

Regulation der Fetteinlagerung in Lymphödemen

D. A. Cuzzone¹, E. Weitman¹, N. J. Albano¹, S. Ghanta¹, I. Savetsky¹, J. Gardenier¹, W. Joseph¹, J. Torrisi¹, J. F. Bromberg², W. L. Olszewski³, S. G. Rockson⁴, B. J. Mehrara¹

▲ Einführung

Das Lymphödem ist eine häufige Erkrankung, bei der das Lymphsystem nicht in der Lage ist, interstitielle Flüssigkeit adäquat zu beseitigen. Dabei handelt es sich um eine chronische und progressive Krankheit, die mit einer Akkumulation von Flüssigkeit beginnt, im Laufe der Zeit verändert sich die Pathologie aber zu einer Anreicherung von adipofibrotischem Gewebe. Die Einlagerung von Fettgewebe ist ein histologischer und pathologischer Schlüsselprozess beim chronischen Lymphödem. Obwohl dieser Prozess dazu führt, dass das Lymphödem auf herkömmliche Behandlungsmethoden wie Manuelle Lymphdrainage und Kompressionsbestrumpfung nicht mehr reagiert, ist wenig darüber bekannt, wie die Fetteinlagerung in das Lymphödem reguliert wird.

Unsere Forschungsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass eine lymphatische Verletzung zu einer Aktivierung von Fettdifferenzierungsgenen führt, was in einer Hypertrophie und Proliferation von Adipozyten resultiert (1, 2). Genau genommen haben wir herausgefunden, dass das in einem Lymphödem eingelagerte Fettgewebe histologisch ähnlich ist zu demjenigen bei einer generalisierten Fettleibigkeit, was durch eine Infiltration chronisch inflammatorischer Zellen sichtbar ist (3, 4). Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Adipozyten und der Prozess der Fetteinlagerung eine Rolle in der Pathologie des Lymphödems spielen können. Dieses Konzept wird von der Tatsache unterstützt, dass eine Fetteinlagerung ein Schlüsselregulator einer Vielzahl von Erkrankungsprozessen ist.

Ein Mechanismus, bei dem das Fettgewebe eine Pathologie moduliert, ist die Entstehung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen wie Interleukin-6 (IL-6). In der laufenden Studie haben wir beschlossen, uns auf IL-6 zu fokussieren, weil frühere Studien gezeigt haben, dass die Expression von IL-6 signifikant erhöht ist bei beiden Tiermodellen für primäre und sekundäre Lymphödeme. Auch ist IL-6 dafür bekannt, bei der Fettgewebe-Homöostase eine kritische Rolle zu spielen (5, 6).

Was noch ausführlich beschrieben werden muss ist, welcher Verbindungsmechanismus zwischen Entzündung

Referat zu: IL-6 regulates adipose deposition and homeostasis in lymphedema.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 2014;306(10):H1426-1434.

und Fethomöostase beim Lymphödem zugrunde liegt. In dieser Studie möchten wir die Rolle von IL-6 bei der Fetteinlagerung im Lymphödem untersuchen. Wir fanden heraus, dass klinische Biopsieproben und Serum von Lymphödempatienten

signifikant erhöhte IL-6-Werte ebenso im Serum wie auch im ödematösen Gewebe aufwiesen. Diese Expression von IL-6 war stark assoziiert mit der Fetteinlagerung und Entzündung in unserem Maus-Lymphödem-Modell. Interessanterweise scheint die CD4⁺-Zellinflammation notwendig für diesen Prozess zu sein, und der Verlust der IL-6-Funktion führt zu einer dramatischen Steigerung der Fetteinlagerung nach einer Lymphgefäßzerstörung.

Methode

Menschliches Lymphödemgewebe- und Serumproben: Normale menschliche Haut und Lymphödemproben wurden durch Prof. Waldemar Olszewski von der polnischen Wissenschaftsakademie mit einem genehmigten Protokoll der institutionellen Prüfungskommission (IRB) gesammelt. Das Serum wurde vom Stanford Center for Lymphatic and Venous Disorders entnommen, ebenfalls mit einem IRB-genehmigten Protokoll. Das Serum stammte von 26 Patienten mit brustkrebsbedingtem Lymphödem (Stadium I-III) und 20 Patienten mit Brustkrebs in der Vorgeschichte aber ohne Lymphödem. Unter Verwendung von partikelbasierten Immunoassays wurden die Serum-IL-6-Level quantifiziert und als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) repräsentiert. Die demographischen Daten jedes Patienten inklusive Body-Mass-Index (BMI) und Lymphödemstadium wurden gesammelt. Das Lymphödemstadium wurde durch das Klassifikationsschema der International Society of Lymphedema definiert (7).

Mausmodell des Lymphödems: Weibliche C57BL/6J-, Interleukin-6-Mangel (IL-6KO)- und CD4-Knockout (CD4KO)-Mäuse erhielten wir von den Jackson Laboratories. In dieser Studie wurden zwei Mausmodelle für lymphatische Verletzungen verwendet, um die Ergebnisse verschiedener Grade der Fetteinlagerung auf die IL-6-Expression auszuwerten. Unser Labor beschrieb zuvor ein Modell für die axilläre Lymphknotendisektion

1 The Department of Surgery, Division of Plastic and Reconstructive Surgery, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York/NY, USA; 2 The Department of Medicine, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York/NY, USA; 3 The Department of Surgical Research and Transplantation, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland; 4 The Department of Medicine, Division of Cardiology, Stanford University Medical Center, Stanford/CA, USA

(ALND), das benutzt wurde, um die Effekte lymphatischer Verletzungen im Zusammenhang mit einer begrenzten Fetteinlagerung zu untersuchen (4). Kurz gesagt besteht das Modell darin, eine 1 cm lange Inzision in der Axilla durchzuführen, durch die das axilläre Lymphknotenbasin inklusive dem perinodalen Gewebe entnommen wurde. Die Kontrolltiere wurden mit einer einfachen Inzision ohne Unterbrechung des Lymphbasins behandelt.

Das zweite verwendete Modell ist das gut beschriebene Lymphödem-Schwanzmodell (1, 4, 8, 9). Dieses Modell ermöglicht es, die Effekte lymphatischer Verletzungen im Zusammenhang mit einer signifikanten Fetteinlagerung zu studieren. In diesem Modell wird ein zirkumferenzielles Segment vollständiger Hautschichtdicke von ungefähr 2 mm Breite im mittleren Teil des Mausschwanzes entfernt, gefolgt von einer mikrochirurgischen Ligation der tiefen Lymphkollektoren. Unsere früheren Studien haben gezeigt, dass diese Mäuse sechs Wochen postoperativ ein dauerhaftes Lymphödem mit begleitender Entzündung, Fetteinlagerung und Fibrose entwickelten, was alles Kennzeichen eines Lymphödems sind (1, 4, 8, 9). Die Kontrolltiere erhielten eine Hautinzision ohne Unterbrechung der tiefen Lymphgefäße.

CD4-Depletions-Studien: Adulte, weibliche C57BL/6J-Mäuse erhielten die Behandlung des oben beschriebenen Schwanzmodells der Lymphgefäß-Unterbrechung. Die Tiere durften sich zwei Wochen lang erholen und wurden dann randomisiert in eine Therapie- und eine Kontrollgruppe einsortiert (n=8-10/Gruppe). Die Therapiegruppe bekam intraperitoneal CD4-monoklonale neutralisierende Antikörper (10 µg/g) alle fünf Tage für insgesamt vier Wochen, wie zuvor beschrieben (4). Die Kontrolltiere erhielten auf die gleiche Weise einen Isotopen-Kontrollantikörper. Die Bestätigung der CD4-Depletion wurde durch Durchflusszytometrie einer Milzzellpopulation demonstriert.

STAT-Inhibition: Um den Effekt der IL-6-Blockade auf die Fetteinlagerung zu untersuchen, wurde ein kleiner molekularer Inhibitor von JAK1/2 (AZD1480; Astra-Zeneca), dem primären Signalweg von IL-6 (10), verwendet. Die Mäuse bekamen orale Dosen von 60 mg/kg AZD1480 für sechs Wochen unmittelbar postoperativ beginnend. Die Kontrolltiere wurden mit dem Vehikel behandelt.

Histologie: Die Gewebeschnitte wurden mit 4% Paraformaldehyd fixiert unter Verwendung von EDTA und dann in Paraffin eingebettet. Die Immunohistochemie wurde für CD45⁺, CD4⁺, IL-6⁺ und STAT-3⁺-Zellen durchgeführt. Die Zellzählung machten zwei verblindete Untersucher in zufällig gewählten leistungsstarken Feldern. Ebenso wurden Hämatoxylin- und Eosin-Färbungen durchgeführt.

ELISA: Die IL-6-Level in den Gewebelysaten und im Serum wurden bestimmt unter Verwendung eines ELISA-Tests (enzyme-linked immunosorbent assays).

Statistische Analyse: Der Studentsche t-Test wurde zum Vergleich von Unterschieden zwischen zwei Gruppen verwendet und eine Varianzanalyse (ANOVA) zur multiplen Vergleichsanalyse durchgeführt. Der Korrelation zwischen den Gruppen wurde durch den Pearson-Koeffizient bestimmt. Zum Schluss erfolgte die Analyse der klinischen Lymphödemsymptome mittels gepaartem Mittelwert-Rang-Test von *Wilcoxon*. Die Daten wurden als Mittelwerte +/- Standardabweichung präsentiert und, sofern nicht anderweitig notiert, mit p<0,05 als in Betracht gezogene Signifikanz.

Ergebnisse

Die lokale und systemische IL-6-Expression ist bei Lymphödempatienten erhöht: Wir fanden heraus, dass Lymphödempatienten eine signifikante Erhöhung der Anzahl von IL-6⁺-Zellen im ihrem Lymphödemgewebe aufweisen im Vergleich zu übereinstimmenden Kontrollen. Weiterhin beobachteten wir eine signifikante Steigerung der pSTAT-3⁺-Färbung – ein intrazellulärer nachgeschalteter Schlüsselmediator der IL-6-Aktivierungskaskade – im Lymphödemgewebe. Diese immunohistochemischen Ergebnisse werden zusätzlich durch den Befund unterstützt, dass Lymphödempatienten zusätzlich eine signifikante Erhöhung der IL-6-Serumlevel im Vergleich zu passenden Kontrollpatienten aufweisen. Beim Vergleich der IL-6-Level mit dem Lymphödemstadium oder dem BMI konnte keine Korrelation festgestellt werden. Diese Tatsache war überraschend, kann aber damit zusammenhängen, dass viele Teilnehmer einen BMI unter 30 hatten.

Der IL-6-Level korreliert mit der Fettablagerung im Zusammenhang mit einer Lymphgefäßunterbrechung: Histologische Analysen des Mausmodells der lymphatischen Verletzung ergaben eine signifikante Fetteinlagerung nur im lymphödematösen Schwanzsegment und nicht im ALND-Modell-System. Immunohistochemische Analysen zeigten eine geringe aber signifikante Vermehrung der pSTAT-3⁺-Zellen in den Vorderbeinen der ALND-Mäuse. Allerdings gab es eine deutliche und signifikante Steigerung der Anzahl von pSTAT3⁺-Zellen im Schwanzmodell, und die IL-6-Gewebeexpression war 20-fach größer als bei den Kontrolltieren. Diese Ergebnisse ergänzen unsere klinischen Befunde und zeigen, dass die IL-6-Expression im Lymphödem mit einer Fetteinlagerung assoziiert ist.

Fetteinlagerung und IL-6-Expression ist von der CD4⁺-Zellinfiltration abhängig: Unser Labor zeigte zuvor, dass Mäuse, die einen Mangel an CD4⁺-Zellen aufweisen, (CD4-Knockout-Mäuse, CD4KO) nach einer Lymphgefäß-

unterbrechung kein Schwanzlymphödem aufweisen (4). Um die Hypothese zu untersuchen, dass CD4⁺-Zellen für die Fetteinlagerung notwendig sind sowie eine IL-6-Expression im Zusammenhang mit einem Lymphödem vorliegt, führten wir Schwanzoperationen in Wildtyp- und CD4KO-Mäusen durch ebenso in Wildtyp-Mäusen, bei denen CD4⁺-Zellen durch neutralisierende Antikörper (α -CD4) entfernt wurden. Wir fanden heraus, dass CD4KO- und mit α -CD4 behandelte Mäuse signifikant weniger Fetteinlagerung aufwiesen nach einer Schwanzhaut- bzw. lymphatischen Exzision und dass dieser Phänotyp mit einer signifikanten Abnahme der Anzahl von pSTAT-3⁺-Zellen und der IL-6-Gewebeexpression assoziiert war. Diese Ergebnisse legen nahe, dass im Zusammenhang mit einem Lymphödem die CD4⁺-Zell-entzündung für die Entwicklung von Fettgewebe notwendig ist wie auch die IL-6-Expression.

Verlust der IL-6-Expression ist mit Fetteinlagerung assoziiert: Wir verwendeten dann das Schwanzmodell, um die Rolle von IL-6 beim Lymphödem zu untersuchen. Wildtyp- und IL-6-Knockout-Mäuse (IL-6KO) erhielten eine Schwanzhaut- und Lymphgefäßexzision. In separaten Experimenten bekamen die Wildtyp-Mäuse eine Schwanzhaut- und Lymphgefäßexzision und wurden entweder mit dem Kontrollvehikel oder einem kleinen Inhibitor von JAK 1/2 behandelt, um unsere IL-6KO-Mausstudie zu bestätigen. Wir fanden heraus, dass der Verlust von IL-6, entweder bei IL-6KO-Mäusen oder durch den Inhibitor des JAK 1/2-Pfades, signifikant assoziiert war mit einer Zunahme an Fettgewebe beim Lymphödem. Histologische Analysen von IL-6KO- und JAK-gehemmten Mäusen zeigten eine signifikante Abnahme an pSTAT-3⁺-Zellen, was demzufolge die Suppression der IL-6-Aktivierung bestätigte. Weiterhin resultierte der Verlust von IL-6 in einer Reduktion an inflammatorischen Infiltraten inklusive CD4⁺-Zellen; dies legt nahe, dass die IL-6-Expression in die abnehmende Fetteinlagerung und Entzündung beim Lymphödem verwickelt sein kann.

Diskussion

Der molekulare und zelluläre Mechanismus, der die Pathogenese des Lymphödems bestimmt, ist wenig verstanden, und dieser Mangel an Kenntnis ist ein signifikantes Hindernis bei der Entwicklung präziser Methoden zur Vorhersage oder Therapie dieser Erkrankung. Diese Studie versucht, ein Teil des Puzzles zu beantworten: Wie ist die Fettgewebeeinlagerung beim Lymphödem reguliert?

Die Evaluation klinischer Zeichen ergab, dass Lymphödempatienten signifikant erhöhte Gewebe- und Serumlevel der IL-6-Expression und seiner nachgeschalteten Stoffwechselwege im Vergleich zu passenden Kontrollen

aufwiesen. Dieses Ergebnis ist signifikant und deutet an, dass der IL-6-Wert als ein hilfreicher Biomarker bei der Diagnose und Behandlung des Lymphödems dienen könnte. Zurzeit gibt es keine Möglichkeit der verlässlichen Vorhersage zur Entwicklung des Lymphödems. Weiterhin bestehen die derzeitigen Methoden zur Kontrolle des klinischen Behandlungserfolges aus subjektiven Messungen wie z.B. des Volumens oder Armumfangs. Deshalb würde die Entwicklung einer objektiven Methode, die zuverlässig und quantifizierbar ist, wie die Bestimmung des IL-6-Levels, eine präzisere Möglichkeit zur Vorhersage und Verfolgung des Therapieerfolges liefern. Bis jetzt sind verschiedene klinische Systeme zur Stadieneinteilung des Lymphödems entwickelt worden. Dennoch unterliegen alle subjektiven Interpretationen des klinischen Zustandes. Sie sind in ihrem Anwendungsbereich limitiert und beachten nicht die zugrundeliegenden histopathologischen Veränderungen, die mit der Entwicklung und Progression eines Lymphödems verbunden sind. In dieser Studie finden wir keine Korrelation zwischen Lymphödemstadium und IL-6-Expression. Obwohl es der Studie möglicherweise an statistischer Stärke fehlt, um kleine Unterschiede zwischen den Gruppen aufzudecken, liegt die Unmöglichkeit, eine Differenz zu erkennen, wahrscheinlich an den Unzulänglichkeiten der heute erhältlichen klinischen Stadien-Schemata. Eine Stadieneinteilung, die die histopathologische Progression des Lymphödems inklusive Fetteinlagerung und Fibrose enthält, kann deshalb ein besseres Mittel zur Kategorisierung des Lymphödems sein.

Das Lymphödem ist eine progressive Erkrankung mit variablen Beginn, Progression und Schweregrad, das sich von Patient zu Patient sehr unterscheidet. Diese Tatsache erschwert die Untersuchung des Lymphödems beim Menschen. Wir haben deshalb Mausmodelle zur Erforschung von zellulären und molekularen Mechanismen der Erkrankung verwendet. Das ALND-Modell ermöglicht uns die Untersuchung der Wirkung von lymphatischem Stau in der Abwesenheit einer signifikanten Fetteinlagerung, wohingegen unser Schwanzmodell eine dramatischere Unterbrechung des Lymphsystems mit signifikanter Fetteinlagerung repräsentiert. Beim Vergleich der zwei Modelle fanden wir heraus, dass die IL-6-Expression, die Aktivierung seiner nachgeschalteten Kaskade und Serumveränderungen der IL-6-Konzentration häufiger mit dem Schwanzmodell auftraten als mit dem ALND-Modell. Dies legt nahe, dass die Stärke der lymphatischen Verletzung und die resultierende Fetteinlagerung ein kritischer Faktor bei der Regulierung der IL-6-Expression sind. Diese Hypothese wird durch frühere Studien unterstützt, die zeigen, dass Fettgewebe eine Hauptquelle von IL-6 (11, 12) ist und dass IL-6 als ein adipolytisches Hormon fungieren kann.

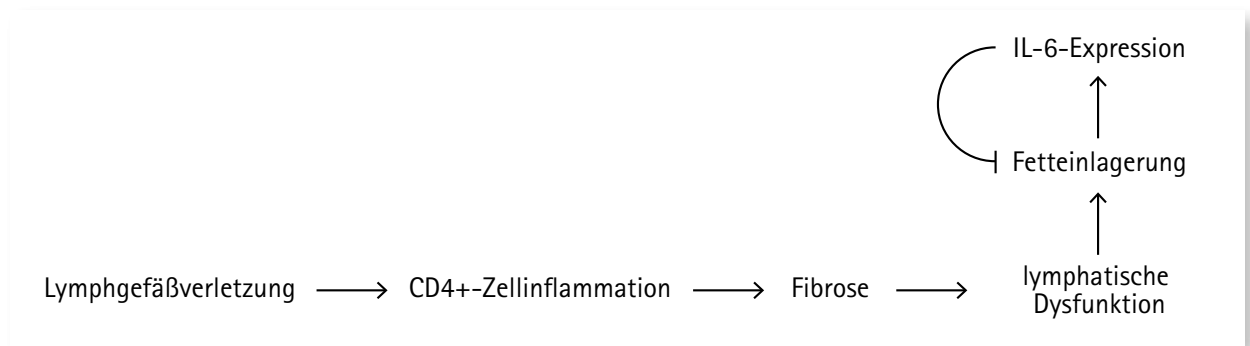


Abb 1: Diese Abbildung beschreibt die zentrale Hypothese der Studie. Eine Lymphgefäßverletzung ist durch eine chronische Entzündung mit einer starken CD4⁺-Zellkomponente charakterisiert. Dieser chronisch entzündliche Zustand führt zu Fibrose und möglicher lymphatischer Dysfunktion. Beim bestehenden Lymphödem werden eine Fetthyperplasie und -hypertrophie beobachtet. Die IL-6-Werte sind bei diesem Zustand erhöht und scheinen eine homöostatische Rolle bei Verminderung oder Aufrechterhaltung der Fetteinlagerung zu spielen.

Wie zuvor erwähnt ist die Entzündung ein histopathologisches Schlüsselkennzeichen des Lymphödems. Unsere vorherigen Studien haben demonstriert, dass sowohl das ALND- wie auch das Schwanzmodell des Lymphödems stark assoziiert sind mit einer signifikanten Erhöhung der CD45⁺- und CD4⁺-Zellinfiltration. Unser Labor konnten auch zeigen, dass eine chronische Entzündung in Form von CD4⁺-Zellen kritisch ist bei Regulierung der Pathologie des Lymphödems (3, 4). In dieser Studie fanden wir heraus, dass das inflammatorische Zellinfiltrat auf das engste mit dem akkumulierten Fettgewebe verbunden war. Diese Ergebnisse wiesen auf eine mögliche bidirektionale Verbindung hin, bei der die Entzündung die Fetteinlagerung unterstützt und andersherum. Weiterhin verringerte sich massiv die Fetteinlagerung, wenn bei CD4KO- oder α -CD4-depletierte Mäuse eine Lymphgefäßunterbrechung im Schwanz durchgeführt wurde. Zusammen genommen legen die Ergebnisse nahe, dass eine chronische CD4⁺-Zellinfiltration für die Fetteinlagerung notwendig ist.

Es ist gut bekannt, dass eine Entzündung mit einer Hochregulierung von inflammatorischen Zytokinen verbunden ist, eines von ihnen ist IL-6. Dabei handelt es sich um ein pleiotropisches Zytokin, welches von einer Menge inflammatorischer Zellen inklusive Makrophagen und T-Lymphozyten produziert wird (19). In dieser Studien fanden wir heraus, dass die chronische Entzündung ein wichtiger Regulator der IL-6-Expression beim Lymphödem ist. Wir haben gezeigt, dass der Verlust an CD4⁺-Zellen assoziiert war mit einem signifikanten Abfall der IL-6-Expression und Aktivierung seiner nachgeschalteten Mediatoren. Wenn die IL-6-Funktion verloren oder gehemmt war, konnten wir eine signifikante Steigerung der Fetteinlagerung und einen begleitenden Abfall des Entzündungsgrades feststellen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die IL-6-Expression beim Lymphödem zur Aufrechterhaltung der Fetthomöostase

durch Verringerung der Einlagerung dienen kann sowie zur Förderung der chronischen Entzündung. Diese Ergebnisse werden durch aktuelle Daten unterstützt, die IL-6 als ein pleotropisches Zytokin vorschlagen, welches nicht nur eine wichtige Rolle bei der Entzündung spielt (19), sondern auch eine signifikante Rolle bei der Regulierung der Adipozytenfunktion (20, 21). Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Steigerung der IL-6-Expression beim Lymphödem eine kompensatorische homöostatische Antwort sein kann, die darauf ausgerichtet ist, die Fetteinlagerung zu begrenzen und die Entzündung zu modulieren.

Schlussendlich demonstriert diese Studie, dass Lymphödempatienten nicht nur eine Erhöhung der Gewebelevel an IL-6 haben, sondern auch der Serumlevel, wobei IL-6 als potenzieller Biomarker für Beginn, Progression und Therapieerfolg beim Lymphödem dienen kann. Diese Erhöhung der IL-6-Expression und Aktivierung stimmt mit unseren Ergebnissen bei den Mausmodellen überein. Die chronische CD4⁺-Zellinflammation ist ein wichtiger Regulator der IL-6-Expression und Fetteinlagerung beim Lymphödem. Insgesamt ergeben diese Ergebnisse, dass IL-6 eine kritische Rolle bei der Aufrechterhaltung der Fetthomöostase spielen kann durch die Begrenzung der Fetteinlagerung beim Lymphödem (Abb. 1).

Literatur bei den Autoren.

Korrespondenzadresse

Daniel A. Cuzzone, MD
The Department of Surgery
Division of Plastic and Reconstructive
Surgery
Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
New York, NY 10065, USA
E-Mail: cuzzoned@mskcc.org

