

Aus der Klinik für Ophthalmologie
(Direktor: Prof. Dr. Johann Roider)
im Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

VEGF- und Gefäßanalyse beim pyogenen Granulom der Konjunktiva

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde einer Doktorin der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Rosa Marie-Joe Entrup

aus Hannover

Kiel 2018

Meinen Eltern

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Johann Roider

2. Berichterstatter: PD Dr. Felix Treumer

Tag der mündlichen Prüfung: 24.9.18

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VII
1. Einleitung	1
1.1 Pyogene Granulome.....	1
1.2 Klinik und Therapie von pyogenen Granulomen der Konjunktiva	2
1.3 Chalazien.....	3
1.4 Anti-VEGF-Therapie in der Augenheilkunde.....	4
1.5 Ziel der Arbeit.....	7
2 Material und Methoden.....	8
2.1 Probengewinnung	8
2.2 Histologische Aufarbeitung.....	8
2.2.1 Fixation.....	8
2.2.2 Schnitttechnik	8
2.3 Färbung.....	9
2.3.1 HE-Färbung	9
2.3.2 vWF-Färbung.....	9
2.3.3 VEGF-Färbung	10
2.4 Bildaufnahmetechnik.....	11

2.4.1	Lichtmikroskopie	11
2.4.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	11
2.5	Bildanalyse	13
2.5.1	Definitionen der analysierten Stellen	13
2.5.2	Axio Vision Autmess Programm.....	15
2.6	Statistische Auswertung.....	18
3	Ergebnisse	19
3.1	Beobachtungen und qualitative Beschreibung.....	19
3.1.1	Pyogene Granulome (PG).....	23
3.1.2	Chalazien (CH)	23
3.1.3	Kontrollen (KO).....	24
3.2	Statistische Auswertung.....	24
3.2.1	Zusammenfassung.....	30
4	Diskussion	31
4.1	Auswahl der Vergleichsgruppen.....	31
4.2	Semiautomatische Messung.....	32
4.3	VEGF als Angiogenesemarker.....	33
4.4	Therapie pyogener Granulome.....	34
4.4.1	Chirurgische Exzision	35
4.4.2	Kryochirurgie	35
4.4.3	Laser	36

4.4.4	Konservative Therapie.....	38
4.4.5	Topische Anti-VEGF Therapie bei kornealen Neovaskularisationen.....	40
5	Zusammenfassung	42
6	Tabellenanhang	44
6.1	Semiquantitative Ergebnisse der vWF-Färbungen der pyogenen Granulome	44
6.2	Semiquantitative Ergebnisse der VEGF-Färbungen der pyogenen Granulome.....	45
6.3	Semiquantitative Ergebnisse der vWF-Färbungen der Chalazien	46
6.4	Semiquantitative Ergebnisse der VEGF-Färbungen der Chalazien.....	47
6.5	Semiquantitative Ergebnisse der vWF-Färbungen der Kontrollen.....	48
6.6	Semiquantitative Ergebnisse der VEGF-Färbungen der Kontrollen	49
6.7	Statistische Signifikanz	50
7	Literaturverzeichnis	52
8	Erklärung.....	58
9	Danksagung.....	59
10	Curriculum vitae.....	60
11	Publikationen.....	61

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
CH	Chalazien
CO2-Laser	Kohlendioxidlaser
GA	Gefäßanzahl
GF	Gefäßfläche
GP	Anzahl der VEGF positiven Gefäße
HE	Hämatoxilin-Eosin
kDa	kiloDalton
KO	Kontrollen
Konz.	Konzentrierte Stelle
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
Max.	maximal
Nd:YAG-Laser	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
nm	nanometer
pH	potentia hydrogenii
PG	Pyogene Granulome
PDGF-B	platelet-derived growth factor-B
Subepi	subepitheliale Stelle
Ver.	Vergrößerung des Mikroskopobektivs
vWF	von Willebrand Faktor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
µm	mikrometer

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Überblick über die Anzahl der Messstellen pro Präparat je Gruppe	15
Tab. 2: Erhobene vaskuläre Parameter pyogener Granulome	23
Tab. 3: Erhobene vaskuläre Parameter von Chalazien.....	23
Tab. 4: Erhobene vaskuläre Parameter von Kontrollen	24
Tab. 5: Semiquantitative Ergebnisse der vWF-Färbungen der pyogenen Granulome.....	44
Tab. 6: Semiquantitative Ergebnisse der VEGF-Färbungen der pyogenen Granulome	45
Tab. 7: Semiquantitative Ergebnisse der vWF-Färbungen der Chalazien	46
Tab. 8: Semiquantitative Ergebnisse der VEGF-Färbungen der Chalazien	47
Tab. 9: Semiquantitative Ergebnisse der vWF-Färbungen der Kontrollen	48
Tab. 10: Semiquantitative Ergebnisse der VEGF-Färbungen der Kontrollen	49
Tab. 11: p-Werte aller 3 Gruppen (PG, CH, KO)	50
Tab. 12: p-Werte aller Binnenanalysen	51

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: A: Pyogenes Granulom der Bindegewebe und B: Der korrespondierende histologische Schnitt.....	2
Abb. 2: Chalazion am ektropionierten Oberlid und am Unterlid	3
Abb. 3: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.....	11
Abb. 4: Filter 43 HE.....	12
Abb. 5: Filter 38 HE.....	12
Abb. 6: Anregungs- und Emissionsspektren des für die VEGF-Färbung verwendeten Antikörpers <i>Alexa Fluor 555</i>	13
Abb. 7: Exemplarischer Direktvergleich gewebstypischer Bereiche aller drei Gruppen	14
Abb. 8: Exemplarischer Direktvergleich der speziellen Stellen aller drei Gruppen.....	14
Abb. 9: <i>Schritt 1:</i> Markierung von Pixelfarben mit Hilfe des Programm assistenten	16
Abb. 10: <i>Schritt 2:</i> Manuelle Korrektur: Ergänzung von Gefäßkonturen und Lumina	17
Abb. 11: <i>Schritt 3:</i> Manuelle Korrektur: Aus-und Abwählen von Objekten.....	17
Abb. 12: <i>Schritt 4:</i> Fertig analysiertes Bild.....	18
Abb. 13: Exemplarische Stellen aller drei Gruppen vor und nach semiautomatischer Markierung der Gefäße (vWF).....	21
Abb. 14: Exemplarische Stellen aller drei Gruppen vor und nach semiautomatischer Markierung des VEGF-Gesamtsignals	22
Abb. 15: mittlere Gefäßanzahl aller Stellen in den drei Gruppen	25
Abb. 16: mittlere Gefäßfläche aller Stellen in den drei Gruppen.....	26

Abb. 17: mittlere Gefäßkaliber aller Stellen in den drei Gruppen.....	26
Abb. 18: Kumulatives VEGF-Signal aller Stellen in den drei Gruppen.....	27
Abb. 19: Anzahl der Gefäße in pyogenen Granulomen aller tiefen Stellen und aller subepithelialen Stellen	28
Abb. 20: Mittleres kumulatives VEGF-Signal in pyogenen Granulomen aller tiefen Stellen und aller subepithelialen Stellen.....	29

1. Einleitung

1.1 Pyogene Granulome

Pyogene Granulome gehören zur Gruppe der Hämangiome und sind exophytisch wachsende entzündliche Tumoren, die hauptsächlich an der Gesichtshaut und den Extremitäten auftreten. Darüber hinaus treten sie oft an Schleimhaut assoziierten Stellen auf wie z.B. in der Mundhöhle, an der Nasenschleimhaut und am Auge (Hare, 1970). Am Auge ist insbesondere das Auftreten an der Konjunktiva, am Lid, im Tränensack und selten auch an der Kornea beschrieben (Googe et al., 1984; Rohrbach & Lieb, 1998, S. 188-192). Über Einzelfälle von pyogenen Granulomen wird auch im Gastrointestinaltrakt berichtet (Yao et al., 1995).

Pyogene Granulome treten sowohl bei Frauen als auch Männern in jeder Altersklasse auf (Hare, 1970). Die Ätiopathogenese zu diesen gutartigen, nicht schmerzhaften Tumoren ist noch weitgehend unbekannt. Auffällig ist, dass sie häufig nach Bagatelltraumen oder Infektionen auftreten (Naumann, 1997). Darüber hinaus kommen sie an der Mundschleimhaut gehäuft bei Schwangeren vor, sodass auch hormonelle Faktoren nicht ausgeschlossen werden können (Grosskopf, 2005). Am Auge kann dem pyogenen Granulom ein perforierendes Hordeolum oder Chalazion vorausgehen (Ferry, 1989; Font et al., 2006; Yanoff et al., 2009, S. 175). Eine Theorie ist, dass fehlgebildete oberflächliche kutane Blutgefäße die Entstehung pyogener Granulome begünstigen (Mooney & Janniger, 1995).

In der Vergangenheit wurden dem pyogenen Granulom viele Namen zugeschrieben. 1844 tauchte der erste Fall eines pyogenen Granuloms in der englischen Literatur auf: „*Hullihen: Case of aneurism by anastomosis of the superior maxillae*“ (Hullihen, 1844). Wenig später vermutete man, dass pyogene Granulome aufgrund einer Pilzinfektion entstünden, weshalb der Name “Botryomycosis hominis” eingeführt wurde (Grosskopf, 2005). Diese Vermutung ließ sich allerdings nicht beweisen. 1904 prägte Hartzell den weitgehend akzeptierten Begriff des „pyogenen Granuloms“ (Hartzell, 1904). Die Auseinandersetzung mit der historischen Namensgebung ist insofern interessant, weil sich im klinischen Alltag ein sogenannter “misnomer” durchgesetzt hat und die Literatur zeigt, dass es durchaus passendere Namen für dieses Krankheitsbild gibt (Gomes et al., 2013). Es kommt häufig zu Verwechslungen, da vermeintlich angenommen werden könnte, pyogene Granulome würden Eiter aufweisen. Dies ist primär jedoch aufgrund der nichtinfektiösen Genese nicht der Fall.

Später wurde von Angelopoulos 1971 der Begriff „hämangiomatoses Granulom“ geprägt, der die Zugehörigkeit der pyogenen Granulome zu den Hämangiomen beschreibt (Angelopoulos, 1971). Cawson et al. beschrieben das pyogene Granulom aufgrund der Präsenz vieler Gefäße und des histopathologischen Bildes einer Entzündung als „Granuloma teleangiectaticum“. Darüber hinaus unterteilten sie es in das „lobuläre kapilläre Hämangiom“ (LCH) und das „nicht lobuläre kapilläre Hämangiom“ (Non-LCH) (Lucas & Cawson, 1998).

Histologisch zeigt sich ein lobuliertes Hämangiom mit fibromyxoider Matrix und großen Gefäßen sowie vielen kleinen Kapillaren. Weiterhin finden sich ein stromales Ödem, mitotische Aktivität in Endothelzellen und Fibroblasten sowie inflammatorische Veränderungen im Sinne einer hyperplastischen granulären Reaktion (Ferry, 1989; Rohrbach & Lieb, 1998). Häufig ist das pyogene Granulom der Konjunktiva ganz oder teilweise mit konjunktivalem Epithel überzogen.

Die bislang am häufigsten angewandte Therapie von pyogenen Granulomen ist die chirurgische Exzision, nach der es nur selten (ca. 0-3,7%) zu Rezidiven kommt (Giblin et al., 2007). Daneben stehen alternative Verfahren wie die Kürettage und Kryo- oder Lasertherapie zur Verfügung (Gilmore et al., 2010).

1.2 Klinik und Therapie von pyogenen Granulomen der Konjunktiva

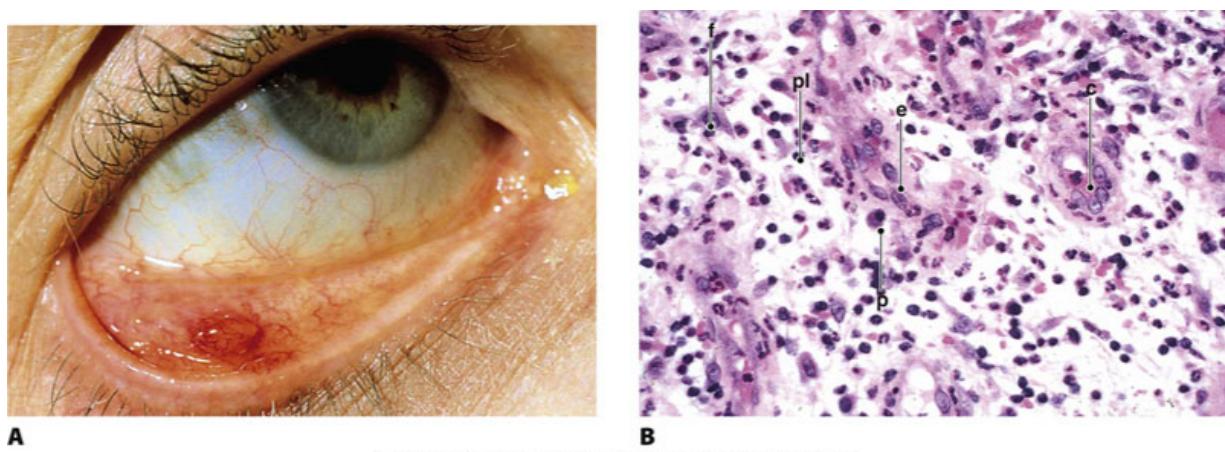


Abb. 1: A: Pyogenes Granulom der Bindehaut und B: Der korrespondierende histologische Schnitt zeigt vaskularisiertes Gewebe (Granulationsgewebe) mit Entzündungszellen (polymorphe Leukozyten pl), Fibroblasten (f) und Endothelzellen (e) von wachsenden Kapillaren (c), (Plasmazelle, p)

Klinisch imponiert das pyogene Granulom der Konjunktiva als kleiner, rötlich-hyperämischer Tumor mit glatter Oberfläche, der häufig im Fornix oder in der tarsalen Konjunktiva liegt

(Naumann, 1997). Die Patienten berichten, dass ihnen innerhalb weniger Wochen eine kleine, rote, nicht schmerzhafte „Geschwulst im Auge“ aufgefallen sei.

Die gängige Therapie ist dann die chirurgische Exzision in Lokalanästhesie. Das pyogene Granulom sollte möglichst vollständig entfernt werden, da es ansonsten mit höherer Wahrscheinlichkeit zu Rezidiven kommt (Ferry, 1989). Das gesamte exzidierte Material wird daraufhin in der Regel histopathologisch untersucht, um differentialdiagnostisch insbesondere maligne Prozesse wie Bindegewebekarzinome oder Plattenepithelkarzinome der tarsalen Haut auszuschließen (Naumann, 1997). Nicht selten ist die Diagnose eines pyogenen Granuloms schwierig von einem Chalazion abzugrenzen.

Der histopathologische Befund eines okulären pyogenen Granuloms gleicht dem eines typischen pyogenen Granuloms der Mundschleimhaut. Unter dem Mikroskop stellt sich ein lobuliertes Hämangiom dar, das hauptsächlich aus Gefäßen und fibromyxoider Matrix besteht. Zentral zweigt sich das gestielte Hämangiom in mehrere größere Gefäße auf, die eine dicke Muskelschicht aufweisen und von kleinen Kapillaren umgeben sind. Vor allem in älteren Läsionen finden sich entzündliche Infiltrationen mit Lymphozyten, Plasmazellen und Neutrophilen (Ferry, 1989). Das oberflächliche Epithel ist dünn und fehlt häufig fokal an ulzerierten Stellen (Rohrbach & Lieb, 1998).

1.3 Chalazien



© 2005 Elsevier Ltd. Spalton et al: Atlas of Clinical Ophthalmology 3e

Abb. 2: Chalazion am ektropionierten Oberlid (links) und am Unterlid (rechts)

Entzündliche Reaktionen am Lid, die von Zeis Drüsen (Hordeolum externum) oder Meibom'schen Drüsen (Hordeolum internum) ausgehen, werden als "Hordeolum" oder auch „Gerstenkorn“ bezeichnet, wenn es sich um eine akute Infektion handelt. Die chronische, nicht infektiöse Form wird "Chalazion" bzw. Hagelkorn genannt. Die Meibomschen Drüsen

(Glandulae tarsales) sind holokrine Talgdrüsen, die nicht wie die kutanen Talg- und Schweißdrüsen mit den Haarwurzeln vergesellschaftet sind. Die Azini der Meibomschen Drüsen liegen nahe der Lidhinterseite in einer bindegewebigen Platte (dem Tarsus des Lids) und besitzen Ausführungsgänge, die von einem mehrschichtigen isoprismatischen Epithel ausgekleidet sind und an der hinteren Lidkante münden. In ihnen auftretende Retentionszysten und Entzündungen, z.B. durch Sekretstau, führen zu den Hagelkörnern (Chalazia) (Yanoff et al., 2009).

Chalazien treten in jedem Lebensalter zu gleichen Anteilen bei beiden Geschlechtern auf (Yanoff et al., 2009).

Chalazien werden auch „Lipogranulome des Lids“ genannt, da sie histologisch das Bild einer lipogranulomatösen Entzündung zeigen. Sie bestehen aus viel lockerem Bindegewebe mit einem hohen Fettgewebsanteil. Typisch ist auch das extrazytoplasmatische Lipid, welches durch beschädigte Talgdrüsen in das Gewebe gelangt. Chalazien haben auch einen granulomatösen Charakter, der sich in der konzentrischen Anordnung von Epitheloidzellen zeigt. Dominante Zelltypen sind polymorphe Leukozyten, Plasmazellen, andere Lymphozyten und insbesondere mehrkernige Riesenzellen. Letztere weisen selten intrazytoplasmatische Kalzifikationen auf, sogenannte „Schauman bodies“ (Rohrbach & Lieb, 1998).

Inwieweit Chalazien das Entstehen von pyogenen Granulomen begünstigen ist noch ungeklärt. Insbesondere, wenn Chalazien durch die tarsale Bindegewebsrupturieren, kann sich daraus ein pyogenes Granulom entwickeln (Yanoff et al., 2009).

Als Differentialdiagnosen kommen daher insbesondere das pyogene Granulom, das Hordeolum, eine chronische Blepharitis oder ein Talgdrüsenkarzinom in Betracht (Kanski & Bowling, 2012). Das klassische Chalazion lässt sich in den meisten Fällen erfolgreich konservativ durch die regelmäßige Anwendung trockener Wärme und hygienischer Maßnahmen über mehrere Wochen behandeln. Bei akuter Infektion des Chalazions, also einem Hordeolum, kommen topische Antibiotika zum Einsatz (Arbabi et al., 2010).

1.4 Anti-VEGF-Therapie in der Augenheilkunde

Die Proteinfamilie der Vascular Endothelial Growth Factors besteht aus VEGF A, B, C, D, E, F und Placental Growth Factor (PIGF). Im Folgenden wird sich bei “VEGF” nur auf VEGF-A

bezogen, welches die größte Rolle in der Angiogenese spielt und am häufigsten im menschlichen Gewebe nachweisbar ist (Klettner & Roider, 2009). Beispielsweise ist für das Überleben des Embryos die korrekte VEGF-Expression unverzichtbar (Carmeliet et al., 1996). Beim Erwachsenen ist VEGF auch an der pathologischen Angiogenese beteiligt, systemisch insbesondere bei Krebserkrankungen und okulär bei choroidalen Neovaskularisationen unterschiedlicher Ursache.

VEGF entfaltet seine Wirkung, indem es an einen Rezeptor bindet. Es sind zwei verschiedene Rezeptor-Tyrosin-Kinasen bekannt, VEGF-Rezeptor-1 (VEGFR-1) und VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2), von denen der letztere als Angiogenese-Auslöser bekannt ist, während VEGFR-1 sowohl zur Chemotaxis als auch zur Inhibition der Angiogenese beiträgt (Claesson-Welsh, 2016). Daneben konnten noch zwei Korezeptoren nachgewiesen werden, Neuropilin-1 und Neuropilin-2, die die Bindung von VEGF an den Rezeptor erleichtern und die Signaltransduktion verstärken (Lampropoulou & Ruhrberg, 2014). Bei Bindung von VEGF an VEGFR2 kommt es zur Autophosphorylierung der Kinasen und somit zur Aktivierung der Signaltransduktionskaskade, die schließlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, zur Gentranskription, Proliferation und Migration von Endothelzellen führt (Ylä-Herttuala et al., 2007).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Angiogenese zu hemmen. Alle in der Augenheilkunde bislang therapeutisch eingesetzten Medikamente (Antikörper) binden direkt an VEGF und verhindern so eine Rezeptoraktivierung. Hierzu gehören vier intravitreal verabreichbare VEGF-Hemmer, die sich in ihrer Struktur und therapeutischen Eigenschaften unterscheiden: Pegabtanib (Macugen®), Ranibizumab (Lucentis®), Bevacizumab (Avastin®) und Aflibercept (Eylea®) (Kellner & Kellner, 2013). Alle Substanzen müssen zur Behandlung beispielsweise der neovaskulären altersbedingten Makuladegeneration im Abstand von 4-6 Wochen mindestens dreimal verabreicht werden und können choroidale Neovaskularisationen hemmen und zur Verkleinerung eines Makulaödems beitragen. Allerdings vermag keine der Substanzen die zugrundliegende Erkrankung wie z.B. die altersabhängige Makuladegeneration oder diabetische Retinopathie zu heilen (Klettner & Roider, 2009).

Grundsätzlich können Anti-VEGF-Präparate aus dem Glaskörper in den Blutkreislauf übertreten und systemische Wirkungen auslösen, dazu gehören arterielle thrombembolische Ereignisse (Schlaganfall, Herzinfarkt). Eine Zunahme der Schlaganfallhäufigkeit nach

Einführung der Anti-VEGF-Therapie konnte in einer Bevölkerungsstudie in Ontario nicht nachgewiesen werden (Campbell et al., 2012).

Die intrazelluläre Inhibition von VEGF ist Gegenstand der Forschung. Hierfür wird doppelsträngige RNA mit einer bestimmten Zielsequenz in die Zelle eingeführt, die die Information enthält, VEGF bzw. VEGFR1 abzubauen (Klettner & Roider, 2009).

Eine weitere interessante Option stellen die Tyrosin-Kinase-Inhibitoren dar, die die Rezeptorphosphorylierung verhindern und somit auch die VEGF-Signaltransduktion unterbinden. Es handelt sich hierbei um kleine chemische Moleküle, deren Vorteil darin besteht, dass sie auch nach externer Anwendung ins Augeninnere diffundieren können (Klettner & Roider, 2012). Zu dieser Gruppe gehören auch beispielsweise die Pazopanib-Augentropfen. In einer Studie von Amparo et al. konnte gezeigt werden, dass Pazopanib korneale Neovaskularisationen um 22% reduziert (Amparo et al., 2013). Andere, in klinischen Studien bereits erfolgreich angewendete, topische VEGF-Inhibitoren zur Reduzierung von kornealen Neovaskularisationen sind Bevacizumab und Ranibizumab (Dastjerdi et al., 2009; Stevenson et al., 2012). Während Bevacizumab als vollständiger humanisierter monoklonaler Antikörper und einem Molekulargewicht von 149kDa am größten ist und Ranibizumab als Antikörperfragment ca. ein Drittel der Größe aufweist, beschränkt sich das Molekulargewicht von Pazopanib auf 0,437kDa (Stevenson et al., 2012). Pazopanib hat eine höhere Permeabilität und hemmt neben VEGF auch platelet-derived growth factor-B (PDGF-B) (Jo et al., 2006), sodass die Applikation von Pazopanib Augentropfen bei Erkrankungen der Netzhaut die Thematik aktueller Studien darstellt (Thakur et al., 2011).

Der histologische Aufbau von pyogenen Granulomen legt nahe, dass die Angiogenese eine maßgebliche Rolle im Entstehungsmechanismus spielen muss. Man geht davon aus, dass Tumorwachstum unter anderem durch das „Anschalten“ von Angiogenese förderlichen Faktoren und „Abschalten“ von inhibitorischen Angiogenesefaktoren zu Stande kommt.

VEGF triggert die Endothelzellproliferation, Chemotaxis und die Permeabilität der Gefäße und trägt somit maßgeblich zur Angiogenese bei (Ferrara, 2009). In einer Studie von Yuan et al. (2000) konnte eine deutlich höhere Expression von VEGF in pyogenen Granulomen der Mundschleimhaut im Vergleich zur Peridontitis oder zu gesundem Gewebe nachgewiesen werden (Freitas et al., 2005; Yuan et al., 2000).

1.5 Ziel der Arbeit

Vor diesem Hintergrund war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Rolle des VEGF in der Pathogenese pyogener Granulome zu untersuchen. Hierzu wurden folgende Größen bestimmt und zwischen pyogenen Granulomen der Konjunktiva (PG), Kontrollgewebe (regelrechte Haut/ Bindegewebe vom Lid) (KO), und Chalazien (CH) verglichen: die Gefäßanzahl, das mittlere Gefäßkaliber, das kumulative VEGF-Signal und die Anzahl VEGF-positiver Gefäße.

Für sich daraus ergebende alternative Therapieoptionen wie z.B. eine Anti-VEGF Augentropfentherapie soll im Rahmen dieser Studie rechtfertigende Evidenz für eine klinische Studie gesammelt werden und in Hinblick auf die publizierte Literatur diskutiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Probengewinnung

Bei dem Untersuchungsmaterial handelte es sich um histologisch aufgearbeitetes Material der Bindegewebe sowie gesunder Haut, überwiegend aus der Periorbitärregion. 13 pyogene Granulome, alle Chalazien sowie 4 Kontrollpräparate stammten aus dem histologischen Archiv des ophthalmologischen Labors der Universitätsklinik Kiel. Weiteres Material dieser multizentrisch angelegten Studie wurde uns aus verschiedenen ophthalmologischen Laboren anderer Universitäten zugesandt: 9 Kontrollen wurden uns von der Universität Freiburg zur Verfügung gestellt. Die Universität Tübingen stellte 6 pyogene Granulome und die Universität Bonn 3 pyogene Granulome. Als Kontrollgruppe wurde „nicht pathologisches“ Lidgewebe verwendet, wie es etwa im Rahmen von stellungskorrigierenden Lidplastiken anfällt.

2.2 Histologische Aufarbeitung

Die histologische Präparation wurde im histopathologischen Labor in der Klinik für Ophthalmologie am UKSH Campus Kiel durchgeführt.

2.2.1 Fixation

Die im Operationssaal exzidierten pyogenen Granulome, Chalazien und Kontrollen wurden 12 Stunden in 4% Formalin fixiert. Daraufhin wurde das Formalin mit Leitungswasser ausgewaschen. Im Einbettautomaten (*Tissue Tek*) wurde das Präparat mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (3x 45min). Es folgte eine Einbettung in 100% Xylol (3x 45min) und dann in Paraffin (4x 30 Minuten), worauf das Präparat schließlich in einen Paraffinblock gegossen werden konnte.

2.2.2 Schnitttechnik

Aus dem Paraffinblock wurden mit dem Mikrotom Schnitte mit einer Dicke von ca. 2-3 Mikrometer erstellt. Die Schnitte wurden mit einem beschichteten Objektträger aus dem kalten Wasserbad aufgefangen und dann zur Dehnung in ein heißes Wasserbad bei 53°C getaucht. Darauf folgte eine Trocknungsphase für ca. 2 Stunden bei 40°C.

2.3 Färbung

2.3.1 HE-Färbung

Zur Orientierung im fluoreszenzgefärbten immunmarkierten Präparat wurde zu jedem Schnitt auch eine Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE) begutachtet. In HE-Schnitten wurden keine semiquantitativen Auswertungen vorgenommen.

Um die Schnitte für die Färbung vorzubereiten wurden sie 3x5 Minuten mit Xylol entparaffiniert und durch eine aufsteigende Alkoholreihe wieder bewässert. Zunächst erfolgte die Färbung mit Hämalaun Lösung für 5-10 Minuten. Dann wurden die Zellkerne durch das alkalisierende Leitungswasser für 5-10 Minuten geblättert und das Präparat kurz in destilliertes Wasser getaut. Nun wurde mit Eosin (Eosin-Pulver in 70% Alkohol) für 3 Minuten gefärbt. Daraufhin wurde das Präparat noch kurz in Alkohol geschwenkt und in Xylol getaut. Als Schutz setzte man auf das Gewebe ein Deckglas mit etwas Eindeckmedium. Abschließend wurden die Präparate für 12 Stunden getrocknet.

2.3.2 vWF-Färbung

In der Literatur werden zum Anfärben von Blutgefäßen häufig der Blutgefäßmarker CD31 und von Willebrand Faktor (vWF) verwendet (Gleich et al., 1997; Sion-Vardy et al., 2001; Souza, 2001; Takahashi et al., 1994; Coomber et al., 1998). Initial wurden für die vorliegende Arbeit Probefärbungen mit beiden Gefäßmarkern vorgenommen. Wir entschieden uns alle weiteren Analysen mit der vWF-Färbung durchzuführen, da wir hier ein qualitativ besseres Ergebnis erzielten.

Die vWF-Färbung wurde durch das Labor für Immunhistochemie des Instituts für Pathologie am UKSH Campus Kiel durchgeführt.

Die Färbung erfolgte durch den Färbeautomaten BOND MAX unter Verwendung des *BOND POLYMER Refine Detection KITS* der Firma *Leica* entsprechend den Herstellerangaben. Um störende Enzyme zu denaturieren und eine optimale Färbung zu erzielen wurde das *BOND Enzyme Pretreatment Kit* angewendet und die Präparate durch eine Citrat Puffer Lösung auf einen pH von 6 eingestellt. Der monoklonale Maus Anti-Human vWF-AK (*M 0616, Dako®*) wurde 1/50 verdünnt und reagiert mit vWF in Endothelzellen. Als Gegenfärbung wurde Hämatoxylin verwendet.

2.3.3. VEGF-Färbung

Die fluoreszierende VEGF-Färbung wurde im Labor der Universitäts-Augenklinik Kiel manuell durchgeführt. Die Herstellung erforderte ca. zwei Tage.

Der Paraffinschnitt wurde zunächst wie oben beschrieben entparaffiniert und in eine Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) getaucht. Dann wurde mit Citratpuffer bei einem pH-Wert von 6 im Dampfdrucktopf für 2,4 Minuten demaskiert und langsam mit Leitungswasser für 30 Minuten bewässert. Daraufhin wurde wieder 3x mit PBS gepuffert. Als letzten vorbereitenden Schritt, vor der Erst-Antikörper (AK) Applikation, wurde der Schnitt noch für 30 Minuten in 1%- boviner Serumalbumin-Lösung gebadet.

Über Nacht wurden die Schnitte bei 4°C in einer feuchten Kammer in 1:50 verdünnter Erst-AK (*DLN-09082 Dianova©, Hamburg*)-Lösung aufbewahrt. Zur AK-Verdünnung verwendeten wir *Dako Antibody Diluent® (S3022, Dako©)*. Zu jedem Durchlauf gehörte eine gefäßreiche Positivkontrolle, in unserem Fall Plazentagewebe, die mit den zu analysierenden Schnitten gefärbt wurde, und eine Negativkontrolle, die nur mit *Dako Antibody Diluent®* behandelt wurde. Für letztere verwendeten wir jeweils einen anderen Schnitt aus der Serie unseres Untersuchungsmaterials.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte 3x für 10 Minuten in PBS gewaschen, um dann folgende Schritte im Dunkeln ausführen zu können: Mit Ausnahme der Negativkontrolle wurden alle Schnitte eine Stunde in eine Lösung aus fluoreszierendem Zweit-AK *Alexa Fluor 555 Esel Anti Maus (A31570, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland)* und in PBS getaucht. Daraufhin wurde wieder 3x 10 Minuten in PBS gewaschen.

Als letzter Schritt erfolgte die Zellkernfärbung mit *Dapi-AK-Eindeckmedium (20.1)* der Firma *Roth© Karlsruhe, Deutschland*.

2.4 Bildaufnahmetechnik

2.4.1 Lichtmikroskopie

In dieser Studie wurde zur histologischen Auswertung der verschiedenen Versuche ein Lichtmikroskop vom Typ *Axioskop* (Modellnr. 451485) und ein Kameraaufsatz *AxioCam MRc5* (Modellnr. 0450-354) - beide von der Firma *Zeiss Microscopy*©, Göttingen, verwendet.

Alle Schnitte wurden klinisch durch einen erfahrenen Ophthalmopathologen befundet.

2.4.2 Fluoreszenzmikroskopie

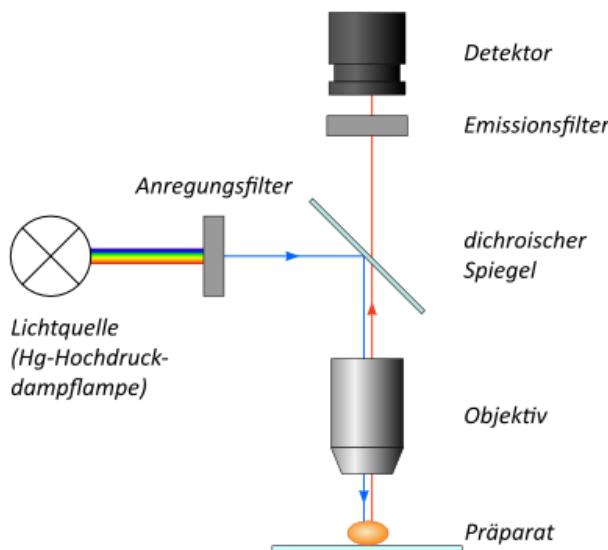


Abb. 3: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops

<https://lp.uni-goettingen.de/get/text/6741>

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine Variante der Lichtmikroskopie, die auf dem Prinzip der Fluoreszenz beruht. Die auf den Präparaten absorbierten Sekundärantikörper *Alexa fluor 555* (*Invitrogen*™) für VEGF und *DAPI* (*Roth*©) für die Zellkerne fluoreszieren unter bestimmter UV-Anregung. Das bedeutet, sie emittieren durch die Anregung eine andere als die anregende Wellenlänge und werden in Form eines leuchtenden Signals für den Beobachter sichtbar (Abb.3).

Der Emissionsfilter (Analysefilter) blockiert Reflexionen und Streulicht des Anregungslichtes und lässt die Wellenlängen des Fluoreszensignals passieren. Die maximale Anregungsempfindlichkeit für Alexa fluor 555 liegt bei 555nm und das Emissionsmaximum bei 567nm; der Farbstoff wurde bei 550 nm angeregt und bei 605nm gemessen (Abb. 4). *DAPI* hat eine max. Anregungsempfindlichkeit bei 359nm und eine max. Emission bei 461 nm; der Farbstoff wurde bei 470nm angeregt und bei 525nm gemessen (Abb. 5). Gleichzeitig wurde immer mit einem Durchlicht/Polarisationsfilter fotografiert, durch den die Gewebestruktur im Präparat sichtbar wurde. Vor Anfertigung von Fotos einer Färbereihe wurde anhand der Positiv- und Negativkontrollen für die gesamte Färbereihe die Beleuchtungsintensität und Belichtungszeit festgelegt, unter denen gerade keine Fluoreszenz

in der Negativkontrolle mehr meßbar war, es in der Positivkontrolle aber bereits zu diagnostisch eindeutigen Signalen kam. Diese Parameter wurden für jedes Foto dieser Färbereihe konstant verwendet. Das verwendete Mikroskop ist ein *Axio Imager Z1* der Firma Zeiss®. Bei dem Kameraaufsatz handelte es sich um eine *AxioCam MRm* (424930) von Zeiss®.

Übersicht über die bei der Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Filter der Firma Zeiss®:

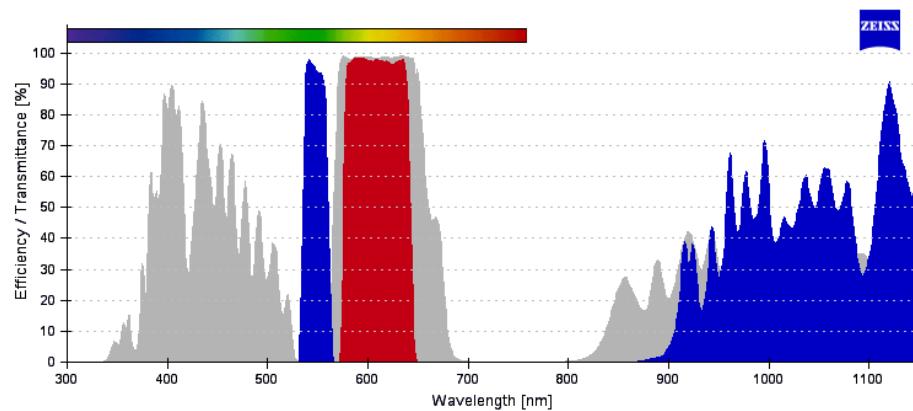


Abb. 4: Filter 43 HE (in dieser Arbeit verwendeter Anregungsfilter blau, Analysefilter rot, Strahlteiler grau, verwendet mit AlexaFluor 555)

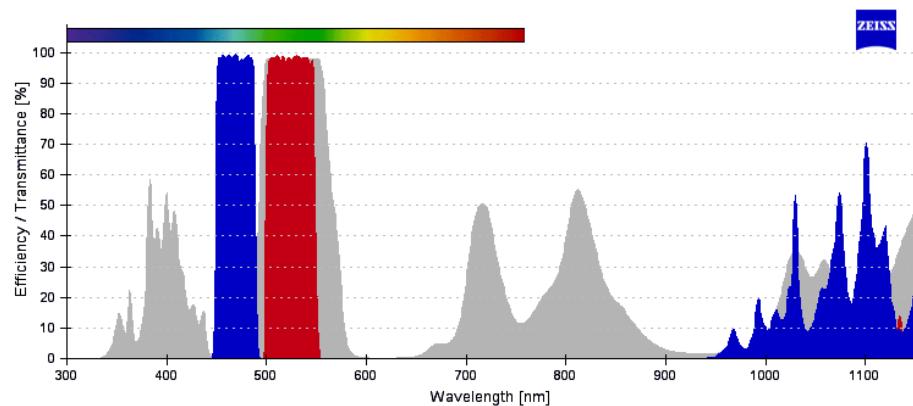


Abb. 5: Filter 38 HE (Anregungsfilter für den Zellkern-AK blau, Analysefilter rot, Strahlteiler grau, verwendet mit DAPI Antikörper)

Anregungs- und Emmissionsspektren des für die VEGF-Färbung verwendeten Antikörpers Alexa Fluor 555 nach Angaben der Firma *Invitrogen*™

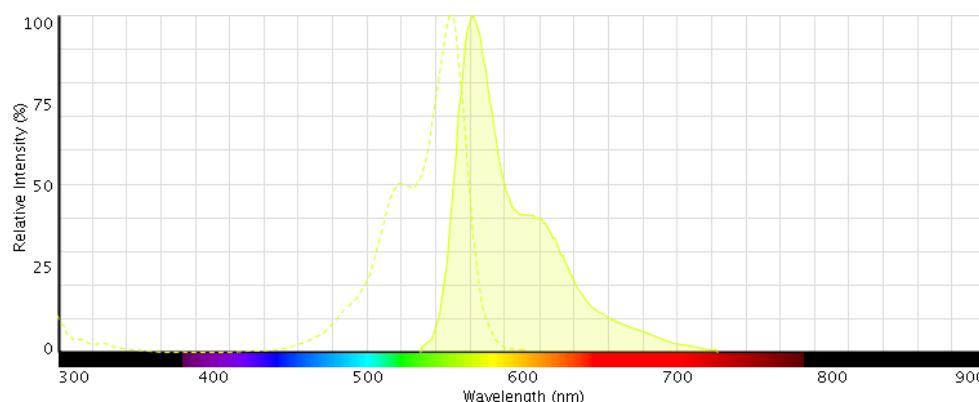


Abb. 6: Alexa Fluor 555, Anregungsmaximum: 555nm, Emissionsmaximum: 567nm

2.5 Bildanalyse

2.5.1 Definitionen der analysierten Stellen

In dieser Studie wurden 22 pyogene Granulome, 22 Chalazien und 13 Kontrollen an jeweils drei gewebstypischen Stellen sowohl lichtmikroskopisch als auch mit dem Fluoreszenzmikroskop auf die oben genannten Größen analysiert. Darüber hinaus wurden alle Parameter in pyogenen Granulomen und Kontrollen zusätzlich auch subepithelial erhoben und in den CH jeweils in einem Bereich, der bindegewebsreicher und somit dem Kapselbereich zugehörig erschien.

Dabei dienten die HE-gefärbten Schnitte als Übersicht über das jeweilige Präparat und erleichterten das Wiederfinden der zu untersuchenden Stellen in den vWF und VEGF-Färbungen.

Als **gewebstypisch** wurde für die pyogenen Granulome der Bereich im Präparat definiert, in dem sich das gestielte pyogene Granulom in weitere Gefäße aufzweigt, also einen stark vaskularisierten Bereich mit vielen Entzündungszellen und ödematischem Stroma (Font et al., 2006).

Der gewebstypische Bereich in den Chalazien wies die Merkmale einer chronisch granulomatösen Entzündung auf: viele Entzündungszellen wie Monozyten, Makrophagen,

Langhanszellen und auch die typischen Epitheloidzellen. Außerdem zeigt das Chalazion typische Areale mit lockerem Bindegewebe mit einigen Fettvakuolen (Rohrbach & Lieb, 1998, S. 66). Als Pendant zu subepithelialen Stellen der anderen Gruppen wurde der Bereich definiert, der bindegewebsreicher und somit dem Kapselbereich zugehörig erschien.

In der Kontrollgruppe wurde der zu analysierende Bereich auf die papilläre Dermis begrenzt. In der papillären Dermis liegen die postkapillären Venolen, durch die Abwehrzellen in das Interstitium emigrieren können (Lüllmann-Rauch & Paulsen, 2012, S. 527) (Abb. 7).

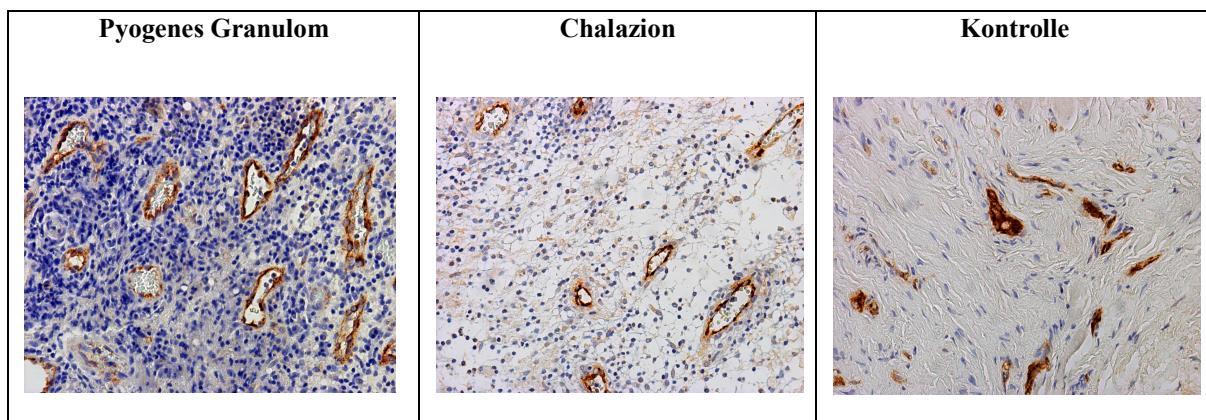


Abb. 7: Exemplarischer Direktvergleich gewebstypischer Bereiche eines pyogenen Granuloms, eines Chalazions und einer gesunden Hautprobe (Kontrolle), x200, vWF

Die **spezielle Stelle** in den pyogenen Granulomen und Kontrollpräparaten bezieht sich auf den subepithelialen Bereich. Es sollte untersucht werden, ob Angioneogenese respektive Wachstum eher an der Oberfläche oder eher in der Tiefe auftritt. In Chalazien wurde der Bereich ausgewählt, der besonders konzentriert und durch organisierte Bindegewebsstränge auffiel, und sich von dem übrigen lockeren granulomatösen Gewebe unterschied (Abb. 8).

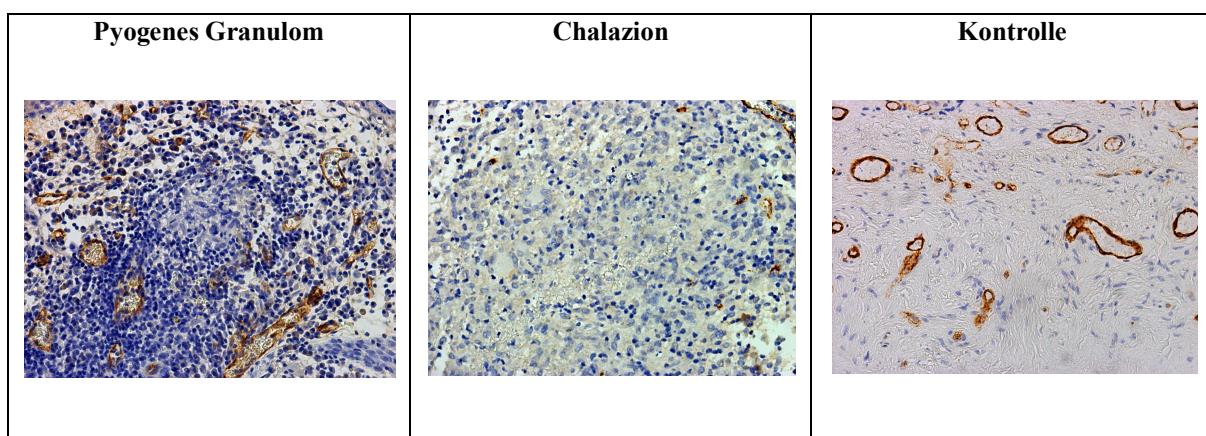


Abb. 8: Exemplarischer Direktvergleich der speziellen Stellen eines pyogenen Granuloms, Chalazions und einer gesunden Hautprobe (Kontrollen), x200, vWF

Grundsätzlich wurden in jeder Gruppe mindestens 3 gewebstypische Bereiche fotografiert (200x Vergrößerung, in pyogenen Granulomen auch in der 100x Vergrößerung für vWF-Färbungen) und eine spezielle Stelle ebenfalls in der 200x Vergrößerung (Tab. 1 und Tabellenanhang).

In der Chalaziengruppe und der Gruppe der pyogenen Granulome wurden Bildaufnahmen in 100x Vergrößerung in den vWF gefärbten Präparaten mit dem Bildmaterial der 200x Vergrößerung verglichen. Dieser Vergleich ergab, dass sich in Relation zur Bildfläche signifikant weniger Gefäße mit dem 10x Objektiv als mit dem 20x Objektiv differenzieren ließen, im Absolutvergleich aber kein Unterschied der Gefäßanzahl je Fotoausschnitt auftraten. Die prozentuale Gefäßfläche verhielt sich bei beiden Vergrößerungen exakt gleich. Der Unterschied bezüglich der Gefäßanzahl erklärt sich unter anderem dadurch, dass sowohl der Untersucher als auch das Messprogramm aufgrund der geringeren Vergrößerung kleinere Gefäße in der 100x Vergrößerung offensichtlich schlechter differenzieren. Aus diesem Grund wurden die anschließenden Messungen ausschließlich mit der 200x Vergrößerung durchgeführt und die Bildaufnahmen mit dem 10x- Objektiv aus der Gesamtwertung ausgeschlossen.

Gruppe	<i>vWF</i>		<i>VEGF</i>	
	Gewebstypisch	speziell	Gewebstypisch	speziell
PG	1x 100x, 3x 200x	1x subepithelial	3x 200x	1x subepithelial
CH	3x 200x	1x konzentrierte Stelle	3x 200x	1x konzentrierte Stelle
KO	2x 200x	1x subepithelial	3x 200x	1x subepithelial

Tab. 1: Überblick über die Anzahl der Messstellen pro Präparat je Gruppe;

„PG“: pyogene Granulome, „CH“: Chalazien, „KO“: Kontrollen

2.5.2 Axio Vision Autmess Programm

Die auf dem Computer gespeicherten Bilder wurden mit dem semiautomatischen *Axio Vision Autmess* Programm der Firma Zeiss ausgewertet. Hierbei wurden in den vWF-Färbungen die Gefäßanzahl je Bildausschnitt sowie die kumulative Querschnittsfläche aller Gefäße je Bildausschnitt in % erfasst. Aus diesen Daten konnte auch die mittlere Querschnittsfläche der

Blutgefäße im Bild sowie der mittlere Gefäßdurchmesser im Bild berechnet werden. In den Fluoreszenzfärbungen wurde die Anzahl der VEGF-positiven Gefäße sowie das kumulative VEGF-Signal als VEGF-positiv gefärbten Flächenanteil des Bildes in % gemessen. Der Bildausschnitt maß in der 200x Vergrößerung 235 μ m x 177 μ m.

Mit Hilfe des Messprogramms konnten verschiedene Parameter eines semiautomatischen Messalgorhytmus eingestellt und am Ende abgespeichert werden, sodass sich in dieser Funktion mehrere Bilder mit gleichen Segmentierungskriterien analysieren ließen (Abb. 9). Als Segmentierungsparameter wurden Farben und Partikelgrößen gewählt. Konfluierende Partikel konnten ebenfalls semiautomatisch nach dem Wasserscheidenprinzip separiert und Löcher gefüllt werden. Durch eine manuelle Nachkorrektur ließen sich die vom Messprogramm nicht erkannten Gefäße nachzeichnen (Abb. 10) bzw. fälschlicherweise als Gefäße markierte Objekte entfernen (Abb. 11). Zur Optimierung der Berechnung wurde jede Gefäß- oder VEGF-Signal-Markierung manuell kontrolliert. Das Ergebnis aller Analyseschritte war ein Bild mit farbig markierten Gefäßen und die Angabe der Gefäßanzahl sowie dem prozentualen Gefäßanteil (Abb. 12).

Exemplarische Abfolge des Meßalgorithmus zum Bestimmen der Gefäßanzahl und der Gefäßfläche je HPF beim vWF-gefärbten pyogenen Granulom:

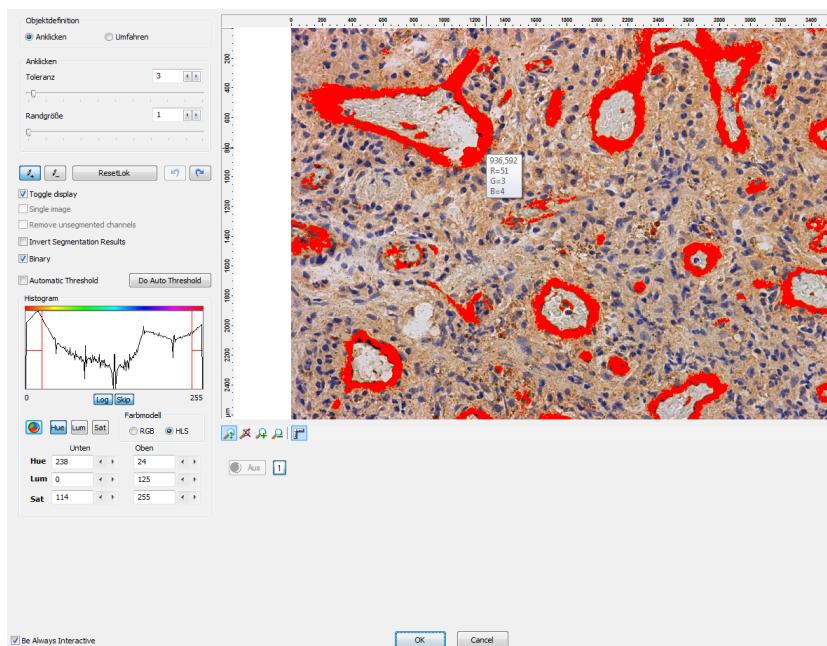


Abb. 9: Schritt 1: Der Programm assistent markierte im ausgesuchten Foto automatisch die zuvor im Messprogramm festgelegten Pixelfarben. Hier die Gefäßwände und ähnliche Farbstufen im Bild.

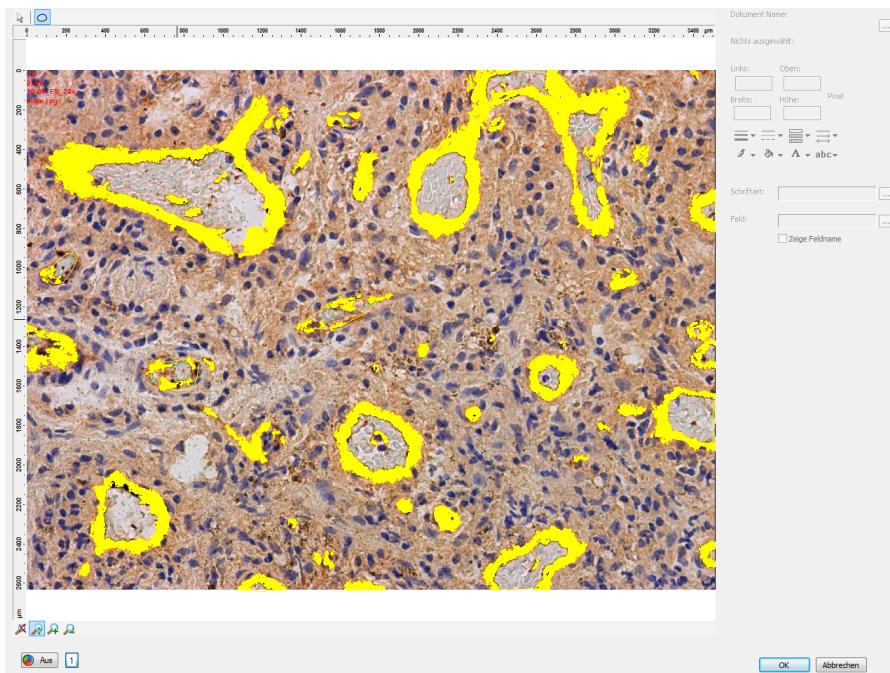


Abb. 10: Schritt 2: Durch manuelles Einzeichnen der Gefäßkonturen werden die vom Computer nicht erkannten Gefäßflächen ergänzt und Löcher gefüllt (hier das Gefäßlumen).

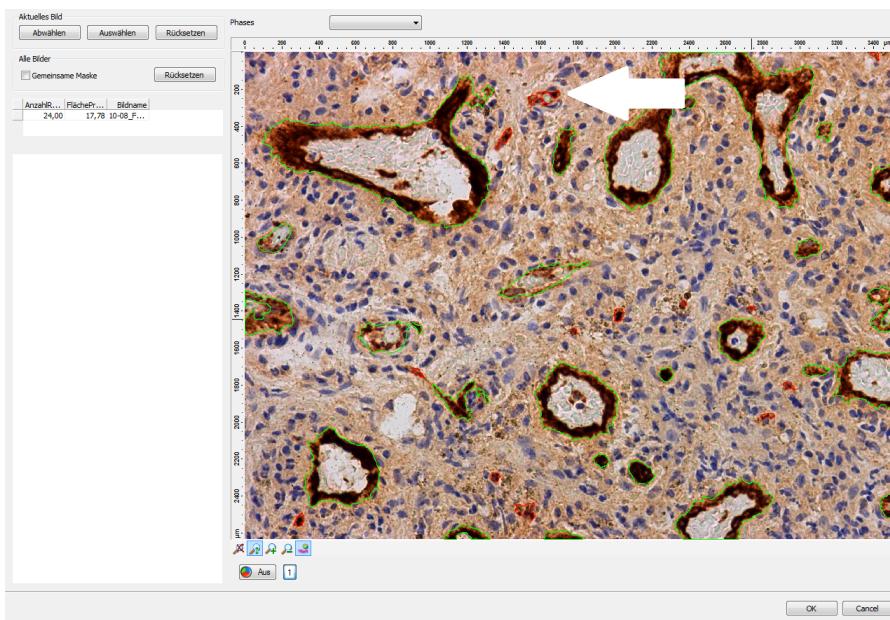


Abb. 11: Schritt 3: Manuelle Korrektur: Alle rot markierten Gefäße (weißer Pfeil) flossen nicht in die Berechnung ein. Alle grünen Markierungen sind Bestandteil der Berechnung. Durch Anklicken der Markierung konnten Objekte ab- bzw. ausgewählt werden.

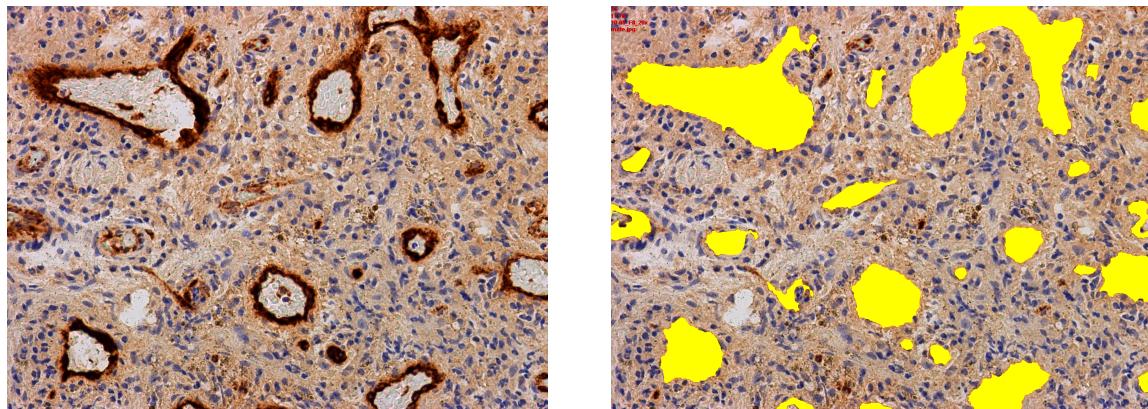


Abb. 12: Schritt 4: Das fertig analysierte Bild zeigt die Anzahl der markierten Gefäße (gelb, hier 24) und den entsprechenden Gefäßanteil in % der Bildfläche (hier: 17,78 %)

2.6 Statistische Auswertung

Der Vergleich der 3 Gruppen pyogene Granulome, Chalazien und der Kontrollgruppe wurde nicht-parametrisch mit dem Kruskal-Wallis-Test für die diskreten und stetigen Variablen Gefäßanzahl, Gefäßfläche insgesamt, mittlere Fläche je Gefäß, Anzahl VEGF-positiver Gefäße, VEGF-positiver Flächenanteil, berechnet. Für jede Analyse wurden als post-hoc Test paarweise Vergleiche angestellt. p-Werte unter 0,05 wurden als signifikant gewertet. Für die Binnenanalysen zweier Variablen (10x versus 20x, Tiefe versus spezielle Stelle) wurde nach dem Wilcoxon Rangsummentest nicht parametrisch verglichen. Bei multiplen Testungen wurden die p-Werte mittels der Bonferroni-Methode adjustiert. Die Auswertungen wurden mit der Software SPSS, Version 20, durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Beobachtungen und qualitative Beschreibung

Es ergaben sich augenfällige Unterschiede zwischen den 3 Gruppen, welche im Folgenden qualitativ beschrieben werden:

In den vWF-Färbungen wiesen die pyogenen Granulome größere Gefäße auf als Chalazien. In den Chalazien ließen sich weniger und kleinere Gefäße als in den pyogenen Granulomen erkennen. In der Kontrollgruppe sah man in den vWF-Färbungen einige mittelgroße Gefäße zwischen den Haarfollikeln und Drüsen, die meist etwas größer als die Gefäße in den Chalazien und etwas kleiner als in den pyogenen Granulomen waren. Die Gefäßanzahl war geringfügig kleiner als in den Chalazien.

Bei der Auswertung der VEGF-Färbungen zeigten sich ähnliche Beobachtungen wie in den vWF-Färbungen. In der Gruppe der pyogenen Granulome waren meist größere, gut abgrenzbare, reife Gefäße zu erkennen, die in den meisten Fällen auch VEGF-positiv waren. Das heißt, es waren VEGF-gefärbtes Endothel und intraluminal VEGF positive Zellen zu sehen. Daneben war in nahezu jedem Schnitt auch extravasales VEGF-Signal extrazellulär und in Einzelzellen zu sehen. Auffällig war ebenfalls, dass die subepithelialen Bereiche der pyogenen Granulome eine vielfach höhere Anzahl an kleineren VEGF-gefärbten Gefäßen aufwiesen. Subepithelial war auch mehr VEGF-Signal extravasal zu sehen. Da wir fluoreszenzgefärbte Immunschnitte verwendeten und zur histologischen Orientierung nur ein Phasenkontrastbild nutzen konnten, war nicht immer eindeutig erkennbar, ob es sich hierbei um VEGF-gefärbte Gefäßsprossen oder um Einzelzellen handelte. Deshalb haben wir uns dazu entschlossen, in den VEGF-Färbungen die gesamte VEGF-positive Fläche pro Blickfeld semiautomatisch zu messen, die Anzahl der VEGF-positiv markierten Gefäße hingegen manuell auszuzählen und nur diejenigen Signale als Gefäß zu werten, die ein eindeutiges Lumen aufwiesen.

Im Gegensatz konnte man in Chalazien kaum VEGF-markierte Gefäße erkennen. Die wenigen VEGF-positiven Gefäße waren kleiner als die Gefäße in den pyogenen Granulomen.

In den VEGF-Färbungen der Kontrollgruppe waren die Gefäße häufiger VEGF-gefärbt und mehr VEGF extravasal zu sehen als in der Chalaziengruppe. Im Vergleich zu den pyogenen Granulomen zeigte sich weniger VEGF extravasal.

Die folgenden Abbildungen (Abb. 13 und Abb. 14) zeigen exemplarisch an typischen Beispielen die nativen Präparate und im Vergleich jeweils die semiautomatische Gefäßmarkierung der drei Gruppen.

Im Tabellenanhang findet sich die vollständige Auflistung der erhobenen Daten. Im folgenden Text werden für die erhobenen Parameter für jede Gruppe die Mediane und der Interquartilbereich (IQR) angegeben.

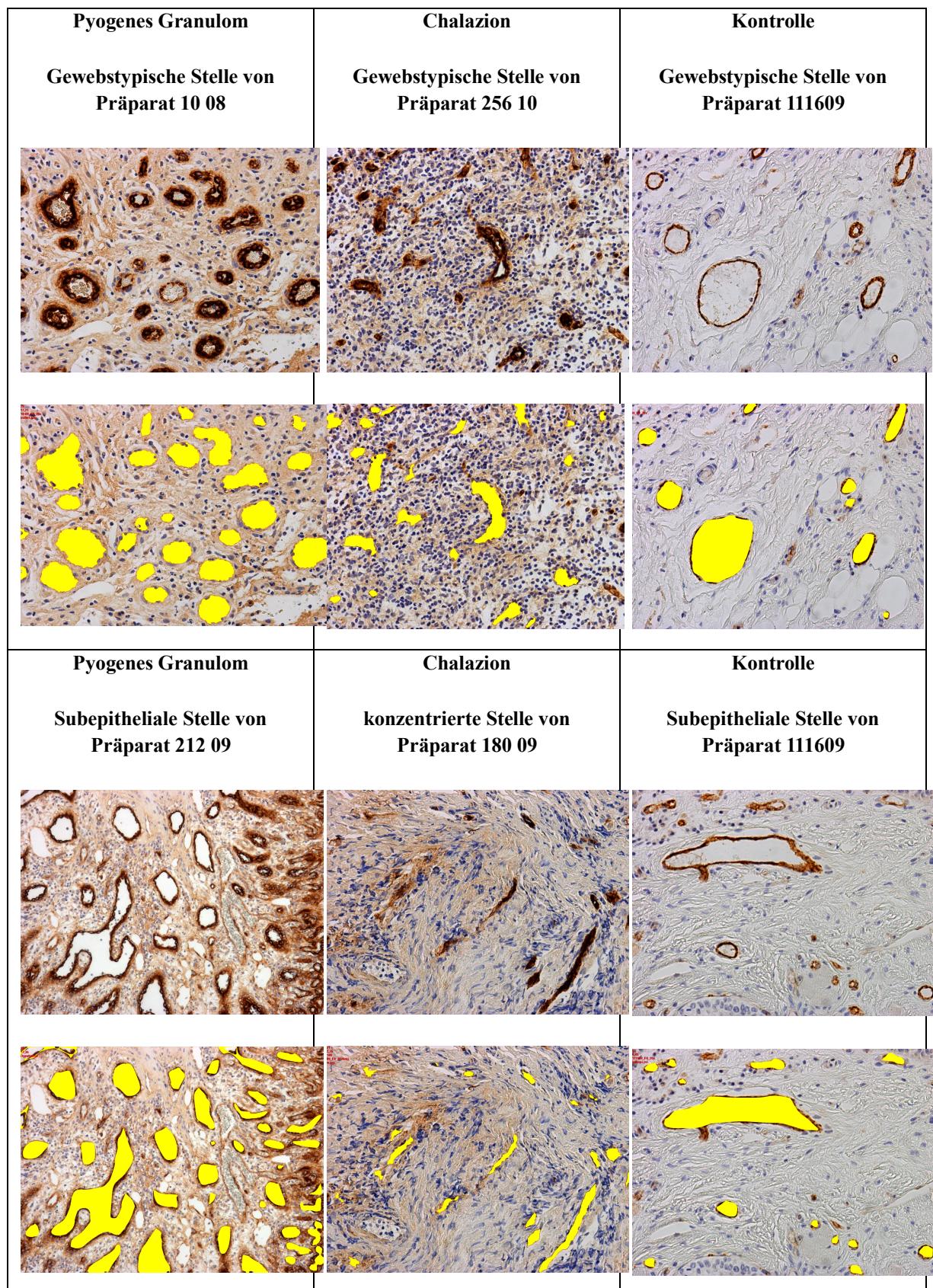


Abb. 13: Exemplarische Stellen eines pyogenen Granuloms, Chalazions und der Kontrollgruppe vor und nach semiautomatischer Markierung der Gefäße (vWF)

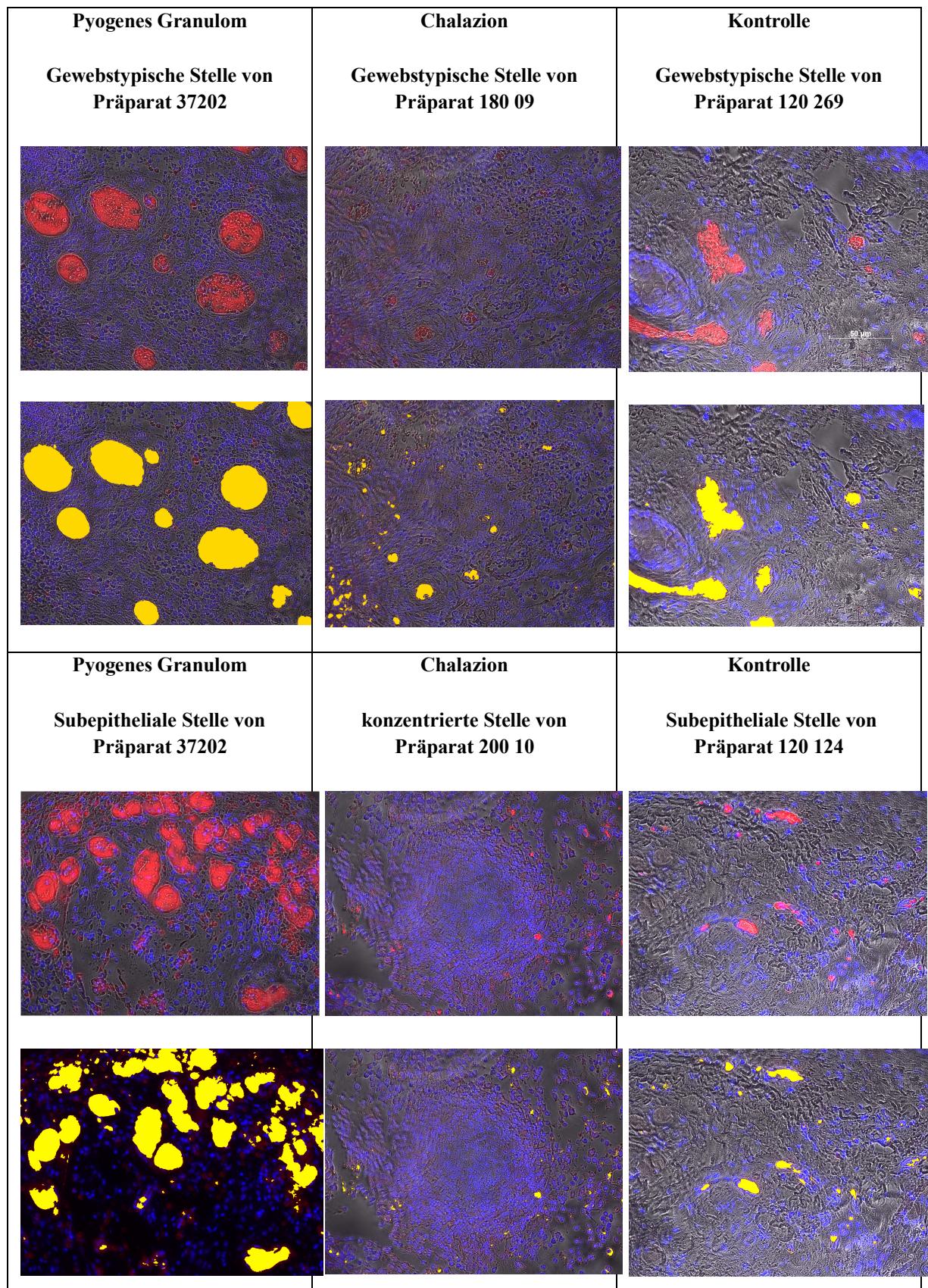


Abb. 14: Exemplarische Stellen eines Pyogenen Granuloms, Chalazions und der Kontrollgruppe vor und nach semiautomatischer Markierung des VEGF-Gesamtsignals. Zur besseren Orientierung im Präparat fotografierten wir immer mit Durchlichtfilter. Aus didaktischen Gründen wird an Präparat 37202 eine Aufnahme ohne Durchlichtfilter gezeigt.

3.1.1 Pyogene Granulome (PG)

<i>Pyogene Granulome (PG)</i>	Mediane mit Interquartilrange (IQR) von:		
	Alle Stellen	Stellen 2-4 (gewebstypisch)	Subepitheliale Stelle
Gefäßanzahl (IQR)	19,25 (12,63)	18 (14)	24 (15)
Gefäßfläche in % der Bildfläche (IQR)	12,44 (13,05)	12,16 (14,8)	8,75 (10,4)
Gefäßkaliber in % der Bildfläche (IQR)	0,70 (1,16)	0,638 (0,9)	0,44 (0,5)
Anzahl der VEGF pos. Gefäße (IQR)	1,25 (4,5)	0 (4,5)	0 (4,5)
VEGF Signal in % (IQR)	2,83 (2,4)	1,59 (2,4)	5,80 (6)

Tab. 2: Erhobene vaskuläre Parameter pyogener Granulome

„% der Bildfläche“ bezieht sich auf 100% eines Highpowerfields (235 µm x177 µm)

3.1.2 Chalazien (CH)

<i>Chalazien (CH)</i>	Mediane mit Interquartilrange (IQR) von:		
	Alle Stellen	Stellen 1-3 (gewebstypisch)	Konzentrierte Stelle
Gefäßanzahl (IQR)	13 (5,69)	14 (8)	16,5 (9)
Gefäßfläche in % der Bildfläche (IQR)	2,96 (1,61)	2,76 (1,3)	2,91 (1,9)
Gefäßkaliber in % der Bildfläche (IQR)	0,19 (0,16)	0,18(0,14)	0,17 (0,2)
Anzahl der VEGF pos. Gefäße (IQR)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
VEGF Signal in % (IQR)	0,56 (1,3)	0,62 (1,5)	0,33 (1,1)

Tab. 3: Erhobene vaskuläre Parameter von Chalazien

„% der Bildfläche“ bezieht sich auf 100% eines Highpowerfields (235 µm x177 µm)

3.1.3 Kontrollen (KO)

Kontrollen (KO)	Mediane mit Interquartilrange (IQR) von:		
	Alle Stellen	Stellen 1-2 (gewebstypisch)	Subepitheliale Stelle
Gefäßanzahl (IQR)	12 (4,75)	10,83 (6)	13 (7)
Gefäßfläche in % der Bildfläche (IQR)	4,5 (3,04)	5,03 (2,4)	7,23 (5,6)
Gefäßkaliber in % der Bildfläche (IQR)	0,48 (0,42)	0,48(0,42)	0,5 (0,6)
Anzahl der VEGF pos. Gefäße (IQR)	1,63 (2,9)	1,17 (1,4)	3 (8)
VEGF Signal in % (IQR)	1,04 (2,4)	1,06 (2,9)	0,65 (1,21)

Tab. 4: Erhobene vaskuläre Parameter von Kontrollen

„% der Bildfläche“ bezieht sich auf 100% eines Highpowerfields (235 µm x177 µm)

3.2 Statistische Auswertung

Jeder der erhobenen Parameter wurde zwischen den drei Gruppen (Pyogene Granulome = PG, Chalazien = CH, Kontrollen = KO) mittels zweiseitigem Kruskal-Wallis Test und paarweisen Vergleichen/post hoc- Analyse verglichen. P-Werte kleiner 0,05 werteten wir als signifikant.

Die vollständige Auflistung der statistischen Ergebnisse aller erhobenen Parameter finden sich in den Tabellenanhang (Tab. 5 - Tab. 12). Für die globale Analyse der vWF-Färbungen schlossen wir die Messungen mit der 100x Vergrößerung aus (siehe Material und Methoden) und fügten alle übrigen erhobenen Werte zusammen. Der Begriff „alle Stellen“ bezieht sich somit auf alle Messungen mit der 200x Vergrößerung und schließt alle gewebstypischen und speziellen Stellen einer Gruppe mit ein. Folgende Vergleiche zeigten dabei signifikante und relevante Unterschiede: Die **Gefäßanzahl** der 3 Gruppen unterschied sich signifikant ($p=0,002$) und der Median betrug 19,25 (IQR 12,63) für PG, 13 (IQR 8,13) für CH und 12 (IQR 4,75) in KO; in den paarweisen Vergleichen bestand eine Signifikanz zwischen PG und KO, und PG und CH (Abb. 15).

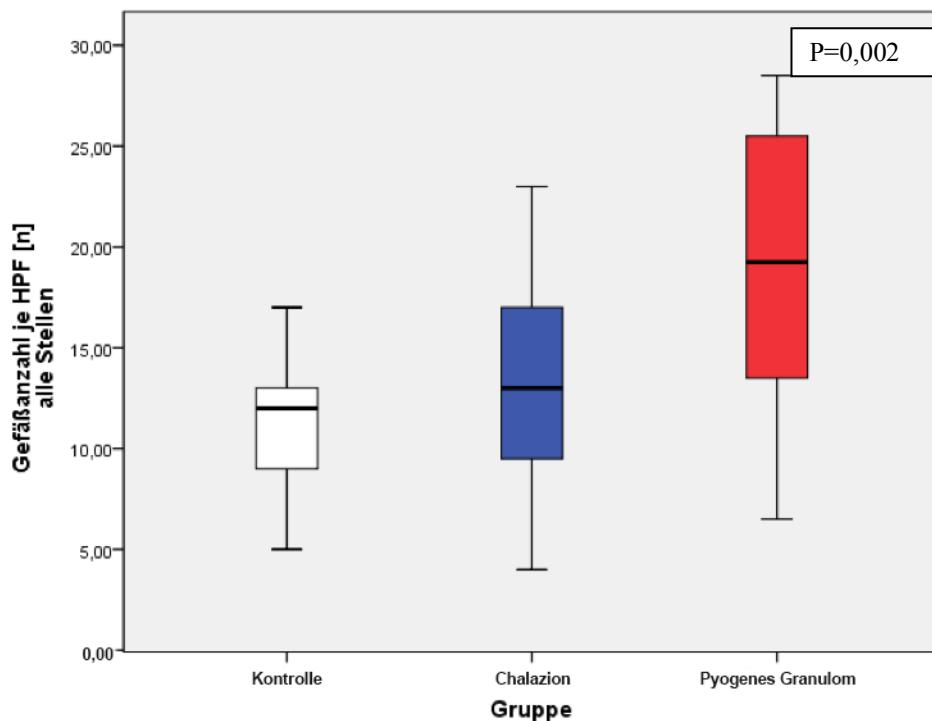


Abb. 15: Mittlere Gefäßanzahl aller Stellen in den drei Gruppen, PG-KO: p=0,002, PG-CH: p=0,021, KO-CH: p=1,0

Der **Flächenanteil der Gefäße** in % der Bildfläche (HPF) der 3 Gruppen unterschied sich signifikant ($p<0,001$) und betrug im Median 12,44% (IQR 13,05) für PG, 2,62% (IQR 1,48) für CH und 4,86% (IQR 4,48) in KO; in den paarweisen Vergleichen bestand zwischen allen drei Gruppen eine Signifikanz (Abb. 16). Ähnlich fielen die Signifikanzen für Unterschiede des mittleren **Gefäßkalibers** in % des HPF für die 3 Gruppen aus. PG haben ein signifikant größeres Gefäßkaliber als CH ($p<0,001$) und KO haben ein signifikant größeres Gefäßkaliber als CH ($p=0,001$). Der Median für das Gefäßkaliber in PG beträgt 0,7 % (IQR 1,16) = $291\mu\text{m}^2$, für CH 0,18% (IQR 0,14) = $75\mu\text{m}^2$ und für die KO 0,45% (IQR 0,54) = $187\mu\text{m}^2$ (Abb. 17).

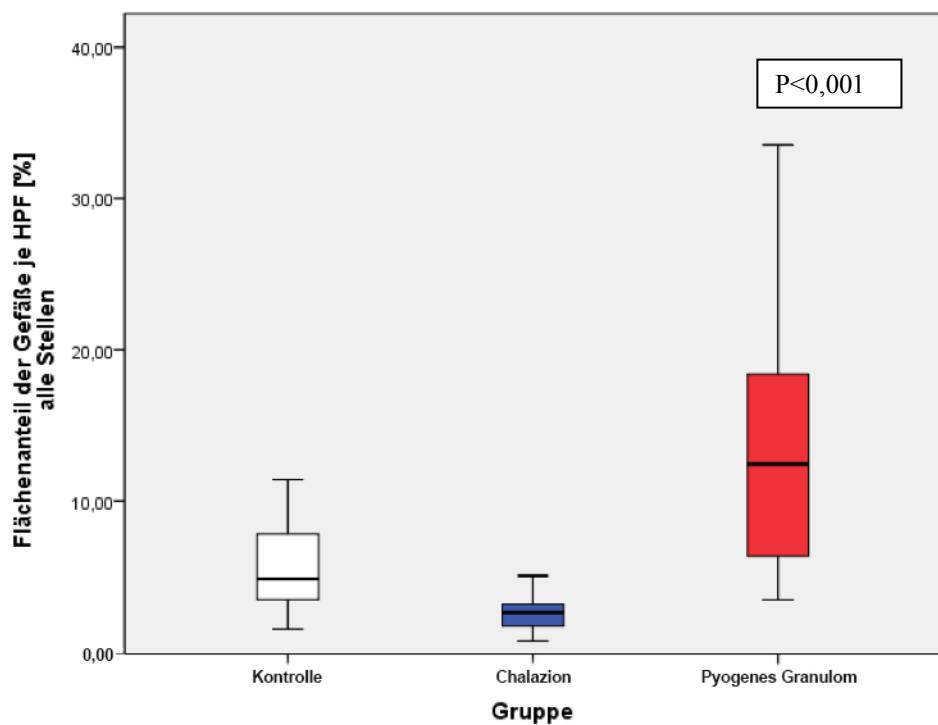


Abb. 16: Mittlere Gefäßfläche aller Stellen in den drei Gruppen, PG-KO: $p=0,039$, PG-CH: $p<0,001$, KO-CH: $p=0,016$

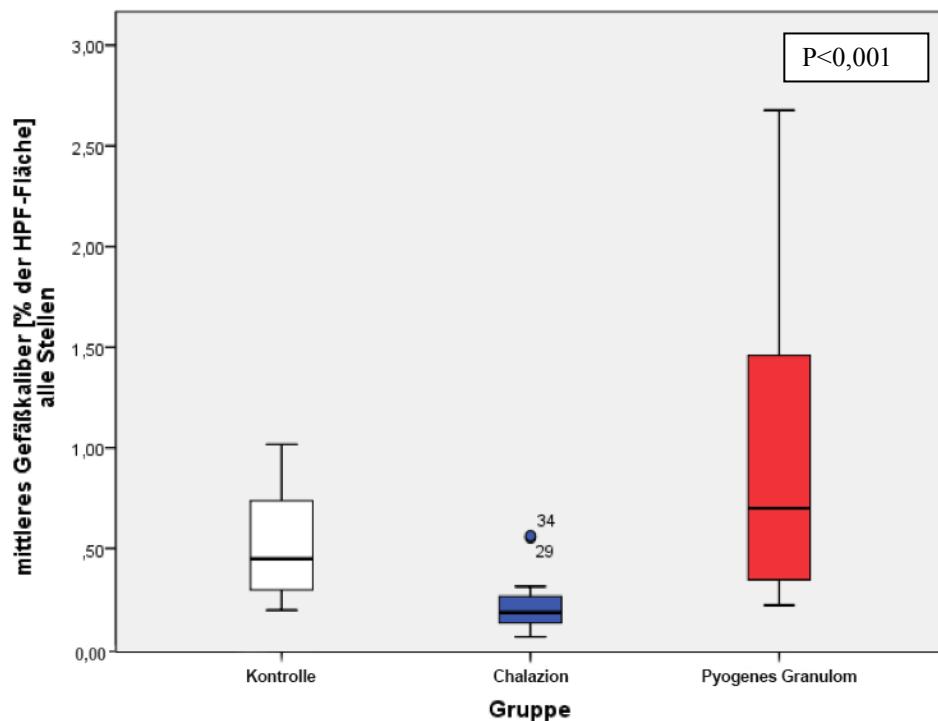


Abb. 17: Mittleres Gefäßkaliber PG-KO: $p=1$, PG-CH: $p<0,001$, KO-CH: $p=0,001$

Das kumulative VEGF-Signal je HPF unterschied sich in allen 3 Gruppen signifikant ($p=0,002$) und betrug im Median 2,83 % (IQR 2,4) für PG, 0,56 % (IQR 1,3) für CH und 1,04% (IQR 2,4) in KO; in den paarweisen Vergleichen bestand eine Signifikanz zwischen PG und CH (Abb. 18).

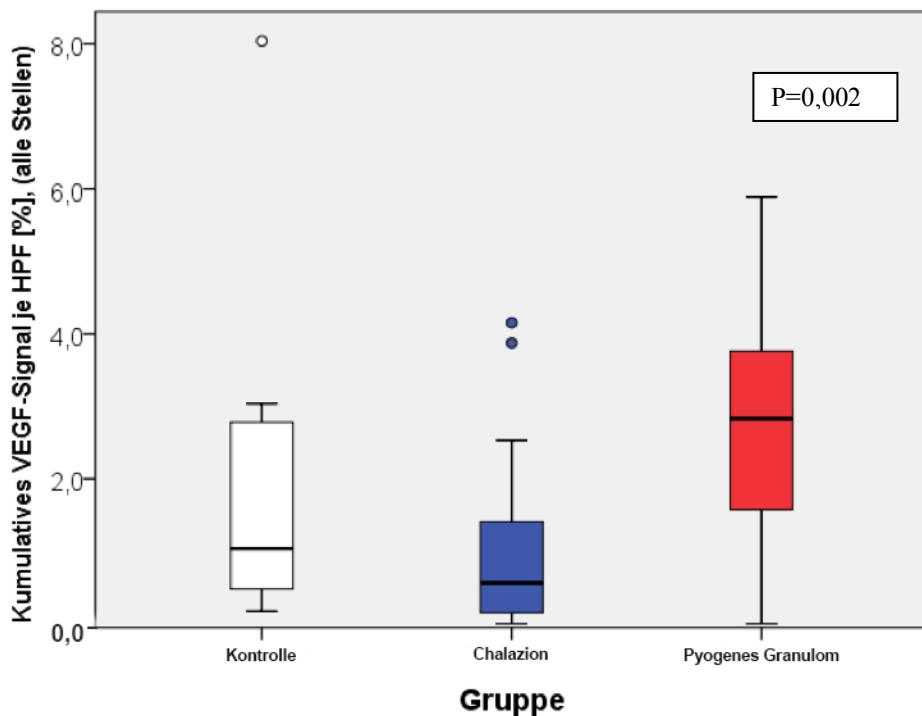


Abb. 18: Kumulatives VEGF-Signal (%) PG-KO: $p=0,219$, PG-CH: $p=0,001$, KO-CH: $p=0,854$

Subgruppenanalyse

Die Gefäßanzahl innerhalb der Gruppe der PG unterschied sich ebenfalls signifikant ($p=0,034$) und betrug im Median 24 (IQR 15) Gefäße für die subepithelialen Bereiche und 18,5 (IQR 13) Gefäße für die in der Tiefe gelegenen Bereiche (Abb. 19). Auch das mittlere Gefäßkaliber je HPF war in der Gruppe der PG mit 0,44% subepithelial signifikant ($p=0,015$) kleiner als in der Tiefe mit 0,67%. Das kumulative VEGF-Signal je HPF in der Gruppe der PG unterschied sich ebenfalls signifikant ($p=0,009$) und betrug im Median 5,80 % (IQR 6) für die subepithelialen Bereiche und 2,83 % (IQR 2,4) für die in der Tiefe gelegenen Bereiche (Abb. 20).

Kein signifikanter Unterschied ließ sich in der Subgruppenanalyse der CH feststellen, sodass die Werte der gewebstypischen und speziellen Stelle gepoolt, also gleichwertig in die Berechnung eingeschlossen wurden.

In der Binnenanalyse der Kontrollgruppe zeigte sich zwar ein statistisch signifikanter Unterschied für die Anzahl der VEGF-positiven Gefäße (mehr VEGF-positive Gefäße subepithelial als in der Tiefe, $p= 0,043$) wobei dieser Unterschied quantitativ nur gering ausfiel und sich alle anderen untersuchten Parameter nicht unterschieden. Deshalb entschlossen wir uns auch hier keinen Unterschied zwischen gewebstypischer und subepithelialer Stelle zu machen.

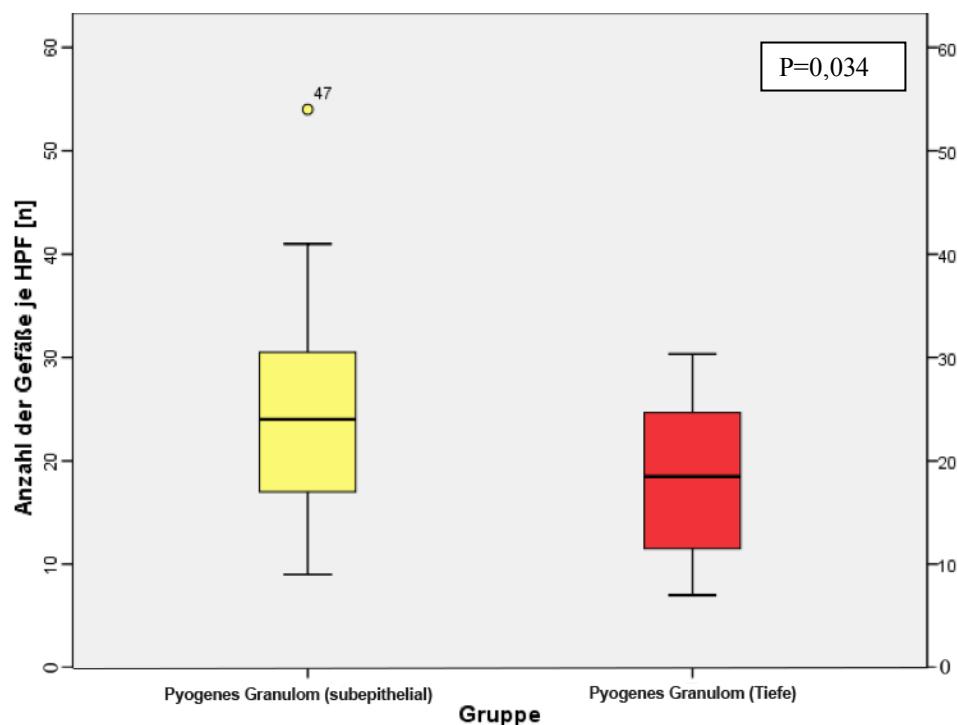


Abb. 19: Anzahl der Gefäße in pyogenen Granulomen aller tiefen Stellen und aller subepithelialen Stellen

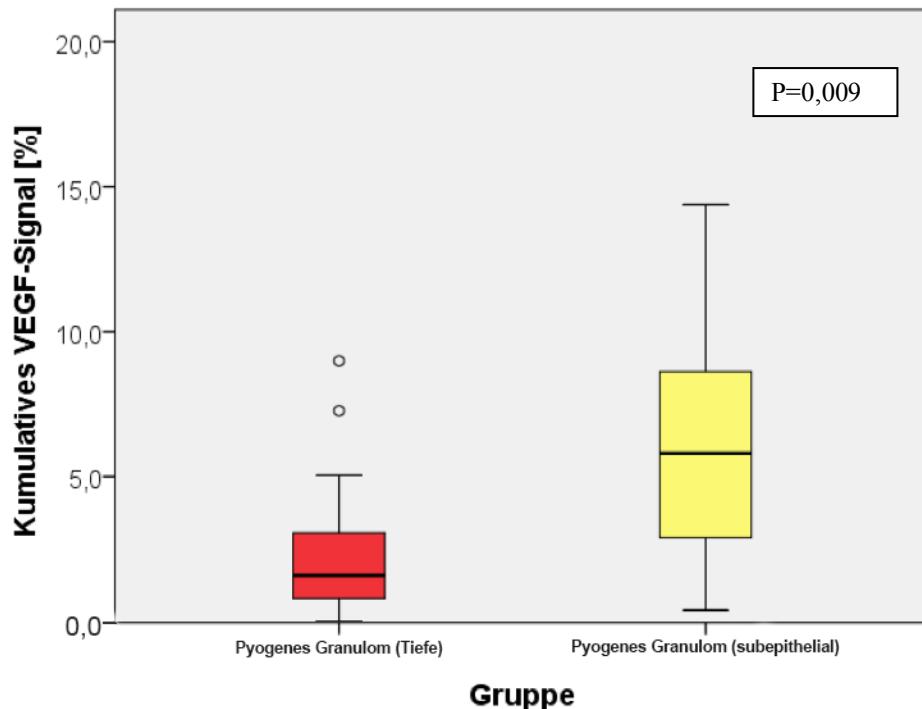


Abb. 20: Mittleres kumulatives VEGF-Signal in pyogenen Granulomen aller tiefen Stellen und aller subepithelialen Stellen

Erwartungsgemäß und passend zu den qualitativen Beobachtungen fanden sich in PG mehr Gefäße und eine größere Gefäßfläche als in KO und CH; diese Unterschiede waren auch im paarweisen Vergleich signifikant. Die Ergebnisse des kumulativen VEGF-Signals decken sich ebenfalls mit den qualitativen Beobachtungen: In PG war mehr VEGF-Signal nachweisbar als in KO und CH, wobei der Unterschied zu den Kontrollen nicht signifikant war. Auch die Beobachtung, dass in der Gruppe der PG mehr Gefäße subepithelial liegen und dort auch im Verhältnis zur Tiefe vermehrt VEGF nachweisbar ist, bestätigt die statistische Auswertung: Sowohl die Gefäßanzahl als auch das kumulative VEGF-Signal sind im Vergleich zur Tiefe in den subepithelialen Bereichen signifikant erhöht. Die subepithelial liegenden Gefäße sind in der Gruppe der PG signifikant kleiner als diejenigen, die in der Tiefe liegen. Keine signifikanten Unterschiede ließen sich dagegen für die Gefäßgesamtfläche oder die Anzahl der VEGF-positiven Gefäße in den subepithelialen Bereichen finden.

3.2.1 Zusammenfassung

Aus der Vielzahl der angestrengten Vergleiche können als konsistente, signifikante und relevante Ergebnisse festhalten werden, dass pyogene Granulome mehr Gefäße als die anderen Gruppen aufweisen und dass eine größere Gefäßfläche und mehr VEGF-Signal nachweisbar sind. Die Binnenanalyse der pyogenen Granulome ergab, dass sie subepithelial eine höhere Gefäßanzahl und vermehrt VEGF-Gesamtsignal als in der Tiefe aufweisen.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden histologische und immunhistochemische Proben von je 22 Chalazien und pyogenen Granulomen der Konjunktiva mit 13 gesunden Kontrollgeweben aus dem Lidbereich verglichen, um Unterschiede hinsichtlich der Vaskularisation und VEGF-Expression zu analysieren. Die darunterliegende Fragestellung war die Rationale einer pharmakologischen Angioneogenesehemmung durch anti-VEGF-Topika beim pyogenen Granulom. Da pyogene Granulome häufig aus Chalazien hervorgehen, wurden Unterschiede nicht nur zu gesundem Kontrollgewebe, sondern auch zu diesem möglicherweise prädisponierenden oder kausalen Krankheitsbild gesucht. Dabei fanden sich in pyogenen Granulomen signifikant mehr Gefäße mit einem größeren Gesamtquerschnitt als in beiden Vergleichsgruppen, und innerhalb der pyogenen Granulome fanden sich die Gefäße signifikant häufiger subepithelial. Auch das kumulative VEGF-Immunsignal war in den pyogenen Granulomen signifikant höher und hier insbesondere subepithelial lokalisiert.

4.1 Auswahl der Vergleichsgruppen

Der histologische Aufbau lässt vermuten, dass konjunktivale pyogene Granulome mehr Gefäße und VEGF-Signal aufweisen als das Kontrollgewebe oder Chalazien. Diese Vermutung wurde aber in der vorliegenden Literatur bisher nicht verifiziert und daher in dieser Arbeit wissenschaftlich geprüft. Die Quantifizierung von Gefäßanzahl und VEGF soll auch dazu beitragen, die Pathogenese pyogenen Granulome besser zu verstehen. Der Vergleich mit Chalazien ist insofern interessant, da pyogene Granulome häufig aus Chalazien entstehen und der genaue Pathomechanismus hier noch unbekannt ist. Außerdem soll durch diese Arbeit herausgefunden werden, ob möglicherweise Veränderungen in Gefäßanzahl und VEGF-Expression in pyogenen Granulomen die gleichen wie bei der Ausgangserkrankung Chalazion sind oder sich von diesen unterscheiden lassen.

Die Analyse der subepithelialen Stellen ist darin begründet, dass, falls aufgrund der erhobenen Ergebnisse eine Anti-VEGF-Augentropfentherapie sinnvoll erscheinen sollte, die applizierten Augentropfen vor allem in diesem Bereich wirken würden. Wenn das VEGF-Signal nur in der Tiefe des pyogenen Granuloms nachzuweisen wäre, ist fraglich, ob eine oberflächlich applizierte Anti-VEGF-Therapie einen Effekt zeigen würde.

Da in Chalazien-Präparaten die Entzündungsreaktion in vielen Fällen nicht die epithelialisierte Oberfläche erreichte und in den Präparaten häufig gar kein Epithel enthalten ist, bot sich die Analyse eines subepithelialen Bereiches dort nicht an.

4.2 Semiautomatische Messung

Um die Gefäßanzahl und das kumulative VEGF-Signal so genau wie möglich zu messen, wurde eine semiautomatische Messung durchgeführt. Für die Auswertung der auf dem Computer gespeicherten Bilder verwendeten wir das *semiautomatische Axio-Vision Autmess* Programmmodul der Firma Zeiss. Von Vorteil war die Möglichkeit mehrere Bilder mit gleichen Segmentierungskriterien objektiv zu analysieren. Da allerdings nicht jede Färbung genau der anderen gleicht und beispielsweise schwächer angefärbte Gefäße in der vWF-Färbung manchmal nicht vom Computer erkannt wurden, erwies sich die manuelle Nachkorrektur (Abb. 10 und Abb. 11) als wichtiger Schritt zu validen Messungen. Auf diese Weise wurde die Validität der Methode im Rahmen des Möglichen optimiert.

In Bezug auf die Messung des kumulativen VEGF-Signals stellte sich der Programm assistent als sehr genaues Analyseinstrument heraus, da vor den fluorezenzmikroskopischen Aufnahmen für diese Messung die **Belichtungszeit** so bestimmt wurde, dass gerade keine Fluoreszenz in der Negativkontrolle feststellbar war, es in der Postivkontrolle aber bereits zu Emissionen kam. Am Computer wurde dann das positive VEGF-Signal als zu messende Pixelfarbe gespeichert. Mit dieser Messeinstellung konnte dann für alle Bilder, unabhängig von der Färbeintensität des Schnittes, das kumulative VEGF-Signal standardisiert erhoben werden.

Manuell musste jedoch die Anzahl der VEGF-positiven Gefäße gemessen werden, da es für die Fluoreszenz gefärbten Bilder keine zufriedenstellende Einstellung gab, die ermöglicht hätte, nur das intraluminale VEGF-Signal inklusive des angefärbten Endothels zu messen. Einer möglicherweise eingeschränkten Untersuchungs-Objektivität wurde dadurch begegnet, dass alle Auswertungen durch dieselbe Untersucherin durchgeführt wurden.

4.3 VEGF als Angiogenesemarker

VEGF-A (VEGF) ist ein allgemein anerkannter Angiogenesemarker (Ferrara and Keyt, 1997). Seine Wirkung entfaltet VEGF über verschiedene Tyrosinkinaserezeptoren und Corezeptoren (z.B. Neuropipine, Heparansulfate und Proteoglykane), die von unterschiedlichen Zelltypen in nahezu jedem Gewebe exprimiert werden (Matsumoto & Claesson-Welsh, 2001). Gefäßwachstum wird über spezielle Endothelzellen, sogenannte „tip cells“ induziert, die besonders viele VEGF-Rezeptoren exprimieren und bei Bindung des Proteins über eine Signalkaskade beginnen sich zu teilen und die Formation neuer „tip cells“ über sogenannte „Notch-Rezeptoren“ zu generieren. Außerdem wird durch VEGF die Permeabilität des Endothels erhöht (Adam et al., 2013). VEGF kann von unterschiedlichen Zelltypen produziert werden, dazu gehören beispielsweise Endothelzellen, Pigmentepithelzellen, Myoblasten, Kardiomyozyten und auch Tumorzellen. Der durch Hypoxie ausgelöste Mechanismus der VEGF-Produktion ähnelt dem der Erythropoetin-Produktion. Die Induktion durch einen geringen Sauerstoffpartialdruck ist genetisch determiniert und liegt für beide auf einer homologen Sequenz (Ferrara & Keyt, 1997).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Wirkung des VEGF über seinen proangiogenetischen Effekt hinausgeht. Über die Rekrutierung von Suppressorzellen und die Hemmung von T-Zellen wirkt VEGF auch immunsuppressiv (Voron et al., 2014).

In dieser Studie wurde das kumulative VEGF-Signal in histologischen Schnitten von pyogenen Granulomen, Chalazien und normaler Haut nach Fluoreszenzmarkierung immunhistochemisch detektiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop war VEGF in pyogenen Granulomen vor allem in den Gefäßen, im Gefäßendothel, extrazellulär und in peripheren extraluminalen Zellen nachweisbar.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit der Literatur, so gibt es keinen Hinweis darauf, dass Erythrozyten VEGF enthalten oder exprimieren. Es kann sich folglich bei den intraluminal angefärbten Zellen um Leukozyten wie beispielsweise periphere mononukleäre Blutzellen, für die in einer Studie von Griga et al. ein positives VEGF-Signal beschrieben worden ist (Griga et al., 1999), um Plasmazellen, Thrombozyten oder freies VEGF im Plasma (Walz et al., 2016) oder eine unspezifische Anfärbung handeln. Wir können nicht mit letzter Sicherheit ausschließen, dass das intraluminale Signal zum Teil ein Färbeartefakt darstellt, halten aber den Nachweis von freiem VEGF im Plasma kleiner Gefäße für mindestens ebenso plausibel.

Die Anfärbung der Endothelzellen erklärt sich einerseits durch die Bindung von VEGF an ihre Tyrosinkinaserezeptoren und andererseits durch ihre Fähigkeit, VEGF zu bilden. In einer Studie von Freitas et al wurde VEGF in den untersuchten pyogenen Granulomen vor allem in Makrophagen und Fibroblasten nachgewiesen (Freitas et al., 2005), was auch zu dem extravasal beobachteten Signal in unserer Studie gut passen könnte. Die Zellmorphologie der extraluminalen Zellen erinnerte uns allerdings auch an Lymphozyten. Schließlich bleibt noch das extrazelluläre VEGF-Signal, bei dem es sich, um das durch Monozyten und Makrophagen exprimierte wasserlösliche Protein im Interzellularraum handeln könnte (Johnson & Wilgus, 2014).

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass die genaue Identifizierung der VEGF-positiven Zellen nicht Ziel dieser Arbeit war, sondern sie sich im Hinblick auf VEGF darauf beschränkt, VEGF quantitativ zu erfassen, um zu evaluieren, ob und wie viel VEGF in pyogenen Granulomen im Vergleich zu Chalazien und nicht pathologischer Haut messbar ist.

Zusammenfassend ergaben unsere VEGF-Immunbefunde für die Gruppe der pyogenen Granulome ein hohes VEGF-Signal für das Gefäßendothel und intraluminale Zellen, sowie ein extravasales VEGF Signal, welches sowohl intra- als auch extrazellulär nachweisbar war. Diese Beobachtungen treffen auch für die Verteilung des VEGF-Signals in Chalazien und Kontrollen zu, während insgesamt das kumulative VEGF-Signal kleiner war als in pyogenen Granulomen. In pyogenen Granulomen war das kumulative VEGF-Signal subepithelial im Vergleich zur Tiefe höher, wohingegen in der Kontrollgruppe kein Unterschied zwischen dem VEGF-Gesamtsignal subepithelial und in der Tiefe nachweisbar war.

4.4 Therapie pyogener Granulome

In der Augenheilkunde ist die gängige Therapie von pyogenen Granulomen bislang die chirurgische Exzision. Allerdings finden sich in Literatur auch erfolgreiche Pilotstudien zu Therapiealternativen wie der Therapie mit Mitomycin C-Augentropfen, dem Einsatz von Plaque Radiotherapie (Gündüz et al., 1998) und der Anwendung steroidaler und antibiotischer Augentropfen (Ababneh & Msallam, 2014). Daneben wurden zur Behandlung pyogener Granulome der Haut und der Mundhöhle Therapiealternativen wie die Kryochirurgie, die Behandlung mit dem CO₂- oder Farbstofflaser, eine photodynamische Therapie, intraläsionale Kortikosteroidtherapie und andere evaluiert (Jafarzadeh et al., 2006; Millsop et

al., 2014). Diese Therapieverfahren werden im Folgenden erläutert und im Vergleich zu einer möglichen Behandlung durch lokale VEGF-blockierende Augentropfen diskutiert.

4.4.1 Chirurgische Exzision

Pyogene Granulome der Konjunktiva werden nach heutiger klinischer Praxis in den meisten Fällen chirurgisch behandelt. Die Exzision erfolgt in der Regel mittels Skalpell in Lokalanästhesie. Abhängig von der Ausbreitung des pyogenen Granuloms müssen Lidränder adaptiert und genäht und gegebenenfalls in einem zweizeitigen Operationsschritt plastisch rekonstruiert werden.

Die Vorteile der chirurgischen Exzision sind die vollständige Entfernung bei einem sehr rezidivfreudigen Tumor und die histopathologische Abklärung des entfernten Materials. Letzteres erlaubt die definitive Diagnosestellung „pyogenes Granulom“ und insbesondere den Ausschluss maligner Prozesse (wie z.B. Plattenepithelkarzinom, Malignes Melanom, Bindegaukarzinom, Kaposi Sarkom), die dem pyogenen Granulom klinisch durchaus ähnlich sehen können (Spraul & Grossniklaus, 1996). Eine Diskussion des Risikos einer Fehldiagnose rief auf der Jahrestagung der deutschsprachigen Ophthalmopathologen, Kiel 2014, bei den ca. 50 Teilnehmern spontan die Erinnerung an mindestens 4 Fälle wach, in denen klinisch als pyogene Granulome befundete Läsionen histologisch maligne Tumoren zeigten.

Giblin et al. dokumentierten eine Rezidivrate von 3,7% auf 326 Fälle und Ferry et al. eine Rezidivrate von 3% auf 100 Fälle, in denen pyogene Granulome verschiedener Körperregionen mittels chirurgischer Exzision entfernt wurden (Ferry, 1989; Giblin et al., 2007). Nachteile dieser Therapie sind die Risiken jedes chirurgischen Eingriffs wie Infektion und Blutungen, darüber hinaus können die verbleibenden Narben in tarsaler Bindegau kosmetisch stören oder zu Funktionseinschränkungen der Lider führen. Als Komplikation kann beispielsweise ein Narbenektopium auftreten, welches einer weiteren chirurgischen Behandlung bedürfte.

4.4.2 Kryochirurgie

Neben der chirurgischen Exzision mittels Skalpell gibt es auch die Möglichkeit der Kryochirurgie des pyogenen Granuloms (Lee et al., 2011). Am vorderen Augenabschnitt sind in der Literatur Fälle beschrieben, bei denen die Kryotherapie beispielsweise bei der Therapie von Pterygien, limbusnaher Keratokonjunktivitiden und gigantopapillärer Konjunktivitiden

(Fraunfelder, 2013, 2008; Jiang et al., 2007) oder auch Basalzelltumoren erfolgreich Anwendung fand (Luther et al., 1989). Es sind keine Fälle bekannt bei denen die Kryochirurgie als Therapie beim pyogenen Granulom der Konjunktiva angewendet wurde, was sicherlich dem Risiko einer Narbenbildung geschuldet ist, die wiederum ein Entropium oder Ektropium nach sich ziehen kann (Gilmore et al., 2010).

Die Kryochirurgie kommt insbesondere bei Patienten mit erhöhter Blutungsneigung, hohem Alter oder einem erhöhten Infektionsrisiko (HIV, Hepatitis) zum Einsatz, oder wenn sich die zu behandelnden Tumoren an einer schwer zugänglichen Stelle befinden. Unbedingt notwendig ist in jedem Fall eine vorherige Probeexzision mit histopathologischer Untersuchung zur Diagnosesicherung. Nachfolgend ist keine histopathologische Kontrolle aufgrund der Zerstörung des Gewebes mehr möglich.

Bei dieser Therapie wird durch lokale Anwendung extremer Kälte ein definierter Gewebeuntergang herbeigeführt. Das Gewebe wird dabei mit einer Mindesttemperatur von 20°C bei einer Gefriergeschwindigkeit von -100°C/Min eingefroren. Als geeignetes Kryogen dient flüssiger Stickstoff (-195,8°C). Die Kälte wird in Lokalanästhesie durch Aufsprühen des Kryogens (Sprayverfahren, offenes Verfahren) oder durch Kontakt mit einer Kryosonde (Kontaktverfahren, geschlossenes Verfahren) appliziert. Die Dauer der Applikation richtet sich nach dem Erscheinen einer weißen Reifung. Reguläre postoperative Reaktionen sind Ödembildung und Schwellung sowie Blasenbildung (nach 1-2 Tagen). Größere Blasen müssen abgetragen werden. Darüber hinaus kann es zu Blutungen und Schmerzen über bis zu 2 Wochen nach der Behandlung kommen (Zouboulis, 2015). Im Gegensatz zur chirurgischen Exzision verbleibt meistens eine zwar kleine, aber deutlichere Narbe, ggf. mit Hypopigmentierung (Gilmore et al., 2010). In einer Studie von Mirshams et al. konnte bei 135 Patienten mit pyogenen Granulomen an Haut bzw. Schleimhaut in 58% der Fälle in der ersten Sitzung ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden. In 42% der Fälle mussten hingegen zwei oder mehr Kryotherapiesitzungen durchgeführt werden (Mirshams et al., 2006).

4.4.3 Laser

In der Lasertherapie pyogener Granulome kommen der CO₂-, der gepulste Farbstoff- und der YAG-Laser zum Einsatz.

Allen Behandlungen mit dem Laser ist gemein, dass sie bei malignen Veränderungen der Haut kontraindiziert sind. Bei Unklarheit ist unbedingt vor Behandlung die Diagnose histopathologisch abzuklären.

Der gepulste Farbstofflaser emittiert hochenergetische Photonen, die einen geeigneten Absorber im Zielgewebe erhitzen können. Da der farbige Spektralbereich (ca. 380-1000nm) von Hämoglobin gut absorbiert wird, zeigt der Farbstofflaser insbesondere ein gutes Ansprechen bei hellroten Gefäßmälern wie z.B. Naevi flammei oder Hämangiomen. Auch an schwierigen Lokalisationen kann der Farbstofflaser angewandt werden, da die Photodermolyse abhängig vom eingestellten Emissionsbereich selektiv stattfindet.

Zur Oberflächenanästhesie eignet sich EMLA-Creme und Kühlung. Darüber hinaus sollte an der behandelten Stelle ein Lichtschutz für 6-8 Wochen erfolgen (Altmeyer & Paech, 2011). Nachteile dieser Therapie sind starke Schmerzen bei Behandlung. Kosmetisch kann in den meisten Fällen ein sehr gutes Ergebnis erzielt werden, da Narbenbildungen und Hypopigmentierungen nur selten auftreten. In einer Studie mit 20 Patienten (Alter: 6 Monate - 16 Jahre) von Tay et al. erforderten 75% der behandelten pyogenen Granulome mehr als eine Sitzung. Größere Tumoren (5 cm über Hautniveau) mussten chirurgisch entfernt werden (Tay et al., 1997).

CO2-Laser

Der CO2-Laser ist ein Gaslaser und emittiert Strahlung mit einer Wellenlänge im Infrarotbereich. Das aktive Medium sind CO₂-Moleküle. Die Strahlung wird vom Wasser im Gewebe absorbiert. Dabei wird die Integrität der zellulären Gewebestruktur durch „Verdampfung“ (Erhitzung des intrazellulären Wassers) zerstört. Der CO₂-Laser kann im „continuous wave“ oder im gepulsten Modus unter Lokalanästhesie angewendet werden. Die starke Absorption der Strahlung durch die oberflächliche Haut verhindert eine Penetration der tieferen Schichten, sodass auch mit diesem Laser sehr gezielt gearbeitet werden kann. Auf der anderen Seite dürfen die Tumoren nicht zu tief liegen, da sie sonst nicht mehr erreicht werden. Hauptsächlich wird der CO₂-Laser in der Dermatologie bei Verdacht auf nicht vaskuläre Veränderungen wie Rhinophym, Viruspapillom, Leukoplakie oder Tätowierungen angewandt (Altmeyer und Paech, 2011). In der Literatur sind aber auch mit dem CO₂-Laser behandelte pyogene Granulome beschrieben, bei denen in einer einzigen Sitzung ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt wurde, ohne Auftreten eines Rezidivs (Raulin et al., 1997). Vorteile dieser Behandlung sind das blutlose Arbeiten und die Zugänglichkeit sog. Problemstellen wie Auge und Perioralbereich. Im Vergleich zur chirurgischen Exzision treten seltener Narben auf, allerdings können Hypo- oder Hyperpigmentierungen verbleiben (Gilmore et al., 2010).

Nd:YAG-Laser

Dieser Festkörperlaser mit Metallionen als aktivem Medium emittiert wie der CO₂-Laser Strahlung im Infrarotbereich (1064 und 1320 nm). Im Gegensatz zum CO₂-Laser eignet sich dieser Laser aufgrund der geringen Absorption in den oberflächlichen Hautschichten für tiefer gelegene Hautveränderungen (Kumaresan & Srinivas, 2011). Überwiegend wird dieser Laser in der Oralchirurgie bei pyogenen Granulomen (Hammes et al., 2012) und in der Dermatologie z.B. bei gutartigen melanozytären Nävi angewandt (Altmeyer und Paech, 2011). Auch mit diesem Laser ist durch die tiefe Koagulation der Gefäße und des Gewebes das blutarme Arbeiten von Vorteil. Kurz nach der Intervention bilden sich häufig Krusten und Purpura und Hypo- und Hyperpigmentierungen können verbleiben. Die Narbenbildung ist im Vergleich zur chirurgischen Exzision jedoch gering (Altmeyer & Paech 2011; Romanos et al., 1995).

4.4.4 Konservative Therapie

Unter der konservativen Therapie pyogener Granulome wird das Abwarten auf spontane Regression oder die Behandlung mit lokal applizierten Medikamenten verstanden. Die konservative Therapie ist bislang insbesondere in der Augenheilkunde keine weit verbreitete Vorgehensweise zur Behandlung pyogener Granulome. Der Grund hierfür ist sicherlich, dass bei der chirurgischen Behandlung durch die histopathologische Untersuchung eine Abgrenzung zu mitunter auch malignen Differentialdiagnosen gewährleistet ist. In eindeutigen Fällen bietet die konservative Therapie allerdings einige Vorteile wie z.B. eine schmerzlose Behandlung, Ausbleiben von Narbenbildung und damit einhergehend keine Funktionsstörung umliegender Lidhaut und keine kosmetische Beeinträchtigung. In der Fallstudie von Ababneh and Msallam beispielsweise genügte es bei einer 44-jährigen Patientin, Punctum plugs als Auslöser der pyogenen Granulome von beiden Augen zu entfernen und steroidal-antibiotische Augentropfen zu applizieren, um die pyogenen Granulome, die sich im Lumen der Tränenkanälchen entwickelt hatten, rezidivfrei zu behandeln (Ababneh & Msallam, 2014).

Vor allem bei jüngeren Patienten wird gerne eine chirurgische Behandlung vermieden, da auch kleinere Eingriffe oft nur in Vollnarkose durchführbar sind. Weitere Vorteile sind keine über die Läsion hinausgehende Narbenbildung und eine evtl. damit verbundene

Funktionseinschränkung und ein geringeres Infektionsrisiko, was auch für immungeschwächte Patienten attraktiver ist. In der Literatur wird über zwei Fälle berichtet, bei denen es bei einem Jugendlichen und einem 5 Monate alten Kind nach topischer Therapie mit Timolol (0,5% Lösung) zu einer rezidivfreien Regression der pyogenen Granulome an Finger und Wange kam (Khorsand et al., 2014; Malik & Murphy, 2014).

Die Rolle VEGFs im Wachstumsprozess Pyogener Granulome

Die Ätiopathogenese pyogener Granulome ist noch weitgehend unbekannt. Neben Infektionen, Bagatelltraumen und Infektionen spielen auch hormonelle Faktoren eine Rolle. Das pyogene Granulom der Gingiva bei Schwangeren (auch genannt „Schwangerschaftstumor“) ist ein Beispiel, bei dem eine konservative Therapie sinnvoll erscheint. Zum einen möchte man durch eine chirurgische Intervention die Schwangerschaft nicht gefährden und empfiehlt konservative Maßnahmen wie Mundpflege, und zum anderen bildet sich ein Teil der pyogenen Granulome nach Entbindung durch die hormonelle Umstellung spontan zurück (Butler & Macintyre, 1991). Zum Entstehungsmechanismus des Schwangerschaftstumors tragen mehrere Faktoren bei. Die erhöhten Hormonspiegel von Östrogen und Progesteron vor allem gegen Ende der Schwangerschaft korrelieren mit dem Auftreten von Gingivitis und pyogener Granulome (Zaki et al., 1984). Man vermutet, dass der Einfluss dieser Hormone auf das Immunsystem die Entstehung pyogener Granulome begünstigt. Progesteron wirkt in der Gingiva immunsuppressiv (Ojanotko-Harri et al., 1991) und in einer Studie von Yuan et al. konnte gezeigt werden, dass Progesteron *in vitro* die Bildung von VEGF in Schwangerschaftstumoren verstärkt (Yuan et al., 2002). In einer Arbeit von Yuan et al. wurden pyogene Granulome der Gingiva von Schwangeren mit Schwangerschaftstumoren von Frauen nach Entbindung histologisch und biochemisch miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die pyogenen Granulome der noch schwangeren Frauen mehr VEGF und weniger apoptotische Endothelzellen aufwiesen als ihre Vergleichsgruppe (Yuan & Lin, 2004). Dies legt nahe, dass auch beim pyogenen Granulom der Gingiva, VEGF maßgeblich am Wachstum beteiligt ist und hormonelle Faktoren nicht ausgeschlossen werden können.

In der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass in pyogenen Granulomen ein höheres VEGF-Gesamtsignal sowie eine höhere Anzahl der VEGF-positiven Gefäße als in Chalazien und Kontrollen nachweisbar ist. Unter Berücksichtigung der zuvor angeführten Studien, die zeigen, dass eine konservative Therapie pyogener Granulome erfolgreich sein kann, sowie der

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der Rolle VEGFs für die Angiogenese (Ferrara, 2009) und folglich auch für das Wachstum pyogener Granulome, erscheint eine topische Anti-VEGF Therapie auch bei pyogenen Granulomen der Konjunktiva sinnvoll.

Pyogene Granulome sind histopathologisch wie ein lobuliertes Hämangiom mit fibromyxoider Matrix und großen Gefäßen sowie vielen kleinen Kapillaren aufgebaut (Ferry, 1989). In der Binnenanalyse der pyogenen Granulome bestätigte sich die Beobachtung, dass viele kleinere Gefäße und Kapillaren insbesondere subepithelial zu sehen waren: Sowohl die Gefäßanzahl als auch das VEGF-Gesamtsignal waren subepithelial signifikant höher im Vergleich zu den tiefer liegenden Gewebsabschnitten. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Angioneogenese respektive Wachstum in pyogener Granulomen insbesondere subepithelial stattfindet, was die Wirksamkeit einer lokal applizierten Anti-VEGF-Therapie begünstigen würde.

Inwiefern durch eine topische Anti-VEGF-Therapie eine Wachstumshemmung oder auch eine Involution pyogener Granulome herbeigeführt werden kann, bedarf weiterer klinischer Studien.

4.4.5 Topische Anti-VEGF-Therapie bei kornealen Neovaskularisationen

Am vorderen Augenabschnitt wurden Anti-VEGF-Augentropfen bereits erfolgreich bei kornealen Neovaskularisationen eingesetzt. In einer Studie von Amparo et al. konnte gezeigt werden, dass Pazopanib-Augentropfen korneale Neovaskularisationen um 22% reduzieren (Amparo et al., 2013) und Krizova et al. wiesen eine Reduzierung der kornealen Neovaskularisationen durch Bevacizumab-Augentropfen um 38% (Krizova et al., 2014) nach. Etwa der gleiche Effekt (bis zu 39,8%) wurde bei Patienten mit kornealen Neovaskularisationen unter Ranibizumab-Augentropfen gesehen (Stevenson et al., 2012). Weiterhin berichten die Autoren über ihre Erfahrungen mit der lokalen Anwendung als Anti-VEGF-Augentropfen bei kornealen Neovaskularisationen. Bei 1% Bevacizumab®, 1% Ranibizumab®- bzw. 0,5% Pazopanib® Lösung waren keine okulären oder systemischen Nebenwirkungen nachweisbar (Amparo et al., 2013; Dastjerdi et al., 2009; Stevenson et al., 2012). Da VEGF auch als Neuroprotektor fungiert und neuronales Wachstum fördert (Rosenstein & Krum, 2004), wird der Effekt von Anti-VEGF Augentropfen auf die Kornea mitunter kritisch diskutiert, da die Applikation der Tropfen eine neuropathische Keratopathie induzieren könnte. In einer Studie von Kim et al. zeigten Patienten mit kornealen

Neovaskularisationen nach topischer Bevacizumab® Therapie eine Hornhautausdünnung und neu entstandene Epitheldefekte (Kim et al., 2008). Es wird diskutiert, dass diese Nebenwirkungen mit der verwendeten höheren Dosierung zusammenhängen könnten. Um okuläre und systemische Nebenwirkungen von VEGF-Inhibitoren, beispielsweise eine Blutdrucksteigerung, zu minimieren, sollte laut einigen Studien eine Therapiedauer von 4 Wochen bei 4x täglicher Applikation nicht überschritten und über diesen Zeitraum den Patienten „punctum plugs“ eingesetzt werden (Amparo et al., 2013; Dastjerdi et al., 2009; Stevenson et al., 2012).

Da es noch keine Erfahrungen mit Anti-VEGF-Augentropfen zur Anwendung beim pyogenen Granulom der Konjunktiva gibt, liegen auch noch keine Daten zu Dosierung, Anwendungsdauer, Rezidivhäufigkeit, Nebenwirkungen und Sicherheitsprofil vor. Wie sich eine topische Anti-VEGF-Therapie beim pyogenen Granulom der Konjunktiva auswirken würde, erfordert klinische Studien. Aber die guten Erfahrungen mit der Anwendung bei Neovaskularisation in der Kornea unterstreichen das Potential dieser Therapiealternative beim pyogenen Granulom.

5 Zusammenfassung

Das pyogene Granulom der Bindegewebe ist ein entzündlicher, schnell wachsender gutartiger Tumor der Bindegewebe, der durch chirurgische Exzision behandelt wird. Der Pathomechanismus pyogener Granulome, die zu der Gruppe der Hämangiome gehören, ist noch weitgehend unbekannt. Aufgrund der gefäßreichen Struktur, und der häufigen Entwicklung eines pyogenen Granuloms aus einem Chalazion beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Expression von Blutgefäßen und VEGF in pyogenen Granulomen und Chalazien, um die Angiogenese beim pyogenen Granulom zu untersuchen. Seit Angiogenesehemmer verfügbar geworden sind, die den Botenstoff VEGF hemmen, lassen sich pathologische Prozesse, die wesentlich durch eine Angioneogenese charakterisiert sind (wie z.B. bei kornealen Neovaskularisationen und der Altersbedingten Makuladegeneration), auch pharmakologisch beeinflussen. In dieser Studie wurde die Basis für die Therapierationale einer topischen antiangiogenen Therapie pyogener Granulome untermauert.

Hierfür wurden semiautomatische Messungen an immunhistochemisch gefärbtem histologischem Material von 22 pyogenen Granulomen, 22 Chalazien und 13 Kontrollen durchgeführt. Als Kontrollgewebe verwendeten wir Lidgewebe ohne histologisch akute pathologische Veränderungen, etwa aus Lidplastiken bei Lidfehlstellungen. Insgesamt wurden ca. 230 Bildausschnitte auf die Gefäßanzahl, das mittlere Gefäßkaliber, das kumulative VEGF-Signal und die Anzahl VEGF-positiver Gefäße untersucht. Die unterschiedlichen Gruppen wurden statistisch nicht parametrisch mit dem Kruskal-Wallis Test miteinander verglichen.

Die Ergebnisse zeigten, dass pyogene Granulome im Vergleich zu Chalazien und der Kontrollgruppe mehr Gefäße sowie eine größere Gefäßfläche aufweisen und ein höheres VEGF-Gesamtsignal nachweisbar ist. Bei der Binnenanalyse der Gruppe der pyogenen Granulome fiel auf, dass sowohl die Gefäßanzahl als auch das kumulative VEGF-Signal in pyogenen Granulomen in den subepithelialen, also oberflächlichen Bereichen im Vergleich zur Tiefe signifikant erhöht ist.

Letzteres ist eine interessante Beobachtung in Hinblick darauf, pyogene Granulome mit lokalen VEGF inhibierenden Augentropfen zu behandeln, da diese ihre stärkste Wirkung subepithelial entfalten können. Am vorderen Augenabschnitt findet die topische Anti-VEGF

Therapie bei kornealen Neovaskularisationen bereits erfolgreich Anwendung (Amparo et al., 2013; Krizova et al., 2014; Stevenson et al., 2012).

Die Ergebnisse dieser Studie sprechen übereinstimmend mit zahlreichen positiven Kasuistiken zur topischen Anti-VEGF-Therapie am vorderen Augenabschnitt bei anderen Krankheitsbildern dafür, dass Anti-VEGF-Tropfen auch bei pyogenen Granulomen der Konjunktiva wirksam sein könnten. Die Vorteile dieser Therapie wären durch die Vermeidung der chirurgischen Exzision auch das Ausbleiben aller operativen Risiken. Zu beachten ist allerdings, dass eine konservative Therapie grundsätzlich nur in klinisch sehr eindeutigen Fällen eine Alternative darstellt, da aufgrund der fehlenden histopathologischen Untersuchung keine eindeutige diagnostische Abgrenzung zu ähnlichen Krankheitsbildern (z.B. Chalazion, Hordeolum oder Plattenepithelkarzinom) gewährleistet ist. Eine Fehldiagnose einer malignen Erkrankung ohne nachfolgende Konsequenz der chirurgischen Exzision muss in jedem Fall vermieden werden.

6 Tabellenanhang

6.1 Semiquantitative Ergebnisse der vWF-Färbungen der pyogenen Granulome

<i>Präparat</i>	GA an Stelle 1, 10 x Ver.	GF in %	GA an Stelle 2, 20x Ver.	GF in %	GA an Stelle 3, 20x Ver.	GF in %	GA an Stelle 4, 20x Ver.	GF in %	GA an subepi. Stelle 20x Ver.	GF in %
12 11	34	2,54	22	4,17	25	6,81	30	4,92	24	5,7
201 10	55	16,45	15	12	25	25	14	34,68	/	/
201 10 /1	57	4,38	19	4,03	36	8,44	15	8,47	/	/
90 11	35	4,82	9	7,05	14	4,04	13	5,2	24	5,37
90 11 /2	/	/	20	4,15	19	5,06	/	/	/	/
140 10	28	1,66	11	1,15	8	2,5	14	4,45	/	/
175 10 /2	68	5,27	22	3,36	25	2,58	22	10,77	/	/
156 11	42	10,57	9	15,83	10	13,69	17	31,58	32	6,71
212 09	47	25,68	20	20,88	15	27,74	23	39,33	41	17,77
6 00 1	65	18,41	16	12,63	24	11,15	30	8,55	9	6,24
70 00	53	12,15	17	13,72	19	10,2	38	20,89	27	16,89
214 00/ 1	78	12,47	44	5,64	27	15,68	20	16,47	27	16,25
278 09	43	10,11	20	11,19	15	11,34	18	12,24	54	7,79
36230	/	/	8	1,18	25	6,29	23	6,43	/	/
36305	42	12,98	12	9,13	10	18,35	11	11,9	12	3,69
36368	41	6,49	11	4,89	5	3,11	10	8,48	19	8,01
36687	21	1,93	7	3,3	10	4,19	13	15,96	15	11,4
37202	/	/	15	12,2	16	10,7	36	26,07	19	18,86
35078	16	4,83	8	4,39	4	12,86	9	19,25	12	9,49
11 310	46	16,46	21	17,05	10	30,15	21	18,06	20	21,32
12 114	77	24,07	28	24,33	21	32,37	25	11,6	34	15,42
10 08	52	9,88	24	15,01	31	13,67	22	12,53	29	7,23

Tab. 5: semiquantitative Ergebnisse der vWF-Färbungen der pyogenen Granulome;

Tabellenlegende: „GA“: Gefäßanzahl, „Ver.“: Vergrößerung des Mikroskopobjektivs, „GF“: korrespondierende Gefäßfläche in % der Gesamtfläche, “/“: nicht berechenbar bzw. das Präparat zeigt diese Stelle nicht. „subepi“: subepitheliale Stelle

6.2 Semiquantitative Ergebnisse der VEGF-Färbungen der pyogenen Granulome

<i>Präparat</i>	GP an Stelle 1, 20x Ver.	VEGF- Signal in %	GP an Stelle 2, 20x Ver.	VEGF- Signal in%	GP an Stelle 3, 20x Ver.	VEGF- Signal in%	GP an subepi. Stelle 20 x Ver.	VEGF- Signal in%
12 11	0	2,86	0	2,61	0	/	0	3,61
201 10	4	0,68	0	0,86	1	/	0	0,22
201 10 /1	0	9,35	3	5,19	0	/	/	/
90 11	0	0,87	0	0,68	0	0,84	0	0,39
175 10 /2	0	3,61	0	1,71	0	0,46	/	/
156 11	0	3,35	0	0,4	0	0,21	2	9,09
212 09	0	0,89	4	0,92	3	9,64	0	1,77
6 00 1	0	0,56	0	1,14	0	0,27	21	2,75
70 00	0	1,47	0	6,13	0	7,53	0	6,08
214 00/ 1	7	2,11	14	2,31	2	0,35	0	6,83
278 09	4	1,09	5	1,11	7	0,36	0	3,04
36230	0	0,58	0	1,21	0	2,19	0	2,32
36305	0	1,93	0	3,39	0	3,85	0	14,38
36368	20	4,16	0	0,97	0	0,66	0	5,53
36687	0	0,65	/	/	/	/	0	8,15
37202	13	12,1	5	5,83	16	9,05	0	25,8
35078	0	1,41	0	0,15	0	0,49	5	4,56
11 310	0	3,21	0	1,45	11	2,26	0	8,12
12 114	12	7,31	0	2,01	0	0,44	8	1,03
10 08	8	2,57	7	1,45	/	/	0	12,01

Tab. 6: Semiquantitative Ergebnisse der VEGF-Färbungen der pyogenen Granulome;

Tabellenlegende: „GP“: Anzahl der VEGF positiven Gefäße, „VEGF- Signal in %“: bezieht sich auf die Geamtfläche des High-power fields „Ver.“: Vergrößerung des Mikroskopobjektivs.“/“: nicht berechenbar bzw. das Präparat zeigt diese Stelle nicht, „subepi“: subepitheliale Stelle

6.3 Semiquantitative Ergebnisse der vWF-Färbungen der Chalazien

<i>Präparat</i>	GA an Stelle 1, 20x Ver.	GA an Stelle 2, 20x Ver.	GF in %	GA an Stelle 3, 20x Ver.	GF in %	GA an konz. Stelle	GF in %
2 09	11	22	4,07	/	/	26	2,66
51/ 09	17	19	0,87	7	1,50	14	8,41
67/ 09	47	17	2,61	29	3,54	41	4,43
68/ 09 2	20	12	1,79	18	3,16	/	/
73/ 09	4	7	5,11	9	3,39	/	/
106/ 09	8	14	2,23	18	2,45	37	4,74
149/ 09	18	10	4,38	15	1,87	9	1,14
158/ 09	13	12	5,60	10	0,58	14	6,03
217/ 09	10	9	1,58	6	1,88	17	1,31
222/ 09	15	14	1,43	24	3,36	15	3,04
237/ 09	15	14	1,83	13	3,92	14	2,43
200/ 10	16	7	3,28	17	2,24	8	3,10
209/ 10	29	27	4,89	17	5,21	/	/
256/ 10	22	21	5,15	15	1,19	16	2,78
60/ 11	10	13	3,22	6	0,95	14	8,71
74/ 11	6	15	2,56	21	3,93	18	4,14
257/ 11	13	17	1,58	/	/	/	/
151/ 09	24	11	1,53	20	1,27	7	0,28
195/ 10 1	10	8	2,49	/	/	23	1,76
180/ 09	49	5	0,44	6	1,03	21	2,76
131/ 12	16	10	0,63	16	0,94	12	0,93
50 /13	7	5	1,99	6	4,36	7	4,50

Tab. 7: Semiquantitative Ergebnisse der vWF-Färbungen der Chalazien

Tabellenlegende: „GA“: Gefäßanzahl, „Ver.“: Vergrößerung des Mikroskopobjektivs, „GF“: korrespondierende Gefäßfläche in % der Gesamtfläche, “/“: nicht berechenbar bzw. das Präparat zeigt diese Stelle nicht, „konz.“: konzentrierte Stelle

6.4 Semiquantitative Ergebnisse der VEGF-Färbungen der Chalazien

Präparat	GP an Stelle 1, 20x Ver.	VEGF- Signal in %	GP an Stelle 2, 20x Ver.	VEGF- Signal in %	GP an Stelle 3, 20x Ver.	VEGF- Signal in %	GP an konz. Stelle	VEGF- Signal in %
2 09	0	0,12	0	0,34	0	0,00	0	0,07
51/ 09	0	1,29	0	0,48	0	0,89	0	0,12
67/ 09	0	1,85	0	0,13	/	/	/	/
68/ 09 2	0	0,29	0	0,08	0	0,08	/	/
73/ 09	4	0,61	0	0,00	0	0,00	0	0,00
106 /09	0	1,81	0	4,51	0	1,09	0	1,35
149/ 09	0	2,47	0	0,23	0	0,13	/	/
158/ 09	0	0,13	0	2,59	/	/	/	/
217/ 09	0	1,82	0	0,63	0	3,09	0	4,59
222/ 09	0	2,55	0	2,81	0	0,11	0	0,33*
237/ 09	0	0,75	0	0,03	0	0,80	0	0,33
200/ 10	0	0,40	0	0,64	0	0,29	0	0,46
209/ 10	0	0,06	0	0,91	0	0,82	0	0,07
256/ 10	0	0,05	0	0,03	0	0,12	0	0,19
60/ 11	0	0,22	0	0,00	/	/	/	/
74/ 11	0	0,90	0	1,34	0	12,06	0	2,31
151/ 09	0	3,02	0	8,60	0	0,00	/	/
195/ 10 1	0	1,78	0	0,42	0	2,59	3	0,85
180/ 09	0	0,25	0	0,21	13	1,41	0	0,04
131/ 12	0	0,60	0	0,60	0	0,49	/	/

Tab. 8: Semiquantitative Ergebnisse der VEGF-Färbungen der Chalazien

Tabellenlegende: „GP“: Anzahl der VEGF positiven Gefäße, „VEGF- Signal in %“: bezieht sich auf die Geamtfläche des High-power fields, „Ver.“: Vergrößerung des Mikroskopobjektivs.“/“: nicht berechenbar bzw. das Präparat zeigt diese Stelle nicht, „konz.“: konzentrierte Stelle.

6.5 Semiquantitative Ergebnisse der vWF-Färbungen der Kontrollen

Präparat	GA an Stelle 1, 20x Ver.	GF in %	GA an Stelle 2, 20x Ver.	GF in %	GA an subepi. Stelle, 20x Ver.	GF in %
67112	7	3,68	7	7,85	7	1,49
111608	26	6,63	12	1,67	21	5,21
111609	7	2,43	9	8,13	13	7,42
120124	13	2,38	14	2,06	14	7,61
120134	8	1,61	15	3,36	9	3,62
120230	12	2,88	9	5,57	13	10,97
120241	9	5,14	11	5,41	7	10,23
120258	5	2,55	/	/	13	5,83
120269	7	6,31	14	7,32	12	15,52
121506	33	6,97	15	2,68	19	7,03
913	10	2,38	7	2,4	10	2,47
27613	13	1,18	4	0,19	6	2,89
081113	18	3,3	20	5,61	6	10,53

Tab. 9: Semiquantitative Ergebnisse der vWF-Färbungen der Kontrollen;

Tabellenlegende: „GA“: Gefäßanzahl, „GF“: korrespondierende Gefäßfläche in % der Gesamtfläche „Ver.“:

Vergrößerung des Mikroskopobjektivs, “/“: nicht berechenbar bzw. das Präparat zeigt diese Stelle nicht, „subepi“: subepitheliale Stelle.

6.6 Semiquantitative Ergebnisse der VEGF-Färbungen der Kontrollen

<i>Präparat</i>	GP an Stelle 1, 20x Ver.	VEGF- Signal in %	GP an Stelle 2, 20x Ver.	VEGF- Signal in %	GP an Stelle 3, 20x Ver.	VEGF- Signal in %	GP an subepi. Stelle, 20x Ver.	VEGF- Signal in %
67112	0	0,13	0	0,11	0	0,08	3	0,38
111608	0	0,14	0	0,32	5	4,73	0	0,26
111609	2	9,26	0	0,48	0	0,1	3	2,31
120124	0	0,4	0	0,82	0	1,16	17	1,27
120134	2	0,87	0	0,2	0	0,41	0	0,23
120230	2	2,46	0	0,18	3	1,34	10	0,66
120241	2	1,67	3	0,44	0	0,21	3	0,63
120258	0	0,6	0	0,03	1	0,65	3	0,64
120269	4	9,56	7	4,95	7	2,73	11	14,92
121506	3	3,64	2	2,32	0	4,48	3	0,68

Tab. 10: Semiquantitative Ergebnisse der VEGF-Färbungen der Kontrollen

Tabellenlegende: „GP“: Anzahl der VEGF positiven Gefäße, „VEGF- Signal in %“: bezieht sich auf die Geamtfläche des High-power fields, „Ver.“: Vergrößerung des Mikroskopobjektivs, „subepi“: subepitheliale Stelle.

6.7 Statistische Signifikanz

GA (n) an allen Stellen Vergleich PG und CH Vergleich PG und KO Vergleich CH und KO	p=0,002 p=0,021 p=0,005 p=1,0
GF (%) an allen Stellen Vergleich PG und CH Vergleich PG und KO Vergleich CH und KO	p<0,001 p<0,001 p=0,039 p=0,016
GK (%) an allen Stellen Vergleich PG und CH Vergleich PG und KO Vergleich CH und KO	p<0,001 p<0,001 p=1 p=0,001
GP (n) an allen Stellen Vergleich PG und CH Vergleich PG und KO Vergleich CH und KO	p<0,001 p=0,003 p=0,644 p<0,001
GP (n) an den gewebstypischen Stellen Vergleich PG und CH Vergleich PG und KO Vergleich CH und KO	p=0,002 p=0,014 p=1 p=0,008
Kum. VEGF Signal (%) an allen Stellen Vergleich PG und CH Vergleich PG und KO Vergleich CH und KO	p=0,002 p=0,001 p=0,219 p=0,854

Tab. 11: p-Werte aller 3 Gruppen (PG, CH, KO) wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test (nicht-parametrisch) für die diskreten und stetigen Variablen Gefäßanzahl (GA), Gefäßfläche insgesamt (GF), mittlere Fläche je Gefäß (GK), Anzahl VEGF-positiver Gefäße (GP), VEGF-positiver Flächenanteil berechnet (kum.VEGF Signal in %). Für jede Analyse wurden als post-hoc Test paarweise Vergleiche angestellt.

GA (n) in PG subepithelial vs Tiefe	p=0,034
GF (%) in PG subepithelial vs Tiefe	p=0,079
GK (%) in PG subepithelial vs Tiefe	p=0,015
GA (n) in PG 10x vs 20x	P<0,001
GF (%) in PG 10x vs 20x	p=0,009
GK (%) in PG 10x vs 20x	p<0,001
GA (n) in KO subepithelial vs Tiefe	p=0,844
GF (%) in KO subepithelial vs Tiefe	p=0,009
GK (%) in KO subepithelial vs Tiefe	p=0,064
GA (n) in CH spezielle Stelle vs Tiefe	p=0,107
GF (%) in CH spezielle Stelle vs Tiefe	p=0,157
GK (%) in CH spezielle Stelle vs Tiefe	p=0,711
Kum. VEGF Signal (%) in PG subepithelial vs Tiefe	p=0,009
GP (n) in PG subepithelial vs Tiefe	p=0,425
Kum. VEGF Signal (%) in CH spezielle Stelle vs Tiefe	p=0,09
GP (n) in CH spezielle Stelle vs Tiefe	p=0,93
Kum. VEGF Signal (%) in KO subepithelial vs Tiefe	p=0,353
GP (n) in KO subepithelial vs Tiefe	p=0,043

Tab. 12: p-Werte aller Binnenanalysen (nicht parametrische Vergleiche nach dem Wilcoxon Rangsummentest)
 „GA“: Gefäßanzahl, „GF“: korrespondierende Gefäßfläche in % der Gesamtfläche, „GK“: Gefäßkaliber in % der Gesamtfläche, „GP“: Anzahl der VEGF positiven Gefäße

7 Literaturverzeichnis

- Ababneh, O.H., Msallam, M.M., 2014. Bilateral simultaneous pyogenic granuloma after perforated punctal plug insertion. *Ophthal. Plast. Reconstr. Surg.* 30, e113–115.
- Adam, M.G., Berger, C., Feldner, A., Yang, W.-J., Wüstehube-Lausch, J., Herberich, S.E., Pinder, M., Gesierich, S., Hammes, H.-P., Augustin, H.G., Fischer, A., 2013. Synaptojanin-2 Binding Protein Stabilizes the Notch Ligands DLL1 and DLL4 and Inhibits Sprouting Angiogenesis. *Circ. Res.* 113, 1206–1218.
- Altmeyer P., Paech.V., 2011. Enzyklopädie der Dermatologie, Allergologie, Umweltmedizin. Springer Verlag, 2.Auflage.
- Amparo, F., Sadrai, Z., Jin, Y., Alfonso-Bartolozzi, B., Wang, H., Shikari, H., Ciolino, J.B., Chodosh, J., Jurkunas, U., Schaumberg, D.A., Dana, R., 2013. Safety and efficacy of the multitargeted receptor kinase inhibitor pazopanib in the treatment of corneal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 537–544.
- Angelopoulos, A.P., 1971. Pyogenic granuloma of the oral cavity: statistical analysis of its clinical features. *J. Oral Surg. Am. Dent. Assoc.* 1965 29, 840–847.
- Arbabi, E.M., Kelly, R.J., Carrim, Z.I., 2010. Chalazion. *British Medical Journal* 341.
- Bhaskar, S.N., Jacoway, J.R., 1966. Pyogenic granuloma--clinical features, incidence, histology, and result of treatment: report of 242 cases. *J. Oral Surg. Am. Dent. Assoc.* 1965 24, 391–398.
- Butler, E.J., Macintyre, D.R., 1991. Oral pyogenic granulomas. *Dent. Update* 18, 194–195.
- Campbell, R.J., Bell, C.M., Paterson, J.M., Bronskill, S.E., Moineddin, R., Whitehead, M., Gill, S.S., 2012. Stroke rates after introduction of vascular endothelial growth factor inhibitors for macular degeneration: a time series analysis. *Ophthalmology* 119, 1604–1608.
- Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kieckens L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., Nagy, A., 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435–439.
- Claesson-Welsh, L., 2016. VEGF receptor signal transduction - A brief update. *Vascul. Pharmacol.* 86, 14–17.
- Coomber, B.L., Denton, J., Sylvestre, A., Kruth, S., 1998. Blood vessel density in canine osteosarcoma. *Can. J. Vet. Res.* 62, 199–204.
- Dastjerdi, M.H., Al-Arfaj, K.M., Nallasamy, N., Hamrah, P., Jurkunas, U.V., Pineda, R., Pavan-Langston, D., Dana, R., 2009. Topical Bevacizumab in the Treatment of Corneal Neovascularization: Results of a Prospective, Open-label, Non-comparative Study. *Arch. Ophthalmol.* 127, 381–389.

- Ferrara, N., 2009. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur. Cytokine Netw.* 20, 158–163.
- Ferrara, N., Keyt, B., 1997. Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications. *EXS* 79, 209–232.
- Ferry, A.P., 1989. Pyogenic granulomas of the eye and ocular adnexa: a study of 100 cases. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 87, 327–343; discussion 343–347.
- Font, R.L., Croxatto, J.O., Rao, N.A., 2006. Tumors of the Eye and Ocular Adnexa. American Registry of Pathology, Washington DC.
- Fraunfelder, F.W., 2013. Liquid Nitrogen Cryotherapy of Pterygia. *Ophthalmology* 120, e70.
- Fraunfelder, F.W., 2008. Liquid nitrogen cryotherapy for surface eye disease (an AOS thesis). *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 106, 301–324.
- Freitas, T.M.C., Miguel, M.C.C., Silveira, E.J.D., Freitas, R.A., Galvão, H.C., 2005. Assessment of angiogenic markers in oral hemangiomas and pyogenic granulomas. *Exp. Mol. Pathol.* 79, 79–85.
- Giblin, A.V., Clover, A.J.P., Athanassopoulos, A., Budny, P.G., 2007. Pyogenic granuloma - the quest for optimum treatment: audit of treatment of 408 cases. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg. JPRAS* 60, 1030–1035.
- Gilmore, A., Kelsberg, G., Safranek, S., 2010. Clinical inquiries. What's the best treatment for pyogenic granuloma? *J. Fam. Pract.* 59, 40–42.
- Gomes, S.R., Shakir, Q.J., Thaker, P.V., Tavadia, J.K., 2013. Pyogenic granuloma of the gingiva: A misnomer? - A case report and review of literature. *J. Indian Soc. Periodontol.* 17, 514–519.
- Googe, J.M., Mackman, G., Peterson, M.R., Richey, M.A., Apple, D.J., Brick, D.C., Shaw, E., 1984. Pyogenic granulomas of the cornea. *Surv. Ophthalmol.* 29, 188–192.
- Griga, T., Werner, S., Köller, M., Tromm, A., May, B., 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in Crohn's disease: increased production by peripheral blood mononuclear cells and decreased VEGF165 labeling of peripheral CD14+ monocytes. *Dig. Dis. Sci.* 44, 1196–1201.
- Grosskopf, M., 2005. Der "Schwangerschaftstumor" der Gingiva, The pregnancy tumor of the gum. Diss., Johann Wolfgang Goethe-Universität.
- Gündüz K, Shields CL, Shields JA, Zhao D, 1998. PLaque radiation therapy for recurrent conjunctival pyogenic granuloma. *Arch. Ophthalmol.* 116, 538–539.
- Hammes, S., Kaiser, K., Pohl, L., Metelmann, H.-R., Enk, A., Raulin, C., 2012. Pyogenic granuloma: treatment with the 1,064-nm long-pulsed neodymium-doped yttrium aluminum garnet laser in 20 patients. *Dermatol. Surg. Off. Publ. Am. Soc. Dermatol. Surg. Al* 38, 918–923.

- Hare, P.J., 1970. Granuloma pyogenicum. Br. J. Dermatol. 83, 513–515.
- Hartzell MB, 1904. Granuloma pyogenicum. J. Cutan. Dis. Syph. 22:520–5.
- Hullihen, 1844. Case of aneurism by anastomosis of the superior maxillae. Am. J. Dent. 160–162.
- Jafarzadeh, H., Sanatkhani, M., Mohtasham, N., 2006. Oral pyogenic granuloma: a review. J. Oral Sci. 48, 167–175.
- Jiang, D., Zhang, M., Hu, Y., 2007. [Preliminary report of surgical treatment of vernal keratoconjunctivitis with giant papillae]. Zhonghua Yan Ke Za Zhi Chin. J. Ophthalmol. 43, 14–17.
- Johnson, K.E., Wilgus, T.A., 2014. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. Adv. Wound Care 3, 647–661.
- Jo, N., Mailhos, C., Ju, M., Cheung, E., Bradley, J., Nishijima, K., Robinson, G.S., Adamis, A.P., Shima, D.T., 2006. Inhibition of platelet-derived growth factor B signaling enhances the efficacy of anti-vascular endothelial growth factor therapy in multiple models of ocular neovascularization. Am. J. Pathol. 168, 2036–2053.
- Kanski, Bowling, 2012. Klinische Ophthalmologie, 7. Auflage. ed. Elsevier Health Sciences.
- Kellner, U., Kellner, S., 2013. [Intravitreal application of drugs 2013]. Klin. Monatsblätter Für Augenheilkd. 230, 181–200; quiz 201–202. doi:10.1055/s-0032-1324936
- Khorsand, K., Maier, M., Brandling-Bennett, H.A., 2014. Pyogenic Granuloma in a 5-Month-Old Treated with Topical Timolol. Pediatric. Dermatol. 32 , 150-1
- Kim, S.W., Ha, B.J., Kim, E.K., Tchah, H., Kim, T., 2008. The Effect of Topical Bevacizumab on Corneal Neovascularization. Ophthalmology 115, e33–e38.
- Klettner, A., Roider, J., 2012. Mechanisms of Pathological VEGF Production in the Retina and Modification with VEGF-antagonists, in: Studies on Retinal and Choroidal Disorders,Edts Stratton RD, Hauswirth WW, Gardner. Springer, pp. 277–306.
- Klettner, A., Roider, J., 2009. Treating age-related macular degeneration - interaction of VEGF-antagonists with their target. Mini Rev. Med. Chem. 9, 1127–1135.
- Klettner, A., Roider, J., 2009. Intravitreale Medikamenteneingabe: VEGF- und was kommt danach? Ophtalmo-Chirurgie, 117–122.
- Krizova, D., Vokrojova, M., Liehneova, K., Studeny, P., 2014. Treatment of Corneal Neovascularization Using Anti-VEGF Bevacizumab. J. Ophthalmol. 132-178
- Kumaresan, M., Srinivas, C., 2011. Lasers for vascular lesions: Standard guidelines of care. Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol. 77, 349.

- Lampropoulou, A., Ruhrberg, C., 2014. Neuropilin regulation of angiogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 1623–1628.
- Lee, J., Sinno, H., Tahiri, Y., Gilardino, M.S., 2011. Treatment options for cutaneous pyogenic granulomas: A review. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 64, 1216–1220.
- Lucas, R.B., Cawson, R.A., 1998. Lucas's Pathology of tumors of the oral tissues. Churchill Livingstone.
- Lüllmann-Rauch, R., Paulsen, F., 2012. Taschenlehrbuch Histologie. Georg Thieme Verlag, 519-537.
- Luther, H., Banas, J., Daweke-Pickardt, G., Hoffmann, K., Fabry, H., 3, P., 1989. [Cryosurgery of basalioma. Results of a retrospective study. Histologic study of the cryogenic lesion]. *Z. Hautkr.* 64, 748–750, 753–755.
- Malik, M., Murphy, R., 2014. A pyogenic granuloma treated with topical timolol. *Br. J. Dermatol.* 171
- Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L., 2001. VEGF receptor signal transduction. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2001, re21.
- Millsop, J.W., Trinh, N., Winterfield, L., Berrios, R., Hutchens, K.A., Tung, R., 2014. Resolution of Recalcitrant Pyogenic Granuloma with Laser, Corticosteroid, and Timolol Therapy. *Dermatol. Online J.* 17, 20.
- Mirshams, M., Daneshpazhooh, M., Mirshekari, A., Taheri, A., Mansoori, P., Hekmat, S., 2006. Cryotherapy in the treatment of pyogenic granuloma. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* 20, 788–790.
- Mooney, M.A., Janniger, C.K., 1995. Pyogenic granuloma. *Cutis* 55, 133–136.
- Naumann, G.O.H., 1997. Pathologie des Auges: ein Lehr- und Nachschlagewerk. Springer, 494.
- Ojanotko-Harri, A.O., Harri, M.P., Hurtta, H.M., Sewón, L.A., 1991. Altered tissue metabolism of progesterone in pregnancy gingivitis and granuloma. *J. Clin. Periodontol.* 18, 262–266.
- Raulin, C., Petzoldt, D., Werner, S., 1997. [Granuloma pyogenicum--removal with the CO₂ laser]. *Hautarzt* 48, 402–405.
- Rohrbach, J.M., Lieb, W.E., 1998. Tumoren des Auges und seiner Adnexe: Textbuch und Atlas unter besonderer Berücksichtigung des klinischen und morphologischen Bildes ; mit 12 Tabellen. Schattauer Verlag, 94-95.
- Romanos, G.E., Pelekanos, S., Strub, J.R., 1995. A comparative histological study of wound healing following Nd:YAG laser with different energy parameters and conventional surgical incision in rat skin. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 13, 11–16.

- Rosenstein, J.M., Krum, J.M., 2004. New roles for VEGF in nervous tissue—beyond blood vessels. *Exp. Neurol.* 187, 246–253.
- Spraul, C.W., Grossniklaus, H.E., 1996. Tumors of the cornea and conjunctiva. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 7, 28–34.
- Stevenson, W., Cheng, S.-F., Dastjerdi, M.H., Ferrari, G., Dana, R., 2012. Corneal Neovascularization and the Utility of Topical VEGF Inhibition: Ranibizumab (Lucentis) Vs Bevacizumab (Avastin). *Ocul. Surf.* 10, 67–83.
- Tay, Y.K., Weston, W.L., Morelli, J.G., 1997. Treatment of pyogenic granuloma in children with the flashlamp-pumped pulsed dye laser. *Pediatrics* 99, 368–370.
- Thakur, A., Scheinman, R.I., Rao, V.R., Kompella, U.B., 2011. Pazopanib, A Multitargeted Tyrosine Kinase Inhibitor, Reduces Diabetic Retinal Vascular Leukostasis and Leakage. *Microvasc. Res.* 82, 346–350.
- Voron, T., Marcheteau, E., Pernot, S., Colussi, O., Tartour, E., Taieb, J., Terme, M., 2014. Control of the Immune Response by Pro-Angiogenic Factors. *Front. Oncol.* 2, 4.
- Walz, J.M., Boehringer, D., Deissler, H.L., Faerber, L., Goepfert, J.C., Heiduschka, P., Kleeberger, S.M., Klettner, A., Krohne, T.U., Schneiderhan-Marra, N., Ziemssen, F., Stahl, A., 2016. Pre-Analytical Parameters Affecting Vascular Endothelial Growth Factor Measurement in Plasma: Identifying Confounders. *PLoS One* 5, 11.
- Yanoff, M., Duker, J.S., Augsburger, J.J., 2009. *Ophthalmology*. Elsevier Health Sciences, 1428 u. 1431.
- Yao, T., Nagai, E., Utsunomiya, T., Tsuneyoshi, M., 1995. An intestinal counterpart of pyogenic granuloma of the skin. A newly proposed entity. *Am. J. Surg. Pathol.* 19, 1054–1060.
- Ylä-Herttula, S., Rissanen, T.T., Vajanto, I., Hartikainen, J., 2007. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J. Am. Coll. Cardiol.* 49, 1015–1026.
- Yuan, K., Jin, Y.T., Lin, M.T., 2000. The detection and comparison of angiogenesis-associated factors in pyogenic granuloma by immunohistochemistry. *J. Periodontol.* 71, 701–709.
- Yuan, K., Lin, M.T., 2004. The roles of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 in the regression of pregnancy pyogenic granuloma. *Oral Dis.* 10, 179–185.
- Yuan, K., Wing, L.-Y.C., Lin, M.T., 2002. Pathogenetic roles of angiogenic factors in pyogenic granulomas in pregnancy are modulated by female sex hormones. *J. Periodontol.* 73, 701–708.
- Zaki, K., el Hak, R., Amer, W., Saleh, F., El Faras, A., Ragab, L., Nour, H., 1984. Salivary female sex hormone levels and gingivitis in pregnancy. *Biomed. Biochim. Acta* 43, 749–754.

Zouboulis, C.C., 2015. Cryosurgery in dermatology. *Hautarzt* 66, 834–848.

8 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst und selbstständig angefertigt habe, dass ich keine anderen Hilfsmittel verwendet habe und dass ich die Arbeit gemäß den Regeln zur guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt habe. Weiter erkläre ich, dass ich nicht mit demselben Thema zeitgleich an einer anderen Hochschule oder Fakultät die Zulassung zur Promotion beantragt habe oder werde, ich an keiner anderen Hochschule oder an keiner anderen Fakultät dieser Hochschule ein Promotionsverfahren endgültig nicht bestanden habe und dass mir noch kein akademischer Grad entzogen wurde.

Rosa Marie-Joe Entrup

Kiel, den

25.9.18

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich denjenigen danken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. J. Roider danke ich für die Themenstellung der Arbeit, für die Bereitstellung der erforderlichen Drittmittel und die Unterstützung der Arbeit in jeglicher Hinsicht.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. S. Koinzer für die Initiierung und Konzeption des Projektes, das Einwerben der Drittmittel sowie exzellente Betreuung und redaktionelle und inhaltliche Korrektur dieses Textes, für seine Lehre und Bestärkung und für seine Geduld.

Ich danke Frau Dr. S. Bajorat für die ausgezeichnete Betreuung und Hilfsbereitschaft.

Ich danke insbesondere der Sektion Ophthalmopathologie der DOG für die Bereitstellung der erforderlichen Drittmittel

Unter den Kolleginnen und Kollegen der Universitäts-Augenklinik danke ich insbesondere den medizinisch technischen Assistentinnen Monika Marquardt und Serap Luick für ihre aktive und umfangreiche Hilfe bei den Histologien, Frau Prof. A. Klettner für ihren wertvollen wissenschaftlichen Rat sowie zahlreichen weiteren für das freundliche kollegiale Klima, in dem ich hier arbeiten konnte.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Amke Caliebe für Ihre mathematisch-statistische Beratung der ich maßgeblich die korrekte und überzeugende Interpretation und Darstellung des umfangreichen Datenmaterials verdanke.

Großer Dank gilt den Laboren der Augenkliniken der Universitäten Tübingen (Prof. Dr. J.-M. Rohrbach und PD Dr. D. Süßkind), Freiburg (Prof. Dr. C. Auw-Hädrich) und Bonn (Prof. Dr. K. Löffler und PD Dr. M. Herwig) für die Bereitstellung histologischer Präparate.

Den Mitarbeitern der Firma Carl Zeiss Meditec AG, namentlich Herrn P. Attermeyer, möchte ich für die Hilfe bei der Anwendung der AxioVision Software zur Auswertung des Bildmaterials danken.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinen Eltern und Stiefeltern für die bedingungslose Unterstützung sowie meinen Brüdern für die hilfreichen Anregungen in der Layout-Gestaltung. Nicht zuletzt danke ich allen Korrekturlesern für ihre Mühe und kostbaren Hinweise.

10 Curriculum Vitae

- erscheint nicht in der Onlinefassung

11 Publikationen

- 10.-11.10.14 Sandra Bajorat, **Rosa Entrup**, Stefan Koinzer, Amke Caliebe, Bernhard Nölle, Johann Roider. VEGF- und Gefäßanalyse beim pyogenen Granulom der Konjunktiva, Jahrestagung der Deutschsprachigen Ophthalmopathologen, Kiel (Vortrag)
- 25.09.-28.09.14 Stefan Koinzer, **Rosa Entrup**, Sandra Bajorat, Amke Caliebe, Bernhard Nölle, Johann Roider. VEGF- und Gefäßanalyse beim pyogenen Granulom der Konjunktiva, 112. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, Leipzig (Posterbeitrag)
- 24.05.14 **Rosa Entrup**, Stefan Koinzer, Sandra Bajorat, Amke Caliebe, Bernhard Nölle, Johann Roider. VEGF- und Gefäßanalyse beim pyogenen Granulom der Konjunktiva, 64. Tagung der Norddeutschen Augenärzte, Rostock (Vortrag)

Eine Fachpublikation im Journal für „Ocular Oncology and Pathology“ ist in Vorbereitung