

Aus der Klinik für Augenheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluß der Photodynamischen Therapie (PDT) auf Angiogenese-
faktoren beim Aderhautmelanom und bei choroidalen
Neovaskularisationen (CNV)

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sibylle Thormann
aus Hamburg

Gutachter : 1. Priv.- Doz. Dr. med. J. Wachtlin
 2. Priv.- Doz. Dr. med. A. Liekfeld
 3. Priv.- Doz. Dr. med. C. Wirbelauer

Datum der Promotion: 18.09.2009

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	5
1.1. DAS ADERHAUTMELANOM	5
1.2. DIE CHOROIDALE NEOVASKULARISATION (CNV).....	7
1.2.1. <i>CNV bei der altersbedingten Makuladegeneration (AMD)</i>	9
1.2.2. <i>Andere Ursachen einer CNV</i>	10
1.3. ANGIOGENESE.....	11
1.3.1. <i>Angiogenese bei malignen Tumoren</i>	13
1.3.2. <i>Angiogenese bei der choroidalen Neovaskularisation</i>	13
1.4. STAND DER FORSCHUNG BEZÜGLICH DER ANGIOGENESEFAKTOREN.....	14
1.4.1. <i>Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und der Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor (VEGFR)</i>	14
1.4.2. <i>Das VEGF/VEGFR-System bei der Angiogenese</i>	16
1.4.3. <i>Der Pigment Epithelium Derived Factor (PEDF)</i>	18
1.4.4. <i>Der PEDF bei der Angiogenese</i>	19
1.4.5. <i>Klinische Bedeutung des VEGF/VEGFR-Systems und des PEDF</i>	19
1.5. DIE PHOTODYNAMISCHE THERAPIE (PDT)	20
1.5.1. <i>PDT zur Behandlung choroidaler Neovaskularisationen</i>	21
1.5.2. <i>PDT zur Behandlung uvealer Melanome</i>	22
1.5.3. <i>Einfluss der PDT auf Angiogenesefaktoren</i>	22
2. FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	24
3. MATERIAL UND METHODEN	26
3.1. VERSUCHSAUFBAU	26
3.1.1. <i>CNV-Membranen</i>	26
3.1.2. <i>Aderhautmelanome</i>	26
3.2. DURCHFÜHRUNG DER PHOTODYNAMISCHEN THERAPIE	27
3.2.1. <i>Behandlung der CNV-Membranen</i>	27
3.2.2. <i>Behandlung der Aderhautmelanome</i>	27
3.3. HERSTELLUNG DER PRÄPARATE.....	28
3.4. IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	28
3.4.1. <i>Prinzip der APAAP-Methode</i>	29
3.4.2. <i>Kurzprotokoll der APAAP-Methode</i>	30
3.4.3. <i>Reagenzien für die APAAP-Methode</i>	32
3.4.4. <i>Verwendete Antikörper</i>	33
3.5. ERHEBUNG DER DATEN UND STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	36
4. ERGEBNISSE	38
4.1. ERGEBNISSE CNV-MEMBRANEN	38
4.1.1. <i>Klinische Charakteristika und Histologie der CNV-Membranen</i>	38

4.1.2. Vergleich der mit der PDT behandelten CNV-Membranen mit den unbehandelten CNV-Membranen	40
4.1.3. Korrelation von Markerkonzentration und Zeitintervall	50
4.2. ERGEBNISSE ADERHAUTMELANOME	53
5. DISKUSSION.....	65
5.1. CNV- MEMBRANEN NACH DER BEHANDLUNG MIT DER PDT	65
5.1.1. Marker für CD 31, CD 34, CD 105.....	65
5.1.2. VEGF	66
5.1.3. VEGF-Rezeptor Flt-1	67
5.1.4. PEDF	68
5.2. ADERHAUTMELANOME NACH DER BEHANDLUNG MIT DER PDT	70
5.2.1. Marker für CD 31, CD 34, CD 105.....	70
5.2.2. VEGF	71
5.2.3. VEGF-Rezeptor Flt-1	72
5.2.4. PEDF	73
5.3. SCHLUSSFOLGERUNG	74
6. ZUSAMMENFASSUNG	77
7. LITERATURVERZEICHNIS	79
8. ABKÜRZUNGS-, TABELLEN-, UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	95
8.1. ABKÜRZUNGEN.....	95
8.2. TABELLEN	97
8.3. ABBILDUNGEN	98
9. DANKSAGUNG.....	104
10. LEBENS LAUF.....	105
11. ERKLÄRUNG.....	106

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit untersucht Angiogenesefaktoren in humanen Aderhautmelanomen sowie chirurgisch exzidierten choroidalen Neovaskularisationsmembranen (CNV) nach der Behandlung mit der Photodynamischen Therapie (PDT). Einleitend wird daher zunächst ein Überblick über beide Krankheitsbilder sowie das Prinzip der Angiogenese gegeben.

1.1. Das Aderhautmelanom

Mit einer Inzidenz von 6-7 Fällen pro eine Million Einwohner pro Jahr tritt das Aderhautmelanom selten auf, es stellt jedoch die häufigste primär intraokuläre Neoplasie dar [43].

Dieser Tumor geht von pluripotenten Melanozyten der Aderhaut aus, die aus der Neuralleiste stammen, Melanomzellen sind neuroektodermaler Herkunft [97].



Abbildung 1: Fotografie eines peripapillären Aderhautmelanoms

Die exakte Ätiologie uvealer Melanome ist weiterhin unbekannt. Diskutiert wird die Beteiligung genetischer Faktoren wie eine Monosomie des Chromosoms 3 und eine Vermehrung von DNA-Anteilen des Chromosoms 8 in den Tumorzellen [71].

Abhängig von der Lage des Tumors in der Aderhaut manifestieren sich die Symptome des Melanoms in Form eines Visusverlusts oder einer Gesichtsfeldeinschränkung [97]. Ein Problem der Diagnostik besteht darin, dass diese Veränderungen meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung auftreten. Die Diagnose eines Aderhautmelanoms kann in nahezu allen Fällen (Diagnosesicherheit 95%) mittels klinischer Methoden wie der indirekten Ophthalmoskopie, der Sonographie, der Angio-

graphie (mit Fluoreszein oder Indocyangrün) und der Kernspintomographie gestellt werden [61, 97].

Da ein Lymphgefäßsystem im Auge und in der Orbita nicht vorhanden ist, erfolgt die Metastasierung primär hämatogen. Ca. 30% der Patienten mit einem malignen Melanom des Augenhintergrunds entwickeln innerhalb von 5 Jahren nach der initialen Diagnosestellung Metastasen in der Leber.

Die Prognose hängt von verschiedenen klinischen, genetischen, histopathologischen sowie zytologischen Faktoren ab. Klinische Faktoren beinhalten die Lokalisation, die Größe und die Form des Tumors sowie das Alter des Patienten, während histopathologisch der Zelltyp, die mitotische Aktivität, die Vaskularisierung des Tumors und eine eventuelle extrasklerale Ausdehnung zu beurteilen ist [137].

Als genetischer Risikofaktor hinsichtlich des Metastasierungsrisikos spielt das Vorhandensein einer Monosomie 3 eine signifikante Rolle [39].

Beim Zelltyp werden nach der modifizierten Callender-Klassifikation neben den gutartigen Spindelzellnävii drei Formen unterschieden: das Spindelzell-Melanom, das epitheloidzellhaltige Melanom sowie das gemischtzellige Melanom. Dabei wird das Auftreten von epitheloiden Tumorzellen als entscheidender, die Prognose negativ beeinflussender Faktor bewertet; die Ursache dafür ist noch nicht bekannt [97].

Es gilt mittlerweile als anerkannt und durch die prospektive COMS-Studie erwiesen, dass die Entscheidung für eine Enukleation oder für eine bulbuserhaltende Therapie keinen Unterschied in der Mortalität durch das maligne Melanom der Uvea bedeutet [35,137].

Aufgrund dieser relevanten Erkenntnisse wird im allgemeinen eine bulbuserhaltende Therapie angestrebt. Bei den etablierten Verfahren bestehen allerdings signifikante Unterschiede bezüglich der okulären Morbidität.

Zur Therapie des Aderhautmelanoms stehen, abhängig von der Lage und der Größe des Tumors, verschiedene Optionen zur Verfügung, bei denen es sich vornehmlich um radiotherapeutische oder operative Verfahren handelt. Als Beispiele sind die Brachytherapie mit radioaktiven Applikatoren (z.B. Ruthenium 106, Iod 125), die transpupillare Thermotherapie (TTT) oder die Protonenbestrahlung bei mittelgroßen Tumoren, verschiedene Resektionstechniken und vorhergehende Bestrahlung des Tumors unter Erhalt des Auges sowie die Enukleation oder Exenteratio bei großen Tumoren mit extraokulärem Wachstum aufzuführen [16,17,36,61,96,97].

1.2. Die choroidale Neovaskularisation (CNV)

Die choroidale Neovaskularisation (CNV) ist eine pathologische Proliferation von Kapillaren der Aderhaut durch die Bruch-Membran hindurch in den subretinalen Raum. Diese Gefäße befinden sich entweder zwischen der Neuroretina und dem retinalen Pigmentepithel (RPE), wie in Abb. 2 dargestellt, und werden als „klassisch“ bezeichnet, oder zwischen RPE und der Choroidea, wobei diese als „okkult“ bezeichnet werden [18, 98].

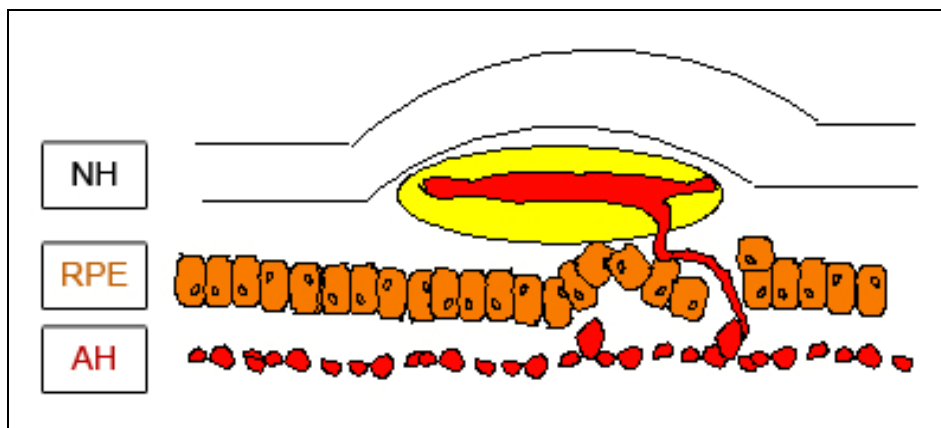


Abbildung 2: schematische Darstellung einer klassischen CNV mit Wachstum von Gefäßen aus der Aderhaut (AH) durch das retinale Pigmentepithel (RPE) unter die Netzhaut (NH).

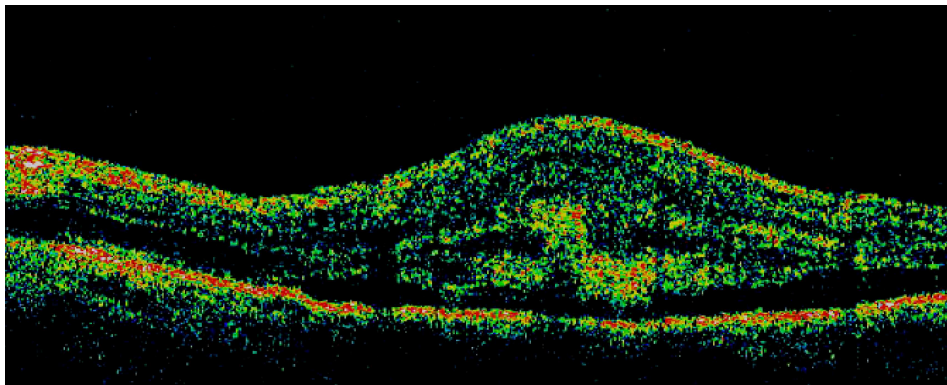


Abbildung 3: optische Kohärenztomographie (OCT): Schnitt durch die Schichten einer klassischen CNV mit Gefäßwachstum durch das RPE unter die Netzhaut

In der Folge ergeben sich vielfältige klinische Ausprägungen, wie z.B. Makulaödem, Blutungen oder Abhebung des retinalen Pigmentepithels.

Die Bildung choroidaler Neovaskularisationen stellt kein Krankheitsbild für sich dar, sondern tritt im Zusammenhang mit einer Reihe verschiedener Erkrankungen auf, die

mit einer Störung der Struktur von Netzhaut, des retinalen Pigmentepithels, Bruch'scher Membran und Choriokapillaris einhergehen [8,110,111,159].

Bei histologischer Betrachtung bestehen die CNV-Membranen aus zellulären Bestandteilen wie RPE-Zellen, Gefäßendothelien, Makrophagen, Fibrozyten und Photorezeptoren sowie aus extrazellulären Bestandteilen wie Kollagen, Fibrin und sogenannten Basal Lamina Deposits [141].

Eine wichtige Rolle bei der Induktion der Neovaskularisation spielen verschiedene angiogenetisch wirksame Wachstumsfaktoren, wie z.B. der vascular endothelial growth factor (VEGF) [121]. Die angestoßene Gefäßbildung führt zur Ausildung einer fibrovaskulären Gefäßmembran, die aus der Choriokapillaris durch die Bruch'sche Membran in den subretinalen Raum wächst und oben genannte Komplikationen hervorruft. Je länger die Exsudation und der Austritt von Flüssigkeit aus diesen Gefäßen besteht, desto größer ist der Schaden durch Degeneration bzw. Untergang der Photorezeptoren-Aussenglieder und des RPE mit nachfolgender Visusminderung [9].

Wie in Tabelle 1 dargestellt, ist die häufigste Ursache einer CNV die altersbedingte Makuladegeneration (AMD). An zweiter Stelle folgt die hohe Kurzsichtigkeit (Myopia magna). Seltenerer Formen sind die post-inflammatorische CNV und die idiopathische CNV. Weiterhin können viele andere Erkrankungen, in der Ausbildung von Neovaskularisationen mit nachfolgender Exsudation resultieren [157].

Tabelle 1: Mögliche Ursachen einer CNV mit exsudativer Makulopathie (modifiziert aus [159])

sehr häufig	AMD
relativ häufig	Myopia magna Z.n. Uveitis posterior Z.n. Entzündungen (z.B. POHS, PIC, multifokale Chorioiditis) Z.n. Laserkoagulation Z.n. chorioretinalen Narben
weniger häufig	idiopathische Genese Angioid streaks Trauma mit Aderhautruptur RPE Abhebung

selten (Auswahl)	RPE Hamartom Vogt Koyanagi Harada Syndrom Retinopathia centralis serosa Drusenpapille Aderhautmelanom M. Stargard M. Best Aderhauthämangiom (sowie alle anderen Erkrankungen des hinteren Augenpols)
-------------------------	--

1.2.1. CNV bei der altersbedingten Makuladegeneration (AMD)

Bei der altersbedingten Makuladegeneration handelt es sich um eine progrediente Erkrankung des zentralen Netzhaut-/Pigmentepithel-/Aderhaut-Komplexes, die in ein Frühstadium die - sog. altersbedingte Makulopathie (ARM)- und ein Spätstadium - die altersbedingte Makuladegeneration - eingeteilt wird. Bei der AMD kann zusätzlich eine „trockene“ (= nicht exsudative) von einer „feuchten“ (= exsudativen) Form unterschieden werden. Die „trockene“ Form geht mit dem Vorhandensein weicher Drusen sowie im Spätstadium mit einer geographischen Atrophie einher. Als „feuchte“ oder auch exsudative Variante wird die AMD bezeichnet, wenn Neovaskularisationen mit Exsudationen, RPE-Abhebungen oder Blutungen vorliegen [18].

Im Zusammenhang mit einer CNV wird dann die Diagnose einer AMD gestellt, wenn zusätzlich entweder Drusen und/oder Pimentepithelveränderungen vorhanden sind.

Die Prävalenz der AMD nimmt mit höherem Alter stark zu; in der Altersgruppe 65-74 Jahre beträgt sie ca. 1%, in der Altersgruppe 75-84 Jahre ca. 5% und bei Personen 85 Jahre und älter bis zu 13%. An der nicht exsudativen Form leiden ca. 85% der Betroffenen und an der exsudativen ca. 15% [85,139]. Obwohl lediglich ca. 15% der Patienten mit AMD von der exsudativen Form betroffen sind, ist die CNV die Haupterblindungsursache bei Patienten mit AMD [112] sowie die häufigste Erblindungsursache im höheren Alter in den westlichen Industrienationen [85].

Neben den Hauptrisikofaktoren Alter und weibliches Geschlecht erhöht sich das Risiko an einer AMD zu erkranken bei starken Rauchern sowie beim Vorliegen weicher Drusen [86,79]. Darüber hinaus wird der Einfluss weiterer Risikofaktoren wie z.B. eine geneti-

sche Prädisposition, eine erhöhte Lichtexposition, stattgefundene Operationen, die Ernährung sowie ein Polymorphismus des Komplementfaktor H – Gens diskutiert [8, 161].

1.2.2. Andere Ursachen einer CNV

Die Ausbildung einer CNV ist die häufigste visusmindernde Komplikation der hohen Myopie (Achsenlänge von > 26 mm oder einer Refraktion von $-6,0$ dpt). Es kann infolge der Dehnung und des Einreissens der Bruch'schen Membran zum Auftreten einer myopen Makulopathie mit Bildung von Blutungen und einer meist klassischen CNV kommen [66,107,157].

Weiterhin kann eine choroidale Neovaskularisation im Rahmen verschiedener entzündlicher Erkrankungen des hinteren Augenpols, wie zum Beispiel einer Pilzinfektion, dem okulären Histoplasmose-Syndrom (OHS) bzw. dem presumed ocular histoplasmosis syndrome (POHS) oder selteneren chorioretinalen Entzündungen wie der Punctate Inner Choriodopathy (PIC) oder der multifokalen Chorioiditis mit Panuveitis (MFCP) entstehen [157,158].

Selten auftretende Erkrankungen, die mit der Ausbildung einer CNV einhergehen können, sind z.B. „Angioid Streaks“, eine traumatische Aderhautruptur sowie hereditäre Makuladystrophien [157].

Die Diagnose einer idiopathischen CNV wird gestellt, wenn sonst keine ophthalmologische Grunderkrankung vorliegt, der Patient unter 50 Jahre alt ist und sich keine Anzeichen einer altersbedingten Makuladegeneration oder einer altersbedingten Makulopathie wie z.B. Drusen finden [157].

1.2.3 Klinik, Diagnostik und Therapie der CNV

Unabhängig von der jeweiligen Grunderkrankung weisen die meisten Patienten mit einer CNV eine ähnliche Symptomatik auf.

Infolge der exsudativen Makulopathie kommt es zu akuten bzw. subakuten Symptomen wie Metamorphopsien und Verschwommensehen. Diese Sehbeeinträchtigung fällt bei einseitigem Befall meist erst nach Abdecken des gesunden Auges auf. Im weiteren Verlauf führt die fortbestehende Exsudation zu einem zentralen Visusabfall mit Leseschwierigkeiten.

Ophthalmoskopisch deuten verschiedene Zeichen auf das Vorliegen einer CNV hin; die definitive Diagnose jedoch kann letztendlich nur mittels einer Fluoreszenzangiographie

gestellt werden [68]. Zusätzlich kann die Indocyaningrün-Angiographie zur Stellung der (Differential-)Diagnose herangezogen werden [56].

Die Auswahl an klinisch verfügbaren Therapieverfahren bei choroidaler Neovaskularisation umfasst neben den konventionellen Laserverfahren (Argon-, Krypton- oder Diodenlaser) [98,113] und der Photodynamischen Therapie [2,22,101,102,123] chirurgische Techniken wie beispielsweise die chirurgische Exzision oder die Makulatranslokation [23,55,84,151].

Weitere Ansätze beschäftigen sich mit der Beeinflussung der an der Entstehung einer CNV-Membran beteiligten angiogenetisch wirksamen Wachstumsfaktoren.

Unspezifisch auf die Gefäßbildung wirkt die Monotherapie mit Triamcinolon (intravitreal injiziert) [37,58]. Ein Kortikosteroid-Derivat zur parabolbären Anwendung mit vornehmlich antiangiogenetischer Wirkung ist das Anecortave Acetat (Retaane®).

Neuere pharmakotherapeutische Verfahren richten sich speziell gegen den Wachstumsfaktor VEGF, als Beispiele sind hier Pegaptanib (Macugen®) und Ranibizumab (Lucentis®) als zugelassene Präparate, sowie Bevacizumab (Avastin®) im off-label-use zu nennen [60,167].

1.3. Angiogenese

Unter dem Begriff „Angiogenese“ versteht man die Entwicklung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden Gefäßen [14], während die Vaskulogenese die Bildung von Blutgefäßen aus mesodermalen Vorläuferzellen, den Angioblasten, bezeichnet [117].

Nach dem Ablauf der ersten Gefäßbildung durch Vaskulogenese in der embryonalen Entwicklung erfolgt die Bildung des Gefäßsystems des menschlichen Körpers durch Angiogenese [117].

Neben physiologischen Prozessen wie beispielsweise der Embryogenese und der Wundheilung ist die Angiogenese auch an pathologischen Vorgängen beteiligt [32,69].

Es konnten bereits eine Reihe an der Angiogenese beteiligter Faktoren identifiziert werden, die je nach ihren Eigenschaften als Induktoren oder Inhibitoren der Gefäßbildung auftreten (s. Tab. 2). Im adulten Organismus ist unter physiologischen Bedingungen das Verhältnis von Induktion zu Inhibition ausgeglichen. Die genaue Interaktion dieser komplexen Vorgänge ist noch Gegenstand der Forschung [76, 77].

Tabelle 2: Übersicht über natürliche Angiogeneseaktivatoren und -inhibitoren des menschlichen Organismus (modifiziert nach[77])

Angiogeneseaktivatoren	Angiogeneseinhibitoren
VEGF, VEGF-C und Homologa	PEDF
VEGF Rezeptoren (VEGFR)	VEGFR-1, löslich
Angiopoietin-1-(Ang-1-) und Tie-2-Rezeptor	VEGFR-1 und Neuropilin-1
TGF-β, Endoglin, TGF-β-Rezeptoren	Angiopoietin-2
VE-cadherin, PECAM (CD31)	Thrombospondin-1, Thrombospondin-2
Ephrine	Angiostatin
Integrine αβ3, αβ5, α5β1	Tissue Inhibitors of MMP (TIMPs), MMP-
Plasminogenaktivatoren, Matrixmetallopro-	inhibitors
teinasen (MMP)	Endostatin
andere Aktivatoren	andere Inhibitoren

Von zentraler Bedeutung für die Angiogenese ist der VEGF, welcher mit seinen Rezeptoren Gegenstand zahlreicher Studien war und ist. Einen maßgeblichen Inhibitor angiogenetischer Prozesse stellt der PEDF (pigment epithelium-derived factor) dar.

Neben anderen Faktoren wie Hormonen, genetischen sowie metabolischen Veränderungen [32,49] gilt die Hypoxie als wichtigster Stimulus der Angiogenese [21,95,103]. Unter hypoxischen Bedingungen wird der Transskriptionsfaktor HIF1-α (hypoxia-inducible factor 1-α) aktiviert und nachfolgend verschiedene proangiogene Faktoren wie VEGF u.a. von Gefäßendothelien und Tumorzellen gebildet [76,88].

Daraufhin folgt die Angiogenese einem bestimmten Schema [77,117]:

Die Aktivierung der Endothelzellen erfolgt durch eine NO-vermittelte Vasodilatation sowie durch eine via VEGF ausgelöste Permeabilitätssteigerung.

Um den nötigen Raum für die zu entstehenden Gefäße zu schaffen, wird die vaskuläre Basalmembran sowie die extrazelluläre Matrix von bestimmten Enzymen, den Matrixmetalloproteinasen, abgebaut.

Unter Beteiligung von VEGF sowie der Angiopoetine migrieren die Endothelzellen bestehender Gefäße in das Interstitium. Durch die Proliferation dieser Zellen kommt es zur Aussprossung von Gefäßen, zur Ausbildung in der Größe variierender Gefäßlumina und schließlich zum Anschluß an das vorhandene Gefäßsystem.

Die Reifung der neuen Gefäße, vermittelt durch Angiopoietine und Ephrine, beinhaltet die Verbindung mit stabilisierenden Zellen wie glatten Muskelzellen und Perizyten, der extrazellulären Matrix sowie die Bildung einer Basalmembran.

Um den Fortbestand der Gefäße zu sichern und deren Regression zu verhindern, wirkt weiterhin eine Zahl von Faktoren, v.a. VEGF und Angiopoietine, auf die Endothelzellen ein.

1.3.1. Angiogenese bei malignen Tumoren

Zur physiologischen Angiogenese bestehen bei der Angiogenese im Rahmen maligner Erkrankungen einige Unterschiede.

Während des sogenannten „avaskulären“ Stadiums ernähren sich die malignen Tumoren, die in diesem Stadium eine Größe von 1 bis 2 Millimetern haben, durch Diffusion aus Blutgefäßen des umliegenden Gewebes. Der Tumor benötigt für eine weitere Größenzunahme ein eigenes Gefäßsystem und steigert daher die Expression verschiedener, die Angiogenese fördernder Substanzen wie VEGF, Angiopoietine, TGF- β und Plasminogenaktivatoren. Durch diese lokale Änderung des Gleichgewichts zwischen Induktoren und Inhibitoren tritt der Tumor durch Einsprossung von Gefäßen aus dem umgebenden Gewebe in das „vaskuläre“ Stadium ein [32,69].

Die Blutgefäße, die auf diese Weise in Tumoren entstehen, sind funktionell und strukturell abnorm, da die angiogenetischen Prozesse weniger geordnet ablaufen, als unter physiologischen Bedingungen [75].

1.3.2. Angiogenese bei der choroidalen Neovaskularisation

An der Erhaltung einer intakten Gefäßstruktur der Choriokapillaris sind verschiedene Faktoren aus dem RPE wie z.B. PEDF und VEGF beteiligt.

Bei Hypoxie wird VEGF vermehrt ausgeschüttet [121,152], während PEDF vermindert exprimiert und so das Gleichgewicht von Inhibitoren und Induktoren lokal gestört wird.

Unter Beteiligung weiterer induzierender Faktoren (TGF- β , TGF- β Rezeptor CD 105, Angiopoietine) werden Angiogeneseprozesse initiiert und die neuen Gefäße sprossen entweder unter die Basalmembran des RPE oder in den subretinalen Raum ein.

Auch bei der Entstehung einer CNV läuft die Angiogenese ungeordnet ab und es werden abnorme Gefäße, die v.a. eine Hyperpermeabilität aufweisen, gebildet. Weiterhin wird das Wachstum von Bindegewebszellen und RPE-Zellen stimuliert, sodass sich im natürlichen Verlauf eine vermehrte Fibrosierung der Gefäßmembranen findet.

Da die vorliegende Arbeit Veränderungen bestimmter angiogen wirksamer Faktoren nach der PDT untersucht, für die ein maßgeblicher Einfluss auf die Angiogenese in cho-

roidalen Neovaskularisationsmembranen und Aderhautmelanomen nachgewiesen wurde bzw. vermutet wird, folgt ein Überblick über den Stand der Forschung hinsichtlich dieser Moleküle sowie über das Wirkprinzip der Photodynamischen Therapie.

1.4. Stand der Forschung bezüglich der Angiogenesefaktoren

1.4.1. Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und der Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor (VEGFR)

1.4.1.1. Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), ein 45 Kilodalton (kDa) großes Glykoprotein, wird durch das humane VEGF-Gen auf dem Chromosom 6p21.3 kodiert [4,118].

Zu der VEGF-Familie gehören zahlreiche Proteine, die strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen. Neben VEGF-A, welches in dieser Arbeit und auch in der Literatur als VEGF bezeichnet wird, sind VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E sowie PlGF (Placenta Growth Factor 1) zu nennen.

Von jedem dieser Moleküle existieren Isoformen (siehe Abb. 4), die durch alternatives Exon-Splicing zustande kommen und sich durch eine unterschiedliche Anzahl von Aminosäuren sowie ein unterschiedliches Bindungsverhalten zu Heparin und Heparin-Sulfat und damit einhergehende Löslichkeit und Rezeptorbindung auszeichnen. Varianten des VEGF-A sind beispielsweise das VEGF 165 als prädominante und hinsichtlich der Angiogenesestimulation potenteste Isoform oder auch das VEGF 121, das eine große Diffusionsfähigkeit besitzt und ebenfalls an der Stimulation der Angiogenese beteiligt ist. Diese beiden Formen spielen eine wichtige Rolle bei den neueren antiangiogenen Therapieverfahren (s.u.). Dem VEGF165b wird eine angiogeneseinhibierende Funktion zugeschrieben [28,34,48,100,118,167].

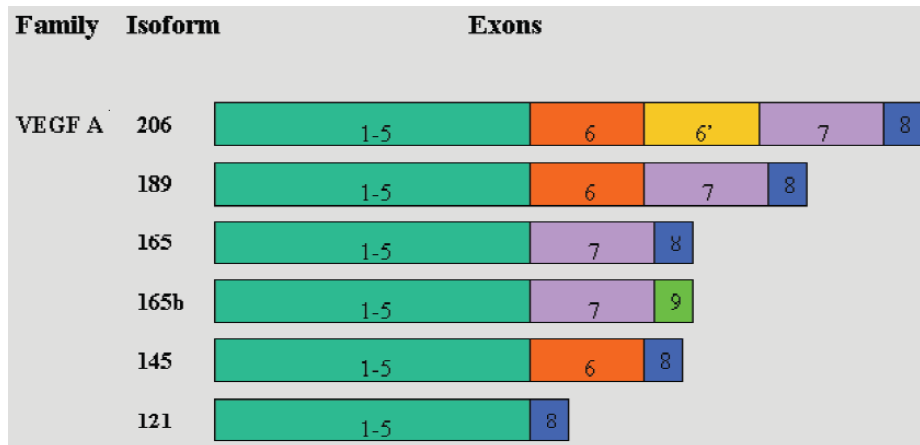


Abbildung 4: VEGF-Isoformen mit Angabe der Anzahl der Exons. Durch Exonsplicing existieren mindestens 6 verschiedene Isoformen des VEGF-A. Als Hauptangiogeneseinduktor gilt das VEGF165, während VEGF165b die Angiogenese inhibiert (aus 28)].

Verschiedene Zelltypen besitzen die Fähigkeit, VEGF zu sezernieren. Unter anderem gehören Endothelzellen und Tumorzellen dazu. Den Hauptstimulus für die Freisetzung des Proteins stellt die Hypoxie dar (s.o.).

VEGF bindet selektiv an drei verschiedene Rezeptoren auf der Oberfläche von Gefäßendothelzellen und induziert Gefäßneubildung und vermehrte Gefäßpermeabilität [34,76,80,100].

1.4.1.2. Der Vascular Endothelial Growth Factor-Rezeptor (VEGFR)

Die Gruppe der VEGF-Rezeptoren umfasst den VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR) und VEGFR-3 (Flt-4). Bei allen drei Rezeptoren handelt es sich strukturell um Tyrosinkinase-Rezeptoren [80,118,145].

Dem VEGFR-1, für den die Größenangaben in der Literatur zwischen 130 kDa und 180 kDa variieren, sowie dem VEGFR-2 (230 kDa) wird eine zentrale Rolle in der Neogenese von Blutgefäßen nachgesagt. Für beide Rezeptoren gelang der Nachweis ihrer Existenz auf Endothelzellen von Blutgefäßen. Der VEGFR-3 (195 kDa) dagegen befindet sich vornehmlich auf den Endothelien von Lymphgefäßen, an deren Entstehung er maßgeblich beteiligt ist [80,87,118,150].

An der Interaktion mit den verschiedenen VEGF-Varianten sind zusätzlich die Co-Rezeptoren Neuropilin-1 (NRP-1) und Neuropilin-2 (NRP-2), sowie heparansulfatierte Proteoglykane (HSPGs), die sowohl mit den Liganden als auch mit den Rezeptoren (VEGFR-1 und -2) interagieren, beteiligt [80]. In Endothelien von humanen Umbilikalvenen wurde eine lösliche Variante des Flt-1 (sFlt-1, s=soluble) entdeckt, die VEGF mit

hoher Affinität bindet. Es wird vermutet, dass dieser Rezeptor die VEGF-induzierte Mitogenese hemmen und damit als Regulator der VEGF-Funktion agieren kann [81,82].

1.4.2. Das VEGF/VEGFR-System bei der Angiogenese

1.4.2.1. Die Signaltransduktion und ihre Folgen

Die Tyrosinkinase-Rezeptoren bestehen aus sieben immunoglobulinartigen Domänen in der extrazellulären Domäne, einem transmembranären Bereich sowie einer Tyrosinkinase-Sequenz, die von einer in die Kinase eingefügten Domäne unterbrochen ist [116,135]. In Abb. 5 ist der Aufbau schematisch dargestellt.

Die Kenntnisse über die Eigenschaften der Signaltransduktion der VEGF Rezeptoren ist noch immer inkomplett. Nicht jeder Ligand bindet jeden Rezeptor: PlGF und VEGF-B binden VEGFR-1, während VEGF sowohl mit VEGFR-1 als auch mit VEGFR-2 interagiert, wobei der VEGFR-1 die höchste Affinität zu der Isoform VEGF₁₆₅ aufweist. VEGF-C und VEGF-D binden VEGFR-2 und VEGFR-3 und VEGF-E reagiert nur mit VEGFR-2 (s. Abb. 5) [51,80].

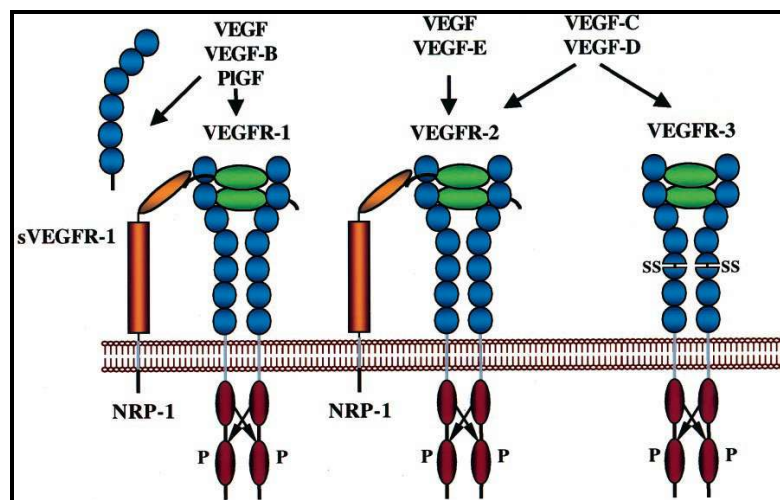


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Aufbaus der VEGFR mit Zuordnung der spezifischen Liganden sowie der Co-Rezeptoren s-VEGFR-1 und NRP-1 [80]). Durch Bindung der verschiedenen Liganden an den jeweiligen Rezeptor kommt es zur Dimerisation und Phosphorylierung und nachfolgend zur Aktivierung von Angiogenesevorgängen.

Die Bindung des Liganden an einen VEGFR führt zu Dimerisation und Phosphorylierung, was wiederum unter Mitwirkung weiterer Moleküle über eine Stoffwechsellkaskade die Aktivierung von Angiogenesevorgängen nach sich zieht [34,80].

Neben einer Steigerung der Gefäßpermeabilität bewirkt die Aktivierung des VEGF/VEGFR-Komplexes eine Stimulation der Endothelzellproliferation und -migration sowie der Bildung bestimmter Moleküle wie z.B. Angiopoetine und Ephrine, die für das Verhindern von Apoptose und Regression von Endothelzellen essentiell sind [21,34,49,51,57,80], wie die Abb. 6 schematisch darstellt.

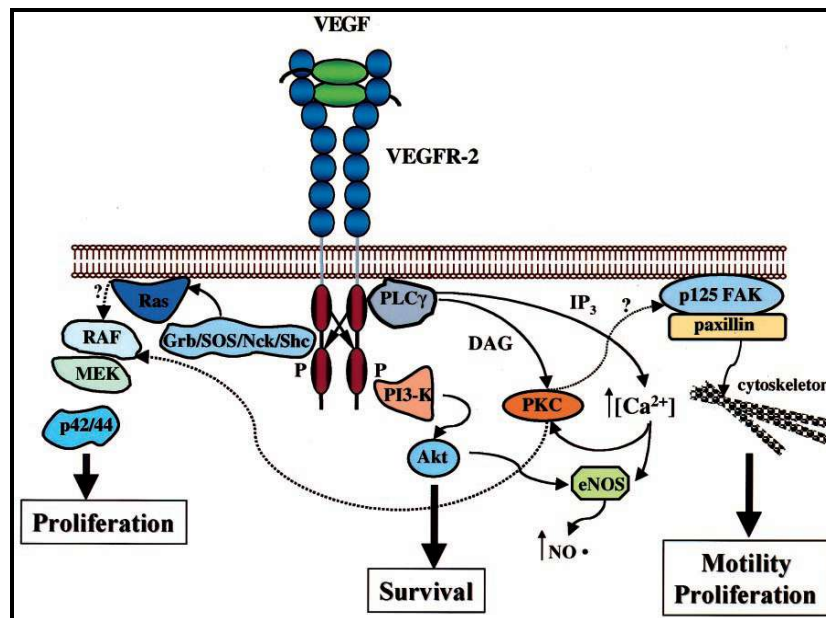


Abbildung 6: Vereinfachte schematische Darstellung der Rezeptor-Ligand-Interaktion mit nachfolgend ablaufenden intrazellulären Stoffwechselprozessen mit Beteiligung von Adapterproteinen wie z.B. der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase), der Protein Kinase C (PKC) sowie Inositoltrisphosphat (IP₃) und Calcium, die in Angiogenese sowie Endothelzell-Überleben resultieren (aus [80]).

Für die Blutgefäßentwicklung ist das VEGF/VEGFR-System von entscheidender Wichtigkeit. So zeigen experimentelle Studien an Mäusen, dass die Inaktivierung des VEGF Gens zu reduziertem Größenwachstum sowie einer Reihe von Entwicklungsanomalien und somit zum Tod heterozygoter Embryos führte [31,50]. Mausembryos, die eine gezielte homozygote Mutation des Flt-1 Gens oder eine Inaktivierung des VEGFR-2 Gens aufwiesen, starben ebenfalls aufgrund von Entwicklungsdefekten des Endothels in utero [54,132].

Dem VEGFR-2 wird aktuell eine tragende Rolle bei der Transduktion der Effekte des VEGF in Endothelzellen zugeschrieben [80,138], während die Funktion des VEGFR-1 kontrovers diskutiert wird. Es wird vermutet, dass VEGFR-1 als negativer Regulator der Angiogenese agiert und die Aktivierung des VEGFR-2 durch VEGF eindämmt [80].

1.4.2.2. Das VEGF/VEGFR-System als therapeutischer Ansatzpunkt

Neben der therapeutischen Nutzung der proangiogenen Wirkung des VEGF, beispielsweise bei chronischer Ischämie von Gliedmaßen oder Koronarinsuffizienz, wird mit Methoden zur Blockade der in der pathologischen Blutgefäßbildung resultierenden Stoffwechsellkaskade bei malignen Erkrankungen oder der choroidalen Neovaskularisation experimentiert [34,70,80].

Als sehr effektiv haben sich die spezifischen niedermolekularen VEGFR-2-Inhibitoren SU5416 (Semaxanib) und PTK787 erwiesen, die ihre Wirkung über eine Hemmung der Tyrosinkinase ausüben [42,140,164]. Diese Substanzen waren die ersten VEGFR-Inhibitoren, die in der Therapie des kolorektalen Karzinoms sowie des kleinzelligen Lungenkarzinoms eingesetzt wurden [164].

Neuere pharmakotherapeutische Verfahren in der Ophthalmologie richten sich speziell gegen den Liganden VEGF; als Beispiele sind hier Pegaptanib (Macugen®), Bevacizumab (Avastin®) und Ranibizumab (Lucentis®) zu nennen [167].

Bei Pegaptanib handelt es sich um ein synthetisches Oligonukleotid, das freie VEGF-Moleküle der Isoform VEGF165 bindet, um so die rezeptorvermittelte Reaktion in den Endothelzellen zu unterbinden. Ranibizumab ist ein humanisiertes, therapeutisches Antikörperfragment. Bei Bevacizumab handelt es sich um einen kompletten Antikörper. Beide binden und inaktivieren VEGF. Im Gegensatz zu Pegaptanib binden Ranibizumab und Bevacizumab an alle Isoformen von VEGF [92,167].

1.4.3. Der Pigment Epithelium Derived Factor (PEDF)

Der Pigment Epithelium Derived Factor ist ein 50 kDa großes Protein, das Sequenz- und Strukturähnlichkeiten mit Mitgliedern der Superfamilie der Serin Proteasen Inhibitoren (Serpine) aufweist [142], obwohl es nicht als Inhibitor einer Proteaseaktivität fungiert [15].

Obwohl ursprünglich im RPE identifiziert, wird PEDF in vielen anderen Körperregionen inklusive Plasma exprimiert [115].

Der PEDF besitzt zwei wesentliche Eigenschaften: einen neuroprotektiven und einen antiangiogenen Effekt [99,73]. Die neuroprotektive Aktivität beinhaltet die Unterstützung des Überlebens von Neuronen [146] sowie den Schutz von Neuronen vor neurotoxischen Einflüssen [147].

1.4.4. Der PEDF bei der Angiogenese

Der PEDF wurde als einer der potentesten der endogenen negativen Regulatoren des physiologischen sowie pathologischen Blutgefäßwachstums identifiziert.

Die wachstumsfaktor-induzierte Angiogenese in vaskulären Endothelzellen wird über einen Mechanismus gehemmt, der die Spaltung und Translokation der transmembranären Domäne des VEGFR-1 erfordert. Diese intramembranäre Proteolyse ist abhängig von der Anwesenheit des Enzyms Gamma-Sekretase, dessen Aktivität in Endothelzellen durch PEDF erhöht wird.

Des Weiteren ist der PEDF in der Lage, die VEGF-induzierte Phosphorylierung des VEGFR-1 zu hemmen [29].

Die Beobachtung, dass PEDF während der Zeit der physiologischen Vaskularisierung im Auge von Mäusen exprimiert wird, weist darauf hin, dass der Faktor eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Blutgefäßen spielt [162]. Transgene Mäuse, denen PEDF fehlte, zeigten eine erhöhte Dichte retinaler Gefäße und eine größere Anzahl misspositionierter Gefäße [40].

Studien über die antiangiogene Wirkung des PEDF haben zusätzlich die Spezifität dieses Effekts nachgewiesen. So zeigte sich beispielsweise, dass PEDF eine Regression neovaskulärer Gefäße bewirkt, die normalen, bereits existierenden Gefäße jedoch verschont [38].

Die Nutzung dieser antiangiogenen Eigenschaften in der Therapie neovaskulärer Erkrankungen des Auges sowie einer Reihe maligner Erkrankungen, bei denen eine Erniedrigung des PEDF im Gewebe beobachtet werden konnte, ist zur Zeit Gegenstand der Diskussion [44,45].

1.4.5. Klinische Bedeutung des VEGF/VEGFR-Systems und des PEDF

1.4.5.1. Das VEGF/VEGFR-System und der PEDF bei nichtmalignen Erkrankungen

Das VEGF/VEGFR-System ist an der Entstehung einer großen Anzahl nichtmaligner Krankheitsbilder beteiligt, wie zum Beispiel an diabetischer Nephro- und Neuropathie, rheumatoider Arthritis, Endometriose sowie der KHK [6,21,76].

Außerdem sind einige okuläre Erkrankungen bekannt, bei denen es zu Neovaskularisationen unter Mitwirkung des VEGF/VEGFR-Systems kommt. Zu diesen gehören die Frühgeborenenretinopathie, die proliferative diabetische Retinopathie, Gefäßprolifera-

tionen nach Zentralvenenverschluss, sowie die Sichelzell- und Strahlenretinopathie, die Eales-Erkrankung und Neovaskularisationen der Iris [3,5,6,48,114].

Bei choroidalen Neovaskularisationsmembranen gilt, neben anderen Einflüssen, die gesteigerte Expression des VEGF und eine Verminderung des PEDF als zentraler pathogenetischer Faktor [121]. So konnte in einem Mausmodell [91] durch die Inhibition des VEGF, sowie in einem Schweinmodell [120] durch periokulären Gentransfer von PEDF, die Ausbildung einer laser- bzw. durch Ruptur der Bruchmembran induzierten CNV fast komplett gehemmt werden.

1.4.5.2. Das VEGF/VEGFR-System und der PEDF bei malignen Erkrankungen

Eine Überexpression von VEGF mRNA konnte in einer Reihe menschlicher maligner Tumore nachgewiesen werden. Als Beispiele seien Neoplasien des Gastrointestinaltraktes [25], der Brust [165] sowie der Nieren [24] genannt.

Gleichzeitig wurde bei manchen Karzinomen wie beispielsweise dem Mammakarzinom beobachtet, dass PEDF durch eine Verminderung der Expression an Vaskularisierungsprozessen von Tumoren beteiligt ist [30].

Zum Einfluss des VEGF/VEGFR-Systems bei der Pathogenese des Aderhautmelanoms existieren bislang nur wenige Studien.

Sheidow et al. gelang es, den VEGF in Aderhaut-Ziliarkörper-Melanomen mittels immunhistochemischer Verfahren nachzuweisen [133], und Boyd et al. machten die Beobachtung einer gesteigerten VEGF-A-Konzentration im Kammerwasser sowie im Glaskörper von Augen mit Aderhautmelanomen [20]. Die VEGFR konnten ebenfalls mittels verschiedener Methoden in uvealen Melanomen nachgewiesen werden [143,160].

Über den Einfluss des PEDF beim Aderhautmelanom ist bisher nichts bekannt.

1.5. Die Photodynamische Therapie (PDT)

Bei der PDT wird der Photosensibilisator Verteporfin (Visudyne®), ein Benzoporphyrin, verwendet, der sich nach intravenöser Applikation in neovaskulären Endothelien anreichert [7] und nur nach Aktivierung mit einem Laser der Wellenlänge 698 nm in ein aktives Stadium umgewandelt wird. Die Aktivierung führt zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen, die eine massive lokale toxische Wirkung, z.B. auf Gefäßendothelien haben und dadurch eine Vasookklusion hervorrufen. Die applizierte Laserenergie allein er-

zeugt keine Hitzedestruktion im Gewebe und es findet sich im Gegensatz zur thermischen Laserkoagulation keine Nekrose im behandelten Areal [101,123]. Die Wirkung kommt lediglich dort zustande wo, Laser und Farbstoff aufeinandertreffen. Eine schematische Darstellung des Verfahrens zeigt Abb. 7.

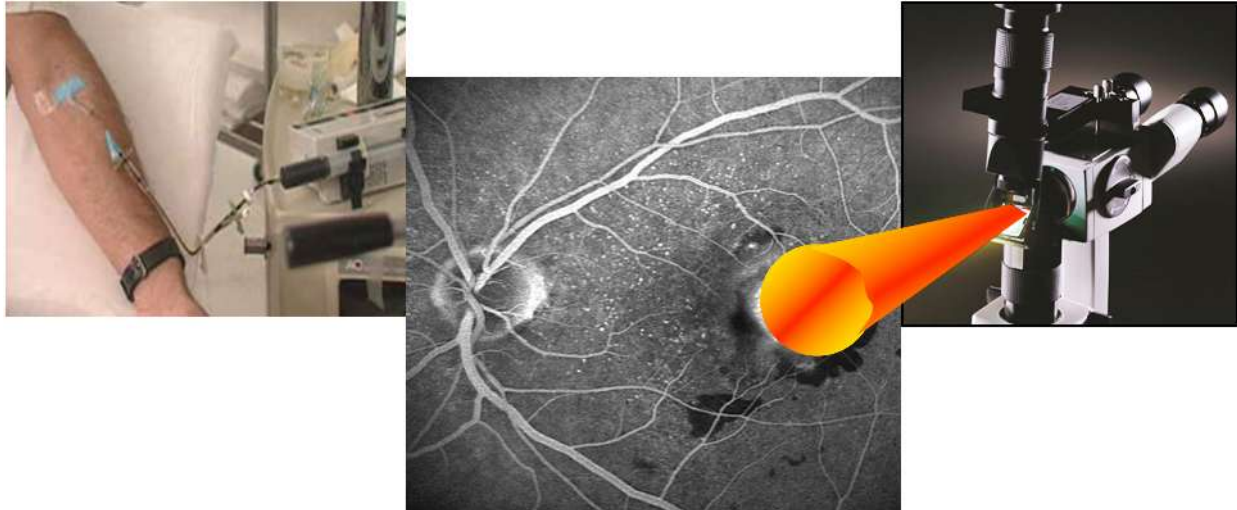


Abbildung 7: Therapie der CNV: Photodynamische Therapie (PDT). Der Farbstoff Verteporfin wird über eine Armvene injiziert und gelangt in die Gefäße der CNV. Dort wird der Farbstoff mittels Laser aktiviert und führt so zu einer Okklusion der pathologischen Gefäße.

1.5.1. PDT zur Behandlung choroidaler Neovaskularisationen

Die PDT wird seit 1998 als klinisches Verfahren bei der Behandlung der exsudativen Makulopathie eingesetzt und in mehreren klinischen Studien wurde die Wirksamkeit, Effektivität und Sicherheit dieser Methode nachgewiesen [2,19,101,128].

Nach der i.v.-Applikation des Verteporfin wird der Spot des Lasers unter funduskopischer Sicht (Spaltlampe und Kontaktglas) auf das Zentrum der CNV gerichtet und der Farbstoff aktiviert. Durch die Inaktivierung der CNV-Membran wird ihr weiteres Wachstum sowie die Exsudation seröser Flüssigkeit in das umliegende Gewebe gestoppt [125].

Häufig kommt es in den folgenden Monaten zum erneuten Gefäßwachstum in das Kapillarnetz der CNV und zur Rekanalisation der pathologischen Gefäße, so dass weitere Behandlungen erfolgen müssen [2,19].

Der Erfolg der photodynamischen Behandlung wird fluoreszenzangiographisch kontrolliert.

Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass im Gegensatz zur konventionellen Laserkoagulation die darüber liegende Netzhaut sowie die Strukturen unterhalb der CNV

(RPE, Choriokapillaris) nur wenig oder gar nicht geschädigt werden und so auch Membranen mit subfovealer Lage mehrfach behandelt werden können [122].

1.5.2. PDT zur Behandlung uvealer Melanome

Bisher befindet sich der Einsatz der PDT zur Behandlung von Aderhautmelanomen in einem experimentellen Stadium.

Der Ansatz der PDT bei der Tumorbehandlung besteht darin, dass sich der Photosensibilisator bevorzugt in den neovaskulären Endothelien des Tumors anreichert und nach der lokalisierten Aktivierung mittels Laserlicht eine Destruktion von Tumorgefäßen und somit eine Tumorzellnekrose erreicht wird. Wie bei der Behandlung der exsudativen Makulopathie gezeigt, sollen dabei die umliegenden sensiblen Strukturen wie das retinale Pigmentepithel und die neurosensorische Netzhaut geschont werden.

In der klinischen Behandlung nicht maligner solitärer Hämangiome der Aderhaut wird die PDT bereits erfolgreich eingesetzt und dabei eine effektive Tumorregression mit geringen Nebenwirkungen erreicht [13,78,130].

Experimentell konnte bereits in Tumormodellen mit humanen pigmentierten und nicht pigmentierten uvealen Melanomen eine Tumornekrose mittels PDT erzeugt werden [41,83,156].

1.5.3. Einfluss der PDT auf Angiogenesefaktoren

Der Einfluss der PDT auf Angiogenesefaktoren wird angenommen. So berichteten Schmidt-Erfurth et al. über einen Anstieg von VEGF, VEGFR-3 sowie PEDF in experimentell mit der PDT behandelte gesunder Netzhaut [129]. Ferrario et al. [52] stellten nach der in vivo Behandlung mit der PDT erhöhte VEGF-Werte im Tumorgewebe von Mammakarzinomen der Maus fest.

1.5.3.1. Einfluss der PDT auf Angiogenesefaktoren in CNV-Membranen

Über den Einfluss der photodynamischen Therapie auf Angiogenesefaktoren in CNV-Membranen existieren bislang wenige Studien.

Bula et al. untersuchten extrahierte CNV-Membranen von Patienten mit AMD und fanden keinen signifikanten Unterschied in der Expression von PEDF, VEGF sowie Ang-1 zwischen solchen, die zuvor mit der PDT behandelt worden waren und solchen ohne vorherige Behandlung [27].

Tatar et al. beschrieben eine deutlich erhöhte Expression von VEGF sowie eine erniedrigte Expression von PEDF in CNV-Membranen nach photodynamischer Behandlung [148].

In einer weiteren Studie stellten Tatar et al. fest, dass die VEGF-Expression in den mit der PDT behandelten Membranen zwar deutlich erhöht ist, im Lauf der Zeit jedoch abnimmt, während die Bildung des Angiogeneseinhibitors Endostatin zunimmt [149].

Aufgrund der kontroversen Ergebnisse der Studien und der Tragweite von Veränderungen der Expression von Angiogenesefaktoren besteht hier weiterer Forschungsbedarf.

1.5.3.2. Einfluss der PDT auf Angiogenesefaktoren in Aderhautmelanomen

Zum Einfluss der PDT auf Angiogenesefaktoren in Aderhautmelanomen existieren keinerlei Studien.

Aufgrund der Tatsache, dass die PDT als weitere Therapieoption dieser Erkrankung diskutiert wird [156], sind auch hier Erkenntnisse über Auswirkungen auf Angiogeneseprozesse im Tumor von Interesse.

2. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die PDT wird seit 1998 als klinisches Verfahren bei der Behandlung der exsudativen Makulopathie eingesetzt und deren Wirksamkeit, Effektivität und Sicherheit wurde in mehreren klinischen Studien nachgewiesen [2,101,128]. In vielen Fällen kommt es zu einem Rezidiv der CNV mit einer Rekanalisation der pathologischen Gefäße, das weitere Behandlungen notwendig macht [2].

Es wird vermutet, dass Angiogenesefaktoren wie der VEGF, sein Rezeptor sowie der PEDF, die eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer CNV spielen, einen maßgeblichen Anteil an der hohen Rezidivrate nach der Behandlung mit der Photodynamischen Therapie haben und die PDT eventuell eine Induktion dieser Faktoren bewirkt [148].

Die PDT wird als ergänzende Behandlungsoption für die Therapie des malignen Melanoms der Aderhaut in Erwägung gezogen. Bislang ist unklar, inwieweit der Tumor durch die PDT zerstört und nachfolgende Rezidive vermieden werden können. Hier ist insbesondere die Frage nach Auswirkungen der PDT auf die Angiogenese von Interesse.

Die Erforschung von Angiogenesevorgängen nach einer PDT ist für die Bedeutung der Kombinationstherapie aus dem primär sehr erfolgreichen gefäßokklusiven Verfahren der PDT und der Applikation von anti-angiogenen Substanzen, die den primären Verschluss aufrechterhalten, wichtig [67]. Hierbei ist insbesondere die Ausprägung und der zeitliche Verlauf von Bedeutung.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, einen Beitrag zum Verständnis von Veränderungen der Expression der Angiogenesefaktoren VEGF, VEGFR-1 sowie PEDF nach der Einwirkung der photodynamischen Therapie zu leisten. Um die Auswirkung der Therapie auf diese Faktoren im menschlichen Auge zu untersuchen, wurden zwei Modelle verwendet:

Zum einen wurden humane CNV-Membranen nach chirurgischer Extraktion verwendet. Diese waren mit der PDT behandelt und im Verlauf der Erkrankung exzidiert worden. Dieses Modell soll die Veränderungen der Angiogenesefaktoren VEGF, PEDF und Flt-1 im Verlauf nach der PDT zu unterschiedlichen Zeitpunkten darstellen. Die Ergebnisse wurden mit denen aus der Untersuchung unbehandelter exzidierter CNV-Membranen verglichen.

Im anderen Modell wurde an humanen Aderhautmelanomen untersucht, ob die Auswirkungen der Therapie auf Angiogenesefaktoren unabhängig von der zugrundeliegenden

Pathologie in der Methode der PDT begründet sind. Weiterhin wurde in diesem Modell der Kurzeiteffekt der PDT auf Angiogenesefaktoren in Aderhautmelanomen untersucht. Die Ergebnisse wurden ebenfalls mit denen einer Gruppe unbehandelter Aderhautmelanome verglichen.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchsaufbau

3.1.1. CNV-Membranen

Es wurden 11 CNV-Membranen von 11 Patienten verwendet, die aufgrund verschiedener Diagnosen wie altersbedingte Makuladegeneration (Alter der Patienten durchschnittlich 77,7 Jahre), hohe Myopie (70 Jahre), POHS (30 Jahre) oder auch idiopathisch (51 Jahre) eine choroidale Neovaskularisation mit erheblicher Visusminderung entwickelt hatten. Diese Patienten waren zu therapeutischen Zwecken einmal bzw. mehrmals mit der PDT behandelt worden. Im Verlauf wurde die operative Entfernung der CNV-Membran 1-29 Monaten nach der PDT via Pars Plana Vitrektomie (PPV) therapeutisch notwendig.

Das Material wurde aufbereitet, immunhistochemisch gefärbt und ebenfalls unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

Als Vergleichsgruppe dienten 9 CNV-Membranen, die ohne vorhergehende PDT entfernt worden waren und hinsichtlich der Ähnlichkeit der Ätiologie, des Alters der Patienten sowie der klinischen Charakteristika (klassisch oder okkult, Größe der Läsion, Krankheitsprogression, Lage) ausgesucht wurden (s. Tab. 5 und 6).

3.1.2. Aderhautmelanome

Es wurden 4 Augen von 4 Patienten, die wegen eines malignen Melanoms der Aderhaut zu einer Enukleation vorgesehen waren, 2-3 Tage vor der Operation mit einer PDT mit Verteporfin auf dem Tumor im zu enukleierenden Auge behandelt. Bei allen Tumoren war eine bulbuserhaltende Therapie mit lokaler Tumorkontrolle aufgrund der Größe bzw. der Lageverhältnisse (zirkumpapillär) nicht möglich.

Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis und wurden darauf hingewiesen, dass es sich um eine experimentelle Behandlung handelt, die keine therapeutische Konsequenz für das Aderhautmelanom besitzt.

Nach der Enukleation wurden die Bulbi aufbereitet, immunhistochemisch gefärbt und unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Als Vergleichsgruppe dienten 5 weitere Augen mit Aderhautmelanomen ähnlicher Größenordnung, die ohne vorhergehende PDT enukleiert worden waren.

Die Empfehlung zur Eukleation wurde unabhängig und zeitlich vor dem Einschluß in die Studie von zwei unterschiedlichen in der Therapie von Aderhautmelanomen spezialisierten Ärzten getroffen. Nachdem die Patienten sich zu einer Eukleation des betroffenen Auges entschieden hatten, wurde von einem dritten Arzt die Information über die experimentelle Behandlung, das Aufklärungsgespräch und die PDT durchgeführt. Für die Studie lag ein positives Votum der zuständigen Ethikkommission vor.

Patienten mit den bekannten Kontraindikationen für eine PDT wie erhöhte Leberfunktionswerte, Porphyrurie oder andere Formen einer Lichtüberempfindlichkeit, Schwangerschaft oder Stillzeit wurden nicht eingeschlossen.

3.2. Durchführung der Photodynamischen Therapie

Die Photodynamische Therapie wurde mit dem Medikament Verteporfin (Visudyne®, Novartis, Bülach, CH) über einen an der Spaltlampe adaptierten Diodenlaser (Zeiss, Jena, Deutschland) und ein Kontaktglas (Area centralis, Volk, USA) durchgeführt.

Alle Patienten bekamen eine Infusion mit 6 mg Verteporfin pro Quadratmeter Körperoberfläche in Glukoselösung.

Nach der Behandlung wurde für 48 Stunden ein Lichtschutz benutzt.

3.2.1. Behandlung der CNV-Membranen

Die PDT wurde mit den für die AMD etablierten Standardparametern [2] angewendet.

15 Minuten (min.) nach Start der Infusion wurde die Behandlung mit dem Laser der Wellenlänge 689 nm, 50 J/cm², einer Intensität von 600 mW/cm² und einer Belichtungszeit von 83 Sekunden (s) durchgeführt.

3.2.2. Behandlung der Aderhautmelanome

Die PDT wurde 2-5 Tage vor der geplanten Eukleation mit einer Laserwellenlänge von 689 nm und einer Behandlungsspotgröße von 3000 µm durchgeführt.

Die Lichtdosis bzw. die Expositionszeit des Lasers, Infusionsgeschwindigkeit, Intervall zwischen Ende der Infusion und Beginn der Beleuchtung wurde variiert (s. Tab. 3).

Tabelle 3: Parameter bei der experimentellen PDT

	Infusionsdauer (min.)	Intervall Start Infusion- Laser	Dauer der Beleuchtung (s)	Lichtdosis J/cm²	Konzentration mg/m² BSA*	Intervall (Tage) PDT- Enu
1	1,5	5	3 x 83	150	6	5
2	3	3	3 x 83	150	6	2
3	3	5	3 x 83	150	6	3
4	10	15	3 x 83	150	6	3

Anmerkungen: *= BSA= Body surface area = Körperoberfläche

Vor der PDT wurden jeweils 4 konventionelle Argonlaserherde (Durchmesser 200 µm) auf der Tumoroberfläche im geplanten PDT-Bereich appliziert, um das PDT-Behandlungsareal bei der Aufarbeitung der Bulbi leichter identifizieren zu können.

3.3. Herstellung der Präparate

Nach der Entfernung wurden die Augen mit den Aderhautmelanomen in 4%igem Formalin fixiert. Nach dem Zerteilen der Bulbi entlang des Behandlungsareals wurde das Gewebestück mit dem PDT-Areal in Paraffin eingebettet.

Die CNV-Membranen wurden nach der operativen Entfernung in Formalin fixiert und dann ebenfalls in Paraffin eingebettet.

Von diesen Paraffinblöcken wurden Schnitte von 4 µm Dicke angefertigt, die 12 Stunden bei 63°C getrocknet wurden.

Vor der immunhistochemischen Färbung wurde das Paraffin von den Gewebeschnitten entfernt. Dies geschah mittels zehnmütiger Inkubation in Xylol, welches durch Spülung in einer absteigend konzentrierten Alkoholreihe wieder entfernt wurde.

3.4. Immunhistologische Untersuchungen

Mittels immunhistochemischer Färbemethoden lassen sich antigene Komponenten in Zellen und Gewebsschnitten durch spezifische Antikörper, die durch Fluoreszenzfarbstoffe, Enzyme, partikuläres Material (z.B. Goldpartikel) oder Isotope markiert sind, nachweisen.

In diesen Untersuchungen wurde die APAAP-Methode angewendet.

Einen Überblick über die in der Arbeit verwendeten Primärantikörper gibt Tab.4.

Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper mit jeweils zugehörigem Antigen

Primärantikörper	Antigen
CD 105 (Endoglin)	Transmembranprotein in Endothelien
CD 31	Endotheliales Zelladhäsionsmolekül (PECAM)
CD 34	Endothelglykoprotein
VEGF	VEGF Protein (alle Isoformen)
VEGF-R (Flt-1)	VEGF-Rezeptor 1
PEDF	PEDF Protein

3.4.1. Prinzip der APAAP-Methode

Die APAAP-Methode basiert auf der Bildung von Alkalische Phosphatase- Anti- Alkalische- Phosphatase Komplexen und wurde in dieser Studie zum Nachweis von CD105, CD31, CD34, PEDF, VEGF und Flt-1 positiven Zellen in den Schnitten der Aderhautmelanome und der CNV-Membranen benutzt.

Prinzipiell stellt die APAAP-Methode eine indirekte immunenzymatische Methode dar.

Für dieses Verfahren benötigt man drei Antikörper: einen Primärantikörper (aus der Maus), der gegen das nachzuweisende Antigen gerichtet ist, einen sogenannten Brückenantikörper (aus dem Kaninchen), welcher sowohl den Primärantikörper, als auch den dritten Antikörper bindet sowie einen monoklonalen Maus-anti-alkalische-Phosphatase-Antikörper, der das Markerenzym (alk. Phosphatase) trägt.

Setzt man nach der Bindung des letzten Antikörpers Naphtol-As-Biphosphat - das Substrat der alkalischen Phosphatase - hinzu, ergibt sich ein Spaltprodukt, das mit Neufuchsin eine rote Färbung bewirkt, wie Abb. 8 darstellt.

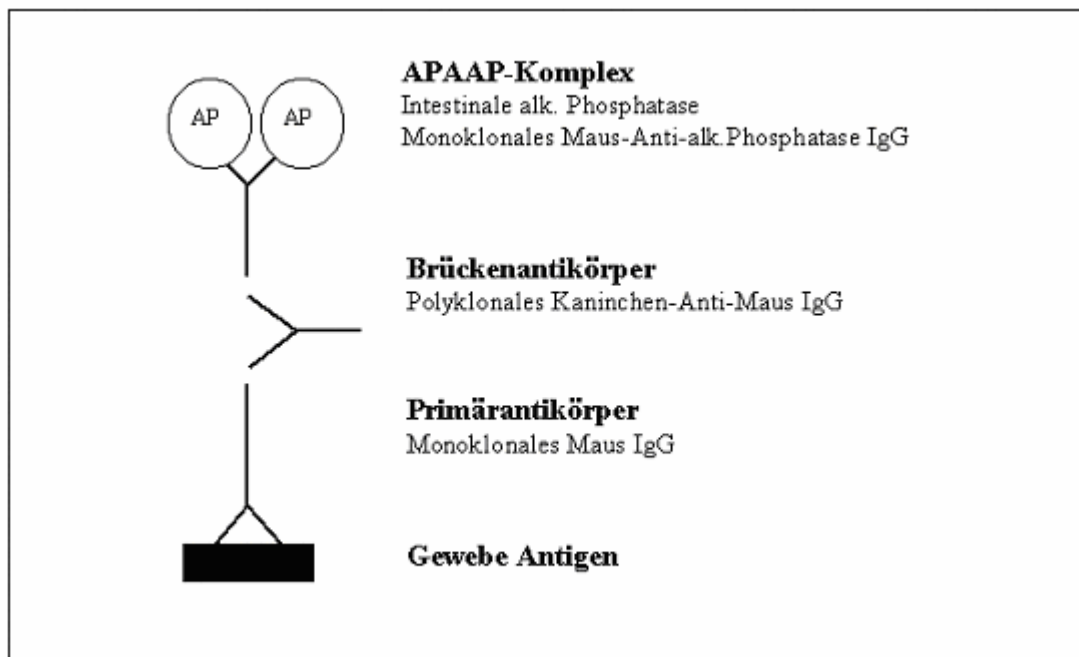


Abbildung 8: Schematische Darstellung der APAAP-Methode aus [131]

Es wurden Vorversuche mit Verdünnungsreihen der einzelnen Antikörper, Variationen der Vorbehandlung (Pronase oder Citratpuffer) und zum Teil zusätzlichen Brückenantikörpern durchgeführt, um optimale Resultate mit möglichst geringer Hintergrundfärbung zu erzielen. Es wurden Protokolle für die einzelnen Antikörper erstellt, mit denen alle APAAP-Färbungen durchgeführt wurden. Als Negativkontrollen dienten humane e-nukleierte Kontrollaugen (PEDF, CD 31), Plazenta (VEGF, Flt-1) sowie Haut (CD 105, CD 34).

3.4.2. Kurzprotokoll der APAAP-Methode

- 1) 5 min Hitzebehandlung mit Citratpuffer (CD 34, VEGF, PEDF) oder 10 min Inkubation in (30°C) Pronase E (CD 105, CD 31, Flt-1). Diese Vorbehandlung demaskiert Proteine, die durch die Formalinfixierung verändert wurden, so dass Epitope für den Primärantikörper freigelegt werden.
- 2) 15 min in TBS-Puffer (pH 7,4-7,6) äquilibrieren
- 3) 3 x 5 min spülen in TBS
- 4) Primärantikörper mit RMPI-Medium verdünnen

CD 31	1:10
CD 34	1:100

CD 105	1:25
VEGF	1:200
PEDF	1:100
Flt-1	1:200

- 5) 30 min bei Raumtemperatur in feuchter Kammer inkubieren
- 6) 3 x 5 min spülen in TBS
- 7) Zwischenschritt nur für PEDF und Flt-1:
 Mouse-anti-goat-Antikörper (MAG) mit Verdünnungsmedium 1:300 für PEDF,
 Mouse-anti-rabbit-Antikörper (MAR) mit Verdünnungsmedium 1:100 für Flt-1
 30 min bei Raumtemperatur in feuchter Kammer inkubieren
 danach 3 x 5 min spülen in TBS
- 8) Brücken-Antikörper mit RMPI und Humanserum 1:20 verdünnen
- 9) 30 min bei Raumtemperatur in feuchter Kammer inkubieren
- 10) 3 x 5 min spülen in TBS
- 11) APAAP mit RMPI und Kälberserum 1:50 verdünnen
- 12) 30 min bei Raumtemperatur in feuchter Kammer inkubieren
- 13) 3 x 5 min spülen in TBS
- 14) Brückenantikörper nochmals 10 min bei Raumtemperatur in feuchter Kammer inkubieren
- 15) 3 x 5 min spülen in TBS
- 16) APAAP nochmals 10 min bei Raumtemperatur in feuchter Kammer inkubieren
- 17) 3 x 5 min spülen in TBS
- 18) Entwicklerlösung 30 min bei Raumtemperatur in feuchter Kammer inkubieren
- 19) 3 x 5 min spülen in TBS
- 20) 1 min Kernfärbung mit Papanicolaou-Lösung 1a
- 21) kurz in Leitungswasser spülen
- 22) kurz differenzieren in 1% HCL-Ethanol
- 23) 10 min abspülen in fließendem Leitungswasser
- 24) Eindecken in Kaisers Glycerin-Gelatine

3.4.3. Reagenzien für die APAAP-Methode

TBS-Puffer:

Auf 5l Aqua dest.: Tris-HCl (TRIZMA Hydrochlorid, SIGMA T-3253) 34,25g
Tris-Base (TRIZMA Base, SIGMA T-1503) 4,5g
NaCl (Natriumchlorid, Merck/Germany, Nr.1.06404.1000) 43,75g
pH : 7,4-7,6

Pronase E für die Vorbehandlung:

0,1g Pronase E (Merck 7433) in 100ml Aqua dest (30 °C) lösen

Citratpuffer für die Vorbehandlung:

Lösung A: 21,01 g/l A.d. Citronensäure (Merck 100 244)
Lösung B: 29,41 g/l A.d. Na-Citrat (Merck 6448)
36 ml Lösung A + 164 ml Lösung B
auffüllen auf 2 l mit Aqua dest, pH 6,0

Verdünnungsmedium für den primären Antikörper, für den zusätzlichen Brückenantikörper für Flt-1 und für APAAP:

500 ml RPMI (GIBCO 21875-034)
+ 50 ml Kälberserum (BIOTEST)
+ 0,5 g Natriumacid (Merck 6688)
pH 7,4 - 7,6

Verdünnungsmedium für den Brückenantikörper:

3500 µl RPMI (GIBCO 21875-034)
+ 500 µl Humanserum (BIOTEST)

Verdünnungsmedium für den zusätzlichen Brückenantikörper (PEDF)

3500 µl RPMI (GIBCO 21875-034) mit Kälberserum (s.o.)
+ 500 µl Humanserum (BIOTEST)
+ 500 µl Kaninchenserum (DAKO X 0902)

Entwicklerlösung:

DAKO Fuchsin + Substrat-Chromogen-System (DAKO K 0625)

Kernfärbung:

Papanicolaou-Lösung 1a (Merck 109 253)

Eindecken:

Kaisers Glyceringelatine (Merck 109 242) vorgewärmt auf 60 °C

3.4.4. Verwendete Antikörper

Endothelzellen: CD31

- Monoklonaler Primär-Antikörper: Mausimmunglobulin IgG1, kappa
gegen ein endotheliales Zelladhäsionsmolekül
(CD31; Synonym PECAM) , Clone JC/70A
DAKO/ Denmark, Code No. M 0823, Lot 107
- Brücken-Antikörper: Kaninchen gegen Maus Immunglobulin
DAKO/Denmark, Code No. Z 0259, Lot 067
- APAAP-Antikörper: Monoklonaler Mausantikörper
DAKO/Denmark, Code No. D 651, Lot 025

Um die Vaskularisierung der Aderhautmelanome und der Membranen zu untersuchen, wurden die Endothelien mit dem Primärantikörper, einem Anti-Mensch-Antikörper aus der Maus, markiert. Dieser reagiert mit einem Glykoprotein, das an der Adhäsion von Endothelzellen beteiligt ist (CD31 bzw. PECAM) [109].

Als Brückenantikörper fungierte ein Anti-Maus-Antikörper aus dem Kaninchen.

Als Detektionssystem wurde ein mit alkalischer Phosphatase markierter monoklonaler Maus-Antikörper verwendet und dieses Markerenzym dann mit der Neufuchsin-Entwicklerlösung rot angefärbt. Der Grad der eingetretenen Färbung wurde dann unter dem Lichtmikroskop beurteilt.

Endothelzellen: CD34

- monoklonaler Primärantikörper: Mausimmunglobulin IgG1
gegen ein Protein in Endothelien
Immunotech/France, Cat.No. 0786
- Brücken-Antikörper: Kaninchen gegen Maus Immunglobulin
DAKO/Denmark, Code No. Z 0259, Lot 067
- APAAP-Antikörper: Monoklonaler Mausantikörper
DAKO/Denmark, Code No. D651, Lot 025

Ebenfalls zur Markierung von Gefäßen diente dieser Maus-Anti-Mensch-Antikörper, der an ein Glykoprotein in Endothelien bindet [53] und als Brückenantikörper wurde wieder der Anti-Maus-Antikörper aus dem Kaninchen verwendet.

Der Nachweis erfolgte mit oben bereits näher erläuterten APAAP-System und die Auswertung unter dem Lichtmikroskop.

Endothelzellen: CD105

- monoklonaler Primärantikörper: Mausimmunglobulin IgG1, kappa
gegen ein Transmembranprotein in Endothelien
DAKO/Denmark, Code No. M3527, Lot 031
- Brückenantikörper: Kaninchen gegen Maus Immunglobulin
DAKO/Denmark, Code No. Z 0259, Lot 067
- APAAP-Antikörper: Monoklonaler Mausantikörper
DAKO/Denmark, Code No. D651, Lot 025

Ein weiterer Gefäßmarker ist der Antikörper gegen CD105 (Synonym: Endoglin GP 160), der mit einem Transmembranprotein in Endothelzellen reagiert. Dieses Transmembranprotein ist ein Bestandteil des transforming growth factor (TGF) β receptor systems mit hoher Affinität für die Wachstumsfaktoren TGF β 1 und β 3 [33] und ist somit mitverantwortlich für das Gefäßwachstum in Tumorzellen [26] und choroidalen Neovaskularisationen [62]. CD105 wird in Kapillaren, Arteriolen, kleinen Arterien und Venolen verschiedener Gewebe gebildet wie z. B. Leber, Niere, Haut und Lymphknoten [144].

Als Brückenantikörper sowie Detektions- und Färbesystem wurden die obengenannten Reagenzien verwendet.

Vascular endothelial growth factor: VEGF (C1)

- monoklonaler Primärantikörper: Mausimmunglobulin IgG2a
gegen Wachstumsfaktor
Santa Cruz/USA, sc-7269
- Brückenantikörper: Kaninchen gegen Maus Immunglobulin
DAKO/Denmark, Code No.Z 0295, Lot 067
- APAAP-Antikörper: Monoklonaler Mausantikörper
DAKO/Denmark, Code No.D651, Lot 025

Dieser Antikörper diente dem Nachweis des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF-A). Es existieren verschiedene Isoformen dieses Proteins [72], der verwendete Antikörper bindet unspezifisch an alle Formen.

Die Verwendung eines Brückenantikörpers, Detektion und Färbung erfolgten wie bereits beschrieben.

VEGF-Rezeptor: Flt-1 (C17)

- polyklonaler Primärantikörper: Kaninchenimmunglogulin
gegen Protein in VEGF-Rezeptor
Santa Cruz/USA, sc-316
- Brückenantikörper 1: Maus gegen Kaninchen Immunglobulin
DAKO/Denmark, Code No. M 0737, Lot 029
- Brückenantikörper 2: Kaninchen gegen Maus Immunglobulin
DAKO/Denmark, Code No. Z 0295, Lot 067
- APAAP-Antikörper: Monoklonaler Mausantikörper
DAKO/Denmark, Code No. D 651, Lot 025

Um den Rezeptor für das wachstumsfördernde Protein VEGF nachzuweisen, wurde dieser Antikörper eingesetzt, der mit einem Peptid an dem C-Terminus des Rezeptors reagiert.

Da der Primärantikörper vom Kaninchen stammt und polyklonal ist, musste ein zusätzlicher Brückenantikörper verwendet werden, der den Antikörper wieder mit der Brücke und dem APAAP-System kompatibel machte.

Der Rest des Verfahrens erfolgte wie vorbeschrieben.

Pigment epithelium-derived factor: PEDF (I-15)

- Polyklonaler Primäantikörper: Ziegenimmunglobulin
 gegen Protein in PEDF
 Santa Cruz/USA, sc-16956
- Brückenantikörper 1: Maus gegen Ziege Immunglobulin
 Dianova/Hamburg, Code No. 205-005-108
- Brückenantikörper 2: Kaninchen gegen Maus Immunglobulin
 DAKO/Denmark, Code No. Z 0295
- APAAP-Antikörper: Monoklonaler Mausantikörper
 DAKO/Denmark, Code No. D 651

Zum Nachweis des antiangiogenetisch und neuroprotektiv wirkenden Faktors PEDF [74] wurde dieser Antikörper eingesetzt, der an ein Peptid bindet, das in der inneren Region des menschlichen PEDF gelegen ist.

Da auch hier ein polyklonaler Antikörper, in diesem Fall von der Ziege, verwendet wurde, musste ein weiterer Brückenantikörper eingesetzt werden. Das Maus-gegen-Ziege Immunglobulin bindet an den Ziegenprimärantikörper und somit ist die Bindungsfähigkeit der üblichen Brücke und des APAAP-Antikörpers wieder gewährleistet.

Des Weiteren wurde ohne Änderung verfahren.

3.5. Erhebung der Daten und statistische Auswertung

Zur Auswertung wurden die Gewebe unter dem Lichtmikroskop begutachtet und bei der Auszählung der gefärbten Zellen je Antikörper ein Rasterokular mit 100 Feldern bei

200-facher Vergrößerung ($0,25 \text{ mm}^2$) verwendet. Alle positiv gefärbten Zellen innerhalb des Rasters wurden gezählt, wobei positive Zellen auf der oberen und rechten Begrenzung dazugezählt wurden; positive Zellen auf der unteren und linken Begrenzung wurden nicht mitgezählt (s. Abb.9).

Die Tumoren wurden in drei Zonen unterteilt und diese jeweils mittels Rasterokular ausgezählt (s. Abb. 40):

- Nekroseareal
- Übergangszone zwischen behandeltem und unbehandeltem Areal
- unbehandeltes Tumorgewebe

Als Übergangszone wurde der Bereich des Tumors definiert, der eine deutliche inflammatorische Reaktion mit Beteiligung von unter dem Lichtmikroskop identifizierbaren Zellen wie Makrophagen und Granulozyten aufwies.

Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden verschiedene Tests eingesetzt. Zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Bei der Gegenüberstellung zweier nichtklassifizierter Parameter wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman verwendet und für den Vergleich zweier klassifizierter Parameter kam der Chi-Quadrat-Test zum Einsatz. Als Signifikanzgrenze wurde $p \leq 0,05$ zugrundegelegt.

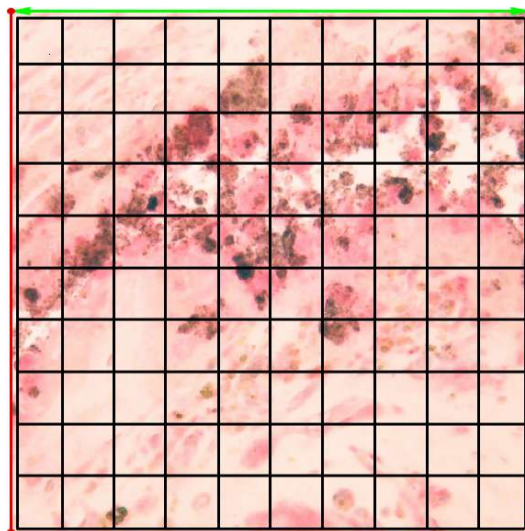


Abbildung 9: schematische Darstellung des mittels Rasterokular ausgezählten Feldes bei 200-facher Vergrößerung. Zellen auf der rechten und oberen Begrenzung wurden mitgezählt, Zellen auf der linken und unteren Begrenzung jedoch nicht.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse CNV-Membranen

In diesem Versuchsteil wurden 11 Neovaskularisationsmembranen nach erfolgter Behandlung mit der photodynamischen Therapie sowie 9 Membranen ohne vorherige Behandlung als Vergleichsgruppe untersucht.

4.1.1. Klinische Charakteristika und Histologie der CNV-Membranen

Es bestanden bezüglich der Parameter der Läsionsgröße (in Papillendurchmesser) ($p=0,766$) und der fluoreszenzangiographischen Charakteristika ($p=1,000$) der beiden Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede.

Die mit der PDT behandelte Versuchsgruppe bestand aus 8 klassischen und 3 okkulten Membranen; die Vergleichsgruppe ohne Behandlung setzte sich aus 6 klassischen und 3 okkulten Membranen zusammen.

Tabelle 5: Klinische Charakteristika (CNV-Typ, Anzahl der durchgeführten Behandlungen, Größe sowie Zeit zwischen PDT und operativer Entfernung der CNV-Membran) der mit der PDT behandelten CNV-Membranen

Patient	Auge	Diagnose	CNV-Typ	Anzahl PDT	Größe (PD)*	Intervall**
1	LA	AMD	okkult	1	1,5	29
2	LA	AMD	okkult	5	2	4
3	LA	AMD	überw. klassisch	1	3	2
4	LA	AMD	klassisch, hämorr.	7	4	3
5	LA	AMD	überw. klassisch, hämorr.	3	2	12
6	RA	AMD, Myopie	klassisch, hämorr.	1	3	2
7	RA	AMD, Myopie	okkult	2	6	24
8	LA	POHS	überw. klassisch	4	1	17
9	RA	Hamartom	min. klassisch, hämorr.	3	3	10
10	LA	idiopathisch	überw. klassisch	4	2	8
11	RA	idiopathisch	überw. klassisch	2	3	1

*PD=Papillenflächen, ** Intervall zwischen letzter PDT und OP in Monaten

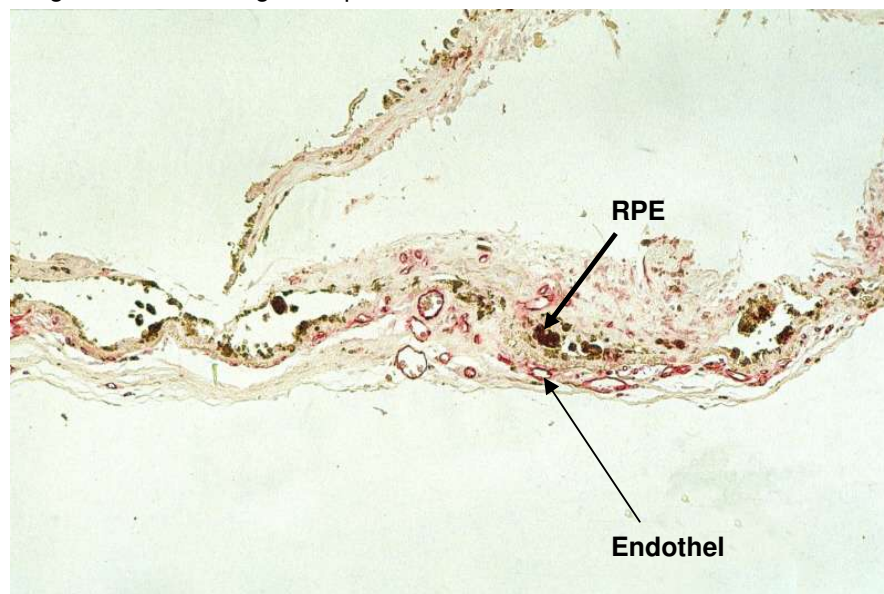
Tabelle 6: Klinische Charakteristika der unbehandelten CNV-Membranen (CNV-Typ sowie Größe der Läsion)

Patient	Auge	Diagnose	CNV-Typ	Größe (PD)*
1	LA	AMD	okkult	1,5
2	RA	AMD	okkult	6
3	LA	AMD	überw. klassisch	3
4	LA	AMD	klassisch	4
5	RA	AMD	klassisch	2
6	LA	AMD	klassisch	3
7	RA	AMD, Myopie	okkult	6
8	RA	POHS	klassisch	1
9	LA	idiopathisch	überw. klassisch	2

* PD=Papillenflächen

Histologisch bestanden die CNV-Membranen aus fibrovaskulärem Gewebe, das sich aus Fibrozyten und teilweise vorhandenen Blutungen zusammensetzte. Den Hauptanteil der zellulären Bestandteile der Membranen bildeten vaskuläres Endothel sowie retinales Pigmentepithel (Abb.10). Unterhalb des RPE zeigten sich diffuse basale Ablagerungen.

Abbildung 10: PDT-behandelte CNV-Membran bei 100-facher Vergrößerung mit retinalem Pigmentepithel und Endothelzellen



4.1.2. Vergleich der mit der PDT behandelten CNV-Membranen mit den un- behandelten CNV-Membranen

Die Anzahlen der positiv gefärbten Zellen für die nachzuweisenden Antigene in den zwei Gruppen wurden gegenübergestellt, um zu beurteilen, ob signifikante Unterschiede zwischen den Werten bestehen.

4.1.2.1. CD 31

Abbildung 11: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für CD 31 bei 100-facher Vergrößerung

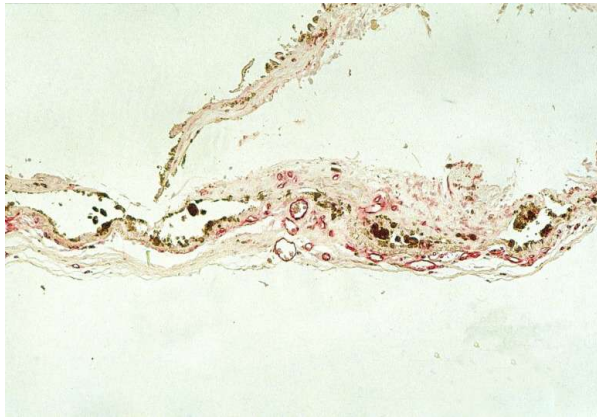


Abbildung 12: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für CD 31 bei 200-facher Vergrößerung

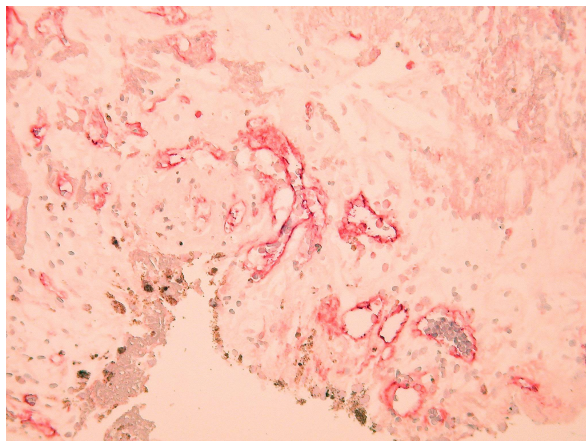


Abbildung 13: unbehandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für CD 31 bei 200-facher Vergrößerung

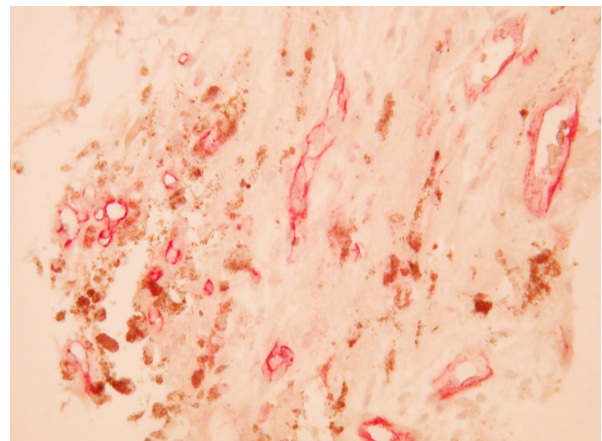
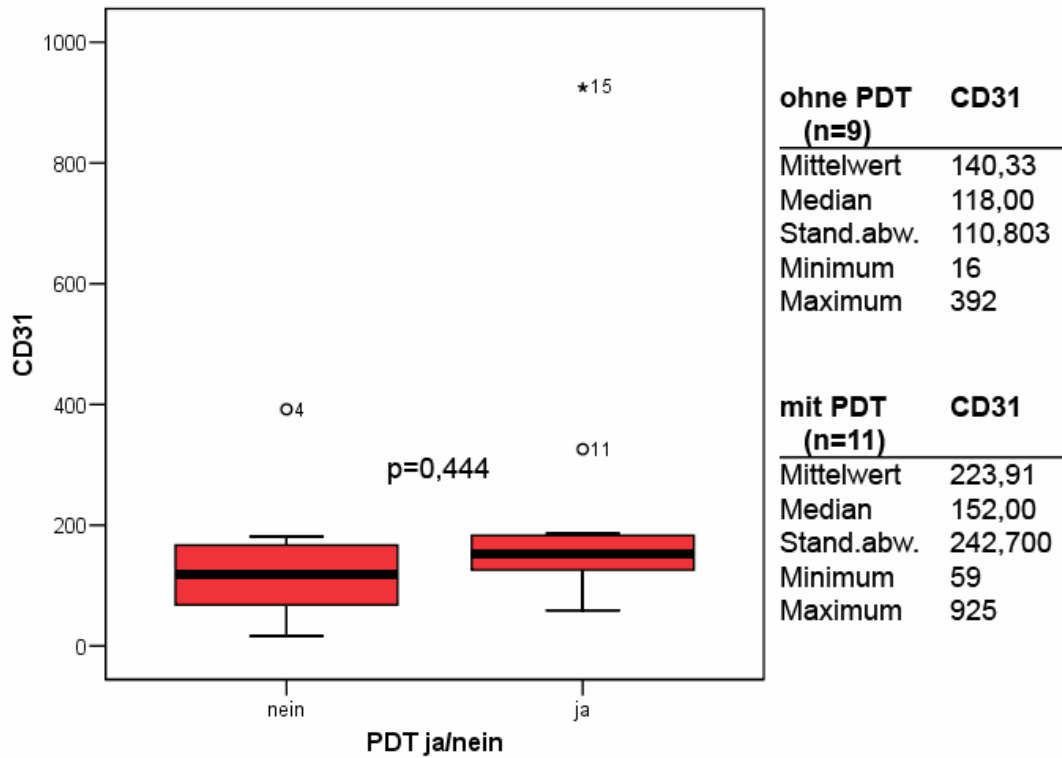


Abbildung 14: Vergleich der Anzahl der CD31-positiv gefärbten Zellen in den CNV-Membranen der behandelten (PDT ja) und der unbehandelten Gruppe (PDT nein) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)



4.1.2.2. CD 34

Abbildung 15: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für CD 34 bei 100-facher Vergrößerung.

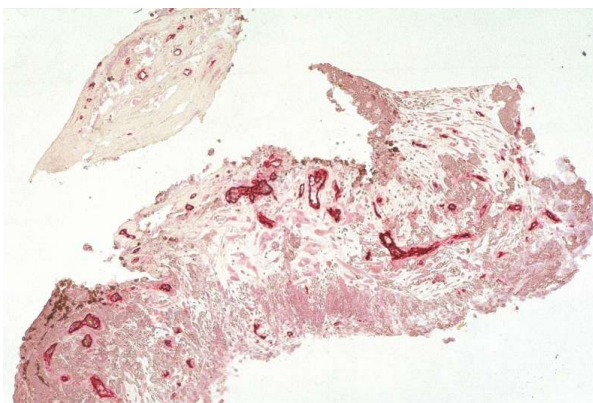


Abbildung 16: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für CD 34 bei 200-facher Vergrößerung.

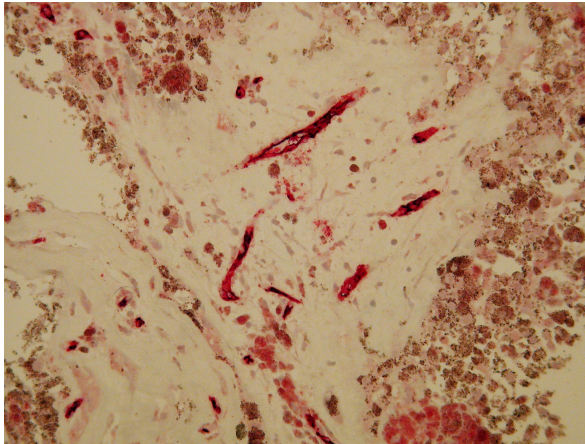


Abbildung 17: unbehandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für CD 34 bei 200-facher Vergrößerung.

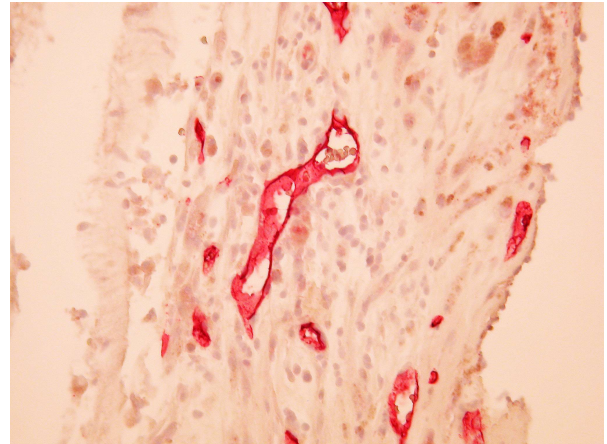
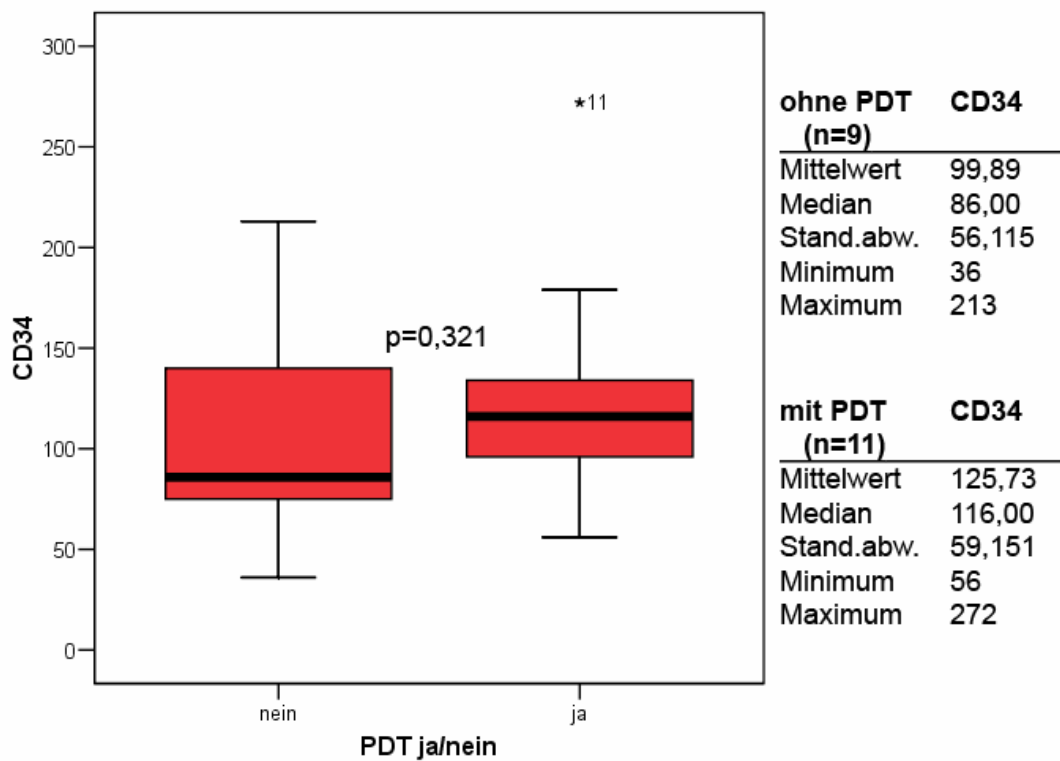


Abbildung 18: Vergleich der Anzahl der CD34-positiv gefärbten Zellen in den CNV-Membranen der behandelten (PDT ja) und der unbehandelten Gruppe (PDT nein) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)



4.1.2.3. CD 105

Abbildung 19: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für CD 105 bei 100-facher Vergrößerung.

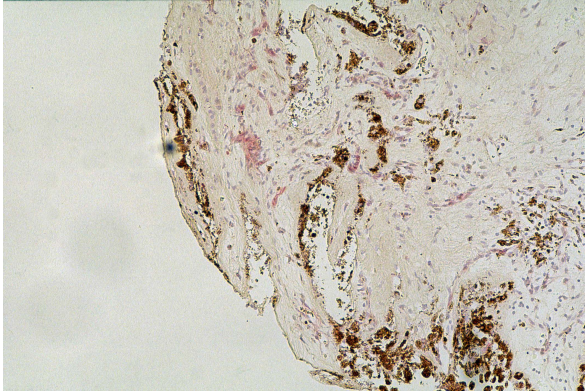


Abbildung 20: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für CD 105 bei 200-facher Vergrößerung.

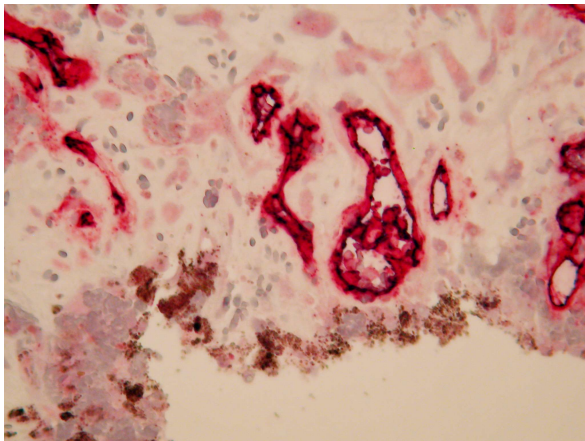


Abbildung 21: unbehandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für CD 105 bei 200-facher Vergrößerung.

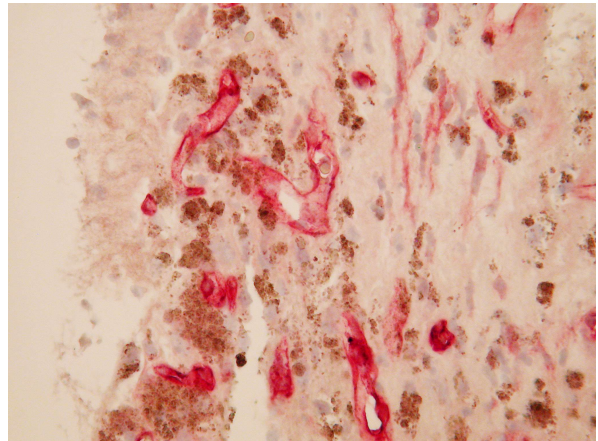
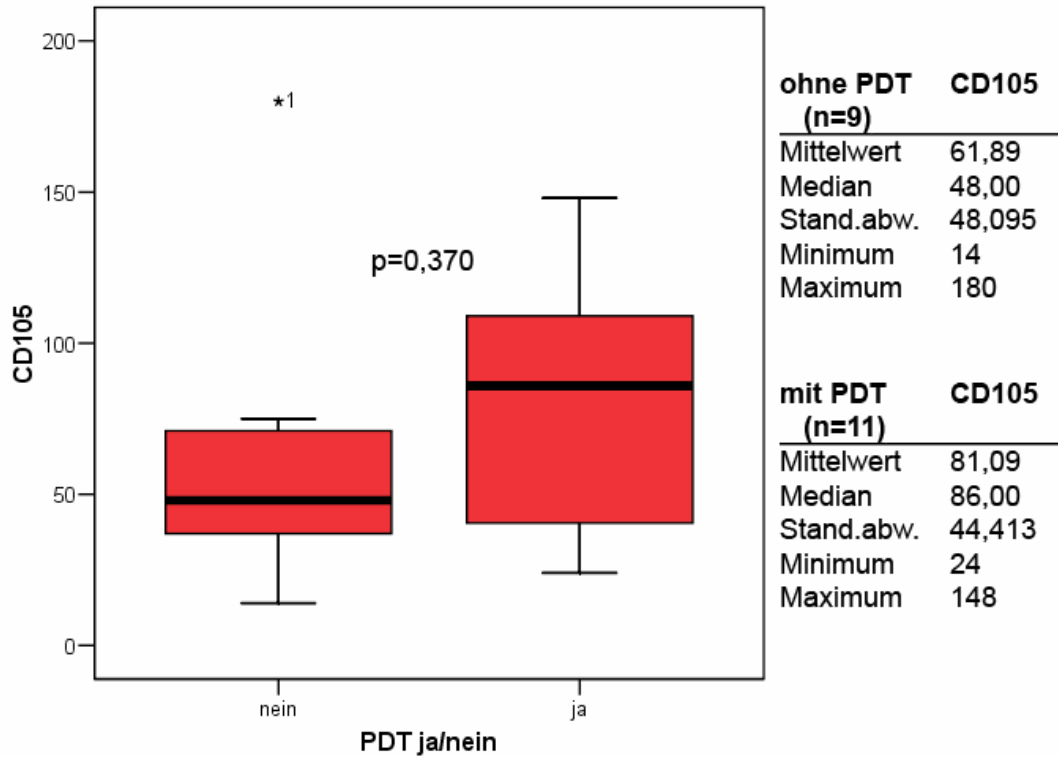


Abbildung 22: Vergleich der Anzahl der CD105-positiv gefärbten Zellen in den CNV-Membranen der behandelten (PDT ja) und der unbehandelten Gruppe (PDT nein) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)



Alle CNV-Membranen waren vaskularisiert und zeigten positiv gefärbte Endothelien bei dem Nachweis von CD 31, CD 34 und CD 105. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Proben, die mit der PDT behandelt worden waren und denen, die ohne vorhergehende Behandlung exzidiert worden waren, konnte nicht beobachtet werden. Lediglich bei der Untersuchung des CD105 fand sich eine Tendenz zu einer erhöhten Expression in der mit der PDT behandelten Gruppe im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe, die jedoch nicht statistisch signifikant war.

4.1.2.4. VEGF

Abbildung 23: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für VEGF bei 100-facher Vergrößerung.

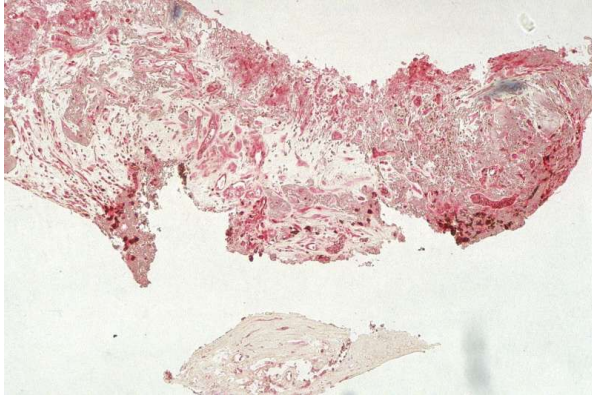


Abbildung 24: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für VEGF bei 200-facher Vergrößerung.

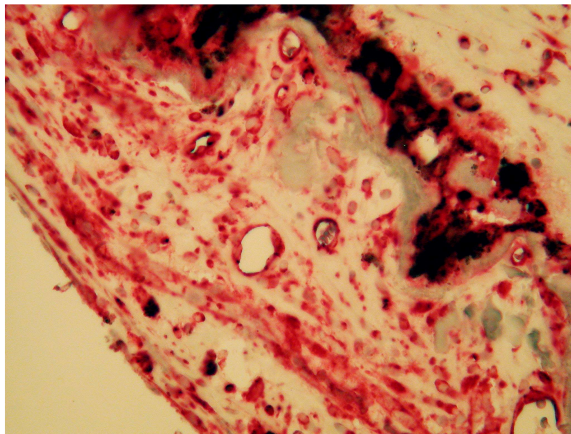


Abbildung 25: unbehandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für VEGF bei 200-facher Vergrößerung.

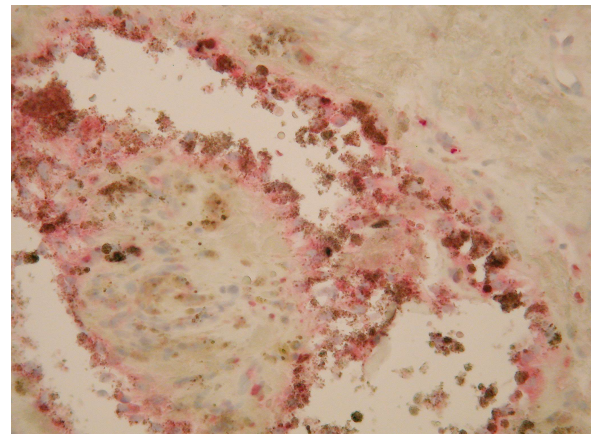
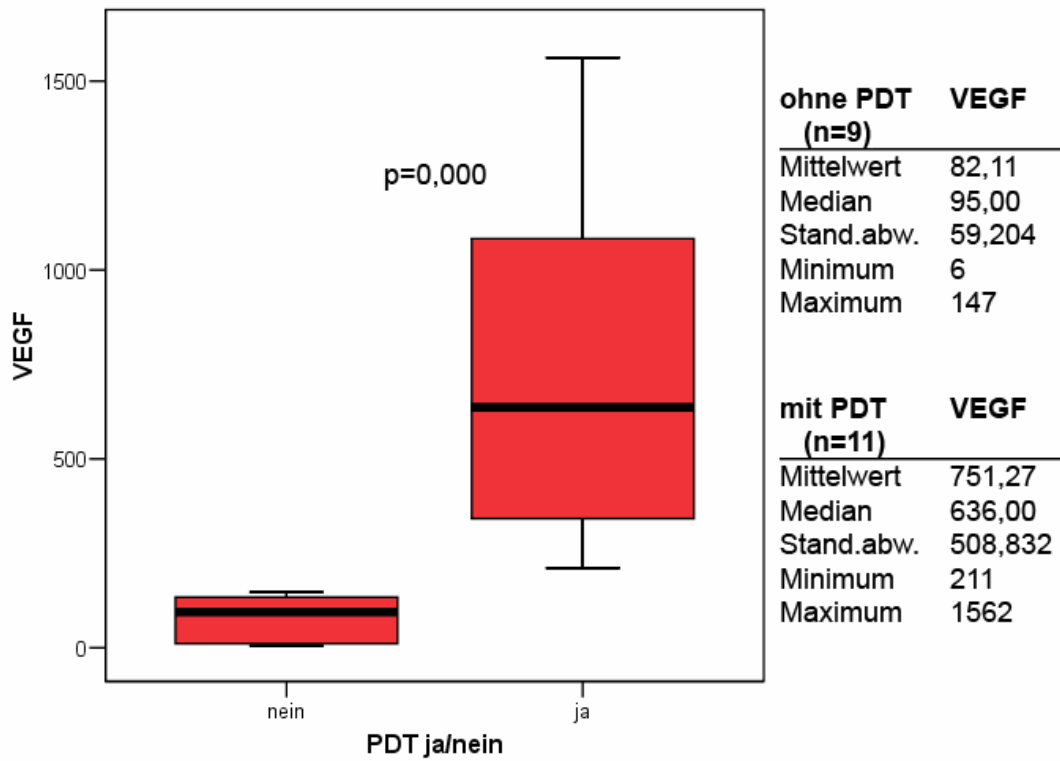


Abbildung 26: Vergleich der Anzahl der VEGF-positiv gefärbten Zellen in den CNV-Membranen der behandelten (PDT ja) und der unbehandelten Gruppe (PDT nein) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)



Der Nachweis des Proteins VEGF ergab eine signifikante Erhöhung ($p=0,00$) der positiv gefärbten Zellen in den Membranen, die mit der PDT behandelt worden waren, gegenüber der nicht behandelten Gruppe.

4.1.2.5. Flt-1

Abbildung 27: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für Flt-1 bei 100-facher Vergrößerung.



Abbildung 28: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für Flt-1 bei 200-facher Vergrößerung.

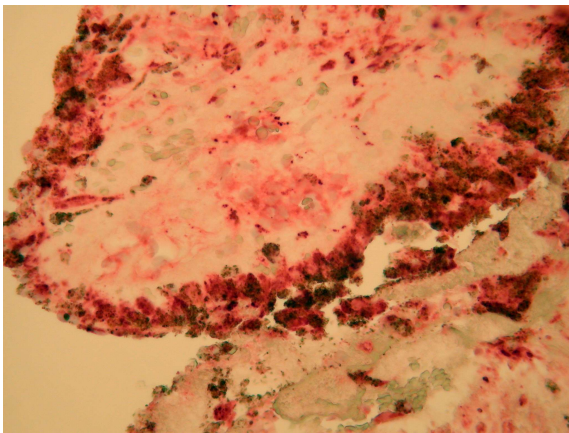


Abbildung 29: unbehandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für Flt-1 bei 200-facher Vergrößerung.

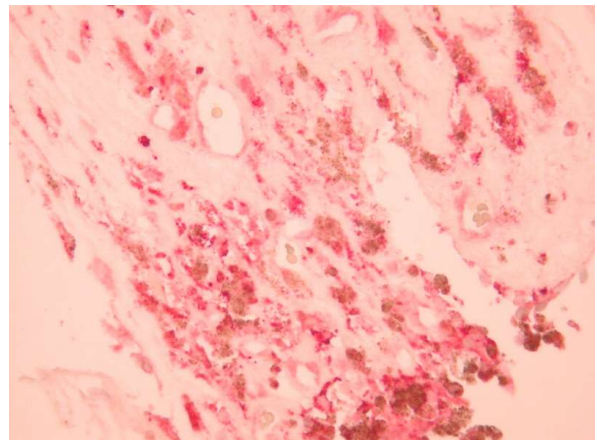
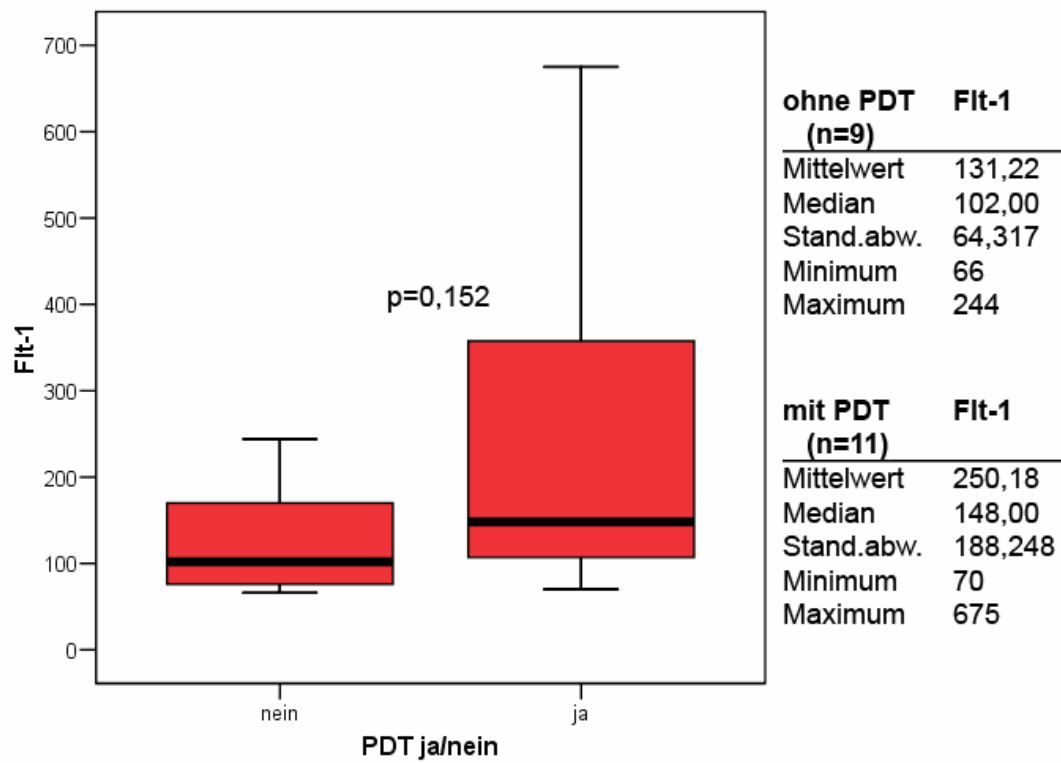


Abbildung 30: Vergleich der Anzahl der Flt-1-positiv gefärbten Zellen in den CNV-Membranen der behandelten (PDT ja) und der unbehandelten Gruppe (PDT nein) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)



Für den VEGF-Rezeptor Flt-1 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl positiver Zellen in den Membranen beider Gruppen nachgewiesen werden und so ergab sich auch keine signifikante Korrelation zwischen den Werten für VEGF und seinen Rezeptor ($p=0,237$).

4.1.2.6. PEDF

Abbildung 31: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für PEDF bei 100-facher Vergrößerung.

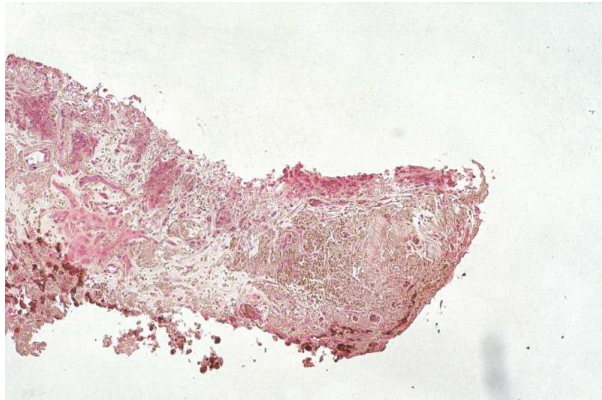


Abbildung 32: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für PEDF bei 200-facher Vergrößerung.

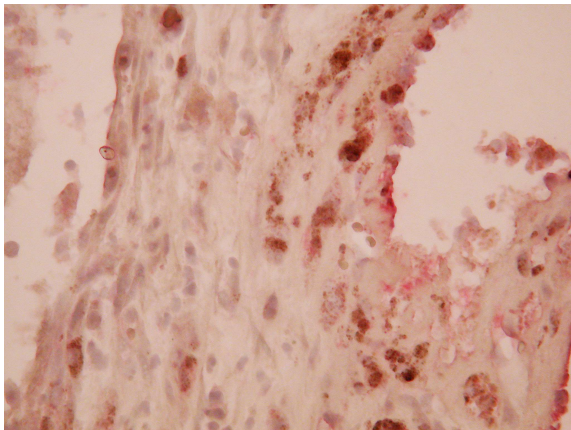


Abbildung 33: unbehandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für PEDF bei 200-facher Vergrößerung.

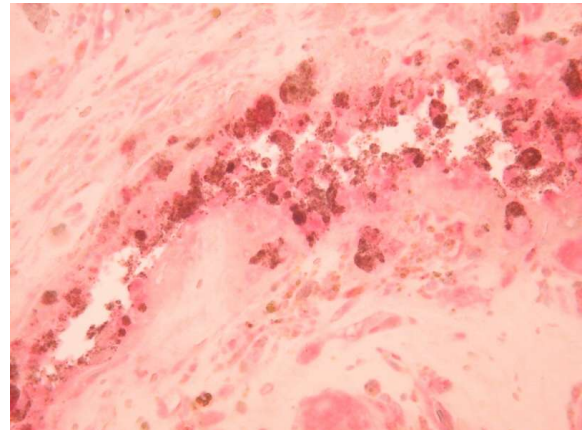
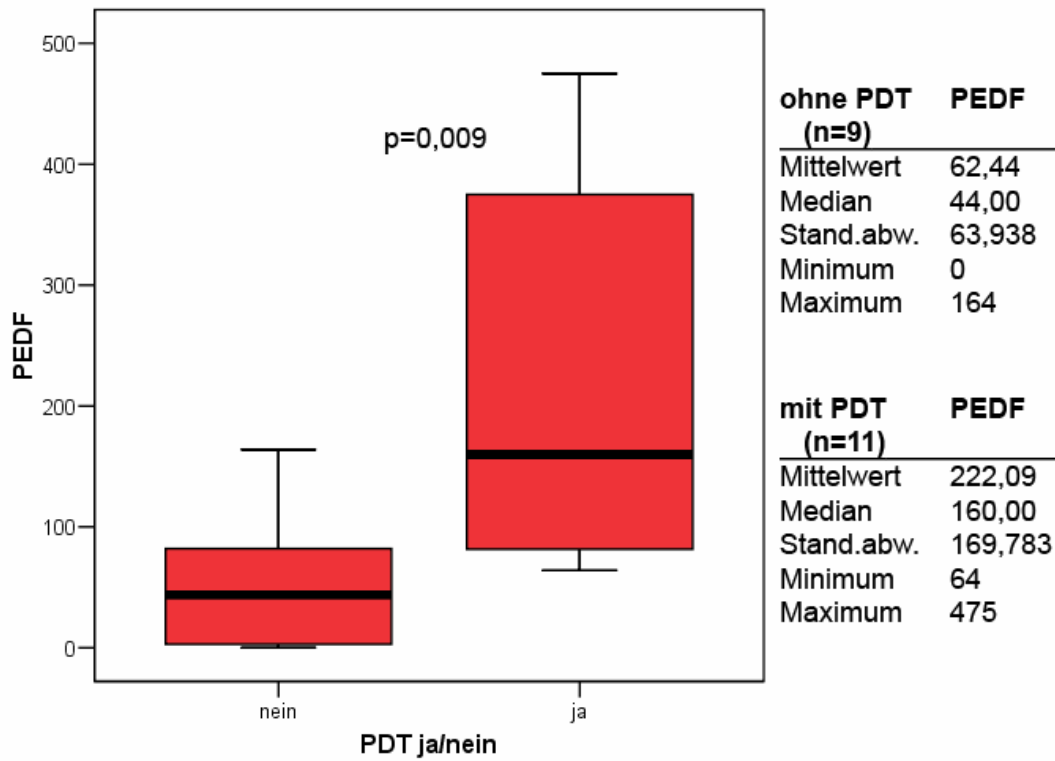


Abbildung 34: Vergleich der Anzahl der PEDF-positiv gefärbten Zellen in den CNV-Membranen der behandelten (PDT ja) und der unbehandelten Gruppe (PDT nein) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)



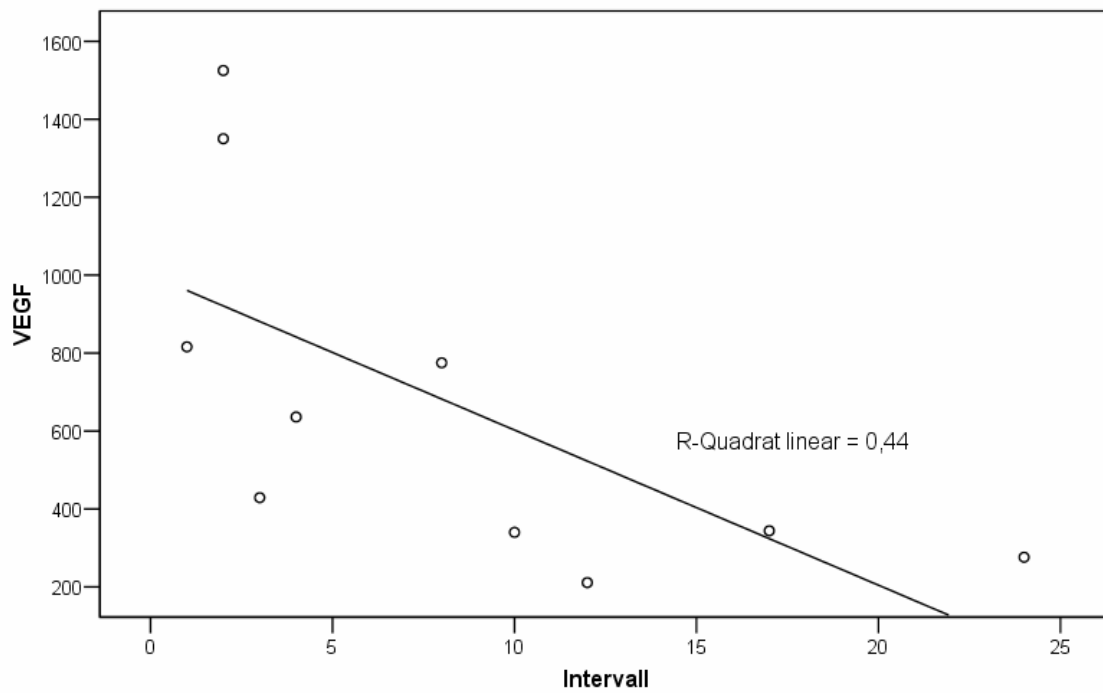
Die Untersuchungen hinsichtlich des PEDF zeigten ebenfalls eine signifikant erhöhte ($p=0.009$) Anzahl positiver Zellen in den Proben der behandelten Gruppe.

Ein Zusammenhang der Erhöhung der VEGF- und PEDF- Konzentrationen in der behandelten Gruppe mit der Größe der CNV-Membranen (je größer die Fläche der Membran desto höher die Expression von VEGF bzw. PEDF) konnte ausgeschlossen werden (VEGF: $p=0,747$; PEDF: $p=0,516$).

4.1.3. Korrelation von Markerkonzentration und Zeitintervall

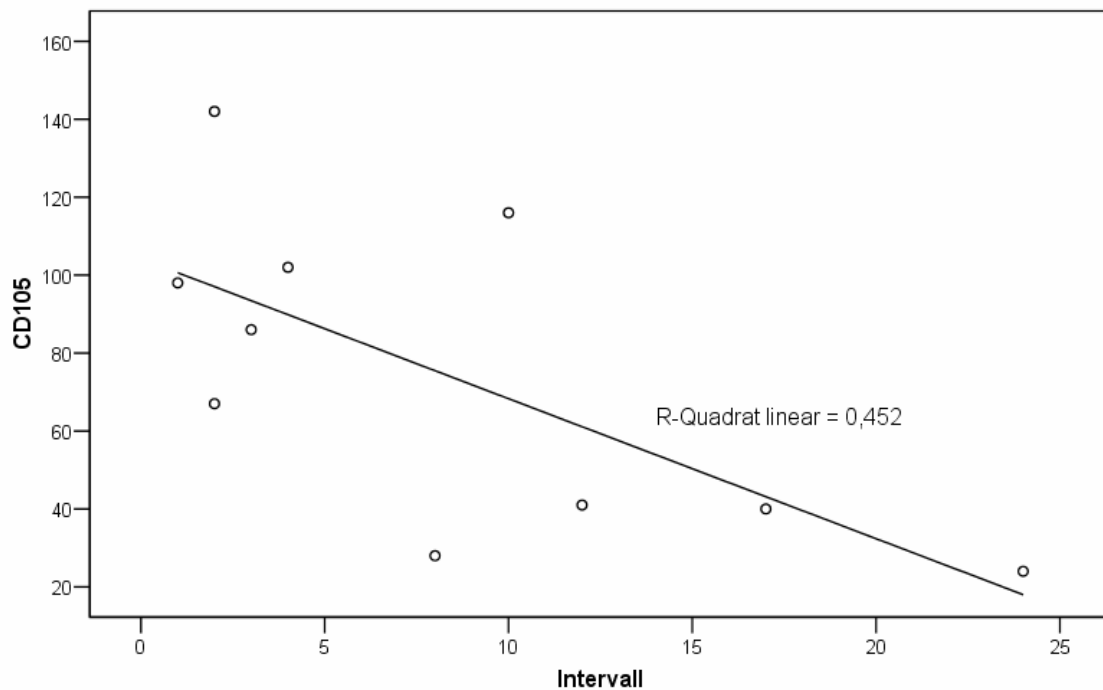
Ebenfalls analysiert wurde der Einfluss des Zeitintervalls in Monaten zwischen der letzten PDT und der operativen Entfernung der CNV-Membran auf die Anzahl der positiv gefärbten Zellen in den Präparaten.

Abbildung 35: Anzahl VEGF-positiv gefärbter Zellen in Abhängigkeit vom Zeitintervall in Monaten zwischen letzter PDT und der operativen Entfernung der CNV-Membran



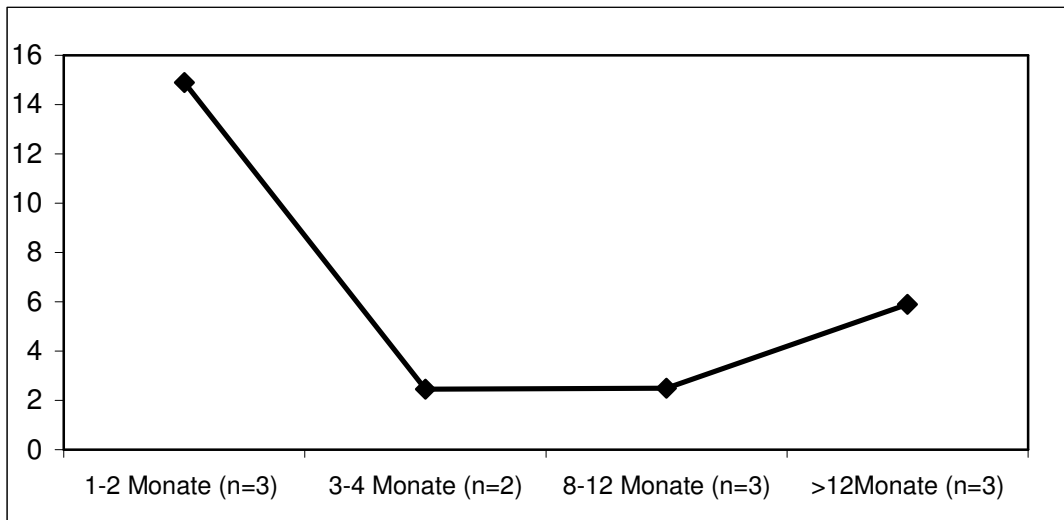
Bei der Untersuchung des VEGF konnte beobachtet werden, dass die Anzahl der positiven Zellen abnahm, je mehr Zeit zwischen der letzten Behandlung und der operativen Entfernung der CNV-Membran lag (Korrelationskoeffizient= -0,851; p=0,002).

Abbildung 36: Anzahl CD105-positiv gefärbter Zellen in Abhängigkeit vom Zeitintervall in Monaten zwischen letzter PDT und der operativen Entfernung der CNV-Membran



Für die Werte der mit CD 105 gefärbten Zellen konnte eine ähnliche Abhängigkeit wie für den VEGF festgestellt werden, die knapp die Signifikanzgrenze verfehlte. Je mehr Zeit zwischen der Behandlung und der Operation lag, desto weniger CD 105-positive Zellen konnten nachgewiesen werden (Korrelationskoeffizient = -0,608; $p= 0,062$). Für alle anderen untersuchten Marker konnte keine Abhängigkeit von dem zeitlichen Abstand zwischen Behandlung und Entfernung beobachtet werden.

Abbildung 37: Deskriptive Darstellung des Quotienten aus der Anzahl VEGF-positiver Zellen über der Anzahl PEDF-positiver Zellen im zeitlichen Verlauf nach der Behandlung mit der Photodynamischen Therapie.



Der Quotient aus der Anzahl VEGF-positiver Zellen über der Anzahl PEDF-positiver Zellen zeigt zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung mit der Photodynamischen Therapie unterschiedliche Werte: in den ersten zwei Monaten nach der Therapie ist das Verhältnis VEGF/PEDF deutlich zugunsten des VEGF verschoben. Im Zeitraum von 3-12 Monaten ist das Verhältnis der beiden Faktoren zueinander annähernd 2:1. Nach Ablauf eines Jahres steigt die Anzahl der VEGF-positiven Zellen wieder etwas mehr. Aufgrund der geringen Fallzahl konnten diese Beobachtungen nicht statistisch verifiziert werden.

4.2. Ergebnisse Aderhautmelanome

In diesem Versuchsteil wurden vier Aderhautmelanome von Patienten, die mit der Photodynamischen Therapie behandelt worden waren, untersucht. Fünf Aderhautmelanome von Patienten, die nicht mit der PDT behandelt worden waren, dienten als Vergleichsgruppe.

Bei allen vier Melanomen konnte mit der Lichtdosis von 150 J/cm² eine Tumornekrose in einem Areal induziert werden (siehe Abb. 31 Pfeil), welches mit dem Bereich, in dem die PDT appliziert wurde, übereinstimmte. Das nekrotische Gewebe ließ sich deutlich von vitalem Tumorgewebe abgrenzen (Abb. 32) und um diesen Bereich herum zeigte sich eine inflammatorische Reaktion mit Beteiligung von Makrophagen und Granulozyten. In dem Nekroseareal fand sich eine weitgehende Zerstörung der Zellstrukturen und

der Tumorgefäße sowie Extravasation von Blutbestandteilen im Interzellularraum. Einzelne vitale Restinseln mit intakten Tumorzellen blieben in diesem Bereich bestehen (s. Abb. 41).

Abbildung 38: makroskopisches Foto eines Aderhautmelanoms mit durch die PDT erzeugter Nekrose.

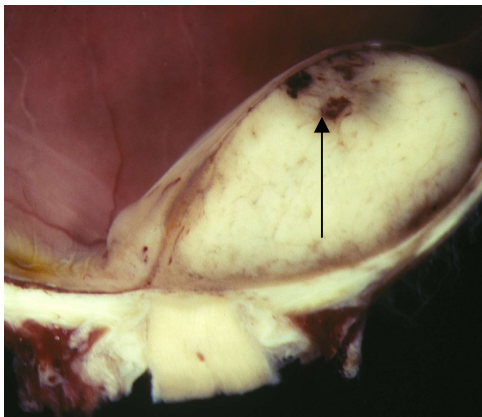


Abbildung 39: mikroskopisches Bild eines Aderhautmelanoms mit durch die PDT erzeugter Nekrose bei 50-facher Vergrößerung.

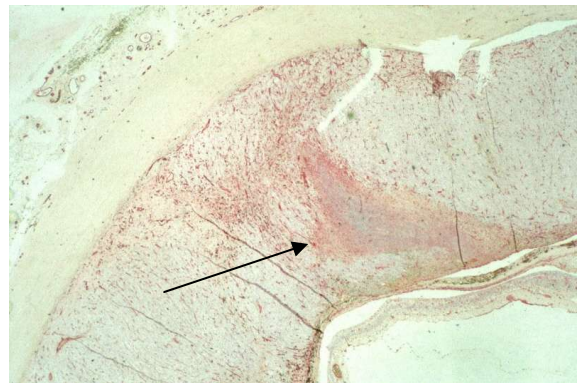


Abbildung 40: mit der PDT behandeltes Aderhautmelanom nach immunhistochemischer Färbung in 200-facher Vergrößerung. Deutlich erkennbar die drei Zonen des Tumors: die Nekrosezone, die Übergangszone zwischen Nekrose und unbehandeltem Areal des Tumors sowie der unbehandelte Bereich.

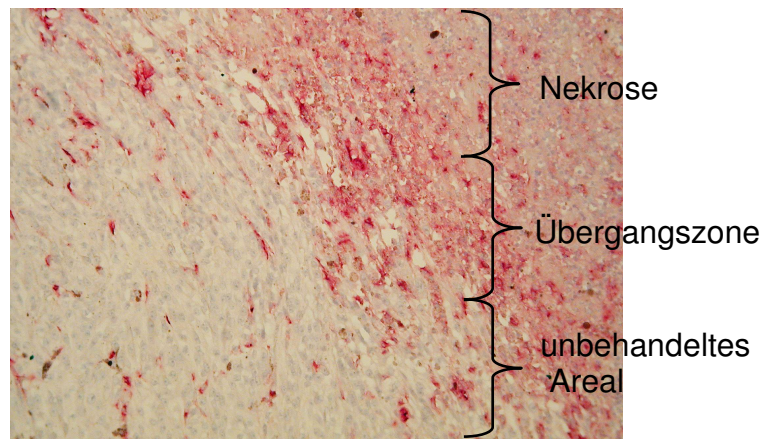


Abbildung 41: Aderhautmelanom nach der Behandlung mit der PDT (50-fache Vergrößerung). Es zeigt sich eine deutliche Nekrose im Behandlungsareal (Pfeile) sowie einige Restinseln vitaler Zellen innerhalb der Nekrose.



Nach der immunhistochemischen Färbung wurden die Präparate wie beschrieben unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

Aufgrund der geringen Fallzahl kamen keine statistischen Tests zur Anwendung und so erfolgt die Darstellung der erhobenen Daten deskriptiv.

4.2.1.1. CD 31

Abbildung 42: mit der PDT behandeltes Aderhautmelanom nach immunhistochemischer Färbung für CD31 bei 200-facher Vergrößerung. Die drei Zonen des Tumors sind deutlich erkennbar: Nekrosezone (N), Übergangszone (Ü) und unbehandeltes Areal (uA)

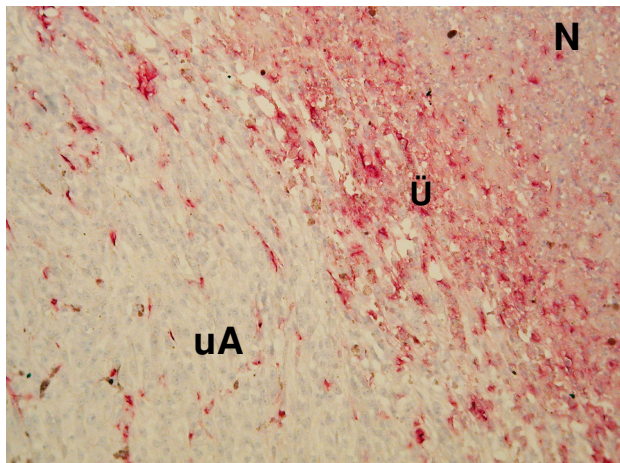


Abbildung 43: unbehandeltes Aderhautmelanom nach immunhistochemischer Färbung für CD31 bei 200-facher Vergrößerung.

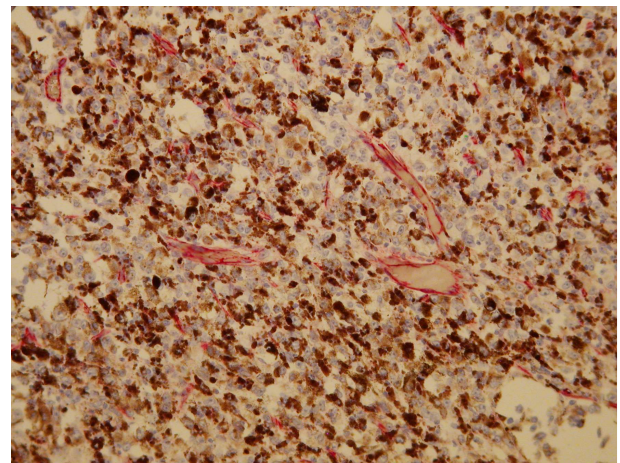


Abbildung 44: Anzahl der CD 31-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen (Nekrose, Übergang, unbehandelt) der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Vergleich) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)

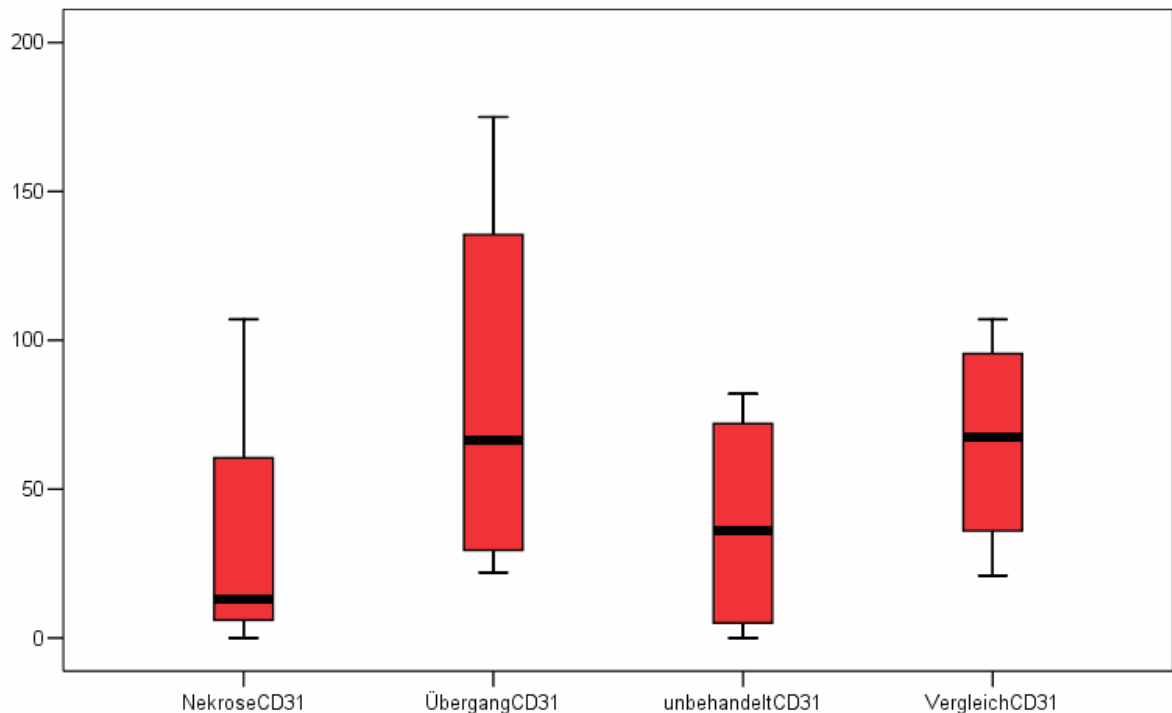


Tabelle 7: Anzahl der CD 31-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)

		Nekrose CD 31	Übergang CD 31	unbehandelt CD 31	Vergleichstumore CD 31
N	gültig	4	4	4	5
	fehlend	0	0	0	0
Mittelwert		33,25	82,50	38,50	55,60
Median		13,00	66,50	36,00	51,00
Standardabweichung		49,554	69,448	39,745	39,734
Minimum		0	22	0	15
Maximum		107	175	82	107

4.2.1.2. CD 34

Abbildung 45: mit der PDT behandeltes Aderhautmelanom nach immunhistochemischer Färbung für CD34 bei 200-facher Vergrößerung. Die drei Zonen des Tumors sind deutlich erkennbar: Nekrosezone (N), Übergangszone (Ü) und unbehandeltes Areal (uA).

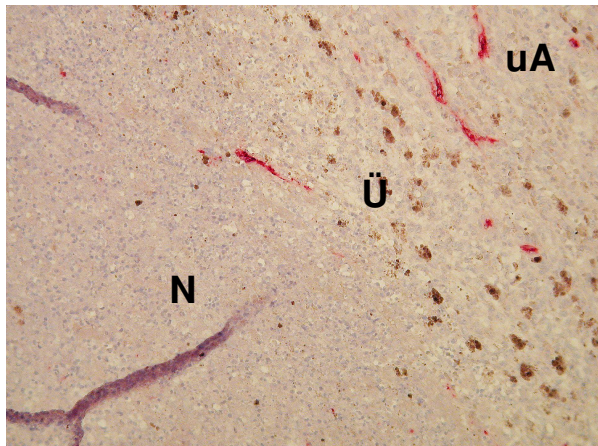


Abbildung 46: unbehandeltes Aderhautmelanom nach immunhistochemischer Färbung für CD34 bei 200-facher Vergrößerung.

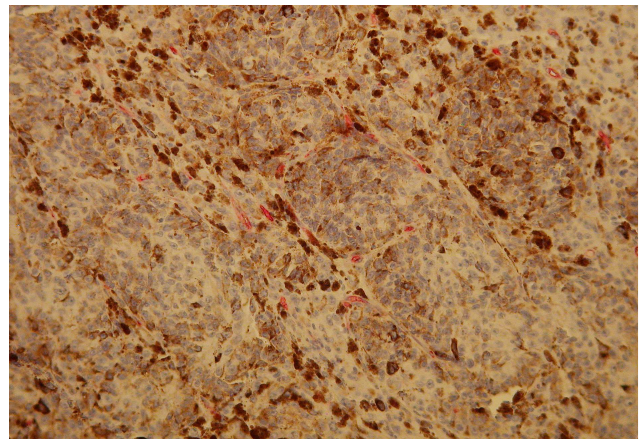


Abbildung 47: Anzahl der CD 34-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen (Nekrose, Übergang, unbehandelt) der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Vergleich) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)

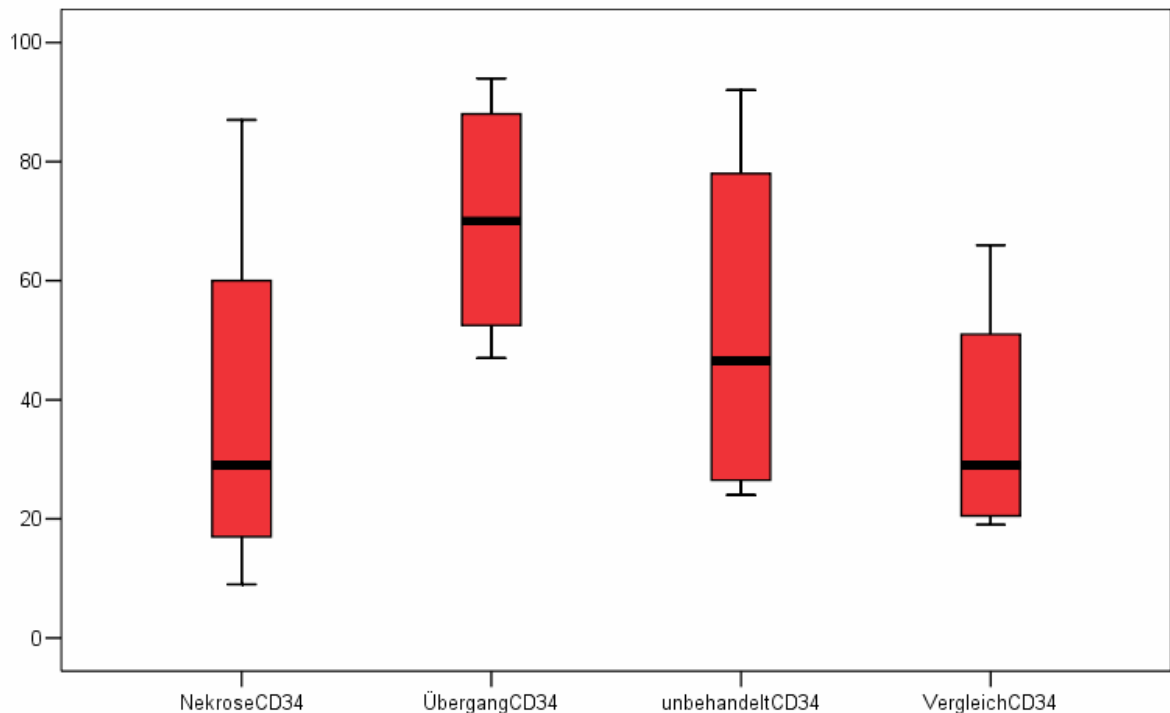


Tabelle 8: Anzahl der CD 34-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)

		Nekrose CD 34	Übergang CD 34	unbehandelt CD 34	Vergleichstumore CD 34
N	gültig	4	4	4	5
	fehlend	0	0	0	0
Mittelwert		38,50	70,25	52,25	37,00
Median		29,00	70,00	46,50	36,00
Standardabweichung		33,838	21,546	31,920	18,815
Minimum		9	47	24	19
Maximum		87	94	92	66

Die Vaskularisierung der behandelten Tumore, nachgewiesen mittels Auszählung der positiv gefärbten Zellen für CD 34 und CD 31 stellte sich in dem Nekroseareal gegenüber der Übergangszone sowie der unbehandelten Zone der PDT-behandelten Melanome reduziert dar. In der Übergangszone zwischen nekrotischem und vitalem Tumorgewebe fand sich gegenüber den beiden anderen Zonen sowie der Vergleichsgruppe eine Erhöhung der positiv gefärbten Zellen der beiden Gefäßmarker.

Im unbehandelten Tumorgewebe konnte im Vergleich zu dem Gewebe der nicht behandelten Vergleichstumore für die Werte CD 34- und CD 31-positiver Zellen kein Unterschied festgestellt werden.

4.2.1.3. CD 105

Abbildung 48: mit der PDT behandeltes Aderhautmelanom nach immunhistochemischer Färbung für CD105 bei 200-facher Vergrößerung. Die drei Zonen des Tumors sind deutlich erkennbar: Nekrosezone (N), Übergangszone (Ü) und unbehandeltes Areal (uA).

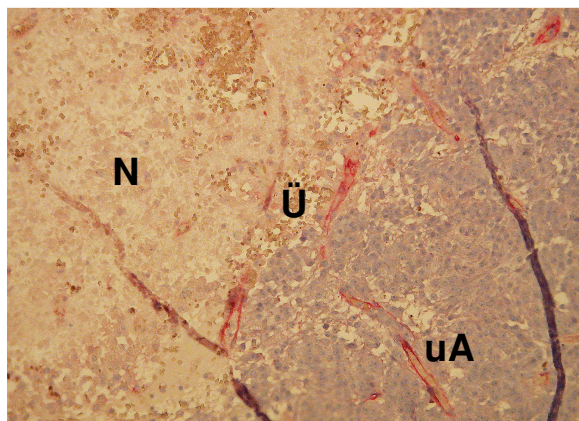


Abbildung 49: unbehandeltes Aderhautmelanom nach immunhistochemischer Färbung für CD105 bei 200-facher Vergrößerung.

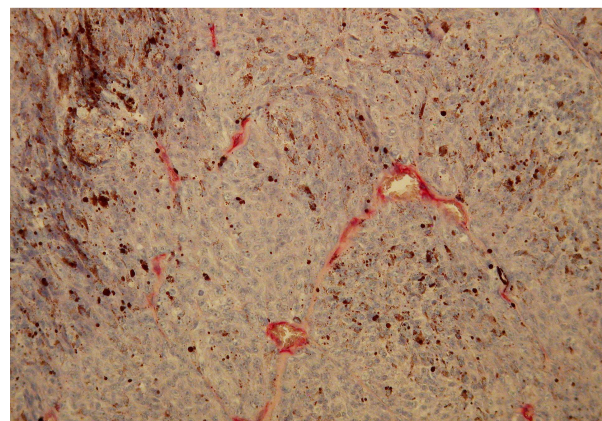


Abbildung 50: Anzahl der CD 105-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen (Nekrose, Übergang, un-
behandelt) der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kon-
trollgruppe (Vergleich) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)

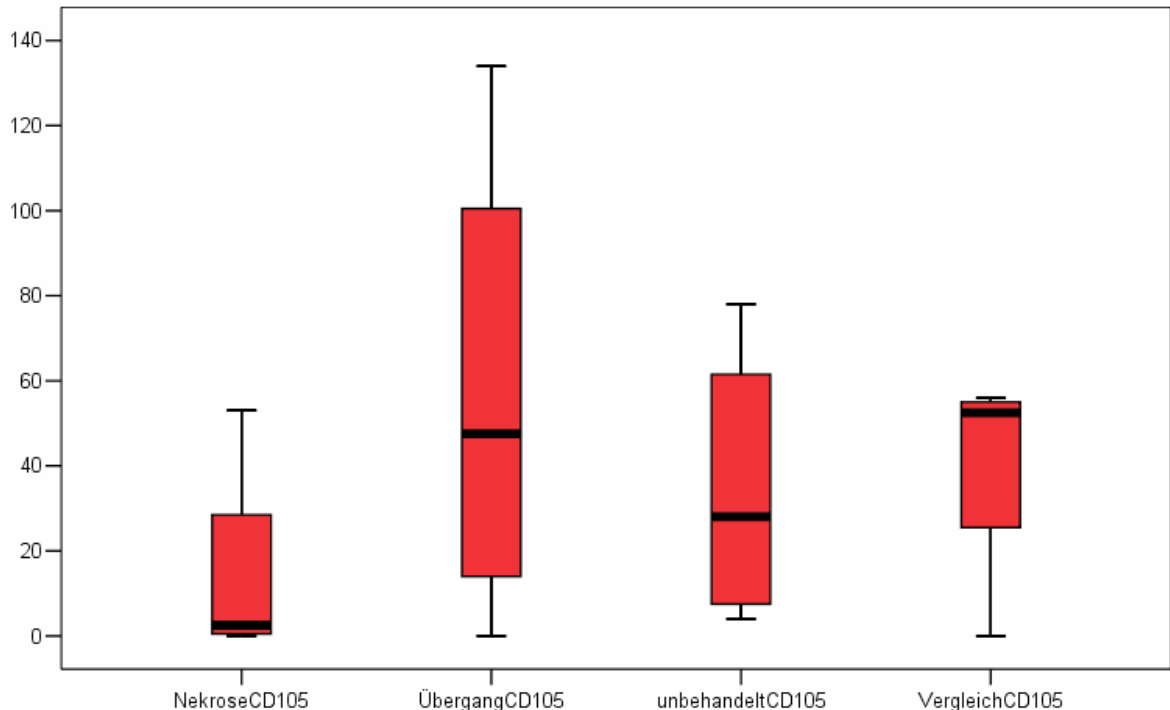


Tabelle 9: Anzahl der CD 105-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen der mit der PDT behandel-
ten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Maximum, Minimum,
Standardabweichung, Median)

		Nekrose CD 105	Übergang CD 105	unbehandelt CD 105	Vergleichstumore CD 105
N	gültig	4	4	4	5
	fehlend	0	0	0	0
Mittelwert		14,50	57,25	34,50	41,80
Median		2,50	47,50	28,00	51,00
Standardabweichung		25,723	58,077	34,083	23,563
Minimum		0	0	4	0
Maximum		53	134	78	56

Bei der Untersuchung des CD105 in der Nekrosezone zeigte sich die Anzahl der posi-
tiven Zellen ebenfalls gegenüber den beiden anderen Zonen der behandelten Tumore
sowie der Vergleichsgruppe erniedrigt. In der Übergangzone war die Expression des

Faktors gegenüber der Nekrose- sowie der unbehandelten Zone der behandelten Tumore deutlich und gegenüber der Vergleichsgruppe gering erhöht.

4.2.1.4. VEGF

Abbildung 51: mit der PDT behandeltes Aderhautmelanom nach immunhistochemischer Färbung für VEGF bei 200-facher Vergrößerung. Die drei Zonen des Tumors sind deutlich erkennbar: Nekrosezone (N), Übergangzone (Ü) und unbehandeltes Areal (uA).

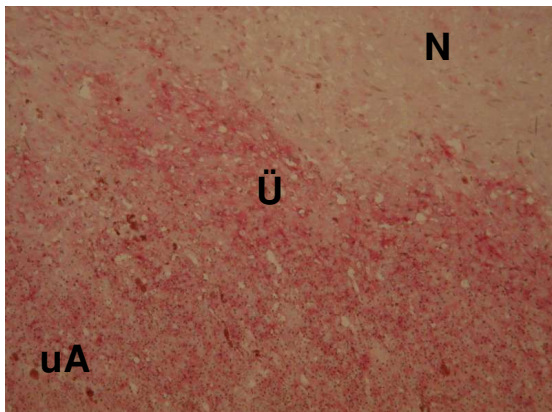


Abbildung 52: unbehandeltes Aderhautmelanom nach immunhistochemischer Färbung für VEGF bei 200-facher Vergrößerung.

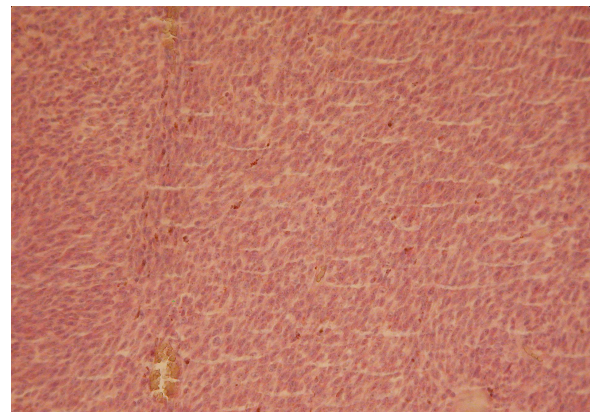


Abbildung 53: Anzahl der VEGF-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe

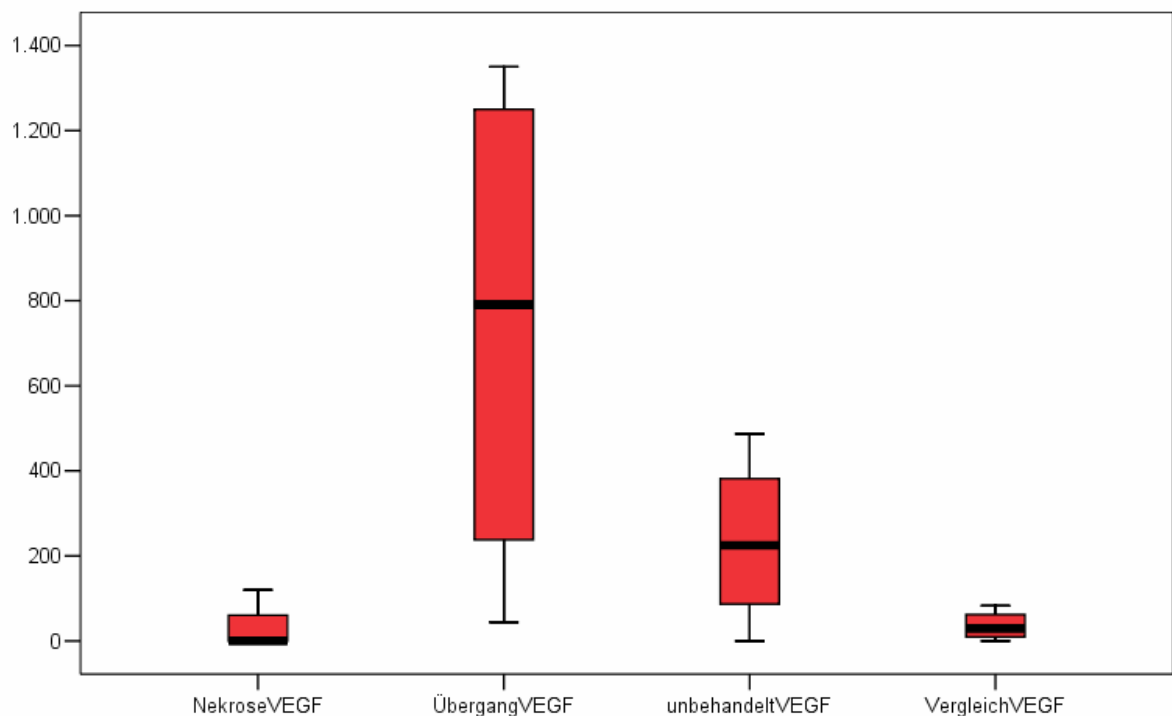


Tabelle 10: Anzahl der VEGF-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)

		Nekrose VEGF	Übergang VEGF	unbehandelt VEGF	Vergleichstumore VEGF
N	gültig	4	4	4	5
	fehlend	0	0	0	0
Mittelwert		30,25	744,00	234,25	28,60
Median		0,50	791,00	225,00	19,00
Standardabweichung		59,835	610,851	203,412	34,789
Minimum		0	44	0	0
Maximum		120	1350	487	83

4.2.1.5. Flt-1

Abbildung 54: mit der PDT behandeltes Aderhautmelanom nach immunhistochemischer Färbung für Flt-1 bei 200-facher Vergrößerung. Die drei Zonen des Tumors sind deutlich erkennbar: Nekrosezone, Übergangszone und unbehandeltes Areal.

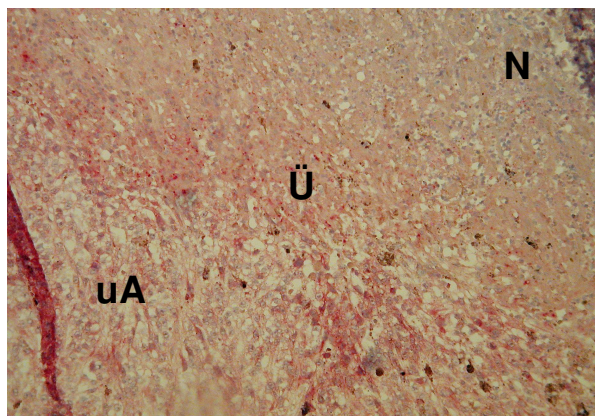


Abbildung 55: unbehandeltes Aderhautmelanom nach immunhistochemischer Färbung für Flt-1 bei 200-facher Vergrößerung.

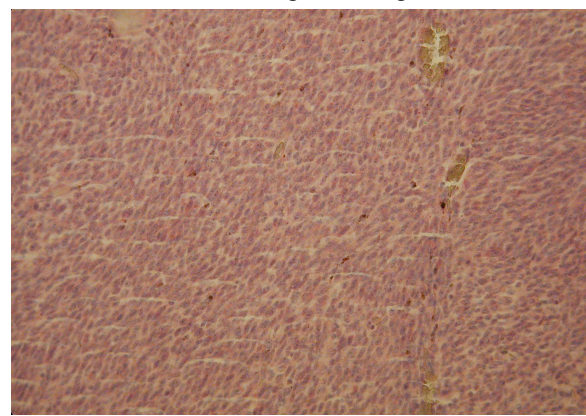


Abbildung 56: Anzahl der Flt-1-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen (Nekrose, Übergang, unbehandelt) der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Vergleich) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)

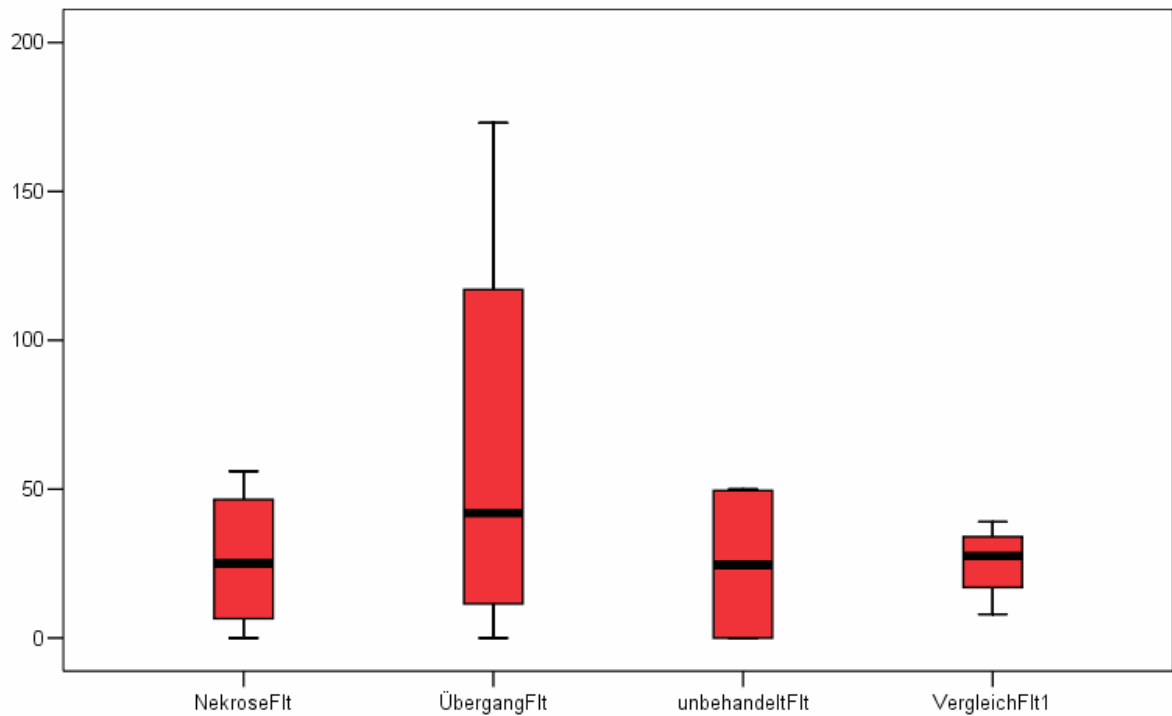


Tabelle 11: Anzahl der Flt-1-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)

		Nekrose Flt-1	Übergang Flt-1	unbehandelt Flt-1	Vergleichstumore Flt-1
N	gültig	4	4	4	5
	fehlend	0	0	0	0
Mittelwert		26,50	64,25	24,75	24,80
Median		25,00	42,00	24,50	26,00
Standardabweichung		24,933	76,739	28,582	11,300
Minimum		0	0	0	8
Maximum		56	173	50	39

4.2.1.6. PEDF

Abbildung 57: mit der PDT behandeltes Aderhautmelanom nach immunhistochemischer Färbung für PEDF bei 200-facher Vergrößerung.

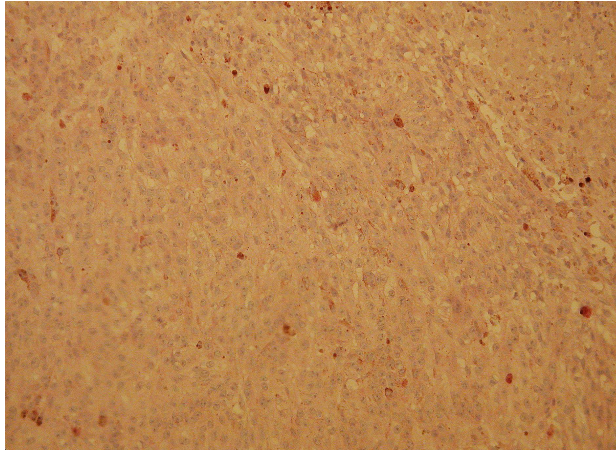


Abbildung 58: unbehandeltes Aderhautmelanom nach immunhistochemischer Färbung für PEDF bei 200-facher Vergrößerung. Es zeigen sich einzelne PEDF-positive Zellen im Tumorgewebe (s. Pfeile).

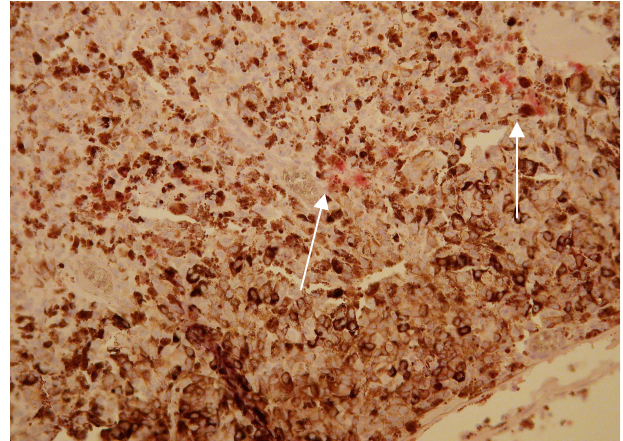


Abbildung 59: Anzahl der PEDF-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen (Nekrose, Übergang, unbehandelt) der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Vergleich) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)

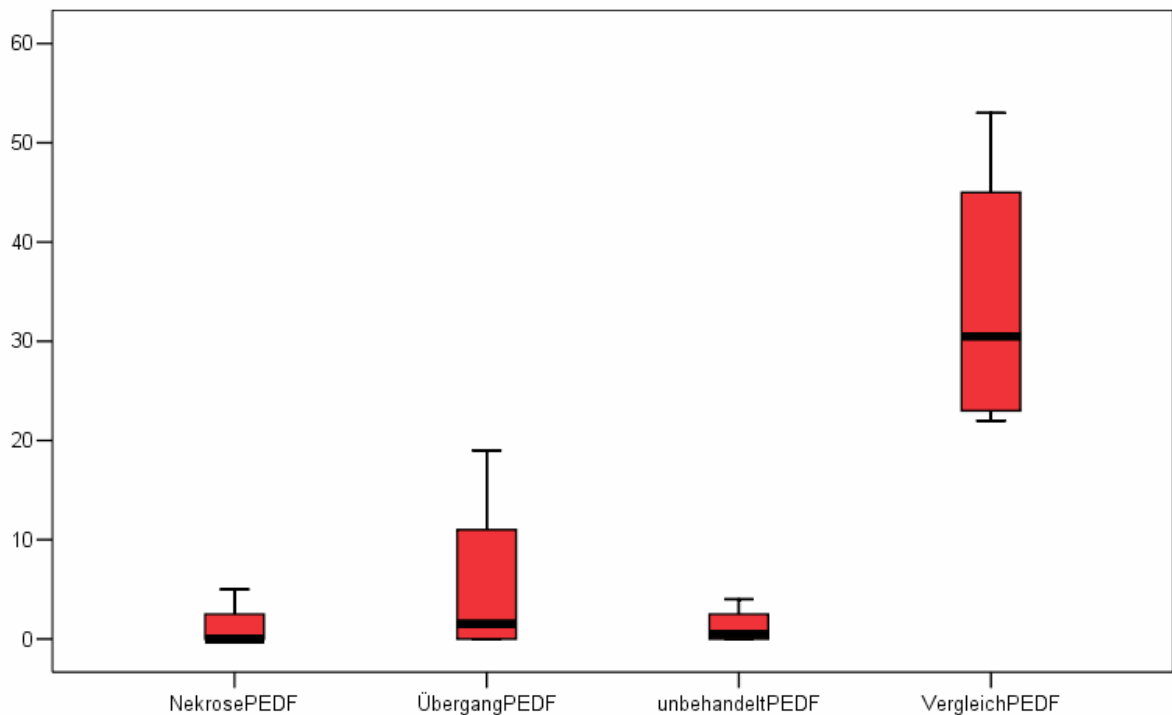


Tabelle 12: Anzahl der PEDF-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)

		Nekrose PEDF	Übergang PEDF	unbehandelt PEDF	Vergleichstumore PEDF
N	gültig	4	4	4	5
	fehlend	0	0	0	0
Mittelwert		1,25	5,50	1,25	30,20
Median		0,00	1,50	0,50	24,00
Standardabweichung		2,500	9,110	1,893	15,023
Minimum		0	0	0	15
Maximum		5	19	4	53

Der VEGF sowie der PEDF waren im Bereich der Nekrose deutlich erniedrigt nachweisbar, während die Konzentration beider Faktoren in der Übergangszone angestiegen war. In dem Bereich der Tumore, der nicht mit der PDT behandelt worden war, zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Erhöhung der Anzahl VEGF-positiver Zellen, bei PEDF hingegen eine Erniedrigung.

Der VEGF-Rezeptor Flt-1 ließ sich im nekrotischen und im unbehandelten Tumorgewebe sowie in der Kontrollgruppe in gleicher Intensität nachweisen. Lediglich in der Übergangszone zwischen nekrotischem und vitalem Tumorgewebe zeigte sich ein Anstieg der positiv gefärbten Zellen.

5. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, einen Beitrag zum Verständnis von Veränderungen der Expression der Angiogenesefaktoren VEGF, VEGFR-1 sowie PEDF nach der Einwirkung der photodynamischen Therapie zu leisten. Um diesen Effekt der PDT im menschlichen Auge zu untersuchen, wurden zwei Modelle verwendet.

Es wurden CNV-Membranen aus dem menschlichen Auge verwendet, die mit der PDT behandelt und im Verlauf der Erkrankung wegen erneuter Aktivität chirurgisch exzidiert worden waren. Dieses Modell sollte die Veränderungen der Angiogenesefaktoren VEGF, PEDF und Flt-1 im Verlauf nach der PDT darstellen und die Ergebnisse mit denen aus der Untersuchung vergleichbarer unbehandelter exzidiert CNV-Membranen verglichen werden.

Im anderen Modell wurde an humanen Aderhautmelanomen untersucht, ob die PDT auch bei einer anderen Pathologie Auswirkungen auf Angiogenesefaktoren hat. Weiterhin sollte in diesem Modell der Kurzzeiteffekt der PDT auf Angiogenesefaktoren in Aderhautmelanomen sowie die Möglichkeit der Induktion einer Nekrose untersucht werden. Die Ergebnisse wurden ebenfalls einer vergleichbaren unbehandelten Kontrollgruppe gegenübergestellt.

5.1. CNV- Membranen nach der Behandlung mit der PDT

In diesem Versuchsteil wurden 11 erneut aktive Neovaskularisationsmembranen nach der Behandlung mit der photodynamischen Therapie untersucht und die Resultate denen aus einer nicht mit der PDT behandelten Gruppe, bestehend aus 9 vergleichbaren CNV-Membranen, gegenübergestellt.

5.1.1. Marker für CD 31, CD 34, CD 105

In allen CNV-Membranen konnten die Gefäßmarker nachgewiesen werden. Es zeigten sich positiv gefärbte Endothelien für CD 31, CD 34 und CD 105. Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Werten der Gruppe der mit der PDT behandelten und der nicht behandelten Membranen. Tatar et al. [148] beschrieben in einer Studie mit 15 PDT-behandelten Membranen, die 3 Tage (n=4) oder 34 bis 246 Tage (n=11) nach der Therapie entfernt worden waren, einen Anstieg der CD 34- und CD 105- positiven Zellen in CNV im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion auf den

traumatisierenden Effekt der PDT. Sie stellten weiterhin fest, dass diese Steigerung in den später exzidierten Membranen mit einer histologisch sichtbaren Reperfusion einherging und deutlicher war, als in denen, die nach drei Tagen entfernt worden waren.

In der vorliegenden Arbeit war zwar die erhöhte Expression von Endoglin nicht statistisch signifikant, zeigte aber dennoch eine ähnliche Tendenz wie die Ergebnisse von Tatar et al.. Die verstärkte Anfärbbarkeit für CD105 deutet auf eine erhöhte proliferative Aktivität der Gefäße hin [94], die übereinstimmt mit der Beobachtung eines Anstiegs des VEGF in den behandelten Membranen.

Die Untersuchung der Auswirkung des Intervalls zwischen PDT und operativer Entfernung der Membran auf die Markerkonzentration zeigte ein Ergebnis, das zwar knapp die Signifikanzgrenze verfehlte ($p=0,062$), von dem aber anzunehmen ist, dass es mit einer größeren Fallzahl statistisch zu verifizieren wäre. Je mehr Zeit zwischen der PDT und der Operation lag, desto weniger endoglin-exprimierende Zellen konnten nachgewiesen werden. Diese Beobachtung weicht etwas von der Tatars ab; die Intervalle zwischen Therapie und operativer Entfernung differieren jedoch: in der vorliegenden Arbeit betrug das kürzeste Intervall 4 Wochen und das längste 29 Monate im Gegensatz zu 3 Tagen und maximal 9 Monaten bei Tatar et al.. Da die später exzidierten (>34 Tage) Membranen in der Studie von Tatar et al. zu einem Zeitpunkt zusammengefasst wurden, lässt sich nicht sagen, ob sich die Ergebnisse der beiden Arbeiten bei einzelner Betrachtung der Membranen möglicherweise ähnlich verhalten würden.

Die zeitliche Abhängigkeit der Endoglinexpression verläuft ähnlich wie die der VEGF-Expression in den Membranen und ist möglicherweise folgendermaßen zu erklären: mit zunehmender Reperfusion oder aber Vernarbung der Membran nimmt die Hypoxie, somit das VEGF und auch der Proliferationsmarker Endoglin ab.

5.1.2. VEGF

In den mit der PDT behandelten CNV-Membranen war eine signifikant stärkere Expression des VEGF gegenüber der unbehandelten Gruppe zu beobachten. Dieser Effekt ist mit der Wirkung der PDT zu erklären, die zu einer Zerstörung der Endothelien und einer Okklusion der Gefäße führt, woraus wiederum eine Hypoxie resultiert. Für die Bildung von VEGF ist die Hypoxie ein zentraler Stimulus [90,155].

Die vorliegenden Resultate bestätigen die Ergebnisse von Schmidt-Erfurth et al. [129], die einen Anstieg des VEGF in der Choriokapillaris PDT-behandelter intakter Netzhaut

von humanen Augen (n=4) mit nicht behandelbarem Melanom im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (n=4) verzeichneten. Über ähnliche Beobachtungen berichteten Tatar et al., die ebenfalls eine erhöhte Anfärbarkeit für VEGF in exzidierten CNV-Membranen (n=15) nach einer PDT berichteten, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Therapie entfernt worden waren (3 – 246 Tage) [148].

In neueren Studien untersuchten Tatar et al. [149] eine größere Anzahl (n=29) behandelte CNV-Membranen nach der chirurgischen Exzision. Dabei wurde unterschieden zwischen solchen Membranen, die drei Tage nach der PDT und solchen, die zu einem späteren Zeitpunkt (ca. 23 Monate) entfernt worden waren. Sie stellten fest, dass 3 Tage nach der PDT die Anfärbarkeit für VEGF am höchsten war. In den Membranen, die später entfernt worden waren, war die VEGF-Färbung zwar signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe, aber deutlich niedriger als in den nach 3 Tagen exzidierten Membranen. Dafür zeigte sich jedoch in den später entfernten Membranen eine deutlich höhere Konzentration von Endostatin, einem weiteren potenten Angiogeneseinhibitor. Tatar et al. nahmen an, dass diese Veränderungen mit dem erneuten Vorhandensein gesunder Endothelien in Zusammenhang stehen könne.

In der vorliegenden Arbeit werden die Beobachtungen von Tatar et al. [149] bestätigt. So zeigte sich ein Zusammenhang der Abnahme der VEGF-Expression in den CNV, und der Zeit zwischen der letzten PDT und der operativen Entfernung. Die Intervalle zwischen Behandlung und OP erstreckten sich bis zu 29 Monate.

Möglicherweise sind die Ergebnisse dahingehend interpretierbar, dass mit zunehmender Reperfusion [63] oder auch Vernarbung der Membran, die das normale Endstadium der Erkrankung darstellt und schlussendlich bei allen Erkrankungen mit einer CNV eintritt, die Bildung des VEGF zurückgeht.

5.1.3. VEGF-Rezeptor Flt-1

Über den Einfluss der PDT auf den VEGF-Rezeptor Flt-1 gibt es zur Zeit wenige Erkenntnisse. Bei der Entwicklung einer CNV wird der Einfluss des Flt-1 als maßgeblich beschrieben [134].

In der einzigen Studie zum Einfluss der PDT auf einen VEGF-Rezeptor in okulärem Gewebe zeigten Schmidt-Erfurth et al. [129], dass in den Bereichen der Choroidea in menschlichen Augen (n=4), die mit der PDT behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=4) eine verstärkte Anfärbarkeit für eine andere Isoform des Rezeptors,

VEGFR-3, nachweisbar war. Für den VEGFR-3 galt bislang eine Beteiligung an der Lymphangiogenese als erwiesen [80,118]. Neuere Studien lassen jedoch vermuten, dass auch dieser Rezeptor an der Angiogenese beteiligt sein könnte [21,34].

Thieme et al. beschrieben in einer tierexperimentellen Studie eine Steigerung der VEGF-Rezeptorzahl auf bovinen Endothelzellen der Netzhaut um 50% unter hypoxischen Bedingungen [150].

In der vorliegenden Untersuchung konnte kein übereinstimmendes Ergebnis für den VEGFR-1 beobachtet werden. Die Anfärbbarkeit für Flt-1 in den behandelten Membranen zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

Die Funktion des Flt-1 wird derzeit noch kontrovers diskutiert [80,93]. Die mangelnde Korrelation der Werte des Flt-1 mit den Werten für den VEGF in der vorliegenden Arbeit ist möglicherweise als Hinweis dafür zu interpretieren, dass Flt-1 nicht als Hauptakteur an der Signaltransduktion des VEGF beteiligt sein könnte [80,93].

5.1.4. PEDF

Für das der Angiogenese entgegenwirkende Zytokin PEDF [38] ließ sich ein signifikanter Anstieg in der behandelten Gruppe gegenüber der Vergleichsgruppe feststellen. Übereinstimmende Resultate sind aus der Studie von Schmidt-Erfurth et al. [129] bekannt, die nach der photodynamischen Behandlung intakter Netzhaut in menschlichen Augen (n=4) eine verstärkte Anfärbbarkeit für PEDF in Endothelien der Choroidea feststellten, welche als mögliche neuroprotektive Reaktion auf eine ischämische Verletzung angesehen wurde [106].

Ohno-Matsui et al. [108] beschrieben in einer experimentellen Studie, dass in vitro unter Zugabe eines VEGF-neutralisierenden Antikörpers bzw. eines VEGFR-1-Antikörpers die PEDF-Produktion in RPE-Zellen signifikant abnahm. Sie schlossen daraus, dass die PEDF-Bildung durch VEGF via den VEGFR-1 reguliert wird. Auch wenn es sich bei dieser Studie um ein in vitro-Experiment an kultivierten RPE-Zellen handelt, bietet der beschriebene Effekt möglicherweise eine Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit beobachtete signifikante Erhöhung der PEDF- bei ebenfalls stark erhöhter VEGF-Expression.

Eine entgegengesetzte Feststellung machten Tatar et al. [148], nachdem sie eine signifikante Verminderung des PEDF in den Endothelien nach photodynamischer Behandlung von CNV-Membranen beobachten konnten. Sie brachten dies mit der Downregula-

tion von PEDF bei Hypoxie [163] in Zusammenhang. Besonders ausgeprägt war diese Verminderung bei den Membranen, die 3 Tage nach der PDT entfernt worden waren (n=4); bei den bis zu 246 Tage später entfernten Membranen (n=11) war der PEDF zwar im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls signifikant vermindert, allerdings nicht in dem Maße wie bei den früher entfernten Membranen. Möglicherweise wäre die Verminderung der PEDF-Expression bei einer größeren Anzahl von Gewebeproben und einem längeren Intervall zwischen PDT und operativer Entfernung nicht mehr so stark ausgeprägt.

Apte et al. [10] entwickelten anhand eines Versuchs an laserinduzierten CNV bei Mäusen die Theorie, dass der PEDF eine konzentrationsabhängige Wirkung hat. Sie zeigten, dass bei systemischer PEDF-Gabe in niedriger Dosierung ein Rückgang der CNV, bei hoher Dosierung jedoch eine Zunahme des CNV-Areals sowie eine Stimulation der Endothelzellmigration und der VEGF-Produktion zu verzeichnen waren. Ob die Effekte einer systemischen Gabe von PEDF mit denen einer endogenen lokalisierten Steigerung der Expression vergleichbar sind, ist jedoch fraglich.

In einer weiteren Studie zeigten Zhang et al. [166] an bovinen retinalen Kapillarendothelzellen sowie retinalen Müllerzellen aus der Ratte *in vitro*, dass eine konzentrationsabhängige reziproke Regulation zwischen PEDF und VEGF in der Retina existiert. Sie stellten fest, dass PEDF in hohen Konzentrationen die VEGF-Expression via Inhibition der MAP-Kinase vermittelten Aktivierung des hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) vermindert. Ebenso beobachteten sie eine signifikante VEGF-Rezeptor-vermittelte Verminderung der PEDF-Expression durch hohe Konzentrationen von VEGF.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Quotient der Faktoren VEGF zu PEDF im zeitlichen Verlauf untersucht. Der PEDF scheint vorwiegend in den Membranen, die ca. 3-12 Monate nach der PDT entfernt worden sind, erhöht zu sein. In den ersten 2 Monaten nach der Behandlung ist die Konzentration des VEGF gegenüber dem PEDF um ein Vielfaches erhöht; zu einem späteren Zeitpunkt nähert sich das Verhältnis auf 2:1 an, was sowohl auf das Absinken des VEGF als auch auf den Anstieg des PEDF zurückzuführen sein könnte. Diese Beobachtungen bestätigen die Feststellungen von Tatar et al. hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der PEDF-Expression nach der PDT.

Anhand der Erkenntnisse der obengenannten Studien lässt sich vermuten, dass die zeitlichen Verläufe der VEGF- sowie der PEDF- Konzentration in den CNV-Membranen durch eine gegenseitige Wechselwirkung in Relation stehen. Die auf die unmittelbar nach der PDT entstehende Hypoxie zurückzuführende sehr hohe VEGF-Konzentration

in den früh entfernten Membranen trägt möglicherweise dazu bei, die PEDF-Konzentration niedrig zu halten. In den später entfernten Membranen steigt die PEDF-Konzentration im Verhältnis zur VEGF-Konzentration an. Ob die Steigerung der PEDF-Expression in der Verminderung des VEGF im natürlichen Verlauf oder die Minderung der VEGF-Expression in der Steigerung der PEDF-Expression im natürlichen Verlauf begründet ist, bleibt unklar.

5.2. Aderhautmelanome nach der Behandlung mit der PDT

Im diesem Teil der Arbeit wurden 4 mit der PDT behandelte Aderhautmelanome immunhistochemisch untersucht. Als Kontrolle wurden 5 Aderhautmelanome von nicht mit der PDT behandelten Patienten verwendet.

In allen 4 Aderhautmelanomen zeigte sich eine deutliche, durch die PDT mit Verteporfin induzierte weitgehende Nekrose des Tumorgewebes. Die Zerstörung des malignen Gewebes an dieser Stelle war inkomplett, da weiterhin einzelne Restinseln mit vitalen Tumorzellen nachweisbar waren.

Dieser mit veränderten Parametern der PDT (höhere Lichtdosis, längere Belichtungsdauer) erzielte Effekt wurde bereits in verschiedenen tierexperimentellen Studien [59,83,126] sowie in Untersuchungen an humanen wenig pigmentierten oder amelanotischen Melanomen der Aderhaut [156] beschrieben, wobei jedoch nicht klar ist, ob dies durch einen direkten zytotoxischen Mechanismus der PDT oder indirekt durch die Zerstörung der Endothelien des Tumorgefäßsystems entsteht [89,104].

In dieser Arbeit wurde erstmals die Auswirkung der photodynamischen Therapie auf Faktoren, die die Angiogenese in uvealen Melanomen beeinflussen, analysiert. Die Untersuchung bezog sich auf drei Bereiche des Tumors: die Nekrosezone, das unbehandelte Tumorgewebe sowie die Übergangszone zwischen Nekrose und vitalem Tumorgewebe.

5.2.1. Marker für CD 31, CD 34, CD 105

Im Nekroseareal der Tumore zeigte sich eine leichte Verminderung der positiv gefärbten Zellen der Endothelmarker (CD 31, CD 34, CD 105). Aufgrund der inkompletten Destruktion der vitalen Zellstrukturen war die erniedrigte Endothelmarkernachweisbarkeit im Nekrosebereich im Vergleich zum Gewebe der unbehandelten Kontrollgruppe nicht so stark ausgeprägt.

Die damit nachgewiesene Reduktion der Vaskularisierung des Tumors an dieser Stelle lässt sich mit dem Wirkmechanismus der Photodynamischen Therapie erklären: der durch Licht aktivierte Farbstoff führt zu einer gezielten Destruktion und Okklusion der vaskulären Endothelien [124] und somit vermutlich zu einer überwiegenden Nekrose des umliegenden Gewebes. Ein solcher Effekt auf Gefäße in Tumorgewebe [89,126] und in humanen Aderhautmelanomen [156] konnte bereits in vorhergehenden Studien beobachtet werden.

In der Übergangszone zwischen nekrotischem und vitalem Tumorgewebe ließ sich im Vergleich zum Gewebe der beiden anderen Zonen eine Erhöhung der positiv gefärbten Zellen aller Endothelmarker feststellen. Die verstärkte Anfärbbarkeit für Endoglin deutet auf eine erhöhte proliferative Aktivität der Gefäße hin [94]. Tatar et al. [148] fanden heraus, dass in choroidalen Neovaskularisationen nach der Behandlung mit der photodynamischen Therapie ein erhöhter Nachweis von Endoglin zu verzeichnen ist, den sie in einem reaktiven Wundheilungsprozess begründet sahen. Die verstärkte Expression des CD 105 nahe der Nekrosezone im Tumor kann hier ebenfalls als Teil einer in anderen Arbeiten bereits beschriebenen inflammatorischen Reaktion mit Gefäßwachstum [156] nach PDT bei Aderhautmelanomen interpretiert werden. Eine weitere Ursache für die vermehrte angioproliferative Aktivität in der Übergangszone findet sich in der vermehrten Expression des proangiogenen VEGF (s.u.), die durch die in der Nekrosezone posttherapeutisch entstehende Hypoxie verursacht sein könnte.

5.2.2. VEGF

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ließ sich im nekrotischen Tumorareal durch die überwiegende Destruktion der Zellen deutlich reduziert nachweisen. Die dennoch vorhandene geringe Produktion des VEGF-Proteins geht mit großer Wahrscheinlichkeit auf die einzelnen überlebenden Tumorzellen in den vitalen Restinseln im Nekroseareal zurück.

Die Expression des Proteins in der Übergangszone war deutlich erhöht. Ein stimulierender Effekt der PDT auf die Bildung von VEGF ist bereits aus der Tumorthherapie bekannt [52,153]. Ferrario et al. [52] haben mittels Westernblot-Analyse erhöhte VEGF-Werte in vivo in Tumorgewebe von Mammakarzinomen der Maus nach der Behandlung mit der PDT festgestellt. Sie benutzten Mammakarzinome in Mäusen, bei denen selektiv die Blutzufuhr des Tumors unterbunden wurde, als Positivkontrolle zur Erzeugung

einer Gewebshypoxie. So erklärten sie die Erhöhung des VEGF mit einem dualen Mechanismus, bestehend aus einer primären zellulären Reaktion und einem stärker bewerteten sekundären hypoxie-getriggerten Effekt vermittelt durch den hypoxia-inducible factor.

In einer anderen Arbeit [129] wurde bei der Untersuchung der Netzhaut menschlicher Augen nach der Durchführung einer PDT ebenfalls ein Anstieg des VEGF in der Choriokapillaris PDT-behandelter humaner Augen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe beobachtet.

Die Beobachtungen hinsichtlich des VEGF in der vorliegenden Arbeit stimmen mit den Ergebnissen der zitierten Studien überein. Die Wirkung der PDT führt im Aderhautmelanom ebenso wie bei CNV-Membranen zu einer Zerstörung der Endothelien und einer Okklusion der Tumorgefäße, woraus wiederum eine Hypoxie resultiert. Für die Bildung von VEGF ist die Hypoxie ein wichtiger Stimulus [90,155]. In der Übergangszone, also der unmittelbar an die Nekrose grenzenden Schicht, befindet sich aufgrund der noch funktionsfähigen Zellen der stärkste Anstieg des VEGF.

Mit den Auswirkungen dieser Hypoxie, die vermutlich bis in das unbehandelte Tumorgewebe hineinreichen, ist möglicherweise auch die leicht erhöhte VEGF-Expression in diesem Bereich zu erklären. Auch in den Melanomen der Vergleichsgruppe konnte erwartungsgemäß VEGF nachgewiesen werden [133], jedoch in einem geringeren Maße als in den behandelten Tumoren.

5.2.3. VEGF-Rezeptor Flt-1

Für Karzinome anderer Gewebe wurde in verschiedenen Studien über eine gesteigerte Expression des Flt-1 (bzw. VEGFR-1) berichtet [105,154].

Jedoch existieren über das Auftreten des VEGF-Rezeptors in Aderhautmelanomen nur wenige Erkenntnisse. In zwei Studien gelang bisher der Nachweis [143,160] im Gewebe uvealer Melanome.

In einer anderen Arbeit konnte eine andere Isoform des Rezeptors (VEGFR-3), für den ebenfalls eine Beteiligung an der Angiogenese als erwiesen gilt, in der Choroidea menschlicher Augen nach der PDT nachgewiesen werden [21,34,129].

Im Rahmen einer tierexperimentellen Studie fand sich als Auswirkung einer Hypoxie im untersuchten Gewebe eine Steigerung von VEGF-Rezeptoren auf bovinen retinalen Endothelzellen [150].

In der vorliegenden Arbeit konnten keine korrespondierenden Ergebnisse für den Flt-1 festgestellt werden. So war der VEGF-Rezeptor in der Nekrose, im unbehandelten Tumorareal sowie in den Präparaten der Vergleichsgruppe in gleicher Intensität nachweisbar. Eine leichte Erhöhung fand sich nur in der Übergangszone zwischen Nekrose und unbehandeltem Tumorgewebe.

Die Funktion des Flt-1 ist derzeit noch unklar. Es wird vermutet, dass Flt-1 als negativer Regulator der Angiogenese agieren und die Aktivierung des VEGFR-2 durch VEGF eindämmen könnte [80]. Sollte diese Theorie zutreffen, so wäre in der vorliegenden Arbeit, die im PDT-behandelten Tumorgewebe eine Verschiebung des Angiogenese-gleichgewichts zugunsten der Angiogeneseinduktion zeigt, nicht mit einem Anstieg des Flt-1 zu rechnen.

5.2.4. PEDF

Der pigment epithelium-derived factor (PEDF), der Gegenspieler des VEGF bei der Angiogenese [38], war in den mit der PDT behandelten Aderhautmelanomen nur in geringem Maß nachweisbar. In der Nekrosezone traten aufgrund der überwiegenden Zerstörung der vitalen Zellstrukturen keine PEDF-positiven Zellen auf, im unbehandelten Tumorgewebe fand sich eine sehr geringe Anzahl und in der Übergangszone ließ sich die verhältnismäßig größte Anzahl PEDF exprimierender Zellen nachweisen.

In der Vergleichsgruppe fanden sich deutlich mehr PEDF-positive Zellen als in allen drei Zonen der behandelten Tumore.

Über die Expression von PEDF in humanen Aderhautmelanomen ist in der Literatur bisher nichts bekannt.

Ein relativer Mangel an PEDF begünstigt das Tumorwachstum und die Angiogenese, wie in einer Studie über die Expression dieses Faktors in Mammakarzinomen festgestellt wurde [30].

In der vorliegenden Arbeit findet sich ein den Beobachtungen des PEDF in den behandelten CNV-Membranen entgegengesetztes Ergebnis. Im Mittel zeigt sich eine Verminderung des PEDF in den mit der PDT behandelten Melanomen im Vergleich zu den unbehandelten Tumoren.

Möglicherweise ist dies auf die nachgewiesenen [166] reziproken Regulationsmechanismen zwischen VEGF und PEDF zurückzuführen. Es wurde an bovinen retinalen Endothelzellen sowie retinalen Müllerzellen aus der Ratte *in vitro* gezeigt, dass sowohl

PEDF als auch VEGF in hohen Konzentrationen mittels bestimmter Mechanismen die Expression des jeweiligen Gegenspielers signifikant vermindern können. Diese Erkenntnisse wurden zwar an retinalen Zellen gewonnen, sind aber möglicherweise auf Tumorgewebe übertragbar.

In den CNV-Membranen nimmt die VEGF-Konzentration nach einer deutlichen Erhöhung der Expression in den 2 Monate nach PDT entfernten Geweben im zeitlichen Verlauf ab; die PEDF-Konzentration steigt im Verhältnis dazu an. Die Annäherung des Quotienten der Konzentrationen von VEGF und PEDF in den Membranen findet vor allem in dem Gewebe statt, dass ca. 3-12 Monate nach der Behandlung mit der photodynamischen Therapie entfernt worden war. Dieser Verlauf des PEDF stimmt mit den Beobachtungen von Tatar et al. [148] überein, die insgesamt gegenüber einer Vergleichsgruppe eine Verminderung des PEDF nach PDT in CNV-Membranen beobachteten, welche unmittelbar nach der PDT stark und im zeitlichen Verlauf immer weniger ausgeprägt war.

Die deutliche Verminderung des PEDF in den mit der PDT behandelten Aderhautmelanomen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass diese in einem Zeitraum zwischen 2 und 5 Tagen nach der PDT entfernt wurden; im Gegensatz zu den CNV-Membranen, die frühestens 1, spätestens 29 (im Mittel 10) Monate nach der PDT entfernt worden waren. Zu diesem frühen Zeitpunkt nach dem Einwirken der PDT zeigt sich deutlich die Auswirkung der Hypoxie: die Expression des VEGF ist stark erhöht und führt so vermutlich über die durch Zhang et al. beobachteten Regulationsmechanismen zu einer deutlichen Verminderung der PEDF-Expression.

Einen weiteren Erklärungsansatz bietet die Tatsache, dass die Fläche der Tumoren im Auge deutlich größer war als die Fläche der untersuchten CNV und bei der Durchführung der PDT andere Behandlungsparameter mit einer längeren Beleuchtungsdauer zum Einsatz kamen. Aufgrund dieser Tatsachen könnte die der PDT folgende VEGF-Erhöpfung in den Tumoraugen stärkere Auswirkungen gehabt und zu einer stärkeren PEDF-Suppression als in den Augen mit CNV geführt haben.

5.3. Schlussfolgerung

In den letzten Jahren hat die PDT eine bedeutende Rolle in der Behandlung der neovaskulären Form der AMD eingenommen. Das Potential und die Wirkung dieser Thera-

pie sind allerdings eingeschränkt durch hohe Rezidivraten und eine reduzierte funktionelle Prognose [2].

Es wird angenommen, dass die PDT ein Trauma verursacht, das unmittelbar nach der Behandlung in einer erhöhten VEGF Expression und Angiogenese in Verbindung mit einem entzündlichen Wundheilungsprozess resultiert. Mit zunehmender Reperfusion oder auch Vernarbung der CNV-Membranen scheint die Expression des Angiogeneseinduktors VEGF und damit auch die proliferative Aktivität der Endothelien abzunehmen.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte diese Vermutung sowohl in den CNV-Membranen als auch den Aderhautmelanomen bestätigt werden.

Die Aussagekraft dieser Arbeit ist durch die geringe Fallzahl sowie aufgrund des nicht-randomisierten, retrospektiven Charakters der Fälle begrenzt. Es handelt sich bei den chirurgisch entfernten CNV-Membranen um ein sehr spätes Stadium in der Entwicklung einer CNV und somit um eine negative Selektion. Bei den Melanomen sind besonders große, nicht anderweitig therapierbare Tumore untersucht worden, bei denen es sich ebenfalls um eine bestimmte Selektion handelt. Es ist unklar in welchem Umfang die Ergebnisse auf frühere Stadien der Krankheitsbilder übertragen werden können. In beiden Versuchsteilen konnte keine in allen Merkmalen exakt übereinstimmende Vergleichsgruppe untersucht werden. Desweiteren handelt es sich bei der Immunhistochemie um ein indirektes Verfahren im Gegensatz zum direkten Nachweis der untersuchten Proteine mittels z.B. Polymerase Chain Reaktion (PCR).

Es handelt sich um seltenes Untersuchungsmaterial und trotz der geringen Fallzahlen waren die jeweiligen Gruppen in ihren Charakteristika soweit übereinstimmend, dass sie statistisch verglichen werden konnten. So zeigte die Untersuchung der CNV-Membranen eindeutige Ergebnisse, die mit denen aus anderen Studien [62,129,148] übereinstimmen. Auch die Beobachtungen, die bei den Melanomen gemacht wurden, hatten einen deskriptiven Charakter und zeigten einheitliche Ergebnisse.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten daraufhin, dass es sich bei den beschriebenen Angiogenese induzierenden Auswirkungen der photodynamischen Therapie um ein Phänomen handelt, dass von der Art des Gewebes sowie der zugrundeliegenden Pathologie unabhängig reproduzierbar ist.

Weiterhin scheint die Folgewirkung der PDT sowohl als Langzeiteffekt nach mehrmaliger Behandlung der CNV-Membranen mit den standardmäßig verwendeten Parametern, als auch als Kurzzeiteffekt einer Behandlung mit hinsichtlich der Lichtdosis, Infusi-

ongeschwindigkeit und Intervall zwischen Ende der Infusion und Beginn der Beleuchtung variierten Parametern, einzutreten.

Die Erkenntnisse dieser Studie erklären möglicherweise die hohen Rezidivraten sowie die Beobachtung einer erniedrigten Wiederbehandlungsrate und einer Verbesserung des Visus bei einer Kombination der PDT mit einer anti-VEGF Behandlung [46,47,67].

Um die Vorgänge in dem komplizierten System von Angiogeneseinduktion und -inhibition in Gewebe nach der Applikation einer photodynamischen Therapie ausreichend zu verstehen, ist die Durchführung weiterer Untersuchungen unerlässlich.

Hinsichtlich der Therapie der untersuchten Krankheitsbilder lassen sich aus den oben genannten Beobachtungen folgende Konsequenzen ableiten:

In der Behandlung der CNV-Membranen scheint eine Kombinationstherapie aus dem Gefäßokklusiven Verfahren der PDT und einem Anti-VEGF Medikament zur Unterdrückung der nachgewiesenen reaktiven Erhöhung der VEGF-Expression nach der PDT sinnvoll.

In der Therapie menschlicher Aderhautmelanome ist die PDT aufgrund der inkompletten Destruktion des malignen Gewebes nur bedingt in Betracht zu ziehen. Das Ausmaß der durch die PDT verursachten Nekrose ist derzeit noch schlecht steuer- und vorher-sagbar. Ebenso kommt es nach der PDT im Nekroseareal zu einer deutlichen Aktivierung der Angiogenese durch vermehrte Expression von VEGF, was im Verlauf zu einer schnellen Rezidivbildung des Tumors führen könnte.

Somit kann derzeit mittels PDT keine sichere Tumorbehandlung mit möglichst geringer Rezidivrate gewährleistet werden.

6. Zusammenfassung

Es gibt Hinweise, dass die erfolgreich zur Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration eingesetzte Photodynamische Therapie (PDT) durch Induktion von Angiogenesefaktoren wie dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und seinem Rezeptor (flt-1) an der Pathogenese von Rezidiven bei der Behandlung von CNV beteiligt ist.

Unklar ist der Stellenwert der PDT in der Tumorbehandlung. Hier ist die Frage nach der Möglichkeit der Induktion einer Nekrose sowie die Auswirkungen der Therapie auf die Tumorangiogenese von Interesse.

In der vorliegenden Arbeit wurden Angiogenesefaktoren in 2 Modellen; choroidalen Neovaskularisationsmembranen sowie Aderhautmelanomen mit und ohne vorhergehende PDT mittels immunhistochemischer Färbung untersucht. Die Gewebe wurden gefärbt für CD 105 (Endoglin), CD 34, CD 31 (beides Gefäßmarker), VEGF-A (alle Isoformen), PEDF (pigment epithelium-derived factor), flt-1 (VEGF-Rezeptor).

Im 1. Versuchsteil wurden 11 rezidierte mit der PDT behandelte, 1-29 Monaten nach der Behandlung chirurgisch aus humanen Augen extrahierte CNV, sowie als Kontrollgruppe 9 nicht mit der PDT behandelte vergleichbare CNV verwendet. Die mit der PDT behandelte Gruppe bestand aus 8 klassischen und 3 okkulten Membranen; die Vergleichsgruppe ohne Behandlung setzte sich aus 6 klassischen und 3 okkulten Membranen zusammen.

Im 2. Versuchsteil wurden 4 Augen, die wegen eines Melanoms zu einer Enukleation vorgesehen waren, 2-5 Tage vor der OP mit einer PDT auf dem Tumor behandelt. Als Vergleich dienten 5 Augen mit Melanomen, die ohne vorhergehende PDT enukleiert worden waren. Die Melanome wurden zur Auswertung in drei Zonen eingeteilt: Nekrose-, Übergangs- und unbehandelte Zone.

Histologisch bestanden die CNV-Membranen aus fibrovaskulärem Gewebe mit Blutungen sowie vaskulärem Endothel und Pigmentepithel. Der Nachweis des VEGF sowie des PEDF ergab eine signifikante Erhöhung in den mit der PDT behandelten CNV gegenüber der unbehandelten Gruppe. Für den VEGF-Rezeptor flt-1 konnte kein Unterschied nachgewiesen werden.

Bei allen vier amelanotischen Melanomen konnte mit der Lichtdosis von 150 J/cm² eine Tumornekrose mit weitgehender Zerstörung der Gefäße induziert werden. Das nekrotische Gewebe ließ sich deutlich von vitalem Tumorgewebe abgrenzen und um diesen

Bereich herum zeigte sich eine inflammatorische Reaktion mit Makrophagen und Granulozyten.

Der VEGF sowie der PEDF waren im Bereich der durch die PDT induzierten Nekrose nicht nachweisbar, in der Übergangszone war der VEGF deutlich, der PEDF leicht erhöht. Im unbehandelten Bereich zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe beim VEGF eine dezente Erhöhung der Anzahl positiver Zellen, beim PEDF hingegen eine Erniedrigung. Der Flt-1 ließ sich in allen Tumorzonen sowie in der Kontrollgruppe in gleicher Intensität nachweisen.

Die Arbeit zeigt, daß nach der Behandlung mit der PDT unabhängig vom zugrundeliegenden Krankheitsbild eine erhöhte Expression von VEGF sowohl in den CNV-Membranen als auch im Behandlungsareal der Tumore induziert wird.

Eine konzentrationsabhängige reziproke Regulation des VEGF und des PEDF gilt als erwiesen und die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Studie hinsichtlich des PEDF sind möglicherweise auf die Auswirkungen dieses komplexen Systems sowie die unterschiedlichen Zeitpunkte der chirurgischen Entfernung zurückzuführen.

Die Ergebnisse der zwei Modelle deuten daraufhin, dass es sich bei dem beobachteten Effekt der Photodynamischen Therapie um ein Phänomen handelt, dass von der Art des Gewebes sowie der zugrundeliegenden Pathologie unabhängig reproduzierbar ist .

Die Ergebnisse dieser Arbeit erklären möglicherweise die Beobachtung einer erniedrigten Wiederbehandlungsrate und einer Verbesserung des Visus bei der Behandlung von CNV bei einer Kombination der PDT mit einer anti-VEGF Behandlung.

Aufgrund der ungenauen Vorhersagbarkeit und Kalkulierbarkeit des Ausmasses einer Nekrose sowie der deutlichen Angiogeneseaktivierung innerhalb des malignen Gewebes ist die PDT zur effektiven Behandlung humaner Aderhautmelanome nur bedingt in Betracht zu ziehen.

7. Literaturverzeichnis

1. (1991) Laser photocoagulation of subfoveal neovascular lesions in age-related macular degeneration. Results of a randomized clinical trial. Macular Photocoagulation Study Group. Arch Ophthalmol: 109(9):1242-57.
2. (1999) Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: one-year results of 2 randomized clinical trials--TAP report. Treatment of age-related macular degeneration with photodynamic therapy (TAP) Study Group. Arch Ophthalmol 117(10):1329-45.
3. Aiello LP (1996) Vascular endothelial growth factor and the eye. Past, present and future. Arch Ophthalmol 114(10):1252-4.
4. Aiello LP (1997) Vascular endothelial growth factor. 20th-century mechanisms, 21st-century therapies. Invest Ophthalmol Vis Sci 38(9):1647-52.
5. Aiello LP (2000) Keeping in touch with angiogenesis. Nat Med 6(4):379-81.
6. Aiello LP, Wong JS (2000) Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. Kidney Int Suppl 77:S113-9.
7. Allison BA, Pritchard PH, Levy JG (1994) Evidence for low-density lipoprotein receptor-mediated uptake of benzoporphyrin derivate. Br J Cancer 69(5):833-9.
8. Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, Ianchulev S, Adamis AP (2003) Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. Surv Ophthalmol 48(3):257-93.
9. Anderson DH, Guerin CJ, Erickson PA, Stern WH, Fisher SK (1986) Morphological recovery in the reattached retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 27(2):168-83.
10. Apte RS, Barreiro RA, Duh E, Volpert O, Ferguson TA (2004) Stimulation of neovascularization by the anti-angiogenic factor PEDF. Invest Ophthalmol Vis Sci 45(12):4491-7.
11. Augustin HG (2003) [Angiogeneseforschung--quo vadis?]. Ophthalmologie 100(2):104-10.
12. Augustin HG, Breier G (2003) Angiogenesis: molecular mechanisms and functional interactions—2nd Kloster seeon Meeting of the German Priority Research Grant “Angiogenesis”. Thromb Haemost 89(1):190-7.

13. Barbazetto I, Schmidt-Erfurth U (2000) Photodynamic therapy of choroidal haemangioma: two case reports. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238(3):214-21.
14. Battegay EJ (1995) Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med* 73(7):333-46.
15. Becerra SP, Sagasti A, Spinella P, Notario V (1995) Pigment epithelium-derived factor behaves like a noninhibitory serpin. Neurotrophic activity does not require the serpin reactive loop. *J Biol Chem* 270(43):25992-9.
16. Bechrakis NE, Bornfeld N, Zoller I, Foerster MH (2002) Iodine 125 plaque brachytherapy versus transscleral tumor resection in the treatment of large uveal melanomas. *Ophthalmology* 109(10):1855-61.
17. Bechrakis NE, Scheibenbogen C, Schmittel A, Servetupoulou F, Foerster MH, Keilholz U (2002) Aderhautmelanom. Adjuvante Therapie bei Hochrisikopatienten und neue Therapieansätze im metastasierten Stadium. *Ophthalmologie* 99(5):333-7.
18. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, et al. (1995) An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The international ARM Epidemiological Study Group. *Surv. Ophthalmol.* 39(5):367-74.
19. Blinder KJ, Bradley S, Bressler NM, et al. (2003) Effect of lesion size, visual acuity, and lesion composition on visual acuity change with and without verteporfin therapy for choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: TAP and VIP report No. 1. *Am J Ophthalmol* 136(3):407-18.
20. Boyd SR, Tan DS, Bunce S et al. (2002) Vascular endothelial growth factor is elevated in ocular fluids of eyes harbouring uveal melanoma: identification of a potential therapeutic window. *Br J Ophthalmol* 86(4):448-52.
21. Breier G (2000) Functions of the VEGF/VEGF receptor system in the vascular system. *Semin Thromb Hemost* 26(5):553-9.
22. Bressler NM (2001) Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: two-year results of 2 randomized clinical trials-tap report 2. *Arch Ophthalmol*: 119(2):198-207.

23. Bressler NM, Bressler SB, Childs AL, et al. (2004) Surgery for hemorrhagic choroidal neovascular lesions of age-related macular degeneration: ophthalmic findings: SST report no.13. *Ophthalmology* 111(11):1993-2006.
24. Brown LF, Berse B, Jackman RW, et al. (1993) Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 143:1255-1262.
25. Brown LF, Berse B, Jackman RW, et al. (1993) Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 53:4727-4735.
26. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, et al. (1995) Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: Implications for diagnosis and therapy. *Clin Canc Res* 1(12):1623-34.
27. Bula DV, Iliaki E, Gragoudas E, Miller JW, Arroyo J (2004) Pigment epithelium-derived factor, angiopoietin-1, and VEGF expression in human choroidal neovascular membranes treated with photodynamic therapy [ARVO abstract]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: E-abstract 1787 Accessed February 15, 2005.
28. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH (2005) Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 9(4):777-94.
29. Cai J, Jiang WG, Grant MB, Boulton M (2006) Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1. *J Biol Chem* 281(6):3604-13.
30. Cai J, Parr C, Watkins G, Jiang WG, Boulton M (2006) Decreased pigment epithelium-derived factor expression in human breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 12(11 Pt1):3510-7.
31. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al. (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380(6573):435-9.
32. Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407(6801):249-57.

33. Cheifetz S, Bellon T, Cales C, et al. (1992) Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267(27):19027-30.
34. Clauss M (2000) Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost* 26(5):561-9.
35. Collaborative Ocular Melanoma Study Group (2006) The COMS randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma: V. Twelve-year mortality rates and prognostic factors: COMS report No. 28. *Arch Ophthalmol* 124(12):1684-93.
36. Damato B, Groenewald C, McGalliard J, Wong D (1998) Endoresection of choroidal melanoma. *Br J Ophthalmol* 82(3):213-8.
37. Danis RP, Ciulla TA, Pratt LM, Anliker W (2000) Intravitreal triamcinolone acetate in exsudative age-related macular degeneration. *Retina* 20(3):244-50.
38. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. (1999) Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 285(5425):245-8.
39. Desjardins L, Levy-Gabriel C, Lumbroso-Lerouic L, et al. (2006) Facteurs pronostiques du mélanome malin de l'uvée. Étude rétrospective sur 241 patients et apport récent de la recherche de la monosomie 3. *J Fr Ophthalmol* 29(7):741-9.
40. Doll JA, Stellmach VM, Bouck NP, et al. (2003) Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. *Nat Med* 9(6):774-80.
41. Donaldson MJ, Lim L, Harper CA, Mackenzie J, G Campbell W (2005) Primary treatment of choroidal amelanotic melanoma with photodynamic therapy. *Clin Experiment Ophthalmol* 33(5):548-9.
42. Dreves J, Laus C, Mendinger M et al. (2002) Antiangiogeneseis: current clinical data and future perspectives. *Onkologie* 25(6):520-7.
43. Egan KM, Seddon JM, Glynn JR, Gragoudas ES, Albert DM (1988) Epidemiologic aspects of uveal melanoma. *Surv Ophthalmol* 32(4):239-51.
44. Ek ET, Dass CR, Choong PF (2006) Pigment epithelium-derived factor: a multi-modal tumor inhibitor. *Mol Cancer Ther* 5(7):1641-6.
45. Eter N, Krohne TU, Holz FG (2006) New pharmacologic approaches to therapy for age-related macular degeneration. *BioDrugs* 20(3):167-79.

46. Eyetech Study Group (2002) Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exsudative age-related macular degeneration. *Retina* 22(2):143-52.
47. Eyetech Study Group (2003) Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. *Ophthalmology* 110(5):979-86.
48. Ferrara N (2001) Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280(6):C1358-66.
49. Ferrara N (2002) Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 29(6 Suppl 16):10-4.
50. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, et al. (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380(6573):439-42.
51. Ferrara N, Davis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18(1):4-25.
52. Ferrario A, von Thiel KF, Rucker N, Schwarz MA, Gills PS, Gomer C (2000) Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res* 60(15):4066-9.
53. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, et al. (1990) Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75(12):2417-26.
54. Fong G-H, Rossant J, Gertenstein M, Breitman M (1995) Role of Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulation of assembly of vascular endothelium. *Nature* 376(6535):66-70.
55. Gabel-Pfisterer A, Laue J, Heimann H, et al. (2004) Long-term results after surgical extraction of subfoveal choroidal neovascular membranes with and without hemorrhage in age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*: 242(4):350-4.
56. Gelisken F: Indocyangrün-Angiographie. In: Heimann H, Kellner U, Foerster MH, eds. *Angiographie-Atlas des Augenhintergrundes*. Stuttgart: Thieme, 2004;10-11.
57. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, et al. (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-

- kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 273(46):30336-43.
58. Gillies MC, Simpson JM, Luo W et al. (2003) A randomized clinical trial of a single dose of intravitreal triamcinolone acetonide for neovascular age-related macular degeneration : one-year results. *Arch Ophthalmol* 121(5):667-73.
59. Gonzalez VH, Hu LK, Theodossiadis PG, Flotte TJ, Gragoudas ES, Young LH (1995) Photodynamic therapy of pigmented choroidal melanomas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36(5):871-78.
60. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET, Jr., et al. (2004) VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 30(351):2805-2816.
61. Grehn F. *Augenheilkunde*. Berlin, Heidelberg, 2003; 215-219.
62. Grisanti S, Canbek S, Kaiserling E, et al. (2004) Expression of endoglin in choroidal neovascularisation. *Exp Eye Res* 78(2):207-13.
63. Grisanti S, Tatar O, Canbek S, et al. (2004) Immunohistopathologic evaluation of choroidal neovascular membranes following verteporfin-photodynamic therapy. *Am J Ophthalmol* 137(5):914-23.
64. Hasan J, Jayson GC (2001) VEGF antagonists. *Expert Opin Biol Ther* 1(4):703-18.
65. Hattenbach LO, Beck KF, Pfeilschifter J, Koch F, Ohrloff C, Schacke W (2005) Pigment-epithelium-derived factor is upregulated in photocoagulated human retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmic Res* 37(6):341-6.
66. Hayashi K, Ohno-Matsui K, Yoshida T, et al. (2005) Characteristics of patients with a favorable natural course of myopic choroidal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 243(1):13-9.
67. Heier JS, Boyer DS, Ciulla TA, et al. For the FOCUS Study Group (2006) Ranibizumab combined with Verteporfin Photodynamic Therapy in neovascular age-related macular degeneration. Year 1 results of the FOCUS Study. *Arch Ophthalmol* 124(11):1532-42.
68. Heimann H: Fluorescein-Angiographie. In: Heimann H, Kellner U, Foerster MH, eds. *Angiographie-Atlas des Augenhintergrundes*. Stuttgart: Thieme, 2004;1-9.

69. Heits F, Wiedemann GJ, Jelkmann W (1998) [Vascular endothelial growth factor VEGF stimulates angiogenesis in good and bad situations]. *Dtsch Med Wochenschr* 123(9):259-65.
70. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, et al. (2002) VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(17):11393-8.
71. Horsthemke B, Prescher G, Bornfeld N, Becher R (1992) Loss of chromosome 3 alleles and multiplication of chromosome 8 alleles in uveal melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 4(3):217-21.
72. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW (1991) The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5(12):1806-14.
73. Putehings H, Maitre-Boube M, Tombran-Tink J, Plouet J (2002) Pigment epithelium derived factor exerts opposite effects on endothelial cells of different phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 294(4):764-9.
74. Jablonski MM, Tombran-Tink J, Mrazek DA, Iannaccone A (2000) Pigment epithelium-derived factor supports normal development of photoreceptor neurons and opsin expression after retinal pigment epithelium removal. *J Neurosci* 20(19):7149-57.
75. Jain RK (2002) Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol* 29(6 Suppl 16):3-9.
76. Josko J, Gwozdz B, Jedrzejowska-Szypulka H, Hendryk S (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit* 6(5):1047-52.
77. Jousseaume AM, Kirchhof B, Gottstein C (2003) Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese. Möglichkeiten antiangiogener Therapie. *Ophthalmologie* 100(4):284-91.
78. Jurklics B, Anastassiou G, Ortmans S et al. (2003) Photodynamic therapy using verteporfin in circumscribed choroidal haemangioma. *Br J Ophthalmol* 87(1):84-9.
79. Kahn JC, Thurlby DA, Shahid A, et al. ; Genetic Factors in AMD Study. (2006) Smoking and age related macular degeneration: the number of pack years of

- cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation. *Br J Ophthalmol.* 90(1):75-80.
80. Karkkainen MJ, Petrova TV (2000) Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene* 19(49):5598-605.
 81. Kendall RL, Thomas KA (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10705-10709.
 82. Kendall RL, Wang A, Thomas KA (1996) Identification of a soluble form of vascular endothelial growth factor receptor FLT-1 and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* 226(2):324-8.
 83. Kim RY, Hu LK, Foster BS, Gragoudas ES, Young LH (1996) Photodynamic therapy of pigmented choroidal melanomas of greater than 3-mm thickness. *Ophthalmology* 103(12):2029-36.
 84. Kirchhof B (2002) Makulatranslokation. Bessere Prognose für AMD-Patienten. *Ophthalmologe* 99(3):143.
 85. Klaver CC, Wolfs RC, Vingerling JR, Hofman A, de Jong PT (1998) Age-specific prevalence and causes of blindness and visual impairment in an older population: the Rotterdam Study. *Arch Ophthalmol.* 116(5):653-8.
 86. Krishnaiah S, Das T, Nirmalan PK, et al. (2005) Risk factors for age-related macular degeneration: findings from the Andhra Pradesh eye disease study in South India. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46(12):4442-9.
 87. Kroll J, Waltenberger J (1997) The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 272(51):32521-7.
 88. Kunz M, Ibrahim SM (2003) Molecular responses to hypoxia in tumor cells. *Mol Cancer* 2(1):23.
 89. Kurohane K, Tominaga A, Sato K, North JR, Namba Y, Oku N (2001) Photodynamic therapy targeted to tumor-induced vessels. *Cancer Lett.* 167:49-56.
 90. Kuroki M, Voest EE, Amano S, et al. (1996) Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 98(7):1667-75.

91. Kwak N, Okamoto M, Wood JM, Campochiaro PA (2000) VEGF is major stimulator in model of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(10):3158-64.
92. Ladewig MS, Ziemmsen F, Jaissle G, et al. (2006) Intravitreales Bevacizumab bei der neovaskulären altersabhängigen Makuladegeneration. *Ophthalmologie* 113(6):537-51.
93. Landgren E, Schiller P, Cao Y, Claesson-Welsh L (1998) Placenta growth factor stimulates MAP kinase and mitogenicity but not phospholipase-C gamma and migration of endothelial cells expressing Flt-1. *Oncogene* 16:359-67.
94. Letarte M, Greaves A, Vera S: CD105 (endoglin). In: Schlossmann SF, Baumsell L, Gilks W eds. *Leukocyte typing*, Oxford University Press, Oxford 1995; 1756-1759.
95. Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M (1996) VEGF, Flk-1 and Flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol* 270(5 Pt 2):H1803-11.
96. Limbourg I, Legrain S, De Potter P (2002) Transpupillary thermotherapy for treatment of choroidal melanomas. *Bull Soc Belge Ophthalmol* (285):55-64.
97. Lommatzsch P. *Ophthalmologische Onkologie*. Stuttgart, 1999; 207-309.
98. Macular Photocoagulation Study Group. (1991) Subfoveal neovascular lesions in age-related macular degeneration. Guidelines for evaluation and treatment in the macular photocoagulation study. *Arch Ophthalmol*. 109(9):1242-57.
99. Maik-Rachline G, Shaltiel S, Seger R (2005) Extracellular phosphorylation converts pigment epithelium-derived factor from a neurotrophic to an antiangiogenic factor. *Blood* 105(2):670-8.
100. Matsumoto T, Claesson-Welsh L (2001) VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE* (112):RE21.
101. Miller JW, Schmidt-Erfurth U, Sickenberg M, et al. (1999) Photodynamic therapy with verteporfin for choroidal neovascularization caused by age-related macular degeneration: results of a single treatment in a phase 1 and 2 study. *Arch Ophthalmol*: 117(9):1161-73.

102. Michaud N, Flotte TJ, Haimovici R, Gragoudas ES (1995) Photodynamic therapy of experimental choroidal neovascularization using lipoprotein-delivered benzoporphyrin. *Arch Ophthalmol*: 113(6):810-8.
103. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J (1994) Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vivo and in vitro. *Lab Invest* 71(3):374-9.
104. Nelson JS, Liaw LH, Berns MW (1987) Tumor destruction in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 46(5):829-35.
105. Ng IO, Poon RT, Lee JM et al. (2001) Microvessel density, vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR in hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 116(6):838-45.
106. Ogata N, Wang R, Jo N (2001) Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury. *Curr Eye Res* 22(4):245-52.
107. Ohno-Matsui K, Yoshida T (2004) Myopic choroidal neovascularisation: natural course and treatment. *Curr Opin Ophthalmol* 15(3):197-202.
108. Ohno-Matsui K, Yoshida T, Uetama T, Mochizuki M, Morita I (2003) Vascular endothelial growth factor upregulates pigment epithelium-derived factor expression via VEGFR-1 in human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 303(3):962-7.
109. Parums DV, Cordell JL, Micklem K, et al. (1990) JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 43(9):752-7.
110. Pauleikhoff D, Chen J, Bird AC, Wessing A (1992) The Bruch membrane and choroid. Angiography and functional characteristics in age-related changes. *Ophthalmologie*: 89(1):39-44.
111. Pauleikhoff D, Harper CA, Marshall J, Bird AC (1990) Aging changes in Bruch's membrane. A histochemical and morphologic study. *Ophthalmology* 97(2):171-8.
112. Pauleikhoff D, Holz FG (1996) Die altersabhängige Makuladegeneration. 1. Epidemiologie, Pathogenese und diagnostische Differenzierung. *Ophthalmologie* 93(3):299-315.
113. Pauleikhoff D, Spital G, Wessing A: Laserkoagulation bei altersbedingter Makuladegeneration. In: Holz FG, Pauleikoff D, Spaide RF, Bird AC Altersabhängige Makuladegeneration. Berlin, Heidelberg: Springer; 2004:130-146.

114. Pe'er J, Folberg R, Itin A, et al. (1996) Upregulated expression of vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 80(3):241-5.
115. Petersen SV, Valnickova Z, Enghild JJ (2003) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) occurs at a physiologically relevant concentration in human blood: purification and characterization. *Biochem J* 374(Pt 1):199-206.
116. Quinn T, Peters KG, de Vries C, Ferrara N, Williams LT (1993) Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(16):7533-7.
117. Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386(6626):671-4.
118. Robinson CJ, Stringer SE (2001) The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 114(Pt 5):853-65.
119. Rosen LS (2001) Angiogenesis inhibition in solid tumors. *Cancer J Suppl* 3:S120-8.
120. Saishin Y, Silva RL, Saishin Y, et al. (2005) Periocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization in a human-sized eye. *Hum Gene Ther* 16(4):473-8.
121. Schlingemann RO (2004) Role of growth factors and the wound healing response in age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 242(1):91-10.
122. Schlotzer-Schrehardt U, Viestenz A, Naumann GO, Laqua H, Michels S, Schmidt-Erfurth U (2002) Dose-related structural effects of photodynamic therapy on choroidal and retinal structures of human eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*: 240(9):748-57.
123. Schmidt-Erfurth U (1998) Photodynamische Therapie. Minimal invasive Behandlung choroidaler Neovaskularisationen. *Ophthalmologe*: 95(10):725-31.
124. Schmidt-Erfurth U, Baumann W, Gragoudas E et al. (1994) Photodynamic therapy of experimental choroidal melanoma using lipoprotein-delivered benzoporphyrin. *Ophthalmology* 101:89-99.
125. Schmidt-Erfurth U, Hasan T (2000) Mechanisms of action of photodynamic therapy with verteporfin for the treatment of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*:45(3):195-214.

126. Schmidt-Erfurth U, Hasan T, Flotte T, Gragoudas E, Birngruber R (1994) Photodynamische Therapie experimenteller intraokularer Tumoren mit Benzoporphyrin-Lipotrotein. *Ophthalmologie* 91(3):348-56.
127. Schmidt-Erfurth U, Hasan T, Gragoudas E et al. (1994) Vascular targeting in photodynamic occlusion of subretinal vessels. *Ophthalmology* 101:1953-1961.
128. Schmidt-Erfurth U, Miller JW, Sickenberg M, et al. (1999) Photodynamic therapy with verteporfin for choroidal neovascularization caused by age-related macular degeneration: results of retreatments in phase 1 and 2 study. *Arch Ophthalmol*: 117(9):1177-87.
129. Schmidt-Erfurth U, Schlötzer-Schrehard U, Cursifen C, Michels S, Beckendorf A, Naumann G (2003) Influence of photodynamic therapy on expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptor 3, and pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(10):4473-80.
130. Schmidt-Erfurth UM, Kusserow C, Barbazetto IA, Laqua H (2002) Benefits and complications of photodynamic therapy of papillary capillary haemangiomas. *Ophthalmology* 109(7):1256-66.
131. Schubert SN (2003) Evaluation des neuroprotektiven Effekts von Methylprednisolon bei cardiopulmonalem Bypass und Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie. Dissertation, Charité Universitätsmedizin Berlin
132. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. (1995) Failure of blood island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature* 376:62-6.
133. Sheidow TG, Hooper PL, Crukley C, Young J, Heathcote JG (2000) Expression of vascular endothelial growth factor in uveal melanoma and its correlation with metastasis. *Br J Ophthalmol* 84(7):750-6.
134. Shen J, Samul R, Silva RL, et al. (2006) Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene Ther* 13(3):225-34.
135. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, et al. (1990) Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 5(4):519-24.
136. Shima DT, Adamis AP, Ferrara N, et al. (1995) Hypoxic induction of vascular endothelial cell growth factors in the retina: identification and characterization of

- vascular endothelial growth factor (VEGF) as the sole mitogen. *Mol Med* 1(2):182-93.
137. Singh AD, Shields CL, Shields JA (2001) Prognostic factors in uveal melanoma. *Melanoma Res* 11(3):255-63.
138. Skobe M, Rockwell P, Goldstein N, Vosseler S, Fusening NE (1997) Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nat Med* 3(11):1222-7.
139. Smith W, Assink J, Klein R, et al. (2001) Risk factors for age-related macular degeneration: pooled findings from three continents. *Ophthalmology* 108(4):697-704.
140. Solorzano CC, Baker CH, Bruns CJ et al. (2001) Inhibition of growth and metastasis of human pancreatic cancer growing in nude mice by PTK 787/ZK222584, an inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases. *Cancer Biother Radiopharm* 16(5):359-70.
141. Spraul CW, Lang GE, Yoon HS, Grossniklaus HE, Lang GK (1997) Histologische Charakterisierung und Klassifikation chirurgische exzidiertes Neovaskularisationsmembranen. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 211(5):324-34.
142. Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, Tombran-Tink J (1993) Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Nat Acad Sci* 90(4):1526-30.
143. Stitt AW, Simpson DA, Boock C et al. (1998) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors is regulated in eyes with intra-ocular tumors. *J Pathol* 186(3):306-12.
144. St. Jaques S, Cymerman U, Pece N, Letarte M (1994) Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology* 134(6):2545-57.
145. Takagi H, King GL, Aiello LP (1996) Identification and characterization of vascular endothelial growth factor receptor (Flt) in bovine retinal pericytes. *Diabetes* 45(8):1016-23.
146. Taniwaki T, Becerra SP, Chader GJ, Etcheberrigaray R, Schwartz JP (1995) Pigment epithelium-derived factor is a survival factor for cerebellar granule cells in culture. *J Neurochem* 64(6):2509-17.

147. Taniwaki T, Hirashima N, Becerra SP, et al. (1997) Pigment epithelium-derived factor protects cultured cerebellar granule cells against glutamate-induced neurotoxicity. *J Neurochem* 68(1):26-32.
148. Tatar O, Adam A, Shinoda K, et al. (2006) Expression of VEGF and PEDF in choroidal neovascular membranes following verteporfin photodynamic therapy. *Am J Ophthalmol* 142(1):95-104.
149. Tatar O, Shinoda K, Adam A, et al. (2007) Effect of Verteporfin Photodynamic Therapy on Endostatin and Angiogenesis in Human Choroidal Neovascular Membranes. *Br J Ophthalmol* 91(2):166-73.
150. Thieme H, Aiello LP, Takagi H, Ferrara N, King GL (1995) Comparative analysis of vascular endothelial growth factor receptors on retinal and aortic vascular endothelial cells. *Diabetes* 44(1):98-103.
151. Thomas MA, Grand MG, Williams DF, Lee CM, Pesin SR, Lowe MA (1992) Surgical management of subfoveal choroidal neovascularisation. *Ophthalmology* 99(6):952-68, discussion 975-976.
152. Tudor RM, Flook BE, Voelkel NF (1995) Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest* 95(4):1798-1807.
153. Uehara M, Inokuchi T, Sano K, Zuolin W (2001) Expression of vascular endothelial growth factor in mouse tumors subjected to photodynamic therapy *Eur J Cancer* 37(16):2111-15.
154. Valter MM, Hugel A, Huang HJ et al. (1999) Expression of the Ets-1 transcription factor in human astrocytomas is associated with Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)/vascular endothelial growth factor receptor-1 synthesis and neoangiogenesis. *Cancer Res* 59(21):5608-14.
155. Viores SA, Youssri AI, Luna JD, et al. (1997) Upregulation of vascular endothelial growth factor in ischemic and non-ischemic human and experimental retinal disease. *Histol Histopathol* 12(1):99-109.
156. Wachtlin J, Bechrakis NE, Foerster MH (2005) PDT mit Verteporfin beim Aderhautmelanom. *Ophthalmologie* 102(3):241-6.

157. Wachtlin J: Choroidale Neovaskularisation anderer Genese. In: Heimann H, Kellner U, Foerster MH eds. *Angiographie-Atlas des Augenhintergrundes*. Stuttgart: Thieme, 2004; 38-39.
158. Wachtlin J, Heimann H, Behme T, Foerster MH (2003) Long term results after photodynamic therapy with verteporfin for choroidal neovascularizations secondary to inflammatory chorioretinal diseases. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 241:899-906.
159. Wachtlin J (2005): Untersuchungen zur Behandlung choroidaler Neovaskularisationen (CNV) am Augenhintergrund mittels Photodynamischer Therapie (PDT). Habilitationsschrift, Charité Universitätsmedizin Berlin.
160. Wansel S (2004): Nachweis von Vascular Endothelial Growth Factor – Rezeptoren - 1 (flt-1) beim Aderhautmelanom. Inaugural-Dissertation, Charité Universitätsmedizin Berlin.
161. Wegscheider BJ, Weger M, Renner W, et al. (2007) Association of complement factor H Y402H gene polymorphism with different subtypes of exsudative age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 114(4):738-42.
162. Wong WT, Rex TS, Auricchio A, et al. (2004) Effect of over-expression of pigment epithelium derived factor (PEDF) on developing retinal vasculature in the mouse. *Mol Vis* 10:837-44.
163. Yao Y, Guan M, Zhao XQ, Huang YF (2003) Downregulation of pigment epithelium derived factor by hypoxia and elevated glucose concentration in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 83(22):1989-92.
164. Ye C, Sweeny D, Sukbuntherng J et al. (2006) Distribution, metabolism and excretion of the anti-angiogenic compound SU5416. *Toxicology in Vitro* 20(2):154-162.
165. Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP (1996) Expression of vascular endothelial growth factor, its receptors, and other angiogenic factors in breast cancer. *Cancer Res* 56(9):2013-16.
166. Zhang SX, Wang JJ, Guoquan G, Kyoungmin P, Jian-xing M (2006) Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy. *Journal of Molecular Endocrinology* 37(1):1-12.

167. Ziemssen F, Bartz-Schmidt KU, Grisanti S (2006) (Neben-) Wirkungen der VEGF-Inhibition. *Ophthalmologe* 103(6):484-92.
168. Ziemssen F, Wegner R, Wegner J, et al. (2006) Analysis of neovasculature in uveal melanoma by targeting the TGFbeta-binding receptor endoglin: is there prognostic relevance of proliferating endothelium? *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 244(9):1124-31.

8. Abkürzungs-, Tabellen-, und Abbildungsverzeichnis

8.1. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AH	Aderhaut
AHMM	Aderhautmelanom
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
Ang.1	Angiopoietin-1
APAAP	Alkalische Phosphatase anti Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARM	age related maculopathy
bzw.	beziehungsweise
cm ²	Quadratcentimeter
CNV	Choroidale Neovaskularisationsmembran
dpt	Dioptrien
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Flt-1	fetal liver kinase 1
g	Gramm
hämorr.	hämorrhagisch
HIF-1 α	hypoxia inducible factor 1 α
HSPGs	heparansulfatierte Proteoglykane
IP3	Inositoltrisphosphat
i.v.	intravenös
J	Joule
KDa	Kilodalton
KDR	kinase insert domain-containing receptor
KHK	koronare Herzkrankheit
MAG	Mouse-anti-Goat Antikörper
MAR	Mouse-anti-Rabbit Antikörper
MFCP	multifokale Chorioiditis mit Panuveitis
mg	Miligramm
min	Minute
ml	Mililiter

mm	Milimeter
mRNA	messenger RNA
mW	Miliwatt
nm	nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NRP	Neuropilin
OCT	optische Cohärenz Tomographie
OHS	ocular histoplasmosis syndrome
PDT	Photodynamische Therapie
PEDF	pigmentepithelium derived factor
PIC	Punctate Inner Choriopathy
PKC	Proteinkinase C
PIGF	Placenta growth factor 1
POHS	presumed ocular histoplasmosis syndrome
RPE	retinales Pigmentepithel
s	Sekunde
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TGF- β	transforming growth factor β
TTT	transpupilläre Thermotheapie
überw.	überwiegend
VEGF	vascular endothelial growthfactor
VEGFR1	VEGF-Rezeptor 1
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
z.B.	zum Beispiel

8.2. Tabellen

Tabelle 13: Mögliche Ursachen einer CNV mit exsudativer Makulopathie

Tabelle 14: Übersicht über natürliche Angiogeneseaktivatoren und -inhibitoren des menschlichen Organismus

Tabelle 15: Parameter bei der experimentellen PDT

Tabelle 16: Verwendete Primärantikörper mit jeweils zugehörigem Antigen

Tabelle 17: Klinische Charakteristika (CNV-Typ, Anzahl der durchgeführten Behandlungen, Größe sowie Zeit zwischen PDT und operativer Entfernung der CNV-Membran) der mit der PDT behandelten CNV-Membranen

Tabelle 18: Klinische Charakteristika der unbehandelten CNV-Membranen (CNV-Typ sowie Größe der Läsion)

Tabelle 19: Anzahl der CD 31-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)

Tabelle 20: Anzahl der CD 34-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)

Tabelle 21: Anzahl der CD 105-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)

Tabelle 22: Anzahl der VEGF-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)

Tabelle 23: Anzahl der Flt-1-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)

Tabelle 24: Anzahl der PEDF-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)

8.3. Abbildungen

Abbildung 60: Fotografie eines peripapillären Aderhautmelanoms

Abbildung 61: schematische Darstellung einer klassischen CNV mit Wachstum von Gefäßen aus der Aderhaut (AH) durch das retinale Pigmentepithel (RPE) unter die Netzhaut (NH).

Abbildung 62: optische Kohärenztomographie (OCT): Schnitt durch die Schichten einer klassischen CNV mit Gefäßwachstum durch das RPE unter die Netzhaut

Abbildung 63: VEGF-Isoformen mit Angabe der Anzahl der Exons. Durch Exonsplicing existieren mindestens 6 verschiedene Isoformen des VEGF-A. Als Hauptangiogeneseinduktor gilt das VEGF165, während VEGF165b die Angiogenese inhibiert.

Abbildung 64: Schematische Darstellung des Aufbaus der VEGFR mit Zuordnung der spezifischen Liganden sowie der Co-Rezeptoren s-VEGFR-1 und NRP-1. Durch Bindung der verschiedenen Liganden an den jeweiligen Rezeptor kommt es zur Dimerisation und Phosphorylierung und nachfolgend zur Aktivierung von Angiogenesevorgängen.

Abbildung 65: Vereinfachte schematische Darstellung der Rezeptor-Ligand-Interaktion mit nachfolgend ablaufenden intrazellulären Stoffwechselprozessen mit Beteiligung von Adapterproteinen wie z.B. der

- Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase), der Protein Kinase C (PKC) sowie Inositoltrisphosphat (IP3) und Calcium, die in Angiogenese sowie Endothelzell-Überleben resultieren.
- Abbildung 66: Therapie der CNV: Photodynamische Therapie (PDT). Der Farbstoff Verteporfin wird über eine Armvene injiziert und gelangt in die Gefäße der CNV. Dort wird der Farbstoff mittels Laser aktiviert und führt so zu einer Okklusion der pathologischen Gefäße.
- Abbildung 67: schematische Darstellung der APAAP-Methode
- Abbildung 68: schematische Darstellung des mittels Rasterokular ausgezählten Feldes bei 200-facher Vergrößerung. Zellen auf der rechten und oberen Begrenzung wurden mitgezählt, Zellen auf der linken und unteren Begrenzung jedoch nicht.
- Abbildung 69: PDT-behandelte CNV-Membran bei 100-facher Vergrößerung mit retinalem Pigmentepithel und Endothelzellen
- Abbildung 70: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für CD 31 bei 100-facher Vergrößerung
- Abbildung 71: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für CD 31 bei 200-facher Vergrößerung.
- Abbildung 72: unbehandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für CD 31 bei 200-facher Vergrößerung
- Abbildung 73: Vergleich der Anzahl der CD31-positiv gefärbten Zellen in den CNV-Membranen der behandelten (PDT ja) und der unbehandelten Gruppe (PDT nein) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)
- Abbildung 74: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für CD 34 bei 100-facher Vergrößerung.
- Abbildung 75: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für CD 34 bei 200-facher Vergrößerung.
- Abbildung 76: unbehandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für CD 34 bei 200-facher Vergrößerung.
- Abbildung 77: Vergleich der Anzahl der CD34-positiv gefärbten Zellen in den CNV-Membranen der behandelten (PDT ja) und der unbehandelten Gruppe (PDT nein) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)

- Abbildung 78: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für CD 105 bei 100-facher Vergrößerung.
- Abbildung 79: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für CD 105 bei 200-facher Vergrößerung.
- Abbildung 80: unbehandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für CD 105 bei 200-facher Vergrößerung.
- Abbildung 81: Vergleich der Anzahl der CD105-positiv gefärbten Zellen in den CNV-Membranen der behandelten (PDT ja) und der unbehandelten Gruppe (PDT nein) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)
- Abbildung 82: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für VEGF bei 100-facher Vergrößerung.
- Abbildung 83: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für VEGF bei 200-facher Vergrößerung.
- Abbildung 84: unbehandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für VEGF bei 200-facher Vergrößerung.
- Abbildung 85: Vergleich der Anzahl der VEGF-positiv gefärbten Zellen in den CNV-Membranen der behandelten (PDT ja) und der unbehandelten Gruppe (PDT nein) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)
- Abbildung 86: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für Flt-1 bei 100-facher Vergrößerung.
- Abbildung 87: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für Flt-1 bei 200-facher Vergrößerung.
- Abbildung 88: unbehandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für Flt-1 bei 200-facher Vergrößerung.
- Abbildung 89: Vergleich der Anzahl der Flt-1-positiv gefärbten Zellen in den CNV-Membranen der behandelten (PDT ja) und der unbehandelten Gruppe (PDT nein) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)
- Abbildung 90: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für PEDF bei 100-facher Vergrößerung.
- Abbildung 91: PDT-behandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für PEDF bei 200-facher Vergrößerung.

- Abbildung 92: unbehandelte CNV-Membran nach immunhistochemischer Färbung für PEDF bei 200-facher Vergrößerung.
- Abbildung 93: Vergleich der Anzahl der PEDF-positiv gefärbten Zellen in den CNV-Membranen der behandelten (PDT ja) und der unbehandelten Gruppe (PDT nein) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)
- Abbildung 94: Anzahl VEGF-positiv gefärbter Zellen in Abhängigkeit vom Zeitintervall in Monaten zwischen letzter PDT und der operativen Entfernung der CNV-Membran
- Abbildung 95: Anzahl CD105-positiv gefärbter Zellen in Abhängigkeit vom Zeitintervall in Monaten zwischen letzter PDT und der operativen Entfernung der CNV-Membran
- Abbildung 96: Deskriptive Darstellung des Quotienten aus der Anzahl VEGF-positiver Zellen über der Anzahl PEDF-positiver Zellen im zeitlichen Verlauf nach der Behandlung mit der Photodynamischen Therapie.
- Abbildung 97: makroskopisches Foto eines Aderhautmelanoms mit durch die PDT erzeugter Nekrose.
- Abbildung 98: mikroskopisches Bild eines Aderhautmelanoms mit durch die PDT erzeugter Nekrose bei 50-facher Vergrößerung.
- Abbildung 99: mit der PDT behandeltes Aderhautmelanom nach immunhistochemischer Färbung in 200-facher Vergrößerung. Deutlich erkennbar die drei Zonen des Tumors: die Nekrosezone, die Übergangszone zwischen Nekrose und unbehandeltem Areal des Tumors sowie der unbehandelte Bereich.
- Abbildung 100: Aderhautmelanom nach der Behandlung mit der PDT (50-fache Vergrößerung). Es zeigt sich eine deutliche Nekrose im Behandlungsareal (Pfeile) sowie einige Restinseln vitaler Zellen innerhalb der Nekrose.
- Abbildung 101: mit der PDT behandeltes Aderhautmelanom nach immunhistochemischer Färbung für CD31 bei 200-facher Vergrößerung. Die drei Zonen des Tumors sind deutlich erkennbar: Nekrosezone (N), Übergangszone (Ü) und unbehandeltes Areal (uA)
- Abbildung 102: unbehandeltes Aderhautmelanom nach immunhistochemischer Färbung für CD31 bei 200-facher Vergrößerung.

- Abbildung 103: Anzahl der CD 31-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen (Nekrose, Übergang, unbehandelt) der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Vergleich) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median).
- Abbildung 104: mit der PDT behandeltes Aderhautmelanom nach immunohistochemischer Färbung für CD34 bei 200-facher Vergrößerung. Die drei Zonen des Tumors sind deutlich erkennbar: Nekrosezone (N), Übergangszone (Ü) und unbehandeltes Areal (uA).
- Abbildung 105: unbehandeltes Aderhautmelanom nach immunohistochemischer Färbung für CD34 bei 200-facher Vergrößerung.
- Abbildung 106: Anzahl der CD 34-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen (Nekrose, Übergang, unbehandelt) der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Vergleich) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median).
- Abbildung 107: mit der PDT behandeltes Aderhautmelanom nach immunohistochemischer Färbung für CD105 bei 200-facher Vergrößerung. Die drei Zonen des Tumors sind deutlich erkennbar: Nekrosezone (N), Übergangszone (Ü) und unbehandeltes Areal (uA).
- Abbildung 108: unbehandeltes Aderhautmelanom nach immunohistochemischer Färbung für CD105 bei 200-facher Vergrößerung.
- Abbildung 109: Anzahl der CD 105-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen (Nekrose, Übergang, unbehandelt) der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Vergleich) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)
- Abbildung 110: mit der PDT behandeltes Aderhautmelanom nach immunohistochemischer Färbung für VEGF bei 200-facher Vergrößerung. Die drei Zonen des Tumors sind deutlich erkennbar: Nekrosezone (N), Übergangszone (Ü) und unbehandeltes Areal (uA).
- Abbildung 111: unbehandeltes Aderhautmelanom nach immunohistochemischer Färbung für VEGF bei 200-facher Vergrößerung.
- Abbildung 112: Anzahl der VEGF-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe

- Abbildung 113: mit der PDT behandeltes Aderhautmelanom nach immunhistochemischer Färbung für Flt-1 bei 200-facher Vergrößerung. Die drei Zonen des Tumors sind deutlich erkennbar: Nekrosezone, Übergangszone und unbehandeltes Areal.
- Abbildung 114: unbehandeltes Aderhautmelanom nach immunhistochemischer Färbung für Flt-1 bei 200-facher Vergrößerung.
- Abbildung 115: Anzahl der Flt-1-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen (Nekrose, Übergang, unbehandelt) der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Vergleich) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)
- Abbildung 116: mit der PDT behandeltes Aderhautmelanom nach immunhistochemischer Färbung für PEDF bei 200-facher Vergrößerung.
- Abbildung 117: unbehandeltes Aderhautmelanom nach immunhistochemischer Färbung für PEDF bei 200-facher Vergrößerung. Es zeigen sich einzelne PEDF-positive Zellen im Tumorgewebe (s. Pfeile).
- Abbildung 118: Anzahl der PEDF-positiv gefärbten Zellen in den drei Zonen (Nekrose, Übergang, unbehandelt) der mit der PDT behandelten Tumore im Vergleich mit der Anzahl positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Vergleich) (Maximum, Minimum, Standardabweichung, Median)

9. Danksagung

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Joachim Wachtlin, Chefarzt der Augenklinik des Sankt Gertrauden Krankenhauses Berlin, für das Überlassen des Themas. Seine stets sehr kompetente, freundliche und motivierende Begleitung der Arbeit sorgte für eine angenehme und produktive Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Michael Foerster, Chefarzt der Augenklinik der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, danke ich für die Möglichkeit in seinem Institut zu promovieren.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. Nikolaos Bechrakis, Chefarzt der Universitätsaugenklinik Innsbruck, Österreich, für die hilfsbereite Beantwortung zahlreicher Fragen hinsichtlich der Histologie.

Ich danke Frau Karin Oberländer, MTA im ophthalmopathologischen Labor, für die Einarbeitung in die experimentellen Methoden, die freundliche Hilfsbereitschaft und stete Ermunterung zum Arbeiten.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau Andrea Stroux, Mitarbeiterin im Institut für Informatik, Biometrie und Epidemiologie der Charité, Campus Benjamin Franklin für die Beratung zum statistischen Abschnitt dieser Arbeit.

Abschließend danke ich meiner Familie, meinen Freunden und meinem Freund, die mich während der Entstehung dieser Arbeit immer unterstützt und in schweren Phasen motiviert haben.

10. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11. Erklärung

Ich, Sibylle Thormann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Einfluß der Photodynamischen Therapie (PDT) auf Angiogenesefaktoren beim Aderhautmelanom und bei choroidalen Neovaskularisationen (CNV)“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 19. Januar 2009

Sibylle Thormann