

1. Einleitung

1.1. Das Plattenepithelkarzinom des oberen Aerodigestivtraktes

1.1.1. Definition

Das Plattenepithelkarzinom -im folgenden PEC genannt- ist ein maligner, epithelialer Tumor. Es geht nicht nur von Organen aus, die normalerweise Plattenepithelien enthalten, sondern kommt auch in Organen vor, die zwar kein Plattenepithel, dafür aber ein Epithel mit der Fähigkeit zur Plattenepithelmetaplasie enthalten.

Solche Karzinome weisen ein typisches Zytokeratin - Zytoskelett auf und ahmen das verhornende Plattenepithel nach, was ihnen je nach Differenzierungsgrad auch in unterschiedlichem Maße gelingt (Riede, 1995).

1.1.2. Einteilung

Sie lassen sich nach verschiedenen Kriterien einteilen:

Für die Malignitäts-Wertung ist histologisch das Grading wichtig. Generell gilt: je höher der Differenzierungsgrad, desto niedriger die Wachstumsintensität und damit die Malignität (Grundmann, 1996).

Klinisch lässt sich eine exophytische und eine endophytische Wachstumsform unterscheiden.

Beim exophytischen Wachstum zeigen sich papilläre, polypöse, ulzerierende oder zystische Tumorformationen.

Beim endophytischen Wachstum zeigen sich multizentrische oder diffuse Tumorformationen (Riede, 1995).

Klinisch besteht ein harter, oft schmerzlos wachsender Tumor mit meist frühzeitiger lymphogener Metastasierung. Die Therapie besteht in der chirurgischen Exzision im Gesunden mit histologischer Kontrolle, Untersuchung der regionären Lymphknoten und gegebenenfalls einer Bestrahlung.

Je nach Lokalisation im oberen Aerodigestivtrakt lassen sich folgende Formen unterscheiden:

Beim PEC der Nasenschleimhaut sind pathogenetisch Nickel und Holzstaub besonders hervorzuheben. Nickel ruft über eine chronische Rhinitis und Plattenepithelmetaplasie schließlich eine Plattenepitheldysplasie hervor, die in ein PEC übergehen kann.

Ähnliches gilt für den Holzstaub (Riede, 1995).

Am Plattenepithelkarzinom der Nasennebenhöhlen erkranken Männer dreimal häufiger als Frauen. Erste Symptome bei bereits fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung sind: Doppelbilder bei Einbruch in die Orbita, einseitig behinderte Nasenatmung, Ausfluss von eitrigem, mit Blut vermishtem Sekret. Auf Grund der oft erst späten Diagnose beträgt die 5-Jahre-Überlebenszeit lediglich 35 Prozent (Boenninghaus, 1996).

Das Mundschleimhautkarzinom ist der weitaus häufigste bösartige Tumor im Bereich der Mundhöhle. Sein Malignitätsgrad nimmt von vorn nach hinten sowie von oben nach unten zu. Über die Hälfte aller Fälle treten im unteren Mundhöhlenbereich auf. Das Mundbodenkarzinom entwickelt sich vorwiegend im vorderen Teil des Sulcus glossoalveolaris. Es befällt bevorzugt das männliche Geschlecht und tritt vom sechsten Lebensjahrzehnt an auf. Regionäre Metastasierung finden sich schon bei initialem Geschwulstwachstum in etwa zwei Drittel der Fälle. Therapeutisch lassen sich sehr radikale und leider verstümmelnde Eingriffe unter gleichzeitiger Einbeziehung des regionären Lymphabflussgebietes und großzügiger Mitnahme von Teilen der Zunge und des Kiefers meist nicht umgehen (Grimm, 1990).

Das Karzinom der Zunge entsteht in erster Linie am Zungenrand, seltener an Zungenrücken und an der Zungenspitze. Bevorzugt befallen sind Männer vom 40. Lebensjahr an. Die ulzerierende, betont endophytisch in den Zungenmuskel infiltrierende Geschwulst ist die häufigere. Ein Frühsymptom der Tumorausbreitung ist der zum Ohr ausstrahlende neuralgiforme Schmerz. Einen positiven Lymphknoten-Befund trifft man im Durchschnitt bei 70 Prozent der Fälle. Häufig sind die Lymphknoten auf beiden Seiten befallen, was in die Therapieplanung miteinbezogen werden muss (Grimm, 1990).

Der Nasopharynx gilt als stille Ecke der malignen Neoplasien, weil seine primären Tumoren klein und symptomlos bleiben, bis sie durch Metastasen auf sich aufmerksam machen. Das nasopharyngeale Plattenepithelkarzinom ist zwar auf der westlichen Hemisphäre selten, kommt aber gehäuft in Afrika und China vor.

Zu dieser offensichtlich ethnischen Prädisposition kommt noch eine virale Genese hinzu, zumal diese Patienten hohe Antikörper-Titer gegen Epstein-Barr-Viren aufweisen. Es breitet sich rasch lymphogen aus und ist außerordentlich strahlensensibel (Riede, 1995). Die 5-Jahre-Überlebenszeit beträgt nur 15 Prozent (Boenninghaus, 1996). Das häufigste Plattenepithelkarzinom des Oropharynx ist das Tonsillenkarzinom (Riede, 1995). Es besteht eine Ulzeration und ein geschwüriger Zerfall der Tonsille. Bei Palpation erscheint die Tonsille verhärtet. Ein Übergreifen auf Gaumenbögen, weichen Gaumen und vor allem Zungengrund verschlechtert die Prognose erheblich. Frühzeitig entsteht eine Metastasierung in den Kieferwinkellymphknoten. Therapie der Wahl ist die Tonsillektomie mit Einschluss der Gaumenbögen und eventuell Teilen des Zungengrundes, bei Inoperabilität Radio-Chemotherapie. Bei Karzinometastasen erfolgen zusätzlich Neck dissection und Nachbestrahlung (Boenninghaus, 1996).

Das Hypopharynxkarzinom zeichnet sich durch uncharakteristische Symptome aus wie Kloß - oder Fremdkörpergefühl. Häufig werden zuerst die Lymphknotenmetastasen am Kieferwinkel bemerkt. Heiserkeit entsteht erst beim Übergreifen auf den Aryknorpel. Die Prognose ist schlecht aufgrund der uncharakteristischen Symptome und der sehr frühen Metastasierung.

Das Plattenepithelkarzinom macht 98 Prozent der Larynx-Karzinome aus. Diese stellen etwa ein Prozent aller Organkrebse da. Sie kommen überwiegend bei Männern (männlich:weiblich = 10 : 1) in der sechsten Lebensdekade vor und sind in über der Hälfte der Fälle Stimmbandkarzinome. Molekularpathologisch scheint der recht häufige Verlust genetischen Materials auf dem Langarm des Chromosom 7 (del7q22q34) ein frühes Ereignis in der Karzinogenese zu sein und dürfte mit der Aktivierung des c-met-Protoonkogen auf dem Chromosom 7q31 in Verbindung stehen. Je nach Sitz des Larynx-Karzinoms liegt eine andere Lymphknotenbeteiligung und eine andere Prognose vor (Riede, 1995).

1.2. Bindungsarten zwischen Immunzellen untereinander und zu einer Zielzelle

Damit eine Immunreaktion stattfinden kann, müssen immunkompetente Zellen untereinander und zu Zielzellen Kontakt aufnehmen können. Dies geschieht mit Hilfe einer Vielzahl von Bindungen, die im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen. Es lassen sich drei unterschiedliche Bindungsarten unterscheiden. Jede erfüllt eine besondere Funktion und zur Ausführung der Zellfunktion ist das Zusammenspiel dieser drei Bindungen essenziell.

1.2.1. Zelladhäsionsmoleküle

Die initiale Interaktion von T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen wird durch Zelladhäsionsmoleküle vermittelt. Die Moleküle finden sich auf den meisten Lymphozyten, der extrazellulären Matrix, auf endothelialen und epithelialen Oberflächen. Sie scheinen eine Vorreiterrolle in der Zell-Zell-Adhäsion, Effektorzellmigration, Antigenerkennung und Aktivierung zu spielen. Eines dieser Moleküle, ICAM1 (interstitial adhesion molecule 1) hat eine zentrale Rolle in der Adhäsion und Aktivierung von T-Lymphozyten und somit deren cytotoxischen Aktivität. Unter normalen Bedingungen ist die Expression dieses Antigens gering. In entzündeten Gebieten jedoch steigt die Expression drastisch an. Ein anderes Zelladhäsionsmolekül ist das Lymphozyten-Funktions-assoziierte Antigen LFA. Es hat eine weite Verbreitung auf den Zellen des hämatopoetischen Systems, mit konstitutiver Expression auf den Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und natürlichen Killerzellen (NK). Die Bindung von ICAM1- LFA liefert somit eine Voraussetzung für die Kontaktaufnahme eines Lymphozyten zur Zielzelle und liefert ein starkes kostimulatorisches Signal. Ein weiteres bekanntes Paar dieser Molekülart ist CD 28 auf Lymphozyten und sein Ligand B 7 auf der antigenpräsentierenden Zelle. All diese Zelladhäsionsmoleküle liefern die Affinität der Bindungen.

1.2.2. antigenpräsentierende/antigenerkennende Rezeptoren

Die Spezifität des Zellkontaktes wird auf lymphozytärer Seite durch den entsprechenden T-Zell-Rezeptor oder B-Zell-Rezeptor erreicht. Die Antigenpräsentation wird durch die auf der Zelloberfläche lokalisierten MHC Moleküle vermittelt, wobei die Präsentation endogener Antigene via MHC 1 Rezeptor die Stimulation von CD 8 positiven Lymphozyten und die Präsentation exogener Antigene via MHC 2 Rezeptor eine Stimulation CD 4 positiver Lymphozyten bewirkt.

1.2.3. Korezeptoren

Dieses Signal wird durch Co-Rezeptoren, die an den gleichen Ligand binden verstärkt. So bindet der CD 4 Rezeptor an den MHC 2 Komplex , der CD 8 Rezeptor an MHC 1 Komplex.

(Janeway, 2001; Scher, 1993)

1.3. Immunsystem und Neoplasie

1.3.1. Das Konzept der Immunüberwachung

Eine wesentliche Aufgabe des Immunsystems besteht darin, Zellen, die als `Fremdlinge` in den Organismus eingedrungen oder als Tumorzellen `fremd` geworden sind, auszumerzen.

Burnet nannte die Fähigkeit des Immunsystems Tumorzellen aufzuspüren und zu zerstören „Immunüberwachung“ (Janeway, 2001). Dem Konzept der Tumorummunüberwachung zur Folge entstehen durch Mutation im Organismus dauernd Zellen mit abartigen Membranantigenen. Sie werden durch zytotoxische T-Zellen als fremd erkannt und ausgemerzt. Für dieses Konzept spricht die Beobachtung, dass Patienten mit angeborenen oder erworbenen Immundefekten im Vergleich zur Normalbevölkerung ein erhöhtes Tumorrisiko aufweisen (Riede, 1995). Bei den meisten Krebserkrankungen lassen sich zellgebundene und humorale Immunreaktionen gegen Tumorzellen feststellen :

1.3.2. Die Humorale Immunreaktion

Im Rahmen der Tumorummunität treten Antikörper auf, die gegen Tumor assoziierte Oberflächenantigene gerichtet sind. Bis zu einem gewissen Grade hemmen sie in einigen Fällen das Tumorwachstum, indem sie entweder als Komplement bindende Antikörper zytotoxisch gegen die Tumorzellen vorgehen oder indem sie die Tumorvernichtung durch Makrophagen vermitteln. In den meisten Fällen bewirken die humoralen Antikörper aber gerade das Gegenteil: sie bedecken die tumorspezifischen Membranantigene und machen sie für die cytotoxischen Zellen unkenntlich (Riede, 1995).

1.3.3. Die zellgebundene Immunreaktion

Die onkolytischen Effektorzellen können unterteilt werden in zwei Hauptkategorien. Die erste Kategorie wird repräsentiert von spezifischen cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL), die zweite von Effektorzellen des natürlichen Abwehrsystems, bekannt als natürliche Killerzellen.

Für die Wanderung und das Anheften von Lymphozyten an Zielzellen spielt die Lymphozytenadhäsion, basierend auf einer spezifischen Rezeptor-Ligand-Interaktion, zum Beispiel zwischen LFA 1 und ICAM 1, eine kritische Rolle.

Grundsätzlich bedarf die T-Zellen Erkennung als ein initiiertes Ereignis eine antigenunabhängige Adhäsion, vermittelt unter anderem von LFA und ICAM 1, zwischen der T-Zelle und der Ziel-/Stimulatorzelle. Nach der initialen Adhäsion liefert LFA ein starkes costimulatorisches Signal und ist in die Signaltransduktion involviert. (Kornfeld, 1993).

Erkennt ein CTL über seinen Rezeptor ein von MHC 1 dargebotenes Peptid und erhält auch noch kostimulatorische Signale, so sezerniert er Perforine und Granzyme. Dies zerstört die Zielzelle. Er kann aber auch indirekt durch Absonderung bestimmter Lymphokine zur Tumorzellvernichtung beitragen.

Natürliche Killerzellen benutzen mehrere unterschiedliche Rezeptoren, einschließlich lectinähnlicher aktivierender Rezeptoren oder Killerrezeptoren, die Kohlenhydrate auf Selbstzellen erkennen. Diese signalisieren ihnen zu töten. Eine andere Art von Rezeptoren jedoch, genannt killer inhibitory receptors (KIRs) erkennen MHC 1 Moleküle und hemmen die Aktivität von natürlichen Killerzellen durch Übertrumpfen der Aktivität der Killerrezeptoren. Dieses hemmende Signal geht verloren, wenn Zellen nicht MHC1 exprimieren. So sind Tumore, die um der Immunüberwachung zu entgehen weniger MHC 1 exprimieren, anfälliger gegenüber natürlichen Killerzellen (Lanier, 1996).

1.3.4.Gründe für das Versagen der Immunüberwachung

Die immunologische Tumorüberwachung kann aber auch aus folgenden Gründen versagen (Janeway, 2001):

- Die Tumorzellen sind von Anfang an nicht immunogen: Sie exprimieren kein fremdes Peptid:MHC Muster, keine Adhäsionsmoleküle (z.B. ICAM 1) oder keine kostimulatorischen Moleküle.
- Die Immunregulationsgene (HLA) werden fehlerhaft exprimiert.
- Antikörper gegen Tumorzelloberflächenantigene induzieren die Endozytose und Degradation des Antigens. Solche Tumorzellen besitzen einen Selektionsvorteil.
- Der Tumor lockt immunsuppressive CD34+ Progenitorzellen an (Young, 2001).

- Vom Tumor sezernierte Faktoren (z.B. TGF- β) supprimieren die T-Zell-Antwort.

1.3.5. Therapeutische Konzepte

Die oben erwähnten chirurgischen und strahlentherapeutischen Schemata gehen mit einer deutlich eingeschränkten Lebensqualität einher. Deshalb müssen neue Strategien gefunden werden.

Diese setzen direkt an den Gründen für das Versagen der Immunüberwachung an:

- So wurden erfolgreiche klinische Studien über den Einsatz von in vitro sensibilisierten Dendritischen Zellen in der Tumorthherapie publiziert. Diese konnten nach erfolgter Reinjektion das Tumorantigen an T-Lymphozyten präsentieren und somit eine Zytotoxische T-Zellantwort gegenüber dem Malignom initiieren (Schuler, 1997).
- Die Blockierung der Akkumulation von CD34+ Zellen in PEC z.B. durch Vitamin D3 (Young, 2001).
- Die exogene Zufuhr von Il-2 verbessert in in-vitro-Studien die antitumorale Immunantwort (Dawson, 1985).
- Als Kombination von all diesem die Impfung gegen Krebs , wie erfolgreich am Lymphom demonstriert (Bendani, 1999).

1.4. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist eine qualitative und quantitative Darstellung immunkompetenter Zellen in PEC des oberen Aerodigestivtraktes.

Darüber hinaus soll geklärt werden, ob bei unterschiedlichen Differenzierungsgraden des Tumors bestimmte Subpopulationen von Immunzellen vorherrschen oder nicht.

Hieraus soll ein Rückschluss auf die Zugrunde liegenden Abwehrmechanismen gezogen werden.

Als Hauptcharakteristikum für die zunehmende Entdifferenzierung dient uns die nachlassende Fähigkeit des Tumors eine Basalmembran zu bilden.

Daher soll in der folgenden Arbeit der Einfluss der Basalmembran auf das Entzündungsgeschehen untersucht, und somit der Frage nachgegangen werden, ob der Grenzzone Tumor-Stroma eine besondere immunologische Bedeutung zukommt.

2. Material und Methode

2.1. Gewebe und Lagerung

Insgesamt wurden 23 Larynx- und Hypopharynxkarzinome untersucht. Sofort nach Exzision wurde das Gewebe in Tissue- Tek (Miles Diagnostic) eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Bis zur weiteren Bearbeitung wurde das Gewebe bei minus 80 Grad Celsius gelagert.

2.2. Aufbereitung des Gewebes

An einem Kryostaten, Fabrikat Frygocut 2800 E der Firma Leica, Bernheim, wurden 4 µm dünne Gefrierschnitte angefertigt.

Nun wurden je 2 Schnitte auf einen Objektträger (76x26 mm) aufgebracht. Um ein Ablösen der Schnitte während des Färbeprozesses zu verhindern, wurden die Objektträger zuvor mit einer Lösung aus Poly-L-Lysin (0,01 %; Sigma Chemicals) beschichtet.

Danach wurden die Schnitte 2-3 Stunden vollständig angetrocknet.

Bis zur Färbung erfolgte die Aufbewahrung bei -80 Grad Celsius.

2.3. Färbeprozess

2.3.1. Verwendete Antikörper

Primärantikörper: Die verschiedenen Antigene wurden mit der indirekten Immunperoxidasetechnik dargestellt.

Hierzu wurden folgende monoklonale Antikörper verwendet (siehe Tabelle).

Firmenname	Verdünnung	Spezifität	Zielstruktur
Dako HLA-DR	1:800	HLA II subregionen DX,DQ	Langerhanszellen, Makrophagen, Endothelzellen, aktivierte T-Zellen, dendritische Zellen
Dako CD 1a	1:100	CD 1a heavy chains	Langerhanszellen, interdigitierende Zellen, corticale Thymozyten
Dako CD 4	1:80	CD 4	T-Helferzellen
Dako CD 8	1:800	CD 8	Zytotoxische T-Zellen
Dako Pan B	1:400	CD 22	B-Lymphozyten
Dako CD 14	1:200	CD 14	Im Blut: Monozyten, Granulozyten Im Stroma: Makrophagen und Langerhanszellen

Dako Anti-Human Collagen IV	1:100	Collagen IV	Basalmembranen
Dako Anti-Human ICAM1	1:100	CD 54	Endothelzellen, Leukozyten, Epithelzellen
Dako Anti-Human LFA-1	1:400	CD 11a	Leukozyten, v.a. T-Zellen
Dako Anti-Zytokeratin	1:100	Zytokeratin	Epithelzellen

Sekundärantikörper: Peroxidase-konjugiertes Anti-Maus-Immunglobulin (IgG) vom Kaninchen.

Tertiärantikörper: Peroxidase-konjugiertes Anti-Kaninchen-Immunglobulin (IgG) von der Ziege. Die Verdünnung erfolgte mit PBS (phosphat buffered serum) 0,01 M, pH 7,4.

2.3.2. verwendete Pufferlösungen

- 1) NaCl-Tris Puffer pH 7,4
- 2) NaCl-Tris Puffer pH 7,6

Für diese Lösungen wurden 9,0 l Aqua dest. und 81,0 g NaCl sowie separat 2,0 l Aqua dest. und 12,0 g Tris(hydroxymethylaminomethan) angesetzt.

Die Tris-Lsg. wird mit 1 n HCl auf pH 7,6 eingestellt. Davon werden 1000 ml zur weiteren Verwendung beiseite getan. Der Rest wird mit 1 n HCl auf einen pH von 7,4 eingestellt.

- 3) DAB-Lsg. :

Es werden hierfür 10 ml NaCl-Tris-Lsg. mit einem pH von 7,6 sowie 6 mg DAB (3,3Diaminobenzidintetrahydrochloridsäure) mit 5 µl H₂O₂ (30 %) direkt vor dem Auftragen auf das Gewebe gemischt.

2.3.3. Die Immunperoxidase-Färbung

- 1) Auftauen der Gewebeschnitte und vollständiges Trocknen bei Raumtemperatur für mindestens eine Stunde.
- 2) 10 minütiges Fixieren des Gewebes in Aceton.
- 3) Einmaliges Waschen der Schnitte mit NaCl-Tris Puffer pH 7,4 , danach Abkippen der überschüssigen Flüssigkeit.

- 4) Überschichten des Gewebes mit dem jeweiligen Primärantikörper und Inkubation des Gewebes für 30 Minuten in einer feuchten Kammer.
- 5) Abspülen des Primärantikörpers mit NaCl-Tris Puffer pH 7,4, danach wieder dreimaliges Spülen und Entfernen der überschüssigen Flüssigkeit vom Objektträger.
- 6) Überschichten der Schnitte mit dem Sekundärantikörper und Inkubation in der feuchten Kammer für 30 Minuten.
- 7) Dreimaliges Waschen mit NaCl-Tris Puffer pH 7,4 und Entfernen der überschüssigen Flüssigkeit.
- 8) Überschichten der Schnitte mit dem Tertiärantikörper und Inkubation in der feuchten Kammer für 30 Minuten.
- 9) Dreimaliges Waschen mit NaCl-Tris Puffer pH 7,4 , anschliesend einmaliges Waschen mit NaCl-Tris Puffer pH 7,6 und Entfernen der Restflüssigkeit.
- 10) Überschichten der Schnitte mit DAB Lösung und Inkubation in der feuchten Kammer für 10 Minuten unter Lichtabschluss.
- 11) Abkippen und Entsorgen der DAB-Lösung. Danach einmaliges Waschen mit NaCl-Tris Puffer pH 7,4 .
- 12) Waschen mit aqua destillata.
- 13) Überschichten der Schnitte mit Mayers Hämalaun (Merck Diagnostika, Darmstadt) für sechs Minuten.
- 14) Abkippen des Hämalauns und Wässern der Schnitte für 10 Minuten unter fließendem Wasser.
- 15) Waschen mit aqua destillata.
- 16) Abkippen und Entfernen der überschüssigen Flüssigkeit sowie Aufbringen der Deckgläser mit Kaisers Glyceringelatine.

2.4. Verwendete Mikroskope

- 1) Die Auswertung der Präparate wurde mit einem Leitz Mikroskop vorgenommen.

Okular	12,5x
Objektive	10x, 25x, 40x
- 2) Die Photographien wurden am gleichen Mikroskop mit der „ Color Video Camera 3 CCD „ der Firma Sony aufgenommen.

2.5. Einteilung

Einteilung der Blickfelder:

Die quantitative Auswertung erfolgte getrennt nach bindegewebigem und epithelialem Kompartiment. Hierzu wurden bei der kleinsten Vergrößerung jeweils 3 Gewebstücke in einer Diagonalen von links oben nach rechts unten festgelegt, die anschließend bei 500 x Vergrößerung mit einer Zählkammer der Größe 0,18 mm x 0,13 mm ausgezählt wurden. Nekrotische Areale wurden hierbei gemieden. Von diesen 3 Werten wurde der Mittelwert gebildet.

Einteilung der Basalmembran:

Die Beurteilung erfolgte bei kleinster Vergrößerung. Um eine anschauliche Darstellung zu erreichen wurde die Ausprägung in eine semiquantitative Darstellung gebracht, mit folgender Zuordnung:

- +++ Basalmembran (BM) weist einzelne kleine Lücken auf
- ++ >50% der Basalmembran erhalten
- + <50% der Basalmembran erhalten

BM fehlt oder nur kleinste Reststücke erhalten

Einteilung der ICAM 1 Färbung:

Auch hier erfolgte eine semiquantitative Darstellung.

- 3 mehr als 2/3 der Zellen positiv
- 2 1/3 bis 2/3 der Zellen positiv
- 1 weniger als 1/3 der Zellen positiv

In einem Fall war eine getrennte Bewertung von Tumor und Bindegewebe nicht möglich. Dieser Tumor wurde vom Ergebnis ausgeschlossen.

2.6. Patientendaten

Das Alter der Patienten lag zwischen 39 und 79 Jahren. Hiervon waren 22 männlich und 1 weiblich. Das Durchschnittsalter betrug 62,3 Jahre.

3. Ergebnisse

3.1. Vergleich Epithel-Bindegewebe

HLA-DR positive Zellen

Es ergab sich eine starke Anfärbung im Bindegewebe (siehe Graphik 1). Die Intensität der Färbung war jedoch vergleichsweise schwach. Verschiedene Zellmorphologien waren zu erkennen: im Epithel die als Langerhanszellen zu identifizierenden, mit deutlichen dendritischen Fortsätzen und perlschnurartigen Formationen. Daneben vereinzelte als Lymphozyten zu identifizierende kleine runde Zellen mit schmalen Zytoplasmasaum. Im Bindegewebe eine Kombination von beiden, sowie große kubisch bis ovale Zellen, die von der Morphologie her Makrophagen ähnelten. Insgesamt zeigte sich gehäuftes Auftreten entlang der Basalmembran sowie vereinzelt clusterförmige Ansammlungen (siehe Bild 1).

CD 1a positive Zellen

Diese Zellart war die einzige, die im epithelialen Kompartiment überwog (siehe Graphik 1). Der überwiegende Teil zeigte deutliche dendritische Zellausläufer. In den basalen Schichten des Epithels zeigte sich vorwiegend eine Ausrichtungen senkrecht zur Basalmembran, zum Teil waren die positiv gefärbten Zellen dort perlschnurartig aneinandergereiht. Eine Ausrichtung parallel zu den Epithelzellen war in den superfiziellen Zellschichten zu beobachten. Im Bindegewebe ließen sich ebenso dendritische Ausläufer beobachten, nicht jedoch eine bevorzugte Lokalisation oder Morphologie (siehe Bild 2).

CD 4 positive Zellen

Es fand sich eine klare Mehrfärbung im bindegewebigen Kompartiment (siehe Graphik 1). Diese kleinen runden Zellen ließen einen deutlich gefärbten, sehr schmalen Zytoplasmasaum um einen runden Kern erkennen. Sie waren häufig in unmittelbarer Nähe der Basalmembran gelegen. Des Weiteren zeigte sich eine Tendenz dieser Zellen, sich vor allem diffus ins Stroma abtropfenden Tumorzellennestern anzulegen (siehe Bild 3).

CD 8 positive Zellen

Auch diese kleinen runden Zellen ließen einen deutlich gefärbten, sehr schmalen Zytoplasmasaum um einen runden Kern erkennen.

Das Epithel-Stroma-Verhältnis betrug ungefähr eins zu zwei. Im Gegensatz zu den CD 1a positive Zellen behielt diese Zellart ihr morphologisches

Aussehen stets bei -unabhängig ob sie sich in superfiziellen oder basalen Epithelschichten oder dem Bindegewebe färbte. Es ergaben sich drei verschiedene Verteilungsmuster:

Ein Teil der Zellen zeigte einen engen Kontakt zur Basalmembran, lag den Tumorzellenformationen klettenartig an, beziehungsweise hielt sich in den basalsten Epithelschichten auf. Ein anderer Teil zeigte eine deutliche clusterförmige Ansammlung vor allem im Stroma. Der Rest war diffus über das Präparat verteilt (siehe Bild 4 und 5).

Pan B positive Zellen

Die Morphologie dieser Zellen entsprach den zwei vorherigen Zellarten. Es zeigte sich eine deutliche Mehrfärbung im Bindegewebe (siehe Graphik 1), wobei sich die Zellen häufig zu subbasal gelegenen Clustern formierten.

CD 14 positive Zellen

Wir fanden eine Mehrfärbung im bindegewebigen Kompartiment (siehe Graphik 1). Von der Form her hatten die Zellen ein ovales bis kubisches Aussehen. Ein kleiner Teil wies dendritische Zellausläufer auf, die sich in Richtung Tumor erstreckten. In der Verteilung war kein besonderes Muster zu erkennen: die Zellen waren diffus über das Präparat verteilt (siehe Bild 6).

Zytokeratin

Mit dieser Färbung stellten wir das Tumorgewebe dar. Es ließ sich eine eindeutige Trennung von Epithel und Stroma beobachten.

ICAM 1 positive Zellen

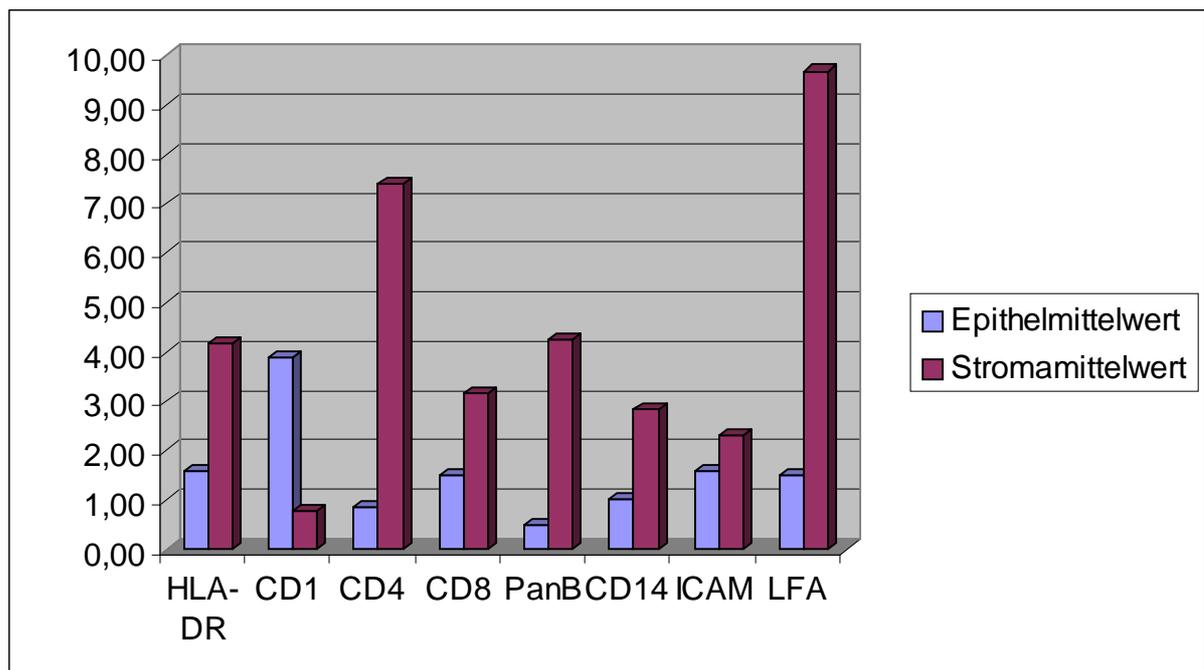
Die ICAM Färbung zeigte ein leichtes Überwiegen positiv gefärbter Zellen im Bindegewebe.

Diese zeigten unterschiedliche Morphologien:

Kleine runde mit deutlich gefärbtem Zytoplasmasaum, fischzugähnliche Bindegewebszellen. Wenn sich das epitheliale Tumorgewebe färbte, war eine auffällige Zunahme der positiven Zellen vom Tumorzentrum zur Peripherie zu beobachten.

LFA positive Zellen

Diese kleine runde Zellart zeigte einen deutlich gefärbten Zytoplasmasaum um einen runden Kern und ließ eine deutliche Mehrfärbung des Bindegewebes erkennen (Graphik1). Die Zellen hielten sich vor allem subbasal auf. Hier waren sowohl perlchnurartige als auch clusterförmige Zellformationen zu erkennen.



Graphik 1

	HLA-DR	CD1	CD4	CD8	PanB	CD14	ICAM	LFA
Epithelmittelwert	1,59 (0,90)	3,88 (1,92)	0,87 (0,70)	1,49 (1,01)	0,48 (0,34)	1,02 (0,59)	1,59 (0,68)	1,61 (0,88)
Stromamittelwert	4,16 (1,84)	0,76 (0,47)	7,42 (3,22)	3,16 (1,42)	4,24 (3,01)	2,84 (1,52)	2,32 (0,70)	9,69 (3,40)

Datentabelle zur Graphik 1, in Klammern die Standardabweichung vom Mittelwert

3.2. Darstellung in Abhängigkeit von der Basalmembran

3.2.1. Quantifizierung der verschiedenen Tumorgruppen

In unserem Tumorgut zeigte sich folgende Verteilung

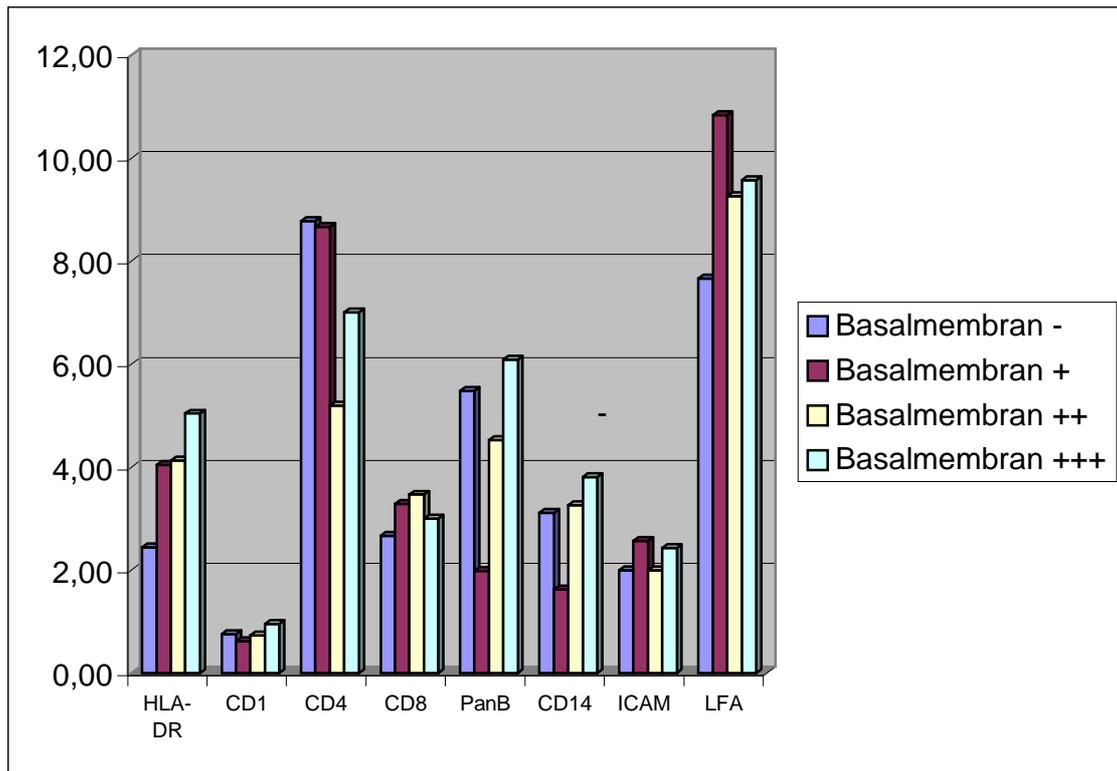
Ausprägung der Basalmembran	-	+	++	+++
Anzahl der Tumoren	3	8	5	7

3.2.2. Bindegewebiges Kompartiment

Es zeigten sich 4 verschiedene Muster der Verteilung.

Mit nachlassender Fähigkeit des Tumors eine Basalmembran zu bilden zeigte sich bei

- HLA-DR ein linearer Abfall
- CD8 erst eine Zunahme gefolgt von einer Abnahme (umgekehrte Parabelform)
- CD1, CD4, PanB, CD14 erst eine Abnahme gefolgt von einer Zunahme (Parabelform)
- ICAM, LFA kein erkennbarer Trend, aber eine Korrelation untereinander



Graphik 2

In den Tabellen stehen die Standardabweichungen in Klammern.

	HLA-DR	CD1	CD4	CD8	PanB	CD14	ICAM	LFA
Basalmembran -	2,44 (1,07)	0,75 (0,32)	8,77 (2,38)	2,66 (1,08)	5,47 (2,46)	3,10 (1,10)	2,00 (0,82)	7,66 (2,29)
Basalmembran +	4,04 (1,66)	0,62 (0,29)	8,67 (2,59)	3,29 (1,37)	1,98 (1,15)	1,62 (0,46)	2,57 (0,49)	10,83 (3,2)
Basalmembran ++	4,13 (1,33)	0,72 (0,23)	5,19 (0,72)	3,46 (1,40)	4,53 (1,99)	3,26 (0,61)	2,00 (0,79)	9,26 (2,16)
Basalmembran +++	5,04 (1,58)	0,95 (0,47)	7,00 (2,40)	3,00 (1,45)	6,09 (2,98)	3,81 (1,21)	2,43 (0,49)	9,57 (3,16)

Datentabelle zur Graphik 2

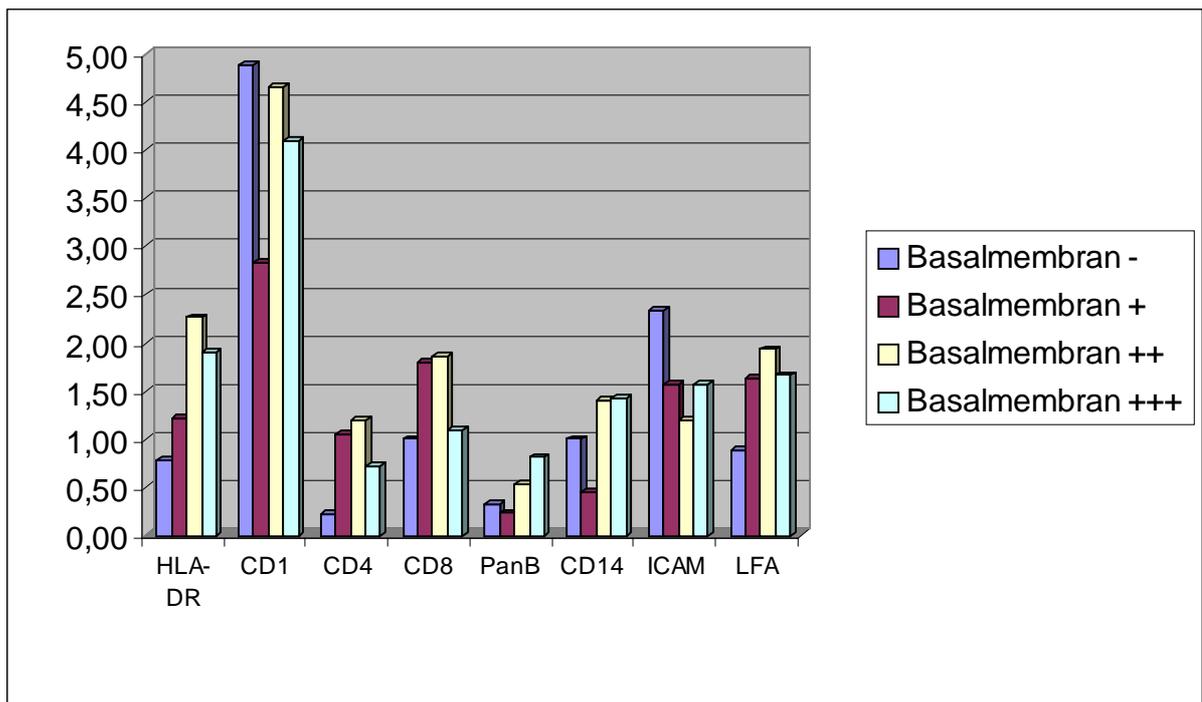
3.2.3. Epitheliales Kompartiment

Es zeigten sich 3 verschiedene Muster der Verteilung.

Mit nachlassender Fähigkeit des Tumors eine Basalmembran zu bilden zeigte sich **bei**

- HLA-DR, CD4, CD8, LFA erst eine Zunahme gefolgt von einer Abnahme (umgekehrte Parabelform)
- PanB, CD14, ICAM erst eine Abnahme gefolgt von einer Zunahme (Parabelform)
- CD1 kein eindeutig erkennbarer Bezug

Es zeigte sich eine Korrelation von HLA-DR mit LFA, CD4 und CD8 .



Graphik 3

	HLA-DR	CD1	CD4	CD8	PanB	CD14	ICAM	LFA
Basalmembran -	0,77 (0,16)	4,88 (1,30)	0,22 (0,11)	0,99 (0,49)	0,33 (0,21)	0,99 (0,27)	2,33 (0,94)	0,88 (0,47)
Basalmembran +	1,21 (0,61)	2,83 (1,21)	1,04 (0,66)	1,79 (0,93)	0,23 (0,19)	0,44 (0,24)	1,57 (0,73)	1,62 (0,80)
Basalmembran ++	2,26 (0,98)	4,66 (1,28)	1,19 (0,35)	1,86 (0,84)	0,53 (0,23)	1,39 (0,65)	1,20 (0,40)	1,93 (0,61)
Basalmembran +++	1,90 (0,69)	4,09 (2,06)	0,71 (0,32)	1,09 (0,57)	0,81 (0,41)	1,43 (0,58)	1,57 (0,73)	1,66 (0,79)

Datentabelle zur Graphik 3

3.2.4.Zusammenfassung der Befunde

Mit Verlust der Basalmembran zeigte sich im epithelialen Tumorgewebe ein Rückgang der antigenpräsentierenden HLA-DR positiven Zellen. Dasselbe Verhalten zeigte sich bei den CD 4 positiven T-Helferzellen, den CD 8 positiven cytotoxischen T-Zellen und der durch LFA gefärbten Gesamtheit der Leukozyten. Andererseits kam es mit Verlust der Basalmembran zu einem vermehrten Vorkommen von CD 1a positiven Langerhanszellen und CD 14 positiven Makrophagen und zu einer vermehrten Expression von ICAM auf den Tumorzellen.

Im bindegewebigen Kompartiment zeigten die HLA-DR positiven Zellen das gleiche Verhalten wie im Epithel. Auffallend war hier jedoch eine starke Zunahme von CD 4 positiven T-Helferzellen, B-Zellen und Makrophagen. Bemerkenswert ist das stark divergierendes Verhalten von HLA-DR positiven Zellen und CD 4 positiven Zellen, die ein funktionelles Paar sind.

Die LFA positiven Zellen zeigten ein insgesamt häufigeres Vorkommen im bindegewebigen Kompartiment. Diejenigen Tumoren, die am wenigsten BM exprimierten ließen die geringste Zelldichte LFA positiver Zellen erkennen; und zwar sowohl im bindegewebigen als auch im epithelialen Kompartiment.

Der Verlauf der intraepithelialen CD1a positiven Zellen zeigt einen annähernd gleichartigen Verlauf zu den CD4 und CD8 positiven Zellen im Stroma (umgekehrte Parabelform).

Mit Verlust der Basalmembran lässt sich also eine Veränderung in der Zusammensetzung des Immunzelleninfiltrates beobachten.

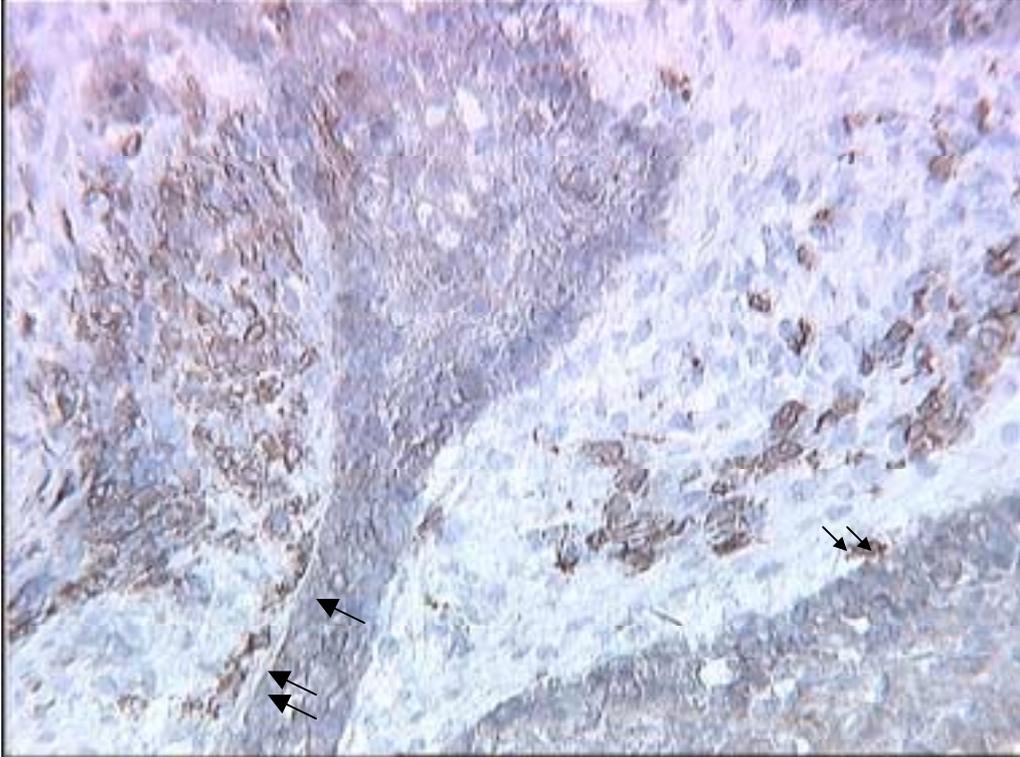


Bild 1) Präp. 27 ; Immunperoxidasefärbung HLA-DR , Vergrößerung: 312 x
Clusterförmige Ansammlung, stellenweise enger Kontakt zur BM (schwarze Pfeile)

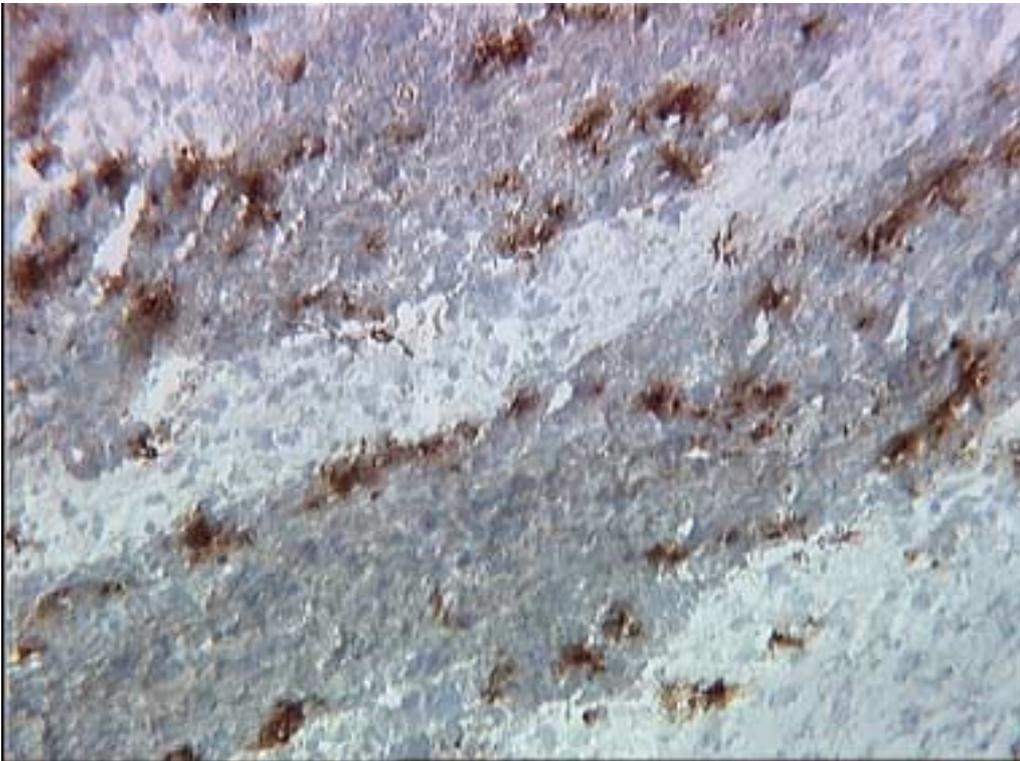


Bild 2) Präp. 8 ; Immunperoxidasefärbung CD 1a ; Vergrößerung: 425 x
Dendritische Zellausläufer; Häufung in den basalen Epithelschichten

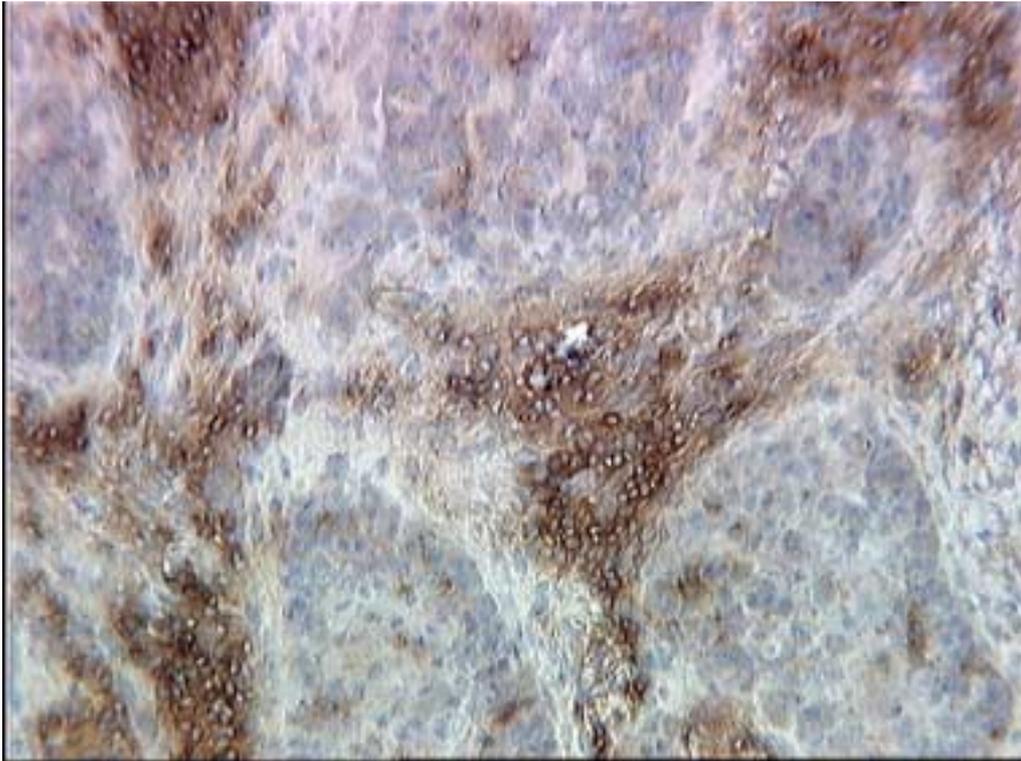


Bild 3) Präp. 27 ; Immunperoxidasefärbung CD 4; Vergrößerung: 312 x
Tendenz der Zellen sich diffus wachsenden Tumornestern anzulegen

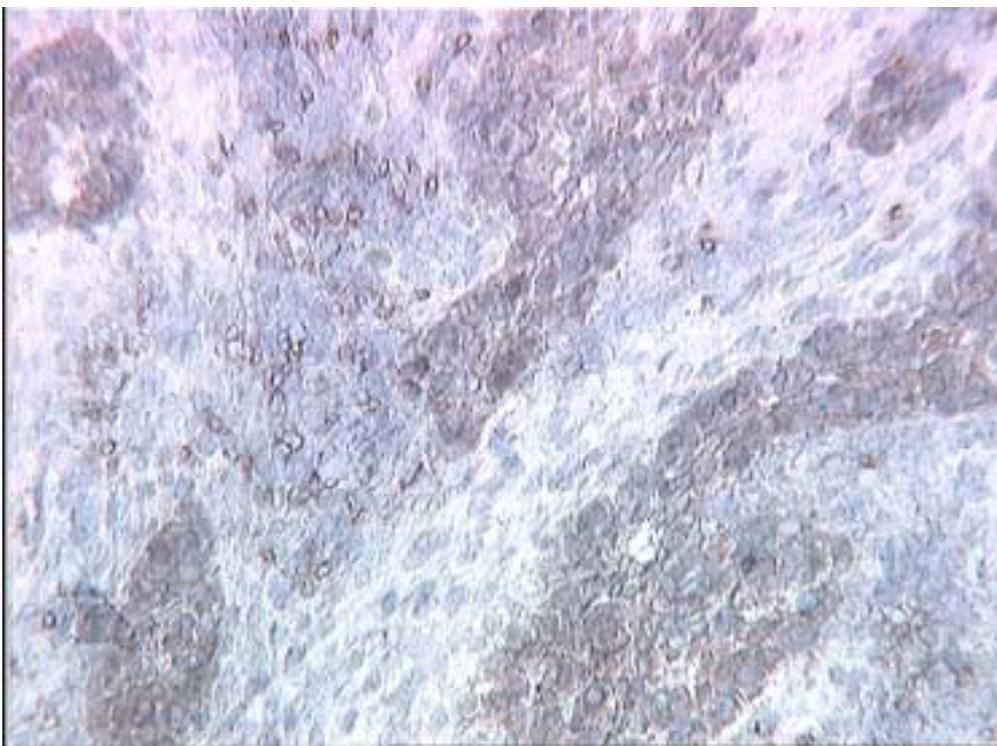


Bild 4) Präp.27 ; Immunperoxidasefärbung CD 8; Vergrößerung: 312 x
Keimzentrumsähnliche Anordnung



Bild 5) Präp.5 ; Immunperoxidasefärbung CD 8; Vergrößerung: 360 x
Kettenartiges Anlagern an Tumorzellen (schwarze Pfeile)

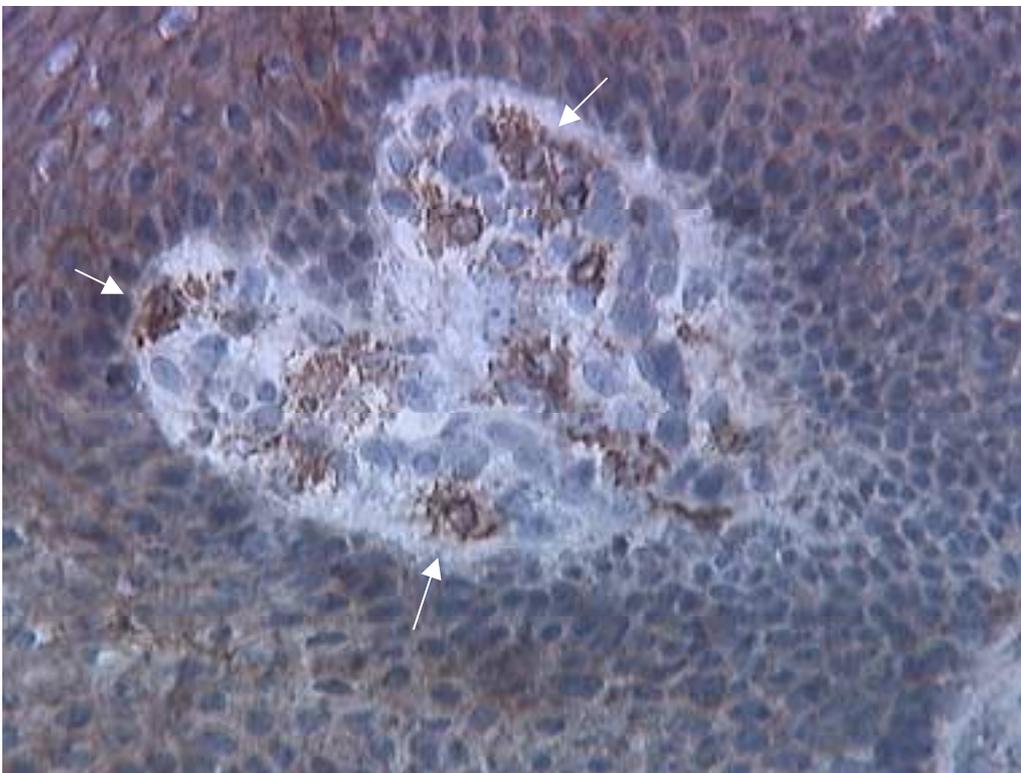


Bild 6) Präp.28; Immunperoxidasefärbung CD14; Vergrößerung: 360 x
Anlagern an die BM bei gut differenziertem Tumor (weiße Pfeile)

4. Diskussion

Die Basalmembran stellt eine entscheidende Schranke für Epithelzellen dar, die im Rahmen des malignen Tumorwachstums durchbrochen werden muss. Die Kontinuität gilt weithin als wichtiges Kriterium für die Gutartigkeit eines Tumors, während eine Unterbrechung der Basalmembran mit malignem Wachstum einhergeht (Nerlich, 1994). Jedoch auch qualitative Veränderungen lassen sich beobachten: zum Beispiel der frühe Verlust der Membrankomponente Kollagen 7 (Nerlich, 1994; Hagedorn, 1994). Wir färbten mit Antikörpern gegen Kollagen 4, da dieses spezifisch für Basalmembranen ist und sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Kollagen 4 Expression und dem histologischen Grading finden ließ (Krecicki, 2001). Im folgenden wird bei intakter Basalmembran von hoch differenzierten, bei weitgehendem Verlust der Basalmembran von niedrig differenzierten Tumoren gesprochen.

Das Plattenepithelkarzinom ist ein immunogener Tumor, der vor dem Hintergrund eines zellulären Immundefizits entsteht. Dies können eine Lymphopenie oder eingeschränkte T-Zell- oder Makrophagenfunktion sein (Gannot, 2002).

Die eingeschränkte T-Zellen Funktion kann erklärt werden durch:

- ein Defizit an Interleukin 2 produzierenden T-Helferzellen. Interleukin 2 stimuliert T-Helferzellen, die Proliferation von zytotoxischen T-Zellen, die IgG Produktion und Aktivität von natürlichen Killerzellen (Dawson, 1985).
- ein Defizit an Interleukin 2 Rezeptoren. Dies erreicht der Tumor durch Anlocken von CD 34 positiven Progenitorzellen (Young, 2001; Zeromski, 1993).
- vom Tumor sezernierte Faktoren, die die T-Zell-Antwort supprimieren z.B. Interleukin 10, FGFb oder die yIFN Sekretion hemmen (Gannot, 1993).
- eine herabgesetzte Expression vom Adhäsionsmolekül ICAM1 (Kornfehl,1993).

Übereinstimmend mit Jecker (1999), Harabuchi (1985) und Karakök (2003) fand sich ein deutliches Überwiegen der CD 1a positiven Langerhanszellen im epithelialen Kompartiment. Ähnlich wie in gesunder Larynxschleimhaut (Sato, 1997) fand sich vorwiegend eine suprabasale Lokalisation.

Im Gegensatz dazu waren die CD 4 positiven und CD 8 positiven T-Lymphozyten überwiegend in bindegewebigen Anteilen präsent. Dieses Ergebnis wird auch von Jecker (1999) gestützt, der außerdem darauf hinweist, dass eine hohe Zahl von dendritischen Zellen ein positiver prognostischer Faktor zu sein scheint. Dieses Ergebnis wird auch von Hachisuga (2001) und Goldmann (1998) gestützt..

Im Gegensatz zu Jecker (1999) und Hachisuga (2001) fand Karakök (2003) heraus, dass die Langerhanszahl nicht mit dem Tumor-Grading, dem TNM-Stadium und der Überlebenszeit assoziiert ist. Die Langerhanszelle sei also kein verlässliches prognostisches Werkzeug bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Larynx. Er benutzte für die Färbung allerdings nicht CD 1a Antikörper sondern S-100 Antikörper. Ferner wich sein Schema bei der Durchmusterung von Hachisuga ab.

Der Langerhanszelle kommt dennoch neben der T-Helferzellen eine herausragende Rolle für immunologisch therapeutische Intervention zu:

Schuler (1997) berichtet über in vitro sensibilisierte dendritische Zellen, die nach erfolgter Reinjektion das Tumorantigen an T-Lymphozyten präsentierten und somit eine zytotoxische T-Zell-Antwort gegenüber dem Malignom initiierten. Diese therapeutische Maßnahme ist jedoch erst für das Melanom und Lymphom angewandt worden.

Die CD 1a positiven Zellen ließen die leichte Tendenz erkennen, bei zunehmender Entdifferenzierung des Tumors anzusteigen und zwar sowohl im Epithel als auch im Stroma. Eine eindeutige Korrelation ließ sich allerdings übereinstimmend mit Karakök (2003) nicht feststellen.

Goldmann (1998) untersuchte eine Abhängigkeit zwischen peritumoralen CD 1a positiven Zellen und dem Tumorstaging und fand eine inverse Korrelation zwischen peritumoraler Langerhanszellzahl und dem Tumorstaging.

Die sich im Stroma färbenden Zellen könnten eventuell keine Langerhanszellen sein. Rucci (1991) fand im peritumoralen Infiltrat CD 1a positive interdigitierende Zellen. Nach seinen Studien leiten sie sich wohl nicht von der Langerhanszelle ab, sondern entstehen in situ aus Monozytenvorläufern, angelockt aus der Blutbahn durch

Tumor- Faktoren. Die lokale Mikroumgebung veranlasse sie, sich zu interdigitierenden Zellen zu differenzieren.

Es bleibt festzuhalten, dass die Rolle der Langerhanszelle noch nicht eindeutig geklärt ist.

Das oftmals klettenartige Anlagern der CD 8 positiven Lymphozyten an die Tumornester scheint Ausdruck einer funktionellen Interaktion zu sein. Ebenso könnte die gelegentlich zu beobachtende clusterförmige, keimzentrumsähnliche Anhäufung positiver Zellen ein Ausdruck einer lokalen T-Zell Proliferation sein. Hinweise hierfür finden sich bei Stephens (1998), der mit molekularbiologischen Methoden eine solche in der Nachbarschaft von oralen Plattenepithelkarzinom fand.

Im Tumorareal konnte ein weitgehend gleichartiges Verhalten der CD 4/CD 8 positiven Zellen gezeigt werden.

Mit zunehmender Entdifferenzierung kam es erst zu einem Anstieg, dann zu einem Abfall: der Tumor scheint also anfangs an Attraktivität für das Immunsystem zu gewinnen und verliert diese später wieder. Im Stroma fand sich für CD 8 dasselbe Verhalten, für CD 4 ein umgekehrtes: also erst ein Abfall, dann ein Anstieg.

Bereits 1985 untersuchte Harabuchi eine ähnliche Frage in Bezug auf das Plattenepithelkarzinom von Kopf/Hals. Er allerdings stellte die Tendenz von T-Lymphozyten fest, besonders in schwach differenzierte Plattenepithelkarzinome zu infiltrieren, weniger in mäßig oder gut differenzierte. Übereinstimmend mit uns fand er ein Überwiegen der B- Zellen in der Peripherie des Tumors und die Tatsache, dass sich T-Helferzellen vor allem um diffus abtropfende Zellennester herum formierten. Der T-Helferzelle scheint also eine besondere Funktion beim Übergang von solidem zu diffusum Wachstum zu zukommen.

Unser Ergebnis wird von Sala (1976) gestützt. Dieser fand, allerdings nicht immunhistochemisch, folgendes: gut differenzierte Tumoren zeigten viel lymphozytäre Reaktion, schlecht differenzierte wenig.

Der scheinbarer Widerspruch zu diesem Ergebnis könnte durch unsere differenzierte Methodik erklärt werden, dass nämlich Epithel und Stroma getrennt ausgezählt werden. Neuchrist (1990) fand keine Korrelation von Tumorgrading und Lymphozyten. Daraus folgerte er: ein Haupteinfluss des Tumors auf die Immunzellzusammensetzung sei unwahrscheinlich. Er sieht das Entstehen von malignem Zellwachstum also eher als Folge eines unspezifischen Immundefizits. Einem spezifischen, also durch den Tumor selbst und nur in dessen Umgebung entstehenden Immundefizit misst er untergeordnete Bedeutung bei.

Dieser Meinung können wir uns nur bedingt anschließen.

Molekularbiologischen konnte Arrany (1998) zeigen: Gut differenzierte Tumoren haben einen immunkompetenteren Status als schwach differenzierte und gut differenzierte zeigen mehr CD 1, CD 4 und CD 8 Eigenschaften. Diese Ergebnisse erhielt er mit RNA-Isolierung und semiquantitativer RT-PCR., so dass sie mit unseren Ergebnissen nicht vorbehaltlos verglichen werden können. Doch auch bei unseren immunhistochemischen Präparaten zeigte sich eine Tendenz der CD 4/CD 8 Zellen, in Richtung völlig entdifferenzierter Tumoren stark abzufallen.

.

Da CD 8 positiven Zellen als Effektorzellen eine Schlüsselrolle im Kampf gegen den Tumor zukommt halten wir fest: mit zunehmender Entdifferenzierung scheint der Tumor für die CD 8 positiven Effektorzellen zunächst an Attraktivität zu gewinnen, diese aber dann kontinuierlich zu verlieren. Die Übereinstimmung dieses Verhaltens in Tumor und Stroma scheint das Ergebnis zu bekräftigen.

Festzuhalten bleibt, dass der Übergangszone von Tumor zum Bindegewebe anscheinend eine besondere immunologische Bedeutung zukommt.

In unseren Präparaten zeigte sich auch bei den B-Lymphozyten und Makrophagen eine bevorzugte Lokalisation im bindegewebigen Kompartiment. Eine bevorzugte Zellformation, wie bei dem oben beschriebenen Zellpaar ließ sich allerdings nicht feststellen. Dieses Ergebnis wird auch von Jecker (1999) gestützt.

Im Stroma fand sich bei beiden Zellarten mit zunehmender Entdifferenzierung erst ein starker Abfall, dann ein steiler Anstieg. Im Mittel überwog die B-Zell-Präsenz, aber nicht ganz so deutlich wie in den Ergebnissen von Kärjä (1987), der außerdem feststellte, dass die B-Zell-Zahl parallel anstieg zur Intensität des Gesamtinfiltrates, auf Kosten der T-Zellen und Makrophagen.

Es wäre also möglich, dass die B-Zellfunktion bei gut differenzierten Tumoren noch eine gewisse Stellung einnimmt. Dies wird durch die bei gut differenzierten Tumoren noch starke HLA-DR Färbung durchaus plausibel.

Interessant in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von Gannot (2002). Er untersuchte die Zunahme des Immunzelleninfiltrates beim Fortschreiten des oralen Plattenepithels von der Hyperkeratose zur Dysplasie und schließlich zum Karzinom. Er fand beim Übergang von schwerer Dysplasie zum Plattenepithelkarzinom einen starken Anstieg von B-Lymphozyten und einen leichten Abfall von CD 8 positiven T-Lymphozyten. Dies bestätigt unsere These von der wichtigen Funktion des B-Zellsystem bei gut differenzierten Tumoren.

Im weiteren Kampf gegen den Tumor scheint die B Zelle durch die CD 8 positive Zellen abgelöst zu werden, die bei den mäßig differenzierten Tumoren ein Maximum aufweist.

Der starke Anstieg von B-Zellen bei starker Entdifferenzierung könnte unseres Erachtens auf eine verstärkte Neigung von entdifferenzierten Tumoren zur Ulzeration und zu bakteriellen Infektionen zurück zu führen sein.

Ob es sich bei dem Häufigkeitsgipfel der B-Zellen bei gut differenzierten Tumoren um eine wirksame Abwehrstrategie handelt, können wir leider nicht beantworten. Sie könnten durch Komplement bindende Antikörper zytotoxisch gegen Tumorzellen vorgehen oder die Tumorzelle für Makrophagen kennzeichnen. Neuchrist (1990) fand in Plattenepithelkarzinomen funktionell reife Makrophagen, bei unseren Präparaten zeigte sich im Stroma eine Parallelität zwischen B-Zellen und Makrophagen.

In einzelnen Tumoren, wie dem Hoden-Seminom, kann dabei die Immunreaktion so heftig sein, dass große Teile des Tumors einer granulomatösen Entzündungsreaktion zum Opfer fallen.

Die humoralen Antikörper könnten aber auch das Gegenteil bewirken:

Sie bedecken die tumorspezifischen Membranantigene und machen sie für die cytotoxischen Zellen unkenntlich, so dass das Tumorwachstum ungehindert los gehen kann (Riede, 1995).

Auch bei den HLA-DR positiven Zellen überwog das bindegewebige Kompartiment. Laut Herstellerangabe richtet sich dieser Antikörper gegen die Alpha und Beta Kette des MHC 2 II Moleküls (DAKO). Es färbt also Zellen, die ein exogenes Antigen auf ihrer Oberfläche anderen Zellen präsentieren. Dies kann zum Beispiel eine CD 4 positive Helferzelle sein, die dann wiederum stimulierend auf die T-Zell Proliferation, auf die CD 8 Zytotoxizität oder die natürliche Killerzellen Aktivität wirkt.

Hilders et al.(1993) konnten eine signifikante Korrelation von intraepithelialen HLA-DR positiven Zellen, mit den Tumor infiltrierenden CD 8 positiven/CD 4 positiven/CD-3 positiven T-Zellen, CD 56 positiven natürlichen Killerzellen und CD 16 positiven Makrophagen beim Cervix Karzinom finden.

Sikorska et al.(1998) zeigten eine statistisch signifikante Korrelation zwischen T-Helferzellen an der Peripherie von laryngealen Plattenepithelkarzinomen und HLA-DR positiven Tumorzellen.

Sie schreibt: " Die De-novo-Expression von MHC 2 Antigen in malignen Zellen, die sich von HLA Klasse 2 negativem Gewebe ableiten, scheint assoziiert zu sein mit einer positiven Immunantwort, aber es könnte ebenso ein Zeichen sein vom Durchbrechen des Krebses durch die immunologische Barriere oder ein Ergebnis von molekularen Veränderungen während der malignen Transformation."

Da dem Kontakt von HLA-DR positiven Zellen mit der T-Helferzellen somit eine zentrale Rolle in der nachgeschalteten humoralen und zellulären Immunreaktion zugebilligt werden kann, könnte die fehlerhafte oder herabgesetzte HLA-DR Expression eine zentrale Schlüsselrolle beim Versagen der Immunüberwachung darstellen.

In unseren Präparaten zeigte sich ebenso eine - wenn auch auf Grund der zu geringen Probenzahl nicht signifikante- positive Korrelation von HLA-DR mit intraepithelialen CD 4 positiven und CD 8 positiven Zellen.

Des weiteren ließ sich ein linearer Abfall der HLA-DR positiven Zellen mit fortschreitender Entdifferenzierung feststellen.

Wichtig ist, dass wir nur HLA-DR positive Immunzellen, nicht jedoch die HLA-DR Expression der Tumorzellen selbst ausgewertet haben.

Macht man dies, kommt man zu einem umgekehrten Ergebnis.

Garcia-Plata (1993) fand heraus, dass gerade undifferenzierte Tumorzellen hohe Level von HLA-DR exprimieren. Hierfür verwendete er 1 zu 100 verdünnte Antikörper, während wir eine Verdünnung von 1 zu 800 benutzten.

Die Bedeutung der HLA-DR Expression auf Tumorzellen für die Prognose des Patienten ist uns nicht klar geworden.

Sikorska (1999) fand eine HLA-DR Expression als prognostisch günstigen Faktor bei Larynx-Karzinomen. Als ungünstiger Prognosefaktor zeigte es sich bei Mundhöhlen Karzinomen (Horiuchi, 1993) und dem Melanom der Haut (Bröcker, 1984).

Da die T-Helferzelle ihre stimulierende Funktion zu einem großen Teil über das Interleukin 2 vermittelt, könnte ein therapeutischer Ansatz darin bestehen, durch exogene Interleukin 2 Zufuhr die T-Helferzellen sozusagen zu substituieren.

Diese These wird gestützt von Dawson (1985), der nach exogener Interleukin 2 Zufuhr eine bessere in vitro Antwort der Immunüberwachung fand.

Hier zeigen sich auch die Grenzen der immunhistologischen Aussagekraft bei Färbungen mit nur einem Antikörper.

Zeromski (1993) schreibt: "... Nur eine geringe Anzahl von Tumor infiltrierenden Lymphozyten exprimierte Interleukin 2 Rezeptoren. Daraus folgt, dass in der Nachbarschaft von Kehlkopfkrebs zwar eine ziemlich große Anzahl von potenziell zytotoxischen Zellen vorkommt, aber in einem niedrigen oder gar keinem Aktivierungszustand."

Hieraus folgt, dass die mit immunhistochemischen Methoden dargestellte Anwesenheit einer bestimmten Zellart nichts über deren Funktionszustand aussagt.

Es wäre interessant, diesem Mechanismus in weiteren Studien nachzugehen, da auch noch ein anderer Mechanismus des Tumors der Immunüberwachung zu entgehen bei Interleukin 2 zusammen läuft: die vom Tumor angelockten CD 34 positiven Progenitorzellen verhindern die Expression von Interleukin 2 Rezeptoren von T-Lymphozyten, nachdem diese über ihre TCR/CD3- Rezeptoren stimuliert wurden. Mit einer gezielten Interleukin 2 Applikation ließen sich also zwei Escape-Mechanismen des Tumors umgehen, während die Applikation von Vitamin D 3 zumindest die Akkumulation von CD 34 positiven Zellen verhindert.

Es stehen somit zwei weitere immunologische Therapieoptionen zur Debatte.

Nach diesen sehr zentralen Mechanismen wenden wir uns nun dem frühesten Schritt der Immunüberwachung zu. Für die Migration und Adhäsion von immunkompetenten Zellen an potenzielle Antigenpräsentierer spielt die Rezeptor-Ligand-Interaktion zwischen LFA und ICAM eine wichtige Rolle. Die antigenunabhängige Adhäsion ist also ein früher Schritt der Immunüberwachung und liefert bei der T-Zellen Erkennung

ein wichtiges kostimulatorisches Signal. Die T-Zell Schwäche bei der Tumorbekämpfung könnte durch eine veränderte Expression von Adhäsionsmolekülen bedingt sein (Kornfehl, 1993).

In unseren Präparaten ließ sich im Stroma eine Korrelation von ICAM zu LFA finden. Dies unterstreicht die oben genannten Mechanismen.

Eine Korrelation von LFA zu CD 4 oder CD 8 positiven Zellen ließ sich im epithelialen Kompartiment erbringen. Eine Korrelation von ICAM konnte nicht erkannt werden, ebenso wenig eine Abhängigkeit von der Tumordifferenzierung. Dieses Ergebnis ist wohl dadurch zu erklären, dass alle sich in der Tumormasse befindlichen Zellen, das heißt Tumorzellen und Infiltrat, in der Auswertung gleich behandelt wurden.

Interessanter wäre es gewesen nur die Keratinozyten respektive Tumorzellen zu beurteilen. Dies ist in einer immunhistochemischen Färbung allerdings nur selten möglich.

Kornfehl (1993) fand mit immunhistochemischer Anfärbung zwar eine Korrelation von ICAM mit CD 3 und CD 8, wies aber auch auf deutliche Schwankungen in der Expression hin. Da ICAM auch von Lymphozyten und Makrophagen exprimiert wird, handelt es sich bei seinem Ergebnis vielleicht lediglich um eine Positivkontrolle des Lymphozyteninfiltrats. Zur Klärung ob die Expression von ICAM auf der Zielzelle, also der Tumorzelle, einen Effekt auf das Immungeschehen hat, darf aber nur die Tumorzelle bewertet werden.

Zellbiologische Untersuchungen sollten hier bessere Ergebnisse liefern.

Eine solche führte Scher (1993) durch:

Er fand eine konstitutive Expression von ICAM auf Zelllinien des HNSCC, mit starkem Anstieg nach der Behandlung mit Gamma Interferon und anderen Zytokinen.

Da das Ziel der Immuntherapie ist, die natürliche Antwort auf ein Neoplasma zu verstärken, schlägt er den therapeutischen Einsatz von Gamma-Interferon vor.

Wie effektiv eine verstärkte Expression von ICAM auf das Immunsystems sein kann zeigt er an zwei Beispielen von Autoimmunkrankheiten: Bei der Psoriasis zeigen Keratinozyten, bei der Autoimmunthyreoiditis Follikelzellen verstärkte ICAM Expression. Bei letzterer kommt es häufig zur kompletten Involution des Organs, ein Effekt von dem Krebstherapeuten schwärmen dürften.

Diese Einzelbefunde sollen nun in ihrer Gesamtheit betrachtet werden.

Der Verlust der Basalmembran stellt den Verlust einer differenzierten Zelleistung dar. Hiermit scheint der Tumor an Immunogenität einzubüßen.

Ein Grund hierfür könnte in einer verminderten MHC 1 Expression liegen, womit die Krebszelle dem cytotoxischen T-Zellen System entkommen könnte.

Ob sie hierdurch an Attraktivität für das natürliche Killerzellensystem gewinnt, welches Zellen mit fehlerhafter oder reduzierter MHC 1 Expression attackiert, müssten weitere Untersuchungen zeigen.

Der Grund für das Versagen der Immunüberwachung könnte auch an der reduzierten Verfügbarkeit von MHC 2 positiven Zellen liegen, die über die Kommunikation mit CD 4 positiven Helferzellen wichtige kostimulatorische Signale für die anderen Zellsysteme liefert.

Hierbei ist auffällig, dass einer sinkenden Zahl HLA-DR positiver Zellen eine stark steigende Zahl CD 4 positiver Helferzellen im Stroma gegenübersteht. Dies könnte als Kompensationsmechanismus des Immunsystems gedeutet werden, um trotz sinkender Zahl an Effektorzellen noch eine suffiziente Immunantwort aufrechterhalten zu können.

Andererseits könnte das scheinbar grundlose Überwiegen der CD 4 positiven Zellen dadurch hervorgerufen werden, dass die Tumorzellen selbst -den Ergebnissen Sikorskas (1998) entsprechend- anfangen HLA-DR zu exprimieren.

Interessant ist es, die Ergebnisse von Gannot (2002) mit den unseren zu vergleichen. Er untersuchte die Veränderung des Immunzelleninfiltrates beim Übergang normalen Epithels der Mundhöhle über die Hyperkeratose und Dysplasie hin zum Karzinom. Mit zunehmendem Dysplasiegrad beobachtete er eine Zunahme von CD 4, CD 8, Pan B und HLA-DR positiven Zellen, oder anderes ausgedrückt: ein Wechsel von nicht spezialisierten Zellen zu B- und T-Lymphozyten mit einem Gipfel bei der schweren Dysplasie. Beim Übergang von schwerer Dysplasie zum Karzinom nehmen bei seinen Untersuchungen die B-Lymphozyten stark zu, die CD 8 positiven Lymphozyten leicht ab.

Der stellenweise Verlust der Basalmembran, der ja das histologische Malignitätskriterium ist, scheint also eine verstärkte Aktivität des B- Zellsystems zu bewirken, während das T-Zell- System leicht an Aktivität verliert. Diese Tatsache bekräftigt auch unsere Ergebnisse:

Wir beobachteten bei hoch differenzierten Tumoren ein Überwiegen des B-Zell Systems, das erst bei mäßig differenzierten Tumoren vom T-Zellen System abgelöst wurde.

Vergleicht man unsere Ergebnisse mit den Untersuchungen an anderen Körperstellen, so zeigen sich ebenso Übereinstimmungen. Hachisuga (2001) untersuchte die Immunantwort im Plattenepithelkarzinom der Cervix uteri . Auch er fand Lymphozyten teils diffus verteilt teils zu Zellennestern zusammen geballt.

Ebenso korrelierten bei ihm im Epithel die HLA-DR positiven Zellen mit CD 4 und CD 8 positiven Zellen. Des Weiteren korrelierte die Zahl der Langerhanszelle mit den CD 4 positiven Zellen und den B-Zellen.

Vergleicht man bei uns den Kurvenverlauf über das Vorkommen von intraepithelialen Langerhanszellen mit den B-Zellen und T-Helferzellen im Stroma, so zeigt sich ein gleichartiger Kurvenverlauf (umgekehrte Parabelform). Morphologisch ist eine Antigenpräsentation von Langerhanszellen an z.B. T-Helferzellen möglich.

Die funktionelle Einbindung der Langerhanszelle lässt sich also auch in unserem Tumorgut nachvollziehen.

Ob der Tumor nun die Ursache für eine gestörte Funktion des Immunsystems, oder ob eine gestörte Funktion des Immunsystems die Ursache von Tumorwachstum ist, kann in dieser Arbeit nicht beantwortet werden.

Wir konnten aber zeigen, dass gerade bei hoch- bis mäßigdifferenzierten Tumoren eine große Anzahl von Effektorzellen in und um den Tumor herum zur Verfügung steht.

Diese zu mobilisieren könnte Ziel immuntherapeutischer Maßnahmen sein.

5.Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, immunkompetente Zellen in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes darzustellen und der Frage nachzugehen, ob der fortschreitende Verlust der Basalmembran einen Einfluss auf die Zusammensetzung des Immunzelleninfiltrates hat.

Wir kamen zu folgenden Ergebnissen:

Das Vorkommen HLA-DR positiver Zellen nimmt bei Entdifferenzierung des Tumors linear ab. Da HLA-DR als Bestandteil von MHC 2 die Präsentation exogener Antigene übernimmt und diese an das B-Zell/Makrophagen System gekoppelt ist, sehen wir hierin einen Grund für das Versagen der B-Zell Antwort.

Da das T-Zellen System via T-Helferzelle eng hiermit verbunden ist, sehen wir hierin auch einen Grund für das mögliche Versagen des T-Zell- Systems.

Die CD 4 positiven Zellen zeigten clusterförmige Ansammlungen, vor allem diffus abtropfenden Tumorformationen anliegend. Ihnen scheint eine besondere Funktion beim Übergang von solidem zu diffusem Wachstumsmuster zu zukommen.

Die CD 8 positiven Zellen zeigten einen engen Kontakt zur Basalmembran und lagen den Tumorzellen stellenweise klettenartig an. Die clusterförmigen Ansammlungen deuten wir als Hinweis auf eine lokale Proliferation.

Es finden sich Hinweise auf die enge funktionelle Verknüpfung der Langerhanszelle zu T-Helferzellen und B-Zellen.

Das B-Zell-System verhielt sich parallel zu den Makrophagen, diese beiden Systeme scheinen funktionell eng verknüpft zu sein.

Bei gut differenzierten Tumoren dominierte das B-Zell-System, bei mäßig differenzierten das T-Zellen System, bei schlecht differenzierten keines von beiden (vorausgesetzt, die B-Zell-Zunahme bei entdifferenzierten Tumoren wird als unspezifische Entzündungsreaktion interpretiert).

ICAM scheint keinen Einfluss auf die Zellzahl, vielleicht aber auf deren Funktionszustand zu haben.

Das geringste Vorkommen LFA positiver Zellen zeigten Tumore mit einem weitestgehenden Verlust der Basalmembran.

Der Basalmembran und der Grenzzone Tumor - Stroma scheint somit eine besondere immunologische Bedeutung zu zukommen.

6.Literaturverzeichnis

Arany I, Adler-Storthz K, Chen Z, Tying SK, Brysk MM :

“Tumor differentiation-dependent local immunity in human head and neck cancers.”

Cancer Lett. 1998 Jan 30;123(2):173-6.

Bendani M ,Gocke CD ,et al.:

“Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte monocyte colony-stimulating factor against lymphoma.”

Nat.Med. 1999, 5 :1171-1177

Boenninghaus, H-G:

“Hals-Nasen-Ohrenheilkunde für Studierende der Medizin.“

Springer Verlag 240-242 ,297ff(1996)

Bröcker E B ,Suteer L , Sorg C :

“HLA-DR antigen expression in primary melanomas of the skin.“

J. Invest. Dermatol:82 ,244-247

Dawson DE, Everts EC, Vetto RM, Burger DR :

“Assessment of immunocompetent cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma.”

Ann Otol Rhinol Laryngol. 1985 Jul-Aug;94(4 Pt 1):342-5.

Duan H, Koga T, Masuda T, Mashino T, Imafuku S, Terao H, Murakami Y, Urabe

K, Kiryu H, Furue M :

“CD1a+, CD3+, CD4+, CD8+, CD68+ and cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive cells in Bowen's disease.”

Br J Dermatol. 2000 Dec;143(6):1211-6.

Gannot G, Gannot I, Vered H, Buchner A, Keisari Y.

“Increase in immune cell infiltration with progression of oral epithelium from hyperkeratosis to dysplasia and carcinoma.”

Br J Cancer. 2002 May 6;86(9):1444-8.

Garcia-Plata D, Mozos E, Carrasco L, Solana R.

“HLA molecule expression in cutaneous squamous cell carcinomas: an immunopathological study and clinical-immunohistopathological correlations.”

Histol Histopathol. 1993 Apr;8(2):219-26.

Goldman SA, Baker E, Weyant RJ, Clarke MR, Myers JN, Lotze MT:

“Peritumoral CD1a-positive dendritic cells are associated with improved survival in patients with tongue carcinoma.”

Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1998 Jun;124(6):641-6

Grimm, G:

“Geschwülste im Mund- und Kieferbereich.“

In: Zahn-Mund-Kieferheilkunde Band 2,

Spezielle Chirurgie. N.Schwenzer und G. Grimm, eds

Thieme Verlag ,308-313 ,314 (1990)

Grundmann, E :

“Tumoren.“

In : Einführung in die Allgemeine Pathologie, E.Grundmann, ed.

Gustav Fischer Verlag , 185 (1996)

Hachisuga T ,Fukuda K :

“Local Immune Response in Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix.“

Gynecol Obstet Invest 2001 ; 52:3-8

Hagedorn H ,Schreiner M ,Wiest I ,Nerlich A:

“Immunohistochemische Analyse der Basalmembran – Expression beim Plattenepithelkarzinom des Larynx.“

Laryngo-Rhino-Otol. 73 (1994) 637-641

Harabuchi Y, Yamanaka N, Kataura A:

“Identification of lymphocyte subsets and natural killer cells in head and neck cancers. An immunohistological study using monoclonal antibodies. “

Arch Otorhinolaryngol. 1985;242(1):89-97

Hilders CG, Houbiers JG, van Ravenswaay Claasen HH, Veldhuizen RW, Fleuren GJ :

“Association between HLA-expression and infiltration of immune cells in cervical carcinoma.”

Lab Invest. 1993 Dec;69(6):651-9.

Horiuchi K, Mishima K :

“Prognostic factors for well differentiated squamous cell carcinoma in the oral cavity with emphasis on immunohistochemical evaluation.”

J.Surg.Oncol. 1993 , 53:92-96

Janeway, CA,(et al.) :

“Immunobiology: the immune system in health and disease .”

Garland Publishing 5th ed. (2001) 295-340; 571-577

Jecker P, Vogl K, Tietze L, Westhofen M :

“Dendritische Zellen, T- und B-Lymphozyten und Makrophagen im supraglottischen und glottischen Plattenepithelkarzinom. Lokalisation und Korrelation zur Prognose der Erkrankung.”

HNO. 1999 Mai; 47(5):466-471

Karakök M, Bayazit YA, Ucak R, Ozer E, Kanlikama M, Mumbuc S, Sari I.:

“Langerhans cell related inflammatory reaction in laryngeal squamous cell carcinoma.. “

Auris Nasus Larynx. 2003 Feb;30(1):81-4.

Kärjä J, Syrjanen K, Nuutinen J :

“Immunocompetent cell reaction in prognostic evaluation of squamous cell carcinoma of the lip.”

Acta Otolaryngol. 1987 May-Jun;103(5-6):640-3.

Kornfehl J, Neuchrist C, Grasl MC, Ehrenberger K, Kraft D, Scheiner O :

“The expression and cellular distribution of adhesion molecules CD2/LFA-3 and ICAM-1/LFA-1 on mononuclear cells in squamous cell carcinoma of the head and neck.”

Eur Arch Otorhinolaryngol. 1993;250(3):168-72.

Krecicki T, Zalesska-Krecicka M, Jelen M, Szkudlarek T, Horobiowska M.:

“Expression of type IV collagen and matrix metalloproteinase-2 (type IV collagenase) in relation to nodal status in laryngeal cancer.”

Clin Otolaryngol. 2001 Dec;26(6):469-72.

Lanier,L :

“NK cell receptors.“

Annu. Rev. Immunol. 16 ,(1998):359-393

Nerlich A, Schreiner M, Hagedorn H, Wiest I, Schleicher E :

“Bedeutung der Basalmembran für das wachstum von Tumoren - Immunhistochemische Aspekte unter besonderer Berücksichtigung von Tumoren des Kopf-/Halsbereiches.”

Laryngorhinootologie. 1994 Dec;73(12):631-636

Neuchrist C ,Grasl M et al :

“Squamous cell carcinoma : infiltrating monocyte/macrophage subpopulations express functional mature phenotype. “

Br. J. Cancer (1990) , 62 , 748-753

Riede U-N und Schaefer H-E, eds:

“Allgemeine und spezielle Pathologie.“

Georg Thieme Verlag. (1995) 353-355, 381, 382, 595, 600ff

Rucci L, Bani D, Gallo O, Arbi Riccardi R, Borghi Cirri MB, Fini-Storchi O :

“Interdigitating cells in the peritumoral infiltrate of laryngeal carcinomas: an immunocytochemical and ultrastructural study.”

ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 1991;53(6):349-56

Sala O, Ferlito A :

“Morphological observations of immunobiology of laryngeal cancer. Evaluation of the defensive activity of immunocompetent cells present in tumour stroma.”

Acta Otolaryngol. 1976 Mar-Apr;81(3-4):353-63.

Sato K, Hirano M:

“Langerhans cells in the larynx and the hypopharynx.”

Kurume Med J. 1997;44(4):297-303.

Scher RL, Koch WM, Richtsmeier WJ :

“Induction of the intercellular adhesion molecule (ICAM-1) on squamous cell carcinoma by interferon gamma.”

Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1993 Apr;119(4):432-8.

Schuler G, Steinmann RM:

“Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors.”

J Exp Med 186:1183-1187, 1997

Sikorska B, Danilewicz M, Wagrowska-Danilewicz M. :

“HLA-DR expression is a significant prognostic factor in laryngeal cancer. A morphometric study.”

APMIS. 1999 Apr;107(4):383-8.

Sikorska B, Danilewicz M, Wagrowska-Danilewicz M.:

“Quantitative analysis of HLA DR expression and lymphocytic infiltrate in laryngeal cancer including clinical and morphological correlations.”

Gen Diagn Pathol. 1998 Apr;143(5-6):297-303.

Stephens M, Lim K, Stephens P, Thomas DW, Lim SH :

“Molecular characterisation of tumour infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma.”

Cancer Immunol Immunother. 1998 Mar;46(1):34-40.

Young MR, Petruzzelli GJ, Kolesiak K, Achille N, Lathers DM, Gabrilovich DI :

“Human squamous cell carcinomas of the head and neck chemoattract immune suppressive CD34(+) progenitor cells.”

Hum Immunol. 2001 Apr;62(4):332-41.

Zeromski J, Dworacki G, Kruk-Zagajewska A, Szymeja Z, Jezewska E, Kostecka J :

“Assessment of immunophenotype of potentially cytotoxic tumor infiltrating cells in laryngeal carcinoma.”

Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 1993;41(1):57-62