2 Expression im Stadium C2, 10 fache Vergrößerung

Man erkennt die Expression in der Gefäßwand  und den Haarfollikeln  und eine bandförmige Expression entlang der Basalmembran. 

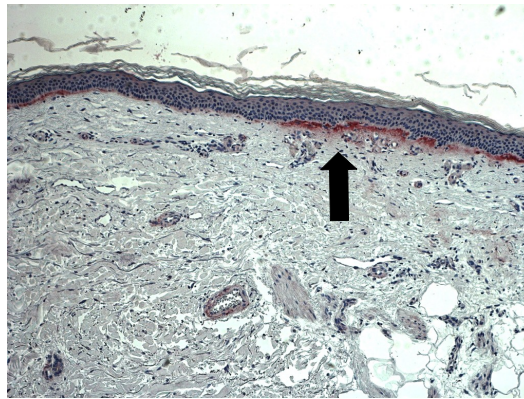


Abbildung 18: Fibrillin 2 Expression im Stadium C2, 10 fache Vergrößerung

Man erkennt eine diskontinuierliche Anfärbung unterhalb der Basalmembran.

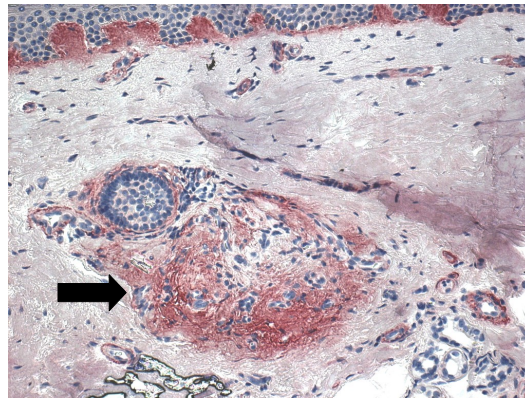


Abbildung 19: Fibrillin 2 Expression im Stadium C2, 20 fache Vergrößerung

Man erkennt eine verstärkte perivaskuläre Anfärbung.



Im Stadium C4 zeigte sich ein heterogenes Muster. In einigen Proben lag ein Expressionsmuster wie im Stadium C2 vor, wie Abbildung 20 verdeutlicht. Bei drei Patienten zeigte sich in der papillären Dermis perivaskulär eine verstärkte Expression von Fibrillin 2. In den Papillen fanden sich viele Gefäßkonvolute, in deren Umgebung die Färbung intensiver erschien. Diese perivaskuläre Anfärbung verschmolz meistens mit dem, im Vergleich zur Anfärbung im Stadium C2, verbreitert angefärbten Streifen entlang der dermo-epidermalen Junctionzone, wie Abbildung 21 und 22 verdeutlichen. Bei fünf Patienten konnte eine Fibrillin 2 Expression in der tiefen Dermis nachgewiesen werden, was man in Abbildung 23 erkennen kann. Jedoch nur bei zwei dieser Patienten war die

gesamte Dermis homogen angefärbt. Bei den anderen zeigten sich zwei unabhängig voneinander angefärbte Areale, einerseits die Expression in der papillären Dermis, vor allem perivaskulär, und andererseits die beginnende Expression in der retikulären Dermis.

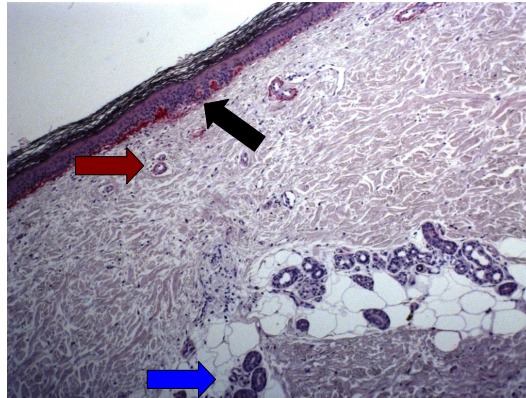


Abbildung 20: Fibrillin 2 Expression im Stadium C4, 10 fache Vergrößerung

Man erkennt einen schmalen diskontinuierlichen Streifen entlang der Basalmembran,  in der Gefäßwand  und in Schweißdrüsen.  Die Expression ist ähnlich der in Stadium C2, siehe Abbildung 18.

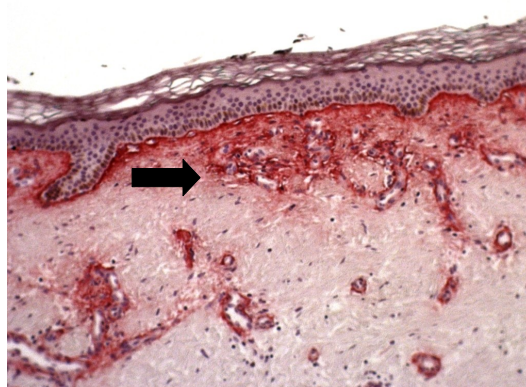


Abbildung 21: Fibrillin 2 Expression im Stadium C4, 20 fache Vergrößerung

Man erkennt in der papillären Dermis und perivaskulär eine vermehrte Expression. 

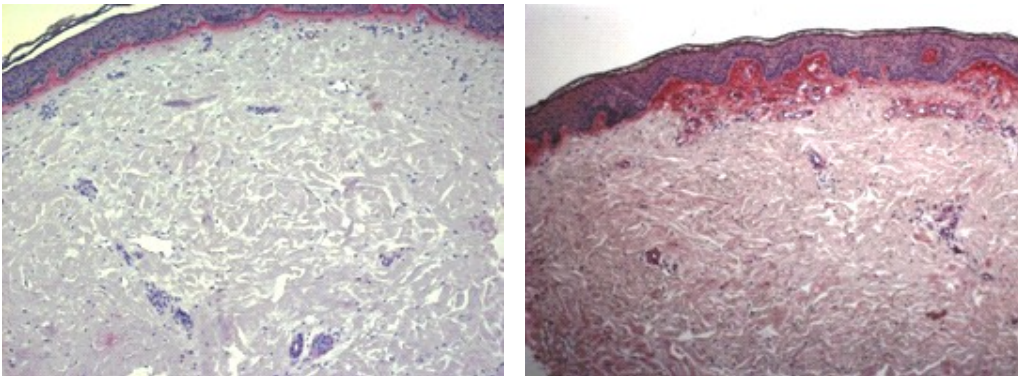


Abbildung 22: Fibrillin 2 Expression, 10 fache Vergrößerung

Links Stadium C2, man erkennt eine kontinuierliche Anfärbung unterhalb der Basalmembran.

Rechts Stadium C4, man erkennt eine verbreiterte Anfärbung unterhalb der Basalmembran, vor allem im Bereich der papillären Gefäße

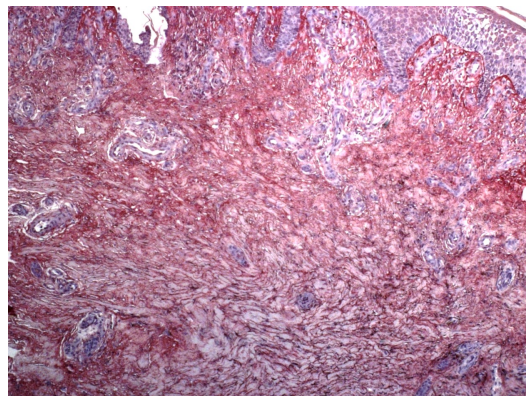
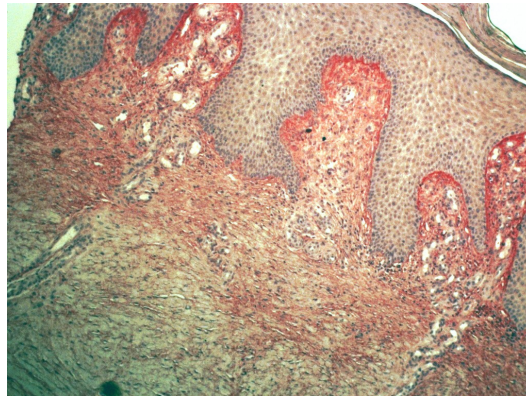


Abbildung 23: Fibrillin 2 Expression im Stadium C4, 10 fache Vergrößerung

Man erkennt ein intensives Signal in der gesamten Dermis.

Bei den Gewebeschnitten aus dem Randbereich des Ulcus cruris venosum (Stadium C6) war für alle fünf Patienten ein fibrilläres relativ homogenes Muster für Fibrillin 2 in der gesamten Dermis nachweisbar, das bis in die Subkutis reichte (Abbildung 24). In zwei Fällen war die Dermis nicht kontinuierlich angefärbt, es war ein stark verbreiteter Saum, vor allem perivaskulär, in der papillären Dermis erkennbar und unabhängig davon ein vermehrt angefärbtes

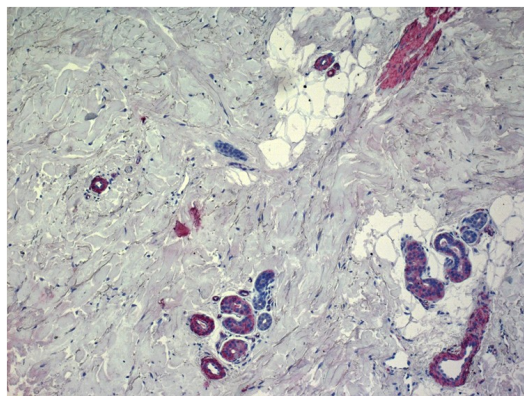
Areal in der retikulären Dermis. Weiterhin zeigten sich die dermo-epidermale Junctionzone, die Gefäßwände und Hautanhangsorgane angefärbt.



*Abbildung 24: Fibrillin 2 Expression im Stadium C6, 10 fache Vergrößerung
Man erkennt deutlich eine verstärkte Expression in der gesamten Dermis.*

3.1.3 α -Smooth Muscle Actin

Ein Nachweis von α -Smooth Muscle Actin war in normaler Haut und in allen Stadien der CVI in den Myofibroblasten der dermalen Gefäße nachweisbar. Die glatten Muskelzellen der Gefäßwände zeigten ein intensives Signal in der gesamten Dermis und Subkutis.



*Abbildung 25: α -Smooth Muscle Actin im Stadium C2, 20 fache Vergrößerung
Man erkennt eine Expression in der Gefäßwand.*

Im Stadium C2 ließen sich die Myofibroblasten in der Gefäßwand als schmaler Saum anfärben, (Abbildung 25). Außerhalb der Gefäße und Drüsen war kein Signal erkennbar und somit waren keine Myofibroblasten vermehrt vorhanden.

Im Stadium C4 zeigte sich das Signal in der Gefäßwand geringgradig intensiver, in Abbildung 26 gut zu erkennen. Jedoch fand sich auch in diesem Stadium kein vermehrtes Vorkommen von Myofibroblasten in der Dermis.

In einigen Gewebeschnitten, die sich für Tenascin und Fibrillin verstärkt anfärben ließen, konnten viele Gefäße, insbesondere in der papillären Dermis unterhalb der Basalmembran, dargestellt werden, jedoch zeigte sich kein erhöhtes Vorhandensein von Myofibroblasten (Abbildung 26).

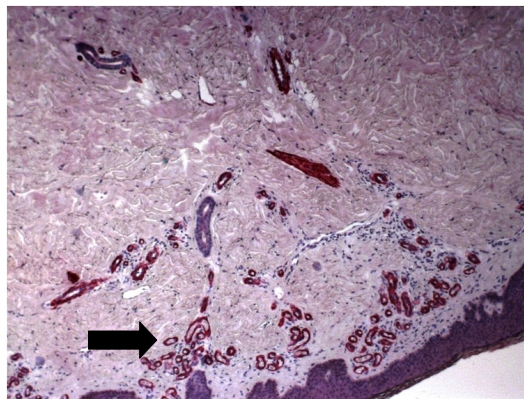


Abbildung 26: α -Smooth Muscle Actin Expression im Stadium C4, 10 fache Vergrößerung

Man erkennt eine deutliche Anfärbung der Gefäßwände und eine große Anzahl von Gefäßen und Gefäßkonvoluten in der papillären Dermis. ➡

In den Hautproben von Patienten mit einem Ulcus cruris venosum konnten vermehrt Myofibroblasten in der tiefen Dermis nachgewiesen werden. Das Ausmaß der Myofibroblasten variierte jedoch erheblich, in drei Fällen fanden sich die Zellen nur ganz vereinzelt, in zwei Proben waren sie ubiquitär in der Tiefe vorhanden, wie in Abbildung 27 dargestellt.

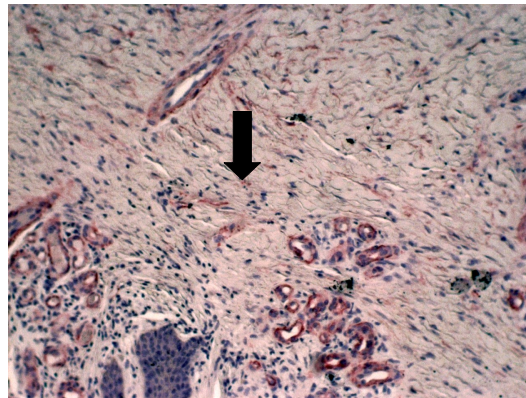


Abbildung 27: α -Smooth Muscle Actin Expression im Stadium C6, 10 fache Vergrößerung

Man erkennt deutlich die vielen Myofibroblasten in der gesamten Dermis. ➡

3.2 Einfluss der Kompressionstherapie auf die Expression der EZM Proteine in den Stadien C2 und C4

3.2.1 Einfluss der Kompressionstherapie auf Tenascin C

Bei der Auswertung der drei Hautproben eines Patienten im Stadium C2, entnommen an Tag 1, 14 und 28 fanden sich kaum Unterschiede in der Expression. In allen drei Biopsien zeigte sich ein Bild wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben. Unterschiede ließen sich lediglich in der Kontinuität des angefärbten Streifens unterhalb der Basalmembran aufzeigen, wie man in Abbildung 10 erkennen kann. In der Abbildung 28 ist für die drei Untergruppen A, B und C graphisch dargestellt, wie viele der vier Hautproben ein diskontinuierliches Muster zeigten und wie viele ein kontinuierliches. Betrachtet man die drei Untergruppen A, B und C, so ließen sich durch die Behandlung mit verschiedenen KKL oder verschiedener Dauer keine Expressionsunterschiede feststellen. Die Gruppe A erhielt zwei Wochen eine Kompressionstherapie mit KKL II, die Gruppe B erhielt vier Wochen eine Kompressionstherapie mit KKL II, die Gruppe C erhielt vier Wochen eine Kompressionstherapie mit KKL III.

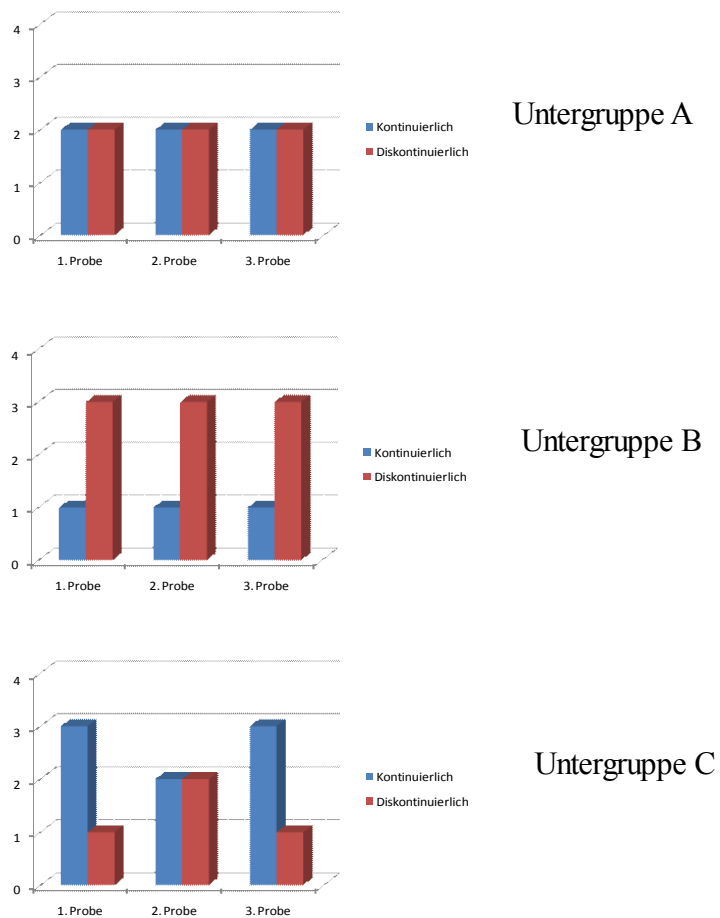


Abbildung 28: Expressionsmuster für Tenascin C im Stadium C2

Man sieht die drei Untergruppen A, B und C. Es ist dargestellt, wie häufig sich in den drei Hautproben eine kontinuierliche oder diskontinuierliche Expression unterhalb der Basalmembran zeigte.

Zwischen den einzelnen Hautproben eines Patienten im Stadium C4 zeigten sich in allen drei Untergruppen (A-C) Unterschiede in der Tenascin C Expression. In zwei Fällen war in der ersten Probe die Basalmembran kontinuierlich angefärbt, in der zweiten und dritten Probe jedoch nur diskontinuierlich. In den Fällen, in denen eine verstärkte Expression in der Dermis nachweisbar war, ließ sich das gefundene Expressionsmuster nicht in allen drei Hautproben nachweisen. Gleiches gilt für eine verstärkte perivaskuläre Expression. So zeigte sich in einem Fall in der zuletzt entnommenen Probe ein verstärktes Signal in der tiefen Dermis, in den beiden

ersten Proben hingegen fand sich nur ein schmaler Streifen im Bereich der dermo-epidermalen Junctionzone (Abbildung 29). Bei einem anderen Patienten war im ersten Gewebeschnitt die papillären Dermis entlang der Gefäße vermehrt angefärbt und im zweiten Schnitt zeigte sich zusätzlich eine erhöhte Expression in der tiefen retikulären Dermis. Bei einem weiteren Patienten ließ sich zwar in allen drei Gewebeschnitten ein homogenes Signal in der gesamten Dermis nachweisen, jedoch war auch hier ein unterschiedliches Muster, fibrillär in der einen Probe, granulär in den anderen, erkennbar.

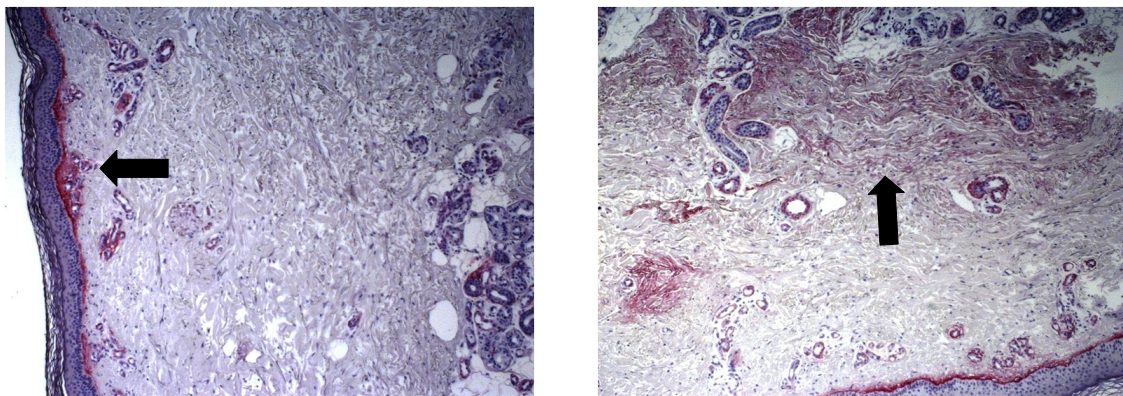


Abbildung 29: Tenascin C Expression im Stadium C4, 10 fache Vergrößerung

29a: zweite Hautprobe eines Patienten

Man erkennt eine gering verbreiterte kontinuierliche Expression im Bereich der dermo-epidermalen Junctionzone. ➡

29b: dritte Hautprobe des gleichen Patienten

Man erkennt eine fibrilläre Tenascin C Expression in der gesamten Dermis.

➡ In beiden Proben sind die Gefäßwände und Schweißdrüsen angefärbt.

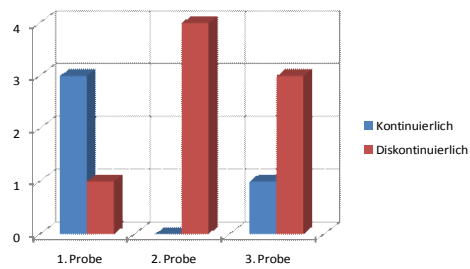
Die Unterschiede in den einzelnen Hautproben richteten sich aber nicht danach, ob die Haut zuvor mit Kompression behandelt wurde oder nicht. Betrachtet man die Untergruppen A, B und C getrennt voneinander, so lässt sich hier kein einheitliches Bild erkennen. Das Expressionsmuster zeigt eine große Variabilität. Auch zwischen den ersten beiden Hautproben der Untergruppe A lassen sich Unterschiede in der Expression feststellen, obwohl zwischen den Entnahmezeitpunkten keine Behandlung stattgefunden hat.

Die Ergebnisse des Stadiums C4 lassen sich graphisch nicht übersichtlich darstellen, da die Expressionsmuster zu stark variieren. Die genaue

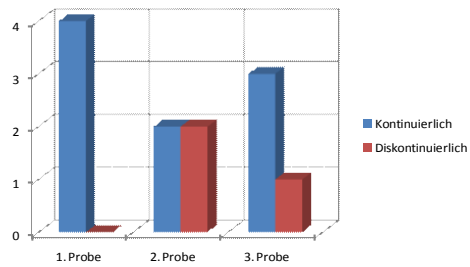
Auswertung der einzelnen Hautproben kann man den Tabellen im Anhang entnehmen.

3.2.2 Einfluss der Kompressionstherapie auf Fibrillin 2

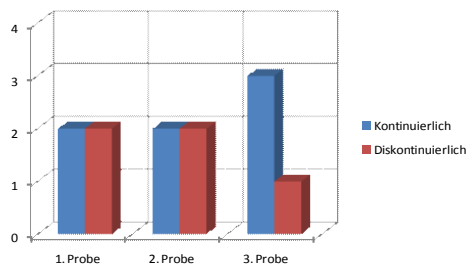
Zwischen den einzelnen Hautproben eines Patienten im Stadium C2 ließen sich in allen drei Untergruppen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Expression ausmachen. Die drei Hautproben eines Patienten unterschieden sich lediglich in der Kontinuität der Fibrillin 2 Expression entlang der dermo-epidermalen Junctionzone. In Abbildung 30 ist für die drei Untergruppen A, B und C graphisch dargestellt, wie viele der vier Hautproben ein diskontinuierliches Muster zeigten und wie viele ein kontinuierliches. Die Gruppe A erhielt MKS der Klasse II für zwei Wochen, die Gruppe B erhielt MKS der Klasse II für vier Wochen, die Gruppe C erhielt MKS der Klasse III für vier Wochen.



Untergruppe A



Untergruppe B



Untergruppe C

Abbildung 30: Expressionsmuster für Fibrillin 2 im Stadium C2

Man sieht die drei Untergruppen A, B und C. Es ist dargestellt, wie häufig sich in den drei Hautproben eine kontinuierliche oder diskontinuierliche Expression unterhalb der Basalmembran zeigte.

Betrachtet man die drei Hautproben eines Patienten im Stadium C4, so kann man auch für Fibrillin 2 bei fast allen Patienten Unterschiede im Expressionsmuster erkennen. Die Proben unterschieden sich in einigen Fällen in der Kontinuität des Streifens unterhalb der Basalmembran. Die vermehrte Anfärbbarkeit für Fibrillin 2 zeigte sich nicht einheitlich in der gesamten Unterschenkelhaut eines Patienten, sondern begann punktuell in einigen Arealen, entweder perivaskulär (Abbildung 21 und 31), subepidermal oder in der Tiefe. Es zeigte sich zum Beispiel bei einem Patienten in einer Probe eine deutliche Anfärbung in der tiefen Dermis, in den übrigen Proben jedoch nur ein

schmaler Saum entlang der Basalmembran. In einem anderen Fall waren zwei Proben positiv auf das Protein angefärbt und die dritte demonstrierte nur einen diskontinuierlichen Streifen entlang der Basalmembran. Ebenfalls fanden sich verschiedene Expressionsmuster in der tiefen Dermis in den Fällen, in denen eine verstärkte Fibrillin 2 Expression in mehreren Hautproben belegt werden konnte. So lag bei einem Patienten, der klinisch eine massive Sklerose aufwies, in allen drei Gewebeschnitten ein verstärktes Signal in der gesamten Dermis vor. In einer Probe überwog ein fibrilläres Muster, in den anderen beiden ein granuläres (Abbildung 32).

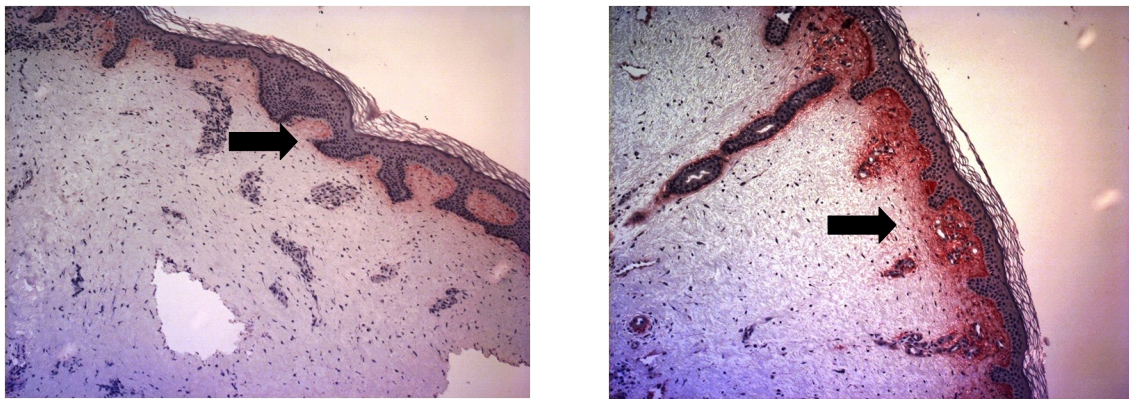


Abbildung 31: Fibrillin 2 Expression im Stadium C4; 20 fache Vergrößerung

Links: erste Hautbiopsie eines Patienten, Untergruppe C

Man erkennt eine bandförmige Expression unterhalb der Basalmembran ➡ und in den Gefäßwänden.

Rechts: zweite Hautbiopsie desselben Patienten nach 14 Tagen

Man erkennt eine verbreiterte Anfärbung in der papillären Dermis und perivaskulär, ➡ weiterhin besteht die Expression in den Gefäßwänden und Haarfollikeln.

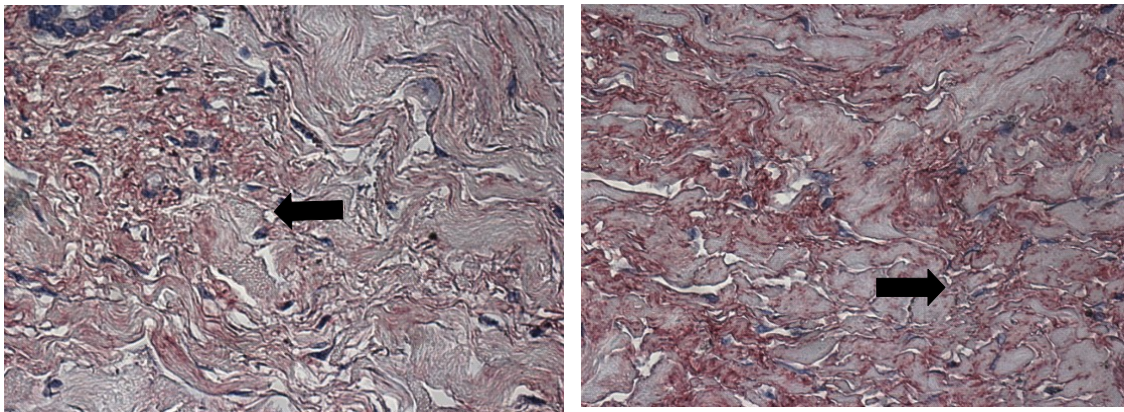


Abbildung 32: Fibrillin 2 Expression im Stadium C4, 40 fache Vergrößerung, Patient der Untergruppe C
Man erkennt das unterschiedliche Expressionsmuster, im ersten Schnitt fibrillär, im zweiten granulär. ➡

Für Fibrillin 2 zeigten sich die Unterschiede in der Expression unabhängig davon, ob das Gewebe zuvor mit Kompression behandelt wurde oder nicht. In den Untergruppen A, B und C ließen sich weder eine abnehmende Tendenz bei der Fibrillin 2 Expression erkennen noch gruppenspezifische Veränderungen feststellen. In allen drei Untergruppen zeigte sich ein uneinheitliches Expressionsmuster, das auch nach der unterschiedlichen Kompressionsbehandlung bestehen blieb.

Auf Grund der starken Variabilität der Expressionsmuster lassen sich die Ergebnisse des Stadiums C4 nicht übersichtlich in einer Graphik darstellen. Die genaue Auswertung der einzelnen Hautproben kann man den Tabellen im Anhang entnehmen.

3.2.3 Einfluss der Kompressionstherapie auf α -Smooth Muscle Actin

Im Stadium C2 und C4 ließ sich keine vermehrte Expression von α -Smooth Muscle Actin in der Dermis darstellen, somit konnte kein Unterschied zwischen den einzelnen Hautproben eines Patienten in den Stadien C2 und C4 gezeigt werden. Das Gleiche gilt für die drei Untergruppen, auch hier konnten keine Unterschiede in der Expression vor und nach der unterschiedlichen Kompressionsbehandlung erkannt werden.

3.3 Image 3D Volumenmessung

Bei den Volumenmessungen der Beine zeigte sich insgesamt eine Abnahme des Beinvolumens durch das Tragen der MKS. Die Volumenabnahme war bei den Patienten, die MKS VenoTrain® delight, (KKL III), trugen, etwas stärker (Mittelwert: -0,0675 (l) am Oberschenkel und -0,0775 (l) am Unterschenkel) als bei denen, die VenoTrain® micro (KKL II) trugen. Die Unterschiede waren sowohl für die Veränderung am Unterschenkel (Gruppe A $p = 0,143$, Gruppe B $p = 0,17$, Gruppe C $p = 0,122$) als auch für die am Oberschenkel (Gruppe A $p = 0,249$, Gruppe B $p = 0,375$, Gruppe C $p = 0,114$) nicht signifikant. Auffällig ist, dass die Gruppe A, die nur zwei Wochen MKS trug, nach Abschluss der Studie eine stärkere Volumenabnahme (Mittelwert: -0,0329 (l) am Oberschenkel und -0,0571 (l) am Unterschenkel) zeigte, als die Gruppe B, die vier Wochen mit MKS behandelt wurde (Mittelwert: -0,0129 (l) am Oberschenkel und -0,0157 (l) am Unterschenkel). Beide Gruppen erhielten die Kompressionsstrümpfe VenoTrain® micro, KKL II. Wenn man die einzelnen Probanden betrachtet, sieht man starke individuelle Schwankungen. In allen drei Gruppen gab es Patienten, die trotz der Behandlung mit Kompressionsstrümpfen, eine zum Teil deutliche Volumenzunahme (bis zu 0,22l) zeigten. Betrachtet man jeweils den Oberschenkel und den Unterschenkel eines Patienten getrennt voneinander, so sieht man, dass es insgesamt gesehen am Unterschenkel zu einer minimal größeren Abnahme des Volumens kam. Dieser Unterschied war jedoch in allen drei Gruppen nicht signifikant (Gruppe A $p = 0,145$, Gruppe B $p = 0,465$, Gruppe C $p = 0,483$). Bei acht Patienten war die Volumenabnahme am Oberschenkel sogar ausgeprägter als am Unterschenkel, bei drei Patienten kam es am Unterschenkel zu einer Verminderung und am Oberschenkel zu einer Zunahme des Volumens.

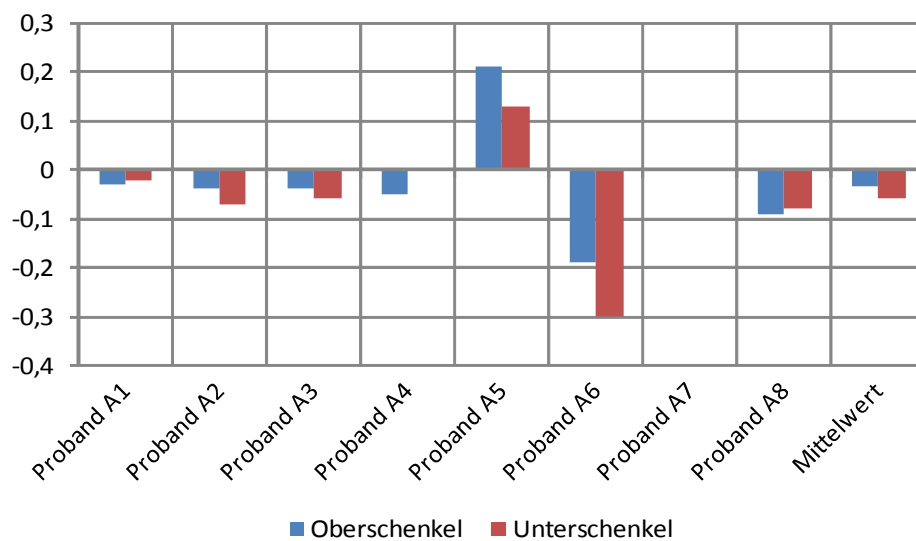


Abbildung 33: Veränderung des Beinvolumens (l) bei Patienten, die für zwei Wochen mit den Kompressionsstrümpfen VenoTrain® micro behandelt wurden (Untergruppe A). Die Gruppen C2 und C4 wurden zusammengefasst.

Man erkennt, dass es insgesamt zu einer geringen Abnahme gekommen ist. Proband A7 erschien nicht zur zweiten Messung.

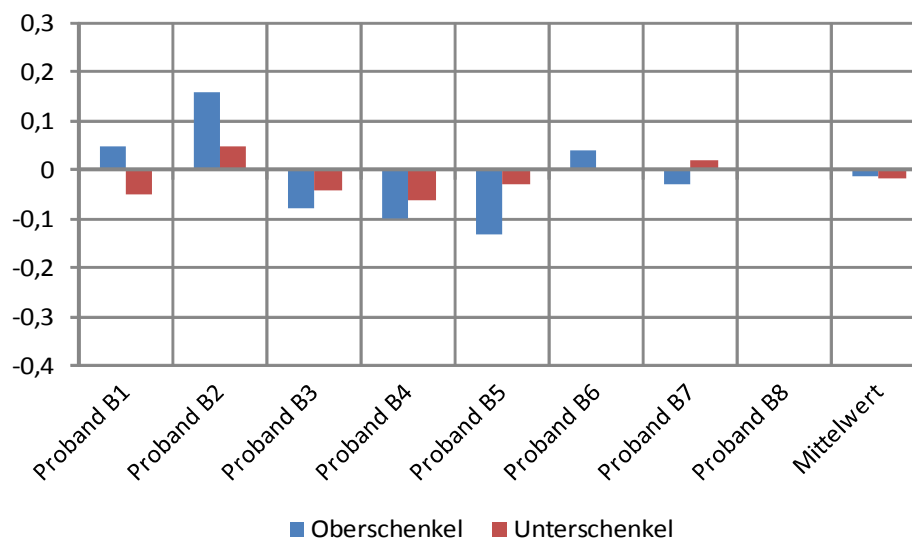


Abbildung 34: Veränderung des Beinvolumens (l) bei Patienten, die für vier Wochen mit den Kompressionstrümpfen VenoTrain® micro behandelt wurden (Untergruppe B). Die Gruppen C2 und C4 wurden zusammengefasst.

Zwar kam es insgesamt zu einer geringen Volumenabnahme, es zeigten sich jedoch deutliche individuelle Schwankungen und bei einigen Patienten auch eine Zunahme des Beinumfangs. Proband B8 brach die Studie ab.

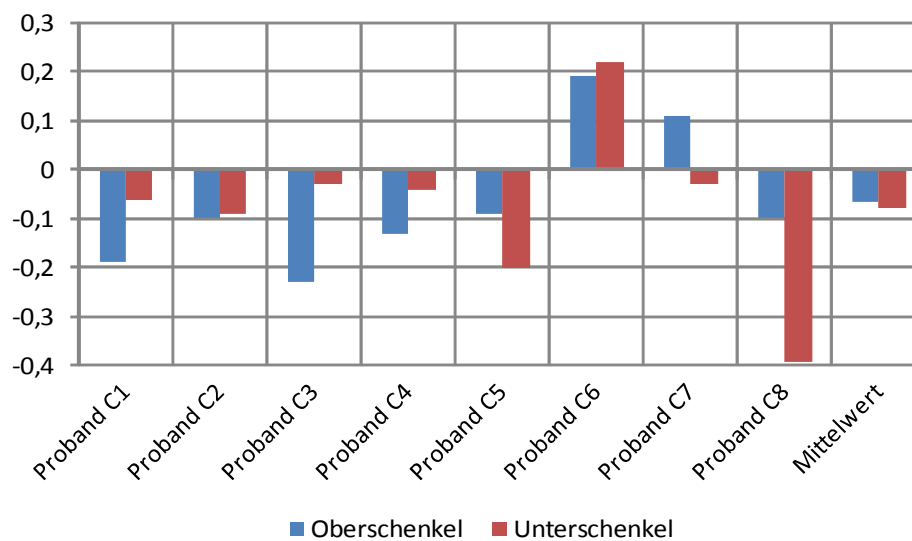


Abbildung 35: Veränderung des Beinvolumens in (l) bei Patienten, die für vier Wochen mit den Kompressionsstrümpfen VenoTrain® delight behandelt wurden (Untergruppe C). Die Gruppen C2 und C4 wurden zusammengefasst.

Es zeigte sich überwiegend eine geringe Volumenabnahme, bei zwei Patienten kam es jedoch zu einer Zunahme des Beinvolumens.

3.4 Patientenbefragung

Die telefonische Umfrage ergab folgendes Ergebnis: zwölf Patienten trugen weiterhin regelmäßig ihre Kompressionsstrümpfe, ein Patient trug die Strümpfe nur gelegentlich bei starker Belastung, zwei Patienten waren in der Zwischenzeit an den Venen operiert worden und brauchten daher keine Kompressionsstrümpfe mehr zu tragen, zwei weitere Patienten nutzten ihre Kompressionsstrümpfe für circa ein halbes Jahr weiter, fühlten sich dann aber im Alltag durch die Strümpfe stärker eingeschränkt, als dass ihre Beschwerden durch die MKS gemildert wurden. Zwei Patienten zogen die Strümpfe nur für den Zeitraum der Studie an.

Betrachtet man die beiden Stadien C2 und C4 getrennt voneinander, so sieht man, dass in der Gruppe der C2 Patienten nur 54,5% der Befragten weiterhin ihre Kompressionsstrümpfe trugen, in der Gruppe der C4 Patienten waren es 88,8%.

In der Gruppe der Patienten im Stadium C2 gaben vier Patienten an, dass ihre Lebensqualität durch die Strümpfe stark verbessert sei, für drei Patienten war sie leicht verbessert, ein Patient konnte keine Veränderung durch das Tragen der Strümpfe feststellen und drei Patienten gaben an, dass ihre Lebensqualität durch das Tragen der MKS eingeschränkt gewesen sei. Als Gründe hierfür wurden das starke Schwitzen unter den Strümpfen und das Rutschen der Strümpfe angegeben. Ein Patient wurde telefonisch nicht erreicht.

In der Gruppe der Patienten im Stadium C4 bewerteten sechs Patienten ihre Lebensqualität als stark verbessert durch das Tragen der MKS, einer von ihnen konnte sogar eine sehr starke Verbesserung feststellen. Zwei Patienten gaben an, dass ihre Lebensqualität leicht verbessert sei und für einen Patienten war sie ziemlich verbessert. Zwei Patienten wurden telefonisch nicht erreicht, ein Patient hatte die Studie abgebrochen.

Auf die Frage nach aktuellen Beschwerden gaben insgesamt zwölf Patienten an, dass sie weiterhin unter Schmerzen in den Beinen leiden würden, wenn sie ihre Strümpfe nicht tragen würden. Allerdings variierte die Intensität der Schmerzen erheblich (1-8). Im Stadium C2 litten 45,5% unter Schmerzen, im Stadium C4 77,8%.

Ohne das Tragen von MKS lagen die Schmerzen für fünf Patienten auf der Schmerzskala im Bereich von 6-8 Punkten, für drei Patienten lagen die Schmerzen bei 3 bzw. 2 Punkten und ein Patient ordnete seinen Schmerzen eine 1 auf der Skala zu (Tabelle 9 und 10) .

Zehn Patienten gaben an, dass ihre Schmerzen durch das Tragen von Kompressionsstrümpfen verringert würden. Die Mehrheit hatte infolge des täglichen Tragens der MKS keine Schmerzen mehr. Drei Patienten sagten aus noch Schmerzen zu haben, deren Intensität bei 1 lag. Zwischen den Stadien C2 und C4 zeigten sich keine großen Unterschiede bezüglich der Schmerzen und deren Veränderung durch die Behandlung mit MKS.

Tabelle 9: Intensität der Schmerzen auf einer Skala von 1-10 bei Patienten im klinischen Stadium C2

Stadium C2	
ohne MKS	mit MKS
2	0
3	trägt keine
0	0
3	1
0	0
0	0
8	trägt keine
0	0
3	0
0	0
0	0

Tabelle 10: Intensität der Schmerzen auf einer Skala von 1-10 bei Patienten im klinischen Stadium C4

Stadium C4	
ohne MKS	mit MKS
0	trägt keine
2	0
1	0
6	1
0	0
8	0
8	0
7	1
2	0

Vierzehn Patienten gaben an, dass sie unter Schweregefühl leiden, wenn sie keine Kompressionsstrümpfe trügen, im Stadium C4 waren es 77,8% und im Stadium C2 55,5%. Bei allen Patienten verbesserte sich das Schweregefühl unter der Therapie, nur drei Patienten litten weiterhin darunter, obwohl sie ihre MKS trugen (Tabelle 11 und 12).

Tabelle 11: Intensität des Schweregefühls auf einer Skala von 1-10 bei Patienten im klinischen Stadium C2

Stadium C2	
ohne MKS	mit MKS
4	3
2	trägt keine
2	0
1	1
8	0
0	0
1	trägt keine
0	0
2	0
0	0
0	0

Tabelle 12: Intensität des Schweregefühls auf einer Skala von 1-10 bei Patienten im klinischen Stadium C4

Stadium C4	
ohne MKS	mit MKS
1	trägt keine
2	0
1	0
6	1
0	0
trägt immer MKS	0
trägt immer MKS	0
0	0
2	0

4. Kapitel: Diskussion

4.1 Expression der EZM Proteine im Stadium C0, C2, C4 und C6

4.1.1 Tenascin und Fibrillin

In der Haut von Patienten mit CVI im klinischen Stadium C0 ließ sich für Tenascin C und Fibrillin 2 mittels immunhistochemischer Färbungen ein schmaler diskontinuierlicher Streifen unterhalb der Basalmembran, in den Gefäßwänden und den Hautanhangsorganen anfärben. Es fand sich also ein Expressionsmuster wie in der Literatur beschrieben (Lightner et al., 1989, Latijnhouwers et al., 1996, Sakai et al., 1986).

Bei Patienten im Stadium C2 der CEAP Klassifikation zeigte sich ein dünn angefärbter Saum entlang der Basalmembran, in den Gefäßwänden und den Hautanhangsorganen. Ein ähnliches Expressionsmuster für Tenascin C fanden Peschen und Vanscheidt (1999) und Schild (2001) in ihren Untersuchungen. Die Zusammensetzung der EZM scheint trotz einer wahrscheinlich bestehenden venösen Mikrozirkulationsstörungen noch nicht verändert zu sein.

Für das Stadium C4 kann keine allgemeine Aussage über die Tenascin C und Fibrillin 2 Expression getroffen werden. Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Studie, so scheint die Unterteilung des Stadiums C4 in C4a (Hyperpigmentierung und Ekzem) und C4b (Dermatoliposklerose und Atrophie) von entscheidender Bedeutung zu sein, wenn man die Veränderungen der EZM beurteilen will. Im Stadium C4a sind noch keine Veränderungen in der Expression der Proteine Tenascin C und Fibrillin 2 nachweisbar, im Stadium C4b hingegen zeigt sich eine deutliche Expressionssteigerung. Das Stadium C4b unterscheidet sich also grundlegend von Stadium C4a, sowohl morphologisch als auch in der Proteinexpression. Die gefundenen Unterschiede in der Expression der Extrazellulärproteine in den Stadien C4a und C4b passt zu den morphologischen Diskrepanzen.

Steht die Hyperpigmentierung als Hautveränderung im Vordergrund, so zeigte sich ein Expressionsmuster ähnlich dem im Stadium C2, also ein schmaler Saum unterhalb der Basalmembran und eine Anfärbung der Gefäßwände und Hautanhangsorgane. Eine erhöhte Expression ist nicht nachweisbar. Analoge Ergebnisse für Tenascin C erhielten Peschen und Vanscheidt (1999) und Mansfeld (2008). Schild (2001) hingegen beschrieb eine verbreiterte bandförmige Expression im Stratum papillare und eine zunehmende Färbung von Kollagenfasern in der tiefen Dermis. Für das klinische Bild eines Stauungsekzems kann keine allgemein gültige Aussage getroffen werden. Es wurden hier nur zwei Patienten untersucht, deren Untersuchungsergebnisse sehr unterschiedlich ausfielen. Bei einem Stauungsekzem handelt es sich um eine chronische Entzündung, in deren Rahmen es zu Wundheilungsprozessen und Freisetzung von Wachstumshormonen (TGF- β , IL-4) kommt. Es wäre zu erwarten, dass die Fibrillin 2 und Tenascin C Expression gegenüber gesunder Haut gesteigert ist. Durch unsere Studie konnte das allerdings nicht bestätigt werden. Somit stehen die Ergebnisse im Widerspruch zu den Aussagen einer Arbeit von Peschen und Vanscheidt (1999). Sie wiesen bei einem Stauungsekzem eine verstärkte Expression an der dermo-epidermalen Junctionzone und im Stratum Papillare, vor allem im perivaskulärem Bereich, nach.

Liegt klinisch zusätzlich eine beginnende Sklerose vor, erscheint die Expression im Stratum papillare und in der Umgebung der dermalen Gefäße laut den Ergebnissen der hier durchgeführten Studie verbreitert. Wurde die Biopsie direkt aus dem sklerotischen Areal genommen, so waren vereinzelte kollagene Fasern in der tiefen Dermis oder die gesamte Dermis angefärbt. Somit konnten die Beobachtungen von Mansfeld (2008) und Schild (2001) bestätigt werden. Bei Schild war in der Haut von Patienten mit Dermatoliposklerose die gesamte Dermis bis hin zur Subkutis mit einem Antikörper gegen Tenascin C anfärbbar. Die Basalmembran schien ein intensiveres Signal als in den Anfangsstadien abzugeben. Ähnliches konnte bereits von Peschen und Vanscheidt (1999) für Tenascin C und von Brinckmann et al. (2010) für Tenascin C und Fibrillin 2 gezeigt werden. Sie konnten bei ihren Untersuchungen eine Kolo-kalisation von

Tenascin C und Fibrillin 2 bei der Dermatoliposklerose nachweisen. In dieser Studie ähnelt sich die Expression der beiden Proteine in allen Stadien der CVI. Dieses deutet darauf hin, dass in allen Stadien der CVI eine Koexpression von Tenascin C und Fibrillin 2 vorliegt.

Bei den Patienten mit Ulcus cruris venosum (Stadium C6) waren Tenascin C und Fibrillin 2 in allen Hautproben vermehrt nachweisbar. Damit entspricht das Ergebnis der Studie für Tenascin C Resultaten vorheriger Arbeiten von Peschen und Vanscheidt (1999), Mansfeld (2008) und Schild (2001), die ebenfalls eine intensive homogene Anfärbung der gesamten Dermis beschreiben. Für die Fibrillin 2 Expression beim Ulcus cruris venosum liegen bisher keine Studien vor. Es ist jedoch bekannt, dass Fibrillin 2 im Rahmen der Wundheilung, bei sklerotischen Umbauvorgängen und bei der Narbenbildung verstärkt exprimiert wird. Daher ist es nicht verwunderlich, dass es auch in der Umgebung eines Ulcus cruris venosum zu einer gesteigerten Fibrillin 2 Expression in der Dermis kommt. Sowohl die Tenascin C als auch die Fibrillin 2 Expression kann durch Fibroblastenaktivierung gesteigert werden. Wichtige Aktivatoren stellen TGF- β , Interleukine (IL-4) und TNF- α dar (Brinckmann et al., 2010). Diese Wachstumsfaktoren sind nachweislich in einem Ulcus cruris venosum vorhanden und somit maßgeblich an der nachgewiesenen Expressionssteigerung von Tenascin C und Fibrillin 2 beteiligt.

Einen möglichen Ursprungsort der verstärkten Tenascin C Expression könnten die Fibroblasten der dermalen Gefäße darstellen. Auffällig ist die perivaskuläre Verteilung in einigen Proben. Das könnte für einen vaskulär getriggerten Prozess sprechen (Herrick et al., 1992). Es zeigt sich jedoch in dieser Studie nicht in allen Proben eine verstärkte perivaskuläre Anfärbung. Zum Teil lässt sich die gesteigerte Expression auch subepidermal oder in der Tiefe zuerst nachweisen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es unabhängig davon an anderen Orten ebenfalls zu einer erhöhten Fibroblastenaktivierung und somit einer verstärkten Expression der untersuchten Proteine kommt. Ähnlich wie bei der Myofibroblastenbildung scheinen sowohl die lokalen Fibroblasten in der Dermis als auch die Perizyten der Gefäße ein möglicher Ursprung für die erhöhte Expression zu sein. Was der Auslöser ist, dass es einmal zu einer

erhöhten perivaskulären Expression und ein anderes Mal zu einer erhöhten Expression in der Tiefe kommt, ist noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.1.2 α -Smooth Muscle Actin

In normaler Haut finden sich Myofibroblasten und somit α -Smooth Muscle Actin nur in den Gefäßwänden, wie schon 2003 von Bandemir nachgewiesen. Ein analoges Bild zeigt sich im Stadium C2 der CEAP Klassifikation. Zur Differenzierung von Myofibroblasten sind, wie bereits erwähnt, verschiedene Faktoren notwendig: eine erhöhte Aktivität von TGF β 1, die Anwesenheit von EDA-Fibronectin und ein hoher extrazellulärer Stress (Hinz et al., 2007). Da diese Voraussetzungen im Stadium C2 nicht gegeben sind, erscheint es nicht verwunderlich, dass sich keine erhöhte Expression von α -Smooth Muscle Actin in den entsprechenden Hautbiopsien finden lässt.

Im Stadium C4 war in den entnommenen Hautproben ebenfalls keine vermehrte Myofibroblastenbildung in der Dermis nachweisbar. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Bandemir (2003) und Vignale et al. (2004), die in ihren Untersuchungen von Dermatoliposklerose eine erhöhte α -Smooth Muscle Actin Expression in der tiefen Dermis und Subkutis fanden. Auch Wang et al. (2005) und Hinz (2007) beschrieben eine erhöhte Anzahl von Myofibroblasten bei fibrotischen Vorgängen. Somit wäre zu erwarten gewesen, dass es im Stadium der Dermatoliposklerose zu einer erhöhten α -Smooth Muscle Actin Expression in der gesamten Dermis kommt. Die Myofibroblasten scheinen aber, laut den in dieser Untersuchung erhobenen Befunden, erst in einem späteren Stadium der Fibrose aufzutreten und somit nicht ursächlich für deren Entstehung zu sein.

Im Stadium C6, also in den Biopsien aus dem Randbereich eines Ulcus cruris venosum, zeigte sich hingegen eine Expression von α -Smooth Muscle Actin in der tiefen Dermis. In diesem Stadium der CVI konnten somit die Ergebnisse von Bandemir (2003) bestätigt werden. Da es sich bei einem floriden Ulcus cruris venosum um eine akute Entzündung und Verletzung mit anschließender Wundheilung handelt, entspricht das vermehrte Vorkommen der Myofibroblasten dem aktuellen Wissensstand. Die Myofibroblasten scheinen

nicht die Ursache eines Ulkus zu sein, sondern vielmehr eine Reaktion auf ein bereits bestehendes Ulkus.

Tamaoki et al. (2005) untersuchten die Regeneration von Herzmuskelgewebe nach Myocardinfarkten und fanden heraus, dass es zu einer erhöhten Tenascin C Expression kommt und in diesen Bereichen des Herzmuskels nachfolgend zu einem erhöhten Vorkommen von Myofibroblasten. Sie konnten zeigen, dass das Vorhandensein von Tenascin C eine Voraussetzung für die Differenzierung von Myofibroblasten ist.

Überträgt man diese Beobachtung auf die CVI, so unterstützt sie die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es erst im Stadium C4b zu einem Anstieg der Tenascin C Expression kommt und anschließend im Stadium C6 zu einer vermehrten Expression von α -Smooth Muscle Actin.

4.2 Einfluss der Kompressionstherapie auf die Expression der EZM Proteine in den Stadien C2 und C4

4.2.1 Tenascin C und Fibrillin 2

Ein Effekt der Kompressionstherapie auf die Expression der untersuchten Proteine konnte an Hand dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Für Fragen nach der Dauer der Kompressionsbehandlung und der effektivsten KKL gilt ähnliches. Im Stadium C2 waren Fibrillin 2 und Tenascin C im Vergleich zu Gesunden nicht vermehrt in der Haut der Patienten nachweisbar. Somit war es nicht möglich einen eindeutigen Einfluss der Kompressionstherapie auf die Proteinexpression darzustellen. Da im Stadium C4 nur bei der Hälfte der Patienten die Proteine erhöht waren, ist auch hier die Aussagekraft eingeschränkt. Wie beschrieben zeigten sich bei fast allen Patienten im Stadium C4 verschiedene Expressionsmuster in den drei entnommenen Hautproben. Die Unterschiede waren jedoch vollkommen unabhängig davon, um welche der drei Proben es sich handelte. Das erkennt man vor allem an der Gruppe A. Hier konnten Unterschiede zwischen der ersten und der zweiten Hautprobe festgestellt werden, obwohl in der Zeit zwischen den Entnahmezeitpunkten keine Kompressionstherapie durchgeführt wurde und

daher zu erwarten gewesen wäre, dass sich das gleiche Expressionsmuster zeigt. Betrachtet man alle zwölf Patienten, lassen die bestimmten Expressionsmuster keinen Rückschluss auf das klinische Stadium zu. Ausnahme ist die Unterscheidung zwischen den Stadien C4a und C4b, wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben. Die veränderte Tenascin C und Fibrillin 2 Expression war nicht kontinuierlich in der gesamten Unterschenkelhaut nachweisbar. Bereits bei einem Abstand von einem cm zwischen den einzelnen Proben zeigte sich ein unterschiedliches Muster, insbesondere wenn die Hautveränderungen noch im Anfangsstadium waren oder nicht den gesamten Unterschenkel betrafen. In einigen Fällen zeigte sich in der zweiten oder dritten Hautprobe im Gegensatz zur ersten eine erhöhte Expression. Diese Steigerung kann eventuell durch Wundheilungsprozesse hervorgerufen worden sein, die in Folge der ersten Probenentnahme eingesetzt hatten.

Eine mögliche Ursache dafür, dass keine Veränderung durch die Kompressionstherapie festgestellt werden konnte, ist eventuell ein zu kurzes Behandlungsintervall bzw. eine zu kurze Beobachtungsdauer. Es ist an Hand dieser Studie nicht auszuschließen, dass die Kompressionstherapie einen positiven Einfluss auf die Expression der untersuchten Proteine hat, sich die Veränderungen aber erst nach einer Therapiedauer von mehr als vier Wochen nachweisen lassen.

Ein wichtiger Punkt der Studie ist, dass sämtliche klinische Erscheinungsbilder des Stadiums C4 eingeschlossen wurden. Wie sich im Verlauf der Untersuchung herausgestellt hat, gibt es im Stadium C4 jedoch kein einheitliches oder eindeutig vermehrtes Expressionsmuster. Bemerkenswert ist der Unterschied in der Expression der Extrazellulärproteine im Stadium C4. Die Studie zeigt, dass die Unterteilung des Stadiums C4 in C4a und C4b von entscheidender Bedeutung ist, wenn man die Veränderungen der EZM betrachtet. Es wäre sinnvoll, das Stadium C4 in weitere Untergruppen zu gliedern, da auch die unter C4a zusammengefassten Pigmentveränderungen und das Ekzem kein einheitlich verändertes Expressionsmuster für die in dieser Studie untersuchten Proteine zeigten. Bei zukünftigen Untersuchungen sollte berücksichtigt werden, dass sich das Expressionsmuster der einzelnen Proteine

in direkt nebeneinander liegenden Hautarealen unterscheiden könnte. Dieses scheint vor allem bei gerade beginnenden Hautveränderungen der Fall zu sein. Hierbei gibt es folgendes zu beachten: Die Hautproben müssen einerseits nah genug beieinander liegen, damit sie sich möglichst ähnlich sind, was die Veränderungen der EZM und den Anpressdruck der MKS betrifft. Andererseits müssen sie so weit voneinander entfernt sein, dass die Entzündungs- und Wundheilungsprozesse, die durch die erste Probenentnahme ausgelöst werden, keinen Einfluss auf das Hautareal der nächsten Probenentnahme haben. Liegen die Entnahmestellen zu dicht beieinander, könnte es sein, dass in der ersten Probe keine vermehrte Expression nachweisbar ist, es aber durch die Manipulation an der Haut jedoch in den folgenden Proben zu einer verstärkten Expression der EZM Proteine kommt.

Um einen eindeutigen Effekt der Kompressionstherapie auf die untersuchten Proteine nachweisen zu können, müsste man weitere Untersuchungen durchführen. Eventuell mit einer deutlich größeren Probandenzahl und genauer definierten Einschlusskriterien bezüglich des klinischen Erscheinungsbildes. Am geeignetsten wäre es Probanden mit einer deutlichen Dermatoliposklerose (Stadium C4b), die gleichmäßig den gesamten Unterschenkel betrifft, zu untersuchen. Außerdem wäre ein längerer Untersuchungszeitraum ratsam, falls sich die erwirkten Veränderungen erst nach Wochen oder Monaten nachweisen lassen.

4.2.2 α -Smooth Muscle Actin

Auch hier kann keine Aussage über den Einfluss der Kompressionstherapie getroffen werden, da in den Stadien C2 und C4 in dieser Studie keine erhöhte Anzahl an Myofibroblasten in der Haut am Unterschenkel nachweisbar war. Ein Einfluss der Kompressionstherapie kann demnach also nicht beurteilt werden. Gleiches gilt für die Frage, ob sich ein Effekt der Kompressionstherapie bereits nach zwei Wochen zeigt und ob es Unterschiede zwischen den Kompressionsklassen II und III gibt.

4.3 Image 3D Volumenmessung

Die durchgeführten Messungen zeigen, dass es unter der Kompressionstherapie zu einer Abnahme des Beinvolumens kommt. Somit konnten die Beobachtungen von Vayssairat et al. (2000) und Benigni et al. (2003), dass es schon nach einer vierwöchigen Behandlung zu einer Verminderung des Beinvolumens kommt, bestätigt werden. Partsch (2006) kam zu dem Ergebnis, dass man bereits mit leichten Kompressionsstrümpfen einem Ödem vorbeugen kann. Bei den hier untersuchten Patienten kam es allerdings nur zu einer sehr geringen, nicht signifikanten Reduktion des Beinvolumens, bei einzelnen Patienten sogar zu einer partiellen Zunahme. Diese individuellen Schwankungen könnten auf eine unterschiedliche Tragedauer der MKS oder auf eine mangelnde Compliance zurückgeführt werden. Die Patienten wurden angewiesen, die Strümpfe mindestens acht Stunden am Tag zu tragen, ob dieses durchgeführt wurde, entzieht sich der Überprüfung durch die Studie. Ein weiterer Kritikpunkt dieser Arbeit ist die relativ niedrige Fallzahl, hierdurch fallen Ausreißer schwerer ins Gewicht.

Entgegen den Erwartungen ist die Volumenabnahme der Gruppe A größer als die der Gruppe B. Es wäre zu erwarten gewesen, dass die Volumenreduktion in der Gruppe B größer ausfällt, da beide Gruppen die gleichen MKS (VenoTrain® micro) trugen, die Gruppe B jedoch zwei Wochen länger behandelt wurde. Das Ergebnis lässt sich eventuell durch eine zu geringe Probandenzahl und eine mangelnde Compliance erklären. Die Probanden der Gruppe C, die MKS der KKL III trugen, zeigten wie erwartet die größte Volumenabnahme, der Unterschied zur Gruppe A ist jedoch nur gering.

Für die zum Teil sehr ausgeprägten Unterschiede der Volumenveränderungen zwischen dem Ober- und Unterschenkel gibt es keine direkte Erklärung. Bei einer Person lassen sie sich vielleicht dadurch erklären, dass der betroffene Proband angab, die Strümpfe würden am Oberschenkel rutschen. Ein weiterer möglicher Grund ist, dass der Anpressdruck am Oberschenkel wesentlich geringer ist als am Unterschenkel und es somit vor allem zu einer Volumenverminderung am Unterschenkel kommt. Messfehler bei der Anpassung der Strümpfe konnten durch die Verwendung des Image 3D

Systems weitgehend vermieden werden, lassen sich jedoch nicht vollkommen ausschließen.

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Studie, so scheint es, als reichen die VenoTrain® micro Strümpfe (KKL II) aus, um einen volumenverringern Effekt zu erzielen. Mit den MKS der KKL III lassen sich keine wesentlichen Verbesserungen gegenüber KKL II erreichen. Um eine genauere Aussage über den zu erwartenden Effekt bezüglich der Volumenreduktion der beiden verwendeten Modelle VenoTrain® delight und VenoTrain® micro machen zu können, sollte eine erneute Messung mit einer deutlich größeren Anzahl an Probanden durchgeführt werden.

4.4 Patientenbefragung

Bei der Patientenbefragung zeigte sich, dass es subjektiv zu einer Beschwerdeverbesserung durch das Tragen der MKS gekommen ist.

Sowohl das Schweregefühl als auch die Schmerzen waren unter der Therapie wesentlich geringer und bei der Mehrzahl der Probanden gar nicht mehr vorhanden. Dieser positive Effekt der MKS wurde bereits in der Bonner Venenstudie beschrieben (Pannier et al., 2007), wobei die dort erzielten Ergebnisse auf Grund der größeren Probandenzahl deutlicher ausfielen, als in dieser Studie. Die Studie besagt, dass insgesamt 73,1% der Befragten eine Besserung ihrer Beschwerden unter der MKS Therapie angaben, vor allem das Schweregefühl konnte bei 89% positiv beeinflusst werden.

Eine spezielle Aussage zu den in der Studie verwendeten Kompressionsstrümpfen zu treffen, ist an Hand dieser Ergebnisse schwierig, da viele der Probanden mittlerweile neu verordnete MKS trugen. Vor allem die Patienten im Stadium C2 trugen statt der zuerst verordneten Oberschenkelstrümpfe (AG) häufig nur noch Wadenstrümpfe (AD). Es konnte also nur der generelle Effekt von MKS auf die bestehenden Beschwerden und die Lebensqualität beurteilt werden. Auffällig ist, dass vor allem Patienten mit einer CVI (C4) regelmäßig ihre MKS trugen und eine gute Compliance aufwiesen. So lag die Anzahl der Patienten, die weiterhin regelmäßig ihre

Kompressionsstrümpfe trugen, in der Gruppe mit dem Stadium C4 wesentlich höher (88,8%) als in der Gruppe mit dem Stadium C2 (54,5%). Diese Werte liegen deutlich über den Ergebnissen der Bonner Venenstudie. Dort trugen nur noch 31,4% der Befragten die verordneten Kompressionsstrümpfe. Die Patienten im Stadium C4 empfanden ihre Lebensqualität deutlicher gesteigert als die der Gruppe C2. So gab kein Patient im Stadium C4 an, dass er sich durch die MKS beeinträchtigt fühle. Im Stadium C2 waren es immerhin zwei Patienten, die auf Grund einer für sie subjektiv empfundenen eingeschränkten Lebensqualität die Kompressionsstrümpfe nicht mehr trugen. Dieses zeigt, dass die Bereitschaft regelmäßig MKS zu tragen mit dem Schweregrad der Venenerkrankung steigt.

5. Kapitel: Zusammenfassung

Bei der chronischen venösen Insuffizienz kommt es im Verlauf der Erkrankung zu Umbauvorgängen in der Extrazellulärmatrix. Das EZM Protein Tenascin C wird in den fortgeschrittenen Stadien der CVI vermehrt in der Dermis exprimiert. Fibrillin 2 ist bei der Dermatoliposklerose erhöht. α -Smooth Muscle Actin ist ein Marker für Myofibroblasten und wird bei Patienten mit Ulcus cruris venosum vermehrt in dem betroffenen Hautareal gebildet. Diese Proteine zeigen in hypertrophem Narbengewebe ein verändertes Expressionsmuster, das sich unter Kompression wieder normalisiert. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich damit, in welchem klinischen Stadium der CVI eine dermale Expressionssteigerung der genannten Proteine auftritt und ob eine Kompressionsbehandlung die Proteinexpression beeinflusst.

Bei vier Patienten im Stadium C0, je zwölf Patienten im Stadium C2 und C4 und fünf Patienten im Stadium C6 wurden Hautstanzen über dem Maleolus medialis untersucht, um die Proteinexpression in den einzelnen Stadien zu beschreiben. Bei den Patienten im Stadium C2 und C4 wurden insgesamt drei Stanzbiopsien im Abstand von 14 Tagen entnommen. Während dieser Zeit erhielten die Patienten eine Kompressionstherapie von unterschiedlicher Dauer und Kompressionsklasse.

Die entnommenen Hautproben wurden mittels APAAP Färbungen auf die EZM Proteine untersucht. Hierbei war im Stadium C0 für Tenascin C und Fibrillin 2 ein schmal angefärbter Streifen entlang der Basalmembran und eine Anfärbung der Gefäßwände und Hautanhangsorgane nachweisbar. Ein ähnliches Bild zeigte sich im Stadium C2. Im Stadium C4 ergaben die Färbungen für Tenascin C und Fibrillin 2 kein einheitliches Bild. Bei Patienten mit Hyperpigmentierung (Stadium C4a) konnte keine verstärkte Tenascin C oder Fibrillin 2 Expression nachgewiesen werden. Dagegen zeigt bereits eine beginnende Sklerose (Stadium 4b), eine gesteigerte, häufig perivaskuläre Expression in der papillären Dermis. Liegt eine ausgeprägte Dermatoliposklerose vor, war sowohl die papilläre als auch die retikuläre Dermis angefärbt. α -Smooth Muscle Actin ließ sich im Stadium C0, C2 und C4 nur in den Gefäßwänden und Drüsen

nachweisen. Erst im Stadium C6 zeigte sich eine verstärkte Expression aller drei Proteine in der gesamten Dermis.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es erst in den fortgeschrittenen Stadien der CVI zu einer vermehrten Expression der untersuchten Proteine kommt. Die Veränderungen beginnen entweder perivaskulär, subepidermal oder in der retikulären Dermis. Es scheint keinen einheitlichen Ursprungsort zu geben. Erst beim klinischen Bild der Dermatoliposklerose und des Ulcus cruris venosum kommt es zu einer gesteigerten Expression in der gesamten Dermis. Myofibroblasten lassen sich erst bei Vorhandensein eines Ulkus in der Haut nachweisen.

Ein Einfluss der Kompression auf die Zusammensetzung der EZM konnte nicht eindeutig belegt werden. Um einen Effekt der Kompression genauer beurteilen zu können, sollten weitere Studien mit einer größeren Probandenzahl und längerer Kompressionsdauer durchgeführt werden. Sinnvoll wäre es, explizit Patienten mit einer ausgedehnten Dermatoliposklerose, Stadium C4b, unter unterschiedlichen Modalitäten der Kompressionstherapie zu untersuchen.

Bei den Patienten im Stadium C2 und C4 wurde zusätzlich eine Volumenmessung der Beine vorgenommen. Es zeigte sich eine Volumenreduktion unter Kompression, am Unterschenkel ausgeprägter als am Oberschenkel. Des Weiteren wurden die Patienten rückblickend zu ihren venösen Beschwerden und ihren Kompressionsstrümpfen befragt. Die Befragung ergab, dass in der Gruppe der C2 Patienten 54,5% und in der Gruppe der C4 Patienten 88,8% weiterhin Kompressionsstrümpfe trugen und die Mehrheit der Patienten ihre Lebensqualität durch das Tragen der MKS als verbessert ansah. Schmerzen und Schweregefühl hatten sich während der Therapie subjektiv ebenfalls verbessert.

6. Literaturverzeichnis

- Bandemir, E. 2003, „Angiogenetische Faktoren bei Psoriasis, Ulcus cruris venosum und Dermatoliposklerose“, Universitätshautklinik, Abteilung experimentelle Dermatologie, Albert-Ludwigs Universität Freiburg i.Br.
- Benigni, J.P., Sadoun, S., Allaert, F.A. & Vin, F. 2003, "Efficacy of Class 1 elastic compression stockings in the early stages of chronic venous disease. A comparative study", *International Angiology*, vol. 22, no. 4, pp. 383-392.
- Blättler, W., Lun, B., Uhl, J.F. & Bringer, Y. 2007, "Determinants of pressure exerted by medical compression stockings", *Phlebologie*, vol. 36, no. 5, pp. 237-244.
- Brinckmann, J., Hunzelmann, N., Kahle, B., Rohwedel, J., Kramer, J., Gibson, M.A., Hubmacher, D. & Reinhardt, D.P. 2010, "Enhanced fibrillin-2 expression is a general feature of wound healing and sclerosis: Potential alteration of cell attachment and storage of TGF- β ", *Laboratory Investigation*, vol. 90, no. 5, pp. 739-752.
- Brinckmann, J., Neess, C.M., Gaber, Y., Sobhi, H., Notbohm, H., Hunzelmann, N., Fietzek, P.P., Müller, P.K., Risteli, J., Gebker, R. & Scharffetter-Kochanek, K. 2001, "Different pattern of collagen cross-links in two sclerotic skin diseases: Lipodermatosclerosis and circumscribed scleroderma", *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 117, no. 2, pp. 269-273.
- Brinckmann, J., Notbohm, H., Tronnier, M., Açil, Y., Fietzek, P.P., Schmeller, W., Müller, P.K. & Bätge, B. 1999, "Overhydroxylation of lysyl residues is the initial step for altered collagen cross-links and fibril architecture in fibrotic skin", *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 113, no. 4, pp. 617-621.
- Burnand, K.G., Whimster, I., Naidoo, A. & Browse, N.L. 1982, "Pericapillary fibrin in the ulcer-bearing skin of the leg: The cause of lipodermatosclerosis and venous ulceration", *British medical journal*, vol. 285, no. 6348, pp. 1071-1072.
- Chaudhry, S.S., Gazzard, J., Baldock, C., Dixon, J., Rock, M.J., Skinner, G.C., Steel, K.P., Kielty, C.M. & Dixon, M.J. 2001, "Mutation of the gene encoding fibrillin-2 results in syndactyly in mice", *Human molecular genetics*, vol. 10, no. 8, pp. 835-843.
- Chiquet-Ehrismann, R. & Chiquet, M. 2003, "Tenascins: Regulation and putative functions during pathological stress", *Journal of Pathology*, vol. 200, no. 4, pp. 488-499.
- Coleridge Smith, P.D., Thomas, P., Scurr, J.H. & Dormandy, J.A. 1988, "Causes of venous ulceration: A new hypothesis", *British medical journal*, vol. 296,

no. 6638, pp. 1726-1727.

- Costa, A.M.A., Peyrol, S., Pôrto, L.C., Comparin, J.-., Foyatier, J.-. & Desmoulière, A. 1999, "Mechanical forces induce scar remodeling: Study in non-pressure- treated versus pressure-treated hypertrophic scars", *American Journal of Pathology*, vol. 155, no. 5, pp. 1671-1679.
- Desmoulière, A., Chaponnier, C. & Gabbiani, G. 2005, "Tissue repair, contraction, and the myofibroblast", *Wound Repair and Regeneration*, vol. 13, no. 1, pp. 7-12.
- Eklöf, B., Rutherford, R.B., Bergan, J.J., Carpentier, P.H., Gloviczki, P., Kistner, R.L., Meissner, M.H., Moneta, G.L., Myers, K., Padberg, F.T., Perrin, M., Ruckley, C.V., Coleridge Smith, P. & Wakefield, T.W. 2004, "Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders", *Journal of Vascular Surgery*, vol. 40, no. 6, pp.1248-1252.
- End, P., Panayotou, G., Entwistle, A., Waterfield, M.D. & Chiquet, M. 1992, "Tenascin: A modulator of cell growth", *European Journal of Biochemistry*, vol. 209, no. 3, pp. 1041-1051.
- Erickson, H.P. & Inglesias, J.L. 1984, "A six-armed oligomer isolated from cell surface fibronectin preparations", *Nature*, vol. 311, no. 5983, pp. 267-269.
- Gallenkemper, G., Bulling, B.-., Gerlach, H., Junger, M., Kahle, B., Kluken, N., Lehnert, W., Rabe, E. & Schwahn-Schreiber, C. 2000, "Guidelines in diagnosis and therapy of chronic venous insufficiency", *Phlebologie*, vol. 29, no. 4, pp. 102-105.
- Gschwandtner, M.E. & Ehringer, H. 2001, "Microcirculation in chronic venous insufficiency", *Vascular Medicine*, vol. 6, no. 3, pp. 169-179.
- Herbst, H & Hübner, H.-J. 1998-2003, Aktualisiert: 01.12.2008, „Pathologie-Online“, Online: <http://www.pathologie-online.de/meth/immunhisto.php>, Zugriff am 20.08.2010.
- Herouy, Y., May, A.E., Pornschtegel, G., Stetter, C., Grenz, H., Preissner, K.T., Schopf, E., Norgauer, J. & Vanscheidt, W. 1998, "Lipodermatosclerosis is characterized by elevated expression and activation of matrix metalloproteinases: Implications for venous ulcer formation", *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 111, no. 5, pp. 822-827.
- Herrick, S.E., Sloan, P., McGurk, M., Freak, L., McCollum, C.N. & Ferguson, M.W.J. 1992, "Sequential changes in histologic pattern and extracellular matrix deposition during the healing of chronic venous ulcers", *American Journal of Pathology*, vol. 141, no. 5, pp. 1085-1095.
- Hammersen, F., Hesse, G. 1990: „Strukturelle Veränderungen der varikösen Venenwand nach Kompressionsbehandlung“ *Phlebol Proktol*, vol. 19 (1990) pp. 193-199.
-

- Hinz, B. 2010, "The myofibroblast: Paradigm for a mechanically active cell", *Journal of Biomechanics*, vol. 43, no. 1, pp. 146-155.
- Hinz, B. 2007, "Formation and function of the myofibroblast during tissue repair", *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 127, no. 3, pp. 526-537.
- Hinz, B., Phan, S.H., Thannickal, V.J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M.-. & Gabbiani, G. 2007, "The myofibroblast: One function, multiple origins", *American Journal of Pathology*, vol. 170, no. 6, pp. 1807-1816.
- Hsia, H.C. & Schwarzbauer, J.E. 2005, "Meet the tenascins: Multifunctional and mysterious", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 29, pp. 26641-26644.
- Jones, F.S. & Jones, P.L. 2000, "The tenascin family of ECM glycoproteins: Structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling", *Developmental Dynamics*, vol. 218, no. 2, pp. 235-259.
- Jünger, M. & Sippel, K. 2003, "Compression therapy for chronic venous insufficiency. New test procedures and therapeutic options", *Hautarzt*, vol. 54, no. 11, pp. 1045-1052.
- Kecelj Leskovec, N., Pavlović, M.D. & Lunder, T. 2008, "A short review of diagnosis and compression therapy of chronic venous insufficiency", *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica*, vol. 17, no. 1, pp. 17-21.
- Kielty, C.M., Baldock, C., Lee, D., Rock, M.J., Ashworth, J.L. & Shuttleworth, C.A. 2002, "Fibrillin: From microfibril assembly to biomechanical function", *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 357, no. 1418, pp. 207-217.
- Kistner, R.L., Eklof, B., Masuda, E.M. 1996, „Diagnosis of chronic venous diseases of the lower extremities: the „CEAP“ classification“, *Mayo Clin Proc*, vol. 71, pp 338-345.
- Ladwig, A., 2008, „Zur Bewertung hämodynamischer Wirkungen von Kompressionsmaterialien“, Universitätshautklinik der Ernst-Moritz-Arndt Universität zu Greifswald.
- Latijnhouwers, M.A., Bergers, M., Van Bergen, B.H., Spruijt, K.I., Andriessen, M.P. & Schalkwijk, J. 1996, "Tenascin expression during wound healing in human skin", *Journal of Pathology*, vol. 178, no. 1, pp. 30-35.
- Lieber, C.S., Weiss, D.G. & Paronetto, F. 2008, "Value of fibrosis markers for staging liver fibrosis in patients with precirrhotic alcoholic liver disease", *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, vol. 32, no. 6, pp. 1031-1039.
- Lightner, V.A., Gumkowski, F., Bigner, D.D. & Erickson, H.P. 1989,
-

- "Tenascin/hexabrachion in human skin: Biochemical identification and localization by light and electron microscopy", *Journal of Cell Biology*, vol. 108, no. 6, pp. 2483-2493.
- Mackie, E.J., Halfter, W. & Liverani, D. 1988, "Induction of tenascin in healing wounds", *Journal of Cell Biology*, vol. 107, no. 6 II, pp. 2757-2767.
- Mansfeld, E. 2008, Einfluss der Mikroangiopathie auf die Expression der extrazellulären Matrixmoleküle bei Patienten mit chronischer venöser Insuffizienz“, Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald.
- Michel, C.C. 1990, "Oxygen diffusion in oedematous tissue and through pericapillary cuffs", *Phlebology*, vol. 5, no. 4, pp. 223-230.
- Midwood, K.S. & Orend, G. 2009, "The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis", *Journal of Cell Communication and Signaling*, vol. 3, no. 3-4, pp. 287-310.
- Pannier, F., Hoffmann, B., Stang, A., Jöckel, K.-. & Rabe, E. 2007, "Prevalence and acceptance of therapy with medical compression stockings: Results of the Bonn vein study", *Phlebologie*, vol. 36, no. 5, pp. 245-249.
- Partsch, H. 2006, "Effects of compression therapy of leg veins dependent upon pressure and material properties", *Vasomed*, vol. 18, no. 2, pp. 46-50.
- Partsch, H., Winiger, J., Lun, B. 2004, „Compression stockings reduce occupational leg swelling“, *Dermatol Surg* 2004; 30, pp 737-743.
- Partsch, H. 1985, "Pathogenesis of venous leg ulcers", *Hautarzt*, vol. 36, no. 4, pp. 196-202.
- Pas, J., Wyszko, E., Rolle, K., Rychlewski, L., Nowak, S., Zukiel, R. & Barciszewski, J. 2006, "Analysis of structure and function of tenascin-C", *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 38, no. 9, pp. 1594-1602.
- Peschen M., Vanscheidt, W. 1999, „Immunhistochemistry and molecular biology of skin with chronic venous insufficiency and venous ulceration“ *Prog. Appl Microcirc*, vol 23, pp. 165-179.
- Rabe, E. & Gerlach, H.E. 2006, *Praktische Phlebologie Empfehlungen zur differenzierten Diagnostik und Therapie phlebologischer Krankheitsbilder*, 2. Auflage edn, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Rabe, E., Pannier-Fischer, F., Broman, K., Schuldt, K., Stang, A., Poncar, C., Wittenhorst, M., Bock, E., Weber, S. & Jörkel, K.-. 2003, "Bonn Vein Study by the German Society of Phlebology: Epidemiological study to investigate the prevalence and severity of chronic venous disorders in the urban and rural residential populations", *Phlebologie*, vol. 32, no. 1, pp. 1-14.
-

- Raghunath, M., Bächli, T., Meuli, M., Altermatt, S., Gobet, R., Bruckner-Tuderman, L. & Steinmann, B. 1996, "Fibrillin and elastin expression in skin regenerating from cultured keratinocyte autografts: Morphogenesis of microfibrils begins at the dermo-epidermal junction and precedes elastic fiber formation", *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 106, no. 5, pp. 1090-1095.
- Ramirez, F. & Pereira, L. 1999, "The fibrillins", *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 31, no. 2, pp. 255-259.
- Ramirez, F. & Sakai, L.Y. 2010, "Biogenesis and function of fibrillin assemblies", *Cell and tissue research*, vol. 339, no. 1, pp. 71-82.
- REHADAT - Informationssystem zur beruflichen Rehabilitation 2010, „Hilfsmittel bei Durchblutungsstörungen / Kompressionsversorgung für Bein und Fuß / Kompressionsstrumpf“, Online: <http://www.rehadat.de/rehadat/Reha.KHS?Db=0&State=340&SORT=T05&GIX=D/00535>, Zugriff am 22.08.2010.
- Sakai, L.Y., Keene, D.R. & Engvall, E. 1986, "Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils", *Journal of Cell Biology*, vol. 103, no. 6 I, pp. 2499-2509.
- Schalkwijk, J., Steijlen, P.M., Van Vlijmen-Willems, I.M.J.J., Oosterling, B., Mackie, E.J. & Verstraeten, A.A. 1991, "Tenascin expression in human dermis is related to epidermal proliferation", *American Journal of Pathology*, vol. 139, no. 5, pp. 1143-1150.
- Schild, A.D. 2001, „Immunfluoreszenzhistochemische Untersuchungen der Expression von Laminin, Fibronectin, Tenascin und der Kollagene I, III, IV und VI während der einzelnen Stadien der chronisch venösen Insuffizienz“, Universitätshautklinik der Albert-Ludwigs Universität Freiburg i.Br.
- Sippel, K. & Jünger, M. 2006, "Compression therapy for varicose veins and chronic venous insufficiency: Basic principles and effectiveness", *Gefasschirurgie*, vol. 11, no. 3, pp. 203-216.
- Spilker, G., Tolsdorf-Kremmer, A. & Küppers, S. 2002, "4.2 Kompressionstherapie" in *Handbuch der Verbrennungstherapie*, eds. J.C. Bruck, F.E. Müller. & M. Steen, 1. edn, ecomed Verlagsgesellschaft AG und Co KG, Landsberg, pp. 353-365.
- Tamaoki, M., Imanaka-Yoshida, K., Yokoyama, K., Nishioka, T., Inada, H., Hiroe, M., Sakakura, T. & Yoshida, T. 2005, "Tenascin-C regulates recruitment of myofibroblasts during tissue repair after myocardial injury", *American Journal of Pathology*, vol. 167, no. 1, pp. 71-80.
- Van der Molen H. 1957 „Über die chronische venöse Insuffizienz. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Venenerkrankungen“ Stuttgart: Schattauer; pp. 41-59.

- Vayssairat, M., Ziani, E. & Houot, B. 2000, "Placebo controlled efficacy of class 1 elastic stockings in chronic venous insufficiency of the lower limbs", *Journal des maladies vasculaires*, vol. 25, no. 4, pp. 256-262.
- Veraart J., Verhaegh M., Neumann HAM., Hulsmanns. E, Arends J. 1993
"Adhesion molecule expression in venous leg ulcers", *Vasa*. No 22, pp 213-219.
- Vignale, R., Panuncio, A., Saralegui, P., Di Matteo, C. & Civila, E. 2004,
"Histopathological studies in lipodermatosclerosis associated with venous hypertension. Pathophysiological considerations", *Medicina cutanea ibero-latino-americana*, vol. 32, no. 3, pp. 111-116.
- Vollert, B., Galler, S., Klyszcz, T., Hahn, M., Steins, A. & Junger, M. 1998,
"Influence of compression therapy in patients with skin microcirculation in chronic venous insufficiency", *Vasomed*, vol. 10, no. SUPPL. AUG., pp. 182-186.
- Wang, J., Zohar, R. & McCulloch, C.A. 2006, "Multiple roles of α -smooth muscle actin in mechanotransduction", *Experimental cell research*, vol. 312, no. 3, pp. 205-214.
- Welt, K., Gall, N., Sindrilaru, A. & Scharffetter-Kochanek, K. 2005,
"Pathogenesis of the chronic ulcer cruris venosum", *Phlebologie*, vol. 34, no. 2, pp. 81-86.
- Widmer LK, Stählin HB, Nissen C, Da Silva (Hrsg), „Venen-, Arterien-Krankheiten, koronare Herzkrankheit bei Berufstätigen, Prospektiv-epidemiologische Untersuchung Baseler Studie I-III 1959-1978.“ Verlag Hans Huber Bern, Stuttgart, Wien 1978.
- Wienert, V., Gerlach, H., Gallenkemper, G., Kahle, B., Marshall, M., Rabe, E., Stenger, D., Stücker, M., Waldermann, F. & Zabel, M. 2006, Aktualisiert: 15.10.2006, *Leitlinien: Medizinischer Kompressionsstrumpf (MKS) Version: 15.10.2006* [Homepage of Deutsche Gesellschaft für Phlebologie], Online: <http://www.phlebology.de/Deutsche-Gesellschaft-fur-Phlebologie/leitlinie-medicinischer-kompressionsstrumpf-mks-version-15102006.html>, Zugriff am: 06.08.2010.
- Zhang, H., Apfelroth, S.D., Hu, W., Davis, E.C., Sanguineti, C., Bonadio, J., Mecham, R.P. & Ramirez, F. 1994, "Structure and expression of fibrillin-2, a novel microfibrillar component preferentially located in elastic matrices", *Journal of Cell Biology*, vol. 124, no. 5, pp. 855-863.

7. Anhang

7.1 Verwendete Chemikalien

NaCl	Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Artikelnr.: 9265.1
Trizma base	Fa. Sigma-Aldrich, München, Deutschland Artikelnr.: T1503
Trizma hydrochloride	Fa. Sigma-Aldrich, München, Deutschland Artikelnr.: T3253
2-Amino-2-methly-1,3-propandiol	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland Artikelnr.: 8.01464.0250
(-)-Tetramisole hydrochloride	Fa. Sigma-Aldrich, München, Deutschland Artikelnr.: L-9756
Na-Nitrit	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland Artikelnr.: F-0220
Naphtol-As-Bi-Phosphat	Fa. Sigma-Aldrich, München, Deutschland Artikelnr.: N2250
Elastase pancreatic from porcine pancreas	Fa. Sigma-Aldrich, München, Deutschland Artikelnr.: E6883
Proteinase, bacterial	Fa. Sigma-Aldrich, München, Deutschland Artikelnr.: P8038
Glyceringelatine	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland Artikelnr.: 1.09242
HCl	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland Artikelnr.: 1.09063.1000
N,N-Dimethylformamid	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland Artikelnr.: 3034
Rabbit-Anti-Mouse Immunglobulin	Fa. Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland Artikelnr.: Z0259
Mouse-Anti-Rabbit-Immunglobulin	Fa. Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland Artikelnr.: M0737
APAAP, mouse, monoclonal	Fa. Dako Deutschland GmbH,

7. Anhang

Dako ChemMate, antibody diluent	Hamburg, Deutschland Artikelnr.: D0651 Fa. Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland Artikelnr.: S2022
Hämalaun, sauer nach Mayer	Division Chroma, Waldeck GmbH, Münster, Deutschland Artikelnr.: 2E038
Dinatriumhydrogenphosphat	Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Artikelnr.: 4984.1
Natriumdihydrogenphosphat	Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Artikelnr.: K300.2
Natrium-Acetat	Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Artikelnr.: 6773.2
Kalium-Acetat	Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Artikelnr.: T874.1
Sonstige Materialien	
Superfrost Plus Objektträger	Hassa Werner GmbH, Lübeck, Deutschland Artikelnr.: J1800AMNZ
Menzel-Deckgläschen	Fa. Menzel, Braunschweig, Deutschland 24*60mm
Aqua dest.	
PBS	NaCl 45g Dinatriumhydrogenphosphat*H ₂ O 8,7g Natriumdihydrogenphosphat*H ₂ O 0,9g Aqua dest. 5000ml mit Orthophosphorsäure auf pH 7,2 einstellen
Protease lösen in	10mmol Na-Acetat (MG 82,03) 5mmol Ka-Acetat (MG 98,15) pH= 7,5 0,1-1 mg/ml
Elastase	Stammlösung von 0,2-,05 Units in 100mmol Tris-HCl pH= 8,0 1mg/ml

7.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen der Stadien C2 und C4

Tabelle 13: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen für Tenascin C in den Hautproben der Patienten im Stadium C2

Proband	klinisches Erscheinungsbild	Hautprobe	Ergebnis der Färbungen
A1	diskrete Varizen am Unterschenkel	Nr. 1	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
A2	stark geschlängelte sichtbare Varizen am gesamten Bein	Nr. 1	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
A3	gering sichtbare Varizen am Unterschenkel	Nr. 1	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
A4	gering sichtbare Varizen am Unterschenkel	Nr. 1	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände

Fortsetzung Tabelle 13: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen für Tenascin C in den Hautproben der Patienten im Stadium C2

Proband	klinisches Erscheinungsbild	Hautprobe	Ergebnis der Färbungen
B1	gering sichtbare Varizen am Unterschenkel, Corona phlebectatica	Nr. 1	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände, an einer Stelle perivaskuläre Anfärbung
		Nr. 2	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
B2	gering sichtbare Varizen am Unterschenkel, Corona phlebectatica	Nr. 1	schwache diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung dermalen Gefäße
		Nr. 2	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung entlang dermalen Gefäße
		Nr. 3	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung entlang dermalen Gefäße
B3	diskrete Varizen am Unterschenkel	Nr. 1	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung entlang dermalen Gefäße
		Nr. 2	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung entlang dermalen Gefäße
		Nr. 3	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung entlang dermalen Gefäße
B4	retikuläre Varizen am Unterschenkel, Corona phlebectatica	Nr. 1	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung entlang dermalen Gefäße
		Nr. 2	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung entlang dermalen Gefäße
		Nr. 3	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung entlang dermalen Gefäße

Fortsetzung Tabelle 13: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen für Tenascin C in den Hautproben der Patienten im Stadium C2

Proband	klinisches Erscheinungsbild	Hautprobe	Ergebnis der Färbungen
C1	gering sichtbare Varizen am Unterschenkel, Corona phlebectatica	Nr. 1	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung entlang dermalen Gefäße
		Nr. 2	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung entlang dermalen Gefäße
		Nr. 3	schwache kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung entlang dermalen Gefäße
C2	stark geschlängelte sichtbare Varizen am gesamten Bein	Nr. 1	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung entlang dermalen Gefäße
		Nr. 2	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung entlang dermalen Gefäße
		Nr. 3	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung entlang dermalen Gefäße
C3	gering sichtbare Varizen am Unterschenkel	Nr. 1	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung entlang dermalen Gefäße
		Nr. 2	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung entlang dermalen Gefäße
		Nr. 3	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung entlang dermalen Gefäße
C4	stark geschlängelte sichtbare Varizen am gesamten Bein	Nr. 1	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung entlang dermalen Gefäße
		Nr. 2	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung entlang dermalen Gefäße
		Nr. 3	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung entlang dermalen Gefäße

Tabelle 14: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen für Tenascin C in Hautproben von Patienten im Stadium C4

Proband	klinisches Erscheinungsbild	Hautprobe	Ergebnis der Färbung
A1	beginnende Sklerose	Nr. 1	deutliche Anfärbung in der papillären und oberen retikulären Dermis, entlang der dermalen Gefäße
		Nr. 2	verbreiterte Anfärbung in der papillären Dermis, vor allem in der Umgebung von Gefäßen
		Nr. 3	verbreiterte Anfärbung entlang der Basalmembran, vor allem in der Umgebung von Gefäßen
A2	Hyperpigmentierung, sichtbare Varizen	Nr. 1	diskontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	kontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	diskontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
A3	Hyperpigmentierung, beginnende Sklerose	Nr. 1	nicht angefärbt
		Nr. 2	verbreiterte Anfärbung in der papillären Dermis, vor allem in der Umgebung von Gefäßen
		Nr. 3	verbreiterte Anfärbung in der papillären Dermis, vor allem in der Umgebung von Gefäßen
A4	Dermatoliposklerose	Nr. 1	verbreiterte Anfärbung in der papillären Dermis, vor allem in der Umgebung von Gefäßen, beginnende punktuelle Anfärbung in der tiefen Dermis
		Nr. 2	diskontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	deutliche fibrilläre Anfärbung in der tiefen Dermis, vor allem perivaskulär, verbreiterte Anfärbung in der papillären Dermis

Fortsetzung Tabelle 14: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen für Tenascin C in Hautproben von Patienten im Stadium C4

Proband	klinisches Erscheinungsbild	Hautprobe	Ergebnis der Färbung
B1	beginnende Sklerose, Hyperpigmentierung	Nr. 1	kontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	kontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, verbreitert in der Umgebung von Gefäßen
		Nr. 3	gering verbreiterte Anfärbung entlang der Basalmembran, deutliche Anfärbung in der tiefen Dermis, vor allem perivaskulär
B2	Hyperpigmentierung	Nr. 1	diskontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	diskontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	diskontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
B3	Dermatoliposklerose, Stauungsekzem	Nr. 1	verbreiterte Anfärbung in der papillären Dermis, vor allem in der Umgebung von Gefäßen, punktuell verwaschen in der tiefen Dermis
		Nr. 2	deutliche fibrilläre Anfärbung der gesamten Dermis
		Nr. 3	deutliche Anfärbung der gesamten Dermis, überwiegend verwaschenes Muster
B4	Hyperpigmentierung, beginnende Sklerose	Nr. 1	kontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Studie abgebrochen
		Nr. 3	Studie abgebrochen

Fortsetzung der Tabelle 14: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen für Tenascin C in Hautproben von Patienten im Stadium C4

Proband	klinisches Erscheinungsbild	Hautprobe	Ergebnis der Färbung
C1	Hyperpigmentierung, beginnendes Stauungsekzem	Nr. 1	diskontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	kontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	diskontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
C2	Stauungsekzem	Nr. 1	diskontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	nicht angefärbt
		Nr. 3	diskontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
C3	Stauungsekzem	Nr. 1	nicht angefärbt
		Nr. 2	verbreiterte Anfärbung in der papillären Dermis, vor allem in der Umgebung von Gefäßen
		Nr. 3	deutliche Anfärbung in der papillären und retikulären Dermis, vor allem perivaskulär
C4	Dermatoliposklerose	Nr. 1	kontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	verbreiterte Anfärbung in der papillären Dermis, vor allem in der Umgebung von Gefäßen
		Nr. 3	verbreiterte Anfärbung entlang der Basalmembran, vor allem in der Umgebung von Gefäßen

Tabelle 15: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen für Fibrillin 2 in den Hautproben der Patienten im Stadium C2

Proband	klinisches Erscheinungsbild	Hautprobe	Ergebnis der Färbungen
A1	diskrete Varizen am Unterschenkel	Nr. 1	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
A2	stark geschlängelte Varizen am gesamten Bein	Nr. 1	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
A3	gering sichtbare Varizen am Unterschenkel	Nr. 1	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
A4	diskrete Varizen am Unterschenkel	Nr. 1	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	schwache diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände

Fortsetzung Tabelle 15: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen für Fibrillin 2 in den Hautproben der Patienten im Stadium C2

Proband	klinisches Erscheinungsbild	Hautprobe	Ergebnis der Färbungen
B1	gering sichtbare Varizen am Unterschenkel, Corona phlebectatica	Nr. 1	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände, an einer Stelle perivaskuläre Anfärbung
		Nr. 2	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
B2	gering sichtbare Varizen am Unterschenkel	Nr. 1	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	schwache kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
B3	gering sichtbare Varizen am Unterschenkel, Corona phlebectatica	Nr. 1	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
B4	retikuläre Varizen, Corona phlebectatica	Nr. 1	schwache kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran und Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran und Anfärbung der Gefäßwände

Fortsetzung Tabelle 15: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen für Fibrillin 2 in den Hautproben der Patienten im Stadium C2

Proband	klinisches Erscheinungsbild	Hautprobe	Ergebnis der Färbungen
C1	gering sichtbare Varizen am Unterschenkel, Corona phlebectatica	Nr. 1	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	kontinuierliche an einigen Stellen leicht verbreiterte Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
C2	stark geschlängelte Varizen am gesamten Bein	Nr. 1	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
C3	gering sichtbare Varizen am Unterschenkel	Nr. 1	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
C4	stark geschlängelte Varizen am gesamten Bein	Nr. 1	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	diskontinuierliche Anfärbung entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	kontinuierliche Anfärbung entlang der gesamten Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände

Tabelle 16: Ergebnis der immunhistochemischen Färbungen für Fibrillin 2 in den Hautproben von Patienten im Stadium C4

Proband	klinisches Erscheinungsbild	Hautprobe	Ergebnis der Färbung
A1	beginnende Sklerose	Nr. 1	deutliche Anfärbung in der papillären und oberen retikulären Dermis, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	verbreiterte Anfärbung in der papillären Dermis, vor allem in der Umgebung von Gefäßen
		Nr. 3	verbreiterte Anfärbung entlang der Basalmembran, vor allem in der Umgebung von Gefäßen
A2	Hyperpigmentierung, sichtbare Varizen	Nr. 1	diskontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	kontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	diskontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
A3	Hyperpigmentierung, beginnende Sklerose	Nr. 1	nicht angefärbt
		Nr. 2	verbreiterte Anfärbung in der papillären Dermis, vor allem in der Umgebung von Gefäßen
		Nr. 3	verbreiterte Anfärbung in der papillären Dermis, vor allem in der Umgebung von Gefäßen
A4	Dermatoliposklerose	Nr. 1	verbreiterte Anfärbung in der papillären Dermis, vor allem in der Umgebung von Gefäßen, beginnende punktuelle Anfärbung in der tiefen Dermis
		Nr. 2	diskontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	deutliche fibrilläre Anfärbung in der tiefen Dermis, vor allem perivaskulär, verbreiterte Anfärbung in der papillären Dermis

Fortsetzung Tabelle 16: Ergebnis der immunhistochemischen Färbungen für Fibrillin 2 in den Hautproben von Patienten im Stadium C4

Proband	klinisches Erscheinungsbild	Hautprobe	Ergebnis der Färbung
B1	beginnende Sklerose, Hyperpigmentierung	Nr. 1	kontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	kontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, verbreitert in der Umgebung von Gefäßen
		Nr. 3	gering verbreiterte Anfärbung entlang der Basalmembran, deutliche Anfärbung in der tiefen Dermis, vor allem perivaskulär
B2	Hyperpigmentierung	Nr. 1	diskontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	diskontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	diskontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
B3	Dermatoliposklerose, Stauungsekzem	Nr. 1	verbreiterte Anfärbung in der papillären Dermis, vor allem in der Umgebung von Gefäßen, punktuell verwaschen in der tiefen Dermis
		Nr. 2	deutliche fibrilläre Anfärbung der gesamten Dermis
		Nr. 3	deutliche Anfärbung der gesamten Dermis, überwiegend granuläres Muster
B4	Hyperpigmentierung, beginnende Sklerose	Nr. 1	kontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Studie abgebrochen
		Nr. 3	Studie abgebrochen

Fortsetzung Tabelle 16: Ergebnis der immunhistochemischen Färbungen für Fibrillin 2 in den Hautproben von Patienten im Stadium C4

Proband	klinisches Erscheinungsbild	Hautprobe	Ergebnis der Färbung
C1	Hyperpigmentierung, beginnendes Stauungsekzem	Nr. 1	diskontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	kontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	diskontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
C2	Stauungsekzem	Nr. 1	diskontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	nicht angefärbt
		Nr. 3	diskontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
C3	Stauungsekzem	Nr. 1	nicht angefärbt
		Nr. 2	verbreiterte Anfärbung in der papillären Dermis, vor allem in der Umgebung von Gefäßen
		Nr. 3	deutliche Anfärbung in der papillären und retikulären Dermis, vor allem perivaskulär
C4	Dermatoliposklerose	Nr. 1	kontinuierlicher Streifen entlang der Basalmembran, Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	verbreiterte Anfärbung in der papillären Dermis, vor allem in der Umgebung von Gefäßen
		Nr. 3	verbreiterte Anfärbung entlang der Basalmembran, vor allem in der Umgebung von Gefäßen

Tabelle 17: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen für α -Smooth Muscle Aktin in den Hautproben der Patienten im Stadium C2

Proband	klinisches Erscheinungsbild	Hautprobe	Ergebnis der Färbungen
A1	diskrete Varizen am Unterschenkel	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände
A2	stark geschlängelte Varizen am gesamten Bein	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände
A3	gering sichtbare Varizen am Unterschenkel	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände
A4	gering sichtbare Varizen am Unterschenkel	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände
B1	gering sichtbare Varizen am Unterschenkel, Corona phlebectatica	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände
B2	gering sichtbare Varizen am Unterschenkel, Corona phlebectatica	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände
B3	diskrete Varizen am Unterschenkel	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände
B4	retikuläre Varizen am Unterschenkel, Corona phlebectatica	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände
C1	gering sichtbare Varizen am Unterschenkel, Corona phlebectatica	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände
C2	stark geschlängelte Varizen am gesamten Bein	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände
C3	gering sichtbare Varizen am Unterschenkel	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände
C4	stark geschlängelte Varizen am gesamten Bein	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände

Tabelle 18: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen für α -Smooth Muscle Aktin in den einzelnen Hautproben bei Patienten im Stadium C4

Proband	klinisches Erscheinungsbild	Hautprobe	Ergebnis der Färbung
A1	beginnende Sklerose	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände
A2	Hyperpigmentierung, sichtbare Varizen	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände
A3	Hyperpigmentierung, beginnende Sklerose	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände
A4	Dermatoliposklerose	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände
B1	beginnende Sklerose, Hyperpigmentierung	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände
B2	Hyperpigmentierung	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände
B3	Dermatoliposklerose, Stauungsekzem	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände
B4	Hyperpigmentierung, beginnende Sklerose	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Studie abgebrochen
		Nr. 3	Studie abgebrochen
C1	Hyperpigmentierung, beginnendes Stauungsekzem	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände
C2	Stauungsekzem	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	nicht angefärbt
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände
C3	Stauungsekzem	Nr. 1	nicht angefärbt
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände
C4	Dermatoliposklerose	Nr. 1	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 2	Anfärbung der Gefäßwände
		Nr. 3	Anfärbung der Gefäßwände

8. Danksagung

Bei der Planung, Durchführung und Auswertung dieser klinisch-experimentellen Arbeit haben mich viele Personen unterstützt, denen ich an dieser Stelle danken möchte.

Mein Dank gilt Frau PD Dr. Birgit Kahle für die Überlassung des Themas, die fachliche Betreuung bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit, sowie die Unterstützung bei der Bewerbung um das Stipendium der Deutschen Gesellschaft für Phlebologie und der Bauerfeind AG.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Brinckmann, der mir während dieser Arbeit immer beratend zur Seite stand.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck, die mich trotz des anstrengenden Klinikalltags immer unterstützt und mir ihre Hilfe angeboten haben. Hervorheben möchte ich Dr. Nina Tetsch, Nina Schumacher und Dr. Anna-Lena Recke.

Für die Einarbeitung im Labor und die fachliche Unterstützung während der experimentellen Arbeit sage ich besonders Frau Atefi Dank. Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern der dermatologischen Forschung und des Histologie Labors.

Bei der Firma Bauerfeind AG, Zeulenroda-Triebes, und der Deutschen Gesellschaft für Phlebologie bedanke ich mich für die Gewährung eines Stipendiums hinsichtlich der vorliegenden Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt natürlich meiner Familie, die mich mit viel Geduld, Verständnis und Zuspruch während der gesamten Arbeit begleitet und unterstützt hat.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinem Freund Christian Huber und meiner Freundin Christina Loley für die Hilfe am Layout der Arbeit.

10. Eigene Publikationen

Gerdes, O., Brinckmann J., Zilikens, D., Kahle, B. 2012 „Lässt sich die Expression von EZM Proteinen durch Kompression beeinflussen?“, *Phlebologie*, vol. 41, no. 3, pp. 121-127

Gerdes, O., Brinckmann J., Zilikens, D., Kahle, B. 2010, „Veränderungen der Extrazellulärmatrix bei verschiedenen Stadien der CVI“, Poster auf der 52. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Phlebologie, Aachen 2010

Gerdes, O., Brinckmann J., Zilikens, D., Kahle, B. 2010, „Veränderungen der Extrazellulärmatrix bei CVI“ Vortrag auf der 52. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Phlebologie, Aachen 2010