

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des
Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. med. M. Laschke)

INNOVATIVE MAGNETRESONANZ- LYMPHOGRAPHIE UND ANALYSE DES ISCHÄMIE-REPERFUSIONS-SCHADENS IN VASKULARISIERTEN LYMPHKNOTEN- LAPPEN IM RATTENMODELL

Dissertation zur Erlangung
des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der
Universität des Saarlandes

2025

vorgelegt von Bijan Jelvani
Geboren am 07.11.1993 in Saarbrücken

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. SUMMARY.....	3
3. EINLEITUNG	5
3.1 Struktur und Funktion des lymphatischen Systems	5
3.1.1 Anatomie.....	5
3.1.2 Physiologie	6
3.2 Bedeutung des lymphatischen Systems in der Medizin	7
3.2.1 Lymphödem	7
3.2.2 Entzündungen.....	8
3.2.3 Metastasen	8
3.3 Bildgebende Verfahren zur Darstellung des Lymphsystems ...	9
3.3.1 Lymphographie	9
3.3.1.1 Direkte Lymphographie.....	9
3.3.1.2 Indirekte Lymphographie	9
3.3.2 Lymphszintigraphie.....	10
3.3.3 Indocyaningrün-Fluoreszenz-Lymphographie	10
3.3.4 MR-Tomographie	11
3.3.4.1 Grundlagen.....	11
3.3.4.2 MR-Lymphographie	12
3.3.4.3 Kontrastmittel für die MR-Lymphographie	13
3.4 Therapieoptionen des Lymphödems	14
3.4.1 Konservative Therapie	14
3.4.1.1 Komplexe physikalische Entstauungstherapie	14
3.4.1.2 Weitere konservative Behandlungsmethoden	15
3.4.2 Operative Therapie	16
3.4.2.1 Ablative Reduktionsverfahren.....	17
3.4.2.2 Rekonstruktive Verfahren	18

4. ZIEL DER STUDIE.....	22
5. MATERIAL UND METHODIK.....	23
5.1 Versuchstiere	23
5.2 Tiermodelle	23
5.2.1 Lymphödem-Tiermodell	23
5.2.1.1 Lymphadenektomie	24
5.2.1.2 Bestrahlung.....	25
5.2.1.3 Messung der Pfotendicke	27
5.2.2 I/R-Modell	28
5.3 Bildgebung	30
5.3.1 MR-Lymphographie	30
5.3.1.1 Verwendete Kontrastmittel.....	32
5.3.1.2 Kontrastmittelapplikation.....	33
5.3.1.3 Datenerhebung und -analyse der MR-Lymphographie.....	34
5.3.1.4 MR-Angiographie.....	35
5.3.2 Ultraschall	36
5.3.3 Photoakustische Bildgebung	36
5.4 Histologie.....	37
5.4.1 Herstellung histologischer Präparate	37
5.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	38
5.4.3 Sirius-Rot-Färbung	39
5.4.4 Histologische Auswertung	39
5.5 Immunhistochemie	40
5.5.1 Grundlagen	40
5.5.2 CD68.....	40
5.5.3 CD3.....	41
5.5.4 LYVE-1	41
5.5.5 CD31.....	42
5.5.6 Hämoxygenase-1.....	42

5.5.7 Proliferating Cell Nuclear Antigen	43
5.5.8 Caspase-3	43
5.5.9 Myeloperoxidase	43
5.6 Western Blot	44
5.7 Experimentelles Protokoll	46
5.8 Statistik	47
6. ERGEBNISSE	49
6.1 Kontrastmittelgestützte MR-Lymphographie	49
6.1.1 MR-Lymphographie bei gesunden Versuchstieren	49
6.1.2 MR-Lymphographie des chronischen Lymphödems	53
6.1.3 Beurteilung des Lymphödem-Modells bei Ratten	55
6.2 I/R-Analysen der VLK-Pakete	57
6.2.1 Gewebeoxygenierung und Morphologie	57
6.2.2 Western Blot-Analysen	59
6.2.2.1 Expression angiogener und lymphangiogener Wachstumsfaktoren	59
6.2.2.2 Expression der Stickstoffmonoxid-Synthasen	60
6.2.3 Histologische und immunhistochemische Analysen	61
6.2.3.1 Morphologie der VLK-Lappen	61
6.2.3.2 Analyse des mikrovaskulären Netzwerks	63
6.2.3.3 Oxidativer Stress	64
6.2.3.4 Zellproliferation und Apoptose	65
6.2.3.5 Immunreaktion	66
6.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	68
7. DISKUSSION	71
7.1 Modelle	71
7.1.1 Lymphödem-Modell	71
7.1.2 I/R der VLK-Lappen	71

7.2 Untersuchungstechniken	74
7.2.1 MR-Lymphographie	74
7.2.2 Pfortendickemessung	76
7.2.3 Photoakustik und Ultraschall	77
7.3 Ergebnisse.....	77
7.3.1 Kontrastmittelgestützte MR-Lymphographie.....	77
7.3.2 Histologie und Immunhistochemie	80
7.3.3 Western Blot	82
7.4 Schlussfolgerungen und Ausblick.....	84
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	85
9. DANKSAGUNG	103
10. LEBENSLAUF	104
11. PUBLIKATIONEN	106

1. Zusammenfassung

Bei einem Lymphödem handelt es sich um eine lokalisierte Weichteilschwellung aufgrund eines dysfunktionalen Lymphabflusses mit resultierendem Lymphstau. Ein chronisches Lymphödem ist eine progressive Erkrankung mit unterschätzter physischer und psychosozialer Belastung für die Betroffenen. Die Diagnostik des Lymphödems ist mit zahlreichen Schwierigkeiten verbunden, insbesondere bei PatientInnen mit Adipositas oder chronischen Venenerkrankungen. Die kontrastmittelgestützte Magnetresonanz (MR)-Lymphographie ist eine vielversprechende Methode, das Lymphsystem hochauflösend darzustellen und so die Diagnostik zu vereinfachen. Die Therapie erfolgt meist konservativ und symptomatisch und hat als Ziel, einem Fortschreiten der Erkrankung entgegenzuwirken. Neue Therapieansätze wie die vaskularisierte Lymphknoten-Transplantation besitzen durch Wiederherstellung des lymphatischen Flusses das Potenzial, kurativ eingesetzt werden zu können. Dabei ist weitestgehend unklar, wie das Spendergewebe in das Empfängerewebe eingebaut wird.

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung des neuen Nanopartikels AGuIX für die kontrastmittelgestützte MR-Lymphographie evaluiert. Hierfür wurde eine Vergleichsstudie mit dem etablierten dendrimer-basierten Kontrastmittel Gd-DOTA durchgeführt. Nach simultaner Injektion beider Kontrastmittel in die rechte und linke Hinterlaupfote gesunder Lewis-Ratten wurden mit Hilfe eines 9.4 Tesla Kleintier-Magnetresonanztomographen über einen Zeitraum von 90 Minuten hochauflösende, dreidimensionale MR-Lymphographie-Bilder aufgenommen. Unterstützend wurden eine Gadofosveset-gestützte MR-Angiographie und eine chirurgische Dissektion nach Methylenblau-Injektion durchgeführt. Dabei erfolgte zusätzlich eine Machbarkeitsstudie der AGuIX-basierten MR-Lymphographie nach Induktion eines chronischen Lymphödems der Hinterlaupfoten von Lewis-Ratten. Das Lymphödem wurde bei den Versuchstieren durch Kombination aus poplitealer und inguinaler Lymphadenektomie an der rechten Hinterlaupfote sowie anschließender 20 Gy Bestrahlung induziert. Hierbei diente die linke Hinterlaupfote der jeweiligen Versuchstiere als intraindividuelle Kontrolle. Um die Dynamik der lymphatischen Regeneration beurteilen zu können, folgten Kontroll-MR-Lymphographie-Untersuchungen 6, 10 und 14 Wochen postoperativ. Zudem erfolgten histologische und immunhistochemische Analysen von Gewebeproben der Versuchstiere. Die AGuIX-basierten MR-Lymphographien ermöglichten eine hochauflösende Darstellung des Lymphsystems der Hinterlaupfoten. Unmittelbar nach AGuIX-Injektion zeigte sich eine signifikante Erhöhung sowohl des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses als auch des Kontrast-zu-Rausch-Verhältnisses innerhalb des poplitealen Lymphknotens, die auch 90 Minuten nach Injektion noch nachweisbar waren. Im Vergleich zu Gd-DOTA erlaubte AGuIX eine signifikant stärkere und längere Kontrastierung des Lymphsystems. AGuIX-basierte Kontroll-MR-Lymphographien wiesen sechs Wochen

nach Lymphadenektomie einen lymphatischen Kollateralkreislauf nach, welcher auf eine lymphatische Regeneration hindeutet.

Im zweiten Studienabschnitt wurden die molekularbiologischen Veränderungen innerhalb vaskularisierter Lymphknoten-Lappen im Anschluss an einen Ischämie-Reperfusion (IR)-Schaden untersucht. Hierfür wurde bei gesunden Lewis-Ratten das axilläre Lymphknoten-Fett-Paket zusammen mit den versorgenden Gefäßen freipräpariert. Anschließend wurden die vaskularisierten Lymphknoten-Lappen durch Anlage mikrochirurgischer Gefäßklemmen einer Ischämie von 45 oder 120 Minuten unterzogen. Bei weiteren Versuchstieren wurden die vaskularisierten Lymphknoten-Lappen ohne Anlage einer Ischämie nach Präparation reseziert und dienten so als Kontrollgruppe. Mittels Western Blot wurde bei weiteren Versuchstieren das perinodale Fettgewebe und die Lymphknoten getrennt analysiert und auf die Expression angiogener und lymphangiogener Wachstumsfaktoren hin untersucht. Mit Hilfe histologischer und immunhistochemischer Techniken wurden die vaskularisierten Lymphknoten-Lappen auf Veränderungen der Morphologie, Mikrogefäßdichte, Zellproliferation/-apoptose und der Immunzellinfiltration untersucht. Während in der IR-45-Gruppe keine signifikanten Veränderungen zu beobachten waren, zeigte sich eine signifikante Zerstörung der normalen Zellarchitektur innerhalb der Lymphknoten nach einer Ischämiezeit von 120 Minuten, während das perinodale Fettgewebe weitestgehend unverändert blieb. In Einklang mit diesen Ergebnissen zeigte sich eine Reduktion der CD31⁺ Blutgefäße mit fortschreitender Ischämiezeit und kompensatorischer Erhöhung der angiogenen Wachstumsfaktoren *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)-A und -D. Interessanterweise war die Expression von VEGF-C nicht erhöht. Die Ischämiezeit von 120 Minuten ging zudem mit einer signifikanten Erhöhung der Immunzellinfiltration und der Anzahl proliferierender/apoptotischer Zellen innerhalb der Lymphknoten einher, während nach 45-minütiger Ischämie derartige Veränderungen nicht beobachtet werden konnten. Im Gegensatz dazu kam es im perinodalen Fettgewebe weder zu einer signifikanten Abnahme der CD31⁺ Blutgefäße noch zu einer Zunahme der Immunzellinfiltration.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass es sich bei AGuIX um ein vielversprechendes Kontrastmittel für die MR-Lymphographie handelt. Es erlaubt eine selektivere Darstellung von Lymphgefäßen als herkömmliche Kontrastmittel wie Gd-DOTA. Zusätzlich zur höheren Kontrastfähigkeit verweilt AGuIX im Vergleich zu Gd-DOTA länger im Lymphsystem, wodurch die Diagnostik von Lymphödemen vereinfacht wird. AGuIX sollte daher in weiteren Studien hinsichtlich der Eignung am Menschen analysiert werden. Im zweiten Studienabschnitt konnte gezeigt werden, dass die Lymphknoten innerhalb vaskularisierter Lymphknoten-Lappen stark auf einen I/R-Schaden reagieren, während das perinodale Fettgewebe weitestgehend unbeeinflusst bleibt.

2. Summary

Lymphedema is a localized soft tissue swelling, that results from a dysfunctional lymph flow and lymphostasis. It is a chronic progressive disease with an underestimated psychosocial burden for the affected patients. The diagnosis of chronic lymphedema is challenging, especially in patients with obesity or chronic venous insufficiency. Contrast-enhanced magnetic resonance lymphography represents a promising method which allows a high-resolution imaging of the lymphatic system and thereby facilitates diagnostics. Therapeutic interventions are mostly symptomatic and conservative and aim at preventing the progression of the disease. Innovative therapeutic approaches like the vascularized transplantation or transposition of lymph nodes have the potential to restore the physiological lymph flow and, thus, may be used for curative purposes. However, the underlying process of how the donor tissue is functionally integrated into the host tissue remains largely unknown.

In the first part of this thesis, the suitability of the novel nanoparticle AGuIX for contrast-enhanced magnetic resonance lymphography was evaluated. For this purpose, a comparative study using AGuIX as well as the clinical dendrimer-based contrast agent Gd-DOTA was conducted in rats. After simultaneous injections of the contrast agents in both hindlimbs, repetitive three-dimensional magnetic resonance lymphography sequences were acquired over a period of 90 minutes using a 9.4 Tesla animal scanner. In support of and in addition to these measures, Gadofosveset-enhancing magnetic resonance angiography as well as surgical dissection after methylene blue injection were performed. In addition, after induction of a chronic lymphedema in the right hindlimbs by means of popliteal and inguinal lymphadenectomy and irradiation with 20 Gy, a feasibility study of AGuIX-enhanced magnetic resonance lymphography was conducted. Thereby, the left unoperated hindlimbs served as intraindividual control. In order to analyze the lymphatic reorganization, repeated magnetic resonance imaging was performed 6, 10 and 14 weeks after inducing chronic lymphedema. Moreover, tissue samples were analyzed by means of histology and immunohistochemistry. The AGuIX-enhanced magnetic resonance lymphography allowed to generate high-resolution images of the rodents' hindlimbs. The injection of AGuIX immediately resulted in a significant increase of both signal-to-noise ratio and contrast-to-noise ratio within the popliteal lymph nodes, which remained elevated more than 90 minutes after the injection. Moreover, AGuIX allowed for a significantly stronger and prolonged contrasting of the lymphatic system compared to Gd-DOTA. Finally, six weeks after lymphadenectomy, AGuIX-based magnetic resonance lymphography showed a lymphatic collateral circulation, indicating a lymphatic regeneration.

In the second part of this thesis, the molecular and cellular effects that ischemia/reperfusion exerts on vascularized lymph node flaps were analyzed. For this purpose, the axillary lymph node flaps along with their supplying blood vessels of healthy Lewis

rats were dissected. Subsequently, by applying microvascular clamps on the pedicle, the dissected flaps underwent an ischemia for either 45 minutes or 120 minutes. Moreover, the vascularized lymph node flaps of additional animals were extracted, whereby none of them underwent ischemia and, thus, served as controls. By means of Western blotting, separate analyses of the perinodal adipose tissue and the lymph nodes concerning the expression of angiogenic and lymphangiogenic growth factors were conducted. Moreover, the morphology, microvessel density, proliferation, apoptosis and immune cell infiltration of vascularized lymph node flaps were evaluated by means of histological and immunohistochemical analyses. The results showed that lymph nodes that underwent an ischemia for 120 minutes exhibited a destroyed physiological cell architecture, whereas the perinodal adipose tissue remained unaffected. Accordingly, a significant reduction of CD31⁺ microvessels along with a compensatory increase of the expression of the angiogenic growth factors vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and -D was observed. Interestingly, the expression of VEGF-C remained unchanged. Moreover, a significant increase of infiltrating immune cells and proliferating/apoptotic cells in lymph nodes undergoing a 120-minutes ischemia was demonstrated. Unlike the lymph nodes, there were no marked changes within the perinodal adipose tissue.

Taken together, the results of the present thesis show that AGuIX is a promising contrast agent for magnetic resonance lymphography in rodents. Compared to Gd-DOTA, AGuIX allows for a more detailed visualization of lymph vessels. In addition, AGuIX remains detectable for a longer time period and, thus, facilitates diagnostic procedures. Hence, AGuIX should be tested for the use in humans. The second part of the present thesis indicates that lymph nodes within vascularized lymph node flaps show a strong reaction in response to an ischemia reperfusion injury, whereas the perinodal adipose tissue remains largely unaffected.

3. Einleitung

Der menschliche Körper besteht im Wesentlichen aus zwei verschiedenen Gefäßsystemen: dem Blut- und dem Lymphgefäßsystem. Obwohl beide Systeme viele Gemeinsamkeiten in ihrem Aufbau und ihrer Funktion besitzen, wurden sie lange Zeit unterschiedlich betrachtet. Während das Blutgefäßsystem über Jahrhunderte sehr ausführlich analysiert wurde, hat das lymphatische System weitaus weniger Aufmerksamkeit erfahren und ist somit vermehrt in den Hintergrund gerückt. Dennoch haben einige wichtige Entdeckungen in den vergangenen Jahrzehnten gezeigt, welche Funktionen das lymphatische System besitzt und welche wichtige Bedeutung ihm in der Medizin zukommt.

3.1 Struktur und Funktion des lymphatischen Systems

3.1.1 Anatomie

Das lymphatische System besteht aus Lymphgefäßen und lymphatischen Organen. Im Gegensatz zum Blutgefäßsystem, welches ein in sich geschlossenes, im Kreis geschaltetes Netzwerk darstellt, handelt es sich beim Lymphsystem um ein blind endendes, lineares System. Während das Blut von *einem* Organ, dem Herz, ausgeworfen und wieder eingesammelt wird, wird die Lymphe, bestehend aus Gewebsflüssigkeit, Proteinen und Immunzellen, aus den Lymphkapillaren der meisten Organe aufgenommen. Diese Lymphkapillaren vereinigen sich zu größeren Lymphgefäßen, sogenannten Lymphkollektoren. In diesen Lymphkollektoren sind die Lymphknoten zwischengeschaltet und dienen als Filterstationen. Die Kollektoren vereinigen sich weiter zu Lymphsammelstämmen (*Trunci*), die dann im Bereich des linken Venenwinkels (*Angulus venosus sinister*) in die obere Hohlvene und somit in den Blutkreislauf münden. Der Transport durch das lymphatische Gefäßnetzwerk kann sowohl aktiv als auch passiv erfolgen. Beim aktiven Transport wird die Lymphe durch unwillkürliche Kontraktion der Gefäßwände entlang der Lymphgefäße transportiert. Beim passiven Transport werden durch die Kontraktion der umliegenden Skelettmuskulatur die Lymphgefäße von außen komprimiert und so die Lymphe transportiert (Lüllmann-Rauch, 2019).

3.1.2 Physiologie

Das lymphatische System besitzt einige Hauptaufgaben, die für eine normale Funktion des menschlichen Körpers unabdingbar sind. Eine dieser Aufgaben besteht darin, für eine ausgeglichene Homöostase der extrazellulären Flüssigkeit zu sorgen (Baluk et al., 2007). Diese Flüssigkeit entsteht durch transkapilläre Filtration des Blutes im Interstitium aufgrund der Differenz zwischen osmotischem Druck und Perfusionsdruck des umliegenden Gewebes (Wiig & Swartz, 2012). Bei einem Ungleichgewicht zwischen Filtration und lymphatischem Abtransport entsteht ein sogenanntes Lymphödem. Der Grund für ein solches Ungleichgewicht kann eine erhöhte Filtration des Blutes, ein verminderter Abtransport durch die Lymphgefäße oder eine Kombination aus beidem sein (Adamczyk et al., 2016).

Darüber hinaus kommt dem lymphatischen System eine zentrale Rolle im Rahmen des Immunsystems zu. So werden Krankheitserreger, Fremdkörper und andere Mikroorganismen durch Lymphozyten zu regionalen Lymphknoten transportiert, die als Filterstationen dienen und eine Immunreaktion auslösen. Zudem können lymphatische Endothelzellen (LEC) dem Immunsystem Antigene direkt präsentieren und leisten so ihren Beitrag zur Immunabwehr (Randolph et al., 2017). Es nutzen jedoch auch viele bösartige Tumore dieses Netzwerk, um Tumorzellen im gesamten Körper zu verbreiten. So konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen der Lymphgefäßdichte und vermehrter Metastasierung nachgewiesen werden (Skobe et al., 2001; Staker et al., 2001).

Zuletzt ist das Lymphsystem ein wesentlicher Regulator des Fettstoffwechsels. Nahrungsfette, die hauptsächlich als Triacylglyceride (TAG) vorliegen, werden durch Enterozyten des Dünndarms resorbiert. Lipide werden an Proteinen gebunden transportiert. Chylomikronen sind TAG-reiche Lipoproteine, welche von den Mukosazellen des Dünndarms produziert und in das Lymphsystem aufgenommen werden. Die an Transportproteine gebundenen Nahrungsfette gelangen so schließlich über den Venenwinkel in den Blutkreislauf. Dies erklärt das Vorkommen von Weichteilfibrose und Fettakkumulation bei PatientInnen mit Lymphödemen (Tashiro et al., 2016).

Um die genannten Funktionen erfüllen zu können, muss zunächst ein entsprechendes Lymphgefäßnetzwerk über den Prozess der Lymphangiogenese gebildet werden. Dies ist ein komplexer Prozess, der das Zusammenspiel von speziellen Wachstumsfaktoren und Rezeptoren voraussetzt. Hierbei spielen die *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)-Proteinfamilie und die entsprechenden Rezeptoren eine zentrale Rolle. So ist die Aktivierung des VEGF-Rezeptors (VEGFR)-2 vor allem für die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) verantwortlich, während eine Aktivierung des VEGFR-3 in einer Hochregulation der Lymphangiogenese resultiert. Der zuerst entdeckte Wachstumsfaktor dieser Proteinfamilie VEGF-A erhöht die Permeabilität von Blutgefäßen (Matsumoto & Ema, 2014; Peach et al., 2018). Seine Hauptfunktion besteht insbesondere darin, nach Bindung an VEGFR-2 die

Bildung neuer Blutgefäße zu stimulieren. Dies ist bei der Therapie einiger Tumorerkrankungen von besonderem Interesse, da die Blockade von VEGF-A beim Tumorwachstum eine Therapiemöglichkeit darstellt (Ross et al., 2003). VEGF-C und VEGF-D sind weitere wichtige Wachstumsfaktoren, welche die Lymphangiogenese durch Bindung an VEGFR-2 und VEGFR-3 stimulieren. Dabei wird VEGFR-3 in der Embryonalentwicklung zunächst auf allen Endothelzellen exprimiert und dient erst im weiteren Verlauf als spezifischer Marker für die Lymphangiogenese (Alitalo et al., 2005). Während VEGFR-2 hauptsächlich auf den Endothelzellen der Blutgefäße zu finden ist und die Bildung neuer Blutgefäße stimuliert, übernimmt VEGFR-3 dieselbe Funktion auf den Endothelzellen des Lymphgefäßsystems. Entsprechend weisen VEGF-C und VEGF-D sowohl eine angiogene als auch eine lymphangiogene Wirkung auf.

3.2 Bedeutung des lymphatischen Systems in der Medizin

3.2.1 Lymphödem

Lymphödeme sind Akkumulationen an Gewebsflüssigkeit, die aus einer Insuffizienz der Lymphkapillaren resultieren. Diese Insuffizienz kann angeboren (kongenital) oder erworben sein. Entsprechend lassen sich primäre und sekundäre Ödeme unterscheiden.

Das primäre Lymphödem entsteht durch eine nicht vorhandene oder insuffiziente Bildung eines lymphatischen Netzwerks, was sowohl zu strukturellen Veränderungen als auch zu funktionellen Beschwerden führt. Dies kann durch Mutationen in verschiedenen Genen verursacht werden. Die Kinmonth's Klassifikation primärer Lymphödeme (Kinmonth, 1965; Kinmonth & Wolfe, 1980) unterscheidet die PatientInnen (a) nach dem Alter bei Auftreten der Symptomatik (kongenital, praecox und tarda) und (b) nach dem Grad der abnormen Lymphgefäße (Aplasie, Hypoplasie, Hyperplasie und Lymphknotenfibrose). Neuere bildgebende Verfahren wie die Magnetresonanz (MR)-Lymphographie ermöglichen heutzutage genauere Klassifikationen (Liu et al., 2012).

Das sekundäre Lymphödem kommt weitaus häufiger vor als das primäre, wobei genaue Zahlen schwer zu ermitteln sind. Die weltweit häufigste Ursache ist die Filariose, eine Infektion mit parasitischen Fadenwürmern aus der Gruppe der Filarien. In Industrieländern hingegen sind Tumorerkrankungen der häufigste Grund für das Auftreten sekundärer Lymphödeme. So können Ödeme nicht nur durch den direkten obstruierenden Einfluss von Tumoren entstehen, sondern auch in Folge der Therapie. Sekundäre Lymphödeme nach Therapien, wie beispielsweise einer Lymphadenektomie oder einer Strahlen- und/oder Chemotherapie, stellen

schwerwiegende Komplikationen für die behandelten PatientInnen dar und gehen mit einer deutlich eingeschränkten Lebensqualität einher (Brahmi & Ziani, 2016; Biglia et al., 2017).

3.2.2 Entzündungen

Bei Entzündungen handelt es sich um komplexe biologische Reaktionen, die darauf abzielen, das Gewebe gegen pathogene Keime, Fremdkörper und andere schädliche Reize zu schützen (Kim et al., 2014). Entzündungsreaktionen gehen mit einer Vielzahl von systemischen und lokalen Veränderungen, wie beispielsweise der Erhöhung der Gefäßpermeabilität, der Aktivierung von Entzündungsmediatoren und dem *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS), einher (Kuprash & Nedospasov, 2016). In zahlreichen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen Entzündungen und der Lymphangiogenese sowie Remodeling der Lymphgefäße nachgewiesen werden (Kim et al., 2014; Liao & von der Weid, 2014; Cimpean & Raica, 2015; Ghanta et al., 2015). Dies ist notwendig, um Antigene, entstandene Abbauprodukte und überschüssige Entzündungszellen auszuwaschen und das durch erhöhte Gefäßpermeabilität entstandene Ödem zu beseitigen (Kim et al., 2014).

Die durch eine Entzündung induzierte Lymphangiogenese besitzt jedoch eine Kehrseite, die im Rahmen von Organtransplantationen relevant ist, insbesondere bei Abstoßungsreaktionen transplanterter Organe. So konnten Kerjaschki et al. (2004) zeigen, dass eine Abstoßungsreaktion mit einer exzessiven T- und B-Lymphozyten-vermittelten Immunreaktion einhergeht. Zudem fanden Nykänen et al. (2010) heraus, dass sich die Überlebenszeit von Herztransplantaten bei Mäusen verlängert, wenn der VEGFR-3-Rezeptor und somit die Lymphangiogenese inhibiert wird. Ähnliche Ergebnisse konnten bei der Hornhauttransplantation beobachtet werden, bei der eine anti-lymphangiogene Therapie das Überleben der Transplantate verlängern konnte (Hos et al., 2015).

3.2.3 Metastasen

Tumormetastasen zählen zur Haupttodesursache bei Karzinomerkrankungen. Sie entstehen durch Verschleppung von Tumorzellen über das Blut- (hämatogen) oder Lymphsystem (lymphogen) zu anderen Organen, wo sie sich ansiedeln und vermehren können. In der Vergangenheit wurden zahlreiche Studien zur Analyse des Verbreitungsmusters und der Mechanismen der hämatogenen Metastasierung durchgeführt, obwohl viele bösartige Tumore nach heutigem Wissensstand auch lymphogen metastasieren. Auch die Zellen von Tumoren, die vorwiegend hämatogen metastasieren, müssen oft erst das lymphatische System passieren, um dann durch den Venenwinkel in den Blutkreislauf zu gelangen (Mortimer & Rockson, 2014). Vor dem Hintergrund, dass Sentinel-Lymphknoten-Metastasen die Prognose

der PatientInnen maßgeblich bestimmen und die Notwendigkeit einer adjuvanten Therapie determinieren (de Boer et al., 2010), kommt Sentinel Lymphknoten-Biopsien bei der frühen Suche nach Metastasen eine große Bedeutung zu. Ähnlich wie bei entzündetem Gewebe setzen bösartige Tumore verschiedene Wachstumsfaktoren (u.a. VEGF-C/-A) frei, welche die Lymphangiogenese innerhalb der Tumore und den Sentinel Lymphknoten induzieren und so die Entstehung von Lymphknotenmetastasen fördern (Karaman & Detmar, 2014).

3.3 Bildgebende Verfahren zur Darstellung des Lymphsystems

3.3.1 Lymphographie

3.3.1.1 Direkte Lymphographie

Zunächst stellt die direkte Lymphographie ein radiologisches Verfahren zur Darstellung von Lymphgefäßen und Lymphknoten dar, bei der ein peripheres Lymphgefäß zunächst mit Hilfe einer subkutanen Farbstoffapplikation (Patentblau) sichtbar gemacht wird. Neben dem peripheren Lymphgefäß können durch die intralymphatische Injektion eines öligen Röntgenkontrastmittels nachgeschaltete Lymphkollektoren sowie Lymphknoten dargestellt werden (Munn & Padera, 2014). Die direkte Lymphographie erlaubt eine detaillierte Darstellung der Lympharchitektur und galt lange Zeit als Methode der Wahl zur Diagnose pathologischer Veränderungen des Lymphsystems, insbesondere bei Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen (Guermazi et al., 2003). Zur Diagnostik des chronischen Lymphödems ist diese Methode jedoch aufgrund der Gefahr der Befundverschlechterung kontraindiziert. Im Vergleich zu anderen bildgebenden Verfahren ist die direkte Lymphographie invasiv und zeitintensiv und wird aktuell nur noch zur Erfassung von Defekten im Verlauf des Ductus thoracicus (Boffa et al., 2008) sowie zur Lokalisation von Lymphfisteln (Kos et al., 2007) verwendet.

3.3.1.2 Indirekte Lymphographie

Des Weiteren handelt es sich bei der indirekten Lymphographie ebenfalls um ein radiologisches Verfahren zur morphologischen Darstellung peripherer Lymphgefäße. Bei diesem Verfahren wird ein wasserlösliches, nicht-ionisches Röntgenkontrastmittel subepidermal injiziert und anschließend über interendotheliale Spalten (*junctions*) in die Lymphkapillaren aufgenommen (Weissleder & Weissleder, 1989). Die indirekte

Lymphographie kommt insbesondere bei der Darstellung morphologischer Veränderungen der Lymphgefäße bei lymphostatischen Ödemen zum Einsatz. Da zentrale Lymphgefäße und Lymphknoten bei der indirekten Lymphographie in der Regel nicht dargestellt werden, wird diese Technik nur zur Beurteilung oberflächlicher Lymphgefäße herangezogen.

3.3.2 Lymphszintigraphie

Die Lymphszintigraphie ist die klinisch am weitesten verbreitete Methode zur Darstellung von Lymphgefäßen (Weissleder & Thrall, 1989; O'Mahony et al., 2004; Sevic-Muraca et al., 2014). Bei dieser Methode handelt es sich um ein minimal-invasives, nuklearmedizinisches Untersuchungsverfahren, das insbesondere zur quantitativen Beurteilung des Lymphabflusses und zur Bestimmung der Restfunktion eines geschädigten Lymphsystems verwendet wird (Yoshida et al., 2016). Hierzu werden subkutan injizierte, radioaktiv markierte Substanzen durch das Lymphsystem aufgenommen und akkumulieren in den nachgeschalteten Lymphknoten, wodurch diese durch wiederholte Bildgebung mittels Gammakamera dargestellt werden können (Weissleder & Weissleder, 1988). Eine häufig verwendete radioaktiv markierte Substanz ist an Albumin gebundenes ^{99m}Tc -Technetium (^{99m}Tc). Radiopharmaka werden dank ihrer molekularen Eigenschaften nicht vom venösen Gefäßsystem aufgenommen und reichern sich ausschließlich im Lymphsystem an. Jedoch ist anzumerken, dass die niedrige Auflösung dieses Verfahrens nur eine eingeschränkte Aussage über Lymphgefäße und Lymphknoten erlaubt.

3.3.3 Indocyaningrün-Fluoreszenz-Lymphographie

Die Indocyaningrün (ICG)-Fluoreszenz-Lymphographie als weiteres bildgebendes Verfahren ist ein neues risikoarmes Verfahren zur Darstellung oberflächlicher Lymphgefäße an den Extremitäten. Das ICG ist eine in der Medizin etablierte Substanz, die unter anderem zur (intraoperativen) Funktionsuntersuchung verschiedener Organsysteme zum Einsatz kommt (Ogata et al., 2007; Kaplan-Marans et al., 2019; Marchese et al., 2019). Der Farbstoff ICG absorbiert und fluoresziert im Nahinfrarot-Bereich. Für medizinische Anwendungen wird ein Absorptionsmaximum bei ca. 800 nm beschrieben. Subkutan injiziertes ICG bindet das Plasmaprotein Albumin und wird anschließend lymphogen abtransportiert, wodurch die oberflächlichen Lymphkollektoren über eine Infrarotkamera dargestellt werden können.

Ein wesentlicher Vorteil der ICG-Fluoreszenz-Lymphographie ist die Möglichkeit der Echtzeit-Aufzeichnung des Lymphflusses. Diese kann unter anderem bei der intraoperativen Darstellung der Sentinel Lymphknoten verwendet werden, um das Risiko von

Lymphknotenmetastasen und Tumorrezidiven zu verringern. Vielversprechende Ergebnisse wurden bislang in experimentellen Studien bei der Therapie von Magen-, Kolon- und Mammakarzinomen erzielt (Kusano et al., 2008; Guo et al., 2017; Chand et al., 2018).

3.3.4 MR-Tomographie

3.3.4.1 Grundlagen

Die MR-Tomographie ist ein nicht-invasives Schnittbildverfahren und basiert auf dem physikalischen Effekt der Kernspinresonanz (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR). Die MR-Tomographie kommt insbesondere bei der Darstellung von Weichteilstrukturen und Nervengewebe zum Einsatz. Grundlage dieses Verfahrens ist der hohe Anteil an Wasserstoffatomen im menschlichen Gewebe. Hierbei macht man sich die Tatsache zunutze, dass Wasserstoffatome aus einem einfach positiv geladenen Elementarteilchen (Proton) bestehen und somit einen sogenannten Netto-Drehimpuls (Eigenrotation eines Teilchens = Spin) besitzen. Magnetfelder entstehen durch Bewegung geladener Teilchen, sodass der Spin des positiv geladenen Wasserstoffatoms ein Magnetfeld erzeugt, welches als magnetisches Dipolmoment bezeichnet wird. Wird nun ein äußeres starkes Magnetfeld angelegt, richten sich die Protonen entlang des Magnetfeldes aus. Diese Ausrichtung der magnetischen Dipolmomente erfolgt parallel oder antiparallel zur Feldstärke, wobei sich ein geringer Überschuss der Protonen parallel zum statischen Magnetfeld ausrichtet. Dieser geringe Überschuss bewirkt in der Summe die außen messbare Magnetisierung (M-Vektor) parallel zum angelegten Magnetfeld. Die Protonen rotieren nicht nur um die eigene Achse (Kern-Spin), sondern auch um die Achse des angelegten Magnetfeldes. Dieser Vorgang wird Präzession genannt. Weiter gibt es die sogenannte Larmor-Frequenz, sie gibt die Frequenz an, mit der die Protonen um die Längsachse des Magnetfeldes präzidieren. Diese ist abhängig von der Feldstärke des Magnetfeldes (in Tesla, [T]) und beträgt bei Protonen 42,58 MHz/T (Weishaupt et al., 2014). Die eigentliche Bildgebung bei der MR-Tomographie basiert auf der Auslenkung der Protonen aus dem Gleichgewichtszustand. Um die Atomkerne in einem Magnetfeld anzuregen, werden Hochfrequenzimpulse (HF-Puls) entsprechend der Larmor-Frequenz ausgestrahlt. Dieser elektromagnetische Impuls bewirkt unter Aufnahme von Energie eine Auslenkung des M-Vektors senkrecht zum äußeren Magnetfeld. Wird der Hochfrequenzimpuls abgeschaltet, kehrt der M-Vektor in seinen Ausgangszustand zurück und gibt die zugeführte Energie als Signal wieder ab, welche von den Radiofrequenzspulen des MR-Tomographen gemessen wird. Dieser Prozess wird als Relaxation bezeichnet. Entsprechend wird die Zeit, die dabei vergeht, Relaxationszeit genannt. Man unterscheidet die T1-Längsrelaxationszeit (Spin-Gitter-Relaxation) und die T2-Querrelaxationszeit (Spin-Spin-

Relaxation). Die T1-Relaxationszeit bezeichnet den Zeitpunkt, an dem 63 % der Protonen in Längsrichtung relaxiert sind, also die Dauer des Wiederaufbaus des M-Vektors in longitudinaler Richtung im Vergleich zum Hauptmagnetfeld. Die T2-Relaxationszeit hingegen bezeichnet den Zeitpunkt, an dem 63 % der Protonen in Querrichtung relaxiert sind, und beschreibt somit die Abnahme der Quermagnetisierung (senkrecht zum Hauptmagnetfeld). Aufgrund ihres unterschiedlichen Protonengehalts besitzen verschiedene Gewebearten individuelle T1- und T2-Relaxationszeiten. Zudem können die T1- und T2-Relaxationszeiten durch Einstellung der Zeit zwischen zwei HF Pulsen (= *time of repetition* [TR]) und der Dauer zwischen HF Puls und Signalmessung (= *time of echo* [TE]) unterschiedlich stark gewichtet werden, was entsprechende Bildkontraste in der MR-Tomographie-Bildgebung bewirkt (Schick, 2005).

3.3.4.2 MR-Lymphographie

Die MR-Lymphographie ist ein nicht-invasives Verfahren zur Darstellung pathologischer Veränderungen des oberflächlichen und tiefen Lymphsystems. Sie liefert einen dreidimensionalen Datensatz, der mit Hilfe eines speziellen Programms eine hochauflösende Darstellung des Lymphsystems erlaubt. Die gute räumliche und zeitliche Auflösung dieser Bildgebung ermöglicht eine genaue Differenzierung einzelner Lymphgefäße sowie Areale mit dermalem Rückfluss (*dermal backflow*; Lohrmann et al., 2007). Diese Informationen eignen sich insbesondere zur präoperativen Planung mikrochirurgischer Maßnahmen und zur postinterventionellen Verlaufskontrolle (Notohamiprodjo et al., 2012, Chen et al., 2020). Durch die Verwendung von entsprechenden Kontrastmitteln kann die Sensitivität und Spezifität der MR-Lymphographie deutlich gesteigert werden. Anders als bei der herkömmlichen kontrastverstärkten MR-Tomographie erfolgt die Kontrastmittelapplikation bei der MR-Lymphographie subkutan und interdigital in die zu untersuchende Extremität. Aufgrund des lückenhaften Endothels und der durchlässigen Basalmembran wird das Kontrastmittel über die Lymphkapillaren in das Lymphsystem aufgenommen, wobei sich dieses unter anderem in Lymphknoten anreichert. Im Folgenden werden dreidimensionale MR-Sequenzen akquiriert, aus denen sich je nach Verteilungs- und Anreicherungsmuster des Kontrastmittels anatomische und funktionelle Informationen ableiten lassen. Die MR-Lymphographie kann sowohl zur morphologischen Darstellung der Lymphgefäße, Lymphknoten und lymphatischer Malformationen als auch zur Beurteilung des Lymphflusses, des Sentinel Lymphknotens und des umliegenden Gewebes eingesetzt werden. Da sich die meisten Kontrastmittel zusätzlich stark im venösen System anreichern, ist eine Differenzierung zwischen Lymphgefäß und Blutgefäß nur morphologisch oder mit Hilfe einer zusätzlichen MR-Angiographie möglich.

Ein weiterer Vorteil der MR-Lymphographie ist die Möglichkeit zur Beurteilung des umliegenden Weichteilgewebes. So kann beispielsweise die Ursache eines sekundären Lymphödems bei Vorliegen von Tumoren oder Raumforderungen direkt visualisiert werden (Liu et al., 2010). Die kontrastverstärkte MR-Lymphographie wurde initial in tierexperimentellen Studien entwickelt, konnte jedoch in den vergangenen Jahren auch beim Menschen vielversprechende Ergebnisse liefern, insbesondere bei der Diagnose von Lymphödem (Lohrmann et al., 2007; Rane et al., 2013; Cellina et al., 2021), der Lymphangiomatosis (Seckeler et al., 2020) sowie bei verschiedenen bösartigen Tumorerkrankungen (Lu et al., 2012, 2013; Turkbey et al., 2020).

3.3.4.3 Kontrastmittel für die MR-Lymphographie

Der Bildkontrast bei der MR-Tomographie sowie der MR-Lymphographie wird maßgeblich von der Protonendichte, der T1- und der T2-Relaxationszeit beeinflusst. Diese Parameter können in verschiedenen Geweben sehr unterschiedlich sein und erlauben eine Differenzierung in der MR-Tomographie auch ohne Verwendung von Kontrastmitteln. Weinmann et al. (1984) fanden jedoch heraus, dass verschiedene Gewebearten (maligne vs. benigne Tumore und gesundes Gewebe) ähnliche Parameter aufweisen und so eine Differenzierung erschweren können. Da die Protonendichte innerhalb eines Gewebes weitestgehend konstant ist, kann eine Optimierung der Bildkontraste nur durch Veränderung der T1- und T2-Relaxationszeiten erreicht werden. Hierfür kommen Kontrastmittel zum Einsatz, die über magnetische Eigenschaften verfügen, welche in der Lage sind, Relaxationszeiten zu verkürzen.

Für die MR-Tomographie kommen meist Kontrastmittel zum Einsatz, welche seltene Erden (beispielsweise Dysprosium, Gadolinium (Gd) und Mangan) enthalten, die ungepaarte Elektronen an der äußeren Schale aufweisen (Zhou & Lu, 2013; Pellico et al., 2019). Aufgrund der hohen paramagnetischen Eigenschaften mit sieben ungepaarten Elektronen und der hohen Stabilität hat sich das Gd-Ion als das am häufigsten verwendete Ion etabliert (Xiao et al., 2016). In freier, ionischer Form weist Gd jedoch eine hohe Toxizität auf und kann sich in verschiedenen Geweben, u. a. im Gehirn, ablagern (Mathur et al., 2020), weshalb die Bindung von Gd-Ionen an Chelatkomplexe (linear z. B. mit DTPA oder makrozyklisch mit DOTA) erfolgt. Durch die Bindung an Chelatkomplexe wird das Verhältnis von freien zu gebundenen Gd-Ionen deutlich reduziert (de Haën et al., 1999) und somit die Toxizität minimiert. Vor 39 Jahren stellten Carr et al. (1984) die erste Gd-Verbindung vor, welche als Kontrastmittel für die MR-Tomographie eingesetzt werden kann. Im Verlauf wurden zahlreiche weitere Gd-haltige Kontrastmittel entwickelt und zugelassen. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Kontrastmittel AGuIX (*Activation and Guidance of Irradiation by X-ray*, AGuIX®, Grenoble,

Frankreich) stellt ein neuartiges, nanopartikuläres, Gd-haltiges Kontrastmittel dar, welches zudem als Radiosensitizer eingesetzt werden kann (Lux et al., 2011, 2019).

3.4 Therapieoptionen des Lymphödems

3.4.1 Konservative Therapie

Die konservative Therapie im Rahmen von primären und sekundären Lymphödemen bildet das Fundament eines ganzheitlichen Therapieansatzes. Um ein zufriedenstellendes Ergebnis zu erzielen, wird bevorzugt ein multidisziplinäres Konzept gewählt, welches die komplexe physikalische Entstauungstherapie sowie weitere konservative Behandlungsmethoden umfasst. Diese werden im Folgenden näher erläutert.

3.4.1.1 Komplexe physikalische Entstauungstherapie

Die komplexe physikalische Entstauungstherapie (KPE) ist nach aktueller S2K-Leitlinie die kausale Therapie des chronischen Lymphödems. Dabei handelt es sich um ein Zwei-Phasen-Behandlungsprotokoll, welches aus den folgenden aufeinander abgestimmten Komponenten besteht: Manuelle Lymphdrainage (MLD), Kompressionstherapie, körperliche Bewegung, Hautpflege und Hautsanierung, Aufklärung sowie Patientenschulung. Die jeweiligen Komponenten werden im Folgenden vorgestellt.

Die MLD ist eine spezielle Form der Massage und wird unter anderem bei der Therapie des chronischen Lymphödems eingesetzt. Bei der MLD soll durch Dehnung der Lymphgefäßwände eine Stimulation der Lymphgefäße erreicht und so der vermehrte Abtransport der Lymphe angeregt werden. Obwohl die manuelle Lymphdrainage zur Standardtherapie bei der Behandlung von chronischen Lymphödemem gehört, ist ihr langfristig positiver Effekt weiterhin umstritten (Thompson et al., 2021). Zudem besteht die Gefahr, dass noch vorhandene und funktionsfähige Lymphgefäße durch zu starken Druck auf das Gewebe beschädigt werden, wobei die erhöhte kapilläre Filtration in einer Exazerbation des Ödems resultieren könnte.

Die Kompressionstherapie, als zweite Komponente der KPE, bewirkt eine Reduktion des venösen Drucks (anti-ödematöse Wirkung) und eine Normalisierung der pathologisch erhöhten Ultrafiltration durch Applikation von externem Druck. Dies führt im weiteren Verlauf zur konsekutiven Reduktion der lymphpflichtigen Last und zur Verbesserung des Lymphtransportes. Schon die alleinige Kompressionstherapie kann zu einem deutlichen Rückgang der Symptome führen. In verschiedenen Studien konnten sowohl Kurzzugbinden

als auch Kompressionsstrümpfe das Volumen des Lymphödems um 31 % (Mortimer, 2000) bzw. 46 % (Brorson & Svensson, 1998) reduzieren.

Die Bewegungstherapie und sportliche Aktivität stellen weitere wichtige Komponenten der KPE dar. Durch spezifische Übungen werden die Muskel- und Gelenkpumpen aktiviert und somit der Lymphabfluss angeregt. Dieser Effekt wird durch gleichzeitige Kompression weiter verstärkt (Kwan et al., 2011).

Aufgrund der pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen des chronischen Lymphödems kommt es zu einer reduzierten Immunkompetenz der betroffenen Extremität. In der Folge steigen das Risiko und die Rate kutaner Veränderungen und Infektionen bedeutsam. Hierzu zählen unter anderem Pachydermie, Hyperkeratosen, Erysipele, die nekrotisierende Faszitis und die Dermatolymphangioadenitis (Olszewski, 2012). Zudem bildet die ödematös geschwollene Haut Falten, in denen sich Bakterien und Pilze leicht vermehren und durch Hautläsionen zu einer bakteriellen Superinfektion führen können (Mallon & Ryan, 1994). Hinzu kommt die starke Beanspruchung der Haut durch Kompressionsverbände und -strümpfe. Der Feuchtigkeits- und Fettgehalt der Haut wird reduziert. Um die natürliche Barrierefunktion der Haut zu erhalten, kommen pH-neutrale Seifen und fetthaltige Cremes zum Einsatz (Fife et al., 2017).

Das chronische Lymphödem stellt für viele PatientInnen eine psychische Belastungssituation dar (Carter et al., 2018; Coriddi et al., 2020). Daher ist es wichtig, Betroffene über den Krankheitsverlauf aufzuklären und entsprechend zu beraten. Darüber hinaus kann das Fortschreiten der Ödeme durch eine adäquate Schulung der PatientInnen deutlich verlangsamt werden, wodurch neben der Compliance auch die Lebensqualität der PatientInnen verbessert wird (Runowicz, 1998).

3.4.1.2 Weitere konservative Behandlungsmethoden

Neben der klassischen KPE gibt es zahlreiche supportive Maßnahmen, die zur Therapie eingesetzt werden können. Obgleich der Nutzen dieser alternativen Behandlungsmethoden nicht ausreichend belegt ist, können diese zur subjektiven Befundbesserung führen. Einige alternative und supportive Behandlungsmethoden werden im Folgenden kurz erläutert.

Lymphgefäße pulsieren mit einer Frequenz von 6-10/Minute. In einer Studie an 29 PatientInnen mit chronischen Lymphödem konnten Piller et al. (2010) zeigen, dass eine elektrische Stimulation der Lymphgefäße bei PatientInnen einen Rückgang der Schwellung im Vergleich zur Kontroll- und Placebogruppe bewirkt. Zudem können auch Schmerz und Schweregefühl der betroffenen Extremität signifikant reduziert werden. Insbesondere für PatientInnen, die aufgrund einer Lähmung nicht an einer Bewegungstherapie teilnehmen können, stellt die Elektrostimulation eine vielversprechende Alternative dar.

Die medikamentöse Therapie im Rahmen des chronischen Lymphödems ist Thema zahlreicher Forschungsarbeiten. Diuretika werden aufgrund ihrer anti-ödematösen Wirkung insbesondere in der ersten Phase der KPE zur initialen Ödemreduktion eingesetzt. Da sie periphere Lymphödeme jedoch nur unzureichend reduzieren und dazu neigen, ein Ungleichgewicht im Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt zu fördern, werden sie nicht routinemäßig eingesetzt (Paskett & Stark, 2000). Zudem wird angenommen, dass Diuretika aufgrund der verstärkten Proteinakkumulation fibrotische Umbauvorgänge fördern. Neben Diuretika werden auch Benzopyrone, welche ebenfalls eine anti-ödematöse Wirkung haben sollen, bei verschiedenen Erkrankungen verwendet. Einige Studien haben eine signifikante Verbesserung von chronischen Lymphödemem verschiedenen Ursprungs gezeigt (Casley-Smith et al., 1993, 2010). Eine positive Schlussfolgerung über die Wirksamkeit von Benzopyronen hinsichtlich der Reduktion der Symptome ist allerdings aufgrund der mangelhaften Qualität vorliegender Studien nicht möglich (Badger et al., 2004).

Das Risiko zur Entwicklung eines chronischen Lymphödems nach Operation und/oder Bestrahlung steigt mit dem Grad der Fettleibigkeit. Die Gewichtsreduktion bei übergewichtigen PatientInnen sollte daher ein integraler Bestandteil in der Therapie des Lymphödems sein. Shaw et al. (2007) konnten in einer Studie mit übergewichtigen Frauen mit Postmastoidektomie-Lymphödem zeigen, dass die Gewichtsreduktion eine signifikante Volumenreduktion des sekundären chronischen Lymphödems bewirkt. Der zunehmende Verzehr gesättigter Fettsäuren und entzündungsfördernder Omega-6-Fettsäuren in industrialisierten Ländern wirkte sich dabei negativ auf den ohnehin gestörten Lymphabfluss aus. Mittelkettige Fettsäuren (MCT) besitzen den Vorteil, das Lymphsystem umgehen zu können und werden von den Blutkapillaren der Darmwand direkt aufgenommen. Eine Diät mit niedrigem Anteil an langkettigen Fettsäuren und einem hohen Anteil kurz- und mittelkettiger Fettsäuren könnte den Verlauf eines Lymphödems daher positiv beeinflussen.

3.4.2 Operative Therapie

Bislang wurden operative Verfahren erst in Betracht gezogen, wenn mit konservativen Methoden keine ausreichende Besserung erzielt werden konnte. Durch die Weiterentwicklung operativer Verfahren könnten diese jedoch in Zukunft als Therapieoption bei primären und sekundären Lymphödemem an Bedeutung gewinnen. Sie werden in ablative Reduktionsverfahren und mikrochirurgisch rekonstruktive Verfahren unterteilt. Zu den ablativen Reduktionsverfahren zählen die Liposuktion und die Exzisionsverfahren, während unter den rekonstruktiven Verfahren unter anderem die lymphovenöse Anastomose, die Lymphgefäßtransplantation, die lymphatisch-venös-lymphatische Anastomosierung mit

Venentransplantaten und die freie vaskularisierte Lymphknotentransplantation zusammengefasst sind.

3.4.2.1 Ablative Reduktionsverfahren

Eine häufige Annahme ist, dass die Umfangszunahme bei einem chronischen Lymphödem ausschließlich auf angestaute Lymphflüssigkeit zurückzuführen ist. In späteren Stadien des chronischen Lymphödems ist jedoch die Zunahme des Fettgewebes für die Umfangsvermehrung der jeweiligen Extremität ursächlich. Die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen sind zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt. Aufgrund dieser Tatsache kann aber eine Liposuktion bei nicht eindrückbaren Ödemen Abhilfe schaffen (Brorson & Svensson, 1998). Bei der Liposuktion wird durch verschiedene Verfahren das krankhaft vermehrte Fettgewebe entfernt. Die am häufigsten verwendete Methode ist derzeit die Tumescenzanästhesie. Dabei wird ein spezielles Gemisch aus sterilem Wasser, Betäubungsmittel, Natriumbikarbonat und gegebenenfalls Kortison in das subkutane Fettgewebe gespritzt. Die Fettzellen saugen sich mit dem Gemisch voll und lassen sich nach kurzer Wartezeit leicht aus dem Bindegewebe lösen. Die entstehende Emulsion kann anschließend mit Hilfe einer Spezialkanüle und einem leichten Sog abgesaugt werden (Klein, 1990). Ursprünglich wurde diese Technik für *body contouring* im Rahmen der ästhetischen Chirurgie genutzt. Sie zeigt aber auch sehr gute Ergebnisse bei der Behandlung des chronischen Lymphödems (Brorson, 2003; Greene et al., 2006). Allerdings besteht bei dieser Therapie das Risiko, bestehende funktionsfähige Lymphgefäße zu verletzen und so das Lymphödem zu verschlimmern. Darüber hinaus müssen bei der Liposuktion auch die üblichen Risiken eines operativen Eingriffs, wie beispielsweise Blutungen oder Infektionen, berücksichtigt werden. Trotz der Risiken stellt die Liposuktion eine vielversprechende Therapiemöglichkeit für betroffene PatientInnen dar, insbesondere in Kombination mit einer Kompressionstherapie (Brorson et al., 2008).

Resezierende Verfahren haben das Ziel, überschüssige Haut und/oder subkutanes Gewebe zu entfernen, um die normale Funktion der betroffenen Extremität wiederherzustellen. Das Verfahren nach Charles (1912) ist eines der ältesten und radikalsten Verfahren. Hierbei kommt es zu einer radikalen en-bloc Resektion der Haut, des subkutanen Bindegewebes und der tiefen Muskelfaszie mit primärer oder gestaffelter plastischer Deckung (Dumanian & Futrell, 1996). Seit der Erstbeschreibung 1912 folgten zahlreiche Abwandlungen dieser Technik (Sistrunk, 1918; Macey & Harry, 1948; Thompson, 1967; Dandapat et al., 1986), die sich jedoch vom Grundprinzip nicht wesentlich geändert haben. Charles selbst setzte diese Operation nur bei der Elephantiasis scroti ein. Die Technik wurde erst später von verschiedenen Operateuren an den Extremitäten angewandt. Es muss jedoch berücksichtigt

werden, dass durch ein solch radikales Verfahren funktionsfähige Lymphgefäße entfernt werden und die Entwicklung der bestehenden Ödeme in distalen Bereichen, wie Händen und Füßen, weiter vorangetrieben wird. Zudem besteht das Risiko zahlreicher Komplikationen wie der Hyperkeratose, der Papillomatose, Ulzerationen und chronischer Infektionen (Mavili et al., 1994). Trotz der zahlreichen Komplikationen und des eingeschränkten ästhetischen Ergebnisses stellt diese Methode eine praktikable Alternative für PatientInnen im Endstadium des chronischen Lymphödems dar, bei denen andere Verfahren keine signifikante Besserung erzielt haben.

3.4.2.2 Rekonstruktive Verfahren

Das primäre Ziel der rekonstruktiven chirurgischen Verfahren des chronischen Lymphödems sowie der zuvor genannten Therapieoptionen besteht darin, durch Reduktion des Ödems und Verbesserung der Beweglichkeit und Funktion der betroffenen Extremität eine Symptumlinderung zu erzielen. Dies führt im weiteren Verlauf zu einer Steigerung der Lebensqualität der PatientInnen (Patel et al., 2015). Sekundär soll durch die Verminderung der lymphpflichtigen Last und Steigerung der lymphatischen Transportkapazität eine messbare Reduktion von Volumen und Umfang der betroffenen Extremität erreicht werden (Hirche et al., 2019). Im Folgenden werden einige etablierte operative Verfahren erläutert.

Die autologe Transplantation von Lymphgefäßen wurde erstmalig 1980 durch Prof. Dr. Dr. med. habil. Rüdiger Baumeister beschrieben (Baumeister et al., 1980) und 1981 erstmalig am Menschen durchgeführt (Baumeister et al., 1981). Dabei werden von der Innenseite eines Oberschenkels eine bis drei Lymphbahnen mit einer Länge von bis zu 30 cm entnommen. Auch hier werden die wichtigsten Lymphbahnen mit Hilfe von Patentblau identifiziert und geschont, um die Entstehung eines sekundären Lymphödems der Entnahmeregion zu verhindern (Baumeister et al., 1981). Die nicht gefärbten Lymphbahnen können anschließend entnommen und an die gewünschte Stelle transplantiert werden. So wird das Transplantat beim sekundären chronischen Lymphödem des Arms zwischen dem betroffenen Arm und einer gesunden Lymphbahn am Hals mikrochirurgisch verlegt.

Die Lymphgefäßtransposition ist bei einseitigen Bein-Lymphödem eine vielversprechende Therapieoption. Hierfür wird ähnlich wie bei der Lymphgefäßtransplantation am gesunden medialen Oberschenkel eine Lymphbahn freipräpariert. Anders als bei der freien Transplantation wird diese unter Schonung der proximalen Verbindung an den inguinalen Lymphbahnen am distalen Ende abgesetzt und subkutan zur gegenüberliegenden Leiste hindurchgezogen. Distal der Obstruktion wird das freie Ende an das Lymphsystem des betroffenen Beines mikrochirurgisch angeschlossen. Auf diese Weise wird ein

Umgehungskreislauf geschaffen und die angestaute lymphpflichtige Flüssigkeit über die gesunde Seite abgeleitet.

Mit Hilfe lymphovenöser Anastomosen (LVA) wird ebenfalls ein Umgehungskreislauf geschaffen. Indem noch funktionelle, afferente Lymphkollektoren vor der Obstruktion supermikrochirurgisch (Gefäßdurchmesser $< 0,7$ mm) an oberflächliche Venen angeschlossen werden, kann die anfallende Lymphlast im betroffenen Arm oder Bein reduziert werden (Gong-Kang et al., 1981). Um zu verhindern, dass eine venöse Insuffizienz das Ergebnis der LVA negativ beeinflusst, sollte der Gefäßstatus der PatientInnen vor Durchführung beurteilt werden. Mit Hilfe der ICG-Fluoreszenz-Lymphographie und zusätzlicher Applikation von Patentblau werden prä- und intraoperativ funktionelle Lymphkollektoren aufgesucht und markiert (Ogata et al., 2007). Diese werden anschließend unter Berücksichtigung ihres Durchmessers an benachbarte Venen oder Venolen angeschlossen. End-zu-Seit-Anastomosen stellen hierbei eine gute Alternative zur klassischen End-zu-End-Anastomose dar, da sie Kaliberunterschiede zwischen Lymphgefäßen und Venen besser ausgleichen und einen retrograden Abfluss ermöglichen (Hirche et al., 2019). Distal am Fuß- oder Handrücken beginnend, werden auf mehreren Etagen 3-4 cm lange quere Hautinzisionen durchgeführt. Venolen und Lymphkollektoren werden präpariert und hinsichtlich ihrer Lage, des Durchmessers, des Lymphabflusses und der Anfärbung durch den *Tracer* beurteilt. Unter der Annahme, dass einige Anastomosen über die Zeit inaktiv werden, sollten im Idealfall mehrere LVA pro Explorationshöhle durchgeführt werden. Um einen postoperativen Verschluss zu vermeiden, wird eine intravenöse Prostaglandin E1 Gabe für fünf Tage angeraten, die dann für einige Wochen oral fortgeführt wird. Besonders effektiv ist diese Methode, wenn die Operation in frühen Stadien des Lymphödems durchgeführt wird. Im Spätstadium kann eine Kombination verschiedener Operationstechniken angewandt werden. Eine postoperative Kompressionstherapie kann darüber hinaus für viele PatientInnen vorteilhaft sein (Koshima et al., 2003).

Eine weitere Operationstechnik bei der Therapie des chronischen Lymphödems ist die Lymphatisch-venös-lymphatische Anastomosierung (LVLA). Hierbei werden autologe Venentransplantate zur Rekonstruktion lymphatischer Abflusswege genutzt. Die Veneninterponate stellen dabei eine Art Brücke zwischen afferenten und efferenten Lymphkollektoren dar. Durch ihr großes Lumen besitzen sie eine größere Transportkapazität, sodass mehrere Lymphkollektoren an ein venöses Segment angeschlossen werden können. Zusätzlich wird durch die Venenklappen ein retrograder Lymphfluss verhindert. Diese Technik kommt insbesondere dann zum Einsatz, wenn die LVA aufgrund einer Venenerkrankung kontraindiziert ist (Campisi & Boccardo, 2003). In einer Studie mit 133 PatientInnen mit chronischem Lymphödem der unteren Extremität konnte mit dieser Therapie bereits in den ersten postoperativen Tagen ein deutlicher Rückgang der Schwellung beobachtet werden

(Campisi et al., 2001). Auch die Langzeitergebnisse erscheinen vielversprechend. So zeigte sich bei einer weiteren Studie mit 64 PatientInnen bei mehr als 50 % der ProbandInnen eine Volumenreduktion des betroffenen Beines um über 75 % (Campisi et al., 1995). Diese Ergebnisse bleiben auch 10 bis 15 Jahre nach der Operation weiterhin konstant (Campisi et al., 2001).

Neben den bereits erwähnten Operationstechniken wird in der vorliegenden Arbeit ein besonderes Augenmerk auf die freie vaskularisierte Lymphknotentransplantation (VLKT) gelegt. Dabei handelt es sich um eine weitere operative Therapieoption bei der Behandlung von Lymphödemen (Becker & Hidden, 1988), bei welcher im Fettgewebe eingebettete Lymphknoten mit eigener Blutversorgung (Arterie und Vene) aus einer gesunden Körperregion entnommen, anatomisch oder extraanatomisch in die betroffene Lymphödemregion transplantiert und mikrochirurgisch anastomosiert werden. Die transplantierten Lymphknoten können in geringem Maße Wachstumsfaktoren (z. B. VEGF-C) freisetzen, welche die Angio- und Lymphangiogenese induzieren (Saaristo et al., 2012). Darüber hinaus sind die in den Lappen enthaltende Lymphkapillaren in der Lage, über lymphovenöse Verbindungen eine sofortige Ableitung der lymphpflichtigen Last über die transplantierte Vene innerhalb des VLK-Lappens zu gewährleisten (Cheng et al., 2014). Lähteenvuo et al. (2011) konnten nachweisen, dass eine postoperative Therapie mit Wachstumsfaktoren die Neubildung von Lymphgefäßen zusätzlich stimuliert und somit das Ergebnis einer VLKT verbessert. Die zu transplantierenden Lymphknoten werden üblicherweise inguinal, thorakal oder zervikal entnommen. Lymphödem der oberen Extremität werden daher typischerweise durch Transplantation inguinaler Lymphknoten behandelt (Becker et al., 2006). Darüber hinaus kann das Ergebnis der VLKT verbessert werden, indem Narbengewebe in der Empfängerregion, welches den Lymphabfluss behindert, entfernt wird (Becker et al., 2012). Dadurch wird auch die immunologische Funktion des Lymphsystems unterstützt und die Infektionsrate der ödematösen Extremität reduziert (Chipp et al., 2010). Durch die Entnahme von Lymphknoten besteht das Risiko, dass es in der Spenderregion ebenfalls zu einem sogenannten Hebedefektlymphödem kommt. In einer Metaanalyse von Demiri et al. (2018) mit insgesamt 189 eingeschlossenen PatientInnen wurde die Häufigkeit dieser Komplikation mit 1,6 % beschrieben. Durch die richtige Entnahmetechnik, dem sogenannten *Reverse Mapping*, kann das Auftreten dieser Komplikation minimiert werden. Dabei werden die Abflusswege der Lymphbahnen mit Hilfe der ICG-Lymphographie, Patentblau und Radionukleotidtracer bestimmt. Dadurch können die wichtigen Lymphbahnen der Spenderregion differenziert und geschont werden (Dayan et al., 2015; Hirche et al., 2019). Auch bei diesem operativen Verfahren hängt das Ergebnis von verschiedenen Faktoren, wie beispielsweise dem Lymphödemstadium und der Erkrankungsdauer, ab. Trotz zahlreicher Studien, welche sich vornehmlich mit den postoperativen Ergebnissen der VLKT und dem Vergleich verschiedener

Operationsverfahren beschäftigen, bleibt der zugrundeliegende Mechanismus für den funktionellen Einbau des VLK-Lappens in das Empfängergerewebe und die Ischämietoleranz der verschiedenen Gewebe innerhalb der Lappen weitestgehend unklar. Die Ischämie-Reperfusion (I/R)-Analysen in der vorliegenden Arbeit sollen dazu beitragen, die zellulären Veränderungen im Rahmen der VLKT und die Funktion der verschiedenen Gewebearten besser zu verstehen.

Der I/R-Schaden beschreibt dabei einen pathologischen Prozess, welcher durch wiederhergestellte Durchblutung nach einer Ischämiephase entsteht und einen großen Stellenwert in zahlreichen medizinischen Fachrichtungen, wie beispielsweise in der Transplantationsmedizin (Zhai et al., 2013), der Kardiologie (Xiang et al., 2021), der Gefäßchirurgie (Weiss et al., 2013) oder in der Traumatologie (Blaisdell, 2002), besitzt.

Im Rahmen der Ischämie kommt es aufgrund einer arteriellen Minderperfusion zu einer Diskrepanz zwischen Sauerstoff (O_2)-Angebot und -Nachfrage. Das Ausmaß der Organ- oder Zellschädigung ist dabei abhängig vom Ausmaß (*no-flow* vs. *low-flow*) und der Dauer der Ischämie sowie von der darauffolgenden multifaktoriellen Schädigung durch die Reperfusion (Kalogeris et al., 2012). Die reduzierte O_2 -Versorgung durch arterielle Minderperfusion beeinträchtigt den Elektronentransport innerhalb der Mitochondrien und führt zu einer verminderten Adenosintriphosphat (ATP)-Produktion. Es kommt somit zu einem zügigen Abbau der intrazellulären ATP-Reserven und zu einem Anstieg von Hypoxanthin. Folglich führt der Rückgang der ATP-Produktion zu einer anaeroben Stoffwechsellage, wobei wiederum weniger ATP und Antioxidantien produziert werden. Kompensatorisch wird die anaerobe ATP-Produktion hochreguliert, wobei Laktatsäure als Nebenprodukt anfällt, welches bei anhaltender Ischämie in einem pH-Abfall und somit in einer metabolischen Azidose resultiert. Zeitgleich kommt es aufgrund der unzureichenden Energieproduktion zu dysfunktionalen Na^+ - K^+ - und Ca^{2+} -ATPasen an der Zelloberfläche, was zu einem K^+ -Ausstrom und Ca^{2+} -Einstrom führt. Der intrazelluläre Anstieg von H^+ -, Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen induziert ein hyperosmolares Milieu, welches durch Wassereinstrom in die Zelle im weiteren Verlauf in einer Zellschwellung und Zelltod resultiert (Wu et al., 2018).

Während der Reperusionsphase wird das Gewebe mit O_2 versorgt und Hypoxanthin wird zu Xanthin oxidiert. Bei dieser Reaktion werden freie Sauerstoffradikale freigesetzt, welche durch die Lipidperoxidation die Zellmembran schädigen können. Neben der direkten zellschädigenden Wirkung induzieren die freien Sauerstoffradikale eine Zunahme des oxidativen Stresses, DNA-Schädigung und die Aktivierung des Immunsystems. Der daraus resultierende Zytokinsturm der proinflammatorischen, neutrophilen Granulozyten innerhalb des ischämischen Gewebes führt durch Schädigung der Zellbestandteile zum fortschreitenden Zelltod (Ornellas et al., 2017).

4. Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die diagnostischen Möglichkeiten im Rahmen des chronischen Lymphödems zu optimieren sowie die zellulären Veränderungen bei einer VLKT besser zu verstehen. **Im ersten Studienabschnitt** wurde hierzu untersucht, ob das neue, nanopartikuläre Kontrastmittel AGuIX im Rahmen der MR-Lymphographie eingesetzt werden kann. Dabei sollten folgende Fragestellungen geklärt werden:

1. Bietet AGuIX im Vergleich zum klinisch etablierten Dotarem Vorteile bei der kontrastmittelgestützten MR-Lymphographie?
2. Eignet sich AGuIX zur Darstellung des Lymphsystems im Rahmen des chronischen Lymphödems?
3. Welche physiologischen und zellulären Veränderungen werden im Rahmen eines sekundären Lymphödems beobachtet?

Im zweiten Studienabschnitt wurden die kurzzeitigen zellulären und molekularen Veränderungen im Anschluss an einen I/R-Schaden bei VLKT analysiert. Dabei sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Eignet sich das in dieser Studie verwendete I/R-Modell zur Analyse des I/R-Schadens bei VLK-Lappen?
2. Resultiert die Induktion eines I/R-Schadens in einer Hochregulierung angiogener und lymphangiogener Wachstumsfaktoren?
3. Welche Auswirkungen auf das mikrovaskuläre Gefäßnetzwerk sind als Folge eines I/R-Schadens zu erwarten?
4. Welche morphologischen und zellulären Veränderungen sind als Folge eines I/R-Schadens zu beobachten?
5. Ist das perinodale Fettgewebe hinsichtlich eines I/R-Schadens resistenter als lymphatisches Gewebe?

5. Material und Methodik

5.1 Versuchstiere

Die Versuche des **ersten Studienabschnitts** wurden an insgesamt 10 Lewis-Ratten (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) durchgeführt. Das Alter der Versuchstiere betrug bei Beginn der Studie 14 ± 2 Wochen bei einem Gewicht von 390 ± 40 g. Die Versuche des **zweiten Studienabschnitts** wurden an insgesamt 44 Lewis-Ratten durchgeführt. Das Alter der Versuchstiere betrug bei Beginn der Studie 17 ± 1 Wochen bei einem Gewicht von 397 ± 8 g. Während des Beobachtungszeitraums wurden die Tiere unter kontrollierten Bedingungen gehalten und waren in Einzelkäfigen in einem klimatisierten Raum mit 12-stündigem Tag- und Nachtrhythmus untergebracht. Die Versorgung mit Wasser und Standardlaborfutter (Altromin, Lage, Deutschland) erfolgte *ad libitum*.

Sämtliche Tierversuche wurden in Einklang mit den Richtlinien des europäischen Parlamentes und des Rates zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (Richtlinie 2010/63/EU) und Leitfaden für den Umgang mit Versuchstieren (National Institutes of Health Publication, 1985) durchgeführt. Die Versuche wurden gemäß dem nationalen Tierschutzgesetz durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz Saarland genehmigt (Genehmigungsnummer: 67/2015).

5.2 Tiermodelle

5.2.1 Lymphödem-Tiermodell

Im **ersten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit sollte die Eignung des neuartigen Kontrastmittels AGuIX für die MR-Lymphographie sowohl bei gesunden Versuchstieren als auch im Rahmen eines chronischen Lymphödems analysiert werden. Bei den männlichen Lewis-Ratten handelte es sich um gesunde Versuchstiere, weshalb die Induktion eines sekundären Lymphödems erforderlich war. Hierfür kommen verschiedene Operationstechniken in Frage. Um einen klinischen Zusammenhang schaffen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit zur Induktion des Lymphödems die Kombination aus operativer Lymphadenektomie und postoperativer Bestrahlung der entsprechenden Region gewählt.

5.2.1.1 Lymphadenektomie

Sämtliche Operationen wurden im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie an der Universität des Saarlandes (Gebäude 65 und 66, Campus Universitätsklinikum Homburg/Saar) durchgeführt.

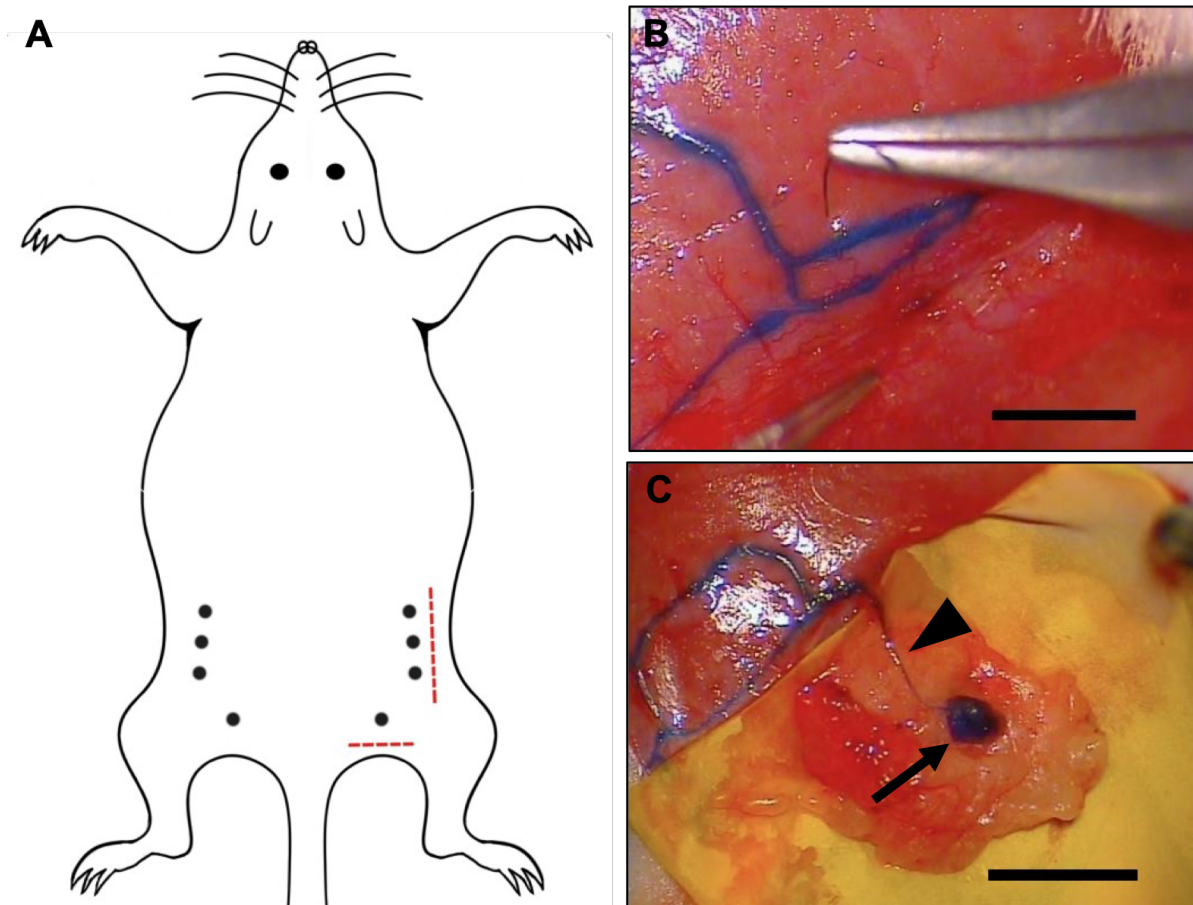


Abbildung 1: Lymphödem-Tiermodell. **A:** Schematische Darstellung der Schnittführung (gestrichelte rote Linien) und Lokalisation der poplitealen und inguinalen Lymphknoten (schwarze Punkte) in Bauchlage. **B:** Intraoperative, mikrochirurgische Ligatur der afferenten Lymphgefäße. **C:** Popliteale Lymphadenektomie mit enthaltenem Lymphknoten (Pfeil) und afferentem Lymphgefäß (Pfeilspitze). Maßstäbe: **B** = 3,5 mm, **C** = 6 mm (Müller et al., 2017)

Die Versuchstiere wurden zunächst gewogen und das Gewicht dokumentiert. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit Hilfe des volatilen Anästhetikums Isofluran in speziellen Narkoseboxen bei einem O₂-Flow von 4 l/min und einem Isofluran-Anteil von 4 %. Zur Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte die intraperitoneale, gewichtsadaptierte Injektion von Ketamin (80 mg/kg Körpergewicht (KG); Ursotamin®, Serumwerke Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und Xylazin (6 mg/kg KG; Rompun®, Bayer, Leverkusen, Germany). Zur Einschätzung der Narkosetiefe wurden die Eigenreflexe der Ratten geprüft und das weitere Prozedere erst bei erloschenen Reflexen fortgeführt. Nach einer gründlichen Enthaarung der

rechten Hinterpfote wurden die Versuchstiere in Bauchlage auf dem Operationsfeld fixiert und die Körpertemperatur mit Hilfe einer Infrarotlampe bei ca. 36°C gehalten. Zur Darstellung des Lymphabflussgebietes wurde 10%iges Methylenblau (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) intradermal in die rechte Pfote injiziert. Um möglichst sterile Bedingungen zu schaffen und so das Risiko einer Wundinfektion zu minimieren, wurde vor Beginn des Eingriffes eine gründliche Desinfektion des Operationsgebietes vorgenommen. Nachdem der erste, ca. 2 cm messende Schnitt popliteal (Abb. 1A) gesetzt wurde, konnte die Haut von der darunterliegenden Muskelfaszie abgehoben werden. Anschließend wurden die ableitenden Lymphgefäße unter kontinuierlicher Blutstillung aufgesucht und mikrochirurgisch ligiert (Abb. 1B). Darüber hinaus wurden die poplitealen Lymphknoten mitsamt dem umliegenden Fettgewebe aus dem Situs präpariert (Abb. 1C). Der Blutverlust der Versuchstiere wurde mittels Kauterisation der Blutgefäße auf ein Minimum reduziert. Der zweite Schnitt erfolgte ebenfalls auf der rechten Seite, jedoch wurde dieser inguinal (Abb. 1A) gesetzt. Auch hier wurde das gesamte Gewebepaket aus Fett und Lymphknoten präpariert und entfernt. Beide Inzisionen wurden jeweils mittels 5/0 Monofilament-Fäden (Prolene®, Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) und Einzelknopfnähten verschlossen. Die postoperative Analgesie erfolgte durch eine einmalige subkutane Injektion von Buprenorphin (0,05 mg/kg KG; Buprenovet®, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) sowie Tramadolhydrochlorid über das Trinkwasser für 3 Tage post-OP (37,5 mg/100 mL Trinkwasser; Tramal®, Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland). Die Wundverhältnisse und die körperliche Verfassung der Versuchstiere wurden täglich überprüft.

5.2.1.2 Bestrahlung

Zur Komplettierung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lymphödem-Modells wurde in Zusammenarbeit mit der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie am Universitätsklinikum des Saarlandes die Bestrahlung des Operationsgebietes durchgeführt. Hierdurch wurden die noch vorhandenen Lymphgefäße zerstört und eine vollständige Ablation des Lymphsystems der entsprechenden Extremität gewährleistet.

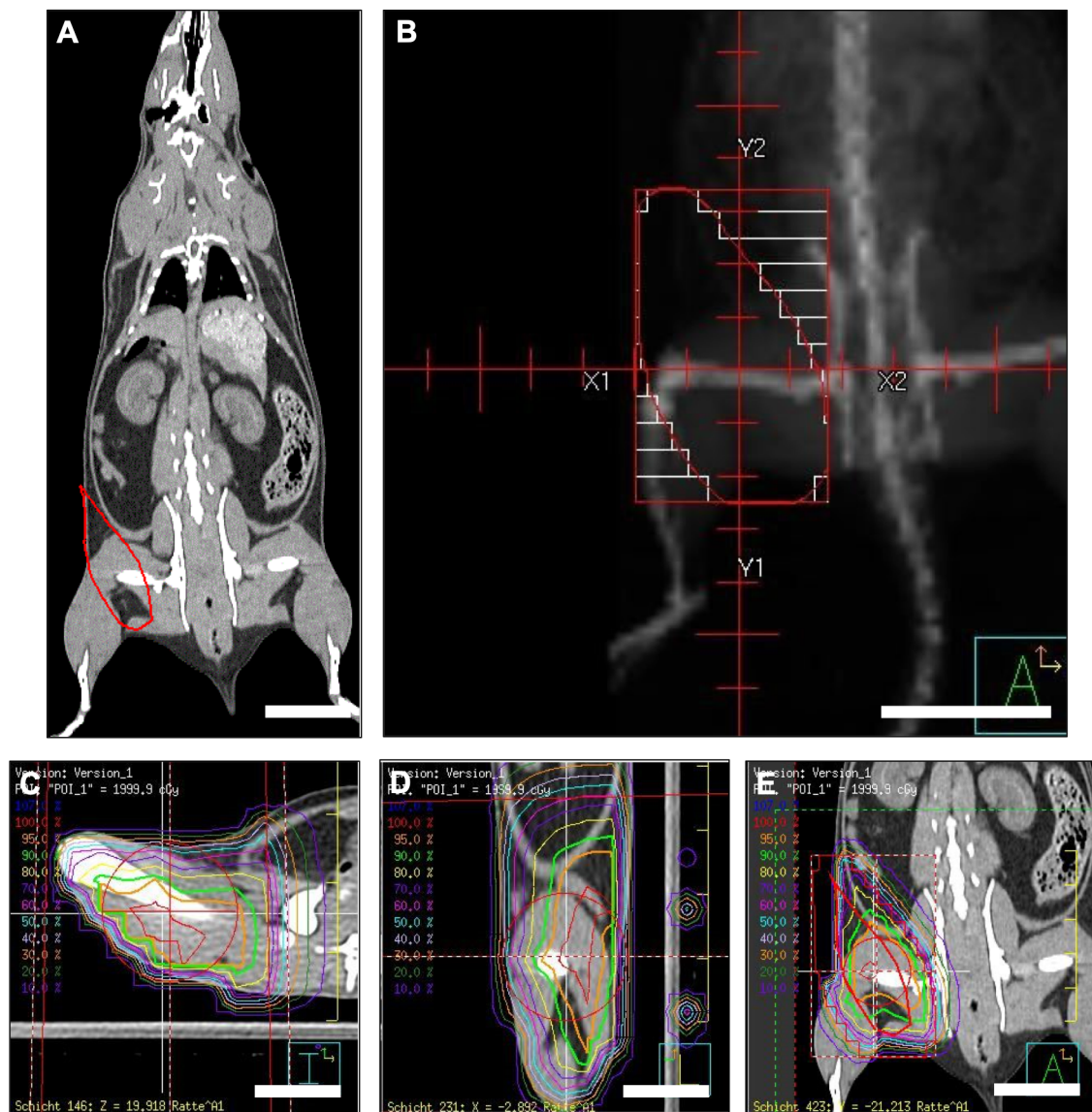


Abbildung 2: Computertomographie (CT)-gestützte Planung der Bestrahlung. **A:** Planungs-CT in Koronar-ebene zur Bestrahlung der rechten Leistenregion (rote Markierung = planning target volume, PTV). **B:** Es folgte die Anpassung des Bestrahlungsfeldes mit Hilfe des Multilamellenkollimators. **C-E:** Darstellung der Dosisverteilung der geplanten Bestrahlung in horizontaler (**C**), transversaler (**D**) und koronarer (**E**) Ausrichtung. Maßstäbe: **A** = 22 mm, **B** = 12 mm, **C-E** = 19 mm (Müller et al., 2017)

Für eine erfolgreiche Bestrahlung ist die vollständige und detaillierte dreidimensionale Erfassung des zu bestrahlenden Gebietes erforderlich. Mit Hilfe dieser Planung kann die applizierte Strahlenmenge millimetergenau bestimmt werden, um gesundes Gewebe zuverlässig zu schonen und die Rate unerwünschter Komplikationen zu minimieren. Für die Planung wurde mittels eines Computertomographen (Brilliance CT Big Bore, Philips Healthcare, Eindhoven, Niederlande) eine sogenannte Planungs-Computertomographie (CT) durchgeführt. Die im Planungs-CT festgelegte Position der Versuchstiere wurde bei der späteren Bestrahlung am Linearbeschleuniger repliziert. Um die identische Lage gewährleisten zu können, kamen verschiedene Lagerungshilfen sowie raumfeste Laserlinien

an beiden Geräten, Computertomograph und Linearbeschleuniger, zum Einsatz. Auf Grundlage dieser dreidimensionalen Bilder wurde auf jeder Schnittebene das zu bestrahlende Zielvolumen (*planning target volume*, PTV) und die zu schonenden Risikoorgane bestimmt.

Um den berechneten Bestrahlungsplan auf die Versuchstiere übertragen zu können, musste der geometrische Bezugspunkt auf den anatomischen Bezugspunkt angepasst werden. Zur Reproduktion der exakten Lage der Versuchstiere standen die zuvor genannten raumfesten Laserlinien und die entsprechenden Markierungen zur Verfügung. Um das PTV für die Bestrahlung der rechten Leiste zu definieren, wurden die Scanparameter auf eine Stromspannung von 120 kV, eine Rotationszeit von 450 mAs mit einem Pixelabstand von 0,1 mm und eine Schichtdicke von 0,75 mm festgelegt. Der daraus resultierende Bestrahlungsplan wurde mit der Planungssoftware Pinnacle v9.8 (Philips Healthcare) fertig gestellt. Das PTV wurde um 6 mm erweitert und die Bestrahlung mit Hilfe eines 6 MeV Linearbeschleunigers geplant (Abb. 2). Ein eingebauter Multilamellenkollimator (*multi-leaf collimator*) ermöglichte das Anpassen des Zielvolumens auf das Bestrahlungsfeld (Abb. 2B). Dadurch wurden unerwünschte Dosisbelastungen kritischer Organe, in diesem Falle insbesondere des Darms, minimiert. Die Größe des Dosisrasters betrug 1 mm x 1 mm x 1 mm und die applizierte Bestrahlungsdosis wurde auf 20 Gy bei einer Tiefe von 25 mm festgelegt (Abb. 2C-E). Die mittlere applizierte Dosis betrug $19,1 \pm 1,1$ Gy. Die Versuchstiere wurden zwei Wochen nach der Operation bestrahlt.

5.2.1.3 Messung der Pfortendicke

Nach Induktion des chronischen Lymphödems kommt es zu einer deutlichen Volumenzunahme der betroffenen Extremität. Zur Quantifizierung dieser Schwellung stehen zahlreiche Methoden zur Verfügung. Dazu zählen die als Goldstandard etablierte optoelektronische Volumetrie (Fischbach et al., 1986), die Volumenbestimmung mittels Bioimpedanzmessung (Doldi et al., 1992) oder Wasserverdrängung (Kettle et al., 1958) sowie verschiedene bildgebende Verfahren, beispielsweise mit Hilfe der Computertomographie (CT) (Hadjis et al., 1985), der MR-Tomographie (Dixon et al., 1993) oder Ultraschall (Doldi et al., 1992). Diese Methoden sind meist technisch anspruchsvoll sowie zeit- und kostenintensiv. In der vorliegenden Arbeit wurde die Pfortendicke der Versuchstiere vergleichsweise einfach mit Hilfe eines digitalen Messschiebers millimetergenau bestimmt. Eine Vergleichsstudie verschiedener Messmethoden von Frueh et al. (2016) konnte die hohe positive Korrelation dieser Messtechnik mit den technisch anspruchsvolleren apparativen Messtechniken nachweisen. Da die Messung der Pfortendicke eine Narkose erforderte, wurden die Versuchstiere erneut in die Narkose-Box gesetzt und die Narkose mit 4%igem Isofluran eingeleitet. Nachdem die Schutzreflexe der Versuchstiere erloschen waren, wurden jeweils

drei Messungen an der operierten Pfote vorgenommen. Diese Messungen dienten als Grundlage für die Errechnung eines Mittelwertes. Zur Vermeidung individueller Messfehler wurden die Hinterlaufpfoten möglichst stammnah und ohne Kompression fixiert. Weiterhin diente die nicht-operierte Hinterlaufpfote als intraindividuelle Kontrolle. Die wöchentlichen Messungen in Isofluran-Narkose erfolgten über einen Zeitraum von 14 Wochen.

5.2.2 I/R-Modell

Im **zweiten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit wurden die morphologischen und molekularbiologischen Veränderungen im Rahmen eines I/R-Schadens in einem I/R-Modell eines axillären VLK-Lappens untersucht. Der Eingriff erfolgte nach Modifizierung des bereits eingeführten Modells von Kwiecien et al. (2015).

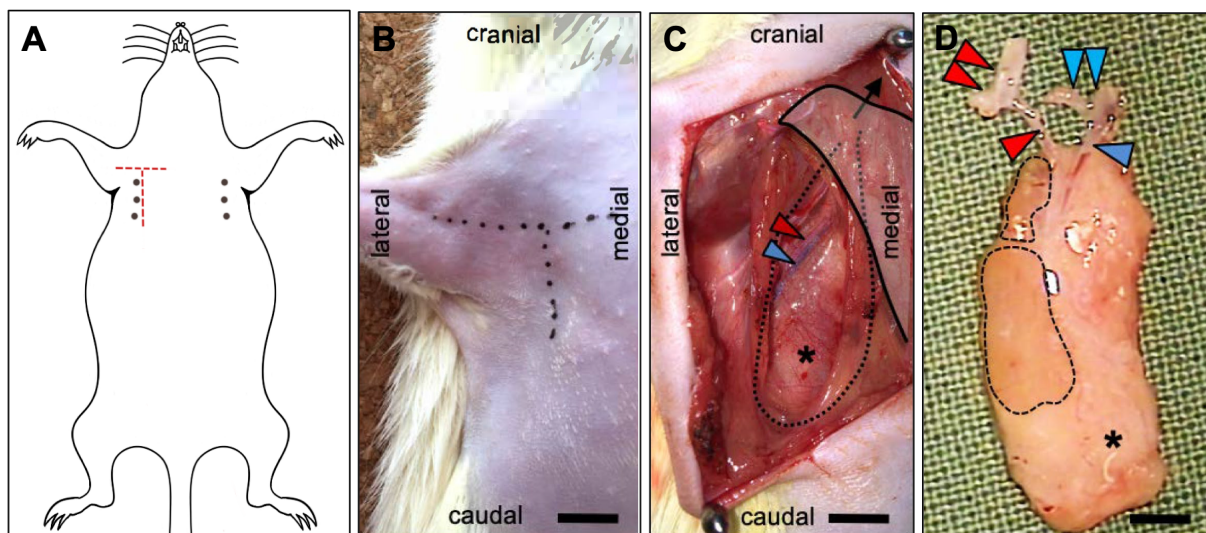


Abbildung 3: Präparation des axillären VLK-Pakets. **A:** Schematische Darstellung der Schnitfführung (gestrichelte Linien) und Lokalisation der axillären Lymphknoten (schwarze Punkte). **B:** T-förmige Hautinzision (gestrichelte Linie). **C:** Nach Durchtrennung des *M. pectoralis* wurde dieser nach kraniomedial verlagert, das Lymphknoten-Fett-Paket (gestrichelte Linie) identifiziert, die A. (rote Pfeilspitze) und V. (blaue Pfeilspitze) *thoracica lateralis* sowie das perinodale Fettgewebe (Sternchen) dargestellt. **D:** Nach Abschluss der 24-stündigen Reperusionszeit folgte die zirkuläre Präparation mit Entnahme des Präparates und den darin enthaltenen Lymphknoten (gestrichelte Linien) sowie dem perinodalen Fettgewebe (Sternchen). Gefäßstiel mit A. *thoracica lateralis* (rote Pfeilspitze) mit der versorgenden A. *axillaris* (rote Doppelpfeilspitze) und der V. *thoracica lateralis* (blaue Pfeilspitze), welche in die V. *axillaris* (blaue Doppelpfeilspitze) mündet. Maßstäbe: **B** und **C** = 6 mm, **D** = 3 mm. VLK = vaskularisierte Lymphknoten. (Frueh et al., 2020)

Wie bereits im ersten Studienabschnitt wurde die Narkose mit Hilfe des volatilen Anästhetikums 4 % Isofluran eingeleitet. Die dauerhafte Narkose der Versuchstiere wurde anschließend durch eine gewichtsadaptierte intraperitoneale Injektion von Ketamin (80 mg/kg KG; Ursotamin®) und Xylazin (6 mg/kg KG; Rompun®) erzielt. Auch in diesem Studienabschnitt

wurden zur Einschätzung der Narkosetiefe die Eigenreflexe der Ratten geprüft, wobei das Prozedere erst bei vollständig erloschenen Reflexen fortgeführt wurde. Nach gründlicher Enthaarung der rechten Axillarregion wurden die Versuchstiere in Rückenlage auf einer beheizten Matte platziert (Abb. 3A). Es folgte eine Fixierung der Extremitäten und die gründliche Desinfektion des OP-Gebietes. Mit Hilfe eines T-förmigen Schnittes im Bereich der rechten Axilla (Abb. 3B) wurde zunächst der rechte Musculus (M.) pectoralis dargestellt. Zur Identifizierung des axillären Nerven- und Gefäßplexus wurde der M. pectoralis nach kraniomedial weggehalten (Abb. 3C). Unterhalb des M. pectoralis präsentierte sich das axilläre Fettgewebe mit den darin enthaltenen Lymphknoten. Das Gewebepaket wurde anschließend zirkulär freipräpariert, wobei alle afferenten und efferenten Lymphgefäße durchtrennt wurden. Neben der Arteria (A.) und Vena (V.) thoracica lateralis wurden auch alle weiteren Blutgefäße am distalen Ende mit Hilfe eines Elektroauters koaguliert. Proximal, im Bereich der Einmündung der A. und V. thoracica lateralis in die A. und V. axillaris, wurden die Gefäße sorgfältig freipräpariert, ohne benachbarte Strukturen zu verletzen. Um postoperative Mobilitätsstörungen zu vermeiden, wurde dabei ein besonderes Augenmerk auf den direkt anliegenden Plexus brachialis gelegt.

Nach vollständiger Präparation des gesamten Lappens und der versorgenden A. und V. thoracica lateralis wurden diese mittels mikrochirurgischer Gefäßklemmen (S&T AG Microsurgical Instruments, Neuhausen, Schweiz), dem experimentellen Protokoll entsprechend, für eine Dauer von 0, 45 oder 120 Minuten abgeklemmt. Um einer Unterkühlung entgegenzuwirken, wurden die Versuchstiere während der Ischämiezeit vor eine Infrarotlampe gelegt. Darüber hinaus wurde das OP-Gebiet in dieser Zeit mit Hilfe einer feuchten Kompresse abgedeckt. Nach Ablauf der Ischämiezeit wurden die Gefäßklemmen entfernt und die Reperfusion des Lappens sichergestellt. Der M. pectoralis wurde mit einer fortlaufenden Nahttechnik und 5/0 Monofilament-Fäden (Prolene®, Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Leverkusen, Deutschland) adaptiert. Für die Hautnaht kamen ebenfalls 5/0 Monofilament-Fäden (Prolene®, Ethicon) zum Einsatz. Der Hautverschluss erfolgte mittels Einzelknopfnähten. Die postoperative Analgesie wurde mittels einer einmaligen subkutanen Injektion von Buprenorphin (0,05 mg/kg KG; Buprenovet®) sowie Tramadolhydrochlorid (37,5 mg/100 mL Trinkwasser; Tramal®) sichergestellt.

5.3 Bildgebung

5.3.1 MR-Lymphographie

Mit Hilfe der kontrastverstärkten MR-Lymphographie und -Angiographie wurden **im ersten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit repetitive Scans durchgeführt und die Eignung des neuartigen, nanopartikulären Kontrastmittels AGuIX zur Darstellung des lymphatischen Systems bei gesunden Versuchstieren und im Rahmen des chronischen Lymphödems analysiert. Hierfür kam ein speziell für die Untersuchung von Kleintieren entwickelter, horizontal ausgelegter MR-Tomograph mit einer statischen Feldstärke von 9,4 T (BioSpec® Avance III 94/20, Bruker Biospin GmbH, Ettlingen, Deutschland) zum Einsatz. Zur Ortskodierung diente ein BGA12S Gradientensystem (maximale Feldstärke: 675 mT m⁻¹, lineare induktive Anstiegszeit: 130 µs, maximale Anstiegszeit: 4673 mT/m/s). Als Bediensoftware wurde ParaVision 6.0.1 (Bruker Biospin GmbH) verwendet. Als Sende- und Empfangssystem kam eine Quadraturspule mit einem Innendurchmesser von 72 mm zum Einsatz (Bruker Biospin GmbH).

Um mit der MR-Lymphographie beginnen zu können, wurde die Narkose mittels Isofluran in einer Narkose-Box bei einem O₂-Flow von 4 l/min und einem Isofluran-Anteil von 4 % eingeleitet. Anschließend wurden die Ratten in Rückenlage in einer speziellen Halterung platziert und die Beine möglichst symmetrisch an der Halterung fixiert. Die Narkose wurde mit Isofluran während des gesamten Untersuchungszeitraums bei einem O₂-Flow von 2 l/min und einem Isofluran-Anteil von 1,5 % aufrechterhalten. Zur Atemüberwachung wurde ein pneumatisches Kissen, welches mit einem Atemsensor ausgestattet war (Graseby, Watford, UK), mittels Pflasterstreifen am Abdomen angebracht. Für das Atemmonitoring wurde dieser Sensor an einen Computer des MRT-Arbeitsplatzes angeschlossen. Während der Messungen erfolgte die Kontrolle der Atemfrequenz mit Hilfe der für die Überwachung der Vitalfunktionen von Kleintieren entwickelten Software PC-SAM-32 (Tomlinson Engineering and Marketing, Middleton, WI, USA). Zur Bildgebung wurden die Versuchstiere jeweils mit dem kaudalen Ende voran in den MR-Tomographen eingebracht.

Das Messprotokoll ist schematisch in Tabelle 1 dargestellt. Zunächst erfolgte ein Pilotscan in allen drei Raumebenen zur Anpassung der jeweiligen Scanparameter. Das folgende *Shim*-Prozedere diente der Homogenisierung des Magnetfeldes. Durch Anbringen sogenannter Hilfsspulen wurden Korrekturfelder erzeugt, die das Magnetfeld der Hauptspule überlagerten und so homogenisierten. Zur Überprüfung der korrekten Lage der Versuchstiere und zur endgültigen Planung der folgenden Sequenzen erfolgte eine Nativaufnahme ohne Kontrastmittel. Anschließend erfolgte die intradigitale Kontrastmittelgabe außerhalb des Kleintier-MR-Tomographen. Nach erneutem Einbringen in den MR-Tomographen und

erneuter Positionsbestimmung wurde die Bildgebung über einen Zeitraum von 90 Minuten wiederholt. Zum Abschluss der MR-Untersuchungen erfolgte eine erneute, diesmal intravenöse Kontrastmittelgabe vor der MR-Angiographie der Hinterpfoten.

Tabelle 1. Messprotokoll für die MR-Lymphographie

1.	Pilotscan in drei Ebenen, Gradient Recalled Echo mit Prescan (Anpassung von Resonanzfrequenz, Magnetfeldhomogenität Sendeleistung und Verstärkungsfaktor des Signals am Eingang)
2.	<i>Shim</i> -Prozedere
3.	Nativaufnahme, 3D-Gradient Recalled Echo-Time of Flight (3D-GRE-TOF)
4.	Entnahme des Tieres aus dem MR-Tomographen
5.	Intradigitale Kontrastmittelapplikation
6.	Erneutes Einbringen des Versuchstieres
7.	Pilotscan in drei Ebenen, GRE ohne Prescan
8.	Kontrastmittelverstärkte MR-Lymphographie über 90 Minuten (3D-GRE-TOF)
9.	Kontrastmittelverstärkte MR-Angiographie (3D-GRE)

Die Dauer der jeweiligen Scans betrug 14 Minuten 36 Sekunden für die MR-Lymphographie und 15 Minuten 52 Sekunden für die MR-Angiographie. Alle MR-Untersuchungen nach Kontrastmittelgabe erfolgten in identischer Geometrie. Die Messparameter der verwendeten MRT-Sequenzen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2. MRT-Sequenzen

Sequenz	2D-GRE	3D-GRE-TOF	3D-GRE
Verwendung	Lokalisation	Lymphographie	Angiographie
TR (ms)	10,0	10,0	10,0
TE (ms)	2,50	2,50	2,95
Anregungswinkel (°)	10,0	10,0	7,5
FOV (mm)	100x100	80x70x40	80x70x40
Matrix	150x150	600x528x300	600x528x300
Voxelgröße (µm)	667x667x1000	133x133x133	133x133x133
Zero filling	1x1	2x2x2	2x2x2
NA	1	2	2

5.3.1.1 Verwendete Kontrastmittel

Gd-markierte Nanopartikel AGuIX

Das in der vorliegenden Arbeit zu untersuchende nanopartikuläre Kontrastmittel AGuIX wurde von einer Forschungsgruppe aus Lyon entwickelt. Dabei handelt es sich um ein synthetisches Polymer auf Silikonbasis mit durchschnittlich zehn Gd-Chelatkomplexen in der Peripherie. Die Hülle wird durch modifizierte *1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-Tetraacetic Acid* (DOTA)-Moleküle gebildet, die in der Lage sind, Chelatkomplexe um freie Gd-Ionen zu bilden. AGuIX zeichnet sich durch eine Molekülmasse von rund $8,5 \pm 1,0$ kDa mit einer durchschnittlichen hydrodynamischen Größe von $3,0 \pm 0,1$ nm aus (Lux et al., 2011). Durch seine Größe und seine starre Form besitzt AGuIX eine schnellere T1-Relaxationszeit, was wiederum zu einem besseren Kontrast führt (Fries et al., 2015). Darüber hinaus ist das AGuIX Molekül zu klein, um von Makrophagen des retikuloendothelialen Systems aufgenommen zu werden und akkumuliert daher nicht in Organen wie Leber, Darm und Lungen. Neben seiner kontrastgebenden Eigenschaft konnte AGuIX in verschiedenen tierexperimentellen Studien erfolgreich als Radiosensitizer eingesetzt werden (Sancey et al., 2014). Radiosensitizer sind Pharmaka, die nach ihrer Verabreichung selektiv die Strahlensensibilität von krankhaft veränderten Tumorzellen gegenüber ionisierender Strahlung erhöhen. Die Verwendung von verschiedenen nanopartikulären Elementen mit hoher Ordnungszahl als Radiosensitizer wurde in der Vergangenheit bereits mehrfach beschrieben (Porcel et al., 2010; Le Duc et al., 2011; Schuemann et al., 2016; Bonvalot et al., 2017; Detappe et al., 2017).

Die verwendeten Lösungen wurden für jedes Versuchstier neu zubereitet und bestanden aus 3 mM AGuIX, 145 mM NaCl, 2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 5 mM HEPES, pH 7,4 aus einer sterilen Stammlösung und sterilisiertem Wasser (Aqua ad iniectionem Braun Ecoflac®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany). Eine 3 mM Konzentration des Nanopartikels enthielt somit 30 mM Gd-DOTA Liganden.

Gd-basiertes Kontrastmittel Gadotersäure

Die Gadotersäure (Gd-DOTA; Dotarem®, Guerbet, Aulnay-sous-Bois, Frankreich) ist ein extrazelluläres, wasserlösliches, paramagnetisches Kontrastmittel, das in der vorliegenden Arbeit als Vergleichskontrastmittel verwendet wurde. Als unspezifisches Kontrastmittel reichert sich Gd-DOTA in allen Organen außer dem zentralen Nervensystem an. Entsprechend der glomerulären Filtrationsrate wird es unverändert renal ausgeschieden. Es handelt sich hierbei ebenfalls um ein Gd-basiertes Kontrastmittel mit einer kleinen Molekülmasse von ca. 0,56 kDa und einer mittleren hydrodynamischen Größe von ~ 5 nm (Reinländer, 2003). Gd-DOTA stellt ein weit verbreitetes Kontrastmittel dar, dessen Wirksamkeit und Sicherheit in zahlreichen

Studien nachgewiesen wurden (Ruehm et al., 2001; Herborn et al., 2007; Wang et al., 2018; Chang & Pracros, 2019).

Gd-haltiges Kontrastmittel Gadofosveset

Gadofosveset ist, wie Gd-DOTA, ein Gd-basiertes Kontrastmittel. Es ist das erste zugelassene, intravenöse Kontrastmittel für die MR-Angiographie. Gadofosveset wirkt dabei als Blutpoolmittel, indem es reversibel an das Serumalbumin bindet und so eine längere Gefäßverweildauer als herkömmliche extrazelluläre Kontrastmittel ermöglicht (Goyen, 2008). Die Proteinbindung erhöht zudem die T1-Relaxivität im Vergleich zu anderen nicht proteingebundenen Kontrastmitteln und ermöglicht eine verbesserte Blutgefäßdarstellung über eine erhöhte *signal-to-noise-ratio* (SNR; Rohrer et al., 2005).

5.3.1.2 Kontrastmittelapplikation

Da sämtliche Kontrastmittel für die MR-Lymphographie ausschließlich für die intravenöse Applikation zugelassen sind, erfolgten die subkutanen Kontrastmittel-Injektionen in der vorliegenden Arbeit als *off-label-use*.

Für die Injektionen wurden die Pfoten der Versuchstiere mit den Fingern fixiert und das jeweilige Kontrastmittel mit Hilfe einer 31G Spritze (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) injiziert. Der Einstich erfolgte palmar in einem Einstichwinkel von 10-15°. Auf diese Weise wurde das Kontrastmittel durch die oberflächlichen Lymphkapillaren aufgenommen und eine Darstellung der Lymphgefäße und Lymphknoten ermöglicht.

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde zunächst das neuartige AGuIX mit dem klinisch bereits etablierten Gd-DOTA auf die Eignung als Kontrastmittel für die MR-Lymphographie untersucht. Hierfür wurden den gesunden Versuchstieren 75 µl der AGuIX-Lösung in einer Konzentration von 3 mmol/l zwischen die 3. und 4. Phalanx der rechten Hinterlaufpfote injiziert. Im Anschluss wurden weitere 75 µl der Gd-DOTA-Fertiglösung mit einer Konzentration von 30 mmol/l zwischen die 3. und 4. Phalanx der linken Hinterlaufpfote injiziert und die MR-Lymphographie durchgeführt. Des Weiteren wurde das nanopartikuläre AGuIX auf seine kontrastgebenden Eigenschaften im Rahmen des chronischen Lymphödems untersucht. Hierbei diente die nicht-operierte Seite als intraindividuelle Kontrolle, weshalb die Injektion von jeweils 75 µl der AGuIX-Lösung mit einer Konzentration von 3 mmol/l zwischen die 3. und 4. Phalanx beider Hinterlaufpfoten erfolgte.

5.3.1.3 Datenerhebung und -analyse der MR-Lymphographie

Die gewonnenen Daten der MR-Lymphographie wurden auf einen externen Arbeitsplatz übermittelt. Die multiplanare Rekonstruktion erfolgte mittels OsiriX® Version 4.1.2. 32-bit Software (Pixmeo Sarl, Bernex, Schweiz) in koronarer, axialer und sagittaler Orientierung. Es folgte die dreidimensionale Maximumintensitätsprojektion und die anschließende quantitative Analyse koronarer zweidimensionaler MR-Bilder.

Die SNR ist ein Maß zur Beurteilung der technischen Qualität eines Signals, welches von einem Rauschsignal überlagert ist. Es ist definiert als das Verhältnis der mittleren Signalintensität (SI) einer bestimmten Region zu deren Standardabweichung (SA; Firbank et al., 1999). Als Bildrauschen bezeichnet man eine Verschlechterung des aufgenommenen Bildes durch Faktoren ohne Bezug zum eigentlichen Bildinhalt. Bei der MR-Bildgebung entsteht das Rauschen beispielsweise durch Inhomogenität des Magnetfeldes oder Bewegungen des untersuchten Körpers. Ein hohes SNR spricht demnach für eine hohe Bildqualität.

Zur Bestimmung des SNR wurden die gesamten poplitealen Lymphknoten manuell in sogenannte *regions-of-interest* (ROI) eingeteilt. Die daraus resultierenden Signalintensitäten auf nativ- und kontrastverstärkten Bildern wurden aufgezeichnet und Mittelwerte pro Lymphknoten und Zeitpunkt errechnet. Darüber hinaus wurden die Signalintensitäten des umliegenden Muskelgewebes auf Basis der ROI-Messungen beurteilt. Das Rauschen wurde als mittlere SA gemessen, wobei zwei identisch große ROIs, die unabhängig voneinander in unmittelbarer Nähe des Versuchstieres platziert wurden, als Grundlage dienten. Das SNR für jeden untersuchten Zeitpunkt wurde wie folgt definiert:

$$\text{SNR}_{\text{LKseg}} = \frac{\text{mittlere SI (LK)}}{\text{mittlere SA}}$$

Von den aufgezeichneten Signalintensitäten der segmentierten Lymphknoten und benachbarten Muskeln wurden die höchsten Signalintensitäten (LKmax) bestimmt und so die maximale SNR für die poplitealen Lymphknoten $\text{SNR}_{\text{LKmax}}$ pro Zeitpunkt und pro Versuchstier errechnet:

$$\text{SNR}_{\text{LKmax}} = \frac{\text{SI (LKmax)}}{\text{mittlere SA}}$$

Das Kontrast-Rausch-Verhältnis (*contrast-to-noise ratio*, CNR) ist neben dem SNR ein weiteres Maß zur Beurteilung der Bildqualität. Der Kontrast ist dabei die Differenz zwischen den Signalintensitäten in benachbarten Gewebeabschnitten im Verhältnis zur mittleren Standardabweichung. Zur Bestimmung der maximalen CNR ($\text{CNR}_{\text{LKmax}}$) wurden ROIs im

umliegenden Muskelgewebe gemessen und die höchste Signalintensität (Muskelmax) innerhalb einer ROI aufgezeichnet. Die entsprechenden CNR_{LKmax} wurden wie folgt berechnet:

$$CNR_{LKmax} = \frac{|SI(LKmax) - SI(Muskelmax)|}{\text{mittlere SA}}$$

Das maximale Lymphknoten-zu-Muskel-Verhältnis ($\frac{LK}{\text{Muskel-Verhältnis}}$) wurde bestimmt durch folgende Formel:

$$\frac{LK}{\text{Muskel-Verhältnis}} = \frac{SNR(LKmax)}{SNR(Muskelmax)}$$

5.3.1.4 MR-Angiographie

Bislang zugelassene Kontrastmittel für die MR-Lymphographie weisen neben der Kontrastierung des Lymphsystems eine zusätzliche Anreicherung im venösen Gefäßsystem auf, was eine Differenzierung von Blut- und Lymphgefäßen erschwert. Zum Zweck einer besseren Differenzierung wurde daher im Anschluss zur MR-Lymphographie eine kontrastverstärkte MR-Angiographie durchgeführt.

Für die intravenösen Kontrastmittelapplikationen wurde eine der lateralen Schwanzvenen der Versuchstiere aufgesucht. Ein Katheter wurde mit dem intravenösen Kontrastmittel Gadofosveset entlüftet und die Vene mit Hilfe einer 25G Kanüle (Venofix®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) einige Zentimeter distal vom Stamm punktiert. Im Anschluss wurde das Kontrastmittel über 10 Sekunden langsam injiziert. Nach Injektion des Kontrastmittels folgte eine Spülung des Kathetersystems mit physiologischer Kochsalzlösung. Katheter und Kontrastmittelspritze wurden so an der Tierhalterung angebracht, dass die Applikation des Kontrastmittels von außerhalb des MRT-Geräts stattfinden konnte. Für die kontrastverstärkte MR-Angiographie wurde Gadofosveset (Vasovist®, Bayer, Leverkusen, Deutschland) in einer Dosis von 0,2 ml/kg intravenös appliziert. Diese Dosis entspricht einer Konzentration von 0,03 mmol/kg Körpergewicht (Chwang et al., 2014).

5.3.2 Ultraschall

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit kam die Ultraschall-Untersuchung als bildgebendes Verfahren zum Einsatz. Diese erlaubt eine *in vivo* Analyse der Gewebemorphologie der VLK-Lappen, welche im Verlauf als Referenz für die parallel durchgeführte photoakustische Bildgebung verwendet wurde.

Nach Präparation des axillären Gewebepakets wurden die Versuchstiere erneut in Rückenlage auf einer beheizten Arbeitsfläche positioniert und fixiert. Die Narkose mit Ketamin und Xylazin wurde zur besseren Steuerbarkeit als Inhalationsnarkose mit einem O₂-Flow von 2 l/min und einem Isofluran-Anteil von 1,5 % fortgeführt. Das zu untersuchende Lymphknoten-Fett-Paket wurde zunächst mit Ultraschall-Gel (Aquasonic® 100; Parker, Fairfield, NJ, USA) bedeckt. Für die dreidimensionale Bildgebung wurde der Schallkopf mit Hilfe eines Motors gleichmäßig über den gesamten Lappen geschwenkt, um die Aufnahme einer Vielzahl von zweidimensionalen, in 150 µm-Abständen parallel angeordneten Einzelbildern zu ermöglichen. Die zweidimensionalen Bilder wurden anschließend mit Hilfe der Software Vevo LAB 1.7.2 (Fujifilm, Visualsonics Inc., Toronto, ON, Kanada) am Computer zu einem dreidimensionalen Bild des Lappens rekonstruiert (Fenster & Downey, 2000).

5.3.3 Photoakustische Bildgebung

Des Weiteren kam **im zweiten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit die photoakustische Bildgebung zum Einsatz. Diese lieferte zusätzliche Informationen zur Gewebeoxygenierung innerhalb der VLK-Lappen und verifizierte außerdem das in der vorliegenden Arbeit gewählte I/R-Modell.

Die photoakustische Bildgebung ist eine biomedizinische Methode, welche auf dem photoakustischen Effekt beruht und den hohen Kontrast der optischen Bildgebung mit der guten Auflösung sowie der hohen Eindringtiefe der etablierten Ultraschall-Bildgebung vereint. Dabei wird das Gewebe durch kurze Lichtimpulse einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt. Ein Teil der Lichtenergie wird vom Gewebe absorbiert und resultiert aufgrund der thermoelastischen Expansion in einer Druckerhöhung. Diese Druckänderung wird als akustische Ultraschallwelle emittiert und kann durch entsprechende Sensoren detektiert werden. Da bei der photoakustischen Bildgebung die akustische Strahlung im Gewebe selbst erzeugt wird und der Streukoeffizient für Ultraschallwellen deutlich geringer ist als der des Lichts, lassen sich anhand der gesammelten Daten und mit Hilfe spezieller Rechenalgorithmen räumlich präzise und besonders hochauflösende dreidimensionale Bilder rekonstruieren (Xu & Wang, 2006).

Die Bildgebung erfolgte parallel zur dreidimensionalen Ultraschall-Untersuchung mittels eines Vevo LAZR® Systems (Fujifilm, Visualsonics Inc.) und eines LZ550-Schallkopfes (Fujifilm, Visualsonics Inc.). Die Herz- und Atemfrequenz der Versuchstiere wurde kontinuierlich aufgezeichnet und die Körpertemperatur bei 36°C konstant gehalten (THM100; Indus Instruments, Houston, TX, USA).

In der vorliegenden Arbeit wurde das in der photoakustischen Bildgebung am häufigsten dargestellte Molekül Hämoglobin (Hb) untersucht. Dabei wurde die Tatsache genutzt, dass die Absorptionseigenschaften des physiologisch vorkommenden Hb vom Oxygenierungszustand abhängig sind (Wray et al., 1988). Hierzu wurde für die photoakustische Bildgebung der vorinstallierte *Oxy-Hemo*-Modus verwendet. Laut Herstellerangaben kommt dieser Modus im klinischen Setting zum Einsatz, beispielsweise bei der Beurteilung akuter Hypoxie innerhalb der Mikroumgebung von Tumorgewebe oder bei der Messung ischämischer Zustände im Rahmen zerebraler und myokardialer Infarkte. Aus diesem Grund eignete sich der *Oxy-Hemo*-Modus auch für die Untersuchung der Gewebsoxygenierung in der vorliegenden Arbeit. Die Wellenlänge kann dabei in einem Bereich von 680 nm bis 970 nm frei gewählt werden. In Anlehnung an die Arbeiten von Mallidi et al. (2015) und Rich & Seshadri (2015) erfolgte die Bildgebung bei einer Wellenlänge von 750 nm und 850 nm bei einer zweidimensionalen Signalverstärkung von 44 Dezibel (dB). Zudem wurde für das Hb ein Schwellenwert von 20 dB festgelegt. Des Weiteren wurden die erfassten Signale bei beiden Wellenlängen zum Gesamtvolumen der untersuchten Lymphknoten ins Verhältnis gesetzt, um das gesamte Hb-Signal innerhalb der Lymphknoten $[\text{HbT}/\text{mm}^3]$ zu bestimmen. Schließlich wurde die Sauerstoffsättigung in den jeweiligen Lymphknoten in Prozent (%) bestimmt. Sämtliche Messungen wurden mit Hilfe der Software Vevo LAB 1.7.2 (Fujifilm Visualsonics Inc.) ausgewertet.

5.4 Histologie

5.4.1 Herstellung histologischer Präparate

Nach Abschluss des 14-wöchigen Beobachtungszeitraums **im ersten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit erfolgte die Tötung der Versuchstiere durch zervikale Dislokation in tiefer Narkose. Zur histologischen Auswertung wurden im Anschluss Gewebeproben mittels eines Skalpells (B. Braun) aus der operierten Hinterlaufpfote exzidiert und in 4 %iger, neutral gepufferter Formaldehydlösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 24 Stunden bei konstanter Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss wurden die Proben mittels Alkohol dehydriert und mit

Hilfe von flüssigem Paraffin imprägniert. Es folgte die Einbettung in einen Paraffinquader und die Anfertigung von Serienschnitten mit einer Schnittdicke von 3 µm mit Hilfe eines Mikrotoms.

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden die VLK-Lappen nach einer Reperusionszeit von 24 Stunden entnommen und analog zum ersten Studienabschnitt fixiert. Nach Aufziehen der Schnitte auf einen Glasobjektträger wurden diese wie in den folgenden Abschnitten beschrieben angefärbt.

5.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung gehört zu den Routinefärbemethoden und dient der Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen anhand zweier Einzelfärbungen. Hämatoxylin, ein natürlicher Farbstoff aus dem Blauholzbaum, muss zunächst zu Hämatein oxidiert werden. Durch Beizung mit Aluminiumammoniumsulfat entsteht anschließend der eigentliche Farbstoff Hämalan. Dieser färbt nach Spülung der Probe mit einer schwach basischen Lösung alle sauren bzw. basophilen Strukturen blau. Dazu zählen insbesondere Zellkerne mit der darin enthaltenen Desoxyribonukleinsäure (DNA) sowie das raue endoplasmatische Retikulum. Eosin, ein synthetischer saurer Farbstoff, färbt alle basischen bzw. acidophilen Strukturen rot. Diese Strukturen umfassen neben Zellplasmae Proteinen auch Mitochondrien, das glatte endoplasmatische Retikulum sowie Kollagen und Keratin (Titford, 2005).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte zunächst eine Färbung mit Hilfe einer Hämalanlösung nach Mayer für drei Minuten. Danach wurden die Schnitte für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült, wodurch ein Anheben des pH-Werts und das Umschlagen des Farbstoffes erreicht wurde. Um die Schnitte anschließend von Leitungswasserrückständen zu befreien, wurden diese für weitere zwei Minuten mit destilliertem Wasser gespült. Die so von Leitungswasserrückständen befreiten Schnitte konnten daraufhin mit einer 1 %igen Eosin-Lösung für 30 Sekunden gegengefärbt werden. Um eine intensivere Anfärbung zu erreichen, wurde ein Tropfen Eisessig (wasserfreie Essigsäure) pro 100 ml Lösung hinzugegeben. Es folgte eine Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe, wobei diese sich aus Ethanol 70 %, Ethanol 80 %, Ethanol 90 % und zweifach Ethanol 100 % zusammensetzte. Abschließend wurden die Schnitte dreifach mit Xylol behandelt und mittels Eindeckmittel und Deckglas bedeckt.

5.4.3 Sirius-Rot-Färbung

Die Sirius-Rot-Färbung dient der Darstellung von Kollagenstrukturen und basiert auf dem Prinzip der Doppelbrechung (optische Anisotropie). Da der anionische Farbstoff mit den basischen Seitengruppen der im Kollagen befindlichen Aminosäuren eine Bindung eingeht, lagern sich die Farbmoleküle längs an Kollagenfasern an und bewirken so eine Zunahme der Doppelbrechung. Während das Kollagen sich lichtmikroskopisch rot abzeichnet, erscheinen Muskelfasern und das Zytoplasma unter dem Mikroskop gelb. Für die Herstellung einer 0,1 %igen Pikro-Sirius-Rot-Lösung werden 0,5 g des Farbstoffes Pikro-Sirius-Rot in 500 ml gesättigter 1,2 %iger flüssiger Pikrinsäure gelöst, wobei die Pikrinsäure eine Verstärkung der optischen Anisotropie der Sirius-Rot-Färbung bewirkt.

Die in Formalin fixierten Schnitte wurden zunächst für eine Stunde in der Pikro-Sirius-Rot-Lösung gefärbt, bevor sie anschließend zwei Mal in verdünnter 3 %iger Essigsäure gewaschen wurden. Ähnlich wie bei der HE-Färbung wurden die Schnitte in einem letzten Schritt zwecks Entwässerung in eine Alkoholreihe getaucht und dreifach mit Xylol behandelt. Im Gegensatz zur HE-Färbung wird die Entwässerung bei der Pikro-Sirius-Rot-Färbung durch zweifaches Eintauchen in reinem Ethanol erreicht. Es folgte auch hier die Einbettung mittels Eindeckmittel und Deckglas.

5.4.4 Histologische Auswertung

Sämtliche Schnitte wurden mit Hilfe eines BX60 Mikroskops (Olympus, Hamburg, Deutschland) und der Bildanalysesoftware cellSens Dimension 1.1 (Olympus) ausgewertet.

Im ersten Studienabschnitt wurde die Dicke der Epidermisschicht mit Hilfe der HE-Färbung analysiert. Die durchschnittliche Schichtdicke wurde bei 200-facher Vergrößerung anhand von Messungen in vier randomisierten ROIs errechnet. Innerhalb dieser ROIs wurde jeweils die Epidermisschicht an drei unterschiedlichen Stellen gemessen und die durchschnittliche Epidermisdicke ermittelt. Für die Auswertung der Kollagenexpression wurde zunächst in Abhängigkeit der Signalstärke für jeden Schnitt ein individueller Schwellenwert für Sirius-Rot-positive Zellbestandteile festgelegt. Anschließend wurde der Kollagengehalt bei 40-facher Vergrößerung in sechs randomisierten ROIs pro Objektträger bestimmt.

Im zweiten Studienabschnitt wurde anhand der HE-Färbung die Zellularität (= Anzahl der Zellkerne pro mm²) bei 400-facher Vergrößerung in fünf randomisierten ROIs bestimmt. Im Gegensatz dazu wurde die Zellularität im umliegenden Fettgewebe bei 200-facher Vergrößerung in vier randomisierten ROIs bestimmt.

5.5 Immunhistochemie

5.5.1 Grundlagen

In der vorliegenden Arbeit wurden auch immunhistochemische Analysen durchgeführt. Diese dienten der Identifizierung und Darstellung von Proteinen bzw. gewebe- und zelltypischen Antigenen (Epitopen) mit Hilfe von spezifischen, mit Farbstoff markierten Antikörpern. Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten indirekten Färbemethode kam ein mit einem Marker gekoppelter sekundärer Antikörper zum Einsatz, welcher sich gegen das Fc-Fragment des primären Antikörpers richtete.

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden nach Abschluss des 14-wöchigen Beobachtungszeitraums die Gewebeproben entnommen und analog zur histologischen Untersuchung für 24 Stunden in eine 4 %ige Formalinlösung getaucht. Die fixierten Gewebe wurden anschließend mit Alkohol dehydriert, in eine Paraffinmatrix eingebettet und mit einem Mikrotom geschnitten. Durch die Formalinfixierung werden die Epitope der Antigene in ihrer räumlichen Struktur verändert und überlagert, was als Maskierung bezeichnet wird. Damit wird die Reaktivität des Antigens herabgesetzt, wodurch sie von den Antikörpern nicht mehr erkannt werden. Die Konformation der Epitope am Antigen wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Hitzebehandlung (*heat induced epitope retrieval*; HIER) wiederhergestellt. Schließlich kamen die verschiedenen Färbe- und Detektionsmethoden zum Einsatz.

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden die zu untersuchenden VLK-Lappen nach Abschluss der 24-stündigen Reperfusionszeit exzidiert und wie zuvor beschrieben aufbereitet.

5.5.2 CD68

Zur immunhistochemischen Analyse der Immunzellinfiltration kam in der vorliegenden Arbeit ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper (1:50; ab125212, Abcam, Cambridge, Großbritannien) als primärer Antikörper zum Einsatz, welcher sich gegen das Oberflächenprotein CD68 von Makrophagen richtete. Anschließend wurde die Probe mit einem biotinylierten sekundären Ziege-anti-Kaninchen Antikörper Typ Immunglobulin G (IgG) versetzt. Dieser sekundäre Antikörper wurde durch Peroxidase-markiertes Streptavidin (Enzymkonjugat, 1:50; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) detektiert. Als Chromogen kam 3-Amino-9-Ethylcarbazol (Abcam) zum Einsatz.

Im ersten Studienabschnitt wurden die CD68⁺ Zellen mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware ImageJ (Collins, 2007) in zehn randomisierten *high power fields* (HPFs, 400-fache Vergrößerung) pro Schnitt gezählt und in Zellen/HPF angegeben.

Im zweiten Studienabschnitt wurden CD68⁺ Zellen innerhalb der Lymphknoten in fünf randomisierten HPFs gezählt, während CD68⁺ Zellen im umliegenden Fettgewebe bei 200-facher Vergrößerung in vier randomisierten ROIs gezählt und in Zellen/mm² angegeben wurden.

5.5.3 CD3

CD3 ist ein Transmembranprotein auf der Oberfläche der T-Lymphozyten und stellt somit einen Marker für die Gesamtpopulation der T-Zellen dar. Zur Quantifizierung der zellulären Immunantwort wurden in der vorliegenden Arbeit weitere Schnitte mit einem primären Kaninchen-Antikörper (1:100; ab166609, Abcam) detektiert, welcher sich gegen CD3 richtete. Als sekundärer Antikörper diente bei der CD3-Färbung ein biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen IgG-Antikörper. Dieser wurde ebenfalls durch Peroxidase-markiertes Streptavidin (Enzymkonjugat, 1:50; Sigma-Aldrich) detektiert, wobei 3-Amino-9-Ethylcarbazol (Abcam) bei dieser Färbung als Chromogen zum Einsatz kam.

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der CD3⁺ Zellen in zehn randomisierten HPFs gemessen und als Zellen/HPF angegeben.

5.5.4 LYVE-1

Der endotheliale Hyaluronsäurerezeptor 1 der Lymphgefäße (LYVE-1) bildet den größten Teil der Oberflächenrezeptoren für Hyaluronan auf Lymphgefäßendothelzellen und kommt als Marker für lymphatisches Gewebe bzw. Lymphangiogenese zum Einsatz, obwohl die genauen Funktionen des LYVE-1 Rezeptors nach aktuellem Stand der Forschung nicht vollständig geklärt sind (Guo et al., 2005; Wu et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit wurden die Schnitte mit einem primären polyklonalen Kaninchen-Antikörper (1:600; ab14917, Abcam) versetzt, welcher gegen LYVE-1 gerichtet war. Ein Ziege-anti-Kaninchen IgG-Alexa555-Antikörper (1:200, Life Technologies, Eugene, OR, USA) diente als Sekundärantikörper. Als Chromogen wurde der Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (2 µg/ml; Hoechst 33342, Sigma-Aldrich) verwendet.

Im ersten Studienabschnitt wurden quantitative Analysen von sechs randomisierten ROIs pro Objektträger durchgeführt. Mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware ImageJ konnte so die Fläche und die Dichte der Lymphgefäße ermittelt werden. Die Lymphgefäßfläche wurde in

Relation zu Gesamtfläche in Prozent (%) angegeben, während die Lymphgefäßdichte in Lymphgefäße/mm² angegeben wurde. Die Lymphgefäße wurden rot visualisiert.

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von LYVE-1 auf Lymphgefäßen zur morphologischen Analyse bei 100-facher Vergrößerung grün visualisiert.

5.5.5 CD31

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden die Folgen eines I/R-Schadens auf das mikrovaskuläre Netzwerk in VLKLs untersucht. Mit Hilfe des Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmoleküls (CD31), das in großen Mengen auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert wird und somit der immunhistochemischen Detektion von Blutgefäßen dient (Newman et al., 1990), konnten sämtliche Blutgefäße dargestellt werden. Als Primärantikörper kam in der vorliegenden Arbeit ein monoklonaler Ratten-Antikörper gegen CD31 (1:100; Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) zum Einsatz, welcher durch einen Ziege-anti-Ratte IgG-Alexa555 Sekundärantikörper (1:200; Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) detektiert wurde. Die Zellkerne wurden, wie auch bei der LYVE-1-Färbung, mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst 33342 (2 µg/mL; Sigma-Aldrich) gefärbt und das CD31-Signal rot visualisiert.

Die Anzahl der CD31⁺ Mikrogefäße innerhalb der Lymphknoten wurde bei 400-facher Vergrößerung in fünf randomisierten ROIs bestimmt, während die Anzahl der Mikrogefäße im umliegenden Fettgewebe bei 200-facher Vergrößerung in vier randomisierten ROIs quantifiziert und als Mikrogefäße/mm² angegeben wurde.

5.5.6 Hämoxygenase-1

Weiterhin wurde **im zweiten Studienabschnitt** das Ausmaß des oxidativen Stresses nach I/R mit Hilfe der Expression von Hämoxygenase-1 (HO-1) analysiert. Dabei wurde in der vorliegenden Arbeit das Enzym durch einen polyklonalen Kaninchen-Primärantikörper gegen HO-1 detektiert (1:100; Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland) und durch einen Peroxidase-markierten Ziege-anti-Kaninchen IgG-Sekundärantikörper (1:200; Dianova) markiert. Als Chromogen kam 3,3-Diaminobenzidin (Sigma-Aldrich) zum Einsatz.

Die Anzahl an HO-1⁺ Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit in den jeweiligen Lymphknoten bei 400-facher Vergrößerung in sechs randomisierten ROIs gezählt und relativ zur Gesamtzellzahl in Prozent (%) angegeben. Im perinodalen Fettgewebe wurde das Verhältnis bei 200-facher Vergrößerung in vier randomisierten ROIs bestimmt.

5.5.7 Proliferating Cell Nuclear Antigen

Im **zweiten Studienabschnitt** wurde zudem die Zellproliferation durch Analyse des Proliferationsmarkers *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) ermittelt. In der vorliegenden Arbeit wurde PCNA durch einen monoklonalen Maus-Primärantikörper (1:100; Agilent, Hamburg, Deutschland) detektiert und durch einen Peroxidase-markierten Schaf-Anti-Maus IgG-Sekundärantikörper (1:200; Dianova) markiert. Als Farbstoff kam 3-Amino-9-Ethylcarbazol (Abcam) zum Einsatz.

Die Anzahl der PCNA⁺ Zellen wurde in den jeweiligen Lymphknoten bei 400-facher Vergrößerung in sechs randomisierten ROIs gezählt und relativ zur Gesamtzellzahl in Prozent (%) angegeben. Im perinodalen Fettgewebe wurde das Verhältnis bei 200-facher Vergrößerung in vier randomisierten ROIs bestimmt.

5.5.8 Caspase-3

Aufgrund der Tatsache, dass der **im zweiten Studienabschnitt** untersuchte I/R-Schaden mit einer Gewebeschädigung einherging, wurden weitere Proben auf die Expression von *cleaved* Caspase (Casp)-3 analysiert. Laborchemisch und molekularbiologisch wird die gespaltene und aktivierte Casp-3 als Marker für apoptotische Zellen verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde Casp-3 durch einen polyklonalen Kaninchen-Primärantikörper (1:100; New England BioLabs GmbH, Frankfurt, Deutschland) gebunden und durch einen biotinylierten Ziege-anti-Kaninchen IgG-Sekundärantikörper (*ready-to-use*; Abcam) markiert. Der biotinylierte Antikörper wurde durch Peroxidase-markiertes Streptavidin (*ready-to-use*; Abcam) detektiert. Als chromogenes Substrat wurde in dieser Immunfärbung 3,3-Diaminobenzidin (Sigma-Aldrich) verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anzahl der Casp-3⁺ Zellen in den jeweiligen Lymphknoten bei 400-facher Vergrößerung in sechs randomisierten ROIs gezählt und relativ zur Gesamtzellzahl in Prozent (%) angegeben. Im perinodalen Fettgewebe wurde das Verhältnis bei 200-facher Vergrößerung in vier randomisierten ROIs bestimmt.

5.5.9 Myeloperoxidase

Schließlich wurden **im zweiten Studienabschnitt** noch Myeloperoxidase (MPO)⁺ Zellen angefärbt. Das in neutrophilen Granulozyten, Monozyten und diversen Gewebsmakrophagen vorkommende Enzym spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation und Terminierung von Entzündungsprozessen (Davies & Hawkins, 2020). In der vorliegenden Arbeit wurden weitere

Proben zunächst mit einem polyklonalen Kaninchen-Primärantikörper (1:100; Abcam) gegen MPO versetzt. Ein biotinylierter Schaf-anti-Kaninchen IgG-Antikörper (*ready-to-use*; Abcam) diente als Sekundärantikörper und wurde durch Peroxidase-markiertes Steptavidin (*ready-to-use*; Abcam) detektiert. Auch bei dieser Färbung diente 3-Amino-9-Ethylcarbazol als Chromogen.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Quantifizierung der MPO⁺ Zellinfiltration in den jeweiligen Lymphknoten bei 400-facher Vergrößerung in fünf randomisierten ROIs. Im umliegenden Fettgewebe wurde die Zellinfiltration bei 200-facher Vergrößerung in vier randomisierten ROIs gemessen und in Zellen/mm² angegeben. Alle quantitativen Analysen wurden mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware ImageJ durchgeführt.

5.6 Western Blot

Zur Analyse der Expression angiogener und lymphangiogener Wachstumsfaktoren (VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D) sowie der endothelialen und induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthasen (eNOS/iNOS) kam **im zweiten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit die Technik des Western Blots zum Einsatz.

Nach Entnahme der Gewebepakete aus dem Situs wurden diese zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einen Tiefkühlschrank bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Um einem enzymatischen Abbau vor der Western Blot-Analyse entgegenzuwirken, erfolgte die Aufbereitung des intrazellulären Materials durch Homogenisierung mittels Extraktionspuffer und Proteaseinhibitoren (0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1:75 v/v Proteaseinhibitorcocktail, 1:100 v/v Phosphataseinhibitorcocktail 2; Sigma-Aldrich). Die so gewonnenen Lysate wurden gesammelt und bei 4°C und 21000 xg für 30 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden abpipettiert und auf Eis gelagert.

Zur Bestimmung der Proteinexpression wurde in einem ersten Schritt mit Hilfe der zuvor gewonnen Lysate ein Kupfer-Protein-Komplex in einer alkalischen Lösung gebildet. Das im zweiten Schritt hinzugegebene Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagens (Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagens) wurde durch den Kupfer-Protein-Komplex reduziert, wobei auch Cu²⁺ (Kupfer) zu Cu⁺ reduziert wurde. In Abhängigkeit der vorhandenen Proteinmenge färbte sich die Lösung intensiv blau. Der so entstandene Farbkomplex wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen und die darin enthaltene Proteinmenge unter Zuhilfenahme einer Eichkurve bestimmt.

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine kam in der vorliegenden Arbeit die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) zum Einsatz. Die denaturierten Proteine wurden mit einem Beladungsvolumen von 15 µl Protein pro Bande auf die Gelmatrix aufgetragen und eine elektrische Spannung angelegt. Nach Beendigung des Vorgangs lagen sämtliche Proteine nach Größe und Molekulargewicht getrennt vor.

Bevor die mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine visualisiert werden konnten, mussten diese auf eine feste Trägermembran transferiert werden. Hierfür wurde das Proteinbanden-enhaltene Gel in eine spezielle Elektrophoresekommer gegeben. Die erneute Anlage einer elektrischen Spannung senkrecht zur Laufrichtung des Gels bewirkte eine Wanderung der Proteinbanden aus dem Gel heraus auf die in der vorliegenden Arbeit verwendete Polyvinyliden-Difluorid-Membran (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland). Das Muster der zuvor getrennten Banden blieb dabei erhalten. Die auf der Membran fixierten Proteine waren anschließend für den immunochemischen Nachweis zugänglich.

Nach Trennung und Blotting der Proteinbanden erfolgte schließlich die Detektion der Targetproteine durch eine spezifische Antikörper-Färbung. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran zunächst mit einem Blockierungsreagenz behandelt. Im Anschluss folgte eine Behandlung der Membran mit der entsprechenden Antikörperlösung, wobei es zur Bindung des spezifischen, unkonjugierten Primärantikörpers am Targetprotein kam. Dabei kamen folgende Primärantikörper zum Einsatz: VEGF-C (1:300; Abcam, Cambridge, Großbritannien), VEGF-D (1:300; Abcam), VEGF-A (1:100; Santa Cruz Technology, Heidelberg, Deutschland), iNOS (1:300; Abcam), eNOS (1:300; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) und p-eNOS (1:500; Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland). Die Membranen wurden zunächst über Nacht bei 4°C mit den jeweiligen Primärantikörpern inkubiert, gefolgt von weiteren drei Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Membranen zur Signalverstärkung für weitere eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur mit dem korrespondierenden Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper (1:5000; GE Healthcare, Freiburg, Deutschland oder 1:1000; R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch eine Reaktion mit einem artifiziellen Chemilumineszenz-Substrat, das zu einem Licht-emittierenden Produkt umgesetzt wurde. Die endgültige Analyse erfolgte mit Hilfe eines ECL ChemoCam Imagers, der Mess-Software Chemostar und der Analyse-Software LabImage 1D (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland).

5.7 Experimentelles Protokoll

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit sollte die Eignung des neuartigen, nanopartikulären AGuIX als Kontrastmittel für die MR-Lymphographie im Vergleich zum klinisch etablierten Gd-DOTA analysiert werden. Weiterhin wurden die kontrastgebenden Eigenschaften von AGuIX im Rahmen eines chronischen Lymphödems untersucht.

Hierfür erfolgte zunächst die simultane, intradermale Injektion von AGuIX in die rechte und Gd-DOTA in die linke Hinterlaufpfote von sechs Versuchstieren (n=6). Nach Kontrastmittelapplikation wurden sechs aufeinanderfolgende MR-Scans durchgeführt und die Signalintensität der jeweiligen Kontrastmittel während des gesamten Untersuchungszeitraums ermittelt. Kontrastmittel für die MR-Lymphographie zeigen neben der Kontrastierung des Lymphsystems eine unterschiedlich starke Anreicherung im venösen Gefäßsystem. Um eine adäquate Differenzierung von Lymph- und Blutgefäßen zu ermöglichen, wurde nach Abschluss der sechs MR-Lymphographie-Scans Gadofosveset über einen Katheter in die Schwanzvene injiziert und eine MR-Angiographie durchgeführt. Abschließend wurde der kationische Farbstoff Methyleneblau intradermal injiziert, die Versuchstiere via zervikaler Dislokation getötet und das lymphatische Netzwerk der Hinterpfote zur Veranschaulichung unter dem Mikroskop freipräpariert.

Bei weiteren Versuchstieren (n=4) wurde die Eignung von AGuIX zur Darstellung des lymphatischen Systems in Rahmen eines chronischen Lymphödems untersucht. Nach Induktion eines chronischen Lymphödems durch Lymphadenektomie und Bestrahlung des Operationsgebiets wurde die MR-Lymphographie 6, 10 und 14 Wochen postoperativ durchgeführt. Zeitgleich erfolgten wöchentliche Messungen der Pfotendicke über den gesamten 14-wöchigen Beobachtungszeitraum. Im Anschluss an die letzte Untersuchung wurden die Versuchstiere durch zervikale Dislokation in Narkose getötet und Gewebeproben zur histologischen und immunhistochemischen Auswertung entnommen.

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen und zellulären Veränderungen des I/R-Schadens nach einer 24-stündigen Reperfusionszeit der VLK-Pakete untersucht. Nach standardisierter Präparation der axillären VLK-Pakete an insgesamt 44 Versuchstieren wurden diese in verschiedene Gruppen aufgeteilt (Kontrolle, IR-45 und IR-120) und qualitative und quantitative Analysen durchgeführt. Für histologische und immunhistochemische Analysen wurden VLK-Lappen bei 24 weiteren Ratten präpariert. Die Gewebeproben wurden für histologische und immunhistochemische Analysen aufbereitet. Die VLK-Pakete der Kontrollgruppe (n=8) wurden keiner Ischämie unterzogen und der Situs unmittelbar nach der Operation verschlossen. Die VLK-Pakete der IR-45-Gruppe (n=8) wurden für 45 Minuten abgeklemmt, wohingegen die Ischämiezeit in der IR-120-Gruppe (n=8) 120

Minuten betrug. Die Versuchstiere wurden 24 Stunden nach Hautverschluss (Kontrollgruppe) oder 24 Stunden nach Abnahme der Gefäßklammern (IR-45-/IR-120-Gruppe) durch zervikale Dislokation getötet.

An acht zusätzlichen Versuchstieren erfolgte die photoakustische Bildgebung, wobei vier Tiere der IR-45-Gruppe (n=4) und vier Tiere der IR-120-Gruppe (n=4) zugeordnet wurden. Die Erhebung der Messdaten erfolgte an sechs unterschiedlichen Zeitpunkten: Vor Ischämiebeginn (*Baseline*), unmittelbar nach Ischämiebeginn (I0), unmittelbar vor Abnahme der Gefäßklammern (I45/I120) sowie 0 min (R0), 10 min (R10) und 24 h (R24h) nach Reperfusion. Die *Baseline*-Messungen fungierten als Kontrolle. Die narkotisierten Versuchstiere wurden nach der letzten Messung durch zervikale Dislokation getötet.

Für zusätzliche Western-Blot-Analysen wurden die präparierten VLK-Pakete von weiteren 12 Versuchstieren entnommen. Die Gewebeproben wurden je nach Ischämiezeit der entsprechenden Kontroll- (n=4), IR-45- (n=4) oder IR-120-Gruppe (n=4) zugeteilt und mittels Western Blot auf die Expression angiogener und lymphangiogener Wachstumsfaktoren sowie der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthasen untersucht. Alle Versuchstiere wurden nach der Entnahme der Proben durch zervikale Dislokation getötet.

5.8 Statistik

Zunächst wurden sämtliche Daten auf Normalverteilung und Varianzhomogenität geprüft.

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden die Unterschiede zwischen den zwei Versuchsgruppen bei Normalverteilung der Daten mit Hilfe des gepaarten *t*-Tests und bei nicht-normalverteilten Daten mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests auf Vorliegen einer statistischen Signifikanz untersucht. Die Analyse der verschiedenen Messzeitpunkte in den einzelnen Gruppen erfolgte bei Normalverteilung der Daten mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse für wiederholte Messungen (*one-way analysis of variance*; one-way ANOVA), während nicht-normalverteilte Daten mittels Friedman-Test untersucht wurden. Die erhobenen Daten wurden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (SD) angegeben. Punktdiagramme wurden mit dem Median als Einzellinie dargestellt, der Interquartilabstand (*interquartile range*; IQR, Datenbereich von 25 % bis 75 %) zeigte sich dabei durch den Abstand zwischen zweier durchgehender Linien. In den Boxplots zeigte sich der IQR durch die Länge der Box, während die Antennen (*Whisker*) den 1,5-fachen IQR darstellen. Innerhalb der Box wurde der Median durch eine durchgezogene Linie gekennzeichnet, der Mittelwert durch einen Punkt. Das Signifikanzniveau α wurde auf 5 % festgelegt. Die statistischen Analysen

erfolgten mit SigmaPlot (Systat Software Inc, San Jose, Kalifornien) und R (R Core Team, Wien, Österreich).

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bei normalverteilten Daten mittels *one-way* ANOVA mit nachfolgendem Bonferroni post-hoc Test auf statistische Signifikanz untersucht. Sofern die Voraussetzung einer Normalverteilung nicht erfüllt war, kam der Kruskal-Wallis Test gefolgt von einem Dunns post-hoc-Test zum Einsatz. Um den Zeiteffekt innerhalb der Versuchsgruppen zu bestimmen, wurden normalverteilte Daten mittels multifaktorieller ANOVA sowie anschließend Tukey post-hoc-Test auf das Vorliegen einer statistischen Signifikanz untersucht. Die Daten wurden als Streupunktdiagramme mit Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Auch im diesem Studienabschnitt wurde das Signifikanzniveau α auf 5 % festgelegt. Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe der Software Prism 7.0d (GraphPad Software, Inc.).

6. Ergebnisse

6.1 Kontrastmittelgestützte MR-Lymphographie

6.1.1 MR-Lymphographie bei gesunden Versuchstieren

Im **ersten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit wurde zunächst an sechs gesunden Versuchstieren das Gadolinium-basierte Kontrastmittel Gd-DOTA (Dotarem®) mit dem nanopartikulären Kontrastmittel AGuIX verglichen. Nach Durchführung eines Nativ-MR-Scans (Abb. 4A) erfolgte die simultane Injektion der Kontrastmittel in beide Hinterlaufpfoten. Es folgten repetitive Scans über einen Zeitraum von 90 Minuten. Diese Art der kontrastmittelgestützten MR-Bildgebung ermöglichte die differenzierte Darstellung von Lymph- und Blutgefäßen (Abb. 4B-G).

Die AGuIX-gestützte MR-Lymphographie erlaubte eine hochauflösende *in vivo*-Darstellung der Lymphgefäßanatomie. Die Lymphkollektoren der betroffenen Seite zeigten ein charakteristisches Aussehen mit variierendem Gefäßdurchmesser, starker Kontrastmittelanreicherung und einem geschlängelten Verlauf in Richtung des poplitealen Lymphknotens (Abb. 4B). Wie in Abbildung 4C dargestellt, hatten die Venen im Gegensatz zu den Lymphgefäßen im Bereich der Hinterlaufpfoten einen glatten Gefäßverlauf und waren weniger stark ausgeprägt. Eine detaillierte Darstellung der Venen war erst nach Gadofosveset-Injektion und MR-Angiographie möglich (Abb. 4C).

Nach der MR-Untersuchung erfolgte eine Methylenblau-Injektion in beide Hinterlaufpfoten der Versuchstiere. Abbildung 4D zeigt, dass die anschließende Präparation des mit Farbstoff markierten Lymphabflussgebietes mit den Ergebnissen der Bildgebung korrelierte.

Die Signalintensität der lymphatischen Gefäße nahm entsprechend der Pharmakodynamik des Kontrastmittels mit fortschreitender Zeit signifikant ab. Die typischen morphologischen Merkmale der Lymphgefäße blieben jedoch erhalten (Abb. 5). Die zu- und abführenden Lymphgefäße konnten auch über 60 Minuten nach AGuIX-Injektion deutlich vom umliegenden Gewebe abgegrenzt werden (Abb. 5D). Auch bei den späteren Scans 75 und 90 Minuten nach AGuIX-Injektion konnten noch geringe Restmengen an Kontrastmittel in lymphatischen Gefäßen nachgewiesen werden (Abb. 5E-F). Dabei zeigte sich eine signifikante Kontrastmittelanreicherung nach dem 90-minütigen Beobachtungszeitraum im Bereich der Injektionsstelle und des poplitealen Lymphknotens (Abb. 5F).

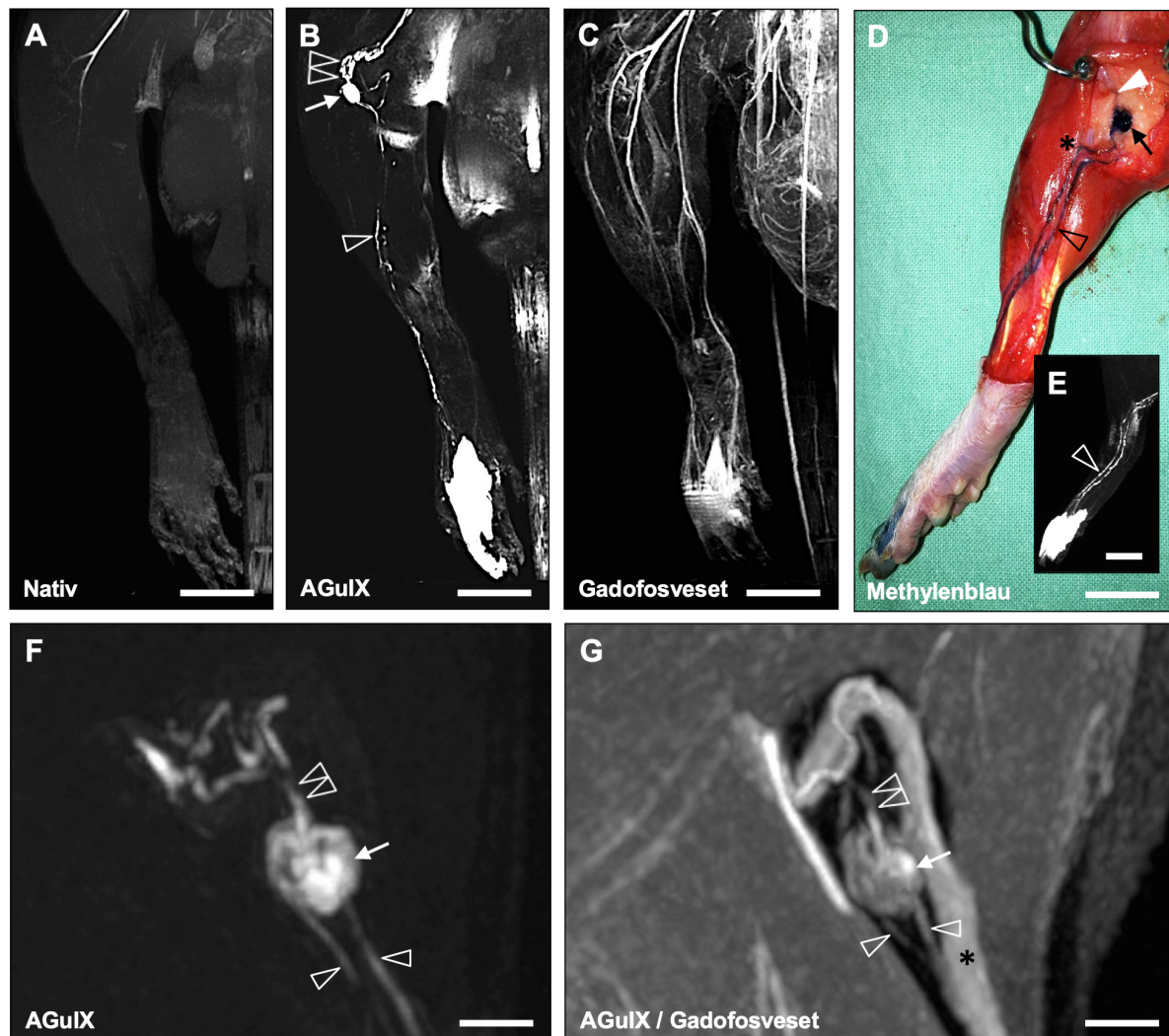


Abbildung 4: Kontrastmittelgestützte MR-Lymphographie und MR-Angiographie bei gesunden Versuchstieren. **A:** Im Anschluss an den Prescan und Homogenisierung des Magnetfeldes (Shim-Prozedere) folgte ein Nativ-3D-TOF-GRE Scan der rechten Hinterlaufpfote. **B:** Nach Entnahme aus dem MR-Tomographen und intradigitaler Injektion von AGuIX wurde erneut ein 3D-TOF-GRE Scan der rechten Hinterlaufpfote durchgeführt. Hierbei ließ sich der afferente Lymphkolektor (Pfeilspitze) darstellen, welcher zum poplitealen Lymphknoten (Pfeil) zieht. Doppelte Pfeilspitzen = efferente Lymphgefäße. **C:** Anschließend erfolgte die 3D-GRE Angiographie nach intravenöser Gadofosveset-Injektion, circa 120 min nach AGuIX-Injektion. **D:** Abschließend erfolgte die anatomische Dissektion der rechten Hinterlaufpfote nach subkutaner Methylenblau-Injektion. Die afferenten Lymphgefäße (Pfeilspitze) durchdringen die Muskelfaszie des M. biceps femoris (Sternchen) und drainieren die Lymphe in den poplitealen Lymphknoten (Pfeil). Cranial davon befindet sich das versorgende Gefäßpedikel des poplitealen Lymphknotens (weiße Pfeilspitze). **E:** Korrespondierende dorsolaterale Ansicht der rechten Hinterlaufpfote nach AGuIX-Injektion mit entsprechenden Lymphkolektoren (Pfeilspitze). **F:** Die AGuIX-Injektion erlaubt eine detaillierte anatomische Darstellung der afferenten Lymphgefäße (Pfeilspitzen), des Lymphknotens (Pfeil) und der efferenten Lymphgefäße (doppelte Pfeilspitzen). **G:** Die Gadofosveset gestützte MR-Angiographie zeigt die Nachbarschaft der V. saphena (Sternchen). Maßstäbe: **A-D** = 8 mm, **E** = 6,5 mm, **F** und **G** = 1,75 mm. MR = Magnetresonanz (Müller et al., 2017)

Wie beim Kontrastmittel AGuIX kam es auch 15 Minuten nach Injektion des Kontrastmittels Gd-DOTA zu einer Kontrastierung. Dabei konnten sowohl Venen als auch die zu- und abführenden Lymphgefäße klar dargestellt werden (Abb. 5A). Für das venöse System, insbesondere für die V. saphena, war die initiale Kontrastmittelanreicherung deutlich stärker ausgeprägt als für die afferenten Lymphgefäße. Circa 30 Minuten nach Applikation nahm die

venöse Kontrastmittelanreicherung stetig ab. Zeitgleich war eine verstärkte Kontrastmittelanreicherung im lymphatischen Gefäßnetzwerk zu beobachten (Abb. 5B), wobei diese nur von kurzer Dauer war. Bereits 45 min nach Kontrastmittelapplikation konnten die Lymphgefäße kaum noch vom umliegenden Gewebe differenziert werden. Geringe Restmengen des Kontrastmittels zeigten sich nur noch an der Injektionsstelle und im poplitealen Lymphknoten (Abb. 5C-D). Im Vergleich zur AGuIX-Injektion war 75 Minuten nach Gd-DOTA-Gabe keine weitere Kontrastmittelanreicherung mehr zu beobachten (Abb. 5E).

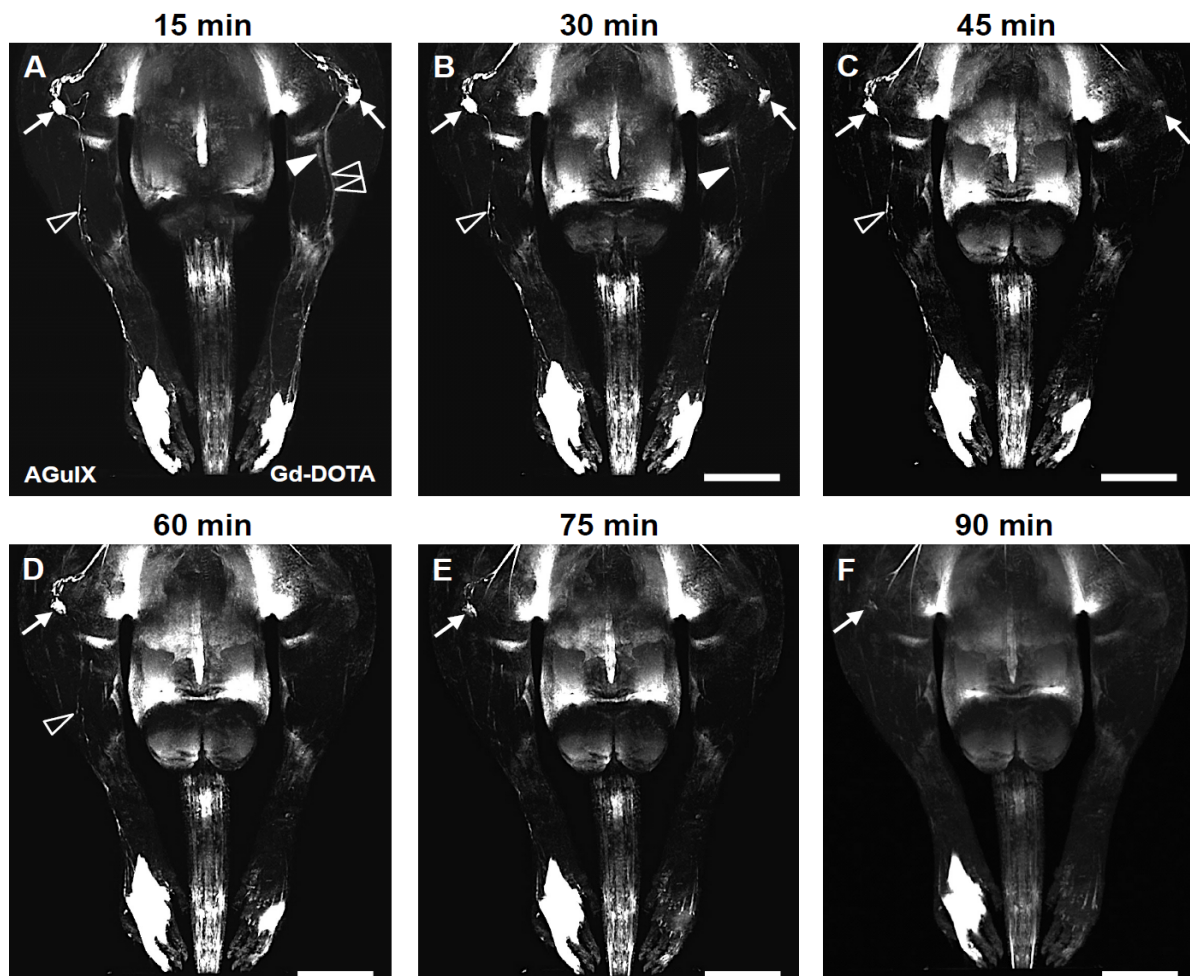


Abbildung 5: 3D-TOF-GRE MR-Lymphographie (Sequenz) nach simultaner AGuIX- und Gd-DOTA-Injektion bei gesunden Versuchstieren. **A:** Die AGuIX-Injektion resultierte in einer selektiven Kontrastmittelanreicherung in das Lymphsystem der entsprechenden Hinterlaufpfote mit deutlicher Kontrastierung der Lymphkollektoren (Pfeilspitze) und des poplitealen Lymphknotens (Pfeil). Die Gd-DOTA-Injektion hingegen führte zu einer simultanen Kontrastierung der Lymphkollektoren (weiße Pfeilspitze) und der V. saphena (doppelte Pfeilspitze). **B-F:** Die repetitive Bildgebung erlaubt die Analyse der pharmakodynamischen und -kinetischen Eigenschaften der untersuchten Kontrastmittel. **B:** Etwa 30 Minuten nach Kontrastmittelapplikation nahm die Gd-DOTA-Anreicherung innerhalb der Venen langsam ab, wodurch die Differenzierung der Lymphkollektoren (weiße Pfeilspitze) erschwert wurde, während die AGuIX-Injektion weiterhin eine starke Kontrastierung des Lymphsystems aufwies und Lymphkollektoren (Pfeilspitze) und der popliteale Lymphknoten (Pfeil) deutlich vom umliegenden Gewebe differenziert werden konnten. **C:** 45 Minuten nach Kontrastmittelapplikation ließen sich residuelle Gd-DOTA-Anreicherungen ausschließlich an der Injektionsstelle und dem poplitealen Lymphknoten (Pfeil) nachweisen, während bei AGuIX weiterhin eine deutliche Kontrastierung der Lymphkollektoren (Pfeilspitze) und des Lymphknotens (Pfeil) zu beobachten war. **D-F:** 60 Minuten nach AGuIX-Injektion (**D**) zeigte sich weiterhin eine Kontrastmittelanreicherung innerhalb des Lymphsystems, welche auch nach 75 Minuten (**E**) und 90 Minuten (**F**) noch nachweisbar war. Maßstab: 9,5 mm. MR = Magnetresonanz. (Müller et al., 2017)

Beim Vergleich der beiden Kontrastmittel ließen sich signifikant unterschiedliche Kontrastierungen beobachten. Während es nach AGuIX-Gabe zu einer deutlichen und langanhaltenden Kontrastierung der Lymphgefäße kam, war die Differenzierung nach Gd-DOTA-Applikation erschwert und das Kontrastmittel bereits nach 75 Minuten vollständig ausgewaschen (Abb. 5A-E).

Sowohl die Gabe von AGuIX als auch die Applikation von Gd-DOTA resultierten in einem frühen Anreicherungspeak der Kontrastmittel 15 Minuten nach Injektion (Abb. 5A), mit einer stetigen Ausschwemmung innerhalb des 90-minütigen Beobachtungszeitraums (Abb. 5). Die Kontrastierung (Abb. 6A-F) und die SNR_{LKseg} nach AGuIX-Gabe war zu jedem Beobachtungszeitpunkt signifikant größer als nach Gd-DOTA-Gabe (Abb. 6G-H). Die AGuIX-Injektion resultierte nach 15 Minuten in einer 7,3-fachen Zunahme der mittleren SNR_{LKseg} von $9,5 \pm 1,9$ auf $68,7 \pm 14,1$. Auch 90 Minuten nach Applikation des Kontrastmittels lag die durchschnittliche SNR_{LKseg} 2,7-mal über dem Ausgangswert. Im Vergleich dazu kam es 15 Minuten nach Gd-DOTA Injektion zu einer 3,7-fachen Erhöhung der mittleren SNR_{LKseg} , von $10,2 \pm 2,1$ auf $37,7 \pm 7,4$, während die mittlere SNR_{LKseg} der Gd-DOTA-Gruppe 60 Minuten nach Injektion auf den Ausgangswert zurückgekehrt war (Abb. 6G).

Die Messungen der maximalen SNR innerhalb der Lymphknoten (SNR_{LKmax}) zeigten nach 15 Minuten einen 11,5-fachen Anstieg in der AGuIX-Gruppe von $19,9 \pm 4,0$ auf $229,0 \pm 72,5$ (Abb. 6H). Im Vergleich zur Baseline-Messung war auch 90 Minuten nach Injektion des Kontrastmittels ein signifikant erhöhter Wert der SNR_{LKmax} zu verzeichnen. Für die Versuchstiere der Gd-DOTA-Gruppe stieg die SNR_{LKmax} nach 15 Minuten um das 7,0-fache, von $20,3 \pm 4,0$ auf $142,0 \pm 48,2$, sank jedoch bereits 45 Minuten nach Injektion auf den Ausgangswert zurück (Abb. 6H).

In Übereinstimmung mit der objektiv beurteilten Bildqualität zeigte die CNR_{LKmax} in der AGuIX-Gruppe einen 28,5-fachen Anstieg von $7,6 \pm 3,3$ vor auf $216 \pm 68,6$ 15 Minuten nach Injektion (Abb. 6I). Im Vergleich zur Baseline-Messung war die CNR_{LKmax} 60 Minuten nach Injektion nicht mehr erhöht. Die Gd-DOTA-Injektion führte hingegen zu einem Anstieg der CNR_{LKmax} um den Faktor 17,2 von $6,5 \pm 1,9$ auf $117,9 \pm 49,9$. Der Ausgangswert war 45 Minuten nach Kontrastmittelapplikation erreicht.

Das Lymphknoten/Muskulatur-Verhältnis (LK/Muskel-Verhältnis) stieg 15 Minuten nach AGuIX-Injektion um das 9,7-fache von $1,5 \pm 0,2$ auf $14,4 \pm 4,0$ und war auch 90 Minuten nach Injektion signifikant erhöht (Abb. 6J). Im Vergleich dazu zeigte sich 15 Minuten nach Gd-DOTA Applikation ein geringerer Anstieg des LK/Muskel-Verhältnisses um das 6,2-fache von $1,4 \pm 0,2$ auf $8,9 \pm 3,3$ (Abb. 6J). Während das LK/Muskel-Verhältnis nach AGuIX-Injektion über den gesamten Beobachtungszeitraum erhöht war, kehrte dieses im Anschluss an die Gd-DOTA-Injektion bereits nach 45 Minuten auf den Ausgangswert zurück.

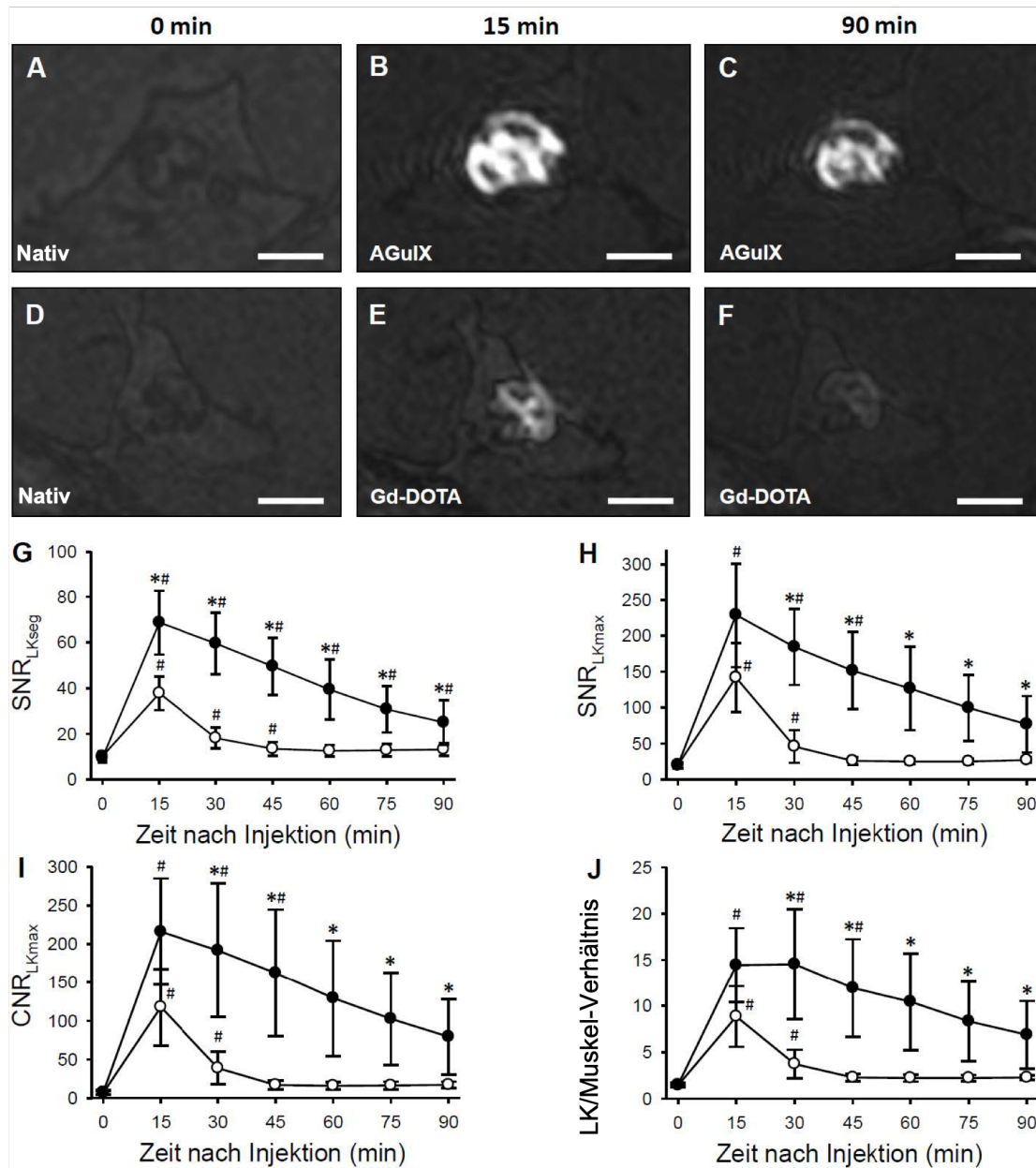


Abbildung 6: Kontrastierung des poplitealen Lymphknotens nach simultaner AGuIX- und Gd-DOTA-Injektion. **A-F:** 3D-TOF-GRE Scans in koronarer Ausrichtung vor (**A** und **D**), 15 min (**B** und **E**) und 90 min (**C** und **F**) nach Kontrastmittelinjektion. Maßstab: **A-F** = 1,5 mm. **G-J:** Die AGuIX-gestützte MR-Lymphographie (schwarze Punkte) resultierte im Vergleich zur Gd-DOTA-gestützten MR-Lymphographie (weiße Punkte) zu jedem Untersuchungszeitpunkt in einer signifikant erhöhten SNR_{LNseg} (**G**), SNR_{LNmax} (**H**), CNR_{LNmax} (**I**) und einem signifikanten erhöhtem LK/Muskel-Verhältnis (**J**). Die Messdaten werden in arbitrary units (a.u.) angegeben. Mittelwerte $\pm$ SD, $n = 6$. * $P < 0,05$ vs. Gd-DOTA, # $P < 0,05$ vs. 0 min. MR = Magnetresonanz, SNR = signal-to-noise-ratio, CNR = contrast-to-noise-ratio. (Müller et al., 2017)

6.1.2 MR-Lymphographie des chronischen Lymphödems

Nachdem im **ersten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit die beiden Kontrastmittel AGuIX und Gd-DOTA für die MR-Lymphographie miteinander verglichen wurden, sollten zusätzlich die diagnostischen Eigenschaften des nanopartikulären AGuIX im Rahmen eines chronischen Lymphödems über einen Zeitraum von 14 Wochen untersucht werden.

Hierfür wurde bei vier weiteren Versuchstieren ein sekundäres Lymphödem durch Lymphadenektomie und postoperative Bestrahlung des Operationsgebietes induziert. Die kontrastmittelgestützten MR-Lymphographie-Untersuchungen erfolgten 6, 10 und 14 Wochen postoperativ und sind in Abbildung 7 dargestellt. Entsprechend dem Versuchsprotokoll erfolgte die Kontrastmittel-Injektion in die 4. Phalanx beider Hinterlaufpfoten.

Sechs Wochen nach Induktion des chronischen Lymphödems ließen sich an der operierten Seite zahlreiche lymphatische Kollateralkreisläufe beobachten, die in Richtung des ipsilateralen Leistenbandes zogen. Diese Kollateralkreisläufe konnten auf der Gegenseite nicht dargestellt werden (Abb. 7A). Diese neuen Lymphgefäße wiesen morphologische Besonderheiten auf. Insbesondere zeigten sich vermehrt ektatische und kurzstreckig geschlängelt verlaufende Lymphgefäße (Abb. 7A). Daraus resultierte eine größere Varianz an Lymphgefäßdurchmessern. Weitere Veränderungen zeigten sich auch im Bereich des Fußrückens der operierten Pfote, in dem es zu einem Umbau des Lymphgefäßnetzwerks kam. Im Gegensatz zur gesunden Seite konnte ein dichtes Netzwerk aus Lymphgefäßen/-kapillaren dargestellt werden, aus dem die Kollateralkreisläufe entsprangen (Abb. 7D und G). Im Bereich der ligierten Lymphgefäße war zum Untersuchungszeitpunkt ein geringer *dermal backflow* nachweisbar (Abb. 7E-F), welcher auf der gesunden Seite nicht dargestellt werden konnte (Abb. 7H-I).

In der MR-Lymphographie-Untersuchung 10 Wochen nach der Induktion des chronischen Lymphödems ließ sich im Bereich der operierten Hinterlaufpfote weiterhin das dichte Netzwerk aus Lymphkapillaren darstellen. Im Vergleich zur Voruntersuchung ließen sich sowohl popliteal als auch inguinal weniger Kollateralkreisläufe beobachten (Abb. 7B).

Bei der letzten MR-Lymphangiographie 14 Wochen nach der Bestrahlung zeigte sich ein weiterer Rückgang der Kollateralkreisläufe. Auch das dichte Netzwerk aus Lymphkapillaren im Bereich der Pfote war zu diesem Zeitpunkt nicht mehr deutlich darstellbar (Abb. 7C).

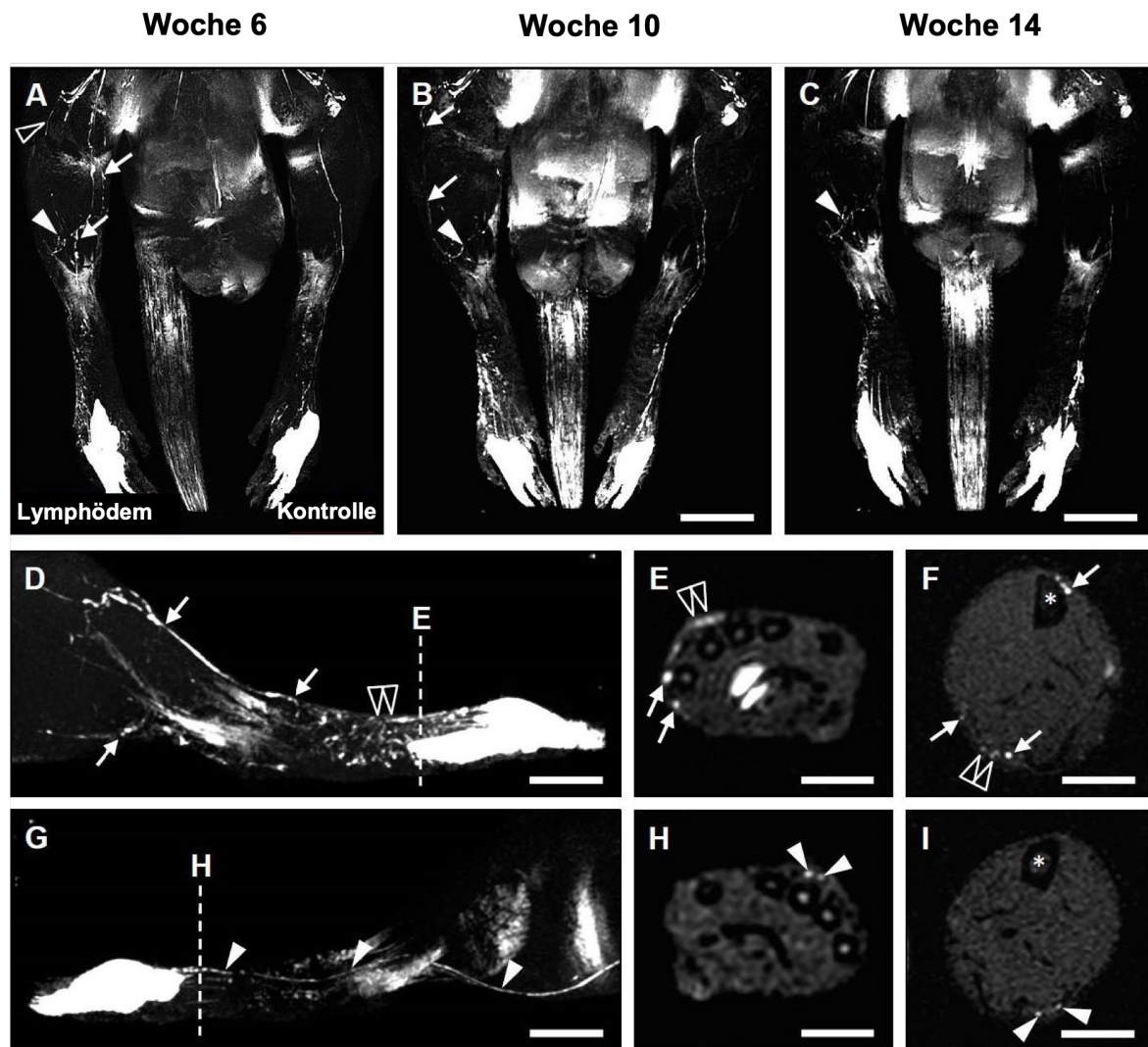


Abbildung 7: Wiederholte AGuIX-gestützte MR-Lymphographie nach Induktion eines chronischen Lymphödems. **A:** Sechs Wochen nach der Lymphadenektomie zeigte sich eine lymphatische Reorganisation mit Bildung von Kollateralkreisläufen (Pfeile). Diese neu gebildeten Lymphgefäße überbrückten den durch die Operation und Bestrahlung geschaffenen Defekt (Pfeilspitze) und drainierten die anfallende Lymphe in Richtung des ipsilateralen Leistenbandes (hier nicht dargestellt). Im Vergleich zur ersten MR-Lymphographie Untersuchung ließ sich 10 (**B**) und 14 (**C**) Wochen nach der Operation weniger Kollateralkreisläufe darstellen (Pfeile). Weiße Pfeilspitze = ligiertes Lymphgefäß. **D, G:** Dorsolaterale Ansicht der Hinterlaufpfote der Lymphödem- (**D**) und Kontroll- (**G**) Pfote sechs Wochen nach Lymphadenektomie. Darstellung der Lymphkapillaren (doppelte Pfeilspitze), welche in die neu gebildeten Lymphgefäße (Pfeile) drainieren (**D**). Korrespondierende koronare Ansicht der ödematösen Pfote (**E**) entsprechend der Markierung in **D**, sowie 5 mm proximal des distalen Tibiofibular-Gelenks (**F**). Im Bereich des ligierten Lymphgefäßes ließ sich ein dermal backflow (**E**, doppelte Pfeilspitze) nachweisen, welcher nach proximal abnahm (**F**, doppelte Pfeilspitze). Die Pfeile in **D**, **E** und **F** stellen die kollateralen Lymphgefäße dar. **G-I:** Auf der nicht-operierten Seite ließen sich regelrechte Lymphkollektoren (Pfeilspitzen) darstellen. Sternchen = Tibia. Maßstäbe: **A-C** = 9,5 mm, **D** und **G** = 7,5 mm, **E** und **H** = 3 mm, **F** und **I** = 5,5 mm. MR = Magnetresonanz (Müller et al. 2017)

6.1.3 Beurteilung des Lymphödem-Modells bei Ratten

Im Rahmen der MR-Lymphographie eines chronischen Lymphödems erfolgte zudem die quantitative Analyse des in der vorliegenden Arbeit genutzten Lymphödem-Tiermodells. Hierfür erfolgte während des gesamten 14-wöchigen Beobachtungszeitraums die wöchentliche, standardisierte Messung der Pfortendicke. Nach Abschluss der letzten MR-Lymphographie, 14 Wochen nach Lymphadenektomie, wurden zudem Gewebeproben von

jeweils vier Versuchstieren entnommen und zur histologischen und immunhistochemischen Analyse verwendet. Dabei kam es bei keinem der Versuchstiere zu einer postoperativen Wundinfektion oder Wundheilungsstörung. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.

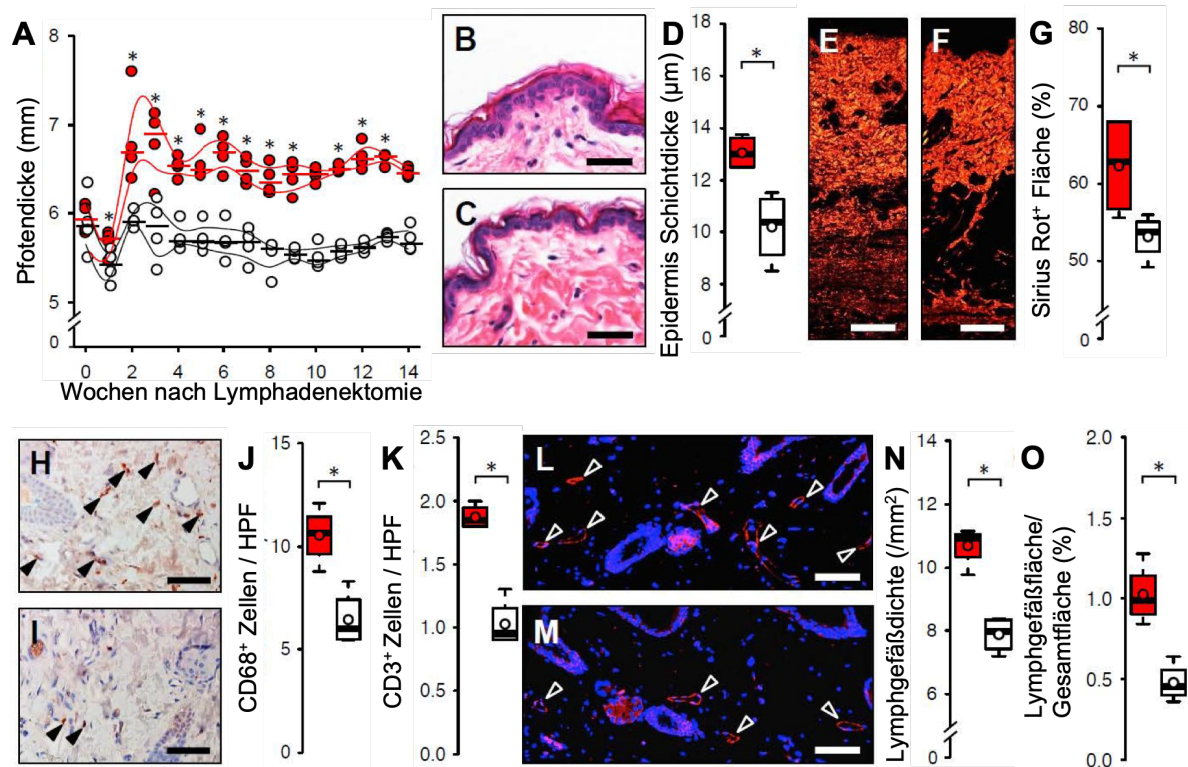


Abbildung 8: Quantifizierung des sekundären Lymphödems. **A:** Die Bestrahlung der rechten Leistenregion zwei Wochen nach Lymphadenektomie resultierte in einer signifikanten Zunahme der Pfotendicke der operierten Seite (rote Punkte) im Vergleich zur gesunden, nicht operierten Pfote (weiße Punkte). Die Pfotendicke zeigte sich im Beobachtungszeitraum leicht regredient, blieb jedoch auch 12 Wochen nach Induktion des chronischen Lymphödems weiterhin signifikant erhöht. **B, C:** HE-gefärbte Gewebeproben der Hinterlaufpfoten der Lymphödem- (**B**) und Kontroll- (**C**) Gruppe. **D:** Im Vergleich zur nicht-operierten Pfote (weißer Boxplot) zeigte sich eine signifikante Zunahme der Epidermischicht in der lymphödematös veränderten Hinterlaufpfote (roter Boxplot). **E, F:** Sirius-Rot-gefärbte Gewebeproben der lymphödematös geschwollenen (**E**) und der gesunden (**F**) Hinterlaufpfoten. **G:** Die Induktion des chronischen Lymphödems führte zu einer signifikanten Zunahme der Bindegewebsfibrose der operierten Seite (roter Boxplot) im Vergleich zur gesunden Seite (weißer Boxplot). **H, I:** Gewebeproben der Hinterlaufpfoten der operierten (**H**) und gesunden (**I**) Seite mit CD68⁺ Makrophagen (schwarze Pfeilspitzen). **J, K:** Im Rahmen des chronischen Lymphödems (rote Boxplots) kam es im Vergleich zur nicht operierten Seite zu einer Immunzellinfiltration mit signifikanter Zunahme von CD68⁺ Makrophagen (**J**) und CD3⁺ T-Lymphozyten (**K**). **L-O:** Die LYVE-1-Färbungen der Gewebeschnitte aus der Lymphödem-Gruppe (**L**) zeigten eine signifikante Zunahme der LYVE-1⁺ Endothelzellen (Pfeilspitzen in **L** und **M**) und somit der Lymphgefäßdichte und -fläche (**N** und **O**, rote Boxplots) im Vergleich zur Kontrollgruppe (**M**; **N** und **O**, weiße Boxplots). Die Zellkerne wurden mit dem Farbstoff Bisbenzimid gefärbt. $n = 4$, $*P < 0,05$ vs. Kontrolle (weiße Boxplots), Maßstäbe: **B** und **C** = 40 µm, **E** und **F** = 220 µm, **H** und **I** = 60 µm, **L** und **M** = 145 µm. HE = Hämatoxylin-Eosin, LYVE-1 = lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor. (Müller et al., 2017)

Die Messungen der Pfotendicke ließen den Schluss zu, dass die Induktion eines chronischen Lymphödems in einer signifikanten Volumenzunahme der Hinterlaufpfoten der Versuchstiere resultiert (Abb. 8A). Dabei war die Schwellung insbesondere in den ersten Wochen nach der Bestrahlung stark ausgeprägt. Obwohl sich diese im weiteren zeitlichen Verlauf als regredient erwies, war eine signifikante Volumenzunahme der operierten Pfote

auch 12 Wochen nach Induktion eines chronischen Lymphödems zu beobachten. In dem gesamten Beobachtungszeitraum konnte keine übermäßige Schwellung der nicht-operierten Pfote beobachtet werden. Nach Beendigung der Operation wiesen alle Versuchstiere eine uneingeschränkte Mobilität auf.

Das in der vorliegenden Arbeit genutzte Lymphödem-Modell der Ratte wurde neben der konventionellen Pfortendickemessung auch auf Grundlage histologischer und immunhistochemischer Analysen beurteilt. In den HE-gefärbten Schnitten ließ sich eine deutliche Zunahme der Epidermisschicht der operierten Hinterlaufpfoten beobachten (Abb. 8B-D). Darüber hinaus konnten mittels einer Sirius-Rot-Färbung weitere typische lymphödematöse Veränderungen, wie eine Zunahme der Bindegewebsfibrose, beobachtet werden (Abb. 8E-G). Außerdem zeigten die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Analysen einen signifikanten Anstieg von CD68⁺ und CD3⁺ Zellen, was auf eine lymphödemtypische Erhöhung der Immunzellinfiltration hinweist (Abb. 8H-K). Die Fluoreszenzfärbung von LYVE-1⁺ Endothelzellen zeigte eine signifikante Zunahme der Lymphgefäßdichte sowie der Lymphgefäßfläche in Relation zur Gesamtfläche der operierten Hinterlaufpfoten im Vergleich zur nicht operierten Seite (Abb. 8L-O).

6.2 I/R-Analysen der VLK-Pakete

6.2.1 Gewebeoxygenierung und Morphologie

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen und zellulären Veränderungen im Rahmen eines I/R-Schadens von VLK-Lappen untersucht. Dabei kamen Ischämiezeiten von 0, 45 und 120 Minuten zum Einsatz. Zunächst wurde die Morphologie und die Gewebeoxygenierung der präparierten VLK-Pakete analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

Um eine objektive *in vivo*-Analyse der IR durchführen zu können, wurden die VLK-Lappen der IR-45 und der IR-120-Gruppe mit Hilfe von Ultraschall und photoakustischer Bildgebung beurteilt (Abb. 9). Die Anlage der Gefäßklemmen bewirkte in beiden Versuchsgruppen einen Abfall der Sauerstoffsättigung (sO₂) auf ein Drittel des Ausgangswertes (68 % in der IR-45-Gruppe, 67 % in der IR-120-Gruppe; Abb. 9C, D, N und P). Während der Ischämiezeit (45/120 Minuten) kam es erneut zu einer signifikanten Abnahme der Sauerstoffsättigung um > 33 % (36 % in der IR-45-Gruppe, 33 % in der IR-120-Gruppe; Abb. 9N und P).

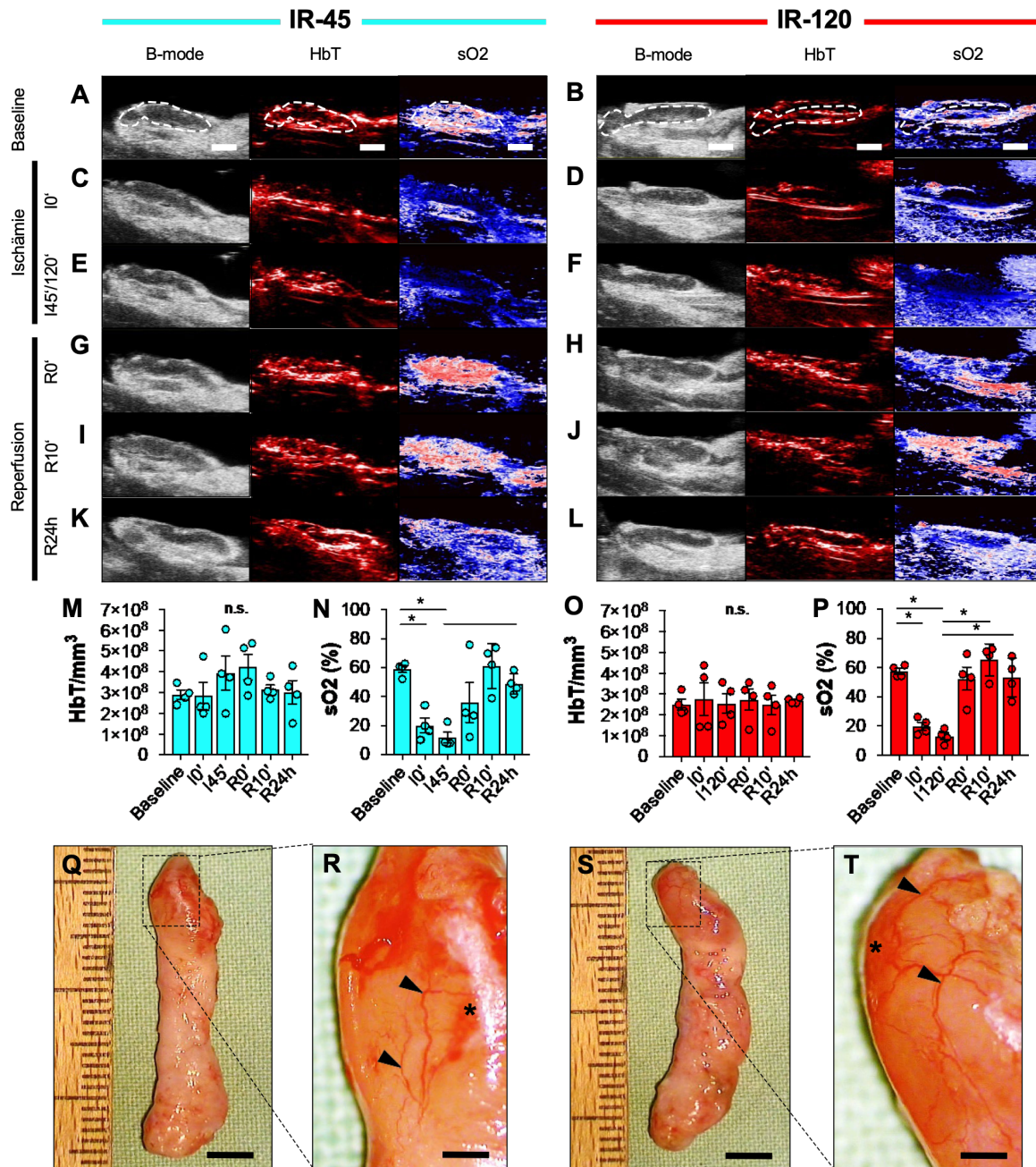


Abbildung 9: Bewertung des IR-Tiermodells. **A-L:** Sonographische (B-mode) und photoakustische (HbT, sO₂) Bildgebung der axillären VLK-Pakete der IR-45- und IR-120-Gruppe vor (**A** und **B**), während (**C-F**) sowie 0 min (**G** und **H**, R0'), 10 min (**I** und **J**, R10') und 24 h (**K** und **L**, R24h) nach Ischämie. Gestrichelte Linie = Lymphknoten. **M-P:** Hämoglobinkonzentration (HbT/mm³) und Sauerstoffsättigung (sO₂ (%)) der Lymphknoten der IR-45 (**M** und **N**, blau) und IR-120-Gruppe (**O** und **P**, rot) zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten (Baseline, 10', 145'/120', R0', R10' und R24h). Mittelwerte ± SEM, n = 4, *P < 0,05, n.s. = nicht signifikant. **Q-T:** Stereomikroskopische Bilder der VLK-Lappen der IR-45- (**Q** und **R**) und IR-120-Gruppe (**S** und **T**). Die höhere Vergrößerung der VLK-Pakete (**R** aus **Q**, **T** aus **S**) zeigte ein dilatiertes Gefäßnetzwerk (Pfeilspitzen) mit kapsulären Hämorrhagien (Sternchen). Maßstäbe: **A-L** = 2 mm, **Q** und **S** = 4,5 mm, **R** und **T** = 900 µm. IR = Ischämie-Reperfusion, VLK = vaskularisierte Lymphknoten. (Frueh et al., 2020)

Nach der Reperfusion stieg der sO₂ rasch wieder auf den Ausgangswert an (Abb. 9N und P). Im direkten Vergleich beider Ischämiegruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Sauerstoffsättigung innerhalb der Lymphknoten (Abb. 9N und P). Die totale Hämoglobinkonzentration innerhalb der Lymphknoten (HbT/mm³) blieb während des gesamten

Beobachtungszeitraums konstant. Überdies wurden nach der 24-stündigen Reperfusion vergleichbare HbT/mm³-Werte innerhalb der beiden Ischämiegruppen gemessen (Abb. 9M und O). Nach Entnahme der VLK-Pakete aus dem Situs zeigte sich unter dem Stereomikroskop ein dilatiertes perinodales Gefäßnetzwerk mit kleinen kapsulären Hämorrhagien (Abb. 9Q-T).

6.2.2 Western Blot-Analysen

6.2.2.1 Expression angiogener und lymphangiogener Wachstumsfaktoren

Im zweiten Studienabschnitt wurde der Western Blot als analytisches Verfahren eingesetzt. Auf diese Weise konnte zunächst die Expression angiogener und lymphangiogener Wachstumsfaktoren als Folge des I/R-Schadens quantifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren VEGF-C, VEGF-D und VEGF-A analysiert. Für die Analyse der Proteinexpression wurden die Lymphknoten und das perinodale Fettgewebe getrennt voneinander kryokonserviert und analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt.

Im Vergleich zur IR-45- und Kontrollgruppe zeigte sich bei der IR-120-Gruppe sowohl innerhalb der Lymphknoten (Abb. 10A und C) als auch im perinodalen Fettgewebe (Abb. 10B und D) eine signifikante Zunahme des lymphangiogenen Wachstumsfaktors VEGF-D. Der Wachstumsfaktor VEGF-C hingegen war, verglichen mit der Kontrollgruppe, weder in der IR-45- (Abb. 10C-D) noch in der IR-120-Gruppe (Abb. 10C-D) signifikant erhöht. Eine signifikant erhöhte VEGF-A-Expression zeigte sich beim Vergleich der drei Versuchsgruppen ausschließlich nach 120-minütiger Ischämiezeit innerhalb der Lymphknoten (Abb. 10C). Ein signifikanter Effekt der IR auf die Ausschüttung von VEGF-A im perinodalen Fettgewebe ließ sich weder in der IR-45-Gruppe noch in der IR-120-Gruppe nachweisen (Abb. 10D).

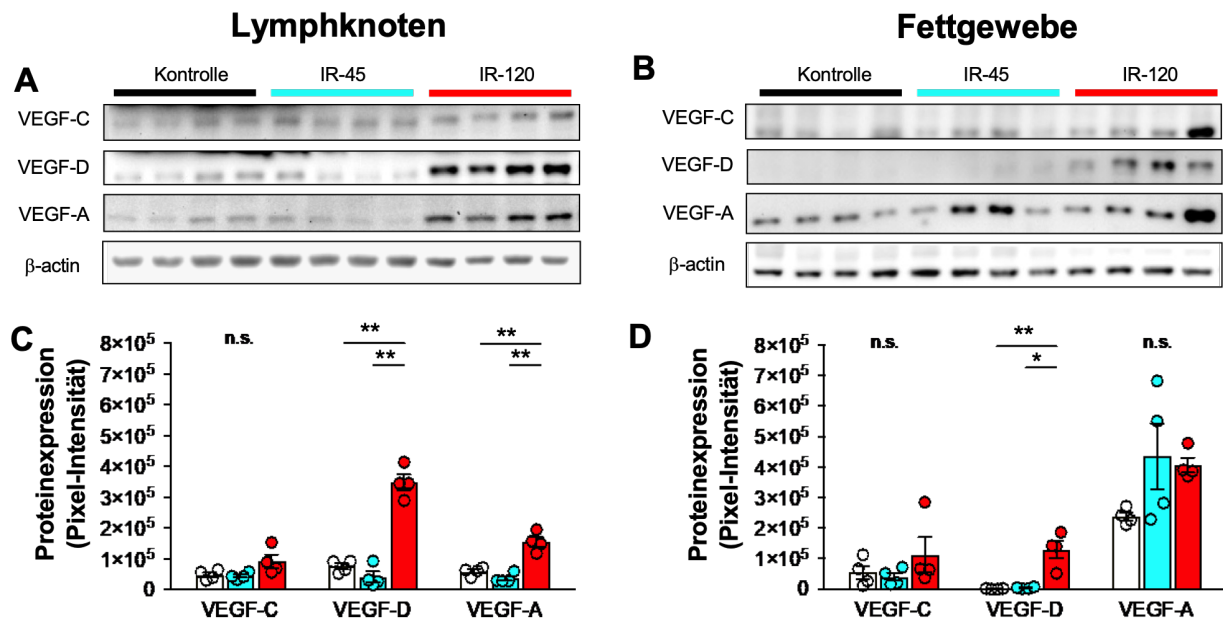


Abbildung 10: Expression von Wachstumsfaktoren nach I/R-Schaden. **A-D:** Western Blot (**A** und **B**) und Quantifizierung (**C** und **D**) der VEGF-C, VEGF-D und VEGF-A Expression der VLK-Lappen in der Kontroll- (weiß), IR-45- (blau) und IR-120-Gruppe (rot). Zusammenführung der Proteinbanden aus derselben Gelmatrix. **A, C:** Expression der Wachstumsfaktoren innerhalb der Lymphknoten. **B, D:** Expression der Wachstumsfaktoren innerhalb des perinodalen Fettgewebes. Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 4$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, n.s. = nicht signifikant. I/R = Ischämie-Reperfusion, VEGF = vascular endothelial growth factor, VLK = vaskularisierte Lymphknoten. (Frueh et al., 2020)

6.2.2.2 Expression der Stickstoffmonoxid-Synthasen

Zusätzliche Western Blots wurden zur Analyse der Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und der phosphorylierten endothelialen NO-Synthase (p-eNOS) angefertigt. Die quantitativen Analysen sind in Abbildung 11 dargestellt.

In den Lymphknoten der Ischämiegruppen zeigte sich keine signifikante Hochregulation der iNOS, der eNOS oder der p-eNOS im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 11A und C). Im Gegensatz dazu war im perinodalen Fettgewebe der IR-120-Gruppe, verglichen mit der IR-45- und der Kontrollgruppe, eine signifikante Erhöhung des Verhältnisses von p-eNOS zu eNOS zu verzeichnen (Abb. 11B und D).

Abbildung 11: Expression der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthasen nach I/R-Schaden. **A-F:** Western Blot (**A** und **B**) und Quantifizierung der iNOS (**C** und **E**) und p-eNOS/eNOS (**D** und **F**) Expression der VLK-Lappen in der Kontroll- (weiß), IR-45- (blau) und IR-120-Gruppe (rot). Analyse der Expression der NO-Synthasen innerhalb der Lymphknoten (**A**, **C** und **D**) und im perinodalen Fettgewebe (**B**, **E** und **F**). Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 4$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, n.s. = nicht signifikant. I/R = Ischämie-Reperfusion, iNOS induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), eNOS = endotheliale NOS, p-eNOS = phosphorylierte eNOS, VLK = vaskularisierte Lymphknoten. (Frueh et al., 2020)

6.2.3 Histologische und immunhistochemische Analysen

6.2.3.1 Morphologie der VLK-Lappen

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden die VLK-Pakete der jeweiligen Versuchsgruppen nach Abschluss der 24-stündigen Reperfusionszeit aus dem Situs entnommen und für histologische und immunhistochemische Analysen prozessiert. Zur Analyse der morphologischen Veränderungen der VLK-Pakete durch einen I/R-Schaden erfolgten zunächst LYVE-1- und HE-Färbungen. Diese erlaubten eine Beurteilung des Lymphgefäßnetzwerks und der Zellularität innerhalb der Präparate.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in den Lymphknoten der Kontroll- und IR-45-Gruppe eine normale Lymphknotenarchitektur mit Rand-, Intermediär- und Marksinus sowie Lymphfollikeln (Abb. 12A-E). Außerdem konnte durch die immunhistochemische Färbung ein LYVE-1⁺ Lymphgefäßnetzwerk nachgewiesen werden, welches die jeweiligen Kompartimente voneinander abgrenzte. Im Vergleich dazu ließ sich nach einer Ischämiezeit von 120 Minuten ein partieller Untergang der normalen Lymphknotenarchitektur beobachten (Abb. 12F und G).

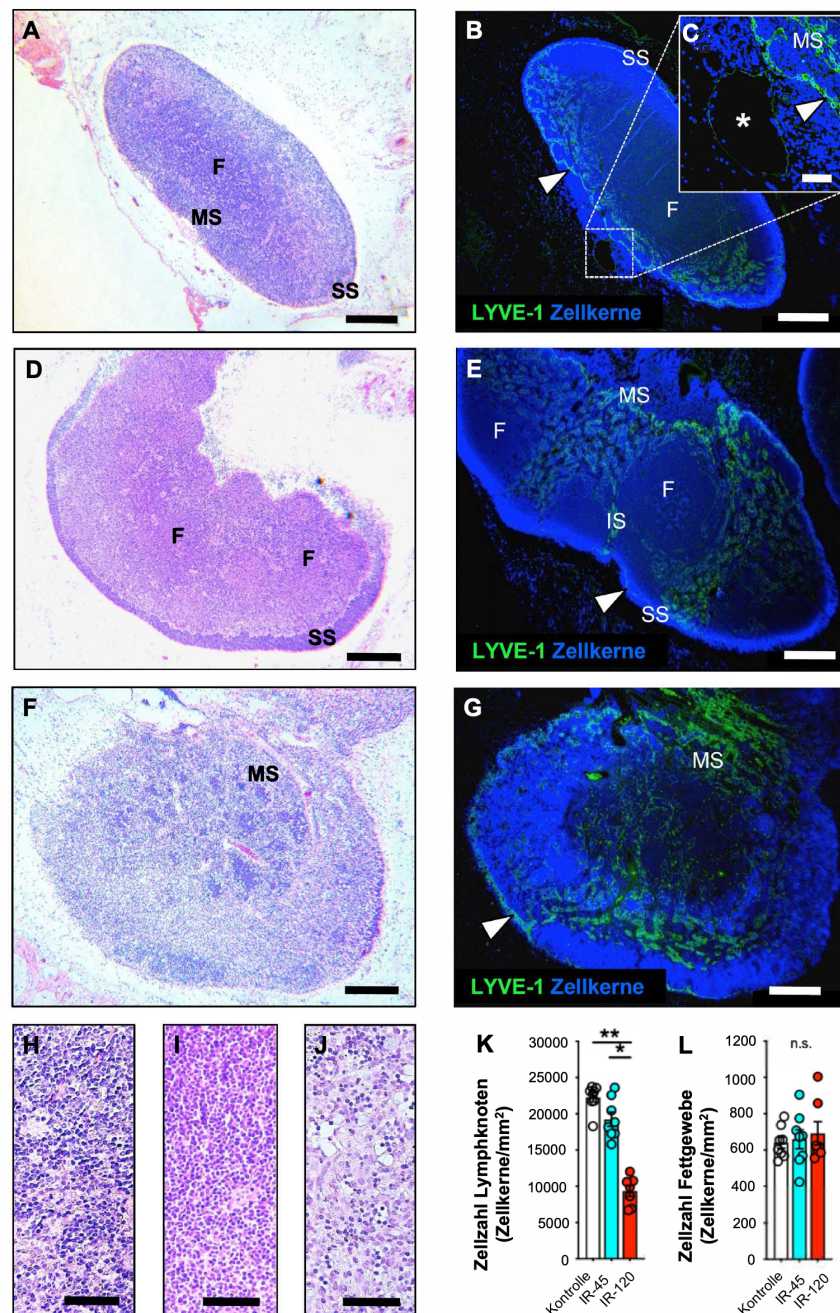


Abbildung 12: Strukturelle Veränderung der VLK-Pakete nach I/R-Schaden. **A-G:** HE-Färbung (**A, D** und **F**) und immunohistochemische LYVE-1-Färbung (**B, C, E** und **G**) der Lymphknoten der Kontroll- (**A-C**), IR-45- (**D** und **E**) und IR-120-Gruppe (**F** und **G**). SS = subkapsulärer Sinus, IS = Intermediärsinus, MS = Marksinus, F = Lymphfollikel, Pfeilspitze = LYVE-1⁺ Lymphgefäßnetzwerk, Sternchen = efferentes Lymphgefäß. **H-J:** HE-gefärbte Gewebeproben der Kontroll- (**H**), IR-45- (**I**) und IR-120-Gruppe (**J**). **K:** Die Analyse der Zellzahl innerhalb der Lymphknoten (Anzahl Zellkerne/mm²) zeigte eine signifikante Reduktion der Zellularität nach einer Ischämiezeit von 120 Minuten. **L:** Innerhalb des perinodalen Fettgewebes konnte keine signifikante Veränderung der Zellzahl beobachtet werden. Mittelwerte ± SEM, n = 8, *P < 0,05, **P < 0,001, n.s. = nicht signifikant. Maßstäbe: **A, B, D-G** = 300 µm, **C** = 40 µm, **H-J** = 60 µm. HE = Hämatoxylin und Eosin, I/R = Ischämie-Reperfusion, LYVE = lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor, VLK = vaskularisierte Lymphknoten. (Frueh et al., 2020)

Diese Beobachtungen korrelieren mit den Ergebnissen der HE-Färbungen. Hierbei ließ sich keine signifikante Abnahme der Zellzahl nach 45-minütiger Ischämie beobachten. Eine Ischämiezeit von 120 Minuten ging jedoch mit einer statistisch signifikanten Reduktion der Zellzahl um 58 % im Vergleich zur Kontrollgruppe einher (Abb. 12K). Im Gegensatz dazu kam es im perinodalen Fettgewebe zu keinen statistisch signifikanten Unterschieden der Zellularität zwischen der Kontrollgruppe, der IR-45-Gruppe und der IR-120-Gruppe (Abb. 12L).

6.2.3.2 Analyse des mikrovaskulären Netzwerks

Des Weiteren wurde der Effekt eines I/R-Schadens auf das mikrovaskuläre Netzwerk innerhalb der VLK-Pakete untersucht. Hierfür erfolgte eine Immunfluoreszenz-Färbung mit Hilfe des endothelialen Zellmarkers CD31 und die Analyse der (Blut-)Gefäßdichte innerhalb der Lymphknoten sowie im perinodalen Fettgewebe (Abb. 13).

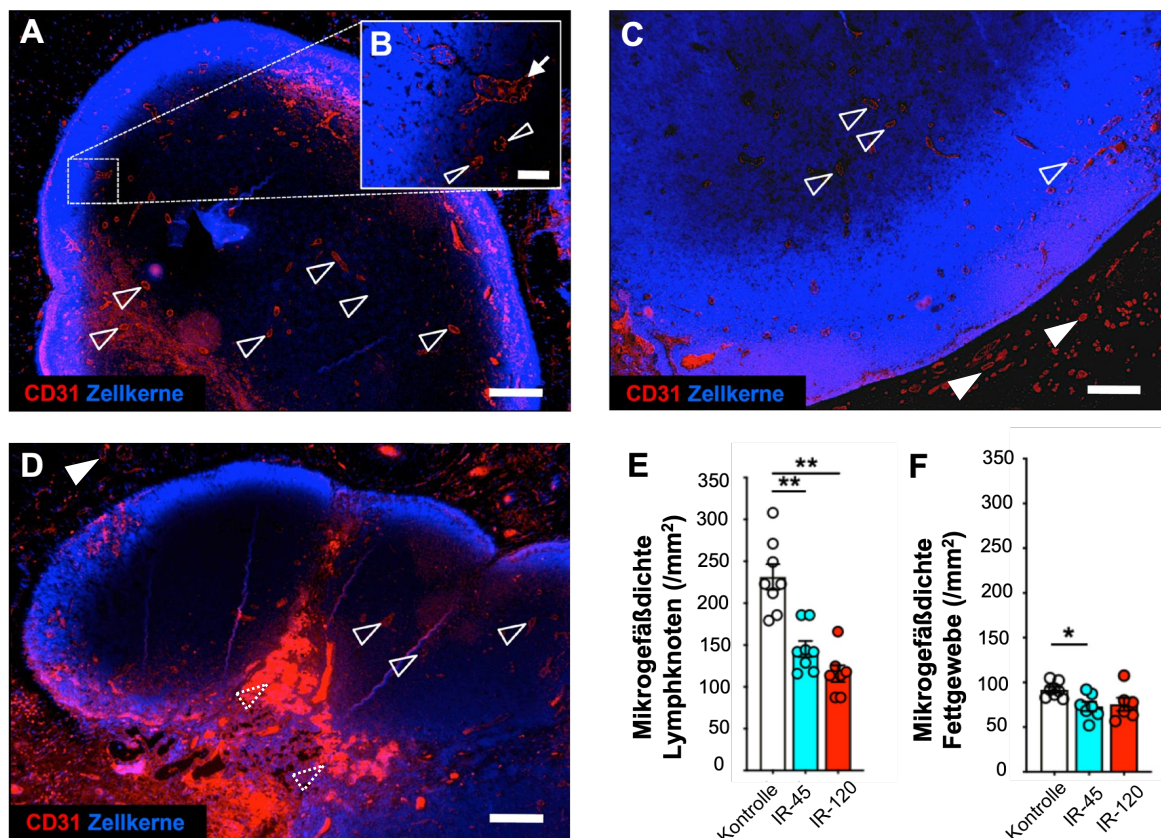


Abbildung 13: Mikrogefäßdichte der VLK-Lappen nach I/R-Schaden. **A-D:** Immunhistochemische Färbung der CD31⁺ Blutgefäße innerhalb der Lymphknoten (Pfeilspitzen) und des perinodalen Fettgewebes (weiße Pfeilspitzen) der VLK-Lappen der Kontroll- (**A** und **B**), IR-45- (**C**) und IR-120-Gruppe (**D**). **B** aus **A**: Subkapsuläre CD31⁺ Blutgefäße mit hochendothelialen Venolen (HEV, Pfeil) und Kapillaren (Pfeilspitzen). Gestrichelte Pfeile in **D** = lokale Hämorrhagien. **E:** Mikrogefäßdichte innerhalb der Lymphknoten (/mm²), Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 7-8$, ** $P < 0,001$. **F:** Mikrogefäßdichte innerhalb des perinodalen Fettgewebes (/mm²), Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 7-8$, * $P < 0,05$. Maßstäbe: **A**, **C** und **D** = 250 μ m, **B** = 40 μ m. I/R = Ischämie-Reperfusion, VLK = vaskularisierte Lymphknoten. (Frueh et al., 2020)

Die Dichte der CD31⁺ Mikrogefäße innerhalb der Lymphknoten der IR-45- und IR-120-Gruppe nahm im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ab (Abb. 13E). Verglichen zur Kontrollgruppe waren nach einer 45-minütigen Ischämiezeit im Durchschnitt 37 % weniger CD31⁺ Gefäße nachweisbar (Abb. 13E). Bei einer Ischämiedauer von 120 Minuten sank die Anzahl der CD31⁺ Blutgefäße auf 50 % des Ausgangswertes (Abb. 13E). Im Fettgewebe war die Anzahl der CD31⁺ Mikrogefäße im perinodalen Gewebe deutlich geringer als innerhalb der Lymphknoten (Abb. 13F). Gleichzeitig war auch der I/R-Schaden im Fettgewebe signifikant geringer ausgeprägt als im Lymphknoten. Es zeigte sich eine leichte, aber signifikante Abnahme der Dichte von CD31⁺ Blutgefäße nach 45-minütiger Ischämie (Abb. 13F), während in der IR-120-Gruppe keine signifikante Reduktion der Anzahl CD31⁺ Gefäße zu verzeichnen war (Abb. 13F).

6.2.3.3 Oxidativer Stress

Im Anschluss an die Analyse des mikrovaskulären Netzwerks wurde der Einfluss des I/R-Schadens auf die Zahl HO-1⁺ Zellen untersucht. Die Reperfusion geht mit der Ausbildung reaktiver Sauerstoffradikale einher. Als Folge wird das Hitzeschockprotein HO-1 vermehrt

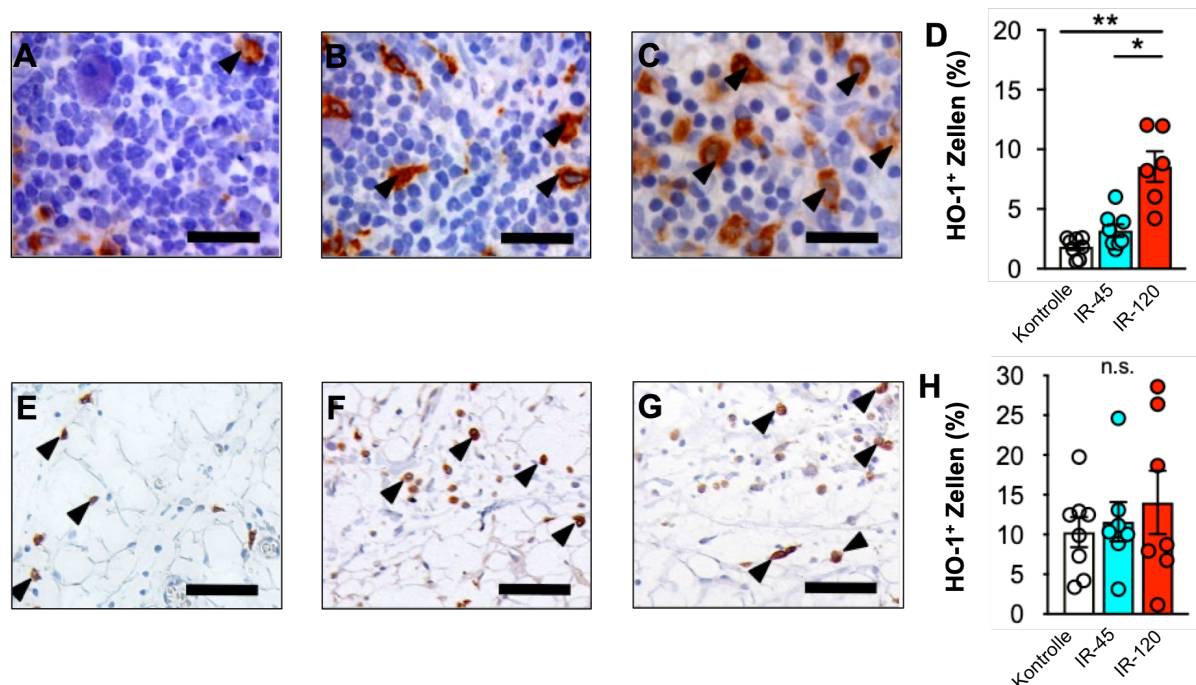


Abbildung 14: Analyse des oxidativen Stresses nach I/R-Schaden. **A-C** und **E-G**: Immunhistochemischer Nachweis HO-1⁺ Zellen (Pfeilspitzen) in der Kontroll- (**A** und **E**), IR-45- (**B** und **F**) und IR-120-Gruppe (**C** und **G**) innerhalb der Lymphknoten (**A-C**) sowie im perinodalen Fettgewebe (**E-G**). **D**: Die quantitative Analyse HO-1⁺ Zellen (%) in der Kontroll- (weiß), IR-45- (blau) und IR-120-Gruppe (rot) im Lymphknoten zeigte eine signifikante Zunahme nach einer Ischämiezeit von 120 Minuten. **H**: Im perinodalen Fettgewebe konnte keine signifikante Veränderung der HO-1⁺ Zellen nachgewiesen werden. Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 8$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, n.s. = nicht signifikant. Maßstäbe: **A-C** = 25 μ m, **E-G** = 50 μ m. I/R= Ischämie-Reperfusion, HO = Hämoxxygenase. (Frueh et al., 2020)

exprimiert, welches in der vorliegenden Arbeit als Marker für den oxidativen Stress innerhalb der VLK-Pakete diente (Abb. 14).

Die immunhistochemischen Analysen zeigten einen signifikanten Anstieg der HO-1-Expression innerhalb der Lymphknoten der IR-120-Gruppe im Vergleich zur IR-45- und zur Kontrollgruppe (Abb. 14A-D). Die leichte Steigerung der HO-1-Expression der IR-45-Gruppe (Abb. 14B) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 14A) war statistisch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu kam es im perinodalen Fettgewebe weder in der IR-120- noch in der IR-45-Gruppe zu einer signifikanten Steigerung der HO-1-Expression (Abb. 14E-H).

6.2.3.4 Zellproliferation und Apoptose

Weiterhin wurde der Einfluss eines I/R-Schadens auf die Zellproliferation und Apoptose untersucht. Als Proliferationsmarker diente PCNA (Abb. 15), wohingegen Casp-3 als Marker für den programmierten Zelltod eingesetzt wurde (Abb. 16).

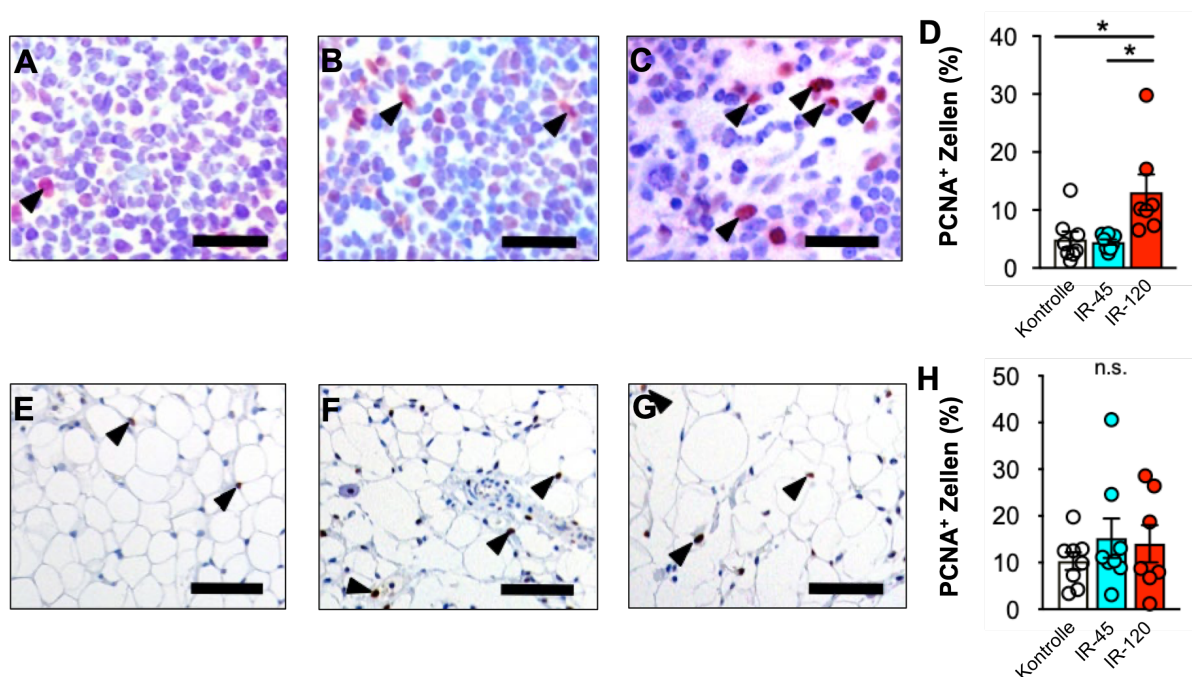


Abbildung 15: Analyse der Zellproliferation nach I/R-Schaden. **A-C** und **E-G**: Immunhistochemischer Nachweis PCNA⁺ Zellen (Pfeilspitzen) in der Kontroll- (**A** und **E**), IR-45- (**B** und **F**) und IR-120-Gruppe (**C** und **G**) innerhalb der Lymphknoten (**A-C**) sowie im perinodalen Fettgewebe (**E-G**). **D**: Die quantitative Analyse von PCNA⁺ Zellen (%) in der Kontroll- (weiß), IR-45- (blau) und IR-120-Gruppe (rot) im Lymphknoten zeigte einen signifikanten Anstieg nach 120-minütiger Ischämiezeit. **H**: Im perinodalen Fettgewebe waren die Anteile der PCNA⁺ Zellen statistisch nicht signifikant unterschiedlich. Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 8$, $*P < 0,05$, n.s. = nicht signifikant. Maßstäbe: **A-C** = 25 μ m, **E-G** = 50 μ m. I/R = Ischämie-Reperfusion, PCNA = proliferating cell nuclear antigen. (Frueh et al., 2020)

Nach einer Ischämiezeit von 45 Minuten war innerhalb der Lymphknoten keine signifikante Erhöhung von PCNA⁺ (Abb. 15B und D) und Casp-3⁺ Zellen (Abb. 16B und D) zu beobachten. Im Vergleich zur Kontroll- und IR-45-Gruppe wiesen die Lymphknoten der IR-120-Gruppe eine signifikant erhöhte Anzahl von PCNA⁺ (Abb. 15C und D) und Casp-3⁺ Zellen

(Abb. 16C und D) auf. Unter mikroskopischer Sicht konnte zellmorphologisch beurteilt werden, dass es sich bei der Mehrzahl proliferierender und apoptotischer Zellen um Lymphozyten handelte. Im Gegensatz dazu kam es im perinodalen Fettgewebe in keiner der Ischämiegruppen zu einer signifikanten Hochregulierung der Zellproliferation und der Apoptose im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 15E-H, Abb. 16E-H).

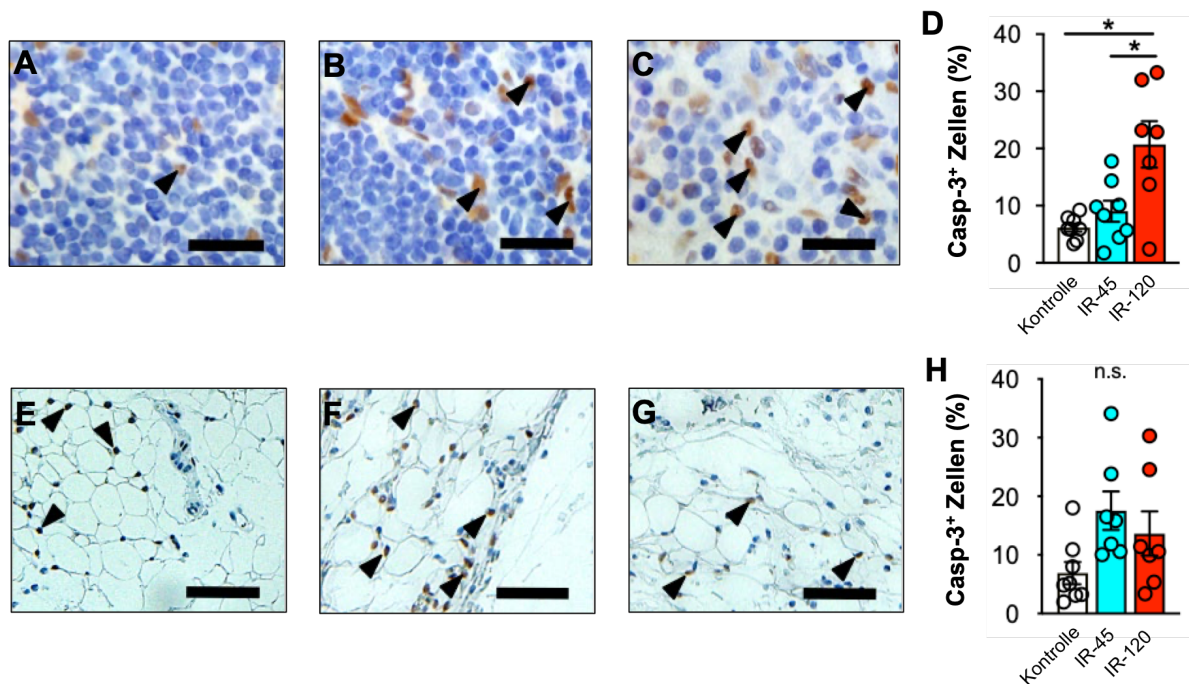


Abbildung 16: Analyse der Apoptose nach I/R-Schaden. **A-C** und **E-G:** Immunhistochemischer Nachweis Casp-3⁺ Zellen (Pfeilspitzen) in der Kontroll- (**A** und **E**), IR-45- (**B** und **F**) und IR-120-Gruppe (**C** und **G**) innerhalb der Lymphknoten (**A-C**) sowie im perinodalen Fettgewebe (**E-G**). **D:** Die quantitative Analyse Casp-3⁺ Zellen (%) in den Lymphknoten der Kontroll- (weiß), IR-45- (blau) und IR-120-Gruppe (rot) zeigte eine signifikante Zunahme nach einer 120-minütigen Ischämiezeit. **H:** Im perinodalen Fettgewebe konnte hingegen keine signifikante Veränderung Casp-3⁺ Zellen beobachtet werden. Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 8$, $*P < 0,05$, n.s. = nicht signifikant. Maßstäbe: **A-C** = 25 μ m, **E-G** = 50 μ m. I/R = Ischämie-Reperfusion, Casp-3 = Cleaved Caspase-3. (Frueh et al., 2020)

6.2.3.5 Immunreaktion

Die Aktivierung des Immunsystems nach einem I/R-Schaden wurde anhand des Nachweises MPO⁺ neutrophiler Granulozyten und CD68⁺ Monozyten und Makrophagen beurteilt. Mit fortschreitender Ischämiezeit zeigte sich eine zunehmende Infiltration von Immunzellen innerhalb der Lymphknoten (Abb. 17A-D, Abb. 18A-D).

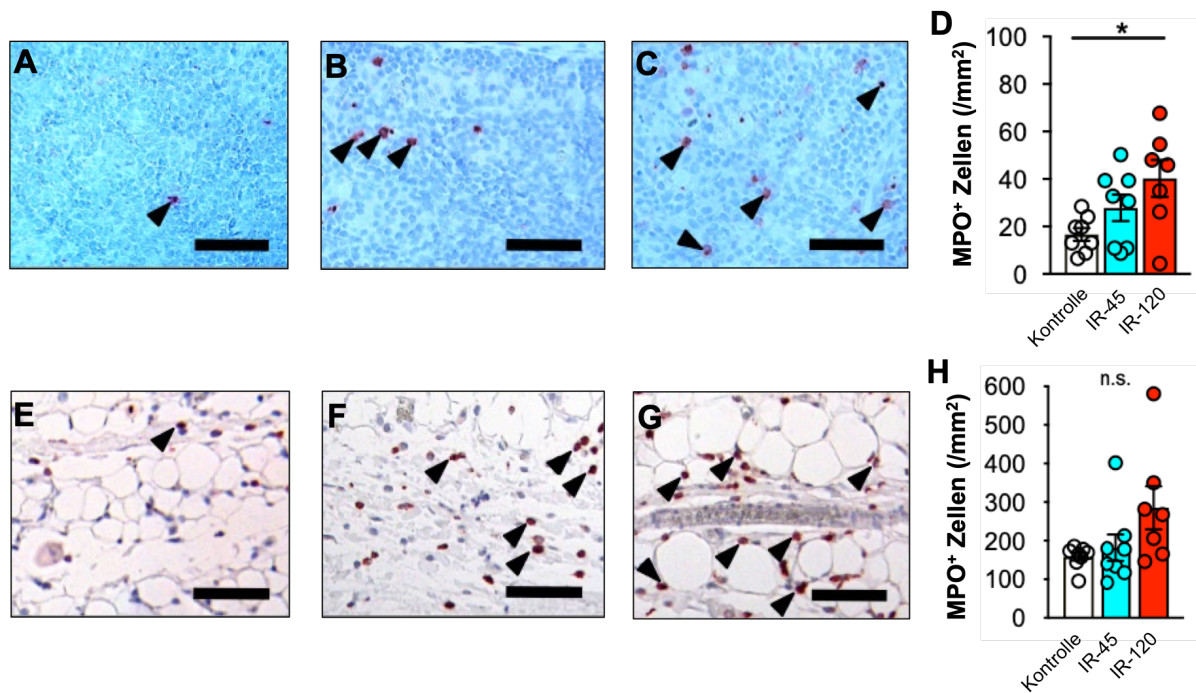


Abbildung 17: Analyse der Entzündungsreaktion nach I/R-Schaden. **A-C** und **E-G:** Immunhistochemischer Nachweis von MPO⁺ Zellen (Pfeilspitzen) in der Kontroll- (**A** und **E**), IR-45- (**B** und **F**) und IR-120-Gruppe (**C** und **G**) innerhalb der Lymphknoten (**A-C**) sowie im perinodalen Fettgewebe (**E-G**). **D:** Die quantitative Analyse der MPO⁺ Zellen (/mm²) in den Lymphknoten der Kontroll- (weiß), IR-45- (blau) und IR-120-Gruppe (rot) zeigte ausschließlich einen signifikanten Anstieg in der IR-120-Versuchsgruppe. **H:** Im perinodalen Fettgewebe konnte unabhängig von der Ischämiezeit keine signifikante Veränderung von MPO⁺ Zellen beobachtet werden. Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 8$, $*P < 0,05$, n.s. = nicht signifikant. Maßstäbe = 50 μ m. I/R = Ischämie-Reperfusion, MPO = Myeloperoxidase. (Frueh et al., 2020)

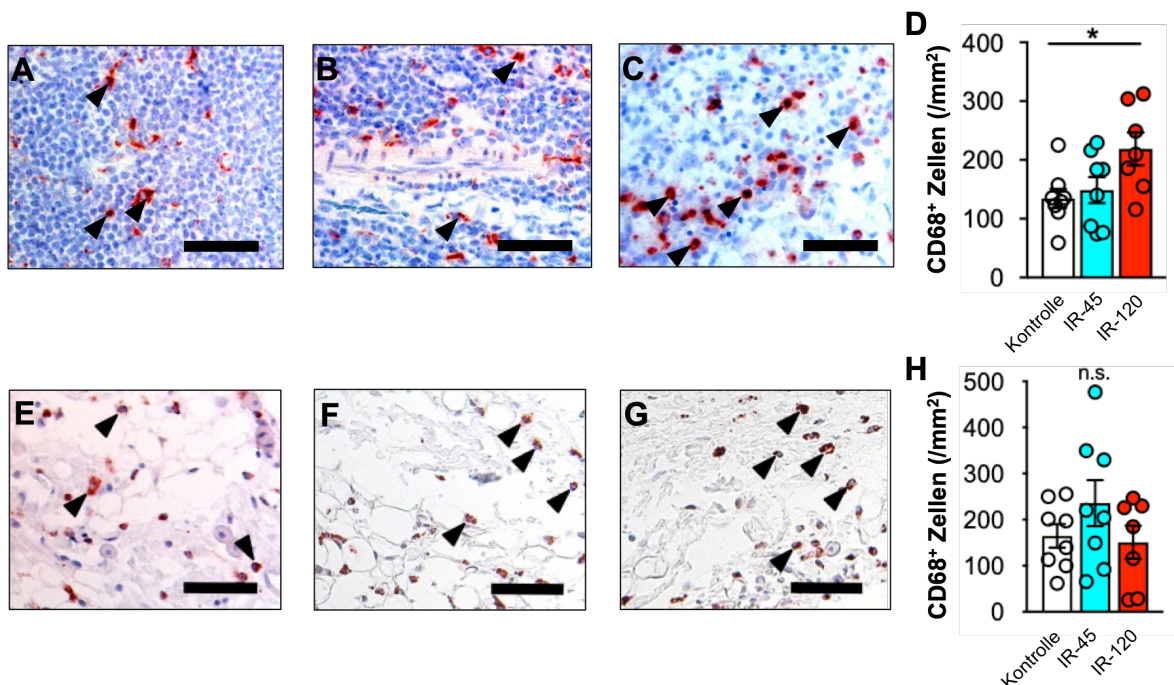


Abbildung 18: Analyse der Entzündungsreaktion nach I/R-Schaden. **A-C** und **E-G:** Immunhistochemischer Nachweis von CD68⁺ Zellen (Pfeilspitzen) in der Kontroll- (**A** und **E**), IR-45- (**B** und **F**) und IR-120-Gruppe (**C** und **G**) innerhalb der Lymphknoten (**A-C**) sowie im perinodalen Fettgewebe (**E-G**). **D:** Die quantitative Analyse der CD68⁺ Zellen (/mm²) in den Lymphknoten der Kontroll- (weiß), IR-45- (blau) und IR-120-Gruppe (rot) zeigt eine signifikante Zunahme der Immunzellinfiltration. **H:** Im perinodalen Fettgewebe konnte keine statistisch signifikante Veränderung in der Anzahl CD68⁺ Zellen beobachtet werden. Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 8$, $*P < 0,05$, n.s. = nicht signifikant. Maßstäbe = 50 μ m. I/R = Ischämie-Reperfusion. (Frueh et al., 2020)

Während eine 45-minütige Ischämiezeit innerhalb der Lymphknoten zu keinem statistisch signifikanten Effekt führte, resultierte eine Ischämiezeit von 120 Minuten in einer signifikanten Zunahme von MPO⁺ neutrophilen Granulozyten (Abb. 17C und D) und CD68⁺ Makrophagen (Abb. 18C und D). Das perinodale Fettgewebe zeigte auch hinsichtlich der Infiltration von Immunzellen keine signifikante Steigerung in den jeweiligen Ischämiegruppen (Abb. 17E-H, Abb. 18E-H).

6.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden die Eigenschaften des nanopartikulären Kontrastmittels AGuIX im Vergleich zum Gadolinium-haltigen Kontrastmittel Gd-DOTA für die MR-Lymphographie untersucht und die Bildgebung mit AGuIX im Rahmen eines chronischen Lymphödems analysiert. Dabei wurden folgende Erkenntnisse gewonnen:

1. Beide untersuchten Kontrastmittel zeichneten sich durch einen frühen Anreicherungsspeak innerhalb des lymphatischen Systems aus. Im Vergleich zum klinisch etablierten Dotarem resultierte die AGuIX-Injektion jedoch in einer stärkeren und länger anhaltenden Kontrastierung der Lymphgefäße und Lymphknoten. Während Dotarem bereits nach 45 Minuten vollständig ausgewaschen war, konnte AGuIX auch noch 90 Minuten nach Injektion innerhalb des Lymphsystems nachgewiesen werden. Außerdem führte die Injektion von Dotarem sowohl im Lymphgefäß- als auch im Venenkreislauf zu einer Anreicherung des extrazellulären Kontrastmittels und erschwerte so die Differenzierung beider Systeme, während die AGuIX-Injektion ausschließlich in einer Anreicherung und Kontrastierung des Lymphsystems resultierte.
2. Die Verwendung des nanopartikulären Kontrastmittels AGuIX zur kontrastmittelgestützten MR-Lymphographie erlaubte eine detaillierte Darstellung eines neuen lymphatischen Kapillarnetzwerks 6 Wochen nach Lymphadenektomie. Interessanterweise konnte ein Rückgang dieser Kollateralkreisläufe 10 und 14 Wochen postoperativ beobachtet werden.
3. Die Induktion eines chronischen Lymphödems durch Lymphadenektomie und postoperative Bestrahlung des Operationsgebietes resultierte in einer initial starken Zunahme der Pfotendicke, welche sich im Verlauf als regredient erwies, jedoch auch 14 Wochen postoperativ signifikant erhöht blieb. Histologisch konnte eine Zunahme der Epidermisschicht sowie eine signifikante Bindegewebsfibrose beobachtet werden. Immunhistochemisch zeigte sich eine signifikante Immunzellinfiltration sowie eine

kompensatorische Zunahme der Lymphgefäßdichte in den entnommenen Gewebeproben.

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen und zellulären Veränderungen nach Induktion eines I/R-Schadens von VLK analysiert. Dabei wurden folgende Ergebnisse gefunden:

1. Als Merkmal der Ischämie zeigte die photoakustische Bildgebung eine gleichbleibende relative Hämoglobinkonzentration innerhalb der Lymphknoten nach Anlage der Gefäßklemmen, während sich die Sauerstoffsättigung signifikant reduzierte. Die Reperfusion äußerte sich durch einen raschen Anstieg der Sauerstoffsättigung zurück auf den Ausgangswert. Nach Abnahme der Gefäßklemmen konnte als Zeichen des fehlenden venösen Abflusses ein dilatiertes Gefäßnetzwerk mit kapsulären Hämorrhagien beobachtet werden.
2. Die Western Blot-Analysen zeigten eine signifikante Zunahme der Expression von VEGF-D innerhalb der Lymphknoten sowie im perinodalen Fettgewebe in der IR-120-Gruppe. Eine Hochregulierung von VEGF-C konnte in keiner der Versuchsgruppen beobachtet werden. Während die Expression von VEGF-A innerhalb der Lymphknoten in der IR-120-Gruppe signifikant erhöht war, konnte dieser Effekt im perinodalen Fettgewebe nicht beobachtet werden.
3. Die Induktion eines I/R-Schadens resultierte sowohl in der IR-45- als auch in der IR-120-Gruppe in einer signifikanten Abnahme des mikrovaskulären Netzwerks innerhalb der Lymphknoten. Obwohl sich in den Western Blot-Analysen eine Aktivierung der eNOS in der IR-120-Gruppe zeigte, konnte in den durchgeführten immunhistochemischen Analysen keine erhöhte Dichte des mikrovaskulären Gefäßnetzwerks beobachtet werden.
4. Eine Ischämiezeit von 120 Minuten resultierte in der vorliegenden Arbeit in einer signifikanten Reduktion der Zellularität sowie in einem partiellen Untergang der physiologischen Lymphknotenarchitektur. Immunhistochemisch konnte zudem eine erhöhte Expression von HO-1 in der IR-120-Gruppe beobachtet werden. Weiterhin konnte eine signifikante Steigerung proliferierender und apoptotischer Zellen nach 120-minütiger Ischämie nachgewiesen werden. Schließlich konnte auch mit zunehmender Ischämiezeit eine signifikante Immunzellinfiltration beobachtet werden.
5. Mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Analysen der VLK-Pakete fanden sich Hinweise für die Resistenz des perinodalen Fettgewebes gegenüber einem I/R-Schaden im Vergleich zu den Lymphknoten. Entsprechend wurde weder in der IR-45- noch in der IR-120-Gruppe eine Abnahme

der Zellularität im perinodalen Fettgewebe beobachtet. Außerdem fanden sich keine Hinweise auf eine vermehrte Immunzellinfiltration, eine Erhöhung des oxidativen Stresses sowie eine veränderte Anzahl proliferierender und apoptotischer Zellen.

7. Diskussion

7.1 Modelle

7.1.1 Lymphödem-Modell

Die Induktion eines chronischen Lymphödems bei Nagetieren ist technisch anspruchsvoll und setzt eine invasive und vollständige Ablation des Lymphsystems voraus (Frueh et al., 2016). **Im ersten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit wurde hierfür eine Kombination aus radikaler inguinaler und poplitealer Lymphadenektomie gewählt, gefolgt von einer Bestrahlung des Operationsgebietes. Diese Methode wurde bereits in mehreren Studien angewendet und erwies sich als besonders effektiv zur Induktion eines chronischen Lymphödems (Kanter et al., 1990; Lee-Donaldson et al., 1999; Oashi et al., 2012). Um eine spontane lymphatische Regeneration zu verhindern, wurde in bisherigen Forschungsarbeiten eine zirkuläre Hautexzision ohne direkten Hautverschluss (Haut wird auf Faszie gesteppt) durchgeführt (Oashi et al., 2013; Bramos et al., 2016). Obwohl diese dermo-epidermale Blockade zur Hemmung der lymphatischen Reorganisation als besonders effektiv gilt, berichteten Wang & Zong (1985) und Kanter et al. (1990) über eine vergleichbar hohe Sterberate der Versuchstiere, welche sie insbesondere auf Wundinfektionen zurückführten.

In der vorliegenden Arbeit konnten charakteristische Merkmale des chronischen Lymphödems, wie eine Bindegewebsfibrose, eine Immunzellinfiltration und eine Zunahme der Lymphgefäßdichte, 14 Wochen nach der Operation durch histopathologische Untersuchungen nachgewiesen und so die Validität des vorgestellten Lymphödem-Modells verifiziert werden. Um ein translational möglichst aussagekräftiges Modell zu verwenden, wurde die Haut direkt verschlossen und die Bestrahlung zur Inhibition der spontanen lymphatischen Regeneration eingesetzt. Entsprechend kam es bei der Anwendung dieser Methode postoperativ bei keinem der Versuchstiere zu Wundheilungsstörungen oder Wundinfektionen.

7.1.2 I/R der VLK-Lappen

Das chronische Lymphödem nach einer Tumorthherapie ist ein weit verbreitetes Leiden mit unterschätzter psychischer und sozioökonomischer Belastung (Carter et al., 2018). Die Erforschung und Entwicklung mikrochirurgischer Verfahren in den vergangenen Jahrzehnten zielte darauf ab, den physiologischen Lymphabfluss wiederherzustellen. Dabei werden die besten (Langzeit-)Ergebnisse durch die LVA (Koshima et al., 2012; Gupta et al., 2021; Verhey

et al., 2022) und die VLKT (Becker et al., 2006; Saaristo et al., 2012; Ito & Suami, 2014; Ward et al., 2021) erzielt.

Aufgrund der zunehmenden Sklerose der Lymphgefäße bei PatientInnen mit chronischem Lymphödem ist der Einsatz der LVA in späten Stadien des Lymphödems eingeschränkt (Boccardo et al., 2013; Schaverien et al., 2018). Darüber hinaus ist das Ergebnis der LVA maßgeblich vom Venenstatus der PatientInnen abhängig (Pain et al., 2005; Sachanandani et al., 2018). Bei PatientInnen mit chronischen Venenerkrankungen ermöglicht die VLKT die Wiederherstellung des physiologischen Lymphabflusses und eine deutliche Reduktion der Symptome (Huang et al., 2016). In einer Übersichtsarbeit von Scaglioni et al. (2018) wurden bei 88 % der PatientInnen nach Transplantation eines supraklavikulären VLK-Lappens und bei 70 % der PatientInnen nach Transposition der Leisten-Lymphknoten von einer deutliche Abnahme lymphödemtypischer Beschwerden berichtet. In einer weiteren Studie von Becker et al. (2006) wurden 24 Patientinnen mit Lymphödem der oberen Extremität behandelt, welches infolge der Therapie eines Mammakarzinoms auftrat. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass sich das Volumen der betroffenen Extremität nach VLKT bei 42 % der Patientinnen normalisierte, während bei weiteren 50 % eine signifikante Besserung einsetzte. Akita et al. (2015) verglichen zudem den Einsatz der LVA und der supraklavikulären VLKT bei 64 PatientInnen mit fortgeschrittenem Lymphödem der unteren Extremität. Dabei zeigte sich eine Besserung der lymphatischen Pumpfunktion bei 23 % der PatientInnen nach LVA und bei 54 % der PatientInnen nach VLKT. Obwohl die Effizienz der VLKT mehrfach gezeigt wurde, bleibt der zugrundeliegende Mechanismus der Wiederherstellung des Lymphabflusses weiterhin Thema der aktuellen Forschung. Cheng et al. (2014) konnten sowohl experimentell als auch klinisch eine Aufnahme des injizierten ICG über die Lymphknoten in das Venensystem nach VLKT nachweisen. So vermuten auch Ito et al. (2016), dass die Lymphknoten eine „Pumpfunktion“ übernehmen, um die Lymphe über intranodale lymphovenöse Verbindungen in den Blutkreislauf zurückzuführen. Zudem schließen sie aus ihren Ergebnissen, dass eine ausreichende Menge an Lymphkapillaren, welche sich im perinodalen Fettgewebe befinden, für den Erfolg einer VLKT essenziell ist. In Einklang mit der Theorie der Pumpfunktion beobachteten Ngyuen et al. (2016) eine positive Korrelation zwischen der Anzahl an Lymphknoten im transplantierten VLK-Lappen und dem lymphatischen Transportindex. In einer jüngeren Studie widmeten sich Gustafsson et al. (2018) der Frage, ob der Erfolg einer Lymphknotentransplantation von der Anzahl der transplantierten Lymphknoten pro VLK Lappen abhängt. Die Ergebnisse ihrer Studie zeigten eine bessere Pumpfunktion der Transplantation bei denjenigen PatientInnen, denen 3-4 oder 5-8 Lymphknoten pro VLK-Lappen transplantiert wurden, als bei den PatientInnen, bei denen die Transplantation von nur 1-2 Lymphknoten pro VLK-Lappen erfolgte. Entsprechend wiesen PatientInnen mit mindestens drei transplantierten Lymphknoten eine signifikant größere

Reduktion des Lymphödems auf als PatientInnen mit einer geringeren Anzahl transplanteder Lymphknoten. Das postoperative Ergebnis war dabei in der Versuchsgruppe mit 5-8 transplanteder Lymphknoten nicht signifikant besser als in der Versuchsgruppe mit 3-4 Lymphknoten pro transplantedem VLK-Paket. Gustafsson et al. (2018) postulieren daher eine Mindestanzahl von drei Lymphknoten pro Lappen, um ein zufriedenstellendes Ergebnis mit der VLKT zu erzielen.

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde der kurzzeitige Effekt eines I/R-Schadens der VLK-Pakete untersucht. Bei der VLKT beträgt die intraoperative Ischämiezeit der Transplantate zwischen 45 und 120 Minuten. Dabei stellt die repetitive Überprüfung der Anastomosen bei Kleintieren eine große Herausforderung dar, weshalb in der vorliegenden Arbeit ein I/R-Modell der VLK-Pakete ohne freie Transplantation gewählt wurde. Obwohl das Verständnis der molekularbiologischen Veränderungen und der Toleranz des Lymphsystems gegenüber einem I/R-Schaden essenziell für den Erfolg einer VLKT ist, ist über den Effekt eines I/R-Schadens im Rahmen der VLKT bislang wenig bekannt. Nach der zirkulären Präparation des axillären Lymphknoten-Fett-Paketes wurde in der vorliegenden Arbeit die Ischämie durch Anlage mikrovaskulärer Klemmen an die zu- und abführenden Gefäße erreicht. Um einen klinischen Bezug herzustellen, wurde entsprechend den obigen Ausführungen eine Ischämiezeit von 45 Minuten (IR-45-Gruppe) oder 120 Minuten (IR-120-Gruppe) eingehalten. Dieser Ansatz hat sich in anderen Studien (Chafin et al., 1999; Yang et al., 2018) bewährt, um die zellulären Veränderungen zu analysieren und eine kritische Ischämiezeit für das Lymphsystem zu bestimmen. So konnte eine höhere Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten mit früheren Studien gewährleistet werden. Die kritische Ischämiezeit verschiedener Organe und Gewebearten wurde bereits mehrfach beschrieben (Kalogeris et al., 2012). Dabei ist die Toleranz gegenüber einem I/R-Schaden von verschiedenen Faktoren, beispielsweise dem Grundumsatz und der Umgebungstemperatur, abhängig (Prucz & Friedrich, 2014; Schlegel et al., 2014). Bei der VLKT handelt es sich um eine sogenannte *Vascularized Composite Allotransplantation* (VCA), bei der ein zusammenhängender, vaskularisierter Gewebeverband aus unterschiedlichen Gewebearten einer Region entnommen und extraanatomisch bei demselben Patienten oder derselben Patientin transplantiert wird. Daher müssen bei zusammengesetzten Geweben die Ischämiezeiten der einzelnen Gewebearten berücksichtigt werden. Zudem erfordert der Einsatz vaskularisierter Gewebetransplantationen neue Forschungsansätze, um das Ausmaß eines I/R-Schadens beurteilen zu können (Messner et al., 2016).

Das in der vorliegenden Arbeit gewählte I/R-Modell der VLK-Pakete weist einige Limitationen auf. Zunächst wurde eine Reperusionszeit von 24 Stunden gewählt, weshalb keine Aussagen zu zellulären und molekularen Veränderungen bei längeren Reperusionszeiten getroffen werden können. Zudem resultiert der intraoperative I/R-Schaden

bei der VLKT aus der freien Gewebetransplantation. In der vorliegenden Arbeit wurde der I/R-Schaden durch *in-situ* Anlage von Gefäßklemmen ohne Transplantation des VLK-Lappens induziert. Angesichts des experimentellen Versuchsaufbaus und des hohen Komplikationsrisikos der Gefäßanastomosen bei den Versuchstieren bei einer VLKT hat sich das verwendete Tiermodell zur Analyse des kurzzeitigen Effektes auf einen I/R-Schaden der VLK-Pakete jedoch sehr gut bewährt.

7.2 Untersuchungstechniken

7.2.1 MR-Lymphographie

Bildgebende Verfahren sind für Diagnostik und Therapieplanung von lymphatischen Erkrankungen unabdingbar. Dabei können verschiedene Verfahren eingesetzt werden. **Im ersten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit kam die kontrastmittelgestützte MR-Lymphographie mit einer Feldstärke von 9.4 T als nicht-invasive Bildgebung zum Einsatz. Mit Hilfe der verwendeten Kontrastmittel war eine hochauflösende Darstellung des Lymphsystems und des umliegenden Gewebes möglich.

Lange Zeit galten die konventionelle Lymphographie und die Lymphoszintigraphie als Goldstandard, um pathologisch veränderte Lymphgefäße und Lymphknoten darzustellen (Guermazi et al., 2003; Yoshida et al., 2016). Darüber hinaus werden beide Techniken nach der aktuellen S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie des chronischen Lymphödems als diagnostische Mittel der ersten Wahl empfohlen (Wilting et al., 2017). Sowohl die konventionelle Lymphographie als auch die Lymphoszintigraphie sind invasiv und gehen mit einer erheblichen Strahlenbelastung für die PatientInnen einher. Ein weiterer Nachteil beider Methoden stellt die eingeschränkte Qualität der Bilder dar, welche die Diagnostik erschweren kann. Im Gegensatz dazu ist die MR-Lymphographie eine nicht-invasive Methode zur Darstellung anatomischer und physiologischer Anomalien im Lymphsystem ohne Strahlenbelastung für die PatientInnen, die auch zur Erstellung eines Therapieplans dienen kann (Lohrmann et al., 2009). Die MR-Lymphographie konnte in der Vergangenheit bei verschiedenen pathologischen Veränderungen, wie beispielsweise dem Mammakarzinom (Lu et al., 2013; Park et al., 2023), dem chronischen Lymphödem (Lohrmann et al., 2007; Rane et al., 2013; Cellina et al., 2021) und der diffusen Lymphangiomatosis (Seckeler et al., 2020), eingesetzt werden. Darüber hinaus erlauben Innovationen im Rahmen der Kontrastmittelentwicklung Darstellungen, die sich durch verbesserte Spezifität und Sensitivität auszeichnen (Kobayashi et al., 2003; Rohrer et al., 2005; Benjamin et al., 2023). Die MR-

Lymphographie bietet zahlreiche Vorteile gegenüber anderen bildgebenden Verfahren. So erlaubt sie eine größere zeitliche und räumliche Auflösung als Radionukleotid-basierte Lymphographien und ist auch für hochauflösende dreidimensionale Untersuchungen kleinster Lymphgefäße geeignet. Eine Differenzierung zwischen Venen und Lymphgefäßen ist besonders im Rahmen der präoperativen Diagnostik essenziell. Dank entsprechender Kontrastmittel ist eine solche Differenzierung bei der MR-Lymphographie möglich (Gennaro et al., 2017). Sie liefert sowohl im Lymphknoten als auch in den Lymphgefäßen präzisere Informationen über strukturelle und funktionelle Anomalien (Liu et al., 2010; Notohamiprodjo et al., 2012) und erlaubt im Gegensatz zu anderen bildgebenden Verfahren eine dreidimensionale qualitative und quantitative Darstellung des oberflächlichen und des tiefen Lymphsystems einer gesamten Extremität (Pons et al., 2019). Diese zusätzlichen Informationen erlauben nicht nur die Differenzierung zwischen Lymphödem und sonstiger Ursachen peripherer Ödeme, sondern verbessern das Verständnis für die pathophysiologischen Veränderungen, die dem chronischen Lymphödem zugrunde liegen (Liu et al., 2009). Dies ist insbesondere für eine adäquate präoperative Vorbereitung erforderlich, um mit der Auswahl des richtigen OP-Verfahrens für PatientInnen je nach Schweregrad der Erkrankung ein zufriedenstellendes Ergebnis zu erhalten.

Zusammenfassend ist die in der vorliegenden Arbeit gewählte kontrastmittelgestützte MR-Lymphographie eine valide Methode zur präzisen Darstellung des Lymphsystems und des umliegenden Gewebes. Sie ist weniger invasiv als andere bildgebende Verfahren und weist, beispielsweise im Vergleich zur konventionellen Lymphographie, deutlich geringere Komplikationsraten auf. Trotz der zahlreichen Vorteile der MR-Lymphographie bestehen einige Einschränkungen im Vergleich zu anderen bildgebenden Verfahren, wie beispielsweise der ICG-Lymphographie. So ermöglicht die MR-Lymphographie eine rein statische Darstellung des Lymphsystems. Durch repetitive Scans, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, kann zwar eine dynamische Analyse des Lymphflusses und der Transportkapazität der Lymphgefäße erfolgen (Liu et al., 2009), jedoch erlaubt die ICG-Lymphographie eine Flowmessung des Lymphabflusses in Echtzeit (Ogata et al., 2007). Sie bietet zudem unter anderem präzise Informationen über die Lokalisation gesunder Lymphgefäße und Kollateralkreisläufe und das Vorhandensein eines *dermal backflow* (Yamamoto et al., 2011). Im Vergleich zur MR-Lymphographie kann die ICG-Lymphographie zudem intraoperativ angewandt werden. So kommen mehrere AutorInnen zu dem Schluss, dass sich die Kombination dieser beiden Verfahren im Rahmen des prä- und intraoperativen Managements als besonders effektiv erweist (Mihara et al., 2012; Pons et al., 2019).

Eine Limitation der vorliegenden Arbeit ist, dass sämtliche Ergebnisse auf Basis von tierexperimentellen Versuchen durchgeführt wurden, wodurch eine direkte Translation auf den Menschen nicht möglich ist. So wurde die MR-Lymphographie in einem speziell für Kleintiere

entwickelten MR-Tomographen bei einer ultrahohen Feldstärke von 9.4 T durchgeführt. Im klinischen Umfeld beträgt die Feldstärke der MR-Bildgebung in der Regel zwischen 1.5 T und 3 T. Durch höhere Feldstärken lässt sich die räumliche und zeitliche Auflösung und somit die Bildqualität erheblich verbessern, was sich in der vorliegenden Arbeit in einer hochauflösenden Darstellung des lymphatischen Systems zeigte.

7.2.2 Pfortendickemessung

Um das chronische Lymphödem bei kleinen Versuchstieren zu quantifizieren, stehen verschiedene Methoden zur Auswahl. Dazu gehören unter anderem die Messung des Umfangs und des Volumens der betroffenen Extremität mittels Plethysmographie oder Wasserverdrängung (Kaulesar Sukul et al., 1993; Megens et al., 2001). Zudem stehen weitere Methoden zur Verfügung, beispielsweise die Lymphabflussanalyse und die 3D-Volumetrie mittels μ CT oder MRT (Frueh et al., 2016).

Im ersten Studienabschnitt wurde die wöchentliche Pfortendickemessung mittels elektronischer Schieblehre über einen Zeitraum von 14 Wochen zur Quantifizierung des chronischen Lymphödems gewählt. Die Schieblehren-basierte Pfortendickemessung stellt eine einfache und valide Möglichkeit zur Quantifizierung des chronischen Lymphödems dar. Durch die repetitiven Messungen konnte zudem eine dynamische Analyse des Lymphödems erfolgen. Innerhalb der ersten Tage und Wochen kam es zu einer starken Schwellung der operierten Pforten, welche über den beobachteten Zeitraum leicht rückläufig war, allerdings auch nach 12 Wochen weiterhin zu verzeichnen war. Diese Ergebnisse reproduzieren die Arbeiten von Kanter et al. (1990) und Slavin et al. (1999), die ebenfalls eine unmittelbar postoperative starke Schwellung der betroffenen Extremität beobachteten, welche sich im weiteren zeitlichen Verlauf regredient zeigte. Die Autoren nahmen an, dass die deutliche Schwellung der Hinterlaufpforten in den ersten Wochen nach Induktion des chronischen Lymphödems vor allem auf die chirurgische Ablation des Lymphgefäßsystems zurückzuführen ist. Die anfallende Lymphe kann im zeitlichen Verlauf über die neu gebildeten Kollateralkreisläufe und andere Kompensationsmechanismen abtransportiert werden. Die anhaltende Schwellung nach dem dreimonatigen Beobachtungszeitraum ist daher möglicherweise auf die lymphödemtypischen Veränderungen, wie z. B. die Bindegewebsfibrose, zurückzuführen, welche durch histologische Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnten.

7.2.3 Photoakustik und Ultraschall

Die Phototakustik stellt eine neuartige und nicht-invasive Möglichkeit der Bildgebung dar, die es erlaubt, optische Signale in detektierbare Schallwellen umzuwandeln. Durch die hohe Auflösung und die hohe Eindringtiefe besitzt diese Technologie ein großes Potenzial für die klinische Anwendung (Steinberg et al., 2019).

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Technik der Photoakustik genutzt, um das verwendete I/R-Modell zu verifizieren. Dabei zeigte sich unter Ischämie eine gleichbleibende Reduktion der Sauerstoffsättigung der VLK-Lappen, welche auf eine hohe Zuverlässigkeit des Modells hindeutet. Mittels Photoakustik kann die totale und relative Hämoglobinkonzentration und die mittlere Sauerstoffsättigung innerhalb eines Gewebes analysiert werden (Nandy et al., 2018), womit sie für die Diagnose zahlreicher Pathologien eingesetzt werden kann. So findet die photoakustische Bildgebung Verwendung für das Screening von Brustkrebspatientinnen (Toi et al., 2017), zur Diagnose von dermatologischen Erkrankungen (Kukk et al., 2023), zur intraoperativen Bildgebung (Lediju Bell et al., 2015), zur Darstellung der Gehirnfunktion (Yang & Wang, 2008) und zur Darstellung von Tumormetastasen innerhalb von Sentinel-Lymphknoten (Kim et al., 2010). Trotz ausbleibender kompensatorischer Hyperoxygenierung nach Ischämie in der vorliegenden Arbeit ist anzunehmen, dass das Gewebe nach einem I/R-Schaden eine höhere Sauerstoffverwertung aufweist. Diese Annahme steht in Einklang mit den Ergebnissen von Bi et al. (2019), die bei physiologischer arterieller Sauerstoffsättigung und reduzierter venöser Sauerstoffsättigung innerhalb der ersten zwei Stunden der Reperfusionsphase eine erhöhte Sauerstoff-Extraktionsrate (ERO_2) nachweisen konnten. Auch Weiss et al. (2013) beobachteten in ihrer Studie zur zerebralen Ischämie und Reperfusion eine erhöhte ERO_2 des ischämischen Hemikortex verglichen mit der Gegenseite.

7.3 Ergebnisse

7.3.1 Kontrastmittelgestützte MR-Lymphographie

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde das nanopartikuläre Kontrastmittel AGuIX im Rahmen der MR-Lymphographie analysiert und mit dem klinisch etablierten MR-Kontrastmittel Gd-DOTA verglichen. Dabei sind die pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften der Kontrastmittel von zahlreichen Faktoren wie den T_1 - und T_2 - Relaxationszeiten, dem Molekulargewicht und der jeweiligen hydrodynamischen Größe abhängig. In diesem Zusammenhang konnten Kobayashi et al. (2003) in ihrer Studie

mit verschiedenen Dendrimer-basierten Kontrastmitteln zeigen, dass die Kontrastmittelaufnahme, -anreicherung und -elimination maßgeblich von der Molekülmasse abhängig sind. Demnach ermöglichten größere Partikel im Vergleich zu niedermolekularen Partikeln aufgrund der geringeren renalen Elimination und der eingeschränkten Aufnahme in das retikuloendotheliale System eine signifikant stärkere und länger anhaltende Kontrastmittelanreicherung innerhalb der Lymphknoten und der Lymphgefäße.

Diese pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften konnten für das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Kontrastmittel AGuIX repliziert werden. Mit einer Molekülmasse von 8,5 kDa zeichnete sich AGuIX durch eine lange Transitzeit durch das Lymphsystem aus, während Gd-DOTA mit einer Molekülmasse von rund 0,56 kDa entsprechend schneller aus dem Lymphsystem eliminiert wurde. Darüber hinaus zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass die mittlere SNR der poplitealen Lymphknoten auch 90 Minuten nach AGuIX-Injektion signifikant erhöht war, während die durchschnittliche SNR nach Gd-DOTA-Applikation bereits nach 60 Minuten auf das Ausgangsniveau zurückkehrte. Ebenso zeigten sich Unterschiede zwischen den beiden Kontrastmitteln bei der Betrachtung des hydrodynamischen Durchmessers. Während AGuIX eine hydrodynamische Größe von 3 nm aufweist, liegt dieser bei Gd-DOTA lediglich bei circa 1 nm. Aufgrund des höheren Molekulargewichtes und des größeren hydrodynamischen Durchmessers wurde AGuIX kaum durch das venöse Gefäßsystem aufgenommen. Stattdessen erfolgte die Drainage von AGuIX hauptsächlich über das Lymphsystem, wobei eine Kontrastmittelanreicherung innerhalb des lymphatischen Systems länger als 60 Minuten nach der Injektion nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu resultierte die Gd-DOTA-Injektion in einer simultanen Anreicherung des Kontrastmittels innerhalb des Venen- und des Lymphgefäßsystems, was die Differenzierung beider Kreisläufe erschwerte. Afferente Lymphgefäße konnten erst nach mehr als 30 Minuten durch dezente Kontrastunterschiede von Venen differenziert werden. Eine Differenzierung zwischen beiden Systemen war nach der AGuIX-Injektion nicht erforderlich, da diese zu einer alleinigen Kontrastmittelanreicherung innerhalb des lymphatischen Systems führte. Die simultane Anreicherung eines Kontrastmittels mit extrazellulärer Ausbreitung im Venen- und Lymphsystem stellt ein Problem bei der Auswertung der MR-Lymphographie dar, da sie mit einer eingeschränkten Beurteilbarkeit bei pathologischen Veränderungen einhergeht. Die Beobachtungen der pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gd-DOTA stimmen mit den Ergebnissen anderer Autoren überein, die Kontrastmittel mit extrazellulärer Anreicherung verwendeten. So beobachteten Ruehm et al. (2001) in ihrer Phase-I-Studie zum Einsatz von Gd-DOTA zur Darstellung pathologischer Veränderungen des Lymphsystems die unvermeidbare simultane Kontrastmittelanreicherung in Blut- und Lymphgefäßen. Lohrmann et al. (2006) untersuchten die Verwendung des extrazellulären Kontrastmittels Gadodiamin

(Gd-DTPA-BMA) im lymphatischen System und beobachteten ebenfalls die simultane Kontrastierung von Venen und Lymphgefäßen, bei der die sichere Differenzierung ausschließlich aufgrund einer schnelleren Eliminierung des Gd-DTPA-BMA aus dem Venensystem möglich war. Auch Notohamiprodjo et al. (2009) erzielten ähnliche Ergebnisse in ihrer Machbarkeitsstudie zur Anwendung des extrazellulären Kontrastmittels Gadopentetat-Dimeglumin (Gd-DTPA). Obwohl in dieser Studie die mittlere SNR und CNR der Lymphgefäße höher ausfielen als die der Venen und die Kontrastierung der Lymphgefäße somit stärker ausgeprägt war, war die Differenzierung bei einem von 13 untersuchten Patienten nicht möglich. Notohamiprodjo et al. (2012) schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass die begleitende Kontrastierung des Venensystems bei der kontrastmittelgestützten MR-Lymphographie unvermeidbar sei.

Neben dem Vergleich beider Kontrastmittel wurde in der vorliegenden Arbeit die AGulX-gestützte MR-Lymphographie hinsichtlich der Eignung zur Darstellung des Lymphsystems im Rahmen eines sekundären Lymphödems untersucht. Die MR-Lymphographie-Untersuchungen 6, 10 und 14 Wochen nach Lymphadenektomie (entsprechend 4, 8 und 12 Wochen nach Bestrahlung) zeigten typische Anzeichen lymphatischer Regeneration. Diese Ergebnisse werden durch verschiedene andere Studienergebnisse gestützt, bei denen es zu einer vergleichbaren lymphatischen Regeneration nach poplitealer Lymphadenektomie kam (Blum et al., 2013; Kwon et al., 2014). So beobachteten Blum et al. (2013) bereits eine Woche nach der Operation die beginnende Ausbildung von lymphatischen Kollateralkreisläufen, die bis zum Abschluss des Beobachtungszeitraums abgeschlossen war. Nach der vierten postoperativen Woche konnten in dieser Studie ausgereifte Lymphgefäße mit Hilfe der ICG-Fluoreszenz-Mikroskopie dargestellt werden, welche in Richtung des inguinalen Leistenbandes zogen. Im Gegensatz zu Blum et al. (2013) wurde in der vorliegenden Arbeit ein deutlich invasiveres Modell zur Induktion eines sekundären Lymphödems gewählt und die erste Bildgebung erst nach Abschluss der sechsten postoperativen Woche angesetzt, wobei ein ähnlicher kollateraler Lymphfluss nachgewiesen werden konnte. Die große Varianz der Gefäßdurchmesser dieser neu gebildeten Lymphgefäße lässt vermuten, dass die Lymphangiogenese zum Untersuchungszeitpunkt nicht vollständig abgeschlossen war. Entgegen der Erwartung, dass sich diese Lymphgefäße bis zur 10. und 14. postoperativen Woche zu reifen Lymphgefäßen entwickeln, konnten zu beiden Untersuchungszeitpunkten weniger Kollateralkreisläufe dargestellt werden als nach der sechsten postoperativen Woche. Eine Erklärung hierfür könnten Uzarski et al. (2008) liefern, die trotz Blockade der VEGF-C/VEGF Rezeptor (VEGFR)-3-Signalkaskade und somit der Lymphangiogenese einen Rückgang der Schwellung beobachten konnten. Sie gehen davon aus, dass der interstitielle Lymphabfluss und die Regeneration der extrazellulären Matrix maßgeblich an der Rückbildung des

Lymphödems beteiligt sind. Darüber hinaus konnten Ongstad et al. (2010) in einem experimentellen Lymphödem-Modell nach Blockade der Lymphangiogenese über die VEGFR-2- und VEGFR-3-Signalkaskade keine statistisch signifikante Beeinträchtigung der Auflösung der lymphödeminduzierten Schwellung beobachten. Auch in dieser Studie vermuten die Autoren, dass neben der Lymphangiogenese zahlreiche weitere Faktoren an dem Lymphabfluss und der Auflösung eines Lymphödems beteiligt sind. Eine weitere Erklärung für die Atrophie der Kollateralkreisläufe könnten Avraham et al. (2009, 2010) liefern, welche die Bindegewebsfibrose als wichtigen Gegenspieler der Lymphangiogenese postulieren. Basierend auf diesen Erkenntnissen ist denkbar, dass der Rückgang der in der vorliegenden Arbeit darstellbaren Kollateralkreisläufe auf die mit der Zeit einsetzende Bindegewebsfibrose und die Inhibierung der Lymphangiogenese zurückzuführen sein könnte.

7.3.2 Histologie und Immunhistochemie

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden nach Abschluss des Beobachtungszeitraums histologische und immunhistochemische Analysen durchgeführt, um die Verlässlichkeit des Lymphödem-Modells zu beurteilen. Dabei zeigten sich typische Zeichen lymphödematöser Umbauprozesse, wie beispielsweise Fibrose, Immunzellinfiltration und Zunahme des Lymphgefäßdurchmessers sowie der Lymphgefäßdichte. Frühere Studien weisen auf eine hohe Verlässlichkeit des hier verwendeten Tiermodells hin. So konnten Olszewski et al. (1990) eine signifikante Immunzellinfiltration und daraus resultierende chronisch-entzündliche Hautveränderungen bei 17 PatientInnen mit chronischem Lymphödem der unteren Extremität nachweisen. Auch Zampell et al. (2012) konnten zeigen, dass die Induktion eines Lymphödems in der Maus in einer deutlichen Entzündungsreaktion mit Zunahme der T-Lymphozyten und der neutrophilen Granulozyten sowie der Makrophagen und dendritischen Zellen resultiert. Weiterhin konnten Ghanta et al. (2015) am Maus-Modell eine signifikante Akkumulation von Makrophagen, CD4⁺-Zellen und Kollagen Typ 1-Fasern in den ödematös veränderten Gewebeproben beobachten. Die Schlüsselrolle der Makrophagen bei der Freisetzung des lymphangiogenen Wachstumsfaktors VEGF-C könnte demnach eine Erklärung für die Zunahme der Lymphgefäßdichte liefern. Auch Kataru et al. (2019) beobachteten eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion als Folge eines chronischen Lymphödems, welche in einem reduzierten lymphatischen Transportindex und in einer zunehmenden Bindegewebsfibrose resultierte.

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden histologische und immunhistochemische Untersuchungen zur Beurteilung des I/R-Schadens in VLK-Paketen durchgeführt. Intraoperative Ischämiezeiten der Transplantate im Rahmen der VLKT betragen meist zwischen 45 und 120 Minuten, weshalb in der vorliegenden Arbeit Versuchsgruppen mit

entsprechenden Ischämiezeiten gewählt wurden (IR-45/IR-120-Gruppe). Dabei wurden sowohl die Lymphknoten als auch das perinodale Fettgewebe analysiert. Ohtani & Ohtani (2008) lieferten in ihrer Studie eine detaillierte Analyse der physiologischen Lymphknotenarchitektur und ermöglichten einen Vergleich zwischen dem physiologischen Aufbau eines Lymphknotens und den Veränderungen nach einem I/R-Schaden. Die detaillierten histologischen und immunhistochemischen Analysen in der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass bereits eine 120-minütige Ischämie mit einer signifikanten Destruktion der physiologischen Lymphknotenarchitektur einhergeht. Trotz Erhalt des subkapsulären Sinus kam es zu einer relevanten Veränderung des Intermediärsinus und der Lymphfollikel sowie zu einer signifikanten Reduktion der Zellularität innerhalb der Lymphknoten in der I/R-120-Gruppe, während sich die Zellzahl innerhalb des perinodalen Fettgewebes nicht signifikant veränderte. In Einklang hierzu zeigte sich ein signifikanter Rückgang von CD31⁺ Mikrogefäßen innerhalb der Lymphknoten der IR-45- und IR-120-Gruppe. Diese Ergebnisse scheinen aus biologischer Sicht durchaus nachvollziehbar, da die lokale Hypoxie im Rahmen eines I/R-Schadens mit einer Destruktion des Gewebes und der Gefäßarchitektur einhergeht (Ballestín et al., 2018). Über zahlreiche Signalwege wird zudem die Expression verschiedener angiogener Wachstumsfaktoren induziert. Allerdings ist die Angiogenese ein zeitaufwendiger Prozess mit einer durchschnittlichen Wachstumsgeschwindigkeit neuer Blutgefäße von ~5 µm/h (Utzinger et al., 2015), weshalb die in der vorliegenden Arbeit gewählte Reperusionszeit von 24 h möglicherweise nicht ausreichte, um eine Zunahme von CD31⁺ Blutgefäßen zu beobachten. Im Vergleich dazu konnte im perinodalen Fettgewebe keine signifikante Abnahme von CD31⁺ Gefäßen beobachtet werden, was wiederum darauf hindeutet, dass hier eine bessere Resistenz gegenüber einem I/R-Schaden besteht.

Die weiteren immunhistochemischen Analysen unterstreichen die Anfälligkeit der Lymphknoten innerhalb der VLK-Lappen gegenüber einem I/R-Schaden. Die signifikante Zunahme von HO-1⁺ und MPO⁺ Zellen nach 45-minütiger und 120-minütiger Ischämiezeit als Maß des oxidativen Stresses und der Entzündungsreaktion stützen die Annahme, dass bereits eine Ischämiedauer von 45 Minuten mit deutlichen zellulären Veränderungen innerhalb der Lymphknoten einhergehen kann. Im Vergleich zur Kontroll- und IR-45-Gruppe zeigte sich zudem in der IR-120-Gruppe ein signifikanter Anstieg an MPO⁺ neutrophilen Granulozyten sowie proliferierenden PCNA⁺ und apoptotischen Casp-3⁺ Zellen. Neben dem Lymphknoten selbst wurde auch das perinodale Fettgewebe immunhistochemisch untersucht. Dabei zeigte sich keine signifikante Erhöhung von HO-1⁺, PCNA⁺ und Casp-3⁺ Zellen. Ebenso war die Zahl infiltrierender Entzündungszellen weder nach 45-minütiger noch nach 120-minütiger Ischämiezeit signifikant erhöht. Diese Ergebnisse unterstreichen weiter die bessere Resistenz des perinodalen Fettgewebes gegenüber einem I/R-Schaden. Bereits Yang et al. (2018) beschäftigten sich mit der kritischen Ischämiezeit vaskularisierter Lymphknoten und kamen

nach Auswertung des Lymphflusses und der Blutperfusion zu dem Schluss, dass sich eine Ischämie erst ab fünf Stunden negativ auf das Transplantat auswirkt. Jüngere Studienergebnisse deuten darauf hin, dass ein irreversibler Ischämieschaden bereits nach 4-stündiger Ischämie einsetzt (Perrault et al., 2020; Tinhofer et al., 2020). Obwohl Perrault et al. (2020) eine kritische Ischämiezeit von vier Stunden annahmen, zeigten ihre quantitativen PCR-Analysen zur Genexpression verschiedener Zytokine und Biomarker (z.B. Tumornekrosefaktor (TNF)- α und Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 1 (CXCL1)), dass sich molekulare Veränderungen in Bezug auf den I/R-Schaden bereits nach 2-stündiger Ischämie äußerten. In der Zusammenschau der Ergebnisse ist anzunehmen, dass die Überlebensrate der Transplantate im Rahmen der VLKT maßgeblich von der kritischen Ischämiezeit und der Funktion der Lymphknoten abhängig ist. Es ist anzumerken, dass der I/R-Schaden in tierexperimentellen Studien proportional zur Ischämiezeit ist (Marto et al., 2016). Die kritische Ischämiezeit ist dabei abhängig vom sogenannten *no-reflow*-Phänomen, welches die ausbleibende Wiederherstellung einer ausreichenden Perfusion peripherer Gewebe nach wiederholter ischämischer Phasen beschreibt (May et al., 1978). Erstaunlicherweise ließ sich initial in der experimentellen Studie von May et al. (1978) zum freien epigastrischen Lappen eine Verbesserung des Lymphflusses nach Reperfusion beobachten, bevor eine irreversible Schädigung zum Zeitpunkt der kritischen Ischämiezeit eintrat. Dieses Phänomen der ischämischen Präkonditionierung, welches eine Verbesserung der Resistenz gegenüber einem I/R-Schaden durch kurze Ischämiephasen beschreibt (Murry et al., 1986; Akcal et al., 2016; Gassman et al., 2016), könnte demnach eine Erklärung für die Beobachtungen von May et al. (1978) liefern.

7.3.3 Western Blot

Um einen adäquaten Lymphabfluss zu gewährleisten, ist neben der zuvor diskutierten Mindestanzahl enthaltener Lymphknoten im jeweiligen VLK-Lappen auch der funktionelle Einbau der Lymphknoten im Empfängergerewebe essenziell für den Erfolg einer VLKT. Das Überleben des Transplantates ist stark von der Expression lymphangiogener Wachstumsfaktoren wie VEGF-C und VEGF-D abhängig, welche durch Bindung an VEGFR-2 und VEGFR-3 die Ausbildung neuer Lymphgefäße stimulieren (Karkkainen et al., 2004; Baldwin et al., 2005; Tammela et al., 2007). Obwohl das perinodale Fettgewebe als Bestandteil der VLK-Lappen ebenfalls zum Erfolg einer VLK-Transplantation beitragen könnte, legte die bisherige Forschung wenig Augenmerk auf dessen Funktion. So enthält es nicht nur ein dichtes Netzwerk aus Lymphgefäßen, sondern auch zahlreiche multipotente mesenchymale Stammzellen und Wachstumsfaktoren. Darüber hinaus wirkt das Fettgewebe immunmodulatorisch und kann so mögliche Abstoßungsreaktionen eindämmen (Chung et al.,

2018). Zudem konnten Aschen et al. (2014) nach Lymphadenektomie bei transgenen Mäusen sowohl in infiltrierenden Lymphgefäßen als auch im perinodalen Fettgewebe sehr hohe VEGF-C Konzentrationen beobachten. In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass dem perinodalen Fettgewebe beim funktionellen Einbau der VLK-Pakete eine entscheidende Bedeutung zukommt.

Um diese Hypothese durch empirische Daten zu stützen, wurden **im zweiten Studienabschnitt** der vorliegenden Arbeit Western Blot-Analysen der VLK-Pakete durchgeführt, wobei die Lymphknoten und das perinodale Fettgewebe getrennt voneinander analysiert wurden. Die Auswertung der Western Blots zeigten sowohl in den Lymphknoten als auch im perinodalen Fettgewebe einen deutlichen Anstieg der VEGF-D Expression nach 120-minütiger Ischämiezeit. Im Vergleich dazu führte eine Ischämiezeit von 45 Minuten zu keiner signifikant erhöhten VEGF-D Expression. Interessanterweise kam es weder in der IR-120-Gruppe noch in der IR-45-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der VEGF-C Ausschüttung. Weiterhin wurde eine signifikante Steigerung der VEGF-A Expression in den Lymphknoten ausschließlich nach 120-minütiger Ischämiezeit beobachtet. Im perinodalen Fettgewebe hingegen konnten signifikant erhöhte VEGF-A-Werte in den Ischämiegruppen nachgewiesen werden.

Die vorliegenden Befunde deuten darauf hin, dass Wachstumsfaktoren für das Einwachsen neuer Lymphgefäße und den Erfolg einer VLKT essenziell sind. Auch die Lymphknoten selbst produzieren die entsprechenden lymphangiogenen Wachstumsfaktoren und tragen so zur Lymphgefäßneubildung bei (Saaristo et al., 2012). Dabei wird die Lymphangiogenese hauptsächlich von VEGF-C und VEGF-D durch Bindung an VEGFR-2 und VEGFR-3 stimuliert (Tervala et al., 2015; Viitanen et al., 2013, 2015). In diesem Zusammenhang nehmen Tervala et al. (2015) VEGF-C als den wichtigsten pro-lymphangiogenen Wachstumsfaktor im Rahmen der rekonstruktiven Mikrochirurgie an, wohingegen Rissanen et al. (2003) VEGF-D als den stärksten lymphangiogenen Faktor der VEGF-Familie postulieren. In Einklang mit diesen Hypothesen konnte in verschiedenen Studien durch eine exogene VEGF-C- und/oder VEGF-D-Injektion im Empfängerbereich die Ausbildung neuer, funktionsfähiger Lymphgefäße beobachtet werden (Hartiala & Saaristo, 2010; Lähteenvuori et al., 2011; Visuri et al., 2015). Durch Bindung an VEGFR-1 und VEGFR-2 wirkt VEGF-A hauptsächlich auf Blutgefäße, fördert jedoch durch Bindung an VEGFR-2 und VEGFR-3 auch die Lymphangiogenese. Zudem werden bei Gewebeschäden über eine VEGF-A-Signalkaskade Faktoren freigesetzt, welche die Regeneration des verletzten Gewebes fördern (Matsumoto & Ema, 2014). VEGF-A erfüllt über verschiedene Signalkaskaden zahlreiche Aufgaben im Rahmen der Gefäßentwicklung und der Organhomöostase (Peach et al., 2018). Interessanterweise konnte trotz der vermehrten Expression von VEGF-A in den ischämischen Lymphknoten keine signifikante Erhöhung der

Mikrogefäßdichte nachgewiesen werden. Vielmehr ließen sich signifikant weniger CD31⁺ Gefäße in denjenigen Lymphknoten nachweisen, die einer 45- oder 120-minütigen Ischämie unterzogen wurden, als in den Lymphknoten, die keiner Ischämie ausgesetzt waren. Auch hier kommt als Erklärung die zuvor genannte ausgeprägte Destruktion der Lymphknotenarchitektur (Ballestin et al., 2018) und die zeitaufwendige Angiogenese (Utzinger et al., 2015) in Betracht. Trotz der geringen Anzahl der untersuchten Versuchstiere leistet daher die vorliegende Analyse einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis der perioperativen lymphangiogenen Wachstumsfaktorausschüttung im Rahmen der VLK-Transplantation.

7.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Im ersten Studienabschnitt konnte gezeigt werden, dass AGuIX als Kontrastmittel für die MR-Lymphographie am Kleintier eingesetzt werden kann. Im Vergleich zum klinisch etablierten Dotarem erlaubt das neuartige nanopartikuläre Kontrastmittel eine hochauflösende und langanhaltende Darstellung des Lymphsystems und kann auch im Rahmen des chronischen Lymphödems eingesetzt werden. Das initial als Radiosensitizer entwickelte AGuIX wurde seit Entwicklung im Jahre 2011 (Lux et al., 2011) in zahlreichen *in vitro* (Mowat et al., 2011; Luchette et al., 2014; Lux et al., 2015) und *in vivo* Studien (Lux et al., 2011; Sancey et al., 2014; Dufort et al., 2015; Miladi et al., 2015; Detappe et al., 2016; Kotb et al., 2016; Verry et al., 2016; Hu et al., 2017) zur Untersuchung verschiedener Pathologien eingesetzt. Zudem befindet sich das Kontrastmittel aktuell in zwei klinischen Phase Ib Studien zur Testung bei multiplen Hirnmetastasen (NANO-RAD) und fortgeschrittenen Hirntumoren (NANOCOL).

In Anbetracht der zahlreichen positiven Forschungsergebnisse sind nun weitere klinische Studien zur Ausweitung der Indikationsstellung des nanopartikulären Kontrastmittels AGuIX erforderlich, bevor der routinemäßige Einsatz empfohlen werden kann. Insbesondere müssen das Nebenwirkungsprofil und die Kontraindikationen für die Verwendung von AGuIX weiter exploriert werden.

Im zweiten Studienabschnitt konnte gezeigt werden, dass große molekulare und zelluläre Veränderungen innerhalb der Lymphknoten der VLK-Pakete bereits nach einer Ischämiezeit von 120 Minuten auftreten können, während das perinodale Fettgewebe deutlich resistenter gegenüber einem I/R-Schaden ist. Entsprechend sollte die kritische Ischämiezeit der Lymphknoten im Rahmen einer VLKT möglichst kurz gehalten werden, um bestmögliche klinische Ergebnisse erzielen zu können.

8. Literaturverzeichnis

1. **Adamczyk LA, Gordon K, Kholová I, Meijer-Jorna LB, Telinius N, Gallagher PJ, van der Wal AC, Baandrup U** (2016) Lymph vessels: The forgotten second circulation in health and disease. *Virchows Archiv*, 469: 3–17
2. **Akcal A, Sirvan SS, Karsidag S, Görgülü T, Akcal MA, Ozagari A, Tatlıdede S** (2016) Combination of ischemic preconditioning and postconditioning can minimise skin flap loss: Experimental study. *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery*, 50(4): 233–238
3. **Akita S, Mitsukawa N, Kuriyama M, Kubota Y, Hasegawa M, Tokumoto H, Ishigaki T, Togawa T, Kuyama J, Satoh K** (2015) Comparison of vascularized supraclavicular lymph node transfer and lymphaticovenular anastomosis for advanced stage lower extremity lymphedema. *Annals of Plastic Surgery*, 74(5): 573–579
4. **Alitalo K, Tammela T, Petrova TV** (2005) Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*, 438(7070): 946–953
5. **Aschen SZ, Farias-Eisner G, Cuzzone DA, Albano NJ, Ghanta S, Weitman ES, Ortega S, Mehrara BJ** (2014) Lymph node transplantation results in spontaneous lymphatic reconnection and restoration of lymphatic flow. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 133(2): 301–310
6. **Avraham T, Clavin NW, Daluvoy SV, Fernandez J, Soares MA, Cordeiro AP, Mehrara BJ** (2009) Fibrosis is a key inhibitor of lymphatic regeneration. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 124(2): 438–450
7. **Avraham T, Yan A, Zampell JC, Daluvoy SV, Haimovitz-Friedman A, Cordeiro AP, Mehrara BJ** (2010) Radiation therapy causes loss of dermal lymphatic vessels and interferes with lymphatic function by TGF-beta1-mediated tissue fibrosis. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 299(3): 589–605
8. **Badger CMA, Preston NJ, Seers K, Mortimer PS** (2004) Benzo-pyrones for reducing and controlling lymphoedema of the limbs. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2004(2): 003140
9. **Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, Williams RA, Hibbs ML, Grail D, Kubo H, Stacker SA, Achen MG** (2005) Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Molecular and Cellular Biology*, 25(6): 2441–2449
10. **Ballestín A, Casado JG, Abellán E, Vela FJ, Álvarez V, Usón A, López E, Marinaro F, Blázquez R, Sánchez-Margallo FM** (2018) Ischemia-reperfusion injury in a rat microvascular skin free flap model: A histological, genetic, and blood flow study. *PLoS ONE*, 13(12): e0209624
11. **Baluk P, Fuxe J, Hashizume H, Romano T, Lashnits E, Butz S, Vestweber D, Corada M, Molendini C, Dejana E, McDonald DM** (2007) Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(10): 2349–2362
12. **Baumeister RGH, Seifert J, Wiebecke B, Hahn D** (1981) Experimental basis and first application of clinical lymph vessel transplantation of secondary lymphedema. *World Journal of Surgery*, 5(3): 401–407
13. **Baumeister RG, Seifert J, Wiebecke B** (1980) Transplantation of lymphvessels on rats

- as well as first application on the experimental lymphedema of the dog. *European Surgical Research / Supplement*, 12(2): 7
14. **Becker C, Assouad J, Riquet M, Hidden G** (2006) Postmastectomy lymphedema: Long-term results following microsurgical lymph node transplantation. *Annals of Surgery*, 243(3): 313–315
 15. **Becker C, Hidden G** (1988) Transfer of free lymphatic flaps. Microsurgery and anatomical study. *Journal Des Maladies Vasculaires*, 13(2): 119–122
 16. **Becker C, Vasile JV, Levine JL, Batista BN, Studinger RM, Chen CM, Riquet M** (2012) Microlymphatic surgery for the treatment of iatrogenic lymphedema. *Clinics in Plastic Surgery*, 39(4): 385–398
 17. **Benjamin J, O'Leary C, Hur S, Gurevich A, Klein WM, Itkin M** (2023) Imaging and interventions for lymphatic and lymphatic-related disorders. *Radiology*, 307(3): e220231
 18. **Bi R, Dinish US, Goh CC, Imai T, Moothanchery M, Li X, Kim JY, Jeon S, Pu Y, Kim C, Ng LG, Wang LV, Olivo M** (2019) In vivo label-free functional photoacoustic monitoring of ischemic reperfusion. *Journal of Biophotonics*, 12(7): e201800454
 19. **Biglia N, Zanfagnin V, Daniele A, Robba E, Bounous VE** (2017) Lower body lymphedema in patients with gynecologic cancer. *Anticancer Research*, 37(8): 4005–4015
 20. **Blaisdell FW** (2002) The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: A review. *Cardiovascular Surgery*, 10(6): 620–630
 21. **Blum KS, Proulx ST, Luciani P, Leroux JC, Detmar M** (2013) Dynamics of lymphatic regeneration and flow patterns after lymph node dissection. *Breast Cancer Research and Treatment*, 139(1): 81–86
 22. **Boccardo F, Fulcheri E, Villa G, Molinari L, Campisi C, Dessalvi S, Murdaca G, Campisi C, Santi PL, Parodi A, Puppo F, Campisi C** (2013) Lymphatic microsurgery to treat lymphedema: Techniques and indications for better results. *Annals of Plastic Surgery*, 71(2): 191–195
 23. **Boffa DJ, Sands MJ, Rice TW, Murthy SC, Mason DP, Geisinger MA, Blackstone EH** (2008) A critical evaluation of a percutaneous diagnostic and treatment strategy for chylothorax after thoracic surgery. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 33(3): 435–439
 24. **Bonvalot S, Le Pechoux C, De Baere T, Kantor G, Buy X, Stoeckle E, Terrier P, Sargos P, Coindre JM, Lassau N, Ait Sarkouh R, Dimitriu M, Borghi E, Levy L, Deutsch E, Soria JC** (2017) First-in-human study testing a new radioenhancer using nanoparticles (NBTXR3) activated by radiation therapy in patients with locally advanced soft tissue sarcomas. *Clinical Cancer Research*, 23(4): 908–917
 25. **Brahmi SA, Ziani FZ** (2016) Lymphedema after breast cancer. *The Pan African Medical Journal*, 23: 255
 26. **Bramos A, Perrault D, Yang S, Jung E, Hong YK, Wong AK** (2016) Prevention of postsurgical lymphedema by 9-cis retinoic acid. *Annals of Surgery*, 264(2): 353–361
 27. **Brorson H** (2003) Liposuction in arm lymphedema treatment. *Scandinavian Journal of Surgery*, 92(4): 287–295

28. **Brorson H, Ohlin K, Olsson G, Svensson B, Svensson H** (2008) Controlled compression and liposuction treatment for lower extremity lymphedema. *Lymphology*, 41(2): 52–63
29. **Brorson H, Svensson H** (1998) Liposuction combined with controlled compression therapy reduces arm lymphedema more effectively than controlled compression therapy alone. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 102(4): 1058–1067
30. **Campisi C, Boccardo F** (2003) Vein graft interposition in treating peripheral lymphoedemas. *Handchirurgie · Mikrochirurgie · Plastische Chirurgie*, 35(04): 221–224
31. **Campisi C, Boccardo F, Tacchella M** (1995) Reconstructive microsurgery of lymph vessels: The personal method of lymphatic-venous-lymphatic (LVL) interpositioned grafted shunt. *Microsurgery*, 16(3): 161–166
32. **Campisi C, Boccardo F, Zilli A, Macció A, Napoli F** (2001) The use of vein grafts in the treatment of peripheral lymphedemas: Long-term results. *Microsurgery*, 21(4): 143–147
33. **Carr DH, Brown J, Bydder GM, Weinmann HJ, Speck U, Thomas DJ, Young IR** (1984) Intravenous chelated gadolinium as a contrast agent in NMR imaging of cerebral tumours. *Lancet*, 1(8375): 484–486
34. **Carter J, Huang H, Armer JA, Carlson JW, Lockwood S, Nolte S, Stewart BR, Wenzel L, Kauderer J, Hutson A, Walker JL, Fleury AC, Soper JT, Mathews CA, Zivanovic O, Richards WE, Alberts DS, Barakat RR** (2018) GOG 244, The lymphedema and gynecologic cancer (LEG) study: The association between the gynecologic cancer lymphedema questionnaire (GCLQ) and lower extremity lymphedema. *Gynecologic Oncology*, 149: 25–26
35. **Casley-Smith JR, Morgan RG, Piller NB** (2010) Treatment of lymphedema of the arms and legs with 5,6-benzo-alpha-pyrone. *New England Journal of Medicine*, 329(16): 1158–1163
36. **Casley-Smith JR, Wang CT, Zi-hai C** (1993) Treatment of filarial lymphoedema and elephantiasis with 5,6-benzo-alpha-pyrone. *British Medical Journal*, 307(6911): 1037–1041
37. **Cellina M, Gibelli D, Martinenghi C, Giardini D, Soresina M, Menozzi A, Oliva G, Carrafiello G** (2021) Non-contrast magnetic resonance lymphography (NCMRL) in cancer-related secondary lymphedema: Acquisition technique and imaging findings. *Radiologia Medica*, 126(11): 1477–1486
38. **Cellina M, Martinenghi C, Panzeri M, Soresina M, Menozzi A, Daniele G, Oliva G** (2021) Noncontrast MR lymphography in secondary lower limb lymphedema. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 53(2): 458–466
39. **Chafin B, Belmont MJ, Quraishi H, Clovis N, Wax MK** (1999) Effect of clamp versus anastomotic-induced ischemia on critical ischemic time and survival of rat epigastric fasciocutaneous flap. *Head & Neck*, 21(3): 198–203
40. **Chand M, Keller, DS, Joshi HM, Devoto L, Rodriguez-Justo M, Cohen R** (2018) Feasibility of fluorescence lymph node imaging in colon cancer: FLICC. *Techniques in Coloproctology*, 22(4): 271–277
41. **Chang DH, Pracros JP** (2019) Safety of gadoterate meglumine in over 1600 children included in the prospective observational SECURE study. *Acta Radiologica*, 60(11):

- 1450–1456
42. **Chen CS, Kim JW, Shin JH, Koo HJ, Kim JB, Li HL, Kwon SH, Ibrahim A, Alhazemi AA, Chu HH** (2020) Lymphatic imaging and intervention for chylothorax following thoracic aortic surgery. *Medicine*, 99(34): e21725
 43. **Cheng MH, Huang JJ, Wu CW, Yang CY, Lin CY, Henry SL, Kolios L** (2014) The mechanism of vascularized lymph node transfer for lymphedema: Natural lymphaticovenous drainage. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 133(2): 192–198
 44. **Chipp E, Ferguson L, Rayatt S** (2010) Vascularized groin lymph node transfer using the wrist as a recipient site for management of postmastectomy upper extremity lymphedema. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 125(2): 751–752
 45. **Chung KJ, Nat M, Chavakis T, Chatzigeorgiou A** (2018) Innate immune cells in the adipose tissue. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 19(4): 283–292
 46. **Chwang WB, Jain R, Bagher-Ebadian H, Nejad-Davarani SP, Iskander ASM, VanSlooten A, Schultz L, Arbab AS, Ewing JR** (2014) Measurement of rat brain tumor kinetics using an intravascular MR contrast agent and DCE-MRI nested model selection. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 40(5): 1223–1229
 47. **Cimpean AM, Raica M** (2015) Lymphangiogenesis and inflammation—looking for the “missing pieces” of the puzzle. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 63(6): 415–426
 48. **Collins TJ** (2007) ImageJ for microscopy. *BioTechniques*, 43(1 Suppl): 25–30
 49. **Coriddi M, Dayan J, Sobti N, Nash D, Goldberg J, Klassen A, Pusic A, Mehrara BJ** (2020) Systematic review of patient-reported outcomes following surgical treatment of lymphedema. *Cancers*, 12(3): 565
 50. **Dandapat MC, Mohapatro SK, Mohanty SS** (1986) Filariar lymphoedema and elephantiasis of lower limb: A review of 44 cases. *British Journal of Surgery*, 73(6): 451–453
 51. **Dashkevich A, Raissadati A, Syrjälä SO, Zarkada G, Keränen MI, Tuuminen R, Krebs R, Anisimov A, Jeltsch M, Leppänen VM, Alitalo K, Nykänen AI, Lemström KB** (2016) Ischemia–reperfusion injury enhances lymphatic endothelial VEGFR3 and rejection in cardiac allografts. *American Journal of Transplantation*, 16(4): 1160–1172
 52. **Davies MD, Hawkins CL** (2020) The role of myeloperoxidase (MPO) in biomolecule modification, chronic inflammation and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 32(13): 957–981
 53. **Dayan JH, Dayan E, Smith ML** (2015) Reverse lymphatic mapping: A new technique for maximizing safety in vascularized lymph node transfer. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 135(1): 277–285
 54. **de Boer M, van Dijck JM, Bult P, Borm GF, Tjan-Heijnen VCG** (2010) Breast cancer prognosis and occult lymph node metastases, isolated tumor cells, and micrometastases. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(6): 410–425
 55. **de Haën C, Cabrini M, Akhnana L, Ratti D, Calabi L, Gozzini L** (1999) Gadobenate dimeglumine 0.5 M solution for injection (MultiHance®): Pharmaceutical formulation and physicochemical properties of a new magnetic resonance imaging contrast medium. *Journal of Computer Assisted Tomography*, 23(1): 161–168

-
56. **Demiri E, Dionyssiou D, Tsimponis A, Goula OC, Milothridis P, Pavlidis L, Spyropoulou GA, Foroglou P** (2018) Donor-site lymphedema following lymph node transfer for breast cancer-related lymphedema: A systematic review of the literature. *Lymphatic Research and Biology*, 16(1): 2–8
 57. **Detappe A, Kunjachan S, Sancey L, Motto-Ros V, Biancur D, Drane P, Guieze R, Makrigiorgos GM, Tillement O, Langer R, Berbeco R** (2016) Advanced multimodal nanoparticles delay tumor progression with clinical radiation therapy. *Journal of Controlled Release*, 238: 103–113
 58. **Detappe A, Thomas E, Tibbitt MW, Kunjachan S, Zavidij O, Parnandi N, Reznichenko E, Lux F, Tillement O, Berbeco R** (2017) Ultrasmall silica-based bismuth gadolinium nanoparticles for dual magnetic resonance-computed tomography image guided radiation therapy. *Nano Letters*, 17(3): 1733–1740
 59. **Dixon AK, Wheeler TK, Lomas DJ, Mackenzie R** (1993) Computed tomography or magnetic resonance imaging for axillary symptoms following treatment of breast carcinoma? A randomized trial. *Clinical Radiology*, 48(6): 371–376
 60. **Doldi SB, Lattuada E, Zappa MA, Pieri G, Favara A, Micheletto G** (1992) Ultrasonography of extremity lymphedema. *Lymphology*, 25(3): 129–133
 61. **Dufort S, Bianchi A, Henry M, Lux F, Le Duc G, Josserand V, Louis C, Perriat P, Crémillieux Y, Tillement O, Coll JL** (2015) Nebulized gadolinium-based nanoparticles: A theranostic approach for lung tumor imaging and radiosensitization. *Small*, 11(2): 215–221
 62. **Dumanian GA, Futrell JW** (1996) The Charles procedure: Misquoted and misunderstood since 1950. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 98(7): 1258–1263
 63. **Fenster A, Downey DB** (2000) Three-dimensional ultrasound imaging. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2(1): 457–475
 64. **Fife CE, Farrow W, Hebert AA, Armer NC, Stewart BR, Cormier JN, Armer JM** (2017) Skin and wound care in lymphedema patients: A taxonomy, primer, and literature review. *Advances in Skin & Wound Care*, 30(7): 305–318
 65. **Firbank MJ, Coulthard A, Harrison RM, Williams ED** (1999) A comparison of two methods for measuring the signal to noise ratio on MR images. *Physics in Medicine and Biology*, 44(12): 261–264
 66. **Fries P, Morr D, Müller A, Lux F, Tillement O, Massmann A, Seidel R, Schäfer T, Menger MD, Schneider G, Bucker A** (2015) Evaluation of a gadolinium-based nanoparticle (AGuIX) for contrast-enhanced MRI of the liver in a rat model of hepatic colorectal cancer metastases at 9.4 Tesla. *RöFo - Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren*, 187(12): 1108–1115
 67. **Frueh FS, Gousopoulos E, Rezaeian F, Menger MD, Lindenblatt N, Giovanoli P** (2016) Animal models in surgical lymphedema research—A systematic review. *The Journal of Surgical Research*, 200(1): 208–220
 68. **Frueh FS, Körbel C, Gassert L, Müller A, Gousopoulos E, Lindenblatt N, Giovanoli P, Laschke MW, Menger MD** (2016) High-resolution 3D volumetry versus conventional measuring techniques for the assessment of experimental lymphedema in the mouse hindlimb. *Scientific Reports*, 6: 34673
 69. **Gassman AA, Lewis MS, Lee JC** (2016) Remote ischemic preconditioning recipient

- tissues improves the viability of murine fat transfer. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 138(1): 55–63
70. **Gennaro P, Borghini A, Chisci G, Mazzei FG, Weber E, Tedone Clemente E, Guerrini S, Gentili F, Gabriele G, Ungari C, Mazzei MA** (2017) Could MRI visualize the invisible? An Italian single center study comparing magnetic resonance lymphography (MRL), super microsurgery and histology in the identification of lymphatic vessels. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 21(4): 687–694
71. **Ghanta S, Cuzzzone DA, Torrisi JS, Albano NJ, Joseph WJ, Savetsky IL, Gardenier JC, Chang D, Zampell JC, Mehrara BJ** (2015) Regulation of inflammation and fibrosis by macrophages in lymphedema. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 308(9): 1065–1077
72. **Gong-Kang H, Ru-Qi H, Zong-Zhao L, Yao-Liang S, Tie-De L, Gong-Ping P** (1981) Microlymphaticovenous anastomosis for treating lymphedema of the extremities and external genitalia. *Journal of Microsurgery*, 3(1): 32–39
73. **Goyen M** (2008) Gadofosveset-enhanced magnetic resonance angiography. *Vascular Health and Risk Management*, 4(1): 1–9
74. **Greene A, Slavin S, Borud L** (2006) Treatment of lower extremity lymphedema with suction-assisted lipectomy. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 118(5): 118–121
75. **Guermazi A, Brice P, Hennequin C, Sarfati E** (2003) Lymphography: An old technique retains its usefulness. *Radiographics: A Review Publication of the Radiological Society of North America*, 23(6): 1541–1560
76. **Guo J, Yang H, Wang S, Cao Y, Liu M, Xie F, Liu P, Zhou B, Tong F, Cheng L, Liu H, Wang S** (2017) Comparison of sentinel lymph node biopsy guided by indocyanine green, blue dye, and their combination in breast cancer patients: A prospective cohort study. *World Journal of Surgical Oncology*, 15(1): 196
77. **Guo LX, Zou K, Ju JH, Xie H** (2005) Hyaluronan promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth in xenografts. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(9): 601–606
78. **Gupta N, Verhey EM, Torres-Guzman RA, Avila FR, Jorge Forte A, Rebecca AM, Teven CM** (2021) Outcomes of lymphovenous anastomosis for upper extremity lymphedema: A systematic review. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 9(8): e3770
79. **Gustafsson J, Chu SY, Chan WH, Cheng MH** (2018) Correlation between quantity of transferred lymph nodes and outcome in vascularized submental lymph node flap transfer for lower limb lymphedema. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 142(4): 1056–1063
80. **Hadjis NS, Carr DH, Banks L, Pflug JJ** (1985) The role of CT in the diagnosis of primary lymphedema of the lower limb. *American Journal of Roentgenology*, 144(2): 361–364
81. **Harisinghani MG, Barentsz J, Hahn PF, Deserno WM, Tabatabaei S, van de Kaa CH, de la Rosette J, Weissleder R** (2003) Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*, 348(25): 2491–2499
82. **Hartiala P, Saaristo AM** (2010) Growth factor therapy and autologous lymph node transfer in lymphedema. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 20(8): 249–253

83. **Herborn CU, Honold E, Wolf M, Kemper J, Kinner S, Adam G, Barkhausen J** (2007) Clinical safety and diagnostic value of the gadolinium chelate gadoterate meglumine (Gd-DOTA). *Investigative Radiology*, 42(1): 58–62
84. **Hirche C, Engel H, Seidenstuecker K, Taeger C, Machens HG, Frick A, Harder Y** (2019) Lympho-reconstructive microsurgery for secondary lymphedema: Consensus of the german-speaking society for microsurgery of peripheral nerves and vessels (DAM) on indication, diagnostic and therapy by lymphovenous anastomosis (LVA) and vascularized lymph node transfer (VLNT). *Handchirurgie, Mikrochirurgie, Plastische Chirurgie*, 51(6): 424–433
85. **Hos D, Schlereth SL, Bock F, Heindl LM, Cursiefen C** (2015) Antilymphangiogenic therapy to promote transplant survival and to reduce cancer metastasis: What can we learn from the eye? *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 38: 117–130
86. **Hu P, Cheng D, Huang T, Banizs AB, Xiao J, Liu G, Chen Q, Wang Y, He J, Shi H** (2017) Evaluation of novel ⁶⁴Cu-labeled theranostic gadolinium-based nanoprobe in HepG2 tumor-bearing nude mice. *Nanoscale Research Letters*, 12(1): 523
87. **Huang JJ, Gardenier JC, Hespe GE, García Nores GD, Kataru RP, Ly CL, Martínez-Corral I, Ortega S, Mehrara BJ** (2016) Lymph node transplantation decreases swelling and restores immune responses in a transgenic model of lymphedema. *PLoS ONE*, 11(12): e0168259
88. **Ito R, Suami H** (2014) Overview of lymph node transfer for lymphedema treatment. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 134(3): 548–556
89. **Ito R, Zelken J, Yang CY, Lin CY, Cheng MH** (2016) Proposed pathway and mechanism of vascularized lymph node flaps. *Gynecologic Oncology*, 141(1): 182–188
90. **Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ** (2012) Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 298: 229–317
91. **Kanter MA, Slavin SA, Kaplan W** (1990) An experimental model for chronic lymphedema. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 85(4): 573–580
92. **Kaplan-Marans E, Fulla J, Tomer N, Bilal K, Palese M** (2019) Indocyanine green (ICG) in urologic surgery. *Urology*, 132: 10–17
93. **Karaman S, Detmar M** (2014) Mechanisms of lymphatic metastasis. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(3): 922–928
94. **Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K** (2004) Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nature Immunology*, 5(1): 74–80
95. **Kataru RP, Baik JE, Park HJ, Wiser I, Rehal S, Shin JY, Mehrara BJ** (2019) Regulation of immune function by the lymphatic system in lymphedema. *Frontiers in Immunology*, 10: 470
96. **Kaulesar Sukul DM, den Hoed PT, Johannes EJ, van Dolder R, Benda E** (1993) Direct and indirect methods for the quantification of leg volume: Comparison between water displacement volumetry, the disk model method and the frustum sign model method, using the correlation coefficient and the limits of agreement. *Journal of Biomedical Engineering*, 15(6): 477–480

97. **Kerjaschki D, Regele HM, Moosberger I, Nagy-Bojarski K, Watschinger B, Soleiman A, Birner P, Krieger S, Hovorka A, Silberhumer G, Laakkonen P, Petrova T, Langer B, Raab** (2004) Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(3): 603–612
98. **Kettle JH, Rundle FF, Oddie TH** (1958) Measurement of upper limb volumes: A clinical method. *The Australian and New Zealand Journal of Surgery*, 27(4): 263–270
99. **Kim C, Erpelding TN, Jankovic L, Pashley MD, Wang LV** (2010) Deeply penetrating in vivo photoacoustic imaging using a clinical ultrasound array system. *Biomedical Optics Express*, 1(1): 278–284
100. **Kim H, Kataru RP, Koh GY** (2014) Inflammation-associated lymphangiogenesis: A double-edged sword? *The Journal of Clinical Investigation*, 124(3): 936–942
101. **Kinmonth JB** (1965) Primary lymphoedema of the lower limb. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 58(12): 1021–1023
102. **Kinmonth JB, Wolfe JH** (1980) Fibrosis in the lymph nodes in primary lymphoedema. Histological and clinical studies in 74 patients with lower-limb oedema. *Annals of The Royal College of Surgeons of England*, 62(5): 344–354
103. **Klein JA** (1990) Tumescence technique for regional anesthesia permits lidocaine doses of 35 mg/kg for liposuction. *The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology*, 16(3): 248–263
104. **Kobayashi H, Kawamoto S, Choyke PL, Sato N, Knopp MV, Star RA, Waldmann TA, Tagaya Y, Brechbiel MW** (2003) Comparison of dendrimer-based macromolecular contrast agents for dynamic micro-magnetic resonance lymphangiography. *Magnetic Resonance in Medicine*, 50(4): 758–766
105. **Kos S, Haueisen H, Lachmund U, Roeren T** (2007) Lymphangiography: Forgotten tool or rising star in the diagnosis and therapy of postoperative lymphatic vessel leakage. *Cardiovascular and Interventional Radiology*, 30(5): 968–973
106. **Koshima I, Nanba Y, Tsutsui T, Takahashi Y, Itoh S** (2003) Long-term follow-up after lymphaticovenular anastomosis for lymphedema in the leg. *Journal of Reconstructive Microsurgery*, 19(4): 209–215
107. **Koshima I, Narushima M, Yamamoto Y, Mihara M, Iida T** (2012) Recent advancement on surgical treatments for lymphedema. *Annals of Vascular Diseases*, 5(4): 409–415
108. **Kotb S, Detappe A, Lux F, Appaix F, Barbier EL, Tran VL, Plissonneau M, Gehan H, Lefranc F, Rodriguez-Lafrasse C, Verry C, Berbeco R, Tillement O, Sancey L** (2016) Gadolinium-based nanoparticles and radiation therapy for multiple brain melanoma metastases: Proof of concept before phase I trial. *Theranostics*, 6(3): 418–427
109. **Kukk AF, Scheling F, Panzer R, Emmert S, Roth B** (2023) Combined ultrasound and photoacoustic C-mode imaging system for skin lesion assessment. *Scientific Reports*, 13(1): 17947
110. **Kuprash DV, Nedospasov SA** (2016) Molecular and cellular mechanisms of inflammation. *Biokhimiia*, 81(11): 1237–1239
111. **Kusano M, Tajima Y, Yamazaki K, Kato M, Watanabe M, Miwa M** (2008) Sentinel node

- mapping guided by indocyanine green fluorescence imaging: A new method for sentinel node navigation surgery in gastrointestinal cancer. *Digestive Surgery*, 25(2): 103–108
112. **Kwan ML, Cohn JC, Armer JM, Stewart BR, Cormier JN** (2011) Exercise in patients with lymphedema: A systematic review of the contemporary literature. *Journal of Cancer Survivorship*, 5(4): 320–336
113. **Kwiecien GJ, Uygur S, Korn J, Gharb BB, Madajka M, Djohan R, Zins JE, Schwarz GS** (2015) Vascularized axillary lymph node transfer: A novel model in the rat: A new vascularized lymph node transfer model. *Microsurgery*, 35(8): 662–667
114. **Kwon S, Agollah GD, Wu G, Sevick-Muraca EM** (2014) Spatio-temporal changes of lymphatic contractility and drainage patterns following lymphadenectomy in mice. *PLoS ONE*, 9(8): e106034
115. **Lähteenvuo M, Honkonen K, Tervala T, Tammela T, Suominen E, Lähteenvuo J, Kholová I, Alitalo K, Ylä-Herttuala S, Saaristo A** (2011) Growth factor therapy and autologous lymph node transfer in lymphedema. *Circulation*, 123(6): 613–620
116. **Le Duc G, Miladi I, Alric C, Mowat P, Bräuer-Krisch E, Bouchet A, Khalil E, Billotey C, Janier M, Lux F, Epicier T, Perriat P, Roux S, Tillement O** (2011) Toward an image-guided microbeam radiation therapy using gadolinium-based nanoparticles. *ACS Nano*, 5(12): 9566–9574
117. **Lediju Bell MA, Ostrowski AK, Li K, Kazanzides P, Bector EM** (2015) Localization of transcranial targets for photoacoustic-guided endonasal surgeries. *Photoacoustics*, 3(2): 78–87
118. **Lee-Donaldson L, Witte MH, Bernas M, Witte CL, Way D, Stea B** (1999) Refinement of a rodent model of peripheral lymphedema. *Lymphology*, 32(3): 111–117
119. **Liao S, von der Weid PY** (2014) Inflammation-induced lymphangiogenesis and lymphatic dysfunction. *Angiogenesis*, 17(2): 325–334
120. **Liu NF, Yan ZX, Wu XF** (2012) Classification of lymphatic-system malformations in primary lymphoedema based on MR lymphangiography. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 44(3): 345–349
121. **Liu NF, Lu Q, Jiang ZH, Wang CG, Zhou JG** (2009) Anatomic and functional evaluation of the lymphatics and lymph nodes in diagnosis of lymphatic circulation disorders with contrast magnetic resonance lymphangiography. *Journal of Vascular Surgery*, 49(4): 980–987
122. **Liu NF, Lu Q, Liu PA, Wu XF, Wang BS** (2010) Comparison of radionuclide lymphoscintigraphy and dynamic magnetic resonance lymphangiography for investigating extremity lymphoedema. *The British Journal of Surgery*, 97(3): 359–365
123. **Lohrmann C, Foeldi E, Bartholomae JP, Langer M** (2007) Gadoteridol for MR imaging of lymphatic vessels in lymphoedematous patients: Initial experience after intracutaneous injection. *The British Journal of Radiology*, 80(955): 569–573
124. **Lohrmann C, Foeldi E, Langer M** (2009) MR imaging of the lymphatic system in patients with lipedema and lipo-lymphedema. *Microvascular Research*, 77(3): 335–339
125. **Lohrmann C, Foeldi E, Speck O, Langer M** (2006) High-resolution MR lymphangiography in patients with primary and secondary lymphedema. *American Journal of Roentgenology*, 187(2): 556–561

126. **Lu Q, Delproposto Z, Hu A, Tran C, Liu N, Li Y, Xu J, Bui D, Hu J** (2012) MR lymphography of lymphatic vessels in lower extremity with gynecologic oncology-related lymphedema. *PloS One*, 7(11): e50319
127. **Lu Q, Hua J, Kassir MM, Delproposto Z, Dai Y, Sun J, Haacke M, Hu J** (2013) Imaging lymphatic system in breast cancer patients with magnetic resonance lymphangiography. *PLoS ONE*, 8(7): e69701
128. **Luchette M, Korideck H, Makrigiorgos M, Tillement O, Berbeco R** (2014) Radiation dose enhancement of gadolinium-based AGuIX nanoparticles on HeLa cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10(8): 1751–1755
129. **Lüllmann-Rauch R** (2019) Taschenlehrbuch Histologie. *Thieme Verlag*, 6: 357–389
130. **Lux F, Detappe A, Dufort S, Sancey L, Louis C, Carme S, Tillement O** (2015) Ultrasmall nanoparticles for radiotherapy: AGuIX. *Cancer Radiotherapie: Journal De La Societe Francaise De Radiotherapie Oncologique*, 19(6–7): 508–514
131. **Lux F, Mignot A, Mowat P, Louis C, Dufort S, Bernhard C, Denat F, Boschetti F, Brunet C, Antoine R, Dugourd P, Laurent S, Elst LV, Muller R, Sancey L, Josserand V, Coll JL, Stupar V, Barbier E, Rémy C, Broisat A, Ghezzi C, Le Duc G, Roux S, Perriat P, Tillement O** (2011) Ultrasmall rigid particles as multimodal probes for medical applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(51): 12299–12303
132. **Lux F, Tran VL, Thomas E, Dufort S, Rossetti F, Martini M, Truillet C, Doussineau T, Bort G, Denat F, Boschetti F, Angelovski G, Detappe A, Crémillieux Y, Mignet N, Doan BT, Larrat B, Meriaux S, Barbier E, Roux S, Fries P, Müller A, Abadjian MC, Anderson C, Canet-Soulas E, Bouziotis P, Barberi-Heyob M, Frochot C, Verry C, Balosso J, Evans M, Sidi-Boumedine J, Janier M, Butterworth K, McMahon S, Prise K, Aloy MT, Ardail D, Rodriguez-Lafrasse C, Porcel E, Lacombe S, Berbeco R, Allouch A, Perfettini JL, Chargari C, Deutsch E, Le Duc G, Tillement O** (2019) AGuIX® from bench to bedside—Transfer of an ultrasmall theranostic gadolinium-based nanoparticle to clinical medicine. *The British Journal of Radiology*, 92(1093): 20180365
133. **Macey H** (1948) A surgical procedure for lymphoedema of the extremities: A follow-up report. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 30(2): 339–346
134. **Mallidi S, Watanabe K, Timerman D, Schoenfeld D, Hasan T** (2015) Prediction of tumor recurrence and therapy monitoring using ultrasound-guided photoacoustic imaging. *Theranostics*, 5(3): 289–301
135. **Mallon EC, Ryan TJ** (1994) Lymphedema and wound healing. *Clinics in Dermatology*, 12(1): 89–93
136. **Marchese E, Della Pepa GM, La Rocca G, Albanese A, Ius T, Simboli GA, Sabatino G** (2019) Application of indocyanine green video angiography in vascular neurosurgery. *Journal of Neurosurgical Sciences*, 63(6): 656–660
137. **Marto JP, Borbinha C, Calado S, Viana-Baptista M** (2016) The stroke chronometer - A new strategy to reduce door-to-needle time. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 25(9): 2305–2307
138. **Mathur M, Jones JR, Weinreb JC** (2020) Gadolinium deposition and nephrogenic systemic fibrosis: A radiologist's primer. *Radiographics: A Review Publication of the Radiological Society of North America*, 40(1): 153–162

139. **Matsumoto K, Ema M** (2014) Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours. *Journal of Biochemistry*, 156(1): 1–10
140. **Mavili ME, Naldoken S, Safak T** (1994) Modified Charles operation for primary fibrosclerotic lymphedema. *Lymphology*, 27(1): 14–20
141. **May JWJ, Chait LA, O'Brien BM, Hurley JV** (1978) The no-reflow phenomenon in experimental free flaps. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 61(2): 256
142. **Megens AM, Harris SR, Kim-Sing C, McKenzie DC** (2001) Measurement of upper extremity volume in women after axillary dissection for breast cancer. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 82(12): 1639–1644
143. **Messner F, Grahammer J, Hautz T, Brandacher G, Schneeberger S** (2016) Ischemia/reperfusion injury in vascularized tissue allotransplantation: Tissue damage and clinical relevance. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 21(5): 503–509
144. **Mihara M, Hara H, Araki J, Kikuchi K, Narushima M, Yamamoto T, Iida T, Yoshimatsu H, Murai N, Mitsui K, Okitsu T, Koshima I** (2012) Indocyanine green (ICG) lymphography is superior to lymphoscintigraphy for diagnostic imaging of early lymphedema of the upper limbs. *PLoS ONE*, 7(6): e38182
145. **Miladi I, Aloy MT, Armandy E, Mowat P, Kryza D, Magné N, Tillement O, Lux F, Billotey C, Janier M, Rodriguez-Lafrasse C** (2015) Combining ultrasmall gadolinium-based nanoparticles with photon irradiation overcomes radioresistance of head and neck squamous cell carcinoma. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(1): 247–257
146. **Mortimer PS** (2000) Swollen lower limb—2: Lymphoedema. *British Medical Journal*, 320(7248): 1527–1529
147. **Mortimer PS, Rockson SG** (2014) New developments in clinical aspects of lymphatic disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(3): 915–921
148. **Mowat P, Mignot A, Rima W, Lux F, Tillement O, Roulin C, Dutreix M, Bechet D, Huger S, Humbert L, Barberi-Heyob M, Aloy MT, Armandy E, Rodriguez-Lafrasse C, Le Duc G, Roux S, Perriat P** (2011) In vitro radiosensitizing effects of ultrasmall gadolinium-based particles on tumour cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11(9): 7833–7839
149. **Munn LL, Padera TP** (2014) Imaging the lymphatic system. *Microvascular Research*, 96: 55–63
150. **Murry CE, Jennings RB, Reimer KA** (1986) Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5): 1124–1136
151. **Nandy S, Mostafa A, Hagemann IS, Powell MA, Amidi E, Robinson K, Mutch DG, Siegel C, Zhu Q** (2018) Evaluation of ovarian cancer: Initial application of coregistered photoacoustic tomography and US. *Radiology*, 289(3): 740–747
152. **Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC, Lyman S, Paddock C, Muller WA** (1990) PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*, 247(4947): 1219–1222
153. **Nguyen DH, Chou PY, Hsieh YH, Momeni A, Fang YHD, Patel KM, Yang CY, Cheng MH** (2016) Quantity of lymph nodes correlates with improvement in lymphatic drainage in treatment of hind limb lymphedema with lymph node flap transfer in rats: Lymph node

- flap transferred in rat model. *Microsurgery*, 36(3): 239–245
154. **Notohamiprodjo M, Baumeister RGH, Jakobs TF, Bauner KU, Boehm HF, Horng A, Reiser MF, Glaser C, Herrmann KA** (2009) MR-lymphangiography at 3.0 T- a feasibility study. *European Radiology*, 19(11): 2771–2778
155. **Notohamiprodjo M, Weiss M, Baumeister RGH, Sommer WH, Helck A, Crispin A, Reiser MF, Herrmann KA** (2012) MR lymphangiography at 3.0 T: Correlation with lymphoscintigraphy. *Gastrointestinal Imaging*, 264(1): 78–87
156. **Nykänen AI, Sandelin H, Krebs R, Keränen MAI, Tuuminen R, Kärpänen T, Wu Y, Pytowski B, Koskinen PK, Ylä-Herttuala S, Alitalo K, Lemström KB** (2010) Targeting lymphatic vessel activation and CCL21 production by vascular endothelial growth factor receptor-3 inhibition has novel immunomodulatory and antiarteriosclerotic effects in cardiac allografts. *Circulation*, 121(12): 1413–1422
157. **Oashi K, Furukawa H, Nishihara H, Ozaki M, Oyama A, Funayama E, Hayashi T, Kuge Y, Yamamoto Y** (2013) Pathophysiological characteristics of melanoma in-transit metastasis in a lymphedema mouse model. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(2): 537–544
158. **Oashi K, Furukawa H, Oyama A, Funayama E, Hayashi T, Saito A, Yamamoto Y** (2012) A new model of acquired lymphedema in the mouse hind limb: A preliminary report. *Annals of Plastic Surgery*, 69(5): 565–568
159. **Ogata F, Azuma R, Kikuchi M, Koshima I, Morimoto Y** (2007) Novel lymphography using indocyanine green dye for near-infrared fluorescence labeling. *Annals of Plastic Surgery*, 58(6): 652–655
160. **Ogata F, Narushima M, Mihara M, Azuma R, Morimoto Y, Koshima I** (2007) Intraoperative lymphography using indocyanine green dye for near-infrared fluorescence labeling in lymphedema. *Annals of Plastic Surgery*, 59(2): 180–184
161. **Ohtani O, Ohtani Y** (2008) Structure and function of rat lymph nodes. *Archives of Histology and Cytology*, 71(2): 69–76
162. **Olszewski WL** (2012) The pathophysiology of lymphedema – 2012. *Handchirurgie · Mikrochirurgie · Plastische Chirurgie*, 44(6): 322–328
163. **Olszewski WL, Engeset A, Romaniuk A, Grzelak I, Ziolkowski A** (1990) Immune cells in peripheral lymph and skin of patients with obstructive lymphedema. *Lymphology*, 23(1): 23–33
164. **O'Mahony S, Rose SL, Chilvers AJ, Ballinger JR, Solanki CK, Barber RW, Mortimer PS, Purushotham AD, Peters AM** (2004) Finding an optimal method for imaging lymphatic vessels of the upper limb. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 31(4): 555–563
165. **Ongstad EL, Bouta EM, Roberts JE, Uzarski JS, Gibbs SE, Sabel MS, Cimmino VM, Roberts MA, Goldman J** (2010) Lymphangiogenesis-independent resolution of experimental edema. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 299(1): 46–54
166. **Ornellas FM, Ornellas DS, Martini SV, Castiglione RC, Ventura GM, Rocco PR, Gutfilen B, de Souza SA, Takiya CM, Morales MM** (2017) Bone marrow-derived mononuclear cell therapy accelerates renal ischemia-reperfusion injury recovery by modulating inflammatory, antioxidant and apoptotic related molecules. *Cellular*

- Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 41(5): 1736–1752
167. **Pain SJ, Vowler S, Purushotham AD** (2005) Axillary vein abnormalities contribute to development of lymphoedema after surgery for breast cancer. *The British Journal of Surgery*, 92(3): 311–315
168. **Paskett ED, Stark N** (2000) Lymphedema: Knowledge, treatment, and impact among breast cancer survivors. *The Breast Journal*, 6(6): 373–378
169. **Patel KM, Lin CY, Cheng MH** (2015) A prospective evaluation of lymphedema-specific quality-of-life outcomes following vascularized lymph node transfer. *Annals of Surgical Oncology*, 22(7): 2424–2430
170. **Peach CJ, Mignone VW, Arruda MA, Alcobia DC, Hill SJ, Kilpatrick LE, Woolard J** (2018) Molecular pharmacology of VEGF-A isoforms: Binding and signalling at VEGFR2. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4): 1264
171. **Pellico J, Ellis CM, Davis JJ** (2019) Nanoparticle-based paramagnetic contrast agents for magnetic resonance imaging. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2019: 1845637
172. **Perrault DP, Lee GK, Bouz A, Sung C, Yu R, Pourmousa AJ, Park SY, Kim GH, Jiao W, Patel KM, Hong YK, Wong AK** (2020) Ischemia and reperfusion injury in superficial inferior epigastric artery-based vascularized lymph node flaps. *PloS One*, 15(1): e0227599
173. **Piller N, Douglass J, Heidenreich B, Moseley A** (2019) Placebo controlled trial of mild electrical stimulation. *Journal of Lymphoedema*, 5(1): 15–25
174. **Pons G, Clavero JA, Alomar X, Rodríguez-Bauza E, Tom LK, Masia J** (2019) Preoperative planning of lymphaticovenous anastomosis: The use of magnetic resonance lymphangiography as a complement to indocyanine green lymphography. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 72(6): 884–891
175. **Porcel E, Liehn S, Remita H, Usami N, Kobayashi K, Furusawa Y, Le Sech C, Lacombe S** (2010) Platinum nanoparticles: A promising material for future cancer therapy? *Nanotechnology*, 21(8): 85103
176. **Prucz R, Friedrich J** (2014) Upper extremity replantation: Current concepts. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 133(2): 333–342
177. **Randolph GJ, Ivanov S, Zinselmeyer BH, Scallan JP** (2017) The lymphatic system: Integral roles in immunity. *Annual Review of Immunology*, 35: 31–52
178. **Rane S, Donahue PMC, Towse T, Ridner S, Chappell M, Jordi J, Gore J, Donahue MJ** (2013) Clinical feasibility of noninvasive visualization of lymphatic flow with principles of spin labeling MR imaging: Implications for lymphedema assessment. *Radiology*, 269(3): 893–902
179. **Rasic D, Wirenfeldt M, Askou AL, Corydon TJ, Telinius N** (2023) Local adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor C induces lymphangiogenesis in the conjunctiva in rabbits. *Ophthalmic Research*, 66(1): 1128–1138
180. **Reinländer C** (2003) MRT-Kontrastmittel für das Knochenmark: Vergleichende experimentelle Untersuchungen von USPIO, SPIO und Gd-DOTA. *Dissertation. Medizinische Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster*

181. **Rich LJ, Seshadri M** (2015) Photoacoustic imaging of vascular hemodynamics: Validation with blood oxygenation level-dependent MR imaging. *Radiology*, 275(1): 110–118
182. **Rissanen TT, Markkanen JE, Gruchala M, Heikura T, Puranen A, Kettunen MI, Kholová I, Kauppinen RA, Achen MG, Stacker SA, Alitalo K, Ylä-Herttuala S** (2003) VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circulation Research*, 92(10): 1098–1106
183. **Rohrer M, Bauer H, Mintorovitch J, Requardt M, Weinmann HJ** (2005) Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Investigative Radiology*, 40(11): 715–724
184. **Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Puzsai L, Bloom KJ** (2003) The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: Biomarker and target of therapy. *The Oncologist*, 8(4): 307–325
185. **Ruehm SG, Schroeder T, Debatin JF** (2001) Interstitial MR lymphography with gadoterate meglumine: Initial experience in humans. *Radiology*, 220(3): 816–821
186. **Runowicz CD** (1998) Lymphedema: Patient and provider education: Current status and future trends. *Cancer*, 83(12): 2874–2876
187. **Saaristo AM, Niemi TS, Viitanen TP, Tervala TV, Hartiala P, Suominen EA** (2012) Microvascular breast reconstruction and lymph node transfer for postmastectomy lymphedema patients. *Annals of Surgery*, 255(3): 468–473
188. **Sachanandani NS, Chu SY, Ho OA, Cheong CF, Lin MCY, Cheng MH** (2018) Lymphedema and concomitant venous comorbidity in the extremity: Comprehensive evaluation, management strategy, and outcomes. *Journal of Surgical Oncology*, 118(6): 941–952
189. **Sancey L, Lux F, Kotb S, Roux S, Dufort S, Bianchi A, Crémillieux Y, Fries P, Coll JL, Rodriguez-Lafrasse C, Janier M, Dutreix M, Barberi-Heyob M, Boschetti F, Denat F, Louis C, Porcel E, Lacombe S, Le Duc G, Deutsch E, Perfettini JL, Detappe A, Verry C, Berbeco R, Butterworth KT, McMahon SJ, Prise KM, Perriat P, Tillement O** (2014) The use of theranostic gadolinium-based nanoprobe to improve radiotherapy efficacy. *The British Journal of Radiology*, 87(1041): 20140134
190. **Scaglioni MF, Arvanitakis M, Chen YC, Giovanoli P, Yang JCS, Chang EI** (2018) Comprehensive review of vascularized lymph node transfers for lymphedema: Outcomes and complications. *Microsurgery*, 38(2): 222–229
191. **Schaverien MV, Badash I, Patel KM, Selber JC, Cheng MH** (2018) Vascularized lymph node transfer for lymphedema. *Seminars in Plastic Surgery*, 32(1): 28–35
192. **Schick F** (2005) Grundlagen der Magnetresonanztomographie (MRT). *Der Radiologe*, 45(1): 69–88
193. **Schlegel A, Kron P, Graf R, Dutkowski P, Clavien PA** (2014) Warm vs. cold perfusion techniques to rescue rodent liver grafts. *Journal of Hepatology*, 61(6): 1267–1275
194. **Schuemann J, Berbeco R, Chithrani DB, Cho SH, Kumar R, McMahon SJ, Sridhar S, Krishnan S** (2016) Roadmap to clinical use of gold nanoparticles for radiation sensitization. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 94(1): 189–205

195. **Seckeler MD, Moedano L, Mustacich D, Kalb BT, Saranathan M, Galons JP, Witte MH** (2020) Non-contrast MR lymphography of rare lymphatic abnormalities. *Lymphology*, 53(3): 136–140
196. **Sevick-Muraca EM, Kwon S, Rasmussen JC** (2014) Emerging lymphatic imaging technologies for mouse and man. *Journal of Clinical Investigation*, 124(3): 905–914
197. **Shaw C, Mortimer P, Judd PA** (2007) A randomized controlled trial of weight reduction as a treatment for breast cancer-related lymphedema. *Cancer*, 110(8): 1868–1874
198. **Shimizu Y, Polavarapu R, Eskla K, Pantner Y, Nicholson CK, Ishii M, Brunnhoelzl D, Mauria R, Husain A, Naqvi N, Murohara T, Calvert JW** (2018) Impact of lymphangiogenesis on cardiac remodeling after ischemia and reperfusion injury. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*, 7(19): e009565
199. **Sistrunk WE** (1918) Further experiences with the Kondoléon operation for elephantiasis. *The Journal of the American Medical Association*, 71(10): 800
200. **Slavin SA, Van den Abbeele AD, Losken A, Swartz MA, Jain RK** (1999) Return of lymphatic function after flap transfer for acute lymphedema. *Annals of Surgery*, 229(3): 421–427
201. **Steinberg I, Huland DM, Vermesh O, Frostig HE, Tummers WS, Gambhir SS** (2019) Photoacoustic clinical imaging. *Photoacoustics*, 14: 77–98
202. **Tammela T, Saaristo A, Holopainen T, Lyytikä J, Kotronen A, Pitkonen M, Abo-Ramadan U, Ylä-Herttuala S, Petrova TV, Alitalo K** (2007) Therapeutic differentiation and maturation of lymphatic vessels after lymph node dissection and transplantation. *Nature Medicine*, 13(12): 1458–1466
203. **Tervala TV, Hartiala P, Tammela T, Visuri MT, Ylä-Herttuala S, Alitalo K, Saarikko AM** (2015) Growth factor therapy and lymph node graft for lymphedema. *The Journal of Surgical Research*, 196(1): 200–207
204. **Thompson B, Gaitatzis K, Janse de Jonge X, Blackwell R, Koelmeyer LA** (2021) Manual lymphatic drainage treatment for lymphedema: A systematic review of the literature. *Journal of Cancer Survivorship: Research and Practice*, 15(2): 244–258
205. **Thompson N** (1967) The surgical treatment of chronic lymphoedema of the extremities. *The Surgical Clinics of North America*, 47(2): 445–503
206. **Tinhofer IE, Yang CY, Chen C, Cheng MH** (2020) Impacts of arterial ischemia or venous occlusion on vascularized groin lymph nodes in a rat model. *Journal of Surgical Oncology*, 121(1): 153–162
207. **Titford M** (2005) The long history of hematoxylin. *Biotechnic & Histochemistry*, 80(2): 73–78
208. **Toi M, Asao Y, Matsumoto Y, Sekiguchi H, Yoshikawa A, Takada M, Kataoka M, Endo T, Kawaguchi-Sakita N, Kawashima M, Fakhrejahani E, Kanao S, Yamaga I, Nakayama Y, Tokiwa M, Torii M, Yagi T, Sakurai T, Togashi K, Shiina T** (2017) Visualization of tumor-related blood vessels in human breast by photoacoustic imaging system with a hemispherical detector array. *Scientific Reports*, 7: 41970
209. **Turkbey B, Czarniecki M, Shih JH, Harmon SA, Agarwal PK, Apolo AB, Citrin DE, Gulley JL, Harisinghani M, Madan RA, Metwalli AR, Paquette E, Pinto PA, Rais-**

- Bahrami S, Rowe LS, Wood BJ, Jacobs PM, Lindenberg L, Dahut W, Choyke PL** (2020) Ferumoxytol-enhanced MR lymphography for detection of metastatic lymph nodes in genitourinary malignancies: A prospective study. *American Journal of Roentgenology*, 214(1): 105–113
210. **Utzinger U, Baggett B, Weiss JA, Hoying JB, Edgar LT** (2015) Large scale time series microscopy of neovessel growth during angiogenesis. *Angiogenesis*, 18(3): 219–232
211. **Uzarski J, Drelles MB, Gibbs SE, Ongstad EL, Goral JC, McKeown KK, Raehl AM, Roberts MA, Pytowski B, Smith MR, Goldman J** (2008) The resolution of lymphedema by interstitial flow in the mouse tail skin. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 294(3): 1326–1334
212. **Verhey EM, Kandi LA, Lee YS, Morris BE, Casey WJ, Rebecca AM, Marks LA, Howard MA, Teven CM** (2022) Outcomes of lymphovenous anastomosis for lower extremity lymphedema: A systematic review. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 10(10): e4529
213. **Verry C, Dufort S, Barbier EL, Montigon O, Peoc'h M, Chartier P, Lux F, Balosso J, Tillement O, Sancey L, Le Duc G** (2016) MRI-guided clinical 6-MV radiosensitization of glioma using a unique gadolinium-based nanoparticles injection. *Nanomedicine*, 11(18): 2405–2417
214. **Viitanen TP, Visuri MT, Hartiala P, Mäki MT, Seppänen MP, Suominen EA, Saaristo AM** (2013) Lymphatic vessel function and lymphatic growth factor secretion after microvascular lymph node transfer in lymphedema patients. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1(2): 1–9
215. **Viitanen TP, Visuri MT, Sulo E, Saarikko AM, Hartiala P** (2015) Anti-inflammatory effects of flap and lymph node transfer. *The Journal of Surgical Research*, 199(2): 718–725
216. **Visuri MT, Honkonen KM, Hartiala P, Tervala TV, Halonen PJ, Junkkari H, Knuutinen N, Ylä-Herttuala S, Alitalo KK, Saarikko AM** (2015) VEGF-C and VEGF-C156S in the pro-lymphangiogenic growth factor therapy of lymphedema: A large animal study. *Angiogenesis*, 18(3): 313–326
217. **Wang GY, Zhong SZ** (1985) A model of experimental lymphedema in rats' limbs. *Microsurgery*, 6(4): 204–210
218. **Wang H, Sebré C, Judé S, Maurin A, Rétif S, Le Mée M, Julea F, Dubuisson RM, Willoquet G, Bouazizi K, Darrasse L, Guillot G, Maître X, de Rochefort L** (2018) Quantitative Gd-DOTA-based aerosol deposition mapping in the lungs of asthmatic rats using 3D UTE-MRI. *NMR in Biomedicine*, 31(12): e4013
219. **Ward J, King I, Monroy-Iglesias M, Russell B, van Hemelrijck M, Ramsey K, Khan AA** (2021) A meta-analysis of the efficacy of vascularised lymph node transfer in reducing limb volume and cellulitis episodes in patients with cancer treatment-related lymphoedema. *European Journal of Cancer*, 151: 233–244
220. **Weinmann HJ, Brasch RC, Press WR, Wesbey GE** (1984) Characteristics of gadolinium-DTPA complex: A potential NMR contrast agent. *American Journal of Roentgenology*, 142(3): 619–624
221. **Weishaupt D, Köchli VD, Marincek B** (2014) Wie funktioniert MRI?: Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung. *Springer Verlag Berlin Heidelberg*, 7

-
222. **Weiss HR, Grayson J, Liu X, Barsoum S, Shah H, Chi OZ** (2013) Cerebral ischemia and reperfusion increases the heterogeneity of local oxygen supply/consumption balance. *Stroke*, 44(9): 2553–2558
223. **Weissleder H, Weissleder R** (1988) Lymphedema: Evaluation of qualitative and quantitative lymphoscintigraphy in 238 patients. *Radiology*, 167(3): 729–735
224. **Weissleder H, Weissleder R** (1989) Interstitial lymphangiography: Initial clinical experience with a dimeric nonionic contrast agent. *Radiology*, 170(2): 371–374
225. **Wiig H, Swartz MA** (2012) Interstitial fluid and lymph formation and transport: Physiological regulation and roles in inflammation and cancer. *Physiological Reviews*, 92(3): 1005–1060
226. **Wilting J, Bartkowski R, Baumeister R, Földi E, Stöhr S, Strubel G, Schrader K, Traber J** (2017) S2k-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Lymphödeme
227. **Wray S, Cope M, Delpy DT, Wyatt JS, Reynolds EOR** (1988) Characterization of the near infrared absorption spectra of cytochrome aa3 and haemoglobin for the non-invasive monitoring of cerebral oxygenation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 933(1): 184–192
228. **Wu M, Du Y, Liu Y, He Y, Yang C, Wang W, Gao F** (2014) Low molecular weight hyaluronan induces lymphangiogenesis through LYVE-1-mediated signaling pathways. *PLoS ONE*, 9(3): e0092857
229. **Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai APY, Cheng YL, Cheng PW, Li CY, Li CJ** (2018) Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 46(4): 1650–1667
230. **Xiang M, Lu Y, Xin L, Gao J, Shang C, Jiang Z, Lin H, Fang X, Qu Y, Wang Y, Shen Z, Zhao M, Cui X** (2021) Role of oxidative stress in reperfusion following myocardial ischemia and its treatments. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021: 6614009
231. **Xiao YD, Paudel R, Liu J, Ma C, Zhang ZS, Zhou SK** (2016) MRI contrast agents: Classification and application. *International Journal of Molecular Medicine*, 38(5): 1319–1326
232. **Xu M, Wang LV** (2006) Photoacoustic imaging in biomedicine. *Review of Scientific Instruments*, 77(4): 041101
233. **Yamamoto T, Yamamoto N, Doi K, Oshima A, Yoshimatsu H, Todokoro T, Ogata F, Mihara M, Narushima M, Iida T, Koshima I** (2011) Indocyanine green-enhanced lymphography for upper extremity lymphedema: A novel severity staging system using dermal backflow patterns. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 128(4): 941–947
234. **Yang CY, Ho OA, Cheng MH, Hsiao HY** (2018) Critical ischemia time, perfusion, and drainage function of vascularized lymph nodes. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 142(3): 688–697
235. **Yang X, Wang LV** (2008) Monkey brain cortex imaging by photoacoustic tomography. *Journal of Biomedical Optics*, 13(4): 044009
236. **Yoshida RY, Kariya S, Ha-Kawa S, Tanigawa N** (2016) Lymphoscintigraphy for imaging of the lymphatic flow disorders. *Techniques in Vascular and Interventional Radiology*, 19(4): 273–276

-
237. **Zampell JC, Yan A, Elhadad S, Avraham T, Weitman E, Mehrara BJ** (2012) CD4+ cells regulate fibrosis and lymphangiogenesis in response to lymphatic fluid stasis. *PLoS ONE*, 7(11): e49940
238. **Zhai Y, Petrowsky H, Hong JC, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW** (2013) Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation—From bench to bedside. *Gastroenterology & Hepatology*, 10(2): 79–89
239. **Zhou Z, Lu ZR** (2013) Gadolinium-based contrast agents for MR cancer imaging. *Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 5(1): 1–18

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich an alle Beteiligten meinen herzlichen Dank aussprechen, die mich während der Anfertigung meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. med. Michael D. Menger für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie an der Universität des Saarlandes.

Herrn Prof. Dr. med. Matthias W. Laschke danke ich für die lehrreiche Zeit, die ständige und uneingeschränkte Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft sowie für die große Unterstützung beim Anfertigen dieser Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Florian Früh für die einzigartige Betreuung, die enge Zusammenarbeit und die Anleitung in den verschiedenen mikrochirurgischen Techniken sowie dem Durchführen der Experimente. Er stand mir als Mentor stets mit hilfreichen Ratschlägen, konstruktiver Kritik und Geduld zur Seite und hat mir den Weg für meinen weiteren beruflichen Werdegang gebahnt.

Außerdem möchte ich mich bei allen MitarbeiterInnen des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie für die großartige Arbeitsatmosphäre und die außerordentliche Hilfsbereitschaft bedanken. Insbesondere danke ich Herrn Dr. rer. med. Andreas Müller für die zeitaufwendige Unterstützung bei der MR-Bildgebung sowie Frau Dr. rer. nat. Claudia Scheuer, Frau Janine Becker und Frau Caroline Bickelmann, die mir bei den Laboranalysen und der Anfertigung histologischer und immunhistochemischer Schnitte stets zur Seite standen. Außerdem danke ich Frau Dr. med. vet. Christina Körbel für die Unterstützung im Rahmen der photoakustischen Bildgebung sowie allen TierpflegerInnen.

Zuletzt danke ich meinen FreundInnen und meiner Familie für die Unterstützung in allen Lebenslagen. Ohne sie wäre dieser Weg nicht möglich gewesen.

10. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht

11. Publikationen

Aus dieser Dissertation sind folgende Publikationen entstanden:

Müller A, Fries P, **Jelvani B**, Lux F, Rübe CE, Kremp S, Giovanoli P, Buecker A, Menger MD, Laschke MW, Frueh FS (2017) Magnetic resonance lymphography at 9.4 T using a gadolinium-based nanoparticle in rats: Investigations in healthy animals and in a hindlimb lymphedema model. *Investigative Radiology*, 52(12): 725–733

Frueh FS, **Jelvani B**, Scheuer C, Körbel C, Kim BS, Giovanoli P, Lindenblatt N, Harder Y, Ampofo E, Menger MD, Laschke MW (2020) Short-term molecular and cellular effects of ischemia/reperfusion on vascularized lymph node flaps in rats. *PLoS One*, 15(10): e0239517

Tag der Promomotion:	05.12.2025
Dekan:	Prof. Dr. M. Hannig
Berichterstatter:	Prof. M. Menger
	PD F. Rosar