

Aus der Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. D. von Schweinitz

**Angiogenetische Faktoren in Plasma und Urin bei Kindern mit Hämangiomen
(basischer Fibroblastenwachstumsfaktor und vaskulärer Endothelwachstumsfaktor)**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Stephan von Hornstein
aus
München

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Weiß

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. R. Wienecke

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. R. Grantzow

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2005

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	1
I. 1 Angiogenese.....	2
I. 1.1 Veränderungen der Gestalt der Zelle	2
I. 1.2 Extrazellulärmatrix (ECM)	3
I. 1.3 Benachbarte Zellen (Perizyten, Makrophagen)	3
I. 1.4 Endogene Regulatoren der Zellproliferation	4
I. 1.5 Angiogenese in pathologischen Prozessen.....	4
I. 2 Angiogenesefaktoren.....	7
I. 2.1 vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor (VEGF).....	8
I. 2.1.1 Charakteristiken der VEGF Proteine	10
I. 2.1.2 Regulation der VEGF Genexpression	10
I. 2.1.3 VEGF Rezeptoren.....	10
I. 2.1.4 Signaltransduktion	11
I. 2.1.5 VEGF in physiologischer und pathologischer Angiogenese	11
I. 2.2 basic fibroblast growth factor (bFGF)	12
I. 2.2.1 Charakteristiken von bFGF	13
I. 2.2.2 Wirkungsmechanismus von FGFs	13
I. 2.2.3 FGF Rezeptoren	13
I. 2.2.4 Signaltransduktion	15
I. 2.2.5 bFGF und Pathologie	15
I. 3 Benigne vaskuläre Tumoren des Gefäßendothels im Kindesalter.....	17
I. 3.1 Definition und Klinik.....	17
I. 3.2 Klassifikation	18
I. 3.3 Besprechung einzelner Formen benigner vaskulärer Tumoren.....	21
I. 3.4 Diagnose.....	22
I. 3.5 Therapie.....	23
I. 3.6 Pathogenese von Hämangiomen	25
I. 4 Fragestellung.....	27

II. Materialien und Methoden	28
II. 1 Patientenkontingent	28
II. 2 Kontrollgruppe	28
II. 3 Materialien	29
II. 3.1 Proben	29
II. 3.2 Enzyme linked immunoassay (ELISA)	29
II. 3.3 Reagenzien.....	30
II. 4 Versuchsablauf	31
II. 4.1 Auswertung und statistische Analyse.....	33
III. Ergebnisse	34
III. 1 Ergebnisse der EDTA-Plasma Messungen von bFGF und VEGF	34
III. 1.1 Kontrollproben	34
III. 1.2 Hämangiopatients.....	37
III. 1.3 Hämangiogröße und klinisches Bild.....	39
III. 1.4 bFGF im Vergleich zum Kontrollkollektiv.....	42
III. 2 Messungen der bFGF-Konzentrationen im Urin	44
III. 2.1 Kontrollgruppe	44
III. 2.2 Hämangiopatients.....	45
III. 3 bFGF und VEGF Plasmaspiegel im Verlauf	46
III. 4 Falldarstellung einer Patientin mit Hämangiomatose	48
IV. Diskussion	53
IV. 1 bFGF und VEGF im Plasma	55
IV. 1.1 Kontrollgruppe	55
IV. 1.2 Hämangiopatients.....	56
IV. 1.3 bFGF/VEGF und Tumorgröße	57
IV. 1.4 Sekundäre bFGF/VEGF Erhöhung	58

IV. 2 bFGF im Urin	59
IV. 3 Hämangiomatose	61
IV. 4 bFGF bzw. VEGF und ihre klinische Bedeutung.....	63
IV. 5 anti-angiogenetische Therapie.....	64
V. Zusammenfassung	68
VI. Allgemeines Abkürzungsverzeichnis.....	70
VII. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	72
VII. 1.1 Abbildungen.....	72
VII. 1.2 Tabellen.....	73
VIII. Literaturverzeichnis	74
IX. Danksagung.....	84
Lebenslauf.....	85

I. Einleitung

Hämangiome sind die am häufigsten im Säuglingsalter und Kleinkindesalter auftretenden gutartigen Tumoren des Gefäßendothels. Mit dem raschen Wachstum in den ersten Lebenswochen und der meist spontanen Rückbildung in den darauffolgenden Jahren zeigen sie einen charakteristischen klinischen Verlauf, der auch als wichtiges diagnostisches Kriterium zur Abgrenzung zu anderen vaskulären Tumoren dient. Trotz der spontanen Rückbildungstendenz der Hämangiome wird bei kosmetisch störenden oder Organfunktionen beeinträchtigenden Hämangiomen eine frühe konsequente Therapie innerhalb der ersten Lebenswochen empfohlen. So wird versucht, die Progression des Wachstums zu verringern, um die Bildung von kosmetisch störendem Narbengewebe und das Auftreten von Komplikationen wie zum Beispiel Ulzerationen oder Infektionen zu verhindern. Allerdings sind gerade bei schnell wachsenden, multiplen und/oder viszeralen Hämangiomen die Therapieerfolge zur Zeit noch nicht befriedigend.

Neue Behandlungsalternativen erhofft man sich vor allem im Bereich der Angiogenese, der Bildung neuer Blutgefäße aus vorhandenem Gefäßendothel. Ein verbessertes Verständnis der pathologischen Vorgänge bei der Entstehung von Hämangiomen könnte zu einer spezifischen anti-angiogenetischen Behandlung führen. Damit ließen sich möglicherweise bessere Therapieerfolge bei geringeren Nebenwirkungen erzielen. Entscheidend dabei ist die Frage nach den Promotoren der Angiogenese und deren Zusammenwirken. Im Bereich der Zytokine sind vor allem der basische Fibroblastenwachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor, bFGF) und der vaskuläre Endothelwachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) als wichtige angiogenetische Faktoren bei der Pathogenese von Hämangiomen beschrieben.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die Spiegel der Angiogenesefaktoren bFGF und VEGF in Plasma und Urin von Hämangiompatienten im Vergleich zu Kontrollproben erhöht sind, und wenn dies der Fall ist, welche Folgerungen sich daraus für die Diagnostik und Therapie ergeben könnten.

Zuerst wird eine kurze Einführung in die Angiogenese gegeben mit Schwerpunkt auf die zu untersuchenden Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF. Im Weiteren werden der Versuchsablauf und die Ergebnisse dargestellt. Im letzten Teil werden die Ergebnisse diskutiert und mit denen anderer Arbeiten aus der Literatur verglichen.

I. 1 Angiogenese

Die Bildung neuer Blutgefäße aus vorhandenem Gefäßendothel wird als Angiogenese bezeichnet. Sie stellt ein komplexes Zusammenspiel vieler Faktoren auf zellulärer und molekularer Ebene dar. Die Angiogenese hängt von den Mechanismen ab, die auf die Endothelproliferation stimulierend oder inhibierend wirken. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Anwesenheit von angiogenetischen Faktoren, d.h. Mediatoren, welche die Gefäßneubildung und Gefäßdifferenzierung stimulieren. Die alleinige Präsenz dieser Faktoren führt allerdings noch nicht zur Aktivierung von ruhenden Endothelzellen. Es bedarf zusätzlich einer Sensibilisierung der Zelle für diese Wachstumsfaktoren, z.B. über Erhöhung der Rezeptordichte auf der Zellmembran oder über Modifizierung der Extrazellulärmatrix (ECM) [55, 71].

Die Neubildung von Gefäßen spielt vor allem in der Embryonalentwicklung eine Rolle. Im gesunden erwachsenen Organismus findet, außer bei der Menstruation der Frau und bei der Wundheilung, praktisch keine Angiogenese statt. Man spricht vom „ruhenden“ Endothel, das jederzeit im Rahmen eines pathologischen Prozesses reaktiviert werden kann. Endothelzellen haben ständig die Tendenz zu proliferieren und sich auszudehnen, werden aber durch einen vielgestaltigen Mechanismus davon abgehalten. Im Folgenden werden die in der Literatur diskutierten wichtigsten Mechanismen beschrieben, die auf die Gefäßneubildung einwirken.

I. 1.1 Veränderungen der Gestalt der Zelle

Die Endothelzelle gehört zu den Zellen des Körpers, deren Wachstum durch die Gestalt der Zelle kontrolliert wird [27]. Versuche zeigten, dass bis zu einem bestimmten Wachstumslimit in der Zellausdehnung ($<500 \mu\text{m}^2$) einige der Angiogenese stimulierenden Faktoren z.B. bFGF, keine mitogene Wirkung auf die Zelle hatten, sondern die Zelle zur Differenzierung anregten. Ließ man die Zelle frei wachsen, korrelierte das Wachstum mit einer erhöhten DNA-Synthese bei Anwesenheit einer konstanten bFGF Konzentration [36]. Dieses Phänomen ist darauf zurückzuführen, dass mechanische Strukturen auf der Zelloberfläche für das Funktionieren von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Hormonen notwendig sind. Diese Strukturen (z.B. Kollagen, Fibronectin) liegen in der Extrazellulärmatrix und sind über spezifische Rezeptoren und Integrine auf der Zelloberfläche mit der Zelle verbunden. Durch Zug an diesen Strukturen kann die Zelle eine Spannung innerhalb ihres Zytoskeletts erzeugen.

Je nach Art des Rezeptors oder des Integrins, an denen der Zug erfolgt, können nun spannungsspezifische Signalkaskaden aktiviert werden, die zu einer erhöhten DNA-Synthese im Nukleus führen.

I. 1.2 Extrazellulärmatrix (ECM)

Neben den oben erwähnten mechanischen Strukturen weist die Extrazellulärmatrix auch noch andere Komponenten auf, die bei der Regulierung der Angiogenese eine Rolle spielen. So binden bestimmte Proteoglykane in der ECM Wachstumsfaktoren, verhindern so den Kontakt mit der Endothelzelle und bilden ein Reservoir dieser Stoffe. Sowohl VEGF, als auch bFGF werden von Heparansulfatproteoglykanen (HSPG) in der ECM gebunden und können bei Bedarf proteolytisch freigesetzt werden oder durch HSPG zu spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche vermittelt werden [37]. Auch nimmt man an, dass die Konzentration von zirkulierenden Angiogenesefaktoren im Blut möglichst auf einem niedrigen Level gehalten wird. Freie, lösliche Rezeptoren oder Rezeptorproteine binden mit hoher Affinität spezifisch Angiogenesefaktoren im Blut und können so zum Beispiel die von Tumoren sezernierten Faktoren abfangen [42, 81]. Über die Mechanismen der Sekretion von Angiogenesefaktoren und deren Steuerung ist bisher allerdings wenig bekannt.

I. 1.3 Benachbarte Zellen (Perizyten, Makrophagen)

Auch benachbarte Zellen wirken sich auf die Gefäßneubildung aus. So können beispielsweise Perizyten in direkter Nachbarschaft zum Endothel gefunden werden. Diese sezernieren den (in vitro) Angiogeneseinhibitor „tumor growth factor“ (TGF- β), der über Kontakt mit der Endothelzelle aktiviert wird. Daraufhin kommt es zur autokrinen Stimulation der Endothelzelle durch TGF- β [3].

Ferner wird den Makrophagen eine Schlüsselrolle in der Angiogenese zugeschrieben. Sie können ein neues Gefäßwachstum auf unterschiedliche Art und Weise vermitteln. „In vitro“ Versuche konnten zeigen, dass Makrophagen eine große Anzahl an Faktoren produzieren, welche die Endothelzelle zur Proliferation, Migration und Differenzierung stimulieren können [85]. Einigen dieser Faktoren konnten auch in vivo angiogenetische Eigenschaften nachgewiesen werden. Ein weiterer Mechanismus der Makrophagen, das Endothelwachstum zu beeinflussen, ist die Modifizierung der Extrazellulärmatrix. Wie

oben beschrieben, hat die Zusammensetzung der ECM einen großen Einfluss auf die Zellgestalt und Morphologie der Zelle, wodurch es zu Veränderungen im Zellwachstum kommen kann [37, 38]. Makrophagen sind in der Lage, die Zusammensetzung der ECM der Endothelzelle entweder durch eigene Produktion von Matrixbestandteilen oder durch Sekretion von Proteasen zu verändern. Obwohl Makrophagen die Angiogeneseaktivität eher steigern [68], können sie unter bestimmten Umständen über die Sekretion von Elastase Angiostatin, einen der potentesten Angiogeneseinhibitoren, aus seiner Bindung mit Plasminogen lösen [15] und die Proliferation hemmen [25, 61].

I. 1.4 Endogene Regulatoren der Zellproliferation

In den letzten Jahren wurden einige endogene Regulatoren der Zellproliferation entdeckt, die die Angiogenese hemmen. So findet man in einigen größeren Proteinen Fragmente mit hemmender Wirkung auf das Endothel. Das Protein als solches wirkt aber nicht inhibitorisch (mit Ausnahme des Platelet Factor 4). Folgende Endothelinhibitoren werden genannt: Fibronectin, Prolactin, Thrombospondin, Angiostatin, Platelet Factor-4, Murine „endothel growth factor“ (EGF). Prolactin (16 kDA) hemmt z.B. die mitogene Wirkung von VEGF und bFGF auf die Endothelzelle, indem es inhibierend auf den Rezeptor und die „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK) wirkt [13].

I. 1.5 Angiogenese in pathologischen Prozessen

Bei vielen Erkrankungen spielt die Neubildung von Blutgefäßen eine wichtige Rolle. Auch inadäquate Angiogenese kann zu pathologischen Prozessen z.B. im Rahmen der Wundheilung führen.

Untersuchungen zeigten vermehrt Makrophagen in Tumorgewebe und bei chronischen Entzündungen. Makrophagen produzieren sowohl positive als auch negative Angiogeneseregulatoren und stellen so eine Schlüsselzelle in der Angiogenese dar. Auch Mastzellen produzieren angiogenetisch wirksame Faktoren. So bilden sie das Hauptreservoir von bFGF bei chronischen Entzündungen und bei Hämangiomen der Haut [69]. Auf großes therapeutisches Interesse stößt derzeit die Frage nach der pathophysiologischen Wirkung der Angiogenesefaktoren und Möglichkeiten, diese zu inhibieren. Bei verschiedenen Tumoren wurden erhöhte Werte von Angiogenesefaktoren

(v.a. bFGF) im Blut und Urin gefunden [32, 56, 65]. Tumore fördern die Angiogenese, indem sie Wachstumsfaktoren sezernieren, welche die Gefäßeinsprossung, die Proliferation, die proteolytische Aktivität und die Kapillarausreifung stimulieren [74]. Bei einigen Patienten mit Tumoren zeigten sich allerdings auch erniedrigte Werte an Angiogenesefaktoren, was darauf schließen lässt, dass diese Tumore andere Mechanismen verwenden, um die Gefäßneubildung zu stimulieren.

Neuere Untersuchungsergebnisse lassen vermuten, dass die Tumorangio-genese nicht nur von Endothelzellen und Tumorzellen abhängig ist, sondern auch von dem Zusammenwirken zwischen Thrombozyten und Endothel. Thrombozyten können sowohl die Angiogenese fördernde, als auch inhibierende Wachstumsfaktoren sezernieren und verändern vielleicht so das angiogene Gleichgewicht des Tumors. Die Hypothese würde die klinische Beobachtung erklären, dass eine antikoagulative Therapie nicht nur vor hämostatischen Komplikationen schützt, sondern nebenbei auch noch einen direkten antitumoralen Effekt zeigt [67].

Generell wird es eine Vielzahl weiterer positiver und negativer Mechanismen geben, die Gefäßneubildung zu aktivieren oder inhibieren.

Im weiteren soll ein kurzer Überblick über die Gruppe der Angiogenesefaktoren gegeben werden mit Schwerpunkten auf den "vascular endothelial growth factor" (VEGF) und dem „basic fibroblast growth factor“ (bFGF).

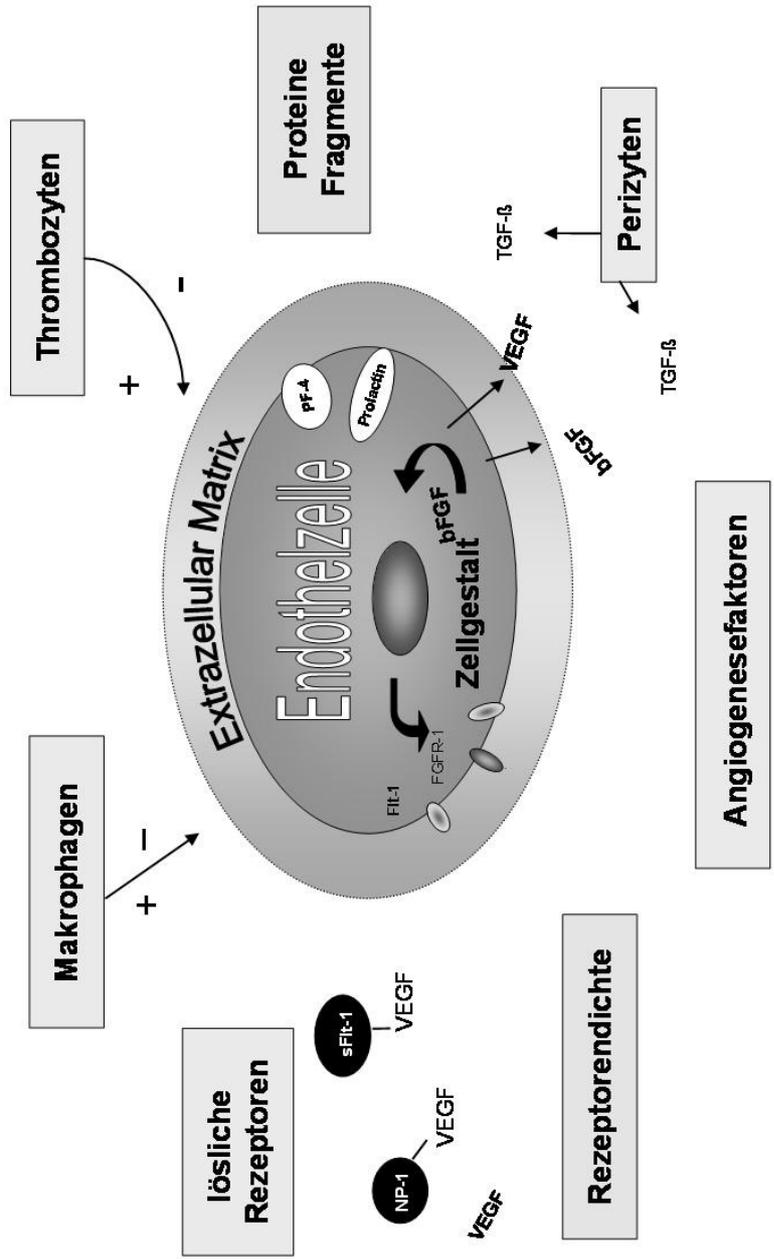


Abbildung 1: Darstellung einiger Faktoren, welche die Angiogenese aktivieren oder inhibieren

Abb.1: Angiogenese

I. 2 Angiogenesefaktoren

Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurde eine Reihe von Peptiden mit mitogener oder chemotaktischer Wirkung auf das Endothel isoliert und charakterisiert. Sie stellen eine heterogene Gruppe von Wachstumsfaktoren dar, die als „Angiogenesefaktoren“ bezeichnet werden. Wachstumsfaktoren gehören zu der Familie der Zytokine. Zytokine sind sezernierte Signalproteine, die mit spezifischen zellulären Rezeptoren reagieren. Sie regulieren Wachstums-, Regenerations- und Differenzierungsprozesse. Zytokine stellen Faktoren der interzellulären Kommunikation dar. Ihre biologische Aktivität liegt im Bereich von 10^{-10} bis 10^{-13} M. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Zytokingruppen.

ZYTOKINE	
Zytokin-Gruppe	Einzelfaktoren
Interleukine (IL)	IL-1, IL-2, u.s.w...
Interferone (IFN)	IFN- α , IFN- β , IFN- γ
Colony stimulating factors (CSF)	G-CSF, M-CSF, GM-CSF
Anderer Wachstumsfaktoren	TGF β , PDGF, bFGF, VEGF
Zytotoxine	TNF- α , TNF- β , NKCF

Tab.1: Zytokine

Die Gruppe der Wachstumsfaktoren umfasst eine Reihe von unterschiedlichen Faktoren, die Wachstum, Proliferation und Stimulation verschiedener Zelltypen hervorrufen. Die hämopoetischen Wachstumsfaktoren werden nach ihrem Verhalten in Zellkulturen als „colony stimulating factors“ (CSF) in eine eigene Gruppe eingeteilt. Tabelle 2 zeigt die wichtigsten anderen Wachstumsfaktoren, die das Endothelzellwachstum fördern und/oder die Angiogenese stimulieren:

Angiogene Wachstumsfaktoren
fibroblast growth factors (FGFs)
platelet derived growth factors (PDGFs)
transforming growth factor- β (TGF- β)
tumor necrosis factor (TNF)
vascular endothelial growth factor (VEGF)

Tab.2: Angiogene Wachstumsfaktoren

Als Grundlage für die weiteren Untersuchungen sollen die Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF beschrieben werden.

I. 2.1 vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor (VEGF)

Unter den heute bekannten Angiogenesefaktoren nimmt der Vascular endothelial growth factor/ Vascular permeability factor (VEGF) eine zentrale Rolle als Regulator der physiologischen als auch pathologischen Angiogenese ein. Es deutet viel darauf hin, dass VEGF ein wichtiger mitogener Stimulus der embryonalen Gefäßneubildung und Ausdifferenzierung ist und zur Entstehung pathologischer, neoplastischer und inflammatorischer Prozesse beiträgt [21, 46].

Neben seiner für Endothelzellen spezifischen mitogenen Aktivität, die ihm 1989 durch seine Entdeckung durch Ferrara und Henzel et al. [22] die Bezeichnung Vaskulärer Wachstumsfaktor einbrachte, zeigt VEGF auch, wie schon 1983 von Senger et al. [80] beschrieben, eine die Gefäßpermeabilität erhöhende Aktivität (Vaskulärer Permeabilitätsfaktor).

In den letzten Jahren wurden weitere Mitglieder der VEGF-Familie isoliert.

VEGF & VEGF verwandte Moleküle	Vermutete biophysiologische Eigenschaft
VEGF	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Siehe unten
VEGF-B	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Stimulierung der Endothelzellproliferation über VEGFR-1 ▪ Heterodimerbildung mit VEGF (Erniedrigung der Bioverfügbarkeit von VEGF?)
VEGF-C	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Keine Heparinbindung ▪ Gefäßpermeabilitätserhöhung ▪ Stimulierung der Endothelzellproliferation über VEGFR-2, nicht VEGFR-1 ▪ Aktivierung der Lymphangiogenese und Differenzierung des lymphatischen Endothels über den lymphatischen Endothelrezeptor VEGFR-3
VEGF-D	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Stimulierung die Endothelzellproliferation ▪ Erhöhte Werte während der Entwicklung der fetalen Lunge ▪ Lymphangiogene Wirkung über VEGFR-3
PlGF (placenta growth factor)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mitogene Wirkung auf die postkapillären Venolen über VEGFR-1, nicht VEGFR-2

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Heterodimerbildung mit VEGF -> Erniedrigung der Bioverfügbarkeit von VEGF ▪ Erhöhung der Aktivität von suboptimalen VEGF Konzentrationen
--	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

[57, 95]

Tab.3: VEGF

Die Rolle der VEGF-ähnlichen Moleküle ist noch nicht vollständig geklärt, aber man nimmt an, dass in pathologischen Prozessen auf unterschiedliche Repertoires von VEGF und VEGF ähnlichen Molekülen zurückgegriffen wird, um die Angiogenese zu stimulieren [57].

Biochemische Daten von VEGF	
VEGF-Daten	Charakterisierung
Gen-Lokalisierung	Chromosom 6p21.3
Zusammensetzung	Homodimeres Glykoprotein; Isoform: 121, 145, 165, 189, 206 Aminosäuren
Molekulargewicht	VEGF ₁₆₅ 45 kDA
Produzenten	Endothelzelle
Zielzelle	Endothelzelle
Rezeptoren	Flt-1 (VEGFR-1); sFlt-1 (soluble) Flt-1/KDR (VEGFR-2)

Tab.4: Biochemische Daten von VEGF

VEGF wirkt mitogen auf das Gefäßendothel von Arterien, Venen und Lymphgängen und induziert die Angiogenese. Durch Stimulation der Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und A1 agiert VEGF als „Überlebensfaktor“. Auch erhöht VEGF die Gefäßpermeabilität, was zu der früheren Bezeichnung „vascular permeability factor“ führte. Zudem stimuliert VEGF die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (nitric oxygen, NO) und führt somit zur Vasodilatation und Hypotension. Durch Hemmung unreifer dendritischer Zellen ohne signifikante Wirkung auf reife Zellen kann über VEGF eine Induktion der Immunantwort beim Tumorwachstum vermieden werden. VEGF besitzt auch eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten.

I. 2.1.1 Charakteristiken der VEGF Proteine

Die verschiedenen Isoformen von VEGF haben aufgrund ihrer molekularen Zusammensetzung unterschiedliche Eigenschaften in ihrer Aktivität, Löslichkeit und Bindungsaffinität. VEGF₁₆₅ ist die am häufigsten vorkommende Isoform, die sowohl in gelöster Form, wie auch in ungelöster, in der Extrazellulärmatrix (ECM) an Heparin gebundener Form, anzutreffen ist. VEGF₁₂₁ ist ein schwach saures Polypeptid in frei löslicher Form, ohne Bindungsaffinität zu Heparin. VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₁ binden mit der höchsten Affinität an Heparin und sind nahezu vollständig in der ECM sequestriert [64]. Man nimmt an, dass diese Formen durch Heparin und Heparinase und/oder Plasmin aus der ECM-Bindung gespalten und in löslicher Form frei werden können. Es scheint daher mindestens zwei Mechanismen zu geben, wie VEGF der Endothelzelle bereitgestellt wird. Zum einen als frei lösliche Proteine (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅) und zum anderen durch Spaltung der längeren Formen nach Proteasenaktivierung.

I. 2.1.2 Regulation der VEGF Genexpression

Einer der Hauptregulatoren der VEGF Genexpression ist der Sauerstoffpartialdruck (pO_2). Bei erniedrigtem pO_2 findet man in einer Vielzahl von normalen und transformierten Zellen eine erhöhte VEGF mRNA Expression [52, 83]. Auch eine Reihe von Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren ist in der Lage, die VEGF mRNA Expression zu regulieren.

I. 2.1.3 VEGF Rezeptoren

Es wurden bis heute zwei Tyrosin Kinase Rezeptoren für VEGF (VEGF-A) identifiziert: Flt-1 (VEGFR-1) und Flk-1/KDR (VEGFR-2) [14] [92]. Sie gehören als Unterfamilie der „platelet derived growth factor“ (PDGF) Rezeptor-Klasse an und sind auf Endothelzellen zu finden. Aber auch bei anderen Zellarten wurden VEGFRs oder deren mRNA nachgewiesen, wie z.B. in malignen Melanomen- oder Chorionkarzinom-Zelllinien. Dabei ist die Funktion der VEGFRs aber noch nicht geklärt. Beide Rezeptoren Flt-1 und KDR/Flk-1 bestehen aus sieben Immunglobulin-ähnlichen Bereichen, die in der Extrazellulärmatrix liegen, einer Transmembranregion und einer intrazellulär liegenden Tyrosin-Kinase-Sequenz, die durch einen Kinase-Einschub unterbrochen ist [49, 82, 91].

Auch wurde eine lösliche Form des Flt-1 Rezeptors (sFlt-1) identifiziert [42, 43], die VEGF₁₆₅ mit hoher Affinität bindet und die durch VEGF induzierte Mitogenese inhibiert [43]. Ein weiterer spezifischer Rezeptor für VEGF ist das Neuropilin-1 (NP-1), das vor allem den mitogenen Effekt von VEGFR-2 steigert.

I. 2.1.4 Signaltransduktion

VEGF induziert die Phosphorylierung von mehreren Proteinen wie Phosphatidylinositol 3-kinase und ras GTPase aktivierendem Protein (GAP). Welcher der VEGF-Rezeptoren an diesen Prozessen beteiligt ist, ist nur ansatzweise geklärt. Ein Beispiel für die unterschiedliche Funktion der VEGF-Rezeptoren zeigt die Bildung und Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (NO). NO erwies sich als wichtiger Mediator von Endothelfunktion durch die Regulierung des Gefäßtonus und der Proliferation von Gefäßzellen. Die „endothelial nitric oxide synthase“ (eNOS) vermittelt über Bildung von NO die von VEGF induzierte Angiogenese und Endothelfunktion. Als Antwort auf VEGF kommt es über VEGFR-2 zu einer erhöhten eNOS Expression [45]. Die Ausschüttung von NO scheint vor allem über VEGFR-1 zu erfolgen, der selber aber keine Wirkung auf die eNOS Proteinexpression zeigt.

I. 2.1.5 VEGF in physiologischer und pathologischer Angiogenese

Viele Tumorzellen produzieren VEGF in vitro. „In situ“ Hybridisierungs-Studien zeigten erhöhte VEGF mRNA Expression in den meisten menschlichen Tumoren wie Karzinomen der Lunge, Brust, Gastrointestinaltrakt, Milz, Ovar und Endometrium, ebenso in Tumoren im intrakraniellen Bereich wie Glioblastoma multiforme und kapillären Hämangioblastomen. In einigen Untersuchungen konnten dementsprechend auch erhöhte VEGF Serumkonzentrationen bei Patienten mit Tumoren gegenüber denen ohne Neoplasie gefunden werden. Durch einen spezifischen monoklonalen VEGF-Antikörper konnte das Wachstum einiger Tumorzellreihen teilweise oder nahezu vollständig gehemmt werden [5, 7, 51, 97]. Dies und einige weitere Versuche der letzten Jahre lassen vermuten, dass VEGF für eine effektive Tumorangiogenese notwendig ist.

I. 2.2 basic fibroblast growth factor (bFGF)

Der „basic fibroblast growth factor“ gehört zu der Familie der Fibroblastenwachstumsfaktoren. Hierbei handelt es sich um eine große Gruppe von derzeit einundzwanzig in der Literatur beschriebenen Proteinen mit ähnlicher Struktur und der Eigenschaft, an Heparin und Heparansulfat zu binden [58]. Die Einteilung der Faktoren erfolgt numerisch. Der basische Fibroblasten Wachstumsfaktor ist gleichbedeutend mit dem FGF-2. In **Tabelle 5** sind die biochemischen Daten von bFGF dargestellt [62].

In den frühen 70iger Jahren wurde der bFGF zusammen mit dem sauren FGF als erster seiner Klasse identifiziert [4, 31]. Bei den Fibroblastenwachstumsfaktoren handelt es sich um Moleküle mit einem vielfältigen Wirkungsspektrum. Sie zeigen sowohl „in vitro“ als auch „in vivo“ chemotaktische, neurotrophische, mitogene und angiogenetische Aktivität. Dieses wird erreicht durch die Interaktion mit einer großen Anzahl an niedrig- und hochaffinen Rezeptoren. Erhöhte Konzentrationen von Fibroblastenwachstumsfaktoren finden sich vor allem in der Extrazellulärmatrix und an der Zelloberfläche. In der ECM ist bFGF an Heparin und Heparansulfatproteoglykanen gebunden und kann bei Bedarf proteolytisch schnell freigesetzt werden. Auch erleichtern diese Strukturen die Bindung von bFGF an seine spezifischen Rezeptoren [59, 60]. Der bFGF wird von einer Vielzahl an Zellen gebildet.

Biochemische Daten von FGF-2	
bFGF - Daten	Charakterisierung
Genlokalisierung	Chromosom 4q26-q27
Zusammensetzung	12 anti-parallele β -Faltblattstrukturen in Form einer trigonalen Pyramide
Molekulargewicht	18, 22, 22.5, 24 kD
Produzenten	große Anzahl an verschiedenen Zellen
Zielzelle	Fibroblast, Endothelzelle, glatte Muskelzelle u.a.
Rezeptoren	FGFR-1; FGFR-2

Tab.5: Biochemische Daten von bFGF

Die unterschiedlichen Isoformen von bFGF unterscheiden sich vor allem darin, dass die schwereren Moleküle eine sogenannte „nuclear localizing sequence“ (nls) aufweisen,

welche den Wachstumsfaktor zum Nukleus leitet. Die leichte Form mit 18kD bleibt im Wesentlichen im Cytosol.

I. 2.2.1 Charakteristiken von bFGF

Der menschliche basische Fibroblasten Wachstumsfaktor wird in vier Isoformen exprimiert. Die mit einem Molekulargewicht von 18 kD aus 155 Aminosäuren (AS) bestehende Form bFGF₁₅₅ ist vorwiegend im Cytosol lokalisiert. Man findet auch außerhalb der Zelle eine signifikante Konzentration dieser Isoform. Dahingegen konnten die schwereren Formen des bFGFs mit 22, 22.5 und 24 kD (196, 201 und 210 AS) nur im Nukleus und in den Ribosomen nachgewiesen werden [6, 72]. Wie die 18 kD-Form des bFGFs allerdings aus der Zelle gelangt, ist unklar. Eine Signalkaskade für die Sekretion konnte nicht nachgewiesen werden [59].

Es wird daher angenommen, dass bFGF bei Schaden oder Tod der Zelle freigesetzt wird.

I. 2.2.2 Wirkungsmechanismus von FGFs

Viele Zellen zeigen eine Antwort auf bFGF Stimulation. Jedoch reagieren die Zellen sehr unterschiedlich auf den Faktor. So kann er sowohl die Zellteilung stimulieren, als auch auf eine nicht mitogene Weise wirken. Diese von der Mitose unabhängige Aktivität beinhaltet zum Beispiel die Stimulation oder Hemmung der Synthese von spezifischen zellulären Proteinen, die Induktion von Zellmotilität und Migration und eine anti-apoptotische Wirkung. Bei einigen kultivierten Tumorzellen konnte auch ein das Wachstum inhibierender Effekt gezeigt werden [78].

I. 2.2.3 FGF Rezeptoren

Zwei Typen von Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen wurden als Bindungsstellen für bFGF beschrieben. Heparansulfatproteoglykane, die in großer Anzahl auf der Zelle zu finden sind, binden FGF mit geringer Affinität. Spezifische FGF-Rezeptoren zeigen eine hohe Bindungsaffinität und weisen eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität auf. Dies ist charakteristisch für viele Wachstumsfaktoren [8, 73].

Heparansulfatproteoglykane (HSPG): Heparin und Heparansulfat sind als Glycosaminoglykane bekannte Polysaccharide. Während Heparin nur durch Gewebsmastzellen gebildet wird, findet man Heparansulfat in allen Geweben und Organen von Säugetieren, wo sie an Coreproteinen als Heparansulfatproteoglykane (HSPG) gebunden sind. Bei den HSPGs handelt es sich um eine Klasse von Molekülen mit unterschiedlichen Funktionen, die auf der Zelloberfläche und in der Extrazellulärmatrix zu finden sind. Dort interagieren sie mit bFGF und steuern dessen Distribution und Funktion [39].

FGF-Rezeptoren: Die spezifischen FGF-Rezeptoren stammen von vier getrennten Genen (FGFR1-4) ab. Neuere Erkenntnisse lassen vermuten, dass bFGF zwei Bindungsstellen aufweist, die möglicherweise eine Bindung zu zwei Rezeptoren oder eine Doppelbindung zu einem Rezeptor zulassen [41]. HSPGs können die Affinität von bFGF zu seinem Rezeptor erhöhen und als eine Art „Brücke“ die Dimerisierung des Rezeptors erleichtern [99]. Es wurde eine Heparin Bindungsstelle auf dem FGFR-1 identifiziert [41], was für die Möglichkeit der Existenz eines Dreierkomplexes zwischen bFGF, FGFR-1 und HSPG sprechen würde (**Abb.2**).

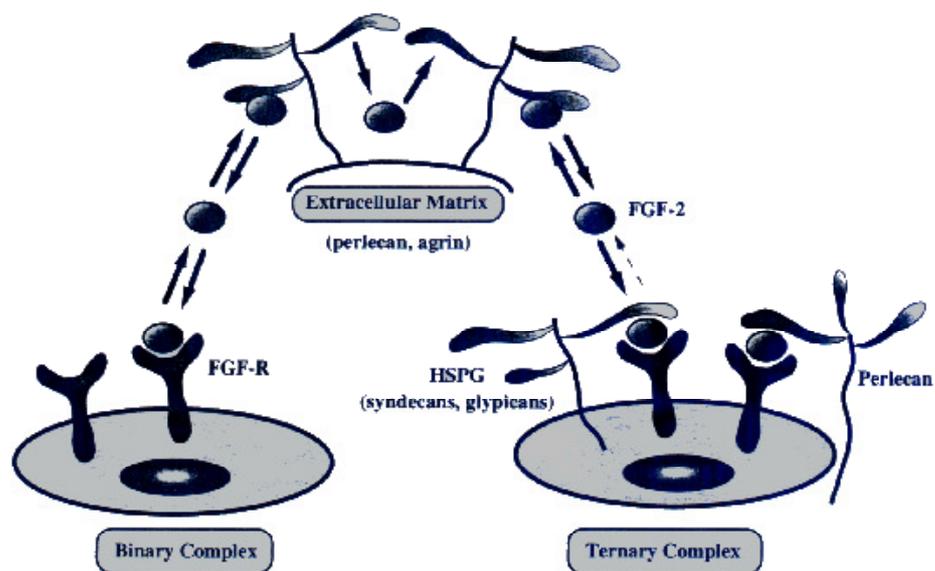


Abb.2: Modell der FGF-2 Regulation durch HSPG

Das in der Extrazellulärmatrix gelegene HSPG bindet bFGF und kann so aktives bFGF speichern. Die Dichte von HSPG innerhalb der Matrix beeinflusst den bFGF Transport und die Freisetzung. Das mit der Zelle assoziierte HSPG kann sowohl in der Zellmembran verankert (z.B. Syndekane, Glypikane), als auch nur mit ihr verbunden sein (z.B. Perlekane). Die Größe und Art der zellulären Antwort mag von der Fähigkeit abhängen, hochaffine Dreierkomplexe zwischen bFGF, FGFR und HSPG bilden zu können. [59]

I. 2.2.4 Signaltransduktion

bFGF aktiviert eine Reihe von intrazellulären Signalkaskaden über die Autophosphorylierung von FGF-Rezeptor an verschiedenen Tyrosin Resten. Dies führt z.B. über mehrere Schritte zur Aktivierung der Mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK; mitogen activated protein kinase). Diese aktiviert durch Phosphorylierung Transkriptionsfaktoren im Nukleus (**Abb.3**).

Welche spezifische Signalkaskade aktiviert wird und welche Moleküle involviert sind, hängt von dem FGF-Rezeptor ab. Auch kann bFGF in die Zelle aufgenommen werden und so intrazellulär, als auch intranukleär eine Signalantwort bewirken und z.B. die Zellproliferation und –migration stimulieren [84].

I. 2.2.5 bFGF und Pathologie

In „knock-out“ Experimenten mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass keine lebenswichtige Funktion allein von bFGF abhängig ist. Dies mag daran liegen, dass die verschiedenen FGFs die gleichen FGF-Rezeptorvarianten triggern. Wie schon oben beschrieben ist der basische Fibroblastenwachstumsfaktor ein sehr potenter angiogenetischer Faktor mit einer hohen biologischen Aktivität auf das vaskuläre System. Da das Wachstum von soliden Tumoren stark von der Gefäßversorgung abhängt, zeigt sich großes Interesse an der Beeinflussung von angiogenetischen Prozessen. Einige klinische Studien zeigten erhöhte Werte im Serum und Urin von angiogenetischen Faktoren bei Patienten mit soliden Tumoren gegenüber der Kontrollgruppe [32, 56, 65]. Welchen Stellenwert diese Faktoren innerhalb der Tumorgenese haben, müssen weitere Studien zeigen.

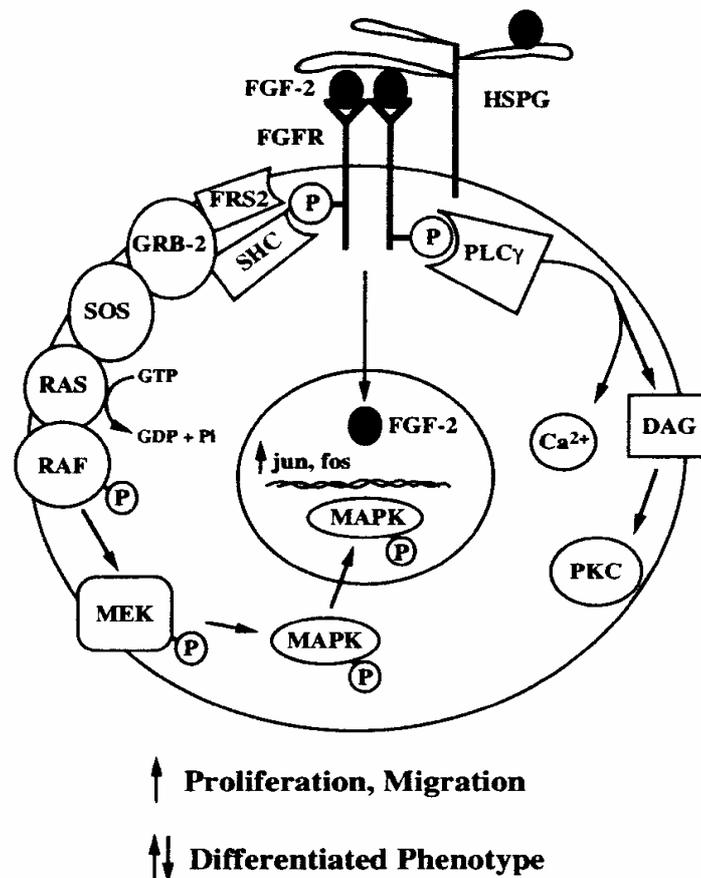


Abb.3: bFGF Signalkaskade

Schematische Darstellung der FGF-2 Signalkaskade. bFGF führt zu einer Aktivierung einer Anzahl an unterschiedlichen Signalwegen. Die wichtigsten und am besten charakterisierten Abläufe, die in einer Anzahl von Zellen gefunden wurden, sind dargestellt. Für eine klarere Darstellung wurden viele Prozesse weggelassen. Die Bindung von bFGF an seine Rezeptoren wird durch HSPG an der Zelloberfläche erleichtert und führt zu einer Autophosphorylierung des FGF-R an Tyrosin-Resten. Einige dieser Phosphotyrosin Reste bilden eine Bindungsstelle für Proteine wie Phospholipase C-γ oder FGF Rezeptor Substrat 2 und SHC. Über einige weitere Schritte kommt es dann z.B. zur Aktivierung der mitogen activated protein kinase (MAPK), die wiederum direkt durch Phosphorylierung Transkriptionsfaktoren im Nucleus aktiviert. Welcher spezifische Signalweg aktiviert wird, kann von dem jeweiligen FGF Rezeptortyp abhängen. Auch mag neben den über die HSPGs der Zelloberfläche vermittelten Wirkungen die intrazelluläre und intranucleäre Wirkung von bFGF für das Ausmaß der zellulären Antwort bestimmend sein. Als Ergebnis solcher komplexen Vorgänge führt bFGF bei einer Vielzahl an Zellen zum Beispiel zur Stimulierung der Zellproliferation und Migration [59].

I. 3 Benigne vaskuläre Tumoren des Gefäßendothels im Kindesalter

I. 3.1 Definition und Klinik

Hämangiome sind definiert als schnell wachsende, gutartige Tumoren des vaskulären Endotheliums. Mit einer Prävalenz von 10-12 % sind sie die häufigsten, gutartigen Tumoren im Kindesalter in der weißen Bevölkerung [9, 24]. Die Inzidenz wird mit 1,0-2,6% angegeben [40]. Ein gehäuftes Auftreten findet man bei Mädchen, Frühgeborenen und Zwillingen [1, 9, 24]. Hämangiome sind häufig bei der Geburt noch nicht vorhanden, bilden sich aber meistens innerhalb der ersten vier Wochen (70-90%) und werden als erythematöse Veränderung, als weißer Fleck oder als lokalisierte Teleangiektasie, manchmal von einem blassen Ring umgeben, auf der Haut sichtbar. Im ersten Lebensjahr des Kindes nehmen sie oft an Größe zu, hören dann zu wachsen auf und bilden sich in den darauf folgenden Jahren ganz oder nur teilweise zurück. Daraus ergeben sich die Phasen von Wachstum und Rückbildung der Hämangiome: die Proliferationsphase und die darauffolgende Involutionsphase.

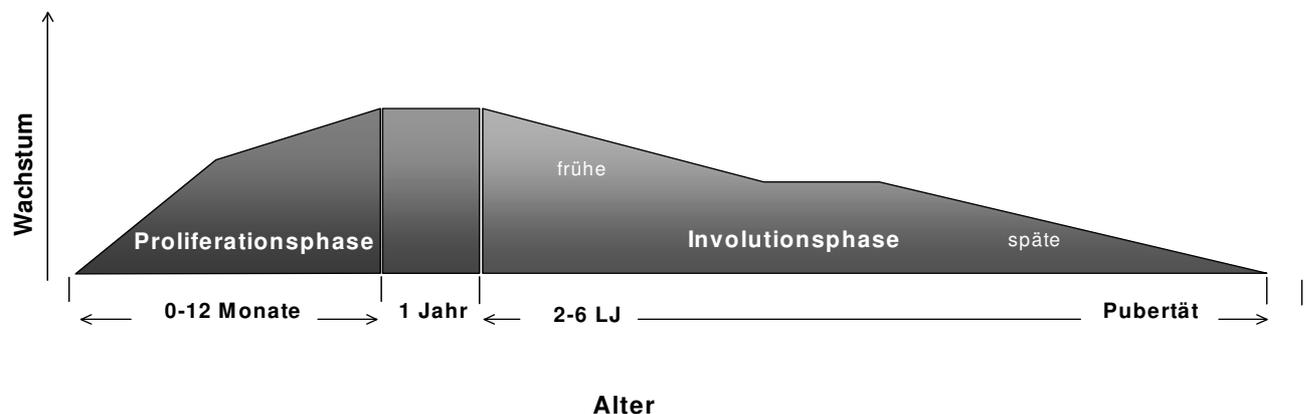


Abb.4: Hämangiomphasen

Phasen des Wachstums und der Rückbildung von Hämangiomen nach Mulliken und Glowacki [54]

Hämangiome können lokal expansiv oder multipel im ganzen Körper verstreut wachsen. 80% der Tumoren treten als einzelne Läsion auf, bei 20% der Betroffenen findet man mehrere Läsionen [23, 54].

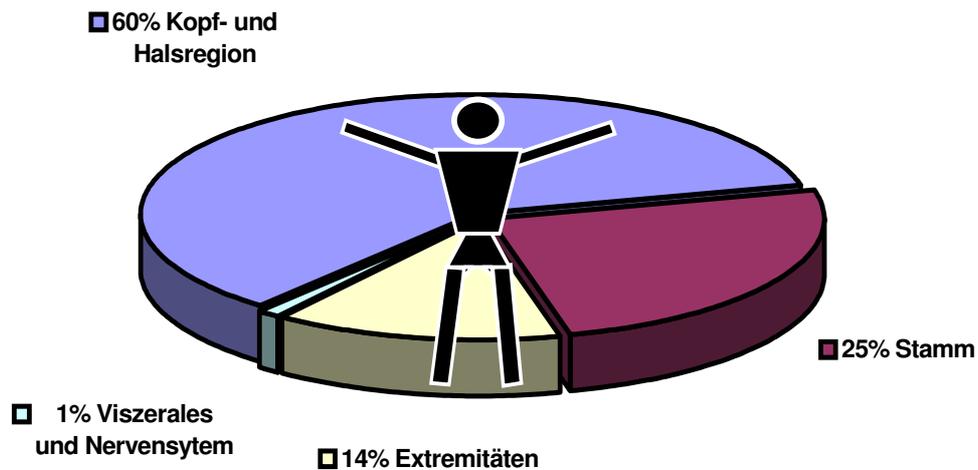


Abb.5: Lokalisation der Hämangiome

Selten sind bei Befall der inneren Organe mit Hämangiomen keine äußerlichen Hautläsionen zu beobachten. Bei multiplen Hämangiomen zeigt sich oft auch ein Befall des viszeralen Systems [23].

I. 3.2 Klassifikation

Die früher gebräuchliche Einteilung in plane, tuberöse, planotuberöse, nodöse und tuberonodöse Hämangiome gilt nach neueren Erkenntnissen als nicht mehr haltbar, da es sich vor allem bei den oberflächlichen Hämangiomen nur um eine momentane Zustandsbeschreibung handelt (H.Cremer). Die inzwischen international gebräuchliche Einteilung nach Mulliken und Glowacki [54] (siehe **Tab.6**) unterscheidet für die Gruppe der „klassischen“ Hämangiome nach dynamischen Gesichtspunkten eine Proliferationsphase und eine Rückbildungsphase.

Sie stellt ein wichtiges Kriterium zur Abgrenzung von Hämangiomen von anderen vaskulären Malformationen dar.

Neue Klassifizierung gutartiger vaskulärer Gefäßtumoren	
Lokalisierte „klassische“ Hämangiome:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ oberflächlich ▪ weiße Hämangiome („Hämangiomvorläufer“) ▪ flache, diffus gerötete Veränderungen ▪ gruppenförmig auftretende Hämangiompapeln ▪ teleangiektatische Hämangiomformen ▪ ohne weißen Ring ▪ mit weißem Ring ▪ regelmäßig begrenzte erhabene Hämangiome ▪ tiefliegend ▪ gemischt
Systematisierte Hämangiomatosen:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ benigne neonatale Hämangiomatosen (nur Hautbeteiligung) ▪ disseminierte Hämangiomatosen der Haut mit viszeraler Beteiligung ▪ disseminierte Hämangiomatose mit viszeraler Beteiligung ohne Hautbefall
Hämangiom-Sonderformen:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ausgedehnte Hämangiome im craniofacialen Bereich (oberflächlich oder gemischt), welche eine ganze Gesichtshälfte oder mehr betreffen ▪ ohne viszerale Beteiligung ▪ mit zusätzlicher viszeraler Beteiligung ▪ eruptive Angiome
tumorartige Hämangiome des Neugeborenen mit guter Spontanrückbildung:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ erhabene violette Tumoren mit erweiterten Venen ▪ erhabene, gräulich aussehende Tumoren mit multiplen kleinen Teleangiektasien ▪ flache infiltrative Tumoren mit violetter bedeckender Haut ▪ sonstige congenitale vaskuläre Tumoren ▪ Kasabach-Merritt-Syndrom ▪ tufted Angiom ▪ Hämangioperizytom ▪ kaposiformes Hämangioendotheliom

Erweiterte Klassifizierung der „klassisch lokalisierten oberflächlichen Hämangiome“ (nach Cremer) [12]	
Aufteilung in unterschiedliche Hämangiomphasen:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ proliferative Phase ▪ langsam wachsend ▪ rasch wachsend ▪ exzessiv wachsend ▪ stationär ▪ Phase der Regression ▪ komplette Rückbildung ▪ ohne Narbenbildung ▪ mit geringer Narbenbildung ▪ mit ausgeprägter Narbenbildung ▪ partielle Rückbildung ▪ fehlende Rückbildung
Berücksichtigung der Hämangiomgröße:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ klein (< 1cm) ▪ mittelgroß (1-5 cm) ▪ großflächig (> 5 cm)
Berücksichtigung der Hämangiomzahl:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ einfach ▪ multiple
Berücksichtigung der Hämangiomlokalisierung:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kopf ▪ Gesicht ▪ Problembereich Auge ▪ Problembereich Lippen ▪ Problembereich Nase ▪ Haarbereich ▪ Hals ▪ Stamm ▪ Arme und Schultern ▪ Beine und Hüfte ▪ anogenitaler Bereich
Berücksichtigung von Hämangiomkomplikationen:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ulzeration ▪ Infektion ▪ Obstruktion ▪ Blutung

Tab.6: Neue Klassifikation benigner vaskulärer Tumoren

I. 3.3 Besprechung einzelner Formen benigner vaskulärer Tumoren

Lokalisierte „klassische“ Hämangiome repräsentieren ca. 85% aller Gefäßanomalien des frühen Kindesalters. Im Verlauf des 1. Lebensjahres entwickeln 10-12% aller Kinder lokalisierte „klassische“ Hämangiome. Die oberflächlichen Hämangiome zeigen sehr unterschiedliche Erscheinungsformen. Oft sieht man schon beim Neugeborenen „Hämangiomvorläufer“, die sog. weißen Hämangiome, aus denen sich im weiteren Verlauf erhabene Hämangiome entwickeln können. Andere Erscheinungsformen treten als flache, diffus gerötete Veränderungen, gruppenförmige Hämangiompapeln oder, eher seltener, als teleangiektatische Hämangiome auf. Am häufigsten findet man jedoch die Gruppe der regelmäßig begrenzten, erhabenen Hämangiome. 1-2% der „klassischen“ Hämangiome sind tiefliegende Tumoren. Hier sind meist zusätzliche diagnostische Maßnahmen zur Diagnosesicherung nötig. Sie zeigen eine wesentlich schlechtere Rückbildungstendenz. Die oft primär als oberflächliche Hämangiome in Erscheinung tretenden, dann sich in die Tiefe entwickelnden sogenannten gemischten Hämangiome machen ca. 12% der lokalisierten „klassischen“ Hämangiome aus.

Die meisten Hämangiome bilden sich im Laufe der Zeit wieder vollständig (70%) oder partiell (20%) zurück. Es kann allerdings, je nach Tumorausdehnung, kosmetisch erheblich störendes Narbengewebe zurückbleiben.

Systematisierte Hämangiome (Hämangiomatosen)

Bei diesen systemischen Formen zeigen sich multiple Hämangiome. Sie können wie bei der benignen neonatalen Hämangiomatose nur auf der Haut liegen und zeigen eine gute Prognose. Oder es liegt auch ein Befall der inneren Organe (v.a. Leber, Gastrointestinaltrakt) wie bei der disseminierten Hämangiomatose der Haut mit viszeraler Beteiligung, der diffusen neonatalen Hämangiomatose, vor. Bei dieser Form der Hämangiomatose kann es zu einer schwerwiegenden Kreislaufbelastung infolge arteriovenöser Shunts, zu massiven Blutungen im Bereich des Magendarmtrakts und auch zu Obstruktionen kommen. Sie zeigen eine entsprechend schlechte Prognose.

Komplikationen

Vor allem in der Proliferationsphase der Hämangiome kann es zu verschiedenen Komplikationen kommen. Gerade im Anogenitalbereich besteht die Gefahr von Ulzerationen, die sich leicht bakteriell infizieren können. Aber auch im Rahmen einer

Allgemeininfektion können lebensbedrohliche Komplikationen einer sofortigen Notoperation bedürfen.

Bei tiefer Lokalisation der Hämangiome kann es, aber eher selten, zur Obstruktion des Tracheal- und Bronchialbereichs kommen [28]. Ein Verschluss im Augenbereich kann zur Erblindung führen [75, 93]. Eine lebensbedrohliche Komplikation bei Kindern mit multiplen kutanen und/oder viszerale Hämangiomen stellt das kongestive Herzversagen dar. Diese Kinder können sich innerhalb der ersten 4-8 Wochen mit der Trias eines kongestiven Herzversagens, einer Hepatosplenomegalie und einer Anämie präsentieren. Meistens zeigen diese Patienten eine Vielzahl kleiner Hämangiome auf der Haut. Die viszerale Hämangiome betreffen am häufigsten die Leber, die Lunge und den Gastrointestinaltrakt. Gerade in dem gut vaskularisierten Leberparenchym zeigen sich proliferierende Hämangiome als hämodynamisch wirksame Strukturen und können zu großen Rechts-Links-Shunts mit entsprechender kardialer Belastung führen.

Blutungen aus lokalisierten „klassischen“ Hämangiomen sind eher selten und praktisch nie lebensbedrohlich.

Das **Kasabach-Merritt-Syndrom** besteht aus einer Thrombozytopenie, Anämie und einer Verbrauchskoagulopathie, die mit einem proliferativen Hämangiom assoziiert ist. Nach neuen Erkenntnissen handelt es sich nicht um ein echtes Hämangiom, sondern der Tumor weist histologische Ähnlichkeit mit dem tufted Angiom oder mit dem kaposiformen Hämangioendotheliom auf. Diese Läsionen sind keine typischen kindlichen Hämangiome und sprechen nur schlecht auf eine Standardtherapie an. Außerdem zeigt der Tumor nicht die klassische Rückbildungstendenz eines kindlichen Hämangioms, sondern die Rückbildung erfolgt wesentlich langsamer [16].

I. 3.4 Diagnose

In den meisten Fällen kann die Diagnose von kleineren Hämangiomen aufgrund der typischen Wachstumscharakteristika und des Erscheinungsbildes gestellt werden. Zusätzliche apparative Untersuchungen sind nicht nötig. Bei atypischen Formen können bildgebende Verfahren zur weiteren Charakterisierung und zur Erfassung der anatomischen Ausdehnung indiziert sein. Bewährt haben sich hier vor allem die

Sonographie, die Doppler-Sonographie und die Darstellung in der Magnetresonanztomographie (MRT). Allerdings zeigen andere Tumoren des Kindesalters, wie das Fibrosarkom oder das Rhabdomyosarkom ähnliche Bildbefunde wie die proliferierenden Hämangiome [16], so dass bei nicht sicher möglicher klinischer Beurteilung eine Biopsie zum Ausschluss von Malignität nötig wird.

Sonographie: Die Sonographie ist eine gute und einfache Methode, Strukturanomalien der Haut darzustellen. Sie ist primär zur Größenbestimmung und topographischen Einordnung geeignet, ermöglicht aber weder eine Artdiagnose, noch genauere Aussagen zur Dignität des Tumors (45). Die Darstellung der Tiefenausdehnung und Vaskularisation ist für die weitere Therapieentscheidung von Bedeutung. So stellen stark vaskularisierte Hämangiome einen Behandlungsnotfall dar, tiefliegende Hämangiome entscheiden z.B. über die geeignete Laserwahl.

Magnetresonanztomographie (MRT): Die MRT dient zur Darstellung von großen und topographisch schwierigen Lokalisationen vor allem in Problemzonen wie Kopf, Anogenitalbereich und Abdomen. Sie findet vor operativen Eingriffen zur genaueren Abgrenzung des Tumors Verwendung.

Angiographie: Die Angiographie dient hauptsächlich zur Abklärung einer Gefäßbeteiligung z.B. im Orofazialbereich der A. carotis interna und klärt die Frage nach einer möglichen Embolisation.

I. 3.5 Therapie

Generell sollten alle Kinder mit Hämangiomen in kosmetisch kritischen Bereichen, im Bereich von Problemzonen oder in ulzerationsgefährdeten Bereichen früh und konsequent therapiert werden. Auch bei schnellem Wachstum sollte nicht auf die Behandlung verzichtet werden.

Bei oberflächlich lokalisierten „klassischen“ Hämangiomen stehen vor allem physikalische Behandlungsmethoden zur Verfügung. Bewährt haben sich die *Kontakt-Kryotherapie* und die *Lasertherapie* mit Argonlaser oder gepulstem Farbstofflaser.

Neodym:Yag-Lasertherapie: Bei tiefliegenden oder stark erhabenen Hämangiomen kommen die interstitielle Neodym:Yag-Lasertherapie, evtl. zusammen mit einer

systemischen Kortisonbehandlung, oder eine chirurgische Intervention in Betracht. Der Laser emittiert Licht im nahen infraroten Wellenbereich (1064nm). Dieses wird vorwiegend von Blut und geringer vom umliegenden Gewebe absorbiert. Bei längeren Expositionszeiten kommt es vor allem zu einer Schädigung der thermisch empfindlichen Endothelzellen. Die Einwirktiefe liegt bei 10 mm. Zur Vermeidung thermischer Schäden an der Haut werden zur Kühlung Eiswürfel verwendet, die zwischen Haut und Laser gehalten werden.

Glukokortikoid-Therapie: Bei der Behandlung von Hämangiomen, die im Laufe ihres Wachstums Komplikationen entwickeln, sind Kortikosteroide noch Mittel der Wahl. Ca. 30 % der Tumore sprechen sehr gut auf die Therapie an, weitere 40% zeigen eine Besserung [19, 20]. Allerdings treten aufgrund der notwendigen hohen Dosierung der Kortikosteroide vielfache Nebenwirkungen auf, wie z.B. Gewichtszunahme, cushingoides Aussehen, Wachstumsverzögerung, Bluthochdruck, Diabetes. Die Wirkungsweise der Glukokortikoide erklärt sich durch die Erhöhung der Sensitivität von Arteriolen und Kapillaren gegenüber vasokonstriktorischen Mediatoren mit Abnahme des Füllungszustandes der Gefäße. Zudem besitzen sie einen Einfluss auf die Angiogenese über die Hemmung der Expression von Zytokinen. Bei "in vitro" Untersuchungen führte eine Glukokortikoidbehandlung zu einer Zunahme der Transkription des Apoptosegens Clusterin/Apolipoprotein-J sowie des mitochondrialen Cytochrom-b im Hämangiomgewebe, was mit einer Hemmung des Kapillarwachstums assoziiert war [34].

Interferon- α 2-Therapie: Bei Therapieresistenz stehen andere anti-angiogenetische Stoffe zur Verfügung. Hierzu zählt Interferon- α 2, über das in klinischen Studien der letzten Jahre viel berichtet wurde und das sich als Therapiealternative etablieren konnte. Neben der antiviralen Wirkung besitzen Interferone auch immunregulatorische und antiproliferative Eigenschaften. Die genaue Wirkungsweise des Interferon- α 2 bei kindlichen Hämangiomen ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Jedoch zeigten „in vitro“ Versuche einen anti-angiogenetischen Effekt über eine Hemmung der Endothelzellproliferation und –migration [29]. Mögliche Nebenwirkungen der Therapie sind neben Allgemeinsymptomen wie Fieber, Müdigkeit auch neurotoxische und zytotoxische Wirkungen. Aufgrund dieser zum Teil schweren Nebenwirkungen der Behandlung stellt Interferon- α eine Therapieoption nur bei kritischer Lokalisation und Nichtansprechen auf Glukokortikoide dar.

I. 3.6 Pathogenese von Hämangiomen

Wie kommt es zu dem plötzlichen auftretenden und raschen Wachstum der Hämangiome kurz nach der Geburt? Und warum hört nach einigen Monaten das Wachstum auf, und der Tumor bildet sich in den darauffolgenden Jahren oft wieder vollständig zurück?

Noch zur Jahrhundertwende vom 19. ins 20. Jahrhundert glaubte man, dass Hämangiome das Produkt mütterlicher Gefühle während der Schwangerschaft seien, die zum Beispiel dazu führten, bei Betrachtung von Blut alarmiert zu sein oder mit einem wunderlichen Verlangen eine Vorliebe nach bestimmten Früchten zu entwickeln. Eine spätere Theorie besagte, dass Hämangiome phylogenetische Überreste von vaskulären Strukturen seien, die einen Teil von Lungen in der Haut von primitiven Amphibien darstellten [53]. Im Laufe der Zeit wurden viele weitere Hypothesen aufgestellt. 1974 schrieb Malan, es könne sich um ruhende Angioblasten handeln, die als Ausdruck für genetisch programmiertes Wachstum und Tod im embryonalem Kapillarsystem verspätet aktiviert würden [47]. Auch heute ist die Frage nach dem Zeitpunkt und der Ursache für die Entstehung von Hämangiomen noch nicht vollständig geklärt.

In neueren Arbeiten konnten Mulliken und Glowacki durch den Nachweis des Faktors VIII im Hämangiomgewebe zeigen, dass die Endothelzellen so weit differenziert sind, dass sie die Fähigkeit besitzen, Proteine zu synthetisieren [54].

Die Histologie der Hämangiome zeigt in der Proliferationsphase im Lichtmikroskop proliferierende Endothelzellen, die im Verbund gruppiert sind, mit oder ohne Lumenbildung. Vereinzelt sieht man Mitosen. Wie aufgrund der Gutartigkeit des Tumors zu erwarten ist, finden sich keine Pleomorphismen. Später bilden sich Lumen in der Größe von Kapillaren aus, die von plumpen Endothelzellen umgeben sind. Man findet eine um 30-40fach erhöhte Anzahl von Mastzellen entlang der Endothelien im Tumorgewebe gegenüber normalem Gewebe [30]. Immunhistochemisch konnte gezeigt werden, dass Hämangiome während der Proliferationsphase hohe Werte an bFGF, VEGF, Urokinase, Kollagen IV, PCNA exprimieren. Man nimmt daher an, dass diese Faktoren eine entscheidende Rolle in der Pathogenese spielen [87].

In der Phase der Rückbildung zeigt sich histologisch eine Abnahme der Anzahl vaskulärer Gefäße innerhalb des Hämangioms bei zunehmender Fibrosierung des

perivaskulären Gewebes. Die zurückbleibenden Gefäße dilatieren und geben dem Hämangiom den Eindruck eines kavernösen Gebildes, welches histologisch mit einer vaskulären Malformation verwechselt werden kann. Am Ende der Rückbildung bleiben Gefäße mit dünnen Wänden, ähnlich denen normaler Kapillaren, zurück. Perivaskulär zeigen sich kleine Bereiche von Fettgewebe, durchzogen von dichten kollagenen und retikulären Strängen. Immunhistochemisch liegen die Werte von VEGF, Urokinase, Kollagen IV und PCNA in dieser Phase im Normbereich. bFGF zeigt einen langsameren Abfall innerhalb der Rückbildung des Hämangioms als VEGF. Erhöht sind stattdessen bei der Regression des Tumors vor allem Werte der „tissue inhibitor metalloproteinase“ (TIMP) und des α -smooth muscle cell actin (SMC-actin). Die Mastzellen sind anfangs noch vermehrt und führen wahrscheinlich über die Interaktion mit Fibroblasten zur perivaskulären Fibrosierung des Gewebes [87].

I. 4 Fragestellung

Hämangiome gehören zu der Gruppe der sogenannten „angiogenesis dependent diseases“. Takahashi K. et al. untersuchten 1994 [87] verschiedene Faktoren in den Wachstums- und Regressionsphasen bei Hämangiomen durch immunhistochemische Analysen. Es konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Hämangiomphasen aufgrund zellulärer Marker unterschieden werden können. Wie oben beschrieben exprimieren Hämangiome während der Proliferationsphase hohe Werte an bFGF, VEGF, Urokinase, Kollagen IV und PCNA. In der Rückbildungsphase liegen diese Werte im Normbereich.

Folkman et al. berichteten über erhöhte Konzentrationen von FGF im Urin von Patienten mit Tumoren, angiogenetischen Prozessen und wachsenden Hämangiomen [56].

Folgende Fragestellungen werden in dieser Arbeit behandelt:

1. Es soll untersucht werden, ob die Spiegel der Angiogenesefaktoren bFGF und VEGF im Plasma von Hämangiompatienten im Vergleich zu denen einer Kontrollgruppe erhöht sind.
2. Die Höhe der Konzentrationen von bFGF und VEGF im Plasma soll mit der Größe und den klinischen Parametern der jeweiligen Hämangiome verglichen und die Fragen nach einer Beziehung zwischen diesen Werten gestellt werden. Die Verläufe der VEGF und FGF Konzentrationen im Plasma bei einigen Kindern mit Hämangiomen werden dargestellt.
3. Ein anderer Teil der Studie widmet sich der Untersuchung der bFGF Konzentration im Urin bei Hämangiompatienten. Die Werte sollen mit denen des Kontrollkollektivs verglichen werden. Zudem werden die Ergebnisse mit den jeweiligen Hämangiomcharakteristiken in Beziehung gesetzt.
4. Im Rahmen einer Falldarstellung werden die bFGF und VEGF Konzentrationen in Plasma und Urin bei einer Patientin mit schwerer diffuser neonataler Hämangiomatose im Verlauf dargestellt.
5. Im Anschluss sollen die Ergebnisse in Hinsicht ihrer klinischen Bedeutung in der Diagnosestellung, der Verlaufsprognose und möglicher Therapiekontrolle diskutiert werden und mit anderen Studien verglichen werden.

II. Materialien und Methoden

II. 1 Patientenkontingent

In die Studie einbezogen wurden Neugeborene (bis vollendete vierte Lebenswoche), Säuglinge (ab fünfter Lebenswoche bis zwölftem Lebensmonat) und Kleinkinder (ab dreizehntem Lebensmonat bis zum zweiten Lebensjahr) mit Hämangiomen, die vom Februar 1998 bis April 2001 wegen ihrer Hämangiome in der Dr. von Haunerschen Kinderklinik der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) in München behandelt wurden. Die Behandlungen wurden sowohl stationär als auch ambulant vollzogen und erfolgten meist als Lokalbehandlung mit dem Neodym:Yag-Laser (siehe 6.3). Gesammelt wurde eine Probe von EDTA-Plasma und/oder Urin pro Patient pro Behandlungstermin. Die Plasmaproben wurden im Rahmen der Anästhesievorbereitung gewonnen, so dass keine separate Blutentnahme erfolgte. Je nach Anzahl an Behandlungen wurden teilweise mehrere Proben eines Patienten innerhalb des Zeitraums der Studie gewonnen. Das Alter der Patienten zur Zeit der Abnahme wurde bestimmt. Zur Kontrolle des Wachstums und zur Bestimmung der morphologischen Veränderungen wurden die Läsionen vor der Behandlung mit Hilfe einer Sofortbildkamera im Verhältnis 1:1 fotografiert sowie der Verlauf schriftlich fixiert. Die Größe der Hämangiome wurde anhand der Fotos gemessen und in Länge x Breite in cm angegeben. Sonographische Daten über das Volumen und die subkutane Ausdehnung der Hämangiome wurden zum Teil aus einer parallel laufenden Studie übernommen und bei der Beurteilung der Tumorgröße berücksichtigt. Unterschieden wurden eine Wachstumsphase mit sichtbarer Größenzunahme und höherer Farbintensität, eine Stagnationsphase ohne sichtbare Veränderung und eine Rückbildungsphase mit deutlicher Ablassung der Farbintensität und/oder Größenabnahme des Hämangioms. Angaben über die frühe Progressionstendenz wurden zum Teil anhand von Aussagen der Eltern erstellt. Die Lokalisation der Tumoren wurde dokumentiert. Die Einteilung erfolgte in Kopf, Stamm und obere/untere Extremität, multiple Hämangiome und viszerale Beteiligung.

II. 2 Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe dienten gesunde Neugeborene (bis vollendete vierte Lebenswoche), Säuglinge (ab fünfter Lebenswoche bis zum zwölften Lebensmonat) und Klein- und Vorschulkinder (zwischen zweitem bis fünften Lebensjahr) ohne Zeichen von infektiösen,

tumorösen oder systemischen Erkrankungen. Die höhere Altersspanne bei den älteren Kindern der Kontrollgruppe im Vergleich zu der Patientengruppe wurde gewählt, um eine ausreichende Probenzahl zu gewährleisten. Die meisten Kinder befanden sich im Rahmen von operativen Eingriffen wie zum Beispiel bei Leistenhernien in der Kinderchirurgischen Klinik der LMU in stationärer Behandlung. Die Blutabnahme erfolgte vor den chirurgischen Eingriffen nach der Einverständniserklärung der Eltern.

Des Weiteren wurden auch einige Proben von Patienten im Alter von 1 Monat bis 2 Jahren mit unterschiedlichen, vor allem infektiösen Erkrankungen in die Studie mit einbezogen, um den Einfluss dieser Erkrankungen auf die gemessenen Faktoren darzustellen.

II. 3 Materialien

II. 3.1 Proben

Die Blutabnahme erfolgte vor der Behandlung im Rahmen der Anästhesievorbereitung nach Einverständniserklärung der Eltern. So erfolgte keine separate Blutabnahme.

Plasma: Blut wurde an peripheren Venen vor allem an Hand und Ellenbeuge über eine Kanüle abgenommen und in EDTA-Röhrchen gesammelt. Das Blut wurde in der Zentrifuge RBA 12 R von Hettich bei 3000 g für 10 min zentrifugiert, das Plasma in kleine Eppendorf-Gefäße abpipettiert und bei $< -20^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Urin: Der Urin wurde in geklebten Urin-Beuteln aufgefangen und in sterile Röhrchen abgefüllt. Bei 3000 g wurde der Urin für 10 min in der Zentrifuge RBA 12 R von Hettich zentrifugiert und bei $< -20^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Die Messung der Konzentrationen von bFGF und VEGF im Blut bzw. Urin erfolgte nach dem Prinzip des „sandwich enzyme linked immunoassay“ (ELISA; Quantikine R&D Systems, Minneapolis, Minnesota).

II. 3.2 Enzyme-linked immunoassay (ELISA)

Der Assay verwendet die quantitative Sandwich Immunassay Technik. Monoklonale spezifische Antikörper gegen bFGF oder VEGF sind auf einer Mikroplatte gebunden. Nach Zugabe von Standardlösungen und Proben bindet sich vorhandenes bFGF/VEGF an die

unbeweglichen Antikörper auf der Mikroplatte. Danach werden ungebundene Rückstände durch mehrmaliges Waschen entfernt und ein enzymgebundener polyklonaler, spezifischer Antikörper gegen bFGF/VEGF auf die Mikroplatte gebracht. Ungebundene, polyklonale Antikörper werden durch Waschen entfernt. Die Platte wird einige Zeit mit Substratlösung inkubiert, danach wird eine Verstärkerlösung hinzugefügt und es tritt eine Farbreaktion im Verhältnis zu der Menge des am Anfang gebundenen bFGFs/VEGFs auf. Die Farbentwicklung wird nach einer bestimmten Zeitspanne gestoppt und die Farbtintensität gemessen.

II. 3.3 Reagenzien

bFGF-Immunoassay (Quantikine HS; R&D):

FGF basic Microplate - 96 Wells polysterene Mikroplatte (12 Reihen je 8 Wells) überzogen mit monoklonalen Antikörpern gegen bFGF

FGF basic Conjugate – 21 ml polyklonaler Antikörper gegen bFGF, gebunden an alkalische Phosphatase, mit Konservierungsstoffen

FGF basic Standard – 3 Gefäße (64pg/Gefäß) mit rekombinantem humanen basischen Fibroblastenwachstumsfaktor in einer gepufferten Protein Lösung mit Konservierungsstoffen, lyophilisiert

Assay Diluent HD1-3 – 11 ml einer gepufferten Proteinlösung mit Konservierungsstoffen für Serum/Plasma Proben

Calibrator Diluent HD6X – 21 ml eines tierischen Serums mit Konservierungsstoffen für Serum/Plasma Proben

Assay Diluent HD1-20 – 11 ml einer gepufferten Proteinlösung mit Konservierungsstoffen für Urinproben

Calibrator Diluent HD5D – 21 ml einer gepufferten Proteinlösung mit Konservierungsstoffen für Urinproben

Wash Buffer Concentrate – 100 ml einer 10fach konzentrierten gepufferten Surfactantlösung mit Konservierungsstoffen

Substrate – lyophilisiertes NADPH mit Stabilisatoren

Substrate diluent – 7 ml einer gepufferten Lösung mit Stabilisatoren

Amplifier – lyophilisierte Verstärkerenzyme mit Stabilisatoren

Amplifier Diluent – 7 ml einer gepufferten Lösung mit Ethanol und INT-violett und Stabilisatoren

Stop Solution – 6 ml von 2 N schwefliger Säure

Plate Covers – 8 Klebestreifen

Human VEGF-Immunoassay (Quantikine HS; R&D):

VEGF Mikroplatte - 96 Wells polysterene Mikroplatte (12 Reihen je 8 Wells) überzogen mit monoklonalen Antikörpern gegen VEGF

VEGF Conjugate – 21 ml polyklonaler Antikörper gegen VEGF, gebunden an Meerrettich Peroxidase, mit Konservierungsstoff

VEGF Standard – 3 Gefäße (2000 pg/Gefäß) mit rekombinatem menschlichen VEGF₁₆₅ in einer gepufferten Protein Lösung mit Konservierungsstoffen, lyophilisiert

Assay Diluent RD1W – 11 ml einer gepufferten Proteinlösung mit Konservierungsstoffen

Calibrator Diluent RD6U – 21 ml eines tierischen Serums mit Konservierungsstoffen

Wash Buffer Concentrate – 21 ml einer 25-fach konzentrierten gepufferten Surfactantlösung mit Konservierungsstoffen

Color Reagent A – 12.5 ml stabilisierte, hydrogene Peroxide

Color Reagent B – 12.5 ml stabilisiertes Chromogen (Tetramethylbenzidin)

Stop Solution – 6 ml von 2 N schwefliger Säure

Plate Covers – 4 Klebestreifen

Die ungeöffneten Kits wurden bei einer Temperatur von 2 – 8 °C bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt.

Weitere Materialien:

- MRX Microplate Reader von Dynex (Meßbereich –0,100 bis 4,000 OD; Wellenlängenbereich 400 – 850 nm; Genauigkeit +/- 0,005 OD oder 2,5%)
- Zentrifuge RBA 12 R von Hettich
- Pipetten und Pipettenspitzen von Eppendorf
- Destilliertes Wasser

II. 4 Versuchsablauf

Vor der Benutzung wurden alle Reagenzien auf Zimmertemperatur gebracht. Die Messung der Proben und des Standards erfolgte in Doppelwerten.

Der erste Schritt des Versuchs war die Vorbereitung der Reagenzien. 100 ml des Waschpufferkonzentrats wurden mit destilliertem Wasser gemischt, um einen Liter an Waschpuffer zu erhalten (1:10 Verdünnung für bFGF Waschpuffer, 1:25 Verdünnung für VEGF Waschpuffer).

Für die Standardreihe wurde 1 ml des Calibrator Diluent mit dem jeweiligen für die Versuche vorgesehenen VEGF/bFGF-basic Standard gemischt, um eine Standardlösung von bFGF 64 pg/ml und von VEGF 2000 pg/ml zu erhalten. Daraufhin wurden folgende Lösungsreihen für die Standardmessung gebildet: bFGF für Plasma von 32, 16, 8, 4, 2 und 1 pg/ml; bFGF für Urin von 32, 16, 8, 4, 2, 1 und 0,5 pg/ml; VEGF von 1000, 500, 250, 125, 62,5 und 31,2 pg/ml. Dazu wurden 500 µl des geeigneten (für den jeweiligen Versuch gedachten) Calibrator Diluents auf jeweils sechs bzw. sieben Reagenzgläser verteilt. Durch Zugabe von 500 µl der Standardlösung zu dem ersten Reagenzglas erhielt man die Konzentration von 32 pg/ml. 500 µl dieser 32 pg/ml Lösung wurden nun in das folgende Röhrchen pipettiert. In dieser Weise wurde die gewünschte Standardreihe für den Versuch erstellt. Das jeweilige Calibrator Diluent diente als null Standard (0 pg/ml).

Die Plasmaproben wurden je nach Bedarf bzw. vorhandener Menge der Proben mit Hilfe der Kalibratorlösung um den Faktor 2-34 verdünnt.

Im zweiten Schritt wurde der auf der Mikroplatte gebundene Antikörper mit der Standardlösung und den Patientenproben in Kontakt gebracht. Dazu wurden die Wells mit der jeweiligen Menge an Assay Diluent gefüllt (bFGF-Serum: 100 µl; bFGF-Urin: 50 µl; VEGF-Serum: 100 µl). Danach gab man die Standardlösungen und Proben dazu (bFGF-Serum: 100 µl; bFGF-Urin: 200 µl; VEGF-Serum: 100 µl). Die Mikroplatte wurde mit einer Klebefolie abgedeckt und die entsprechende Zeit (bFGF-Serum/Urin: 3 Stunden; VEGF-Serum: 2 Stunden) inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Lösungen der Mikroplatte verworfen und alle Wells mehrmals mit dem Waschpuffer gewaschen.

Daraufhin erfolgte die Bindung des enzymgebundenen polyklonalen Antikörpers. Dazu wurden 200 µl in alle Wells gegeben, abgedeckt und für die angegebene Zeit inkubiert (bFGF-Serum/Urin: 2 Stunden; VEGF-Serum: 2 Stunden). Nach mehrmaligem Waschen der Platte wurde die Substrat Lösung hinzugefügt und inkubiert (bFGF-Plasma/Urin: 50 µl für 60 min; VEGF-Plasma: 200 µl für 25 min). Bei der bFGF Messung erfolgte die weitere Zugabe von 50 µl der Verstärkerlösung und weitere 30 min Inkubation.

Zum Schluss wurden bei allen Messungen 50 µl Stopplösung dazugegeben und das Ergebnis mit Hilfe des MRX-Microplate-Readers innerhalb von 30 Minuten ausgewertet.

II. 4.1 Auswertung und statistische Analyse

Die Daten wurden mit Hilfe der Computerprogramme „Sigma Plot“ (Version 8.03; SPSS Inc.) und SPSS ausgewertet und graphisch dargestellt. Der Mann-Whitney-U-Test wurde für den Vergleich der Patientengruppe mit der Kontrollgruppe, sowie für den Vergleich der Untergruppen (z.B. Alter, Geschlecht, klinischer Befund) innerhalb der Kontroll- und Patientengruppe verwendet. Für den Vergleich mehrerer Untergruppen diente der Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben. Das statistische Verwerf-Kriterium war eine 0,05 zweiseitige Wahrscheinlichkeit. Mittelwerte und Standardabweichung wurden zur Darstellung der statistischen Messungen verwendet.

III. Ergebnisse

III. 1 Ergebnisse der EDTA-Plasma Messungen von bFGF und VEGF

III. 1.1 Kontrollproben

bFGF

Die Anzahl der Kontrollproben von bFGF EDTA-Plasma betrug 32. Davon waren 6 von Neugeborenen, 12 von Säuglingen und 14 von Kleinkindern. Das mediane Alter der Gruppe der Kleinkinder war 24 Monate (Range 15-26 Monate). Insgesamt lag der Mittelwert für bFGF im EDTA-Plasma bei 35,3 pg/ml (Median: 19 pg/ml; Strd.Abw: 34,7 pg/ml; Range: 3-132 pg/ml). Bei der Altersaufteilung zeigte sich bei den Neugeborenen ein Mittelwert von 80,3 pg/ml (Median: 77 pg/ml; Strd.Abw: 40,9; Range: 35-132 pg/ml), bei den Säuglingen von 35,0 pg/ml (Median: 24,5 pg/ml; Strd.Abw: 30,7; Range: 3-95 pg/ml) und bei den Kleinkindern von 16,3 pg/ml (Median: 13 pg/ml; Strd.Abw. 10,7; Range: 7-42 pg/ml).

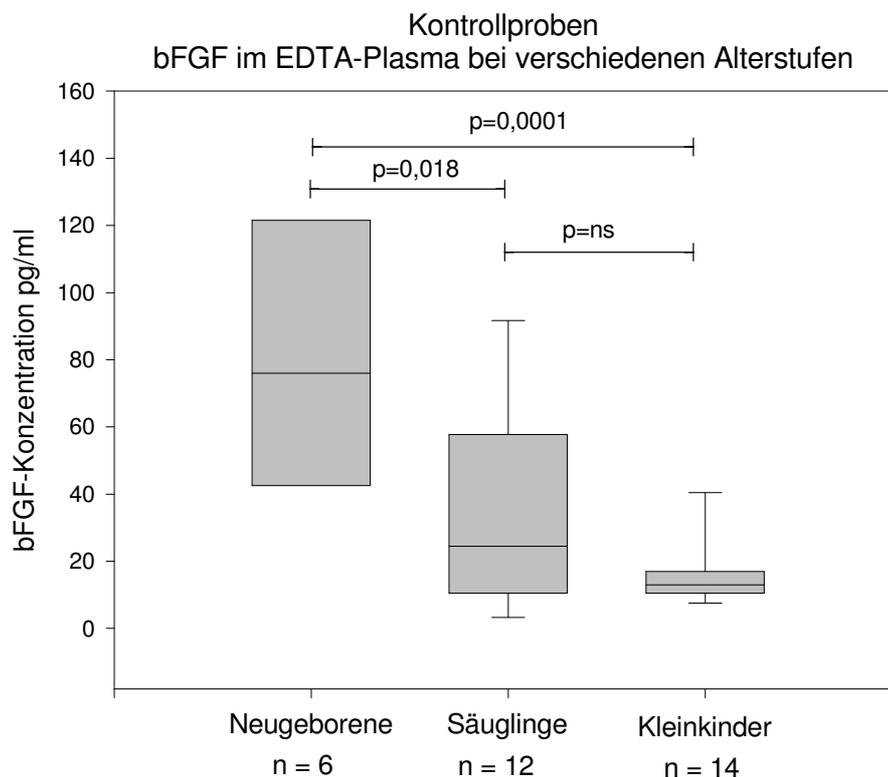


Abb.6: bFGF Plasmaspiegel bei Kontrollgruppe

Darstellung der bFGF Plasmaspiegel bei verschiedenen Altersstufen innerhalb der Kontrollgruppe. P-Werte zeigen den Vergleich der Mittelwerte zwischen den unterschiedlichen Gruppen.

VEGF

Bei 43 Kontrollproben wurde die VEGF-Konzentration im Plasma bestimmt. Hiervon waren 6 von Neugeborenen und 16 von Säuglingen. Die restlichen 21 Proben stammten von Kleinkindern mit einem medianen Alter von 24 Monaten (Range 15-26). Die mittlere VEGF Konzentration im EDTA-Plasma aller Kontrollproben lag bei 200,1 pg/ml (Median: 152,5 pg/ml; Strd.Abw: 147,9 pg/ml; Range: 28-754 pg/ml). Die Altersverteilung zeigte bei den Neugeborenen einen Mittelwert von 317 pg/ml (Median: 175 pg/ml; Strd.Abw: 276,7 pg/ml; Range: 100-745 pg/ml), bei den Säuglingen von 196,0 pg/ml (Median: 177,5 pg/ml; Strd.Abw: 116,2 pg/ml; Range: 28-376 pg/ml) und bei den Kleinkindern von 172,3 pg/ml (Median: 128 pg/ml; Strd.Abw: 114,7 pg/ml; Range: 33-436 pg/ml).

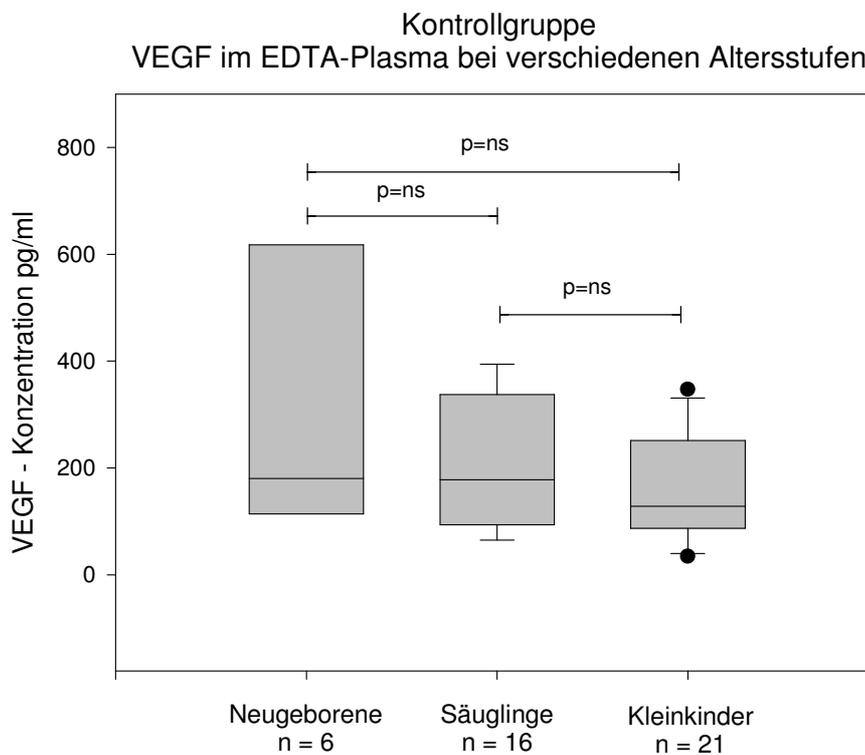


Abb.7: VEGF Plasmaspiegel bei Kontrollgruppe

Darstellung der VEGF-Plasmaspiegel bei verschiedenen Altersstufen innerhalb der Kontrollgruppe. Die P-Werte dienen zum Vergleich der Mittelwerte zwischen den Gruppen.

Bei den bFGF Konzentrationen in der Kontrollgruppe zeigten sich die höchsten Werte bei den Neugeborenen und ein Abfall der Plasma bFGF Konzentration bis ins Kleinkindalter. Dieser Befund bestätigt die in der Literatur beschriebenen hohen bFGF Konzentrationen, die bei Neugeborenen in den ersten Lebenswochen gefunden wurden. Die bFGF Konzentration im Blut bei Säuglingen zeigte die größten Schwankungen. Bei Kleinkindern ab einem Jahr lagen 92% der Werte unter 17 pg/ml mit geringen Schwankungen in der Spannweite.

Auch bei der VEGF Konzentration im Plasma wurden die höchsten Werte bei den Neugeborenen gemessen, doch zeigte sich insgesamt kein deutlicher Abfall der Konzentration mit dem Alter der Probanden.

Der Vergleich der Mittelwerte zwischen weiblichen und männlichen Probanden zeigte für beide Wachstumsfaktoren keinen signifikanten Unterschied ($p(\text{bFGF})=0,467$; $p(\text{VEGF})=0,455$)

Die Ergebnisse der Kontrollgruppe sollen zum Vergleich zu den Konzentrationen der Proben von Hämangiopatienten dienen.

III. 1.2 Hämangiopatien

Bei 93 % der Patienten befand sich die Läsion am Kopf, bei 3% im Bereich des Stamms und bei 3% an den Extremitäten. 70 Patienten hatte nur eine einzelne Läsion, 8 Patienten bis zu drei Hämangiome und 3 Patienten zeigten einen multiplen Befall.

bFGF: Die Anzahl (n) der gesammelten und ausgewerteten Plasmaproben für bFGF betrug n=98 bei 81 Patienten. Bei 10 Hämangiopatien wurden 2 oder mehr Proben gesammelt. Das Verhältnis männlich:weiblich lag bei 1:1,6 (31 männl.; 50 weibl.). Das Alter der Patienten betrug zwischen 2 Wochen und 21 Monaten. Davon waren 2 Neugeborene unter 4 Wochen, 72 Säuglinge zwischen 4 Wochen und 12 Monaten, 9 Kleinkinder. Der Mittelwert aller Proben von bFGF im EDTA-Plasma von Patienten mit Hämangiomen betrug 31,1 pg/ml (Median: 18 pg/ml; Strd.Abw: 36,1 pg/ml; Range: 2-212 pg/ml). Bei den Neugeborenen ergab sich ein Mittelwert von 12,5 pg/ml (Median: 12,5 pg/ml; Strd.Abw: 7,7 pg/ml; Range: 7-18 pg/ml), bei den Säuglingen von 31,4 pg/ml (Median: 17 pg/ml; Strd.Abw: 36,4 pg/ml; Range: 2-212 pg/ml) und bei den Kleinkindern von 32,0 pg/ml (Median: 25 pg/ml; Strd.Abw: 37,2 pg/ml; Range: 3-159 pg/ml).

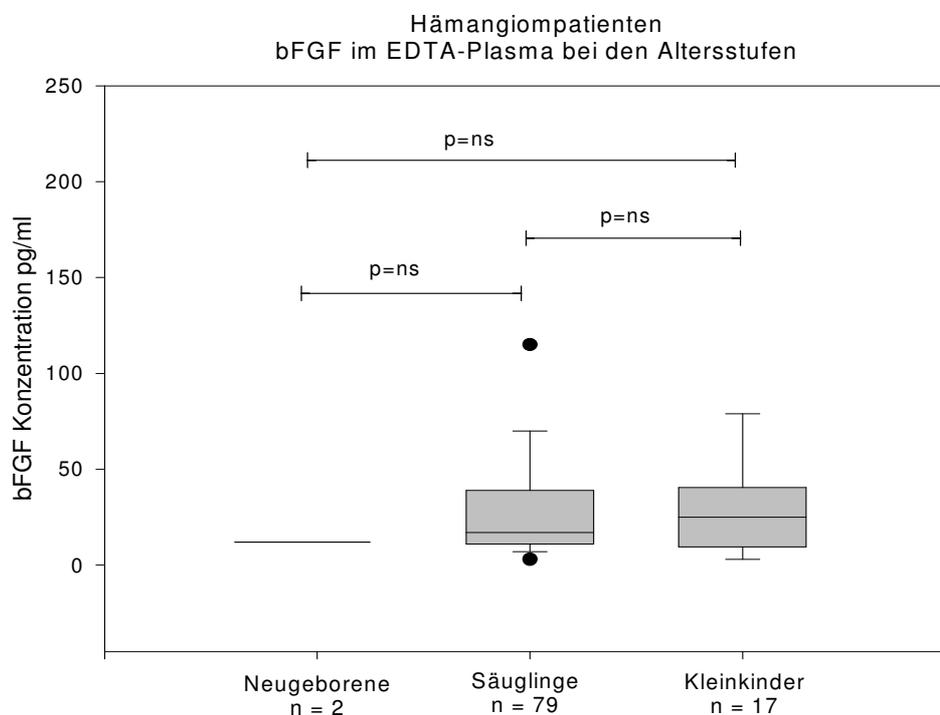


Abb.8: bFGF Plasmaspiegel bei Hämangiomen

Darstellung der bFGF Plasmaspiegel bei verschiedenen Altersstufen innerhalb der Patientengruppe. Die P-Werte dienen zum Vergleich der Mittelwerte zwischen den Gruppen.

VEGF: Es wurden 101 VEGF-Werte von 89 Patienten bestimmt. Der Mittelwert aller Proben betrug 166,6 pg/ml (Median: 87 pg/ml; Strd.Abw: 246,1 pg/ml; Range: 15-1604pg/ml). Bei den Neugeborenen (n=2) lag der Mittelwert bei 53,5 pg/ml (Median: 53,5 pg/ml; Strd.Abw: 31,8 pg/ml; Range: 31-76 pg/ml), bei den Säuglingen (n=71) bei 172,3 pg/ml (Median: 87 pg/ml; Strd.Abw: 259,3 pg/ml; Range: 15-1604 pg/ml) und bei den Kleinkindern (n=16) bei 156,2 pg/ml (Median: 105,5 pg/ml; Strd.Abw: 195,8 pg/ml; Range: 24-830 pg/ml).

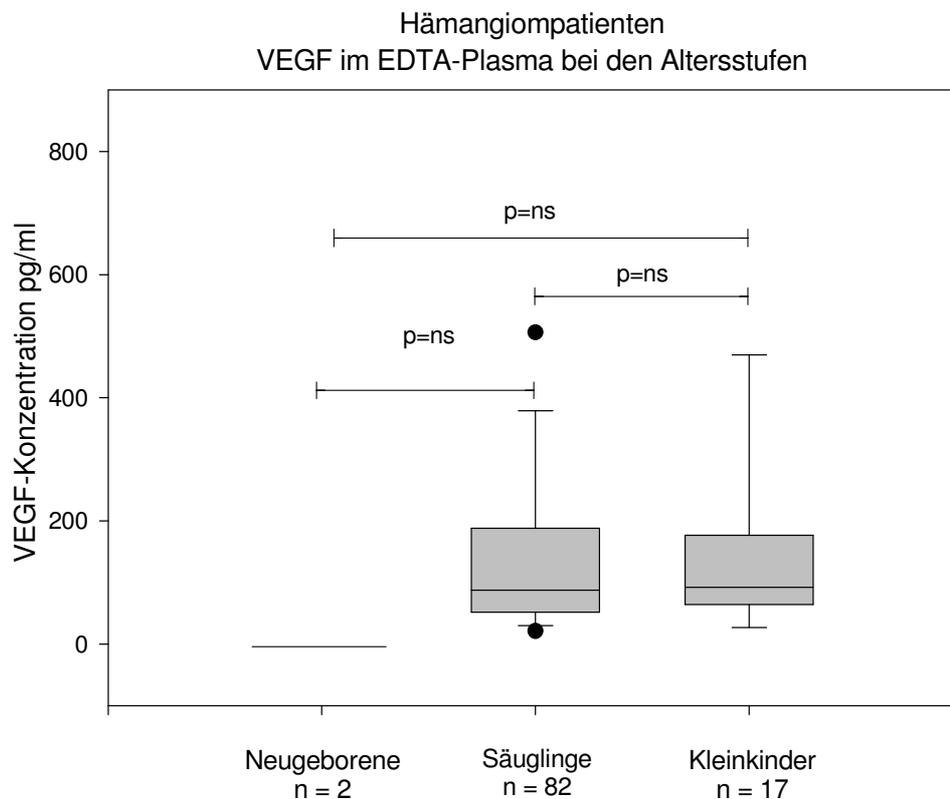


Abb.9: VEGF Plasmaspiegel bei Hämangiomen.

Darstellung der VEGF-Plasmaspiegel bei verschiedenen Alterstufen innerhalb der Patientengruppe. Die Signifikanz (p) zeigt den Vergleich der Gruppen.

III. 1.3 Hämangiomgröße und klinisches Bild

Innerhalb der Gruppe der Hämangiopatien wurden die Plasmaspiegel von bFGF und VEGF mit der Hämangiomgröße und dem klinischen Bild der Tumore verglichen. Dazu wurden die Hämangiome nach ihrer Größe in drei Gruppen (<2cm, 2-5cm, >5cm im Durchmesser) unterteilt. Patienten mit mehreren Hämangiomen wurden zur Gruppe >5cm gezählt. Informationen über die subkutane Ausbreitung der Hämangiome wurden aus einer parallel laufenden Studie übernommen und bei der Gruppeneinteilung berücksichtigt. **Tabelle 7** zeigt die Daten im Vergleich.

Größe	<2cm (n=12)		2-5cm (n=29)		>5cm (n=8)		
	bFGF	VEGF	bFGF	VEGF	bFGF	VEGF	
Mittelwert	21,4	112,4	38,0	112,3	54,6	316,9	pg/ml
Median	13	64	22	90	44	321	pg/ml
Standardabweichung	19,7	129,0	49,2	86,9	48,4	282,2	pg/ml
Maximalwert	57	438	212	394	159	856	pg/ml
Minimalwert	2	20	4	19	4	20	pg/ml

Tab.7: Hämangiomgröße und Plasmaspiegel

Anhand des klinischen Bildes wurden die Hämangiome in drei Gruppen eingeteilt. T1 steht dabei für ein oberflächliches, nicht erhabenes Hämangiom. T2 bedeutet, dass das Hämangiom leicht erhaben ist. Stark tuberöse Hämangiome zählen zur Gruppe drei. Diese dritte Gruppe zeigt klinisch auch eine höhere Progression des Tumors als die anderen zwei Gruppen. In **Tabelle 8** sind die Ergebnisse wiedergegeben.

Klinisches Bild	T1 (n=22 u. 23)		T2 (n=13)		T3 (n=11 u. 14)		
	bFGF	VEGF	bFGF	VEGF	bFGF	VEGF	
Mittelwert	21,0	115,3	40,3	61,8	64,5	284,2	pg/ml
Median	17,5	76	26	46	39	216	pg/ml
Standardabweichung	14,8	111,0	54,5	37,8	58,4	222,8	pg/ml
Maximalwert	53	438	212	119	159	865	pg/ml
Minimalwert	2	20	4	19	10	37	pg/ml

Tab.8: Klinisches Bild und Plasmaspiegel

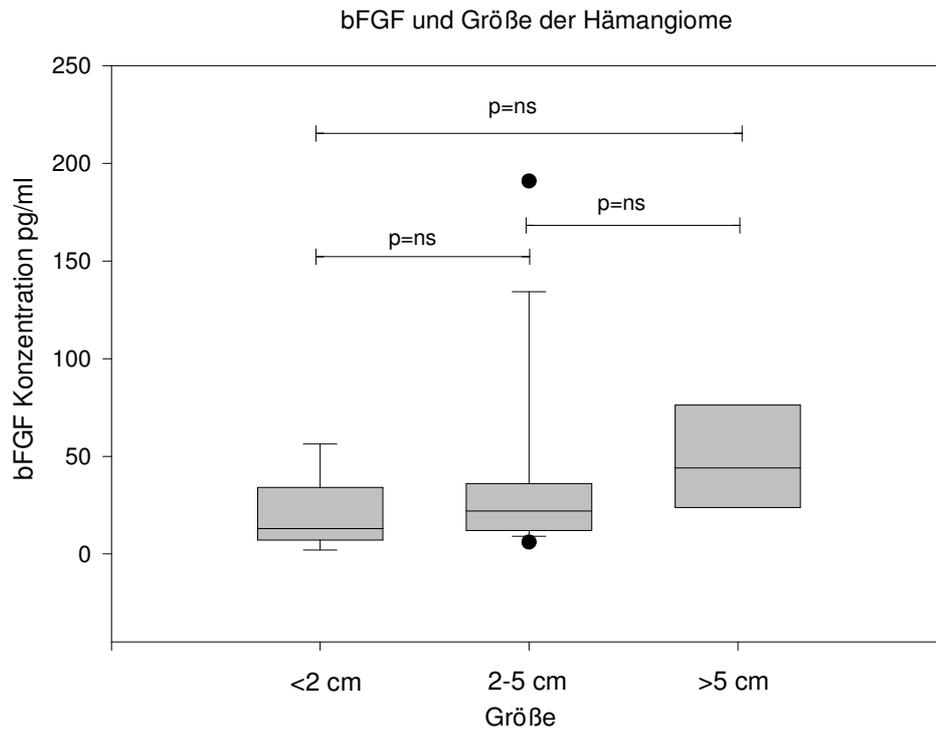


Abb.10: bFGF und Hämangiomgröße

Darstellung der bFGF Plasmaspiegel bei unterschiedlichen Hämangiomgrößen. Die P-Werte dienen zum Vergleich der Mittelwerte zwischen den Gruppen. K-W-Test $p=0,175$.

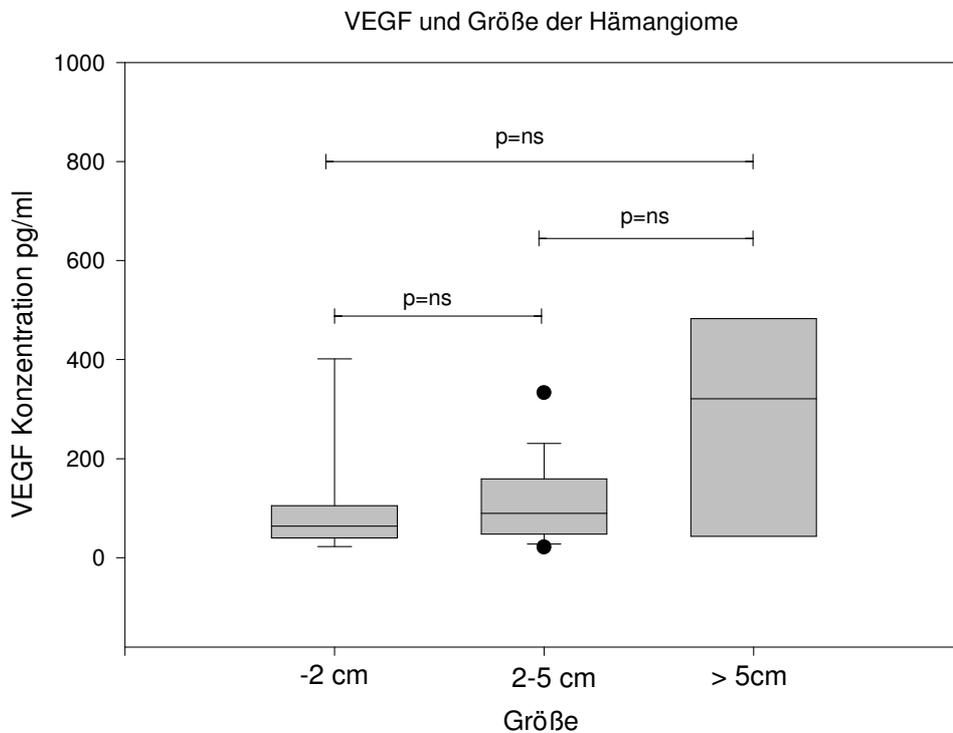


Abb.11: VEGF und Hämangiomgröße

Darstellung der VEGF Plasmaspiegel bei unterschiedlichen Hämangiomgrößen. Die P-Werte dienen zum Vergleich der Mittelwerte zwischen den Gruppen. K-W-Test $p=0,093$.

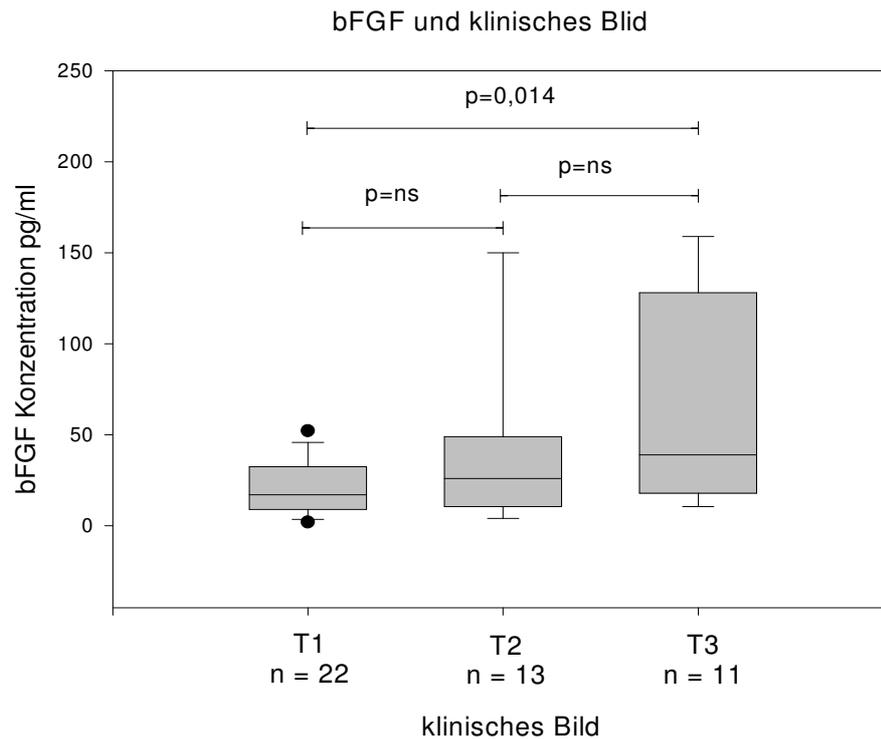


Abb.12: bFGF und klinisches Bild

Darstellung der bFGF Plasmaspiegel in bezug auf die unterschiedliche klinische Präsentation der Hämangiome. Die P-Werte dienen zum Vergleich der Mittelwerte zwischen den Gruppen. K-W-Test $p=0,054$.

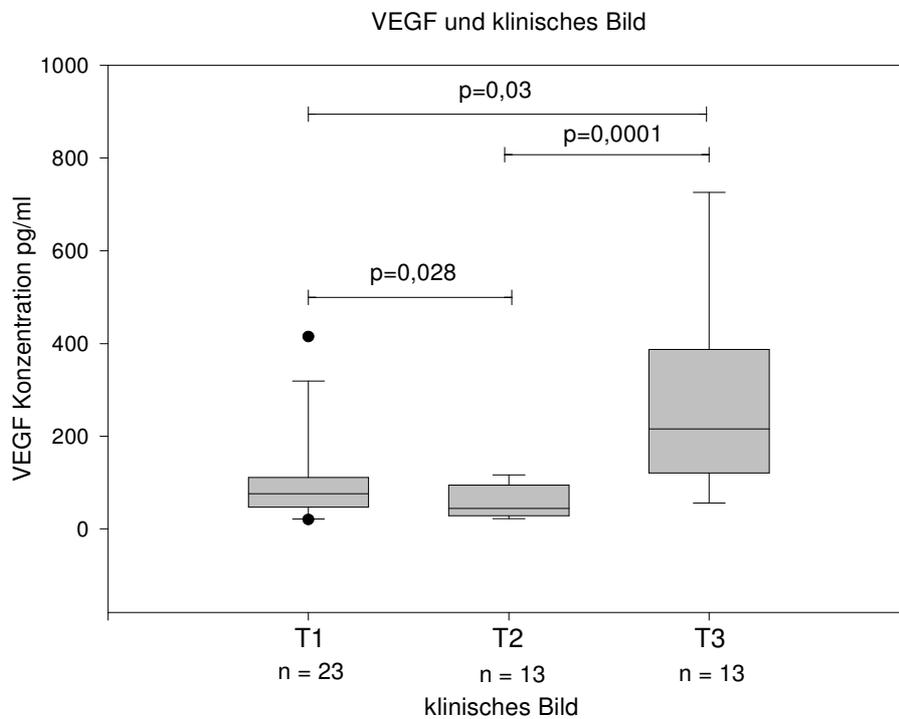


Abb.13: VEGF und klinisches Bild

Darstellung der VEGF Plasmaspiegel in bezug auf die unterschiedliche klinische Präsentation der Hämangiome. Die P-Werte dienen zum Vergleich der Mittelwerte zwischen den Gruppen. K-W-Test $p=0,01$.

III. 1.4 bFGF im Vergleich zum Kontrollkollektiv

Die in 8.1.1 ermittelten Werte für VEGF und bFGF im Plasma der Kontrollgruppe dienen als Normalwerte für den Vergleich mit der Gruppe der Hämangiompatienten. **Tab.9** und **Tab.10** geben diesen Vergleich wieder. In **Abb.14** und **Abb.15** ist dies graphisch festgehalten.

bFGF [pg/ml]	Neugeborene		Säuglinge		Kleinkinder	
	Patienten	Kontrolle	Patienten	Kontrolle	Patienten	Kontrolle
Mittelwert	12,5	80,3	31	35,0	32	16
Median	12,5	77	17	24,5	25	13
Standardabweichung	7,8	40,9	36,4	30,7	37,2	10,7
Maximalwert	18	132	76	95	159	42
Minimalwert	7	35	31	28	39	7

Tab.9: bFGF im Vergleich

Darstellung der gemessenen bFGF-Konzentrationen im EDTA-Plasma der Gruppe der Hämangiompatienten im Vergleich zu den Werten der Kontrollgruppe. Die Gegenüberstellung erfolgt zur genaueren Darstellung in den jeweiligen Altersgruppen.

VEGF [pg/ml]	Neugeborene		Säuglinge		Kleinkinder	
	Patienten	Kontrolle	Patienten	Kontrolle	Patienten	Kontrolle
Mittelwert	53,5	317,3	172,3	196,0	156,2	172,3
Median	53,5	175	87	177,5	105,5	128
Standardabweichung	31,8	276,7	259,3	116,3	195,8	114,7
Maximalwert	76	754	1604	376	803	436
Minimalwert	31	100	15	28	24	33

Tab.10: VEGF im Vergleich

Darstellung der gemessenen VEGF-Konzentrationen im EDTA-Plasma der Gruppe der Hämangiompatienten im Vergleich zu den Werten der Kontrollgruppe. Die Gegenüberstellung erfolgt zur genaueren Darstellung in den jeweiligen Altersgruppen.

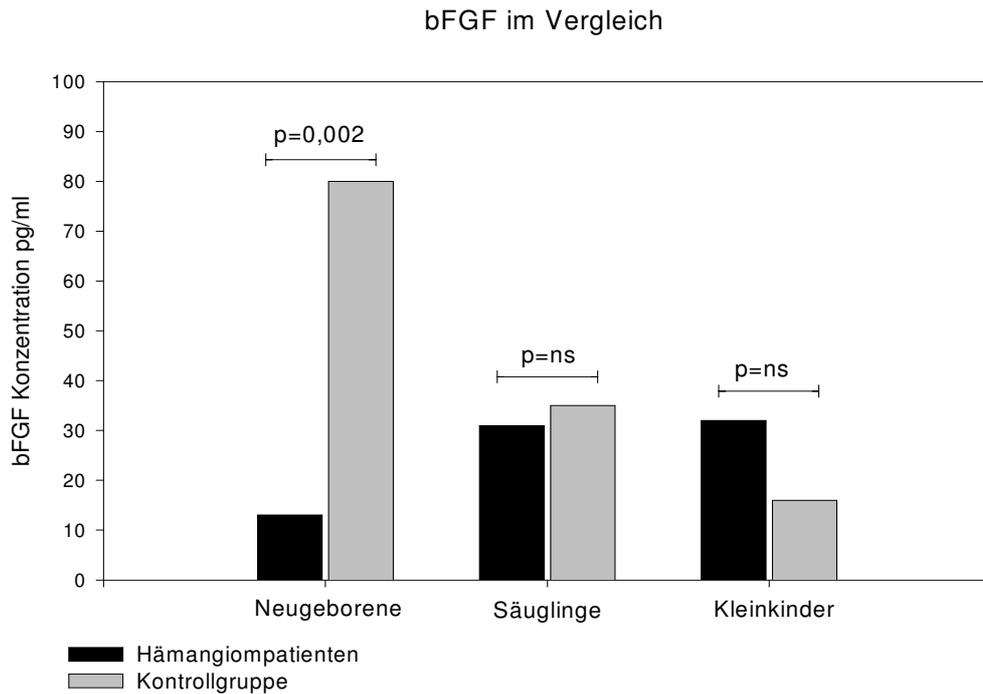


Abb.14: bFGF im Vergleich

Darstellung der Mittelwerte der Hämangiomproben im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe. Die P-Werte dienen zum Vergleich der Mittelwerte zwischen Kontroll- und Patientengruppe der jeweiligen Altersstufe.

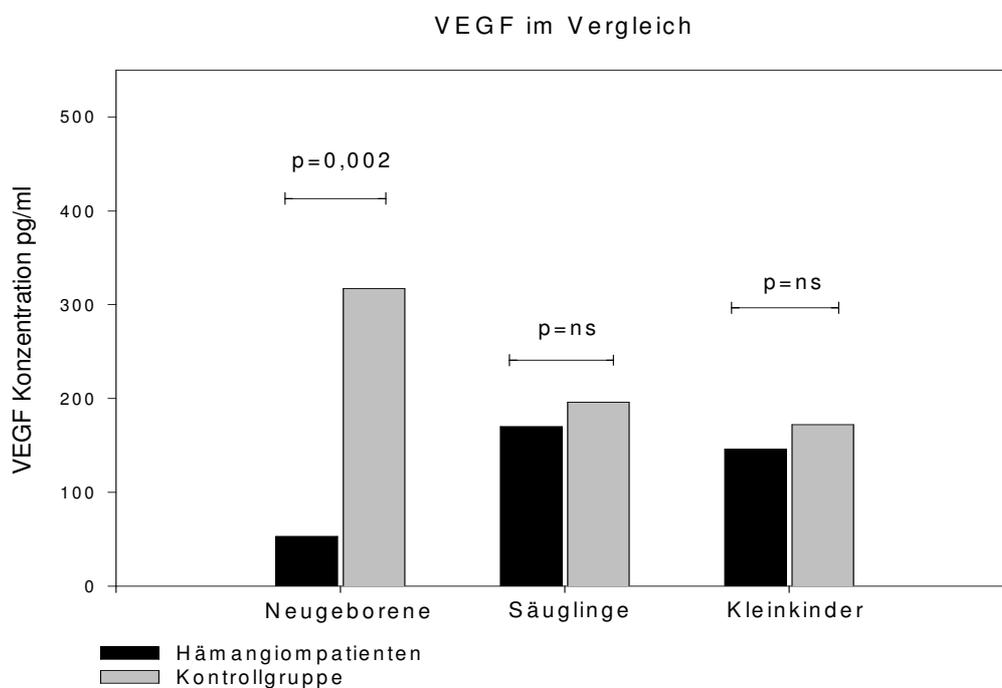


Abb.15: VEGF im Vergleich

Darstellung der Mittelwerte der Hämangiomproben im Vergleich zu den Mittelwerten der Kontrollgruppe. Die P-Werte zeigen die Signifikanz.

III. 2 Messungen der bFGF-Konzentrationen im Urin

III. 2.1 Kontrollgruppe

Für die Bestimmung eines Referenzwertes wurden 34 Urinproben von gesunden Kindern im Alter von 2 Wochen bis 2 Jahren gemessen. Bei 22 Proben (= 65%) lag die Konzentration unter dem messbaren Bereich von 1 pg/ml des Assays (R&D). Bei den restlichen 12 Proben lag der Mittelwert bezogen auf die Kreatininkonzentration bei 24,1 ng/g Kreatinin (Median: 21,3 ng/g Kreatinin; Strd.Abw: 14,2 ng/g Kreatinin; Range: 7-45 ng/g Kreatinin). Hiervon waren 9 Proben von Neugeborenen im Alter von unter vier Wochen, der Mittelwert in dieser Altersgruppe lag bei 20,9 ng/g Kreatinin (+/-17,4). Von insgesamt 22 Proben aus der Altersgruppe der Säuglinge und Kleinkinder lagen nur 3 Proben (=14%) im messbaren Bereich des Assays. Der Mittelwert dieser Gruppe war 1,6 ng/g Kreatinin (+/- 4,7).

Kontrollgruppe	Insgesamt	Neugeborene	Säuglinge/Kleinkinder	
Probenanzahl	n=34	n=12	n=22	
Mittelwert	8,0	20,9	1,6	ng/g Krea
Median	0	19,2	0	ng/g Krea
Stand. Abweichung	+/- 13,9	+/- 17,4	+/- 4,7	ng/g Krea
Positive Proben	12	9	3	

Tab.11: bFGF im Urin bei der Kontrollgruppe

Die Gruppe der Neugeborenen zeigte zum Teil hohe bFGF Konzentrationen im Urin (bis 45 ng/g Kreatinin). Hohe Serum- und Urinkonzentrationen in den ersten Wochen nach der Geburt wurden auch in anderen Arbeiten beschrieben (siehe Diskussion). Die in dieser Studie ermittelten Werte bei Neugeborenen wurden aus folgenden Gründen nicht zum Vergleich mit den Patientenproben herangezogen:

- 1) Alle Hämangiompatienten, von denen eine Urinprobe gewonnen wurde, waren älter als 2 Monate.
- 2) Es handelt sich bei Neugeborenen um wahrscheinlich physiologisch (im Rahmen der perinatalen Adaptation) erhöhte bFGF Werte, die keinen Referenzwert für ältere Kinder darstellen.

III. 2.2 Hämangiompatienten

Die Anzahl der gemessenen Proben betrug $n=67$. Davon waren 63 Proben von Patienten im Alter von 2-12 Monaten und 4 von Patienten über ein Jahr. Proben von Neugeborenen (<4 Wochen) mit Hämangiomen konnten nicht gesammelt werden. Bei 55 Proben (=82%) lag die Konzentration von bFGF im Urin unterhalb des messbaren Bereichs von 1 pg/ml des Immunassays. Bei den restlichen 12 Proben lag der Mittelwert der Messung bei 30,4 ng/g Kreatinin (Median: 22,2 ng/g Kreatinin; Strd.Abw: 30,5 ng/g Kreatinin; Range: 2-100). Der Median aller Proben lag bei 0 ng/g Kreatinin.

Hämangiomatose

Bei einer Patientin mit diffuser neonataler Hämangiomatose konnten insgesamt 15 Urinproben im Verlauf gewonnen werden mit einem Mittelwert von 196,6 ng/g Kreatinin (Median 196 ng/g Kreatinin; Range: 39-502). Allerdings ist anzumerken, dass einige Proben während der anti-angiogenetischen Therapie mit Interferon- α 2a genommen wurden. Eine genaue Darstellung der Befunde dieser Patientin wird weiter unten (Abschnitt III.4) vorgenommen. In der **Abbildung 16** wird der Vergleich der Patientengruppe mit der Kontrollgruppe dargestellt.

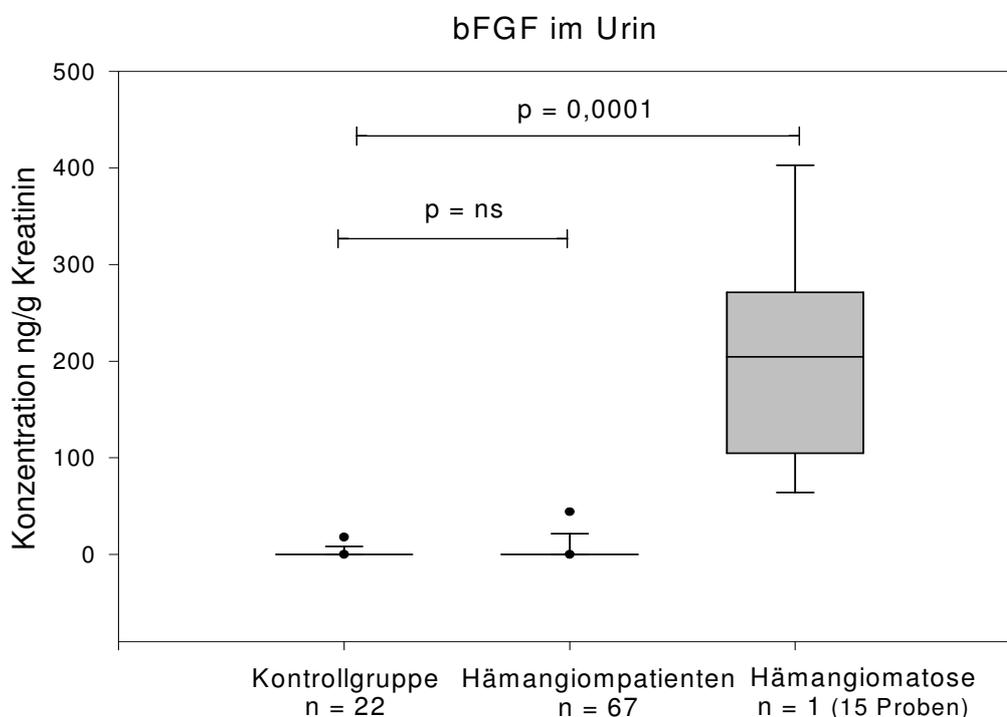


Abb.16: bFGF im Urin

Darstellung der bFGF Konzentration in ng/g Kreatinin im Urin bei Hämangiom-patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = Probenanzahl).

III. 3 bFGF und VEGF Plasmaspiegel im Verlauf

Bei einigen Patienten wurden EDTA-Plasmaproben an mehreren Behandlungsterminen gewonnen. Bestimmt wurde je Plasmaprobe die bFGF und VEGF Konzentration, wenn ausreichendes Material zur Verfügung stand. Alle Patienten wurden lokal mit dem Neodym-Yag Laser behandelt.

bFGF im Verlauf

Bei der bFGF Messung (insgesamt 8 Patienten) lagen die Konzentrationen bei einer oder mehreren Proben von 4 Patienten innerhalb des Verlaufs über der 95. Perzentile der Kontrollgruppe. Bei den restlichen vier Patienten lagen keine erhöhten Konzentrationen an bFGF vor. Die **Abbildung 17** zeigt den Verlauf der Konzentrationen an. Bei zwei Patienten (Nr. 6 u. 8) kam es in den ersten Lebensmonaten zu einem starken Anstieg der bFGF Konzentrationen innerhalb des Beobachtungszeitraums. Bei beiden Patienten nahm die Größe der Hämangiome in dieser Zeit stark zu.

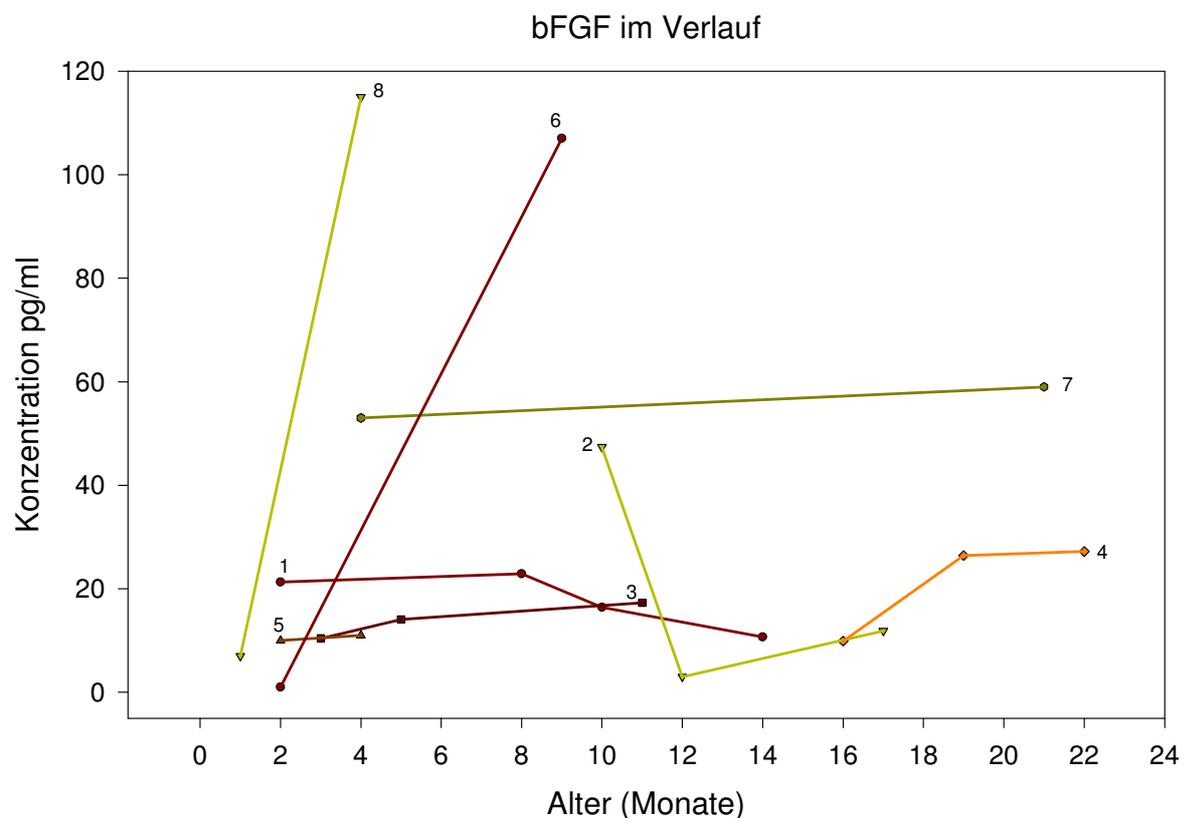


Abb.17: bFGF im Verlauf

Darstellung der bFGF Konzentration im EDTA-Plasma bei Patienten mit Hämangiomen im Verlauf von mehreren Monaten. Die Zahlen stehen für je einen Patienten und entsprechen denen der Abb.18.

VEGF im Verlauf

Die Messungen der VEGF Plasmakonzentrationen zeigten bei 5 Patienten von insgesamt 9 während des Beobachtungszeitraums erhöhte Konzentrationen des Wachstumsfaktors. Bei 6 Patienten sank die VEGF-Konzentration im Verlauf. In der **Abbildung 18** sind die Anfangs- und Endkonzentrationen innerhalb des Beobachtungszeitraums dargestellt. Zwei Patienten mit großen proliferierenden Hämangiomen im Bereich des Kopfes (Patienten Nr. 1 und Nr. 6, siehe auch Tabelle 12) zeigten im Alter von zwei Monaten hohe VEGF Werte, die innerhalb eines halben Jahres stark abfielen. Insgesamt konnte eine Abnahme der Wachstumstendenz gegen Ende des Beobachtungszeitraums verzeichnet werden.

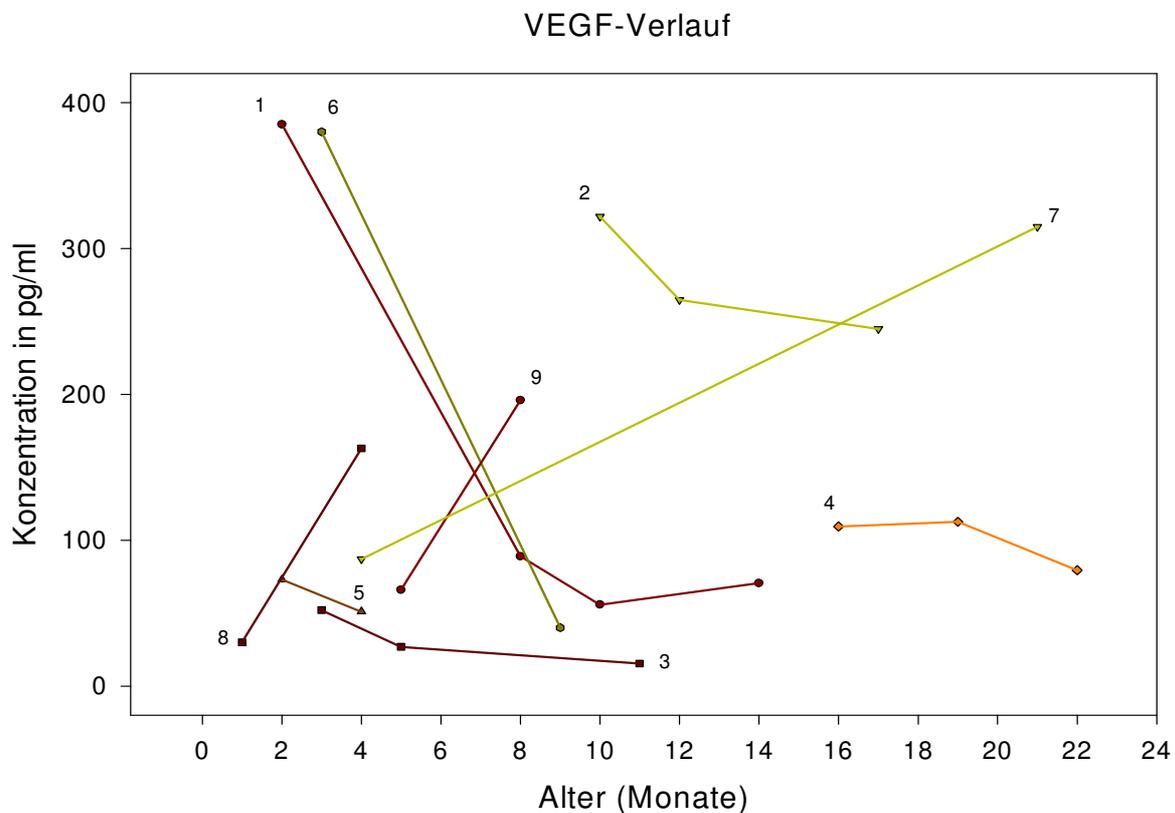


Abb.18: VEGF im Verlauf

Darstellung der VEGF Konzentration im EDTA-Plasma bei Patienten mit Hämangiomen im Verlauf von einigen Monaten. Die Zahlen stehen für je einen Patienten und entsprechen denen der **Abb.17**.

Patient	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 3	Pat. 4	Pat. 5	Pat. 6	Pat. 7	Pat. 8
Hämangiomgröße	G3	G3	G2	G1-G2	G2	G3	G3	G3
Wachstum	+++	+	+	++	+	++	+/0	+++

+ leichte Größenzunahme ; ++ deutliches Wachstum; +++ massive Größenzunahme; 0 kein Wachstum

Tab.12: Hämangiome und Verlauf

III. 4 Falldarstellung einer Patientin mit Hämangiomatose

Im folgendem wird eine Patientin mit schwerer, systemischer Hämangiomatose vorgestellt, bei der über einen Zeitraum von 7 Wochen die Bestimmung der Konzentration von bFGF und VEGF im EDTA-Plasma und von bFGF im Urin erfolgte.

Es handelte sich um ein weibliches, ehemaliges Frühgeborenes (36+2 Schwangerschaftswochen; Geburtsgewicht 2930g; Geburtslänge 52cm; Kopfumfang 37cm; APGAR 8/9), das postpartal in einem auswärtigen Krankenhaus zahlreiche kleine, zum Teil erhabene Hämangiome (>100) am gesamten Integument entwickelte (**Abb.19** u. **Abb.20**). Die zu diesem Zeitpunkt durchgeführten Untersuchungen wie Abdomensonographie, Echokardiographie und Schädelsonographie waren unauffällig. In der dritten Lebenswoche zeigten sich in der Abdomensonographie eine Stauung der intrahepatischen Gefäße und eine massive Hepatomegalie mit wolkg vermehrter Echogenität des Parenchyms. In der MRT des Abdomens stellte sich das Leberparenchym grobknotig verändert dar. Es wurde der Verdacht auf Hämangiome der Leber gestellt. Die Echokardiographie ergab eine Vergrößerung aller vier Herzhöhlen mit hohen Flussgeschwindigkeiten über der Pulmonal- und Aortenklappe. Zu dieser Zeit zeigten sich im Labor eine Verbrauchskoagulopathie, erhöhte Transaminasen und Bilirubinwerte.

Es wurde die Diagnose einer diffusen Hämangiomatose gestellt und neben der Gabe von FFP (fresh frozen plasma), Antithrombin III, Thrombozyten- und Erythrozytenkonzentraten die medikamentöse Therapie mit 5 mg/kg/die Decortin H per os begonnen.

Aufgrund der gesundheitlichen Verschlechterung mit Tachypnoe und O₂-Sättigungsabfällen erfolgte die Verlegung der Patientin aus der auswärtigen Klinik auf die Neugeborenenintensivstation in der Dr. von Haunerschen Kinderklinik in der fünften Lebenswoche. Dort wurde die Kortisontherapie fortgeführt und aufgrund der schlechten Kontraktilität des Herzens Diuretika und Digitalis angesetzt. In der Abdomen (Doppler-Duplex)-Sonographie wurde der Verdacht auf einen ausgeprägten Shunt im Bereich des linken Leberlappens gestellt. Die zur weiteren Klärung veranlasste Leberangiographie in der achten Lebenswoche zeigte eine generalisierte Shuntbildung in beiden Leberlappen. Durch die Kortisontherapie konnte bis dahin noch keine klinische Besserung der Hämangiomatose erzielt werden und es wurde der Beginn einer Interferon- α 2a (Roferon[®]) Therapie mit täglich 1.5 Mio.IE pro m² Körperoberfläche subkutan begonnen.

Auch unter der zusätzlichen Therapie mit Interferon- α 2a zeigte sich keine Besserung. Die Größe und Zahl der kutanen Hämangiome nahm zu. Die Leber war mit 9 cm unter dem Rippenbogen in der Medioclavikularlinie im Gegensatz zur letzten Untersuchung größer geworden. Auch nahm das kongestive Herzversagen weiter zu, was zu Husten Tachypnoe, Trinkschwäche, generalisierten Ödemen und einem kontinuierlichen O₂-Bedarf führte und eine Intubation notwendig machte. Die Echokardiographie in der zwölften Woche zeigte eine massive Herzmuskel- und Septumhypertrophie mit schlechter Ventrikelfüllung, aber ohne Insuffizienzzeichen. Das Herzzeitvolumen betrug 700ml/kg/min. Daraufhin wurde Digoxin abgesetzt und Decortin H langsam ausgeschlichen.



Abb.19: Diffuse neonatale Hämangiomatose, Kopfbereich

Patientin mit diffuser neonataler Hämangiomatose. Multiple kleine Hämangiome auf der Haut und Schleimhaut mit viszeraler Beteiligung (Leber, Pankreas, ZNS). Zunahme der Anzahl und Größe der Hämangiome innerhalb der ersten Lebenswochen. Die Patientin verstarb an den Komplikationen der Erkrankung.

Bei rückläufiger Diurese wurde die Diuretikatherapie intensiviert. Wegen Verdacht auf Nebenwirkungen bei Hämolyse wurde Interferon- α 2a nach einmonatiger Gabe abgesetzt. Neben der Hämolyse zeigte sich auch eine Verbrauchskoagulopathie und Thrombopenie im Blut. Die Embolisation der A. hepatica sinistra in der 11. Lebenswoche

und der A. hepatica communis in der 12. Lebenswoche brachte keine Besserung der hohen Shuntflüsse, da sich bereits nach Verschluss der Gefäße andere Gefäße eröffneten. Im Computertomogramm stellte man multiple viszerale Hämangiome im ZNS, in der Leber und dem Pankreas fest.

Der gesundheitliche Zustand der Patientin verschlechterte sich im Verlauf immer weiter. Im Alter von 15 Wochen verstarb die Patientin an den Folgen ihrer progredienten Krankheit.

Innerhalb der achten bis vierzehnten Woche wurden Plasmaproben und Urinproben der Patientin gesammelt. Die Messung begann mit Beginn der Interferon- α 2a Therapie. Insgesamt wurden die bFGF Werte von 15 Urinproben und von 8 Plasmaproben bestimmt.



Abb.20: Diffuse neonatale Hämangiomatose, Stammbereich

Massiver Befall des gesamten Integuments mit kleinen, zum Teil größeren erhabenen dunkelroten runden Hämangiomen.

Die bFGF-Werte der Patientin waren sowohl im Plasma als auch im Urin gegenüber der Kontrollgruppe zum Teil deutlich erhöht. In der **Abbildung 21** sind die Verlaufswerte von bFGF im Plasma in pg/ml und im Urin in ng/g Kreatinin $\times 10^3$ über 7 Wochen dargestellt. Die Interferon- $\alpha 2a$ Therapie erfolgte über 35 Tage (roter Balken). Die Embolisation der A. hepatica sinistra erfolgte in der 11. Lebenswoche, die der A. hepatica communis in der 12. Lebenswoche (schwarze Pfeile). Aufgrund des geringen Probenmaterials konnten für die Messung des VEGF Plasmaspiegels nur fünf Werte bestimmt werden (**Abb.22**). Dabei zeigt sich ein starker Abfall der Plasmakonzentration von 512 pg/ml auf unter 4 pg/ml. Allerdings liegen die zwei letzten Werte aufgrund der hohen Verdünnung der Proben wahrscheinlich unter dem tatsächlichen Wert. Dennoch ist aufgrund der starken Konzentrationsgefälle der ersten drei Spiegel anzunehmen, dass die Werte niedrig sein müssten.

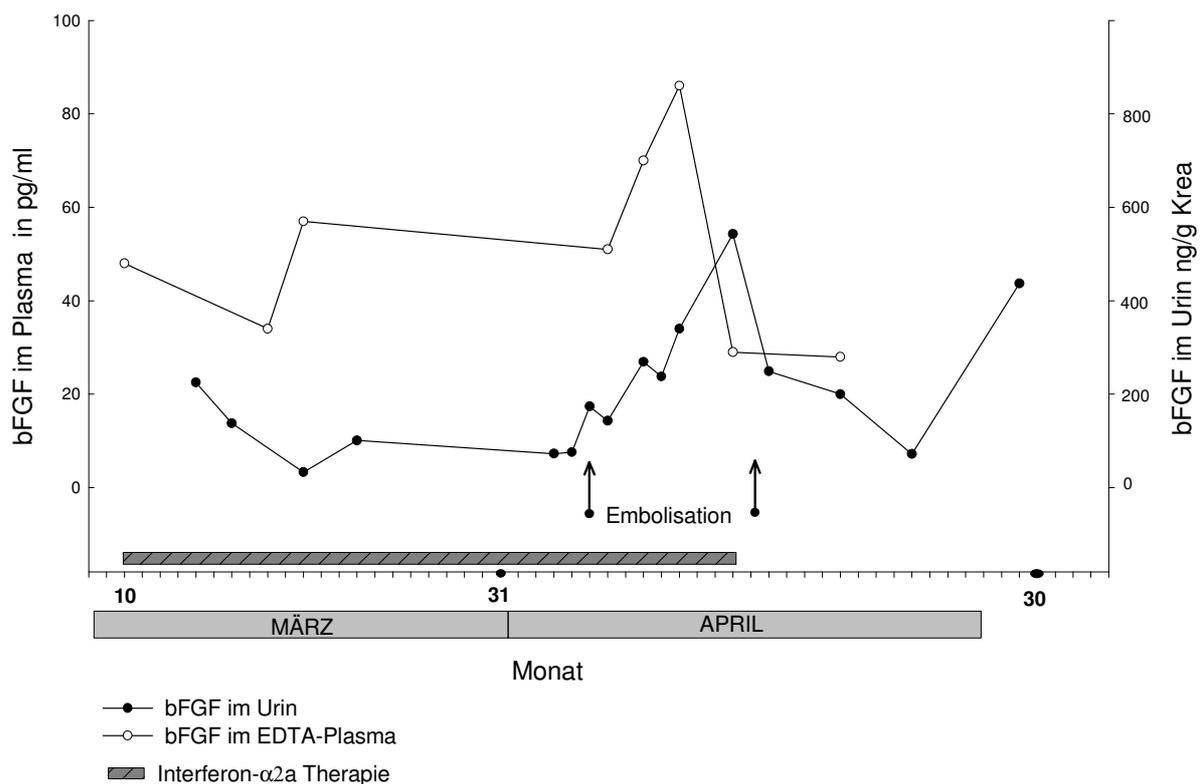


Abb.21: bFGF im Verlauf bei Hämangiomatose

Darstellung der bFGF Konzentration im Plasma und Urin im Verlauf von zwei Monaten bei einer Patientin mit diffuser neonataler Hämangiomatose. Der dunkelgraue Balken zeigt die Dauer der Interferon- $\alpha 2a$ Therapie, die aufgrund der schwerwiegenden Nebenwirkungen wieder abgesetzt wurde. Die Patientin verstarb an den Komplikationen ihrer schweren Erkrankung wenige Tage nach der letzten Messung.

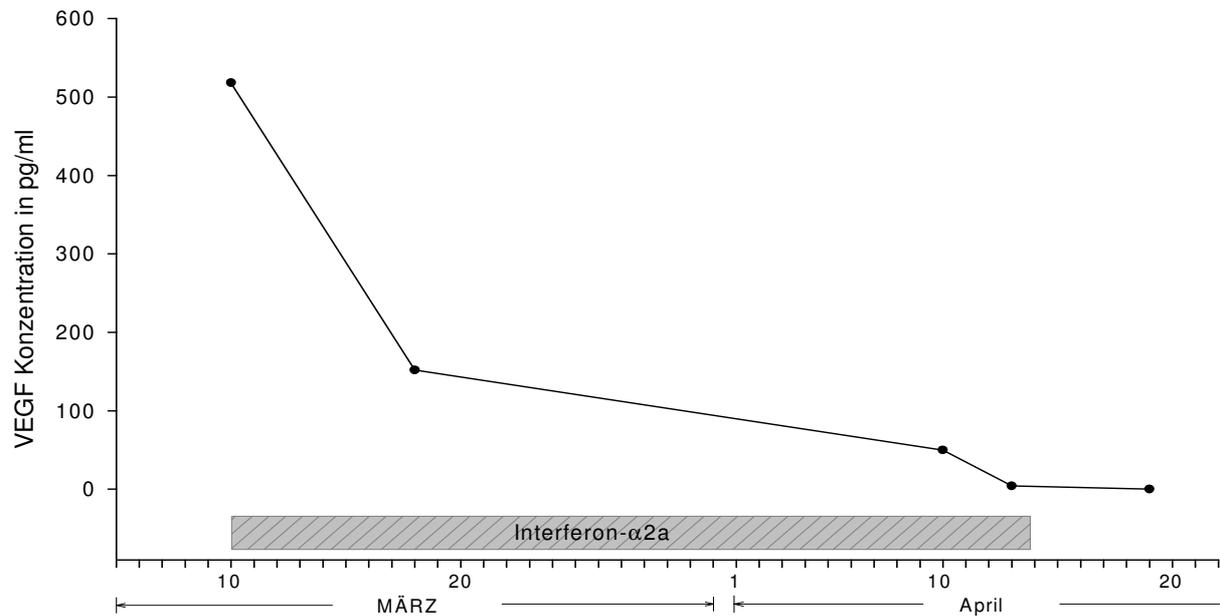


Abb.22: VEGF im Verlauf bei Hämangiomatose

Darstellung der VEGF Plasmakonzentration im Verlauf von zwei Monaten bei einer Patientin mit diffuser neonataler Hämangiomatose. Der graue Balken gibt die Dauer der Interferon- α 2a Behandlung an. Die VEGF Plasma Konzentration war zu Beginn der Interferon Behandlung stark erhöht und sank dann rasch ab. Eventuell zeigte sich hier die anti-angiogenetische Wirkung von Interferon- α 2a zumindest im Labor, auch wenn klinisch keine Besserung zu verzeichnen war.

IV. Diskussion

Die Angiogenese stellt einen wichtigen und notwendigen Schritt in der Proliferation und Ausdehnung von Gewebe, sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Prozessen dar. Es ist daher nicht verwunderlich, dass gerade dieser Bereich in den letzten Jahren auf großes Interesse in der medizinischen Forschung stieß. Dieses zeigt sich vor allem an den zahlreichen Studien und Veröffentlichungen über dieses Thema. So formt sich nun langsam ein genaueres, aber immer noch sehr lückenhaftes Bild der komplexen zellulären und biochemischen Vorgänge der Angiogenese. Im molekularen Bereich können mit den heutigen Methoden einfach und genau Konzentrationen von biochemisch wirksamen Faktoren in den verschiedenen Geweben und Flüssigkeiten gemessen werden.

Eine wichtige Gruppe dieser Faktoren ist die Familie der Zytokine, Moleküle der interzellulären Kommunikation, die ein großes Spektrum an Wirkungen auf unterschiedliche Zellen aufweisen.

Gerade einer bestimmten Gruppe dieser Familie, den Wachstumsfaktoren mit angiogenetischer Wirkung wird eine sehr wichtige Rolle in der Angiogenese zugesprochen. Hierzu zählen der basic fibroblast growth factor (bFGF) und der vascular endothelial growth factor (VEGF), bei denen eine hohe angiogenetische Wirkung „in vivo“ und „in vitro“ nachgewiesen werden konnte [66].

Hämangiome stellen ein Paradebeispiel unphysiologischer Angiogenese dar. Folkman postulierte, dass es sich hierbei um unkontrollierte Angiogenese handelt [26]. Gerade die zeitliche Abfolge von raschem Wachstum über Stagnation bis hin zur Regression der Tumoren bieten ein interessantes Gebiet zur Erforschung angiogenetischer Prozesse und deren Steuerung. Wegen der Komplexität der zahlreichen Mechanismen, die an der Gefäßneubildung beteiligt sind, deren Modulation und Interaktion wird allerdings ersichtlich, dass es nicht nur einen Weg gibt, die Gefäßneubildung zu stimulieren. So scheinen Prozesse, die auf die Angiogenese angewiesen sind, auf verschiedene Aktivierungs- und Regulationsmechanismen zurückgreifen zu können. Die Identifizierung dieser molekularen Trigger in Hämangiomen stößt auf großes Interesse sowohl auf klinischer als auch auf biologischer Seite.

So wurde in den letzten Jahren versucht, genauere Einblicke in die Pathogenese der Hämangiome zu bekommen [87-89]. Dazu dienten verschiedene „in vitro“ Modelle unter anderem an transgenen Mäusen, sowie an Zellkulturen von Endothel aus menschlichem Hämangiomgewebe [18, 33, 76, 98]. Alle diese Methoden und Modelle werden den pathophysiologischen und biochemischen Prozessen in menschlichen Hämangiomen allerdings nicht gerecht und weisen teilweise große Mängel im Vergleich auf [89]. Ein neueres „in vitro“ Modell mit Kultivierung von menschlichen Hämangiomgewebe aus Biopsiematerial versucht, diese Voraussetzungen möglichst genau zu schaffen [88]. Hierbei wird auch der Einfluss von gewebsständigen Zellen wie Mastzellen und Perizyten berücksichtigt, die bewiesenermaßen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Hämangiomen spielen (siehe Abschnitt 1.3.6). Eventuell lassen sich so bald genauere Kenntnisse über die Gefäßneubildung und das Wachstum von Hämangiomen erwerben.

Takahashi et al. konnten durch immunhistologische Techniken erhöhte Konzentrationen von bFGF und VEGF im Gewebe von proliferierenden Hämangiomen nachweisen und sprachen diesen Faktoren als einer der ersten eine wichtige Rolle in deren Entwicklung zu [87]. Sie untersuchten verschiedene zelluläre Marker im Gewebe von Hämangiomen zu den unterschiedlichen Verlaufsphasen. In der Proliferationsphase (0-12 Monate) dokumentierten sie erhöhte Werte sowohl von VEGF, als auch von bFGF. In der Involutionsphase (13 Monate-5Jahre) fiel der Wert von VEGF stark ab. Werte von bFGF zeigten sich in dieser Phase noch erhöht und waren erst in der „involuted“ Phase merkbar verringert. In anderen Arbeiten konnte eine erhöhte mRNA Expression für beide Wachstumsfaktoren in proliferierenden Hämangiomen dokumentiert werden [11]. Auf dieser Grundlage basierend stellte sich die Frage, ob diese Faktoren auch im Blut und Urin bei Patienten mit Hämangiomen erhöht sind und ob Messungen dieser Faktoren eventuell im klinischen Vorgehen von Nutzen sein könnten.

Auf der Basis dieser Erkenntnisse untersuchten wir, ob erhöhte Werte von bFGF und VEGF im Plasma und Urin bei Patienten mit Hämangiomen der Dr. von Haunerschen Kinderklinik der Ludwigs-Maximilians-Universität zu ermitteln sind und welche Folgerungen daraus gezogen werden können.

IV. 1 bFGF und VEGF im Plasma

IV. 1.1 Kontrollgruppe

Das mediane Alter unserer Kontrollgruppe lag bei 12,5 Monaten. Um eine ausreichende Anzahl an Proben von Kindern mit einem Alter von über 12 Monaten zu erhalten, wurde zu Beginn der Arbeit als Einschlusskriterium ein Alter bis zu fünf Jahren festgesetzt. Insgesamt lag das mediane Alter der Gruppe der Kleinkinder bei 24 Monaten (Range 15-26 Monate) und unterschied sich somit nicht wesentlich vom medianen Alter von 17 Monaten der Gruppe der Kleinkinder mit Hämangiomen.

Die bFGF Messung im Plasma aller Proben ergab einen Mittelwert von 35,3 pg/ml (Median: 19 pg/ml). Innerhalb der Altersverteilung zeigten sich die höchsten Werte in der Gruppe der Neugeborenen mit einem Konzentrationsgefälle zu den Säuglingen bis hin zu den Kleinkindern. Die hohen bFGF Werte im Plasma bei Neugeborenen wurden auch in anderen Studien beobachtet [35, 46]. Die größte Spannweite der Werte von bFGF im Plasma zeigte sich in der Gruppe der Säuglinge (Range: 3-95 pg/ml). Vergleiche mit Daten der Literatur zeigen in der Studie von Pavlakovic et al. bei gesunden Kindern (Durchschnittsalter: 7 Jahre) einen Mittelwert von bFGF im Serum von 8,3 pg/ml (+/- 9,8) [65]. In einer anderen Studie mit einer insgesamt jüngeren Kontrollgruppe (n=22) von durchschnittlich 2 Jahren zeigte sich ein Median von 3 pg/ml (Range: 0-7 pg/ml) [86]. Laut Herstellerangaben (R&D) liegt die gemessene Konzentration von bFGF im Serum unter der Konzentration von bFGF im Plasma. Es wurden in der Literatur keine genauen Angaben zu bFGF Plasmaspiegeln bei gesunden Kindern gefunden [70]. Der Median bei gesunden Erwachsenen liegt in einer Arbeit von Komorowski et al bei 11,1 pg/ml (+/- 2,4) [44].

Die Messung von VEGF im Plasma bei der Kontrollgruppe ergab einen Mittelwert von 200,1 pg/ml (Median: 152,5 pg/ml). Bei den Neugeborenen wurden die höchsten VEGF Konzentrationen gemessen, allerdings war der Median mit 175 pg/ml nicht höher als bei den Säuglingen (Median: 177,5 pg/ml). Innerhalb der Gruppe der Kleinkindern lag der Median mit 128 pg/ml im Vergleich etwas tiefer. In der Literatur finden sich Angaben über VEGF Plasmakonzentrationen bei älteren gesunden Kinder mit einem Median von 135 pg/ml (+/- 22,8) [94]. In einer anderen Studie mit einer Kontrollgruppe (n=81) von durchschnittlich 4,8 Jahren lag der Median von VEGF im Plasma bei 66,3 pg/ml (+/- 22,5) [35]. In dieser Arbeit wurden bei gesunden Neugeborenen stark erhöhte VEGF Werte

im Plasma gemessen, die rasch innerhalb der ersten drei Monate nach der Geburt abfielen und danach auf einem stabilen Plateau blieben. Im Vergleich zu den Plasmawerten lagen die VEGF Serumkonzentrationen bei gesunden Kindern (Alter 3-17) in einer Studie aus Essen im Mittel bei 241 ± 47 pg/ml [65]. Hierbei muss allerdings bedacht werden, dass laut Herstellerangaben (R&D) die im Serum gemessenen VEGF Serumwerte über denen der EDTA-Plasmawerte liegen.

Bei der Geschlechtsverteilung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Kontrollgruppe bei beiden Faktoren.

Wie die oben beschriebenen Daten zeigen, ist aufgrund der z.T. deutlichen Unterschiede eine Festlegung eines „physiologischen“ Konzentrationsbereichs von VEGF und bFGF bei gesunden Kindern aus dieser Arbeit sowie aus den bisher veröffentlichten Studien nicht möglich. Zum Vergleich der Ergebnisse unserer Patienten mit Hämangiomen dienten daher ausschließlich die in dieser Arbeit erhobenen Konzentrationen der Kontrollgruppe.

IV. 1.2 Hämangiopatien

Die Messung von bFGF und VEGF im Plasma innerhalb der Hämangiomgruppe zeigte im Gegensatz zur Kontrollgruppe bei der Altersverteilung keinen Abfall der Plasmaspiegel bei den älteren Patienten. Die gemessenen Konzentrationen beider Faktoren bei den zwei Neugeborenen mit Hämangiomen waren sogar vergleichsweise niedrig. Der Grund dafür ist unklar, allerdings ist die geringe Fallzahl nicht aussagekräftig. Innerhalb der Gruppe der Säuglinge zeigte sich eine große Spannweite der Plasmaspiegel von bFGF (Range: 2-212 pg/ml) und VEGF (Range: 15-1604 pg/ml). Auch bei den Patienten über ein Jahr wurden große Spiegelunterschiede vor allem von bFGF gemessen. Zudem lag der Mittelwert dieses Faktors etwas höher als der der Säuglingsgruppe.

Der Vergleich der Mittelwerte von bFGF und VEGF im Plasma aller Hämangiopatien mit denen der Kontrollgruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied. Das mag darauf zurückzuführen sein, dass ein großer Teil der Patienten zwar wegen Hämangiomen in Behandlung war, die geringe Größe der Tumoren allerdings nicht zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration von

Wachstumsfaktoren im Blut führte. Eine genauere Differenzierung unter Beachtung der Tumorgroße und der Wachstumseigenschaft wird weiter unten vorgenommen.

Betrachtet man den Vergleich der Werte zwischen der Kontrollgruppe und der Hämangiomgruppe innerhalb der Altersverteilung (Tabelle 8), so zeigte sich, dass die Spiegel von bFGF und VEGF im Plasma der Hämangiompatienten im Mittel sogar unter denen der Kontrollgruppe lagen. Eine Ausnahme bietet hier der Wert von bFGF bei den Kleinkindern mit Hämangiomen, der über dem der Kontrollgruppe lag. Allerdings zeigte diese Gruppe auch eine große Spannweite der Spiegel mit teilweise sehr niedrigen Werten (Range: 3-159 pg/ml). Der große Unterschied des Mittelwerts beider Faktoren innerhalb der Neugeborenenengruppe ist aufgrund der geringen Fallzahlen kaum zu beurteilen. Dennoch ist anzumerken, dass bei keiner der Kontrollproben eine so geringe Konzentration wie bei den zwei Patienten mit Hämangiomen gemessen wurde.

IV. 1.3 bFGF/VEGF und Tumorgroße

Wie oben beschrieben lagen die Plasmaspiegel der gemessenen Wachstumsfaktoren bei der Hämangiomgruppe im Mittel nicht höher als die der Kontrollgruppe. Die Vermutung, die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF seien im Plasma bei Hämangiompatienten erhöht nachzuweisen, konnte für den überwiegenden Teil der Patienten nicht bestätigt werden. Wie aber verhält es sich bei dem Vergleich der Höhe der Konzentration von bFGF oder VEGF im Plasma mit der jeweiligen Tumorgroße und dem klinischen Aspekt des Tumors? Es zeigte sich, dass bei Zunahme der Tumorgroße auch eine Erhöhung der Plasmaspiegel beider Faktoren im Plasma vorlag (*Abb. 7. u. 8*). Der Vergleich der drei Gruppen mit unterschiedlicher Hämangiomgröße zeigte bei beiden Faktoren keinen statistisch signifikanten Unterschied. Hierbei ist der Zeitpunkt der Abnahme zu berücksichtigen, der bei einigen Patienten mit großen Hämangiomen in der zweiten Hälfte des ersten Lebensjahres oder später erfolgte, somit gegen Ende der Proliferationsphase der Hämangiome bzw. danach.

Bei der Einteilung der Hämangiome nach dem klinischen Aspekt als Zeichen der Progressionstendenz der Hämangiome kam es auch zu einer Zunahme der Konzentration von bFGF und VEGF, je ausgeprägter die Wachstumstendenz der Tumore war (*Tab. 8 u. 9*). Bei stark eruptiven, dunkelroten Hämangiomen (T3) lagen die

Werte beider Faktoren signifikant höher als bei planen, hellroten oder ablassenden Tumoren ($p_{bFGF} = 0,014$; $p_{VEGF} = 0,03$). Bei der ersten Gruppe lag auch eine erhöhte Wachstumsprogredienz vor. Auch die Ergebnisse der Verlaufsmessungen von mehreren Proben eines Patienten bestätigen die Korrelation zwischen Proliferationstendenz und Höhe der Wachstumsfaktoren bei den Patienten mit großen Hämangiomen. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe der Konzentration von bFGF und VEGF (Kovariation) konnte in dieser Arbeit nicht gefunden werden und wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Somit zeigt sich aus den Ergebnissen, dass sowohl die Größe der Hämangiome als auch deren klinischer Aspekt (gleichbedeutend für die Wachstumsprogredienz) einen Einfluss auf die Plasmakonzentrationen von bFGF und VEGF haben. Hohe bFGF oder VEGF Konzentrationen im EDTA-Plasma sind demnach vor allem bei Patienten mit Hämangiomen >5cm und starker Wachstumstendenz zu erwarten.

Auch bestätigen die Ergebnisse die wichtige Rolle beider Wachstumsfaktoren in der Pathogenese der Hämangiome.

IV. 1.4 Sekundäre bFGF/VEGF Erhöhung

Sicherlich gibt es aber auch viele sekundäre Ursachen, die zu einer Erhöhung von bFGF und VEGF im Plasma führen können. In unseren Untersuchungen zeigten Plasmaproben von Kindern in der akuten Phase von Infekten sowie postinfektiös hohe bis sehr hohe Spiegel beider Wachstumsfaktoren.

Aber auch bei anderen akuten wie chronischen Allgemeinerkrankungen im Kindesalter wie zum Beispiel beim Kawasaki-Syndrom [90], bei der juvenilen rheumatoiden Arthritis [96] oder bei der Mukoviszidose [50] konnten erhöhte Konzentrationen von angiogenetischen Faktoren im Plasma/Serum und/oder Urin gemessen werden.

Bei zwei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie konnten wir stark erhöhte Werte von bFGF im Plasma messen (Median: 246 pg/ml). Erhöhte Konzentrationen von angiogenetischen Faktoren im Serum und Urin bei Patienten mit malignen Bluterkrankungen wurden auch in anderen Arbeiten beschrieben [2, 63, 77].

Zusammenfassend kann über die Messung von bFGF und VEGF im EDTA-Plasma nach den oben beschriebenen Ergebnissen folgendes gesagt werden:

In allen Proben konnten die Faktoren nachgewiesen werden. Innerhalb des ersten Lebensjahres zeigten sich große interindividuelle Unterschiede in der Höhe der Konzentrationen sowohl von bFGF als auch von VEGF. Die höchsten Konzentrationen wurden innerhalb der ersten vier Lebenswochen gemessen. Warum die Konzentrationen beider Wachstumsfaktoren interindividuell so unterschiedlich waren, ist unklar. Faktoren wie zum Beispiel akute Infektionen, die sekundär zur Erhöhung der Wachstumsfaktoren führen können, wurden so gut wie möglich ausgeschlossen.

Die Messung von bFGF und VEGF im EDTA-Plasma bei Patienten mit Hämangiomen ergab im Schnitt vor allem bei kleinen Hämangiomen keine erhöhten Konzentrationen beider Faktoren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Allerdings konnten bei großen und/oder multiplen Hämangiomen mit starker Wachstumstendenz erhöhte Plasmaspiegel von bFGF und/oder VEGF gemessen werden. Dabei korrelierten die Konzentrationen sowohl von bFGF als auch von VEGF mit dem klinischen Bild des Tumors. Somit kann die Messung dieser beiden Faktoren im Plasma zur Beurteilung der Wachstumsprogredienz eines Hämangioms herangezogen werden. Ob dies allerdings von klinischem Nutzen ist, kann erst nach weiteren Untersuchungen und der Bewertung individueller Verläufe beurteilt werden. Mit Ausnahme der Patientin mit Hämangiomatose wurden alle Patienten nur lokal physikalisch behandelt. Auf die Messung von bFGF und VEGF im Plasma bei Patienten mit Hämangiomatose wird weiter unten Bezug genommen. Der Einfluss einer anti-angiogenetischen Therapie mit z.B. Interferon oder Kortikoiden auf die Plasmakonzentrationen von bFGF oder VEGF konnte somit bei diesen Patienten nicht beurteilt werden. In der Literatur wird dieser bei einem Teil von Patienten mit Hämangiomen aber beschrieben.

IV. 2 bFGF im Urin

Die Überlegung erscheint sinnvoll, durch Messungen der Wachstumsfaktoren im Urin von Hämangiompatienten eine mittlere Konzentration über einen längeren Zeitraum zu ermitteln. Die intraindividuellen Schwankungen der bFGF-Werte im Urin von gesunden Probanden innerhalb weniger Tage liegen laut Literaturangabe um 10% [56] (keine eigenen Daten). Bei insgesamt 34 Urinproben der Kontrollgruppe lagen nur 12 Proben über der Nachweisgrenze des Assays mit einem Mittelwert von 24,1 ng/g Kreatinin. Wie

oben beschrieben, stammten 9 positive Proben der Kontrollgruppe von Neugeborenen (siehe S. 44, Tab. 11). Für die Kontrollgruppe im Alter zwischen 2 Monaten und 2 Jahren lag der Mittelwert bei 1,6 ng/g Kreatinin (+/- 4,7). Im Vergleich lag der Mittelwert von bFGF im Urin bei einem Kontrollkollektiv gesunder Kinder bei einer Arbeit aus Essen bei 1,8 (+/- 8,4) ng/g Kreatinin (n=57; Alter 2-17 Jahre) [65]. Auch hier lagen über 80% der Proben unter der Nachweisgrenze des Immunassays. Die Ergebnisse entsprechen somit denen dieser Arbeit. Es ist allerdings noch nicht genau geklärt, welche Faktoren die bFGF Werte im Urin beeinflussen können. Bei einem Patienten mit einem fieberhaften Infekt war die bFGF Konzentration im Urin mit 196 ng/g Kreatinin deutlich erhöht.

Innerhalb der Gruppe der Hämangiopatien (ohne Patientin mit Hämangiomatose) konnte nur bei ca. 1/4 aller Proben bFGF im Urin nachgewiesen werden. Der Median aller Proben lag daher wie bei der Kontrollgruppe bei 0 ng/g Kreatinin. Betrachtet man den Mittelwert der positiven Patientenproben (n=12), so lag dieser bei 30,4 ng/g Kreatinin (Median:22,2 ng/g Kreatinin; Strd. Abw: +/- 30,5) und war somit im Vergleich zu den positiven Kontrollproben deutlich höher. Bei 11 Patienten zeigte sich auch klinisch eine Wachstumsprogredienz des Hämangioms. Bei einem Patienten befand sich das Hämangiom klinisch bereits in der Regressionsphase.

Bei der Patientin mit Hämangiomatose waren die Urin bFGF Werte (Median: 196 ng/g Kreatinin) im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p= 0,0001$). Die Patientin wird unter Abschnitt IV.3 gesondert besprochen.

Bei einigen Patienten konnte zeitgleich sowohl eine Urinprobe als auch eine Plasmprobe gewonnen werden. Eine direkte Korrelation zwischen bFGF-Plasmakonzentration und Urinkonzentration bestand nur bei sehr hohen Konzentrationen. Bei einigen niedrigen bFGF Werten im Plasma waren die Urinkonzentrationen nachweisbar und zum Teil auch hoch. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei einigen Patienten mit hohen bFGF Plasmakonzentrationen nicht die zu erwartenden hohen Urinwerte. Zum Teil lagen diese unter der Nachweisgrenze des Immunassays.

Zusammenfassend kommt man anhand dieser Befunde zu folgendem Ergebnis: Die Vermutung, aufgrund der Größe der Hämangiome und deren Wachstumstendenz

und/oder einer hohen bFGF Plasmakonzentration Rückschlüsse auf die Höhe der bFGF Urinkonzentration zu ziehen, bestätigte sich nicht. So lagen bei einigen Patienten mit großen, proliferativen Hämangiomen die Urinkonzentrationen von bFGF sogar unter der Nachweisgrenze des Immunassays. War bFGF allerdings im Urin nachweisbar, so waren die Konzentrationen bei 85% der Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht.

IV. 3 Hämangiomatose

Gegenüber den oben beschriebenen lokalisierten Formen von Hämangiomen müssen die schweren systemischen Formen, die sogenannten Hämangiomatosen abgegrenzt werden. Bei unserer Patientin mit schwerer diffuser neonataler Hämangiomatose lagen die gemessenen Werte von bFGF und VEGF im Plasma als auch bFGF im Urin deutlich höher als die der Kontrollgruppe. Es konnte aufgrund ausreichenden Materials ein interessanter Verlauf dargestellt werden (Abb. 21 u. Abb.22). Dabei scheint die Messung von bFGF im Urin geringeren Schwankungen zu unterliegen als die Messung im Plasma. Beide Kurven verlaufen tendenziell ähnlich. Trotz fehlender Vorwerte zeigte sich ein gleich bleibendes niedriges Niveau der bFGF Konzentration während der Interferon- α 2a Therapie in den ersten 20 Tagen. Die hohe VEGF Konzentration fiel unter der Behandlung stark ab. Eine klinische Besserung der Hämangiomatose trat in dieser Zeit nicht auf, sondern die Anzahl der Hämangiome nahm weiter zu. Auch der sonographische Befund der Leber zeigte eine deutliche Größenzunahme der Hämangiome innerhalb dieser Zeit im Vergleich zum Vorbefund. Daher waren die niedrigen bFGF und VEGF Werte nicht gleichzusetzen mit einer klinischen Besserung oder Stillstand der Erkrankung. In den letzten 10 Tagen vor Absetzen von Interferon- α 2a zeigte sich eine Erhöhung der bFGF Werte sowohl im Plasma, als auch im Urin. In dieser Zeit verschlechterte sich der klinische Zustand der Patientin rasch und es wurden aufgrund der zunehmenden Shuntflüsse mit erheblicher kardiovaskulärer Belastung zwei Embolisationen der AV-Fisteln in der Leber vorgenommen. Ob diese Eingriffe einen Einfluss auf die Plasmaspiegel der Faktoren hatten oder ob die Erhöhung der Konzentrationen von bFGF Folge einer erhöhten Krankheitsaktivität war, ist schwer zu beurteilen. Zwar zeigte sich nach der ersten Embolisation ein deutlicher Anstieg von bFGF im Plasma und im Urin, bei der zweiten Embolisation kam es allerdings zu einem Abfall der bFGF Konzentration. Auch mag die fehlende anti-angiogenetische Wirkung

von Kortikosteroiden nach Absetzen von Decortin H zu dieser Zeit zu einer Erhöhung des bFGF-Spiegels geführt haben. Ob die Kortikoidtherapie aber überhaupt einen Einfluss auf die Höhe der Konzentration der Wachstumsfaktoren insbesondere von bFGF bei dieser Patientin hatte, kann aufgrund fehlender Werte vor Beginn der Decortin H Behandlung nicht beurteilt werden. In der Literatur wurde die Abnahme der bFGF Konzentration unter Kortikoidtherapie bei einigen Patienten mit Hämangiomen beschrieben.

Im Rahmen der Messung der VEGF Plasmaspiegel bei der Patientin fällt auf, dass die Konzentration des Faktors im Zeitraum der Interferon- α 2a Therapie stark abfällt. Der Wert sinkt von 500 pg/ml am ersten Behandlungstag mit Interferon- α 2a bis auf unter 50 pg/ml innerhalb der ersten 30 Behandlungstage. Hier zeigt sich vielleicht der hemmende Einfluss von Interferon- α 2a auf die Angiogenese, zumindest im Bereich dieses Wachstumsfaktors.

Zusammenfassend kann man folgendes über die Ergebnisse der bFGF und VEGF Messung bei der Patientin mit schwerer Hämangiomatose sagen:

Die bFGF Konzentration in Plasma und Urin waren im Vergleich zur Kontrollgruppe zum Teil signifikant erhöht. Auch der VEGF Plasmaspiegel zu Beginn der Messung lag signifikant höher. Unter Interferon- α 2a Therapie blieben die bFGF Konzentrationen weitgehend gleich niedrig, während es bei VEGF sogar zu einem deutlichen Konzentrationsabfall kam. Da es allerdings trotz der niedrigen Spiegel beider Faktoren unter anti-angiogenetischer Behandlung zu einer Progredienz der Erkrankung mit Zunahme der Hämangiomzahl kam, muss hinterfragt werden, inwiefern die Höhe der Plasmakonzentration beider Faktoren einen Einfluss auf die lokale Krankheitsaktivität bei dieser Patientin hatte. Auch stellt sich die Frage, ob mit einer intensiveren anti-angiogenetischen Therapie mit höheren Dosen an Interferon- α 2a die starke Progredienz der Erkrankung hätte verhindert bzw. verzögert werden können. Aufgrund der wahrscheinlich durch das Medikament bedingten Nebenwirkungen während der Behandlung, die auch zum Absetzen des Medikaments geführt hatten, kam eine höhere Dosierung jedoch nicht in Frage.

Insgesamt stellt diese Patientin den schwersten Fall einer diffusen Hämangiomatose mit letalem Ausgang dar, bei dem auch in der heutigen Medizin noch keine ausreichend

wirksame Behandlung bekannt ist. Hier mag die anti-angiogenetische Therapie in Zukunft einen großen Stellenwert einnehmen (siehe unten).

IV. 4 bFGF bzw. VEGF und ihre klinische Bedeutung

Dosquet et al. untersuchten den basischen Fibroblastenwachstumsfaktor im Urin bei Patienten mit proliferierenden Hämangiomen und vaskulären Malformationen [17]. Die Patienten mit vaskulären Malformationen (n=4) zeigten normale bis niedrige Werte von bFGF im Urin (0-980 pg/g Kreatinin; Alter 6 Monate bis 25 Jahre). Von 10 Patienten mit proliferierenden Hämangiomen waren die Werte von bFGF im Urin bei 8 Patienten erhöht gegenüber der Kontrollgruppe (n=18; Median: 0 pg/g Kreatinin; Range: 0-1700). Bei 6 Patienten führten die erhöhten Werte (Median: 18 600 pg/g Kreatinin; Alter 2-11 Monate) zu der Wahl einer anti-angiogenetischen Therapie mit Interferon- α 2a nach erfolgloser Behandlung mit hohen Dosen an Kortison. Die Therapie mit Interferon- α 2a führte bei allen Patienten zu einer Abnahme der bFGF Werte im Urin. Stark erhöhte Werte gegenüber der Kontrollgruppe zeigte auch unsere Patientin mit einer diffusen neonatalen Hämangiomatose. Die Werte lagen im Mittel bei 196500 pg/g Kreatinin (Strd.Abw: 123000) und waren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Auch bei unserer Patientin sanken die bFGF Werte im Urin am Anfang unter der Interferon- α 2a Therapie wie oben und in anderen Studie beschriebenen [10, 17]. Klinisch zeigten sich aber weiterhin eine klinische Progredienz mit Auftreten neuer Hämangiome und Wachstum der schon bestehenden, wie auch schon vorher unter hohen Dosen an Kortison.

Schweigerer et al. untersuchten bFGF und VEGF im Serum und Urin bei zwei Patienten mit infantiler Leberhämangiomatose (IHL) [79]. Da auch bei unserer Patientin sonographisch multiple Hämangiome in der Leber dargestellt wurden, soll hier ein Vergleich gezogen werden. Schweigerer stellte fest, dass bei einem der zwei untersuchten Patienten, bei dem eine medikamentöse Therapie mit Interferon nach erfolgloser hoher Kortisongabe keine Besserung brachte, die Werte von bFGF im Serum (>50 pg/ml) und Urin (>400ng/g Kreatinin) initial stark erhöht waren. Dagegen lagen die VEGF Werte im Serum und Urin niedrig. Bei dem anderen Patienten konnte durch hohe Kortisongaben innerhalb von 14 Tagen eine klinische Besserung erreicht werden und die Hämangiome bildeten sich im Laufe der Zeit zurück. Dieser Patient hatte anfangs

hohe VEGF Werte im Serum (>1500 pg/ml) und Urin (>1000 ng/g Kreatinin) bei niedrigen bFGF Werten (<10 pg/ml). Schweigerer et al. vermuteten, dass der unterschiedliche klinische Verlauf auf verschiedenen molekularen Mechanismen der Angiogenese in den Hämangiomen basiert, die zu erhöhten Produktion und Ausschleusung von jeweils einem der angiogenetischen Stimulatoren bFGF oder VEGF führt. Dies könnte bedeuten, dass Patienten mit IHL mit hohen bFGF Werten bei niedrigen VEGF Werten eine schlechtere Prognose hätten und hier aggressiv multimodal therapiert werden müsste. Dagegen stellen hohe VEGF Werte bei niedrigen bFGF Werten eine gute Prognose dar, bei der, wie bei dieser Arbeit, eine milde Therapie ausreichend wäre. Unsere Patientin zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe vor Beginn der Interferontherapie und gegen Ende der Therapie hohe bFGF Werte sowohl im Plasma (50-98 pg/ml) als auch im Urin (> 300 ng/g Kreatinin) und mittlere bzw. niedrige VEGF Werte (0-500 pg/ml). Daraus könnte sich eine eher schlechte Prognose ergeben, was sich klinisch bestätigte. Trotz Interferontherapie kam es zu keiner Besserung der Erkrankung. Dass bFGF der vielleicht entscheidende Parameter für die Krankheitsprogredienz bei unserer Patientin war, lässt sich auch dadurch vermuten, dass trotz des rapiden Absinkens der VEGF Konzentration unter der Interferonbehandlung es zu keiner klinischen Besserung kam. Die bFGF Konzentrationen wiederum sanken zwar unter der Therapie anfangs leicht ab, zeigten aber im weiteren Verlauf keine Veränderung. Hier stellt sich auch die Frage, ob Interferon- α 2a bei Patienten mit Hämangiomatose überhaupt eine klinisch relevante Wirkung auf bFGF hat bzw. welche Dosierung bei Patienten mit derart starker Ausprägung notwendig wäre.

Ob bFGF und VEGF wirklich den oben dargestellten Stellenwert bei der Verlaufsprognose von Hämangiomatosepatienten einnehmen, müssen weitere Studien mit größerer Fallzahl zeigen. Trotzdem können hohe bFGF Urinkonzentrationen für eine meist starke Progredienz des Hämangioms und somit für das Voranschreiten des Tumors sprechen.

IV. 5 Anti-angiogenetische Therapie

Hämangiome stellen je nach Lokalisation in den meisten Fällen ein eher kosmetisches Problem für den Patienten und/oder dessen Eltern dar. Eine medikamentöse Therapie

steht hier zurzeit, vor allem wegen der möglichen Nebenwirkungen der Medikamente, nicht als Alternative zur Verfügung. Allein der klinische Verlauf von Hämangiomen mit Regression innerhalb einiger Jahre steht hier im Widerspruch zu einer aggressiven systemischen Therapie. In diesen Fällen kann aber durch eine physikalische Behandlung zum Beispiel mit dem Neodym:Yag-Laser klinisch eine Besserung erzielt werden.

Dagegen stellt sich die Situation bei den schnell proliferierenden Hämangiomen im Bereich von Sinnesorganen (v.a. der Augen) oder mit Beteiligung von inneren Organen wie z.B. Leber, Hirn wesentlich schwieriger dar. Die Komplikationen können hier je nach Lokalisation von einem einseitigem/zweiseitigem Verlust der Sehfähigkeit bis hin zu lebensbedrohlichen Zuständen reichen. Hier spielt gerade die Frage nach der Progression des Tumors eine wichtige Rolle. Die Messung von angiogenetischen Faktoren wie zum Beispiel bFGF oder VEGF bei diesen Patienten könnte vielleicht in Zukunft diese Frage beantworten und auch bei der medikamentösen Behandlung z.B. mit Kortison oder Inteferon- α 2a als Verlaufsparemeter dienen. Es muss jedoch betont werden, dass die momentanen Therapiealternativen gerade bei schweren Verläufen mit viszeraler Beteiligung oft keine befriedigenden Erfolge bringen. Dies war auch bei unserer Patientin der Fall. Gerade hier wird die Frage nach den Möglichkeiten einer spezifischen anti-angiogenetischen Therapie laut. Im Bereich der Tumorforschung laufen dazu schon einige klinische Studien vor allem im Bereich der Tyrosinkinaseinhibitoren (z.B. SU5416 für den VEGF2-Rezeptor) und monoklonalen Antikörper (z.B. Rhu-mab-VEGF) [48, 71, 100]. Inwiefern diese Behandlungsverfahren allein oder in Kombination mit anderen Medikamenten erfolgreich sein können, wird die klinische Entwicklung zeigen. Auch die Frage nach den möglichen Nebenwirkungen einer solchen Therapie wird auch dann erst beantwortet werden können. Insgesamt erhofft man sich aber aufgrund der hohen Selektivität auf sich teilende Endothelzellen geringe Nebenwirkungen.

Fazit

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit kann folgendes über die Messung von bFGF und VEGF im EDTA-Plasma und bFGF im Urin bei Patienten mit Hämangiomen und Hämangiomatose gesagt werden:

- Bei Säuglingen und Kindern mit kleinen Hämangiomen (<5cm) sind gegenüber Kindern ohne Hämangiome keine erhöhten bFGF und VEGF Plasmaspiegel zu erwarten.
- Die Wahrscheinlichkeit, erhöhte Konzentrationen beider Wachstumsfaktoren im Plasma von Patienten mit großen und/oder multiplen Hämangiomen zu messen, ist hoch.
- Große Hämangiome mit starker Wachstumsprogression zeigten signifikant erhöhte Konzentrationen von bFGF und VEGF im Plasma im Vergleich zur Kontrollgruppe, als auch zu der Gruppe von Patienten mit Hämangiomen in der Stagnations- bzw. Regressionsphase.
- Es besteht somit eine direkte Korrelation zwischen Größe und Wachstumstendenz der Hämangiome und der Höhe der bFGF und VEGF Plasmakonzentration. Dies kann von klinischem Nutzen sein.
- Erhöhte Konzentrationen von bFGF fanden sich im Urin von einzelnen Hämangiompatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Allerdings lagen bei 4/5 der Patienten die Konzentrationen unterhalb des messbaren Bereichs des Immunassays.
- Ein Patient mit Hämangiomatose zeigt hohe Konzentrationen von bFGF und/oder VEGF sowohl im Plasma als auch im Urin.
- Hohe bFGF Plasma- und Urinkonzentrationen haben eventuell eine prognostische Bedeutung bei der Hämangiomatose und bei viszeralen Hämangiomen und sprechen für einen schweren, meist medikamentös schlecht zu beeinflussenden Verlauf.
- Das Absinken eines Wachstumsfaktors unter anti-angiogenetischer Therapie ist nicht gleichbedeutend mit einer klinischen Besserung. Besteht klinisch eine Besserung, so findet man allerdings meist auch einen Rückgang der Wachstumsfaktoren.
- Es muss weiter geprüft werden ob die Messung von bFGF und VEGF für die Verlaufsbeurteilung einer anti-angiogenetischen Therapie in Einzelfällen von Nutzen ist.

→ bFGF und VEGF können bei Beurteilung der Progression von Hämangiomen, der Therapieentscheidung und der weiteren Verlaufsbeurteilung der Therapie von Nutzen sein und haben eventuell auch eine prognostische Bedeutung. Für die klinische Routinebehandlung sind die bisher vorliegenden Daten der bFGF- und VEGF-Messungen noch nicht eindeutig nutzbar. Die Entscheidung zur Messung beider Wachstumsfaktoren sollte vom Hämangiomspezialisten individuell gestellt werden und ist vor allem abhängig von der daraus resultierenden Konsequenz für das weitere Vorgehen. Zur Bestimmung der Faktoren stehen mittlerweile standardisierte Methoden zur Verfügung, die eine hohe Sensitivität und Spezifität haben. Das ELISA-Testverfahren ist zurzeit allerdings noch sehr teuer. Welchen Stellenwert die Bestimmung von Angiogenesefaktoren bei Tumoren einnehmen wird, bleibt abzuwarten.

V. Zusammenfassung

Thema: Der basic fibroblast growth factor (bFGF) und der vascular endothelial growth factor (VEGF) sind Wachstumsfaktoren der Familie der Zytokine, die eine wichtige Rolle in der Angiogenese sowohl in physiologischen, als auch in pathologischen Prozessen spielen. Bei der Entstehung von kindlichen Hämangiomen wird den beiden Wachstumsfaktoren aufgrund ihrer starken angiogenetischen Potenz ein hoher Stellenwert zugesprochen. So konnte gezeigt werden, dass in der Phase des schnellen Wachstums (Proliferationsphase) der Hämangiome erhöhte Konzentrationen von bFGF und VEGF im Gewebe der Tumoren zu messen sind. Dagegen liegen die Konzentrationen beider Faktoren in der Rückbildungsphase der Tumore deutlich niedriger. In einigen Arbeiten wurde auch von erhöhten Serum- und Urinspiegeln von bFGF und VEGF berichtet.

In dieser Arbeit wurden die Plasmakonzentrationen von bFGF und VEGF und die Konzentrationen von bFGF im Urin bei Patienten mit Hämangiomen gemessen. Es wurde untersucht, ob die Konzentrationen beider Faktoren erhöht sind und ob erhöhte Spiegel mit den klinischen Parametern korrelieren.

Materialien und Methoden: Unter Verwendung des enzyme linked immunosorbent assay (ELISA; Quantikine R&D Systems) wurden die Konzentrationen von VEGF und bFGF im EDTA-Plasma bei gesunden Säuglingen und Kleinkindern ($n_{\text{bFGF}}=33$; $n_{\text{VEGF}}=44$) und bei Säuglingen und Kleinkindern mit Hämangiomen ($n_{\text{bFGF}}=81$; $n_{\text{VEGF}}=89$) gemessen. Zudem wurde auch die bFGF Konzentration im Urin bei 34 gesunden Säuglingen und Kleinkindern und bei 67 Säuglingen und Kleinkindern mit Hämangiomen bestimmt. Klinische Merkmale wie Größe und Beschaffenheit der Hämangiome wurden zum Zeitpunkt der Blutabnahme notiert.

Ergebnisse: Erhöhte Werte von bFGF und VEGF im Plasma wurden bei Patienten mit grossen Hämangiomen ($> 5\text{cm}$) und hoher Wachstumstendenz gefunden. Die gemessenen Werte von bFGF im Urin waren im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht. Gerade im Säuglingsalter zeigten sich bei der Kontrollgruppe wie auch bei der Patientengruppe starke interindividuelle Schwankungen beider Faktoren. Bei einer Patientin mit Hämangiomatose lagen die Konzentrationen beider Faktoren signifikant höher als bei der Kontrollgruppe. Auch die Konzentration von bFGF im Urin war stark erhöht. Unter der anti-angiogenetischen Therapie mit Interferon- $\alpha 2a$ kam es zu

einem starken Abfall der zu Beginn der Behandlung hohen VEGF Plasmaspiegel. Die Behandlung zeigte keinen wesentlichen Einfluss auf die hohen bFGF Konzentration im Plasma und Urin.

Schlussfolgerung: Diese Arbeit zeigt, dass man bei einigen Patienten mit großen und proliferierenden Hämangiomen erhöhte Konzentrationen der Angiogenesefaktoren VEGF und bFGF im Plasma messen kann. Aufgrund der inter- sowie intraindividuellen Schwankungen der Plasmaspiegel beider Faktoren ist allerdings der klinische Nutzen zur Verlaufsbeurteilung eingeschränkt. Dennoch mag gerade bei den systemischen Formen, den Hämangiomatosen, in Zukunft die Messung von Angiogenesefaktoren für die Therapiekontrolle einer anti-angiogenetischen Behandlung eine wichtige Rolle spielen. Ob die Höhe der Konzentrationen von unterschiedlichen Angiogenesefaktoren auch Rückschlüsse auf die Pathogenese der Tumoren zulässt und so zu einer geeigneten Auswahl der Therapieform führt, müssen weitere Studien zeigen. In dieser Arbeit führte die Therapie mit Interferon zwar zu einem Abfall der VEGF Konzentration im Plasma bei einer Patientin mit diffuser neonataler Hämangiomatose, es kam aber bei gleichbleibendem hohem bFGF Plasmaspiegel nicht zu einer klinischen Besserung.

Vor allem im Bereich der Onkologie laufen bereits erste klinische Studien mit anti-angiogenetischen Medikamenten, deren Ergebnisse abzuwarten bleiben.

VI. Allgemeines Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäuren
AV-Fistel	Arteriovenöse Fistel
bFGF	Basic fibroblast growth factor, basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor
ECM	Extrazellulärmatrix
EGF	endothel growth factor; Endothelwachstumsfaktor
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
FFP	fresh frozen plasma
FGF-2	Fibroblastenwachstumsfaktor-2 = basic FGF
g	Gramm
GAP	GTPase aktivierendes Protein
HSPG	Heparansulfatproteoglykane
IE	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kDA	Kilo Dalton
KOF	Körperoberfläche (m ²)
Krea	Kreatinin
K-W-Test	Kruskal-Wallis-Test
MAPK	Mitogen activated protein kinase
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Probenanzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NP-1	Neuropilin-1
PDGF	Platelet derived growth factor,
pg	Picogramm
PIGF	Placenta growth factor
s.c.	subkutan
SMC-actin	Smooth muscle cell actin

SSW	Schwangerschaftswoche
Strd. Dev.	Standardabweichung
TGF-β	Tumor growth factor- β ; Tumorstadiumsfaktor- β
TIMP	Tissue inhibitor metalloproteinase
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
μl	Mikroliter

VII. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

VII. 1.1 Abbildungen

Abb.1: Darstellung der Angiogenese	6
Abb.2: Modell der FGF-2 Regulation durch HSPG	14
Abb.3: bFGF Signalkaskade	16
Abb.4: Hämangiomphasen	17
Abb.5: Lokalisation der Hämangiome	18
Abb.6: bFGF Plasmaspiegel bei Kontrollgruppe	34
Abb.7: VEGF Plasmaspiegel bei Kontrollgruppe	35
Abb.8: bFGF Plasmaspiegel bei Hämangiomen	37
Abb.9: VEGF Plasmaspiegel bei Hämangiomen	38
Abb.10: bFGF und Hämangiomgröße	40
Abb.11: VEGF und Hämangiomgröße	40
Abb.12: bFGF und klinisches Bild	41
Abb.13: VEGF und klinisches Bild	41
Abb.14: bFGF im Vergleich	43
Abb.15: VEGF im Vergleich	43
Abb.16: bFGF im Urin	45
Abb.17: bFGF im Verlauf	46
Abb.18: VEGF im Verlauf	47
Abb.19: Diffuse neonatale Hämangiomatose, Kopfbereich	49
Abb.20: Diffuse neonatale Hämangiomatose, Stammbereich	50
Abb.21: bFGF im Verlauf bei Hämangiomatose	51
Abb.22: VEGF im Verlauf bei Hämangiomatose	52

VII. 1.2 Tabellen

Tab.1: Zytokine	7
Tab.2: Angiogene Wachstumsfaktoren	7
Tab.3: VEGF	9
Tab.4: Biochemische Daten von VEGF	9
Tab.5: Biochemische Daten von bFGF	12
Tab.6: Neue Klassifikation benigner vaskulärer Tumoren	20
Tab.7: Hämangiomgröße und Plasmaspiegel	39
Tab.8: Klinisches Bild und Plasmaspiegel	39
Tab.9: bFGF im Vergleich	42
Tab.10: VEGF im Vergleich	42
Tab.11: bFGF im Urin bei der Kontrollgruppe	44
Tab.12: Hämangiome und Verlauf	47

VIII. Literaturverzeichnis

1. Achauer BM, Chang CJ, Vander Kam VM. *Management of hemangioma of infancy: review of 245 patients*. *Plast Reconstr Surg*, 1997. 99(5): 1301-8.
2. Aguayo A, Kantarjian HM, Estey EH, Giles FJ, Verstovsek S, Manshour T, Gidel C, O'Brien S, Keating MJ, Albitar M. *Plasma vascular endothelial growth factor levels have prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia but not in patients with myelodysplastic syndromes*. *Cancer*, 2002. 95(9): 1923-30.
3. Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA. *An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. 86(12): 4544-8.
4. Armelin HA. *Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1973. 70(9): 2702-6.
5. Asano M, Yukita A, Matsumoto T, Kondo S, Suzuki H. *Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor*. *Cancer Res*, 1995. 55(22): 5296-301.
6. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. *Biological roles of fibroblast growth factor-2*. *Endocr Rev*, 1997. 18(1): 26-45.
7. Borgstrom P, Bourdon MA, Hillan KJ, Sriramarao P, Ferrara N. *Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo*. *Prostate*, 1998. 35(1): 1-10.
8. Burgess WH, Maciag T. *The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins*. *Annu Rev Biochem*, 1989. 58: 575-606.
9. Burrows PE, Laor T, Paltiel H, Robertson RL. *Diagnostic imaging in the evaluation of vascular birthmarks*. *Dermatol Clin*, 1998. 16(3): 455-88.
10. Chang E, Boyd A, Nelson CC, Crowley D, Law T, Keough KM, Folkman J, Ezekowitz RA, Castle VP. *Successful treatment of infantile hemangiomas with interferon-alpha-2b*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 1997. 19(3): 237-44.

11. Chang J, Most D, Bresnick S, Mehrara B, Steinbrech DS, Reinisch J, Longaker MT, Turk AE. *Proliferative hemangiomas: analysis of cytokine gene expression and angiogenesis*. *Plast Reconstr Surg*, 1999. 103(1): 1-9; discussion 10.
12. Cremer H. *Klassifizierung vaskulärer Tumoren (Hämangiome) im Kindesalter (1)*. *Pädiatr Prax*, 2001. 59: 303-320.
13. D'Angelo G, Struman I, Martial J, Weiner RI. *Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(14): 6374-8.
14. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. *The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor*. *Science*, 1992. 255(5047): 989-91.
15. Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ. *Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma*. *Cell*, 1997. 88(6): 801-10.
16. Donnelly LF, Adams DM, Bisset GS, 3rd. *Vascular malformations and hemangiomas: a practical approach in a multidisciplinary clinic*. *AJR Am J Roentgenol*, 2000. 174(3): 597-608.
17. Dosquet C, Coudert MC, Wassef M, Enjolras O, Drouet L. *Importance of bFGF ("basic fibroblast growth factor") for diagnosis and treatment of hemangiomas*. *Ann Dermatol Venereol*, 1998. 125(5): 313-6.
18. Dubois-Stringfellow N, Kolpack-Martindale L, Bautch VL, Azizkhan RG. *Mice with hemangiomas induced by transgenic endothelial cells. A model for the Kasabach-Merritt syndrome*. *Am J Pathol*, 1994. 144(4): 796-806.
19. Enjolras O, Mulliken JB. *The current management of vascular birthmarks*. *Pediatr Dermatol*, 1993. 10(4): 311-3.
20. Enjolras O, Riche MC, Merland JJ, Escande JP. *Management of alarming hemangiomas in infancy: a review of 25 cases*. *Pediatrics*, 1990. 85(4): 491-8.
21. Ferrara N. *Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis*. *Kidney Int*, 1999. 56(3): 794-814.

22. Ferrara N, Henzel WJ. *Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. 161(2): 851-8.
23. Finn MC, Glowacki J, Mulliken JB. *Congenital vascular lesions: clinical application of a new classification*. J Pediatr Surg, 1983. 18(6): 894-900.
24. Fishman SJ, Mulliken JB. *Hemangiomas and vascular malformations of infancy and childhood*. Pediatr Clin North Am, 1993. 40(6): 1177-200.
25. Folkman J. *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. Nat Med, 1995. 1(1): 27-31.
26. Folkman J. *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis*. N Engl J Med, 1995. 333(26): 1757-63.
27. Folkman J, Haudenschild C, Ingber DE, Kendall RL, Thomas KA, Polverini PJ, Leibovich SJ, Risau W, Pinedo HM, Verheul HM, D'Amato RJ. *Angiogenesis in vitro*. Nature, 1980. 288(5791): 551-6.
28. Fordham LA, Chung CJ, Donnelly LF. *Imaging of congenital vascular and lymphatic anomalies of the head and neck*. Neuroimaging Clin N Am, 2000. 10(1): 117-36, viii.
29. Friesel R, Komoriya A, Maciag T. *Inhibition of endothelial cell proliferation by gamma-interferon*. J Cell Biol, 1987. 104(3): 689-96.
30. Glowacki J, Mulliken JB. *Mast cells in hemangiomas and vascular malformations*. Pediatrics, 1982. 70(1): 48-51.
31. Gospodarowicz D. *Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary*. J Biol Chem, 1975. 250(7): 2515-20.
32. Graeven U, Andre N, Achilles E, Zornig C, Schmiegel W. *Serum levels of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in patients with soft-tissue sarcoma*. J Cancer Res Clin Oncol, 1999. 125(10): 577-81.
33. Greer P, Haigh J, Mbamalu G, Khoo W, Bernstein A, Pawson T. *The Fps/Fes protein-tyrosine kinase promotes angiogenesis in transgenic mice*. Mol Cell Biol, 1994. 14(10): 6755-63.

34. Hasan Q, Tan ST, Xu B, Davis PF. *Effects of five commonly used glucocorticoids on haemangioma in vitro*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2003. 30(3): 140-4.
35. Himeno W. *Angiogenic growth factors in patients with cyanotic congenital heart disease and in normal children*. Kurume Med J, 2001. 48(2): 111-6.
36. Ingber DE. *Fibronectin controls capillary endothelial cell growth by modulating cell shape*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(9): 3579-83.
37. Ingber DE. *Control of capillary growth and differentiation by extracellular matrix. Use of a tensegrity (tensional integrity) mechanism for signal processing*. Chest, 1991. 99(3 Suppl): 34S-40S.
38. Ingber DE, Folkman J. *How does extracellular matrix control capillary morphogenesis?* Cell, 1989. 58(5): 803-5.
39. Iozzo RV. *Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function*. Annu Rev Biochem, 1998. 67: 609-52.
40. Jacobs AH, Walton RG. *The incidence of birthmarks in the neonate*. Pediatrics, 1976. 58(2): 218-22.
41. Kan M, Wang F, Xu J, Crabb JW, Hou J, McKeehan WL. *An essential heparin-binding domain in the fibroblast growth factor receptor kinase*. Science, 1993. 259(5103): 1918-21.
42. Kendall RL, Thomas KA. *Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(22): 10705-9.
43. Kendall RL, Wang G, Thomas KA. *Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. 226(2): 324-8.
44. Komorowski J, Jankewicz J, Stepień H. *Vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) and soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) concentrations in peripheral blood as markers of pituitary tumours*. Cytobios, 2000. 101(398): 151-9.

45. Kroll J, Waltenberger J. *VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR)*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. 252(3): 743-6.
46. Malamitsi-Puchner A, Tziotis J, Protonotariou E, Xyni K, Sarandakou A, Creatsas G. *Heparin-binding angiogenic factors (basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor) in early neonatal life*. *Pediatr Res*, 1999. 45(6): 877-80.
47. Malan E. *Vascular Malformations (Angiodysplasias)*. Milan: Carlo Erba Foundation, 1947: 4.
48. Margolin K, Gordon MS, Holmgren E, Gaudreault J, Novotny W, Fyfe G, Adelman D, Stalter S, Breed J. *Phase Ib trial of intravenous recombinant humanized monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor in combination with chemotherapy in patients with advanced cancer: pharmacologic and long-term safety data*. *J Clin Oncol*, 2001. 19(3): 851-6.
49. Matthews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR. *A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations*. *Cell*, 1991. 65(7): 1143-52.
50. McColley SA, Stellmach V, Boas SR, Jain M, Crawford SE. *Serum vascular endothelial growth factor is elevated in cystic fibrosis and decreases with treatment of acute pulmonary exacerbation*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. 161(6): 1877-80.
51. Melnyk O, Shuman MA, Kim KJ. *Vascular endothelial growth factor promotes tumor dissemination by a mechanism distinct from its effect on primary tumor growth*. *Cancer Res*, 1996. 56(4): 921-4.
52. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. *Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo*. *Lab Invest*, 1994. 71(3): 374-9.
53. Mulliken JB. *Vascular Birthmarks (Hemangiomas and Malformations)*. W.B. Saunders Company, 1988. part two(chapter four): 63.
54. Mulliken JB, Glowacki J. *Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: a classification based on endothelial characteristics*. *Plast Reconstr Surg*, 1982. 69(3): 412-22.

55. Nguyen LL, D'Amore PA. *Cellular interactions in vascular growth and differentiation*. Int Rev Cytol, 2001. 204: 1-48.
56. Nguyen M, Watanabe H, Budson AE, Richie JP, Hayes DF, Folkman J. *Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers*. J Natl Cancer Inst, 1994. 86(5): 356-61.
57. Nicosia RF. *What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis?* Am J Pathol, 1998. 153(1): 11-6.
58. Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, Itoh N. *Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver(1)*. Biochim Biophys Acta, 2000. 1492(1): 203-206.
59. Nugent MA, Iozzo RV. *Fibroblast growth factor-2*. Int J Biochem Cell Biol, 2000. 32(2): 115-20.
60. Okada-Ban M, Thiery JP, Jouanneau J. *Fibroblast growth factor-2*. Int J Biochem Cell Biol, 2000. 32(3): 263-7.
61. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. *Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma [see comments]*. Cell, 1994. 79(2): 315-28.
62. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M. *Receptor specificity of the fibroblast growth factor family*. J Biol Chem, 1996. 271(25): 15292-7.
63. Orpana A, Salven P. *Angiogenic and lymphangiogenic molecules in hematological malignancies*. Leuk Lymphoma, 2002. 43(2): 219-24.
64. Park JE, Keller GA, Ferrara N. *The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF*. Mol Biol Cell, 1993. 4(12): 1317-26.
65. Pavlakovic H, Von Schutz V, Rössler J, Koscielniak E, Havers W, Schweigerer L. *Quantification of angiogenesis stimulators in children with solid malignancies*. Int J Cancer, 2001. 92(5): 756-60.

66. Pepper MS, Mandriota SJ, Vassalli JD, Orci L, Montesano R. *Angiogenesis-regulating cytokines: activities and interactions*. Curr Top Microbiol Immunol, 1996. 213(Pt 2): 31-67.
67. Pinedo HM, Verheul HM, D'Amato RJ, Folkman J. *Involvement of platelets in tumour angiogenesis?* Lancet, 1998. 352(9142): 1775-7.
68. Polverini PJ, Leibovich SJ. *Induction of neovascularization in vivo and endothelial proliferation in vitro by tumor-associated macrophages*. Lab Invest, 1984. 51(6): 635-42.
69. Qu Z, Liebler JM, Powers MR, Galey T, Ahmadi P, Huang XN, Ansel JC, Butterfield JH, Planck SR, Rosenbaum JT. *Mast cells are a major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma*. Am J Pathol, 1995. 147(3): 564-73.
70. Ray P, Acheson D, Chitrakar R, Cnaan A, Gibbs K, Hirschman GH, Christen E, Trachtman H. *Basic fibroblast growth factor among children with diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome*. J Am Soc Nephrol, 2002. 13(3): 699-707.
71. Reilly W, McAuslan BR. *Matrix control of tumor angiogenesis*. Adv Exp Med Biol, 1988. 242: 221-7.
72. Renko M, Quarto N, Morimoto T, Rifkin DB. *Nuclear and cytoplasmic localization of different basic fibroblast growth factor species*. J Cell Physiol, 1990. 144(1): 108-14.
73. Rifkin DB, Moscatelli D. *Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor*. J Cell Biol, 1989. 109(1): 1-6.
74. Risau W. *Angiogenic growth factors*. Prog Growth Factor Res, 1990. 2(1): 71-9.
75. Robb RM. *Refractive errors associated with hemangiomas of the eyelids and orbit in infancy*. Am J Ophthalmol, 1977. 83(1): 52-8.
76. Sage EH. *Secretion of SPARC by endothelial cells transformed by polyoma middle T oncogene inhibits the growth of normal endothelial cells in vitro*. Biochem Cell Biol, 1992. 70(7): 579-92.
77. Salven P. *Angiogenesis in lymphoproliferative disorders*. Acta Haematol, 2001. 106(4): 184-9.

78. Schweigerer L, Neufeld G, Gospodarowicz D. *Basic fibroblast growth factor as a growth inhibitor for cultured human tumor cells.* J Clin Invest, 1987. 80(5): 1516-20.
79. Schweigerer L, Pavlakovic H, Havers W. *Infantile liver hemangiomas: evidence for molecular heterogeneity.* J Pediatr, 2000. 136(3): 419-20.
80. Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. *A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines.* Cancer Res, 1986. 46(11): 5629-32.
81. Shibuya M. *Role of VEGF-flt receptor system in normal and tumor angiogenesis.* Adv Cancer Res, 1995. 67: 281-316.
82. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M. *Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family.* Oncogene, 1990. 5(4): 519-24.
83. Shima DT, Deutsch U, D'Amore PA. *Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability.* FEBS Lett, 1995. 370(3): 203-8.
84. Sperinde GV, Nugent MA. *Heparan sulfate proteoglycans control intracellular processing of bFGF in vascular smooth muscle cells.* Biochemistry, 1998. 37(38): 13153-64.
85. Sunderkotter C, Goebeler M, Schulze-Osthoff K, Bhardwaj R, Sorg C. *Macrophage-derived angiogenesis factors.* Pharmacol Ther, 1991. 51(2): 195-216.
86. Tabone MD, Landman-Parker J, Arcil B, Coudert MC, Gerota I, Benbunan M, Leverger G, Dosquet C. *Are basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor prognostic indicators in pediatric patients with malignant solid tumors?* Clin Cancer Res, 2001. 7(3): 538-43.
87. Takahashi K, Mulliken JB, Kozakewich HP, Rogers RA, Folkman J, Ezekowitz RA. *Cellular markers that distinguish the phases of hemangioma during infancy and childhood.* J Clin Invest, 1994. 93(6): 2357-64.
88. Tan ST, Hasan Q, Velickovic M, Ruger BM, Davis RP, Davis PF. *A novel in vitro human model of hemangioma.* Mod Pathol, 2000. 13(1): 92-9.

89. Tan ST, Velickovic M, Ruger BM, Davis PF. *Cellular and extracellular markers of hemangioma*. *Plast Reconstr Surg*, 2000. 106(3): 529-38.
90. Terai M, Yasukawa K, Narumoto S, Tateno S, Oana S, Kohno Y. *Vascular endothelial growth factor in acute Kawasaki disease*. *Am J Cardiol*, 1999. 83(3): 337-9.
91. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. *Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase*. *Oncogene*, 1991. 6(9): 1677-83.
92. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P. *Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. 187(3): 1579-86.
93. Thomson HG, Ward CM, Crawford JS, Stigmar G. *Hemangiomas of the eyelid: visual complications and prophylactic concepts*. *Plast Reconstr Surg*, 1979. 63(5): 641-7.
94. Topaloglu R, Sungur A, Baskin E, Besbas N, Saatci U, Bakkaloglu A. *Vascular endothelial growth factor in Henoch-Schonlein purpura*. *J Rheumatol*, 2001. 28(10): 2269-73.
95. Veikkola T, Alitalo K. *VEGFs, receptors and angiogenesis*. *Semin Cancer Biol*, 1999. 9(3): 211-20.
96. Vignola S, Picco P, Falcini F, Sabatini F, Buoncompagni A, Gattorno M. *Serum and synovial fluid concentration of vascular endothelial growth factor in juvenile idiopathic arthritides*. *Rheumatology (Oxford)*, 2002. 41(6): 691-6.
97. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N. *Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis*. *J Clin Invest*, 1995. 95(4): 1789-97.
98. Williams RL, Risau W, Zerwes HG, Drexler H, Aguzzi A, Wagner EF. *Endothelioma cells expressing the polyoma middle T oncogene induce hemangiomas by host cell recruitment*. *Cell*, 1989. 57(6): 1053-63.

99. Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. *Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor.* Cell, 1991. 64(4): 841-8.
100. Zangari M, Anaissie E, Stopeck A, Morimoto A, Tan N, Lancet J, Cooper M, Hannah A, Garcia-Manero G, Faderl S, Kantarjian H, Cherrington J, Albitar M, Giles FJ. *Phase II study of SU5416, a small molecule vascular endothelial growth factor tyrosine kinase receptor inhibitor, in patients with refractory multiple myeloma.* Clin Cancer Res, 2004. 10(1 Pt 1): 88-95.

IX. Danksagung

Für die fachlich exzellente Betreuung möchte ich mich an erster Stelle bei Herrn Prof. Dr. med. M. Weiß bedanken.

Für die Gelegenheit vorliegende Studie durchzuführen bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. R. Grantzow.

Ich danke auch Herrn Dr. med. M. Albert für die freundliche Unterstützung und die konstruktiven Vorschläge.

Allen Ärzten und Krankenschwestern der Kinderstationen des Dr. von Haunerschen Kinderspitals und der Kinderchirurgischen Klinik möchte ich für die Hilfe bei der Gewinnung des Probenmaterials danken.

Zuletzt möchte ich meinen herzlichen Dank der medizinisch technischen Assistentin Frau Genoveva Kim des Zytokinlabors der Dr. von Haunerschen Kinderklinik aussprechen, die mir bei der Durchführung der Studie stets zur Hilfe stand.

Lebenslauf

Name: Stephan Maximilian
Freiherr von Hornstein
Geburtsdatum: 29.06.1975 in München
Familienstand: ledig
E-Mail: svhornstein@hotmail.com

Schulbildung:
1981 – 1985 Kerschensteiner Grundschule Germering
1985 – 1994 Carl-Spitzweg-Gymnasium Germering
Juli 1994 Abitur

Berufsausbildung:

Medizinstudium

1995- 2002 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

ärztliche Vorprüfung August 1997
1.Staatsexamen August 1998
2.Staatsexamen April 2001
3.Staatsexamen Juni 2002

Arzt im Praktikum Oktober 2002 – März 2004
Kinder- und Kinderpoliklinik der Technischen Universität München, Kinderklinik München-Schwabing

Assistenzarzt seit Juli 2004
Studienassistent HIT-LGG 1996/SIOP-LGG 2004 Studie
Kinderklinik Augsburg