

Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Abteilung Toxikologie
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. Ralf Stahlmann

**Induktion von Proteinen der extrazellulären Matrix durch VEGF in der perfundierten
Arterie der humanen Nabelschnur**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Jirka Grosse
Arzt aus Berlin

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. D.-G. Grimm

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. J. Jankowski

Gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 07.12.2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Problemstellung	1
1.2	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor	3
1.2.1	Biologische Aktivität von VEGF	3
1.2.2	VEGF Isoformen	5
1.2.3	Regulation der VEGF-Genexpression	7
1.2.4	VEGF-Rezeptoren	8
1.2.5	Die Rolle von VEGF in der Physiologie (Angiogenese)	11
1.2.6	Die Rolle von VEGF in der Pathophysiologie	12
1.3	Extrazelluläre Matrix	14
1.3.1	Integrine	16
1.3.2	Kollagene	16
1.3.3	Laminin	17
1.3.4	Osteopontin	18
1.4	Nabelschnur	19
1.4.1	Länge und Durchmesser	19
1.4.2	Nabelschnurgefäße	19
1.4.3	Wharton-Sulze	21
1.4.4	Amnionepithel	22
1.5	Ziel der Dissertation	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Material	24
2.1.1	Nabelschnur	24
2.1.2	Geräte	24
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	25
2.1.4	Gebrauchsfertige Kits	26
2.1.5	Chemikalien	26
2.1.6	Antikörper	28
2.1.7	Lösungen und Puffer	29
2.2	Methoden	32
2.2.1	Versuchsaufbau und -ablauf	32
2.2.1.1	Nabelschnur und Untersuchungsgruppen	32
2.2.1.2	Präparation	33
2.2.1.3	Applikation von Kontrollmedium und VEGF ₁₆₅	33
2.2.1.4	Extrakorporale Perfusion	34

2.2.1.5	Asservierung der Gewebeproben	37
2.2.2	Untersuchungen.....	37
2.2.2.1	Histologie und indirekte Immunhistochemie	37
2.2.2.1.1	Vorbereitung der Gewebeproben	37
2.2.2.1.2	Histologie.....	39
2.2.2.1.3	Indirekte Immunhistochemie.....	39
2.2.2.1.4	Bildanalyse der immunhistochemischen Färbungen	43
2.2.2.2	Gelelektrophorese und Western Blot.....	43
2.2.2.2.1	Vorbereitung der Proben	44
2.2.2.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	45
2.2.2.2.3	Western Blot.....	47
2.2.2.2.4	Immunmarkierung.....	47
2.2.2.2.5	Densitometrische Auswertung.....	48
2.2.2.3	Transmissionselektronenmikroskopie.....	49
2.2.2.3.1	Vorbereitung der Gewebeproben	49
2.2.2.3.2	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme	50
2.2.2.4	Wassergehaltsanalyse	51
2.2.2.5	Ödembestimmung durch Evans Blau-Extravasation	51
2.2.3	Statistik.....	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Modell.....	53
3.2	Wassergehaltsanalyse	55
3.3	Ödembestimmung durch Evans Blau-Extravasation	57
3.4	Morphologie.....	59
3.4.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	59
3.4.2	Transmissionselektronenmikroskopie	61
3.4.3	Sirius-Rot-Färbung und Polarisationsmikroskopie	62
3.5	β_1 -Integrin	64
3.5.1	Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von β_1 -Integrin mit Western Blot-Analyse	64
3.6	Kollagen Typ IV	66
3.6.1	Immunhistochemische Färbung von Kollagen Typ IV	66
3.6.2	Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von Kollagen Typ IV mit Western Blot-Analyse.....	69
3.7	Laminin	71
3.7.1	Immunhistochemische Färbung von Laminin.....	71

3.7.2	Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von Laminin mit Western Blot-Analyse	74
3.8	Osteopontin	76
3.8.1	Immunhistochemische Färbung von Osteopontin	76
3.8.2	Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von Osteopontin mit Western Blot-Analyse	79
3.9	VEGF	81
3.9.1	Immunhistochemische Färbung von VEGF	81
3.9.2	Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von VEGF mit Western Blot-Analyse	84
3.10	Flk-1	86
3.10.1	Immunhistochemische Färbung von Flk-1	86
3.10.2	Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von Flk-1 mit Western Blot-Analyse	89
3.11	Flt-1	91
3.11.1	Immunhistochemische Färbung von Flt-1	91
3.11.2	Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von Flt-1 mit Western Blot-Analyse	94
4	Diskussion	96
4.1	Diskussion der Methode	96
4.2	Diskussion der Ergebnisse	97
4.2.1	Einfluss von VEGF ₁₆₅ auf die vaskuläre Permeabilität	97
4.2.2	Einfluss von VEGF ₁₆₅ auf die extrazelluläre Matrix	99
4.2.3	Einfluss von VEGF ₁₆₅ auf seine Rezeptor-Tyrosin-Kinasen	101
4.2.4	Einfluss von VEGF ₁₆₅ auf β_1 -Integrin	103
5	Zusammenfassung	104
6	Summary	106
7	Abkürzungsverzeichnis	107
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	109
8.1	Abbildungsverzeichnis	109
8.2	Tabellenverzeichnis	110
9	Literaturverzeichnis	113
10	Publikationsverzeichnis	135
11	Danksagung	137
12	Curriculum Vitae	138
13	Eidesstattliche Erklärung	139

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Die vaskuläre Permeabilität ist definiert als die Durchlässigkeit der Blut- und Lymphgefäße für unterschiedliche Substanzen in Abhängigkeit von der Transportkapazität des jeweiligen Kreislaufsystems. Sie steht im Zentrum der Betrachtung diverser physiologischer und pathologischer Prozesse. Insbesondere der Erhöhung der vaskulären Permeabilität kommt eine große Bedeutung zu.

Physiologisch spielt sie eine wichtige Rolle beim Prozess der Angiogenese, speziell bei der Neubildung von Gefäßen aus dem vorhandenen primären Gefäßsystem. Nach einem positiven Stimulus erfolgt der proteolytische Abbau der extrazellulären Matrix (EZM) eines primären Gefäßes und die Aussprossung von Kapillaren beginnt, indem Stränge aus endothelialen Zellen gebildet werden, die durch Proliferation elongieren und dann ein Lumen ausbilden. Abschließend wird eine Basalmembran um das neu entstandene Gefäß gebildet und mit Perizyten und glatten Muskelzellen stabilisiert (Ausprunk DH, Folkman J, 1977; Hanahan D, 1997). Physiologischerweise umfasst die Angiogenese die Entwicklung unreifen, die Wundheilung adulten Gewebes und den zyklischen Aufbau von Endometrium.

Als pathologisches Korrelat findet man sie bei einer Vielzahl von karzinogenen, inflammatorischen und kardiovaskulären Erkrankungen (Bates DO, Harper SJ, 2002).

Grundsätzlich kann man die Angiogenese bei hypoxisch veränderten Arealen des entsprechenden Gewebes beobachten.

Des Weiteren ist die durch verschiedene Mediatoren gesteigerte Permeabilität der Gefäße der entscheidende Faktor in der Pathogenese des exsudativen Ödems (Bühling KJ et al., 2000). Solche Ödeme können durch Entzündungen, Toxine, anaphylaktische Reaktionen, Schädigungen durch Stoffwechselprodukte, chemische und physikalische Noxen verursacht werden. Zu letzteren gehören die mechanischen Traumata, wie beispielsweise das gedeckte Schädel-Hirn-Trauma, und die thermischen Traumata, nämlich Erfrierungs- und Verbrennungstrauma, die dem lokalen, aber auch dem generalisierten Ödem pathogenetisch zugrunde liegen.

Die Interaktionen von Zellen, insbesondere Endothelzellen, Proteinen der EZM und Mediatoren spielen bei solchen Prozessen eine essenzielle Rolle, sind aber derzeit noch nicht vollständig verstanden. Eine herausragende Rolle kommt hierbei dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) zu.

Endothelzellen, die als Endothel die Innenwand der Blut- und Lymphgefäße auskleiden, spielen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen. Sie sind nicht nur als physikalische Barriere für die transvaskuläre Diffusion von Flüssigkeit und Soluten zu betrachten, sondern sind hochspezialisiert; so besitzt das Endothel endokrine und exokrine Aufgaben und ist funktionell an der Regulation der Koagulation und des Blutflusses sowie an aktiven und passiven Transportvorgängen (Wasser, Gase, Nährstoffen, Lipoproteine u. a.) beteiligt. Ferner spielt es eine wichtige Rolle in der Adhäsion von Leukozyten und dem Wachstum der glatten Gefäßmuskelzellen. Bei Veränderungen des Mikromilieus kann es sich schnell an die geänderte Funktions- und Bedarfslage adaptieren (Schiffirin EL, 1994; Aird WC, 2005).

Die EZM-Proteine der Blutgefäße sind von großer Bedeutung für die Hämostase, indem sie die Thrombozytenadhäsion am Gewebedefekt fördern. Die Wand der Blutgefäße besteht aus vielen EZM-Proteinen, wie beispielsweise verschiedenen Kollagen-Subtypen (Typ I, Typ II, Typ III, Typ IV und Typ VIII), Fibronektin, Laminin, Vitronektin u. a. (Sixma JJ et al., 1995; Polanowska-Grabowska R et al. 1999; Hallmann R et al., 2005).

VEGF ist ein potenter Mediator der vaskulären Regulation von Angiogenese und vaskulärer Permeabilität (Senger DR et al., 1983; Ferrara N, Henzel WJ, 1989; Ploüet J et al., 1989; Vincenti V et al., 1996). Das homodimere Protein hat ein Molekulargewicht von 45 kDa (Kilo-Dalton); man kennt derzeit sieben verschiedene Isoformen, die sich in der Anzahl der Aminosäuren unterscheiden. Am häufigsten kommen die löslichen Formen VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ vor, die sich hinsichtlich ihres proliferationsinduzierenden und permeabilitätssteigernden Potentials unterscheiden. Die Expression von VEGF wird über Differenzierung, Transformation und Sauerstoffbedarf reguliert. Die Effekte werden hauptsächlich über die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen VEGFR-1/Flt-1 und VEGFR-2/Flk-1/KDR vermittelt, die überwiegend auf der Plasmamembran der Endothelzellen lokalisiert sind.

Es konnte gezeigt werden, dass die intraluminale Applikation von VEGF nach mikrochirurgischer Anastomosenbildung an der Arteria femoralis der Ratte den Heilungsprozess, der mit einem Anstieg der EZM-Proteine einhergeht, positiv beeinflusst (Infanger M et al., 2005).

Integrine sind heterodimere transmembranäre Moleküle, die aus zwei Untereinheiten aufgebaut sind. Der β_1 -Integrin-Rezeptor vermittelt u. a. die Bindung von Endothelzellen und der EZM und beeinflusst dadurch Wachstum, Migration und die Ablagerung von Matrixproteinen. Er ist somit ein wichtiger Faktor im Bereich der Angiogenese, Arteriosklerose und arterieller Restenose (Xu H et al., 2006).

Der Einfluss von VEGF auf Integrine sowie die Expression von Integrinen in der humanen Nabelschnur sind derzeit unbekannt.

Die vaskuläre Permeabilität ist unter pathologischen Konditionen erhöht, wie zum Beispiel bei Verbrennungsverletzungen, bei inflammatorischen Erkrankungen oder bei Schädel-Hirn-Traumata, die mit 10.000 pro Jahr in Deutschland die häufigste Todesursache bei unter 40-jährigen Patienten darstellen. Dies führt insbesondere bei der Verbrennungsverletzung nicht nur zu einem lokalen, sondern auch zu einem generalisierten Ödem. Ein einzelner Mechanismus kann jedoch die Erhöhung der vaskulären Permeabilität nicht erklären.

Grundlegende Kenntnisse des physiologischen Zusammenspiels von Endothelzellen und anderen gefäßbildenden Zellen, Proteinen der EZM und Wachstumsfaktoren wie VEGF sind die Basis für die Erforschung der exakten pathogenetischen Mechanismen einer Vielzahl von Erkrankungen. Dies ist von herausragender klinischer Bedeutung, um durch Modulation einzelner oder mehrerer Komponenten neue Therapieansätze zur Behandlung von Verbrennungen, Schädel-Hirn-Traumata, kardiovaskulären und inflammatorischen Erkrankungen zu entwickeln und klinisch zu implementieren.

1.2 Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor

Im Jahre 1983 wurde von Senger et al. ein Protein im Medium einer Tumorzelllinie von Meerschweinchen isoliert, das in der Lage war, die vaskuläre Permeabilität nach Injektion in die Haut zu erhöhen (Senger DR et al., 1983). Dies führte zum Namen Vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF). Die Isolation und Sequenzierung gelang 1990 (Senger DR et al., 1990). 1989 berichteten Ferrara und Henzel über die Isolierung eines löslichen endothelzellspezifischen Mitogens, das sie als vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) bezeichneten (Ferrara N, Henzel WJ, 1989).

Isolierung, Klonierung und Sequenzierung zeigten, dass es sich bei VPF und VEGF um das gleiche Protein handelt. Die spezifische Wirksamkeit an Endothelzellen hinsichtlich Mitogenität und Permeabilitätserhöhung führte zur Hypothese, dass VEGF in der Regulation von physiologischer wie pathologischer Angiogenese eine bedeutsame Rolle spielt.

1.2.1 Biologische Aktivität von VEGF

Mitogenese, Angiogenese, Wirkung als Überlebensfaktor

Eine charakteristische *in vitro*-Aktivität von VEGF ist die Fähigkeit, das Wachstum von Endothelzellen aus Arterien, Venen und Lymphgefäßen zu fördern (Ferrara N, Davis-Smyth T,

1997). VEGF fördert darüber hinaus die Angiogenese in dreidimensionalen *in vitro*-Modellen, indem das Einwandern von konfluenten mikrovaskulären Endothelzellen in Kollagen-Gel induziert wird. Dabei formen die Endothelzellen kapillarähnliche Strukturen (Pepper MS et al., 1992). Auch bei einer Reihe von *in vivo*-Modellen führt VEGF zu einer angiogenetischen Antwort, so beispielsweise in der Cornea von Kaninchen (Phillips GD et al., 1994) und der Iris von Primaten (Tolentino MJ et al., 1996). Die Applikation von VEGF induziert unter bestimmten Konditionen auch die Lymphangiogenese bei Mäusen (Nagy JA et al., 2002).

Ferner ist VEGF sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein Überlebensfaktor für Endothelzellen. So beugt VEGF der Apoptose vor, die durch Hungermedium oder durch simulierte Mikrogravitation (Infanger M et al., 2006) eingeleitet wird. Diese Aktivität wird über den Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase (PI3-Kinase)/Akt-Signaltransduktionsweg vermittelt (Gerber HP, McMurtry A et al., 1998). Die Aktivität von VEGF als Überlebensfaktor geht mit der Expression antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2, A1 (Gerber HP, Dixit V et al., 1998), XIAP (Tran J et al., 1999) und Survivin (Tran J et al., 2002) in Endothelzellen einher. Durch den Mangel an VE-Cadherin wird die Apoptose von Endothelzellen induziert und das von VEGF-A getragene Überlebenssignal kann durch verminderte Komplexbildung mit VEGFR-2, β -Catenin und der PI3-Kinase nicht an die Akt-Kinase und Bcl-2 übermittelt werden (Carmeliet P et al., 1999). *In vivo* ist die Wirkung von VEGF als Überlebensfaktor vom Status der Entwicklung abhängig. So führt die Inhibition von VEGF zu apoptotischen Veränderungen im Gefäßsystem der neonatalen, nicht aber der adulten Maus (Gerber HP, Hillan KJ et al., 1999).

Abgesehen von Endothelzellen wirkt VEGF auch auf retinale Pigmentzellen (Guerrin M et al., 1995), duktale Pankreaszellen (Oberge-Welsh C et al., 1997) und Schwanzzellen (Sondell M et al., 1999) mitogen.

Effekte auf Knochenmarkszellen

VEGF ist in der Lage, die Chemotaxis von Monozyten zu fördern (Clauss M et al., 1990), und hat einen hämatopoetischen Effekt. Dieser ist an der Koloniebildung reifer Subtypen der Granulozyten-Makrophagen-Progenitorzellen erkennbar (Broxmeyer HE et al., 1995). Ferner erhöht VEGF die Produktion von B-Zellen und die Rekrutierung hämatopoetischer Stammzellen (Hattori K et al., 2001).

Erhöhung der vaskulären Permeabilität und hämodynamische Effekte

VEGF ist in der Lage, die vaskuläre Permeabilität zu erhöhen (Senger DR et al., 1983) und spielt somit bei entzündlichen Prozessen eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass die hydraulische Leitfähigkeit isolierter Mikrogefäße durch VEGF erhöht wird (Bates DO, Curry FE, 1996), ein Prozess, der durch einen erhöhten Kalziumeinfluss vermittelt wird (Bates DO, Curry FE, 1997). *In vitro* konnte dokumentiert werden, dass durch VEGF die

Endothelzellen, während VEGF-C und VEGF-D die lymphatische Angiogenese regulieren (Stacker SA et al., 2002). Dies verdeutlicht die herausragende Rolle dieser Gen-Familie bei Wachstum und Differenzierung multipler Komponenten des vaskulären Systems.

Das menschliche VEGF-A-Gen ist auf Chromosom 6p21.3 lokalisiert (Vincenti V et al., 1996), die Kodierungsregion umfasst etwa 14 kb (Kilobase: 1000 Basenpaare). Es ist in acht Exons organisiert, die von sieben Introns separiert werden. Während die VEGF-mRNA (Messenger-Ribonukleinsäure) immer die Exons 1 bis 5 beinhaltet, können durch alternatives Splicing der Exons 6 bis 8 verschiedene VEGF-Isoformen synthetisiert werden. Gegenwärtig sind sieben verschiedene Isoformen bekannt, die sich lediglich in der Länge der Polypeptidketten unterscheiden. Korrelierend zur Zahl der Aminosäuren werden sie als VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆, bezeichnet (Houck KA et al., 1991; Poltorak Z et al., 1997; Jingjing L et al., 1999; Lange T et al., 2003). VEGF₁₆₅ ist das prädominante Protein. Die Isoformen mit 145, 162 und 183 Aminosäuren kommen deutlich seltener vor.

VEGF ist ein homodimeres Glykoprotein mit einer Größe von 45 kDa, das in der Lage ist, Heparin zu binden (Ferrara N, Henzel WJ, 1989). Die dimeren Bausteine sind durch zwei Disulfid-Brücken kovalent aneinander gebunden (Muller YA et al., 1997). Diese Eigenschaften korrespondieren am besten mit VEGF₁₆₅, welcher durch verschiedene normale und transformierte Zellen sezerniert wird.

VEGF₁₂₁ ist ein saures, nicht heparin-bindendes Polypeptid, das frei diffusionsfähig ist. VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ sind basische Polypeptide, die eine sehr hohe Affinität zu Heparin haben und nahezu vollständig an Proteine der extrazellulären Matrix gebunden sind (Houck KA et al., 1992). Während sich VEGF₁₂₁ und VEGF₁₈₉ in den meisten Zellen und Geweben befinden, kommt VEGF₂₀₆ deutlich seltener vor.

Die an die EZM-Proteine gebundenen Isoformen werden durch Heparin oder Heparinase aus ihrer Bindung verdrängt. Plasmin-Spaltung aktiviert sie. Dies lässt vermuten, dass die EZM-gebundenen Isoformen eine wichtige Rolle bei der lokalen Bioverfügbarkeit und Aktivität einnehmen (Pepper MS, 2001).

VEGF₁₆₅ zirkuliert frei, jedoch wird eine signifikante Fraktion an der Zelloberfläche und den Proteinen der EZM gebunden (Park JE et al., 1993). Da ein Verlust der heparin-bindenden Domäne eine Reduktion der mitogenen Aktivität zur Folge hat, scheint VEGF₁₆₅ die höchste Bioverfügbarkeit und biologische Potenz zu haben (Keyt BA et al., 1996).



Abbildung 2: VEGF-Molekül (Berman HM et al., 2000)

1.2.3 Regulation der VEGF-Genexpression

Die Expression von VEGF in spezifischen Zellen wird durch eine Vielzahl von Faktoren wie Hypoxie, Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine und Onkogene stimuliert oder inhibiert.

Die Hypoxie ist der maßgebliche Induktor für die Genexpression von VEGF unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen (Dor Y et al., 2001; Semenza G, 2003; Shweiki D et al., 1992). Die gesteigerte Transkription der VEGF-mRNA wird zumindest partiell durch Bindung von Hypoxia-inducible Factor 1 (HIF-1) an eine entsprechende Bindungsstelle innerhalb des Promoters von VEGF vermittelt (Levy AP et al., 1995). HIF-1 ist ein basisches heterodimeres Protein, das aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut ist. Es ist ein Schlüsselmediator bei Reaktionen der Zelle auf hypoxische Reize (Semenza G, 2002) und wird durch Hypoxie stimuliert. Es bindet an spezifische Enhancer-Elemente, sodass es zu einer erhöhten Transkription unter anderem von VEGF kommt. Ebenso ist HIF-2 an der Regulation der VEGF-Expression beteiligt (Ema M et al., 1997). Auch das Produkt des von-Hippel-Lindau (VHL) Tumor-Suppressor-Gens ist in diesen Signaltransduktionsweg involviert (Mole DR et al., 2001). So scheint VHL die negative Regulation von VEGF im Sinne einer Hemmung zu vermitteln (Iliopoulos O et al., 1996).

Viele Wachstumsfaktoren vermitteln ebenso eine erhöhte Expression VEGF-mRNA, wie beispielsweise der Epidermal Growth Factor (EGF), Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) (Neufeld G et al., 1999), Transforming Growth Factor β (TGF- β) (Pertovaara L et al, 1995), Keratinocyte Growth Factor (KGF) (Frank S et al., 1995), Insulin-like Growth Factor I (IGF-I)

(Goad DL et al, 1996), Fibroblast Growth Factor (FGF-4) (Deroanne CF et al., 1997) und Platelet-derived Growth Factor (PDGF) (Finkenzeller G et al., 1997).

Darüber hinaus induzieren inflammatorische Zytokine wie Interleukin 1 β (IL-1 β) (Li J et al., 1995) und IL-6 (Cohen T et al., 1996) die Expression von VEGF in Übereinstimmung mit der These, dass VEGF ein Mediator der Angiogenese bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen ist. Andere Zytokine wie IL-10 und IL-13 hingegen hemmen die Freisetzung von VEGF (Neufeld G et al., 1999).

Auch Hormone sind wichtige Regulatoren der VEGF-Genexpression. So konnten Soh et al. 1996 zeigen, dass das Thyroidea-stimulierende Hormon (TSH) die Sekretion von VEGF in Schilddrüsenkarzinomzellenlinien steigert (Soh EY et al., 1996). Auch das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) (Shifren JL et al., 1998) und die Gonadotropine sind als Induktoren der VEGF-Expression bekannt. Letztere stimulieren die VEGF-Expression in Ovarien *in vivo* und *in vitro* (Ferrara N et al., 1998; Christenson LK, Stouffer RL, 1997) sowie in Leydig-Zellen (Schwarzenbach H et al., 2004). Studien konnten auch belegen, dass die Sexualhormone in hormon-sensitiven Geweben eine Erhöhung der VEGF-mRNA- und Proteinlevel bewirken (Stewart RJ et al., 2001; Mueller MD et al., 2003).

Die Induktion der VEGF-Genexpression kann Folge unterschiedlicher oncogener Mutationen oder einer Amplifikation von ras sein (Okada F et al., 1998).

Schließlich stimulieren UV-B-Strahlung und Oxidantien wie Wasserstoffperoxid die Produktion von VEGF in Keratinozyten (Brauchle M et al., 1996).

1.2.4 VEGF-Rezeptoren

Rezeptoren für VEGF werden hauptsächlich auf der Zelloberfläche vaskulärer Endothelzellen (Vaisman N et al., 1990) sowie auf Monozyten exprimiert (Shen H et al., 1993). Zwei der Rezeptoren, VEGFR-1 (de Vries C et al., 1992) und VEGFR-2 (Terman BI et al., 1992), gehören der Tyrosin-Kinase Rezeptorfamilie an. VEGFR-1 und VEGFR-2 haben extrazellulär gelegen sieben immunoglobulin-ähnliche Domänen, eine transmembrane Region und eine intrazelluläre Split-Tyrosin-Kinase. Ein weiterer Vertreter dieser Rezeptor-Familie, VEGFR-3 (Flt-4) (Pajusola K et al., 1992), ist nicht Rezeptor für VEGF-A, sondern bindet VEGF-C und VEGF-D und wird im lymphatischen System exprimiert (Karkkainen MJ et al., 2002).

Darüber hinaus interagiert VEGF mit Korezeptoren wie den Neuropilinen.

VEGFR-1 und VEGFR-2 werden vorwiegend auf der Zelloberfläche von Endothelzellen, aber auch auf Tumorzellen exprimiert (Fournier E et al., 1997). Ferner exprimieren Monozyten, Trophoblasten (Barleon B et al., 1996) und renale mesangiale Zellen (Thakahashi T et al.,

1995) VEGFR-1. VEGFR-2 findet sich auf der Plasmamembran von hämatopoetischen Stammzellen, Retinazellen und Megakaryozyten.

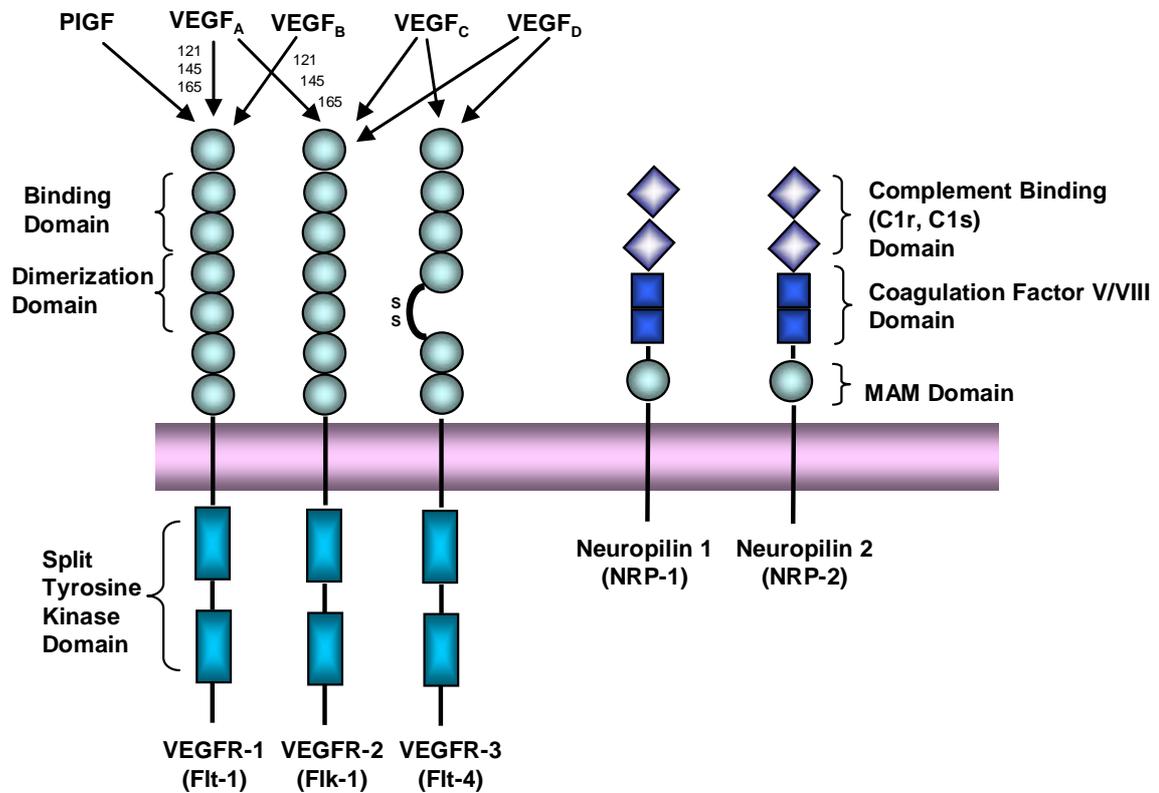


Abbildung 3: Schematische Darstellung der VEGF-Rezeptoren und ihrer Liganden (Quelle: www.sigmaaldrich.com)

VEGFR-1 (Flt-1)

Die Funktion von Flt-1 (fms-like tyrosine kinase) ist bisher nicht gänzlich bekannt, was unter anderem daran liegt, dass der Signaltransduktionsweg abhängig vom Entwicklungsstadium und vom Zelltyp ist (zum Beispiel Endothelzelle versus hämatopoetische Stammzelle). Die Expression von VEGFR-1 wird durch Hypoxie via HIF-1 erhöht (Gerber HP et al., 1997). Gebunden werden können neben VEGF-A auch PIGF (Park JE et al., 1994) und VEGF-B (Olofsson B et al., 1998), die nicht an VEGFR-2 binden. Eine lösliche Form von VEGFR-1 (sFlt-1) wirkt durch Konkurrenz um VEGF-Moleküle als Inhibitor der VEGF-vermittelten Aktivität (Kendall RL, Thomas KA, 1993). Nach Bindung von VEGF an VEGFR-1 kommt es zur schwachen Autophosphorylierung (Waltenberger J et al., 1994). Infolge einer Rezeptoraktivierung durch PIGF kann es unter Umständen zur Angiogenese kommen, die über eine Transphosphorylierung von VEGFR-2 vermittelt wird (Autiero M et al., 2003).

Weitere Effekte der Aktivierung von VEGFR-1 durch einen Stimulus mit VEGF oder PlGF sind die Migration und Chemotaxis von Monozyten, die ebenfalls VEGFR-1 exprimieren (Barleon B et al., 1996) sowie die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine via Signaltransduktion über PI3-Kinase/AKT und ERK1/2 (Selvaraj SK et al., 2003). Auch die Induktion der Matrix-Metalloproteinase 9 (Hiratsuka S et al., 2002) und die Rekrutierung hämatopoetischer Stammzellen und endothelialer Progenitorzellen sind Folgen einer VEGFR-1-Aktivierung (Hattori K et al., 2002).

Zusammenfassend scheint VEGFR-1 am vaskulären Endothel nicht primär der Regulation der Angiogenese zu dienen, sondern die parakrine Freisetzung von gewebespezifischen Wachstums- und Überlebensfaktoren zu induzieren (LeCouter J et al., 2003).

VEGFR-2 (KDR, Flk-1)

VEGFR-2 ist der Hauptmediator der Mitogenität, der Angiogenese, der Permeabilitätserhöhung und der Hämatopoese, die durch Bindung von VEGF vermittelt werden. Die Schlüsselrolle dieses Rezeptors wird durch die Untersuchung von Flk-1-negativen Mäusen verdeutlicht, die durch fehlerhafte Vaskulogenese und gestörte Entwicklung von Blutinseln und organisierten Gefäßen bereits *in utero* sterben (Shalaby F et al., 1995). Auf Subpopulationen von multipotenten hämatopoetischen Stammzellen des Menschen ist ebenfalls VEGFR-2 identifiziert worden (Kabrun N et al., 1997). Das mitogene und chemotaktische Signal sowie die Wirkung des Liganden als Überlebensfaktor ist Folge einer Dimerisation und liganden-abhängiger Tyrosin-Phosphorylierung des Rezeptors (Matsumoto T, Claesson-Welsh L, 2001). VEGF induziert via VEGFR-2 die Phosphorylierung unter anderem folgender Proteine der Signaltransduktion: Phospholipase C γ , PI3-Kinase, ras-GTPase-Aktivierungsprotein (Guo D et al., 1995) und Proteine der src-Familie (Eliceiri BP et al., 1999). VEGFR-2 aktiviert nach Bindung von VEGF verschiedene Integrine, die bekanntermaßen in den Prozess der Angiogenese involviert sind, wie beispielsweise $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$, und erhöht die Zelladhäsion, die Migration sowie die Bindung löslicher Liganden (Byzova TV et al., 2000). Die VEGFR-2-Aktivierung induziert das Endothelzellwachstum über den Raf-Mek-Erk-Signaltransduktionsweg (Wu LW et al., 2000). VEGF-Mutanten, die selektiv an VEGFR-2 binden, wirken auf Endothelzellen vollständig als Mitogene, Chemotaktine und permeabilitätserhöhend, wohingegen spezifisch an VEGFR-1 bindende Mutanten diese Aktivitäten nicht aufweisen (Gille H et al., 2001). Ebenso werden nur über Bindung an VEGFR-2 die antiapoptotischen Effekte von VEGF an humanen umbilikalen venösen Endothelzellen vermittelt (Gerber HP, McMurtrey A et al., 1998), und zwar über den PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweg, der auch für die endotheliale Chemotaxis wichtig ist (Morales-Ruiz M et al., 2000).

Neuropilin 1, Neuropilin 2

Eine von Tumor- und Endothelzellen exprimierte VEGF-Bindungsstelle, die sich in ihrer Affinität zu VEGF und ihrem Molekulargewicht von den bekannten VEGF-Rezeptoren unterscheidet (Soker S et al., 1996), konnte als Neuropilin 1 (NP 1) identifiziert werden. NP 1, das an die Collapsin/Semaphorin-Familie bindet und eine Rolle in der neuronalen Entwicklung zu spielen scheint (Neufeld G et al., 2002), verstärkt die Bindung von VEGF₁₆₅ an VEGFR-2 und die VEGF₁₆₅-vermittelte Chemotaxis, sofern NP 1 und VEGFR-2 koexprimiert werden (Soker S et al., 1998). NP 1 scheint VEGF₁₆₅ VEGFR-2 zu präsentieren und somit die Effektivität der VEGFR-2-vermittelten Signaltransduktion zu verstärken. Die direkte Bindung von VEGFR-1 durch NP 1 ist eine Ursache der negativen Regulation der VEGF-Aktivität. VEGFR-1 konkurriert hierbei mit VEGFR-2 um die Bindung an NP 1 (Fuh G et al., 2000). Die Bedeutung von NP 1 für die Entwicklung des vaskulären Systems konnte durch den Tod von NP 1-negativen Mäusen in der Embryonalphase demonstriert werden (Kawasaki T et al., 1999). NP 2 hingegen ist für die Entwicklung lymphatischer Gefäße verantwortlich (Yuan L et al., 2002).

1.2.5 Die Rolle von VEGF in der Physiologie (Angiogenese)

Die Rolle von VEGF unter physiologischen Konditionen umfasst die Vaskulogenese und Angiogenese in der pränatalen und die Angiogenese in der postnatalen Wachstums- und Reifungsphase von Organismen, beim ovariellen Zyklus sowie bei der Wund- und Frakturheilung.

VEGF spielt eine essenzielle Rolle bei der embryonalen Vaskulogenese und Angiogenese der Maus (Carmeliet P et al., 1996). So führt die Inaktivierung eines einzelnen VEGF-Allels zur embryonalen Sterblichkeit sowie zu Entwicklungsanomalien, defekter Vaskularisation in verschiedenen Organen und deutlich reduzierter Zahl an roten Blutzellen in den Blutinseln des Dottersacks. Insbesondere bei der Entwicklung des vaskulären Plexus im zerebralen Kortex führt ein Mangel von VEGF zu einer verminderten Gefäßdichte und konsekutiv zu Hypoxie, Neurodegeneration und neonataler Letalität (Haigh JJ et al., 2003). Jedoch führt auch ein moderater Anstieg der VEGF-Genexpression zu schweren Fehlbildungen am Herzen und embryonaler Letalität (Miquerol L et al., 2000). Somit scheint das exakte Quantum der VEGF-Genexpression während der Entwicklung von größter Wichtigkeit zu sein. Während die Inaktivierung der VEGF-B-Genexpression mit weniger schwerwiegenden Fehlbildungen einhergeht – hierzu gehört unter anderem eine reduzierte Herzgröße – (Bellomo D et al., 2000), führt ein Mangel an VEGF-C zu einer gestörten Entwicklung des lymphatischen Systems. Eine Flüssigkeitsansammlung im Gewebe und der Tod *in utero* sind die Folgen (Karkkainen MJ et

al., 2004). Die Rolle von VEGF im frühen postnatalen Stadium wurde durch partielle Hemmung von VEGF bei neonatalen Mäusen untersucht. Es zeigten sich eine erhöhte Mortalität, missgebildetes Wachstum und eine beeinträchtigte Organentwicklung. *In vitro* führt die Hemmung von VEGF bei Endothelzellen, die aus der Leber neugeborener, mit löslichem VEGFR-1 behandelter Mäuse gewonnen wurden, zu einem erhöhten apoptotischen Index. Somit ist VEGF nicht nur für die Proliferation, sondern auch für das Überleben von Endothelzellen postnatal von großer Bedeutung (Guerrin M et al., 1995). Ferner kam es zur erhöhten Letalität, da eine Inhibition der Glomerulumentwicklung zu Nierenversagen führte. Die Neutralisation von VEGF bei adulten Mäusen hingegen hat keinen Effekt auf die glomeruläre Funktion, führt aber bei nephritischen Prozessen zu einer reduzierten glomerulär-endothelialen Regeneration (Fuh G et al., 1998). Der Neutralisation von VEGF bei juvenilen Primaten folgt keine pathologische Veränderung des renalen Systems (Ryan AM et al., 1999).

Die enchondrale Ossifikation ist ein fundamentaler Mechanismus des Knochenlängenwachstums. VEGF-mRNA wird von hypertrophen Chondrozyten in der Epiphysenfuge exprimiert, da dieser VEGF-Gradient für das Wachstum von Blutgefäßen benötigt wird (Gerber HP, Vu TH et al., 1999). Durch VEGF-Blockade wird das Wachstum der Blutgefäße supprimiert und es kommt zu Beeinträchtigungen der trabekulären Knochenformation. Beide Effekte sind bei Beendigung der VEGF-Blockade reversibel. Die Induktion von VEGF in Osteoblasten durch bone morphogenetic proteins (BMPs) deutet auf eine Kopplung von Knochenwachstum bzw. Knochenheilung und der Bildung von Blutgefäßen hin (Deckers MM et al., 2002). So wird durch VEGF-Blockade die Frakturheilung reduziert (Street J et al., 2002). Darüber hinaus hat VEGF eine chemotaktische Wirkung auf Osteoblasten (Mayr-Wohlfart U et al., 2002) und Osteoklasten (Engsig MT et al., 2000).

Angiogenese ist auch bei der zyklischen ovariellen Funktion ein Schlüsselaspekt, da das folliculäre Wachstum und die Entwicklung des Corpus luteum von der Proliferation neuer Kapillargefäße abhängig sind (Bassett DL, 1943). Die darauf folgende Rückbildung der Gefäße macht deutlich, dass es bei dem ovariellen Zyklus eines koordinierten Zusammenspiels von Induktoren und Inhibitoren der Angiogenese bedarf (Goede V et al., 1998). Die Gabe von VEGF-Inhibitoren verzögert die folliculäre Entwicklung und supprimiert die luteale Angiogenese bei Primaten (Fraser HM et al., 2000).

1.2.6 Die Rolle von VEGF in der Pathophysiologie

Auch unter pathophysiologischen Bedingungen spielt VEGF eine wichtige Rolle und bietet einen interessanten Ansatzpunkt für künftige Therapiestrategien bei der Behandlung von

bösartigen Neoplasien, intraokularen neovaskulären Syndromen, inflammatorischen Erkrankungen und Hirnödemen.

Viele Tumorzelllinien sezernieren VEGF als Mediator für die Tumor-Angiogenese *in vitro* (Ferrara N et al., 1992). Studien konnten belegen, dass VEGF-mRNA in der Mehrzahl der bis jetzt untersuchten Tumore exprimiert wird, dazu gehören Karzinome der Lungen (Volm M et al., 1997), der Mammae (Brown LF et al., 1995), des Gastrointestinaltrakts (Brown LF et al., 1993, Cancer Res), der Leber (Suzuki K et al., 1996), des Pankreas (Ellis LM et al., 1998), der Nieren, der Harnblase (Brown LF et al., 1993, Am J Pathol), der Ovarien (Olson TA et al., 1994) und des Endometriums (Guidi AJ et al., 1996) sowie verschiedene intrakranielle Tumore (Phillips HS et al., 1993) und das kapilläre Hämangioblastom (Wizigmann Voos S et al., 1995). Auch bei Schilddrüsenkarzinomzellen zeigen sich höhere Level an VEGF-mRNA im Vergleich zu normalen Schilddrüsenzellen (Soh EY et al., 1997).

Abgesehen von soliden Tumoren findet sich eine erhöhte VEGF-Expression auch bei einer Vielzahl bösartiger hämatologischer Erkrankungen. Dazu gehören T-Zell-, histiozytische und Burkitt-Lymphome sowie die akute lymphoblastische, die akute lymphozytische und die promyelozytische Leukämie (Gerber HP, Ferrara N, 2003). Ebenso werden die Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 verstärkt exprimiert.

Diabetes mellitus und eine Okklusion der Vena centralis retinae können mit einer retinalen Ischämie und intraokulärer Neovaskularisation assoziiert sein, die zu Hämorrhagie, Retinaablösung, Glaukom und Blindheit führen kann (Patz A, 1980). Es konnte gezeigt werden, dass die hypoxie-regulierte VEGF-Expression, die auch für die normale Entwicklung von retinalen Gefäßen eine Schlüsselrolle spielt, bei Primaten mit retinaler Ischämie erhöht ist und mit dem Ausmaß der Neovaskularisation korreliert (Miller JW et al., 1994). Auch im menschlichen Auge werden bei Patienten mit proliferativer Retinopathie erhöhte VEGF-Spiegel als Folge eines Diabetes mellitus gefunden, die mit der Schwere des klinischen Erscheinungsbildes korrelieren (Aiello LP et al., 1994). Bei der altersabhängigen Makuladegeneration hat der Verlust der Sehkraft seine Hauptursache in der VEGF-vermittelten Neovaskularisation und der intraokularen Permeabilitätserhöhung der Gefäße (Lopez PF et al., 1996).

Bei vielen inflammatorischen Erkrankungen findet sich eine Erhöhung des VEGF-Spiegels. VEGF wird verstärkt von epidermalen Keratinozyten bei der Wundheilung und bei der Psoriasis exprimiert, beides Konditionen, die mit einer erhöhten mikrovaskulären Permeabilität und Angiogenese einhergehen (Detmar M et al., 1995). Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, in deren Verlauf die Angiogenese eine signifikante Rolle spielt, finden sich in der Synovialflüssigkeit erhöhte Spiegel von VEGF. Dies ist bei anderen Formen der Arthritis und bei degenerativen Gelenkerkrankungen nicht der Fall (Koch AE et al., 1994).

Erhöhte Werte der VEGF-Expression können bei der Entwicklung von Hirnödemen beobachtet werden. Da die Hypoxie der Hauptregulator der Genexpression von VEGF ist, finden sich deutlich erhöhte Spiegel von VEGF, aber auch von VEGFR-1 und VEGFR-2 bei Induktion einer fokalen zerebralen Ischämie im Rattengehirn (Lennmyr F et al., 1998). Ebenso sind erhöhte Spiegel von VEGF bei Hirnödemen zu verzeichnen, deren Genese traumatisch ist (Suzuki R et al., 2003).

Angiogenese ist ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der Endometriose, ein Krankheitsbild, das durch ektopes Endometrium charakterisiert ist. In der Peritonealflüssigkeit von erkrankten Patientinnen kann ein erhöhter VEGF-Gehalt bestimmt werden (Hull ML et al., 2003).

Hinsichtlich der pathologischen Permeabilitätserhöhung des Endothels werden die höchsten Serumspiegel von VEGF mit bis zu 2800 mg/ml gegenüber dem Referenzwert von 60-100 mg/ml (Grad S et al., 1998) bei Verbrennungspatienten gefunden (Infanger M et al., 2004), die nicht nur das lokale, sondern auch das generalisierte Ödem mit konsekutivem Flüssigkeitsverlust erklären.

1.3 Extrazelluläre Matrix

Per definitionem gehören EZM alle Makromoleküle, die sich außerhalb der Plasmamembran von Zellen befinden. Diese Makromoleküle werden von den Zellen synthetisiert, in den Interzellularraum sezerniert und bilden das komplexe Netzwerk des Bindegewebes.

Je nach vorherrschendem Zelltypus und Gewebe besteht die EZM aus unterschiedlichen Anteilen spezifischer Proteoglykane, Glukosaminoglykane und Glykoproteine (Hay E, 1951).

Die am häufigsten vorkommenden Glykoproteine der EZM gehören zur Gruppe der Kollagene. Proteoglykane sind aus einem zentralen fadenförmigen Core-Protein aufgebaut, das mit Glukosaminoglykanseitenketten kovalent verbunden ist. Letztere bestehen aus Uronsäure, einem Aminozucker und repetitiven Disaccharideinheiten. Bei den Glukosaminoglykanen differenziert man nicht sulfatierte Formen wie zum Beispiel die Hyaluronsäure, die am häufigsten vorkommt und sich durch ihre Wasserbindungskapazität auszeichnet, und sulfatierte Formen wie beispielsweise Chondroitinsulfat und Heparansulfat. Die mit dem Core-Protein der Glykoproteine verbundenen Seitenketten setzen sich aus nicht sulfatierten Monosacchariden zusammen. Glykoproteine, die in der EZM auch als Strukturglykoproteine bezeichnet werden, sind beispielsweise Laminin, Fibronectin, Osteonectin und Thrombospondin.

Zur EZM gehören außerdem viele andere Komponenten: Proteine wie Fibrin, Elastin und Nidogene, Hydroxylapatit im Knochen oder *per definitionem* flüssige Komponenten wie Blutplasma oder -serum.

Die Funktionen der EZM sind unter anderem durch ihre gewebespezifische Zusammensetzung und die Wechselwirkung mit ortsständigen Zellen mannigfaltig. Sie dient nicht nur der Formgebung und Elastizität von Geweben und Organen, der Stabilität, Zugfestigkeit und Elastizität von Knochen, Bändern und Sehnen, sondern primär der Adhäsion der Zellen mit Definition der Polarität (Basalmembranen von Epi- und Endothel), wobei sich Zelle und Matrix wechselseitig beeinflussen. Somit ist über die EZM eine interzelluläre Signaltransduktion möglich. Rezeptoren auf der Zellmembran vermitteln durch Bindung unterschiedlicher Moleküle der EZM die Regulation der Genexpression. Die Zell-EZM-Adhäsion wird von spezifischen Adhäsionsmolekülen (Integrine) reguliert. Integrine dienen unter anderem der Transmission mechanischer Stimuli von der EZM auf das Zytoskelett.

Nicht zuletzt ist die Verbindung von Zelle und EZM über die Integrine für die Zelle überlebenswichtig (Fukai F et al., 1998). Dies ist an der Tatsache erkennbar, dass die Trennung der Zelle von ihrer Matrix bei vielen Zellarten ein apoptotisches Signal auslöst (Frisch SM et al., 1994).

Die EZM bildet ein lokales Depot für eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, die den Polysaccharid- und Proteinanteilen angelagert sind. Durch physiologische oder pathologische Stimuli können Proteasen aktiviert werden, die beim Abbau der Proteine der EZM eine lokale Freisetzung dieser Faktoren bewirken. Somit ist eine lokale Aktivierung zellulärer Funktionen sichergestellt, ohne dass es einer *de novo*-Synthese der Wachstumsfaktoren bedarf.

Die EZM ist ebenfalls in die Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushaltes auf Gewebe-, Organ- und Organismus-Ebene involviert und spielt eine wichtige Rolle im Prozess der Blutgerinnung, Wundheilung und Angiogenese (Li J et al., 2003) sowie bei fibrotischen Prozessen.

Aufbau und Zusammensetzung unterliegen einer gewissen Dynamik. Je nach Qualität und Quantität äußerer Stimuli können EZM-Proteine auf- oder abgebaut werden, befinden sich also unter physiologischen Konditionen in einem Fließgleichgewicht. Effektoren des Ab- und Umbaus sind membranständige oder lösliche Matrix-Metalloproteinasen (MMP), von denen bisher 20 Subtypen bekannt sind. Diese zinkhaltigen Enzyme bauen die Proteine der EZM ab und stehen dabei mit ihren Inhibitoren, den Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinasen (TIMP), im Gleichgewicht.

1.3.1 Integrine

Integrine sind transmembrane Zellmembranproteine. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Anhaftung der Zelle an die EZM und an andere Zellen und sind hauptverantwortlich für die Transduktion von Signalen zwischen EZM und der Zelle.

Sie sind aus zwei heterodimeren Ketten aufgebaut, die als α - und β -Untereinheit bezeichnet werden. Es sind insgesamt 18 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt, die teilweise noch in verschiedenen Varianten vorliegen (Hyne RO, 2002). Außerhalb der Plasmamembran liegen die α - und β -Kette dicht beieinander und bilden die ligandenbindende Region der Integrine für EZM-Proteine, penetrieren die Plasmamembran und haben gewöhnlich eine kurze zytoplasmatische Domäne. Das Molekulargewicht variiert zwischen 90 kDa und 160 kDa.

Integrine sind in der Lage, verschiedene Proteine der EZM mit dem Zytoskelett (Mikrofilamente) der Zelle zu verbinden. Zu den Liganden gehören Fibronectin, Vitronectin, verschiedene Kollagene und Laminin. So hält die Zelle Zugkräfte aus, ohne aus der EZM herausgerissen zu werden. Die transmembrane Verbindung von EZM-Protein, Integrin und Mikrofilament ist indirekt, da sie nach Bindung eines Matrixproteins an die extrazelluläre Integrindomäne intrazellulär über Gerüstproteine wie Talin, Paxillin und α -Actinin vermittelt wird, die sich ihrerseits über weitere Bindungsproteine an Aktin-Filamente anlagern. Bemerkenswert ist, dass die Affinität zum Liganden im Vergleich zu anderen Rezeptorbindungen verhältnismäßig schwach ist.

Integrine spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion (Alberts B et al, 1994). Die Verbindung mit EZM-Molekülen kann ein in die Zelle weitergeleitetes Signal induzieren und zwar über Protein-Kinasen des PI3-Weges (Schwartz MA, 2001), die mit dem intrazellulären Ende des Integrin Moleküls verknüpft sind. Auf diese Weise können Zellform, Zellmotilität, Zellwachstum, Zellteilung, Differenzierung, Überleben oder Apoptose, wie bereits oben beschrieben, vermittelt werden. Lösliche Wachstumsfaktoren wie beispielsweise VEGF oder PIGF sind an dieser Vermittlung beteiligt (Borges E et al., 2000).

1.3.2 Kollagene

Kollagene sind die am häufigsten vorkommenden Proteine bei Säugetieren und machen 25 % des Gesamtproteins beim Menschen aus. Sie gehören zur Gruppe der Glykoproteine, sind äußerst zugbelastbar und die Hauptkomponente der EZM. So kommen sie im Herz, im Knorpel, in Bändern, Sehnen, Knochen, Zähnen und der Haut vor, verstärken Blutgefäße und werden in kristalliner Form in der Kornea und Linse des Auges gefunden.

Gegenwärtig sind 28 unterschiedliche Typen von Kollagen bekannt. Kollagen Typ I spielt mit einem Anteil von 90 % am Gesamtkollagen die wichtigste Rolle und verleiht dem Gewebe Zugfestigkeit. Es kommt in nahezu allen Organen des menschlichen Körpers vor, insbesondere im Narbengewebe, in Sehnen, im Endomysium der Myofibrillen und im organischen Anteil des Knochens. Die Faseranordnung entspricht der Zugbelastungsrichtung. Intrazellulär werden drei links-helikale Peptidketten, die Präprokollagene, von den Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums (RER) synthetisiert. Diese werden im Lumen des RER hydroxiliert und glykosyliert, die Tripelhelixstruktur wird gebildet und das Prokollagen verlässt nach Passage des Golgi-Apparats via Exozytose die Zelle. Außerhalb der Zelle findet die enzymatische Umwandlung zum rechts-helikalen Tropokollagen und die Formation mehrerer Tropokollagenmoleküle zu kollagenen Fibrillen statt. Kollagen wird der Zellmembran über verschiedene Proteine wie Fibronectin und Integrin angelagert. Kollagen Typ II verleiht dem hyalinen Knorpel Elastizität. Kollagen Typ III ist an der Bildung retikulärer Fasern beteiligt und kommt in der Wand großer Blutgefäße und lymphatischer Organe vor. Das in dieser Arbeit untersuchte Kollagen Typ IV ist ein wichtiger Bestandteil der Basallamina der Gefäße. Die Lamina basalis ist aufgebaut aus der Lamina rara externa, Lamina densa, Lamina rara interna und Lamina fibroelastica. Kollagen Typ IV findet sich vor allem in der Lamina densa und liegt im Gegensatz zu anderen Kollagentypen nicht in fibrillärer, sondern in geknäuelter Form vor (Alberts B et al, 1994). Darüber hinaus spielt es eine Rolle bei der Filtration in Kapillaren und Glomerula des Nephrons.

Kollagene erfüllen jedoch nicht nur mechanisch-physikalische Aufgaben, sondern dienen auch als Signalmoleküle. Durch unterschiedliche Rezeptortypen, zu denen die Integrine gehören, sind sie in die Signaltransduktion eingebunden.

Laminin, Fibronectin und Tenascin, die zu den nichtkollagenen Glykoproteinen gehören, vermitteln durch direkte Anlagerung an Zellen die Bindung zwischen Zellen und EZM.

1.3.3 Laminin

Laminine bilden die anteilmäßig größte nicht kollagenöse Komponente der Lamina basalis und sind somit ein essenzieller Bestandteil der EZM. Es handelt sich um heterotrimere Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 400-600 kDa, die jeweils aus einer α -, β - und γ -Kette aufgebaut sind (Cognato H, Yurchenko PD, 2000). Derzeit sind 15 unterschiedliche Laminin-Trimere bekannt.

Laminine bilden in der Lamina rara interna unabhängige Netzwerke und sind vor allem über Entactin, Perlecan und Nidogen mit Kollagen Typ IV-Netzen, die in der Lamina densa gelegen

sind, verbunden. Darüber hinaus binden sie an Integrine und andere Moleküle der Plasmamembran sowie an Glykosaminoglykanketten anderer Proteoglykane der EZM. Durch diese Interaktion besitzen Laminine nicht nur strukturelle Aufgaben, sondern tragen auch zur Zelladhäsion, Zellmigration und Aufrechterhaltung des Phänotyps bei, aber darüber hinaus auch zur Zelldifferenzierung, Zellproliferation und zum Überleben der Zelle (Alberts B et al., 1994).

1.3.4 Osteopontin

Osteopontin (OPN) ist ein Glykoprotein der EZM mit einem Molekulargewicht von 44-75 kDa und wurde zuerst 1979 als Knochenstrukturprotein identifiziert (Senger DR et al., 1979). Wegen seiner wichtigen Rolle bei der zellulären Immunantwort wird OPN auch Eta-1 (Early T-lymphocyte activation 1) genannt. Der Genort wird als *spp-1* bezeichnet (Patarca R et al., 1989).

Neben Bindungsstellen für Heparin und Kalzium verfügt OPN über eine Arginin-Glycin-Asparat-Sequenz (RGD-Sequenz), die beispielsweise auch bei Kollagen und Fibronectin auftritt und die Bindung von OPN an Integrine vermittelt (Denhardt DT et al., 2001). Über den Rezeptor CD 44 wird die OPN-induzierte Migration von Zellen beeinflusst (Weber GF et al., 1996).

OPN kann in monomerer und in polymerer Form vorliegen. Die monomere Form besitzt, ähnlich einem Zytokin, eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten sowie auf die Migration von Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Eine Interaktion mit anderen Proteinen der EZM ist nur bei der polymeren Form bekannt (Kartinen MT et al., 1999). Am Gefäßsystem ist OPN an angiogenetischen wie auch an atherosklerotischen Prozessen beteiligt (Denhardt DT, Guo X, 1993). Neben der chemotaktischen ist auch eine antiapoptotische Wirkung auf Monozyten und Endothelzellen beschrieben.

Die Expression von OPN konnte bisher in Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten, in pulmonalen, gastrointestinalen und glandulären Epithelzellen und in glatten Muskel- sowie Endothelzellen nachgewiesen werden. Die Synthese wird unter anderem von Calcitriol stimuliert.

Einige bösartige Neoplasien (zum Beispiel das Mamma-Karzinom) zeigen eine erhöhte OPN-Expression des Primärtumors, die mit einer frühen Metastasierung einhergeht (El-Tanani MK et al., 2006).

1.4 Nabelschnur

1.4.1 Länge und Durchmesser

Im Mittel beträgt die Nabelschnurlänge 50-70 cm bei reifen gesunden Neugeborenen, kann aber in Extremfällen 18 cm oder 120 cm erreichen (Boyd JD, Hamilton WJ, 1970; Sohn C et al., 2003). Ihr Durchmesser nimmt von der 13. bis zur 30. Schwangerschaftswoche von 4 mm auf 16 mm zu. Bis zur Geburt bleibt dieser Wert konstant oder nimmt im Rahmen einer Reduktion der Wharton-Sulze ab (Raio L et al., 1999).

1.4.2 Nabelschnurgefäße

Makroskopische Anatomie

Die Nabelschnur besteht im Normalfall aus drei klappenlosen Gefäßen, nämlich zwei Arterien (Arteriae umbilicales), die sich um eine zentral gelegene Vene (Vena umbilicalis) winden. Diese Gefäße besitzen keine Vasa vasorum oder nervale Innervation und sind in die Wharton-Sulze eingebettet. Diese ist außen vom Amnionepithel überzogen. In der Nabelschnurvene wird das sauerstoff- und nährstoffreiche Blut von der Plazenta zum Fetus transportiert, während über die Nabelschnurarterien das sauerstoffarme Blut zur Plazenta zurückfließt.

Die umbilikalen Arterien haben ihren Ursprung in den paarig angelegten Arteriae iliacae internae. Von hier aus verlaufen sie beidseits der Harnblase an der vorderen Bauchwand und verlassen dann am Umbilicus den Fetus. Nach postnataler Unterbrechung des umbilikalen Blutstromes obliterieren die Arterien und verbleiben rudimentär als strangförmige Chordae umbilicales.

Die Umbilikalvene, die über den Umbilicus in den Fetus gelangt, verläuft kurz nach dem Eintritt intrahepatisch und geht in den Ductus venosus über. Im Rahmen der Kreislaufumstellung bei Geburt obliteriert sie und verbleibt als Ligamentum falciforme.

Die Durchmesser der Nabelschnurarterien nehmen durchschnittlich von 1,2 mm in der 16. Schwangerschaftswoche auf 4,2 mm bei Geburt zu, während der Durchmesser der Nabelschnurvene von 2 mm auf 8,2 mm wächst (Di Naro E et al., 2001).

Die weitaus häufigste Fehlbildung der Nabelschnur ist die singuläre Umbilikalarterie (SUA). Sie tritt in etwa 1 % aller Schwangerschaften auf. Um dennoch ein ausreichendes Sauerstoff- und Nährstoffangebot für den Fetus zu gewährleisten ist die singuläre Nabelschnurarterie kompensatorisch dilatiert (Persutte WH, Lenke RR, 1994). 1995 konnte von Benirschke und

Brown gezeigt werden, dass bis zu 50 % aller Feten mit einer SUA schwere Fehlbildungen und Komplikationen aufweisen. Dazu gehören beispielsweise eine Assoziation mit strukturellen Fehlbildungen und Chromosomenaberrationen, das Auftreten von intrauteriner Wachstumsretardierung, Komplikationen der Plazenta und Komplikationen unter der Geburt. Darüber hinaus ist die SUA häufiger mit einer intrauterinen Wachstumsretardierung und einer höheren perinatalen Mortalität vergesellschaftet (Heifetz SA, 1984).

Mikroskopische Anatomie

Der mikroskopische Aufbau der Nabelschnurarterien entspricht dem einer Arterie vom muskulären Typ (Arens Y et al., 1998). Arterie und Vene setzen sich aus folgenden Schichten zusammen (Junqueira LC, Carneiro J, 1996):

Die Intima besteht aus dem luminal gelegenen einschichtigen Endothel, aus dem bindegewebigen Stratum subendotheliale und aus der Membrana elastica interna, die aufgrund der Kontraktion des Gefäßes im histologischen Präparat gewellt erscheint.

Die Media, die bei der Nabelschnurarterie sehr stark ausgeprägt ist, besteht aus glatten Muskelzellen, die ringförmig angeordnet und in ein Netz aus u. a. Kollagen, Elastin und Proteoglykanen eingefügt sind. Sie werden von luminal ernährt und machen den Hauptanteil der Stoffwechselaktivität des Gefäßes aus.

Die Adventitia (Externa) setzt sich aus Bindegewebe und elastischen Fasern zusammen.

Die Vena umbilicalis besitzt eine verhältnismäßig dicke Wand, jedoch finden sich bei den Arteriae mehr und dichter gepackte Muskelzellschichten (Sexton AJ et al, 1996), die kaum durch Bindegewebe getrennt sind. Lediglich die inneren Lagen scheinen aufgelockert zu sein (Meyer WW et al., 1978). In der Vene findet sich durch bindegewebige Strukturen eine stärkere Separation der Muskelzellen.

Das einschichtige Endothel der Gefäße ist von kontinuierlichem Charakter (Parry EW, Abramovich DR, 1972). Bei Geburt sind die zu Beginn der Schwangerschaft rundlichen Endothelzellen abgeflacht, elongiert (Sexton AJ et al, 1996) und zeigen in der Vene zahlreiche Zytoplasmafortsätze (Gebrane-Younes J et al., 1986). Ihr Zytoplasma ist organellenreich, was ein Charakteristikum für eine metabolisch aktive Zelle ist. Insbesondere das ausgeprägte RER weist auf eine hohe Syntheseleistung hin. Dokumentiert sind auch zahlreiche pinozytische Vesikel sowie das Vorhandensein von Glykogen. Am basalen Zellpol des Endothels befindet sich eine organellenfreie Zone mit myofilamentären Strukturen, die auf die Fähigkeit zur Eigenkontraktion hindeuten. Durch zahlreiche Interdigitationen stehen die einzelnen Endothelzellen miteinander in Kontakt, sind über lange Fortsätze aber auch mit den glatten Muskelzellen in Verbindung.

Die Media der Nabelarterie weist einen zweischichtigen Bau auf, wobei die Muskulatur innen in Längsrichtung, außen zirkulär angeordnet ist. Mitunter wird auch ein fließender Übergang durch einen spiraligen Verlauf mit sich veränderndem Neigungswinkel beschrieben (Gebrane-Younes J et al., 1986). Die Media der Nabelvene wird ebenso kontrovers beschrieben.

Elektronenmikroskopisch sind in den Nabelgefäßen zwei unterschiedliche Zelltypen aufzufinden, nämlich ausdifferenzierte Muskelzellen mit zahlreichen Myofilamenten und Mikropinozytosevesikeln sowie Myofibroblasten, die nur einen geringen Myofilamentgehalt, aber einen hohen fibroblastenartigen Organellenreichtum aufweisen. Die glatten Muskelzellen stehen über zahlreiche Zytoplasmaausläufer miteinander in Kontakt (Sexton AJ et al, 1996).

Kollagene und elastische Fasern sind die Hauptbestandteile des interzellulären Bindegewebes der Nabelschnurgefäße. Die kollagenen Fasern umhüllen dabei die Muskelzellen (Scharl A, 1986). Die Lamina elastica interna wird zwar in der Vena umbilicalis, nicht aber in den Arteriae umbilicales ausgebildet (Scharl A, 1986), jedoch sind zwischen den einzelnen Muskelschichten elastische Fasern nachweisbar. Insgesamt finden sich in den Vasae umbilicales weniger elastische Fasern als in Arterien vergleichbarer Größe. Einige Autoren werten die Wharton-Sulze als Adventitia aller drei Gefäße (Di Naro E et al., 2001), andere beschreiben die separate Ausbildung der Adventitia, die sich durch einen höheren Zellgehalt von der Wharton-Sulze abgrenzen lässt (Zawisch C, 1955) und an der Vene schwächer als an den Arterien ausgeprägt ist.

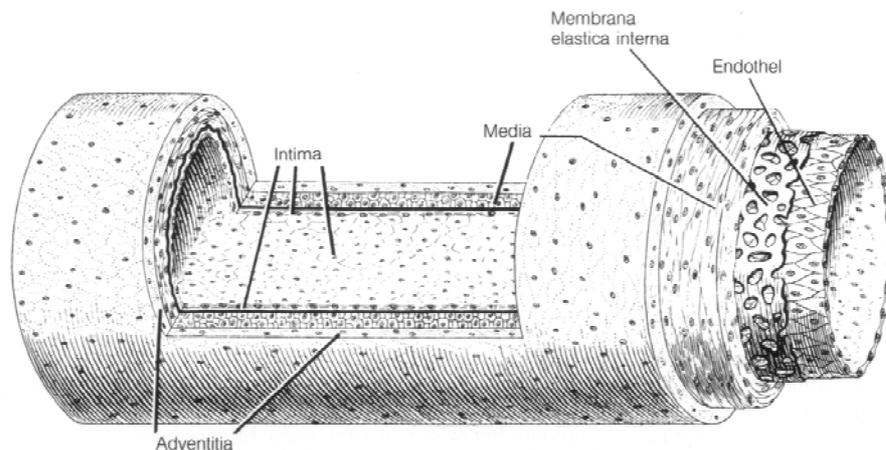


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer mittelgroßen muskulären Arterie mit ihren Schichten (Junqueira LC, Carneiro J, 1996)

1.4.3 Wharton-Sulze

Die weißliche Wharton-Sulze (WS), benannt nach ihrem Erstbeschreiber Thomas Wharton, ist das spezielle Bindegewebe der Nabelschnur und umgibt die Nabelschnurgefäße schützend. Sie

ist elastisch, komprimierbar und von gelatinöser Struktur (Tavian M et al., 1999; Nanaev AK et al., 1997). Außen ist sie von Amnionepithel überzogen.

Von Di Naro et al. (2001) wird die WS als einheitliches Gewebe beschrieben, das die Adventitia aller drei Gefäße bildet (Di Naro E et al., 2001). Sie besteht aus Zellen, Fasern und einer amorphen Grundsubstanz (Catini C, Gheri G, 1983; Nanaev AK et al., 1997), wobei sie relativ zellarm ist, sodass die Zellen voneinander separiert sind (Eyden BP et al., 1994). Die Zelldichte nimmt jedoch perivaskulär und nahe des Amnionepithels zu (Takechi K et al., 1993). Es handelt sich um Myofibroblasten, die neben den typischen Fibroblastenmerkmalen (stark entwickeltes RER, ausgeprägter Golgi-Apparat) Eigenschaften von Muskelzellen aufzeigen (laminin-positives Material an der Zelloberfläche, kontraktile Aktin-Filamente mit fokalen Verdichtungen, elongierter Kern mit Indentationen, Glykogenspeicherung). Sie sind sowohl zur Kontraktion als auch zur Synthese von EZM-Proteinen befähigt (Takechi K et al., 1993; Nanaev AK et al., 1997). Bemerkenswert ist, dass die perivaskulär gelegenen Zellen eher fibroblastenartigen Charakter haben, während die subamniotischen Zellen tendenziell myozytär sind.

Kollagene Faserbündel machen rund 50 % der WS aus (Takechi K et al., 1993; Nanaev AK et al., 1997; Vizza E et al., 1995) und durchziehen die Nabelschnur als zusammenhängendes Netzwerk. Sie sind längs, also in Zugrichtung orientiert und werden durch retikuläre Fasern vor Überdehnung geschützt. Es dominiert Kollagen Typ III, jedoch kommen auch Typ I, Typ IV und Typ V vor (Sobolewski K et al., 1997).

Ferner existieren faser- und zellfreie Räume, die mit amorpher Grundsubstanz ausgefüllt sind und zentral kanalikulären, peripher eher kavernösen Charakter haben. Außerdem werden ähnlich geartete perivaskuläre Räume beschrieben (Vizza E et al., 1995).

Eine wichtige Komponente der EZM der Nabelschnur bilden die Glukosaminoglykane, wobei die Hyaluronsäure am häufigsten vertreten ist (Catini C, Gheri G, 1983).

1.4.4 Amnionepithel

Das Nabelschnurepithel wird als Amnionepithel bezeichnet. Das anfangs flache Epithel ist bei Geburt kubisch bis hochprismatisch und verfügt über viele Mikrovilli (Sinha AA, 1971). Apikal sind Zonulae occludentes beschrieben, basal werden Hemidesmosomen zur Basalmembran ausgebildet. Die Zellen verfügen über Mitochondrien, ein leicht dilatiertes RER und Golgi-Komplexe. Im Laufe der Schwangerschaft kommt es zu einer Abnahme des Organellengehalts zu Gunsten der stärkeren Ausbildung von Filamenten. In gleichem Rahmen nimmt der Glykogengehalt der Zellen zu. Ferner ist die Expression von Cytokeratinen und Vimentin beschrieben (Kasper M et al., 1988).

Am fetalen Ende der Nabelschnur können kleine Epithelwucherungen (Plaques) auftreten, die nach apikal verhornen und in das Uteruslumen abschilfern (Benirschke K, Kaufmann P, 2000).

1.5 Ziel der Dissertation

Für die Untersuchung der erhöhten vaskulären Permeabilität, wie sie durch VEGF, aber auch andere Substanzen verursacht wird, stehen am Patienten die klinische Untersuchung, bildgebende Verfahren und die Erhebung laborchemischer Daten zur Verfügung. Eine exakte Quantifizierung des Ödems und Untersuchung der Signaltransduktionswege ist jedoch nur experimentell möglich. Zur Verfügung stehen hierfür verschiedene *in vivo*-Tiermodelle und *ex vivo*-Perfusionsmodelle einzelner Organe sowie die Zellkultur mit venösen Endothelzellen humaner Nabelschnüre (HUVEC) und anderen Endothelzelltypen. Die Untersuchung von strukturellen und quantitativen Veränderungen der extrazellulären Matrixproteine kann ebenfalls nur experimentell erfolgen.

Ein komplexes humanes Modell, welches das gesamte physiologische und morphologische Gefüge eines Gefäßes umfasst, steht derzeit nicht in ausreichender Menge zur Verfügung, da für molekularbiologische wie pharmakologische Untersuchungen und Analysen mitunter hohe Fallzahlen zur entsprechenden statistischen Absicherung der Ergebnisse benötigt werden. Zwar sind Untersuchungen an Endothelzellen in Kultur etabliert, die gewonnenen Ergebnisse bleiben aber auf Endothelzellen beschränkt. Im Vergleich dazu sind Tiermodelle deutlich komplexer, jedoch nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragbar.

Mit der Etablierung des Perfusionsmodells der humanen Nabelschnur wird die Komplexität eines vollständigen Gefäßes mit der besseren Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf den menschlichen Organismus verknüpft.

Ziel dieser Dissertationsschrift ist die Entwicklung eines neuen Perfusionsmodells der humanen Nabelschnur, das die Komplexität eines kompletten Gefäßes widerspiegelt.

Da an einem solchen *ex vivo*-Modell physiologische Konditionen simuliert und gezielt beeinflusst werden können, besteht die Möglichkeit, Tierversuche, die im Rahmen gefäßbiologischer oder pharmakologischer Studien durchgeführt werden, zu ersetzen und auch die mit Tierversuchen verbundenen Kosten zu reduzieren.

Ferner wird die Wirkung von VEGF₁₆₅ auf die vaskuläre Permeabilität der Arteria umbilicalis unter kontrollierten Bedingungen untersucht. Dem schließt sich die Analyse an, welchen Einfluss VEGF₁₆₅ auf Proteine der EZM und die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen an der humanen Arteria umbilicalis ausübt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Nabelschnur

Die verwendeten Nabelschnüre stammen aus den Kliniken für Geburtshilfe der Charité – Universitätsmedizin Berlin (Campus Benjamin Franklin und Campus Rudolph Virchow) und wurden mit Einverständnis der Mütter, des leitenden Arztes und der Hebammen zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Geräte

ASM555/OSM3 Analysesystem	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Durchlauferhitzer	Haake/Thermo Electron, Karlsruhe, Deutschland
Elektronenmikroskop EM10 A	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Färbekammer „feucht“	Eigenbau
Fotoapparat DSC-P92	Sony, Tokio, Japan
Gefrierschrank (-20 °C)	Linde, Bad Herfeld, Deutschland
Gefrierschrank Thermo Forma ULT (-80 °C)	Klatt, Berlin, Deutschland
Heiz-/Rührplatte Ika Combimag Ret	Janke & Kunkel, Staufen im Breisgau, Deutschland
Kolbenhubpipetten (versch. Volumina)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank Küleg 0-15 °C	Münchhoff, Berlin, Deutschland
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Leica EM TRIM	Leica Mikrosysteme, Wien, Österreich
Lichtmikroskop Axiophot	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Microm Färbeautomat HMS	Microm International, Walldorf, Deutschland
Robotstainer	
Microplate Reader Model 3550	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Mikrotom HM 355	Microm International, Walldorf, Deutschland
Mikrowelle MICROMAT	AEG, Zürich, Schweiz
Mini PROTEAN 3	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA

Mini Trans-Blot	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
OP-Instrumentarium	S&T, Neuhausen, Schweiz
OP-Mikroskop Type 355110	Wild, Heerbrugg, Schweiz
Histokinette-Einbett-Automat E7326	British American Optical Co., Bucks, England
Perfusionsapparat	Mediport Biotechnik, Berlin, Deutschland
Perfusionsbehälter	Bau gemäß eigener Konstruktionskizze
pH-Meter	Knick, Berlin, Deutschland
PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Rollenpumpe 505U	Watson Marlow, Falmouth, England
Saughilfen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Scanner GT 7000	EPSON, Meerbusch, Deutschland
Schüttler IKA-VIBRAX-VXR	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau, Deutschland
Thermometer	Haake/Thermo Electron, Karlsruhe, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischwaage 1602 MP	Satorius, Göttingen, Deutschland
ULTRACUT E	Reichert-Jung Optische Werke, Wien, Österreich
Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau, Deutschland
Videokamera 3CCD	Sony, Tokio, Japan
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Wärmeplatte	MEDAX Nagel, Kiel, Deutschland
Wärmeschrank (37 °C) UT6	Heraeus, Langenselbold, Deutschland
Wärmeschrank (60 °C)	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wärmeschrank (98 °C)	Memmert, Schwabach, Deutschland

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

DAKO PEN S2002	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Deckglaspinzette	VWR, Darmstadt, Deutschland
Disposable Scalpel No. 11	Feather Safety Co., Osaka, Japan
Dreivegehahn Discifix	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Elka Objektträger 2406	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, Deutschland

Flacheinbettungsgießform	Plano, Wetzlar, Deutschland
Gel-Blotting-Papier	Satorius, Göttingen, Deutschland
High-Flux Polysulphon Hemoflow F7	Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Deutschland
Polysulfone UF 6.4	Plano, Wetzlar, Deutschland
KODAK SO-163	VWR, Darmstadt, Deutschland
Kunststoffwanne	Plano, Wetzlar, Deutschland
Kupfer-Grids	Hellma, Müllheim, Deutschland
Küvetten Typ-Nr. 105.202-QS	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Nitrocellulose-Membran 0,45 µm	Mallinckrodt, Athlone, Irland
Paediatric Feeding Tube 5,0 Ch	Brand, Wertheim, Deutschland
Pasteurpipette	VWR, Darmstadt, Deutschland
Petrischale 120 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (versch. Größen)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen für Western Blot	Plano, Wetzlar, Deutschland
Rasierklinge (einkantig)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Vicryl 3-0 PS-2S	Baxter Healthcare Corporation, Renal Division, Illinois, USA
Schläuche INFUS	Nunc, Roskilde, Dänemark
96 Well-Platte 167008	

2.1.4 Gebrauchsfertige Kits

BC Assay UP40840A	Uptima, Interchim, Montluçon, Frankreich
Laminin Immunhistology Kit	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

2.1.5 Chemikalien

Acetat Puffer (2,5 mol/l, pH 5,0)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Aceton	J. T. Baker, Deventer, Holland
30 % Acrylamide/Bis Solution 37,5:1	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC)-Chromogen	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

3-Aminopropyl-Triethoxysilane	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
BCIP/NBT Solution UP099851	Uptima, Interchim, Montlucon, Frankreich
Bic 8,4 %	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Bleicitrat(II)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenol Blue	Biomol, Hamburg, Deutschland
BSA Standard for Protein Assay	Uptima, Interchim, Montlucon, Frankreich
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
3,3-Diaminobenzidin (DAB) Tabletten	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Eiweiß-Glycerin aus Hühnereiweiß	Waldeck, Münster, Deutschland
Entellan Schnelleindeckmittel	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Epon (Glycidether 100)	Plano, Wetzlar, Deutschland
Essigsäure	J. T. Baker, Deventer, Holland
Ethanol (versch. Konzentrationen)	J. T. Baker, Deventer, Holland
Evans Blau	Merck, Darmstadt, Deutschland
ExtrAvidin (Peroxidase Reagent)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Formvar 1 %	Plano, Wetzlar, Deutschland
25 % Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycine	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Goatserum (Ziegenserum)	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Hydrogen Peroxid (3 % H ₂ O ₂)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Kaisers Glyceringelatine Microscopy	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaleidoscope Prestained Standards	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Mayers Hematoxin Solution 0,1 %	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	J. T. Baker, Deventer, Holland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
0,9 % Natrium-Chlorid-Infusionslösung	Berlin-Chemie, Berlin, Deutschland
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Neoclear	Merck, Darmstadt, Deutschland
Osmiumtetroxid 2 %	Plano, Wetzlar, Deutschland
Paraffin Paraplast Plus	Sherwood Medical Company, Norfolk, Madison County, Nebraska, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland

Pepstatin A	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Phosphat-Buffered-Saline (PBS)	GIBCO™, Invitrogen, Paisley, UK
Phosphat-Buffered-Saline (PBS)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
0,2 M Phosphatpuffer	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Sirius-Rot F3BA	BDH Laboratory Supplies, Poole, England
Skim Milk Powder	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Styrol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Suprapur 30 % Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
SW 239 A	B. Braun, Melsungen, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamid)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Trizma Base	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Trizma-Hydrochlorid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin-EDTA (1x) in HBSS W/O	GIBCO™, Invitrogen, Paisley, UK
Tween 20	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Uranylacetat 1 % EM-Klasse	Plano, Wetzlar, Deutschland
VEGF ₁₆₅	Chemicon International, Temecula, California
Vulcite M2	Fina Europe, Brüssel, Belgien
Xylol	J. T. Baker, Deventer, Holland
Zitronensäuremonohydrat 99,5 % p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.6 Antikörper

Primärantikörper

Flk-1 (C-1158) Rabbit Polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA
Flt-1 (H-225) Rabbit Polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA
Integrin β_1 Mouse IgG	BD Transduction Laboratories, San Jose, California, USA

Monoclonal Anti- β -Actin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Monoclonal Mouse Anti-Human Collagen IV	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Monoclonal Mouse Anti Osteopontin MPIIB10	Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa, USA
Rabbit Anti-Laminin (L9393)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Rabbit Anti-Laminin (prediluted)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
VEGF (A-20) Rabbit Polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA

Sekundärantikörper

Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Polyclonal Swine Anti-Rabbit IgG/HRP	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Rabbit Anti-Mouse IgG/HRP	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Sheep Anti-Mouse IgG alkaline phosphatase conjugated	Chemicon International, Temecula, California, USA
Sheep Anti-Rabbit IgG alkaline phosphatase conjugated	Chemicon International, Temecula, California, USA

2.1.7 Lösungen und Puffer

Perfusat / Dialysat (pH 7,4)

57,1 ml SW 239 A (Saures Bicarbonat-Hämodialyse-Konzentrat)

70 ml Bic 8,4 % (Basisches Bicarbonat-Hämodialyse-Konzentrat 8,4%)

1872,3 ml Aqua bidest. (autoklaviert)

Karnowski-Lösung (pH 7,4)

15 ml 25 % Glutaraldehyd

45 ml 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4)

40 ml 3 % Paraformaldehyd

Methacarn

60 ml Methanol (100 %)
30 ml Chloroform (100 %)
10 ml Essigsäure (100 %)

Paraformaldehyd (3 %)

30 g Paraformaldehyd
1000 ml Aqua bidest.

0,01 M Citratpuffer (pH 6,0)

2,1 g Zitronensäuremonohydrat 99,5 % p.a. MW=210,14
1 l Aqua bidest.

AEC-Chromogen-Lösung

4 ml Aqua bidest.
2 Tropfen Acetat Puffer (2,5 mol/l, pH 5,0)
1 Tropfen 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC)-Chromogen
1 Tropfen Hydrogen Peroxid (3 % H₂O₂)

Lysis-Puffer (Herstellung auf Eis)

1 ml Triton X-100
0,5 ml 20 % Sodiumdodecylsulfat (SDS) MG=288,38
876 mg Natriumchlorid (NaCl)
5 ml 1 M Trizma-Hydrochlorid (pH 7,2) MW=157,6
Pepstatin A
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) MW=174,2

Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Lösung (20 %)

20 g SDS
100 ml Aqua bidest.

Stock-Solution Pepstatin A (Lagerung bei -20 °C)

1 mg Pepstatin A MW=685,9
1 ml Methanol

Stock-Solution Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Lagerung bei -20 °C)

0,1742 g Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) MW=174,2

10 ml Methanol

Proben-Puffer (pH 6,8)

10 g SDS MG=288,38

23,64 g Trizma-Hydrochlorid MW=157,6

25 ml Ethanol

38,9 mg Glycin MW=75,07

25 mg Bromphenol Blue

Aqua bidest. auffüllen auf 100 ml

Tris-Gel-Puffer für Laufgel (1 M, pH 8,8)

60,55 g Trizma Base MW=121,14

500 ml Aqua bidest.

Tris-Gel-Puffer für Sammelgel (1 M, pH 6,8)

78,8 g Trizma-Hydrochlorid MW=157,6

500 ml Aqua bidest.

Ammoniumpersulfat-Lösung (5 %)

25 mg Ammoniumpersulfat (APS) MW=228,2

500 µl Aqua bidest.

Lauf-Puffer

3 g Trizma Base MW=121,14

14,42 g Glycine MW=75,07

1 g SDS

Aqua bidest. auffüllen auf 1000 ml

Transfer-Puffer

5 g Trizma Base MW=121,14

24,5 g Glycine MW=75,07

100 ml Methanol

2000 ml Aqua bidest

Block-Puffer

50 g Skim Milk Powder

1 ml Tween 20

1000 ml PBS (Phosphate buffered Saline = phosphatgepufferte Salzlösung)

Tris-Puffer (pH 9,5)

5,85 g Natriumchlorid

12,11 g Trizma Base MW=121,14

10,17 g Magnesiumchlorid (MgCl₂)

Aqua bidest. Auffüllen auf 1000 ml

2.2 Methoden**2.2.1 Versuchsaufbau und -ablauf****2.2.1.1 Nabelschnur und Untersuchungsgruppen**

Einschlusskriterien für die Verwendung der Nabelschnur sind eine gesunde Mutter (keine Nebendiagnosen wie Hypertonie, Diabetes oder prädiabetische Stoffwechsellage, Präeklampsie oder Plazentainsuffizienz) und ein reifes (älter als 38. Schwangerschaftswoche), gesundes Neugeborenes (keine Fehlbildungen, keine Infektion), das via Sectio caesarea auf die Welt gebracht wurde. Eine grüne Verfärbung des Fruchtwassers als Zeichen des Abgangs von Mekonium (der in der Fetalperiode im Intestinum des Neugeborenen gebildete schwarz-grüne Darminhalt aus Darmepithelien, Fettsubstanzen, Schleim, Gallepigment, Verdauungsenzymen und verschluckten verhornenden Plattenepithelien und Lanugohaaren) durch oxidativen Stress oder eine intrauterine Infektion führt zum Ausschluss der Nabelschnur. Ebenso sind eine Gefäßverletzung (zum Beispiel nach Punktion zur Entnahme von Nabelschnurblut) oder -anomalie an der Nabelschnur selbst (beispielsweise eine singuläre Nabelschnurarterie) Ausschlusskriterien.

Ziel ist es, die Zahl der die fetoplazentare Perfusion beeinflussenden Faktoren weitestgehend zu vereinheitlichen.

Mit dem Abklemmen der Nabelschnur von Neugeborenem und Plazenta beginnt die warme Ischämiezeit (< 9 Minuten), die andauert bis die Nabelschnur in 2-3 °C kalte 0,9 % Natrium-

Chlorid-Lösung (0,9 % NaCl-Lösung) eingebracht wird. Ab diesem Zeitpunkt beginnt die kalte Ischämiezeit, in der der Transport der Nabelschnur in das Labor erfolgt.

Es werden

1. n=10 nicht-perfundierte Nabelschnüre (**0-Probe**), die als Kontrollen für den Zeitpunkt 0 dienen (n=20 bei der Wassergehaltsanalyse),
2. n=10 perfundierte Nabelschnüre ohne VEGF₁₆₅-Applikation (**-VEGF**) und
3. n=10 perfundierte Nabelschnüre mit VEGF₁₆₅-Applikation (**+VEGF**) untersucht.

2.2.1.2 Präparation

Vor der Präparation erfolgt die weitere Untersuchung der Nabelschnur. Sie muss frei von Gefäßanomalien oder -verletzungen, „falschen“ wie „echten“ Knoten und makroskopisch beurteilbarer Zysten sein. Im Folgenden werden 0-Proben (*prae perfusionem*) asserviert. Bei der Präparation wird ein 10 cm langes Perfusionssegment zugeschnitten. Unter dem OP-Mikroskop werden mittels mikrochirurgischen Operationsinstrumentariums an beiden Enden des Segmentes je eine Arteria umbilicalis und die Vena umbilicalis auf eine Länge von 3 mm freipräpariert. Im Anschluss werden Katheter (Paediatric Feeding Tube) in diese Gefäße eingeführt und durch Umschlingung mit chirurgischem Nahtmaterial (Vicryl 3-0) am jeweiligen Gefäß fixiert, sodass die Schnittstelle abgedichtet ist. Der Test auf Durchgängigkeit der Gefäße und Abdichtung der Schnittstelle erfolgt durch kurzes Anspülen mit 4 °C kalter 0,9 % NaCl - Lösung.

2.2.1.3 Applikation von Kontrollmedium und VEGF₁₆₅

Nach Präparation erfolgt die intraarterielle Applikation des frisch angesetzten Kontrollmediums aus 0,4 ml 0,9 % NaCl-Lösung und 0,2 ml Evans Blau (2 % verdünnt mit 0,9 % NaCl-Lösung) über den arteriellen Katheter (-VEGF). Dieser wird abgeklemmt, sodass die applizierte Lösung für 90 Minuten in der eigens konstruierten Perfusionskammer bei 37 °C inkubieren kann.

Die Effekte von VEGF₁₆₅ auf das Gefäß werden getestet, indem statt des Kontrollmediums eine frisch angesetzte Lösung mit einer effektiven Konzentration von 2 ng/ml VEGF₁₆₅ (Stock-Solution: 10 µg/ml angesetzt mit 0,9 % NaCl-Lösung) über den arteriellen Katheter appliziert wird (+VEGF). Im Anschluss beginnt die extrakorporale Perfusion.

2.2.1.4 Extrakorporale Perfusion

Der Perfusionsapparat besteht aus drei Teilkreisläufen: einem Perfusions-, einem Dialyse- und einem Wärmekreislauf.

Als Perfusat und Dialysat werden 2000 ml frisch angesetztes Human-Dialysat verwendet (1872,3 ml bidestilliertes und autoklaviertes Wasser, 57,1 ml saures Bicarbonat-Hämodialyse-Konzentrat (SW 239 A), 70 ml basisches Bicarbonat-Hämodialyse-Konzentrat (Bic 8,4 %)), das zuvor mit Salzsäure (HCl) bzw. Natronlauge (NaOH) auf einen pH-Wert von 7,4 titriert wird. Die Konzentration der Soluten ist im Folgenden aufgelistet (die Angaben in mmol beziehen sich auf jeweils 1000 ml): Na⁺ 140,00 mmol, K⁺ 2,00 mmol, Ca²⁺ 1,75 mmol, Mg²⁺ 0,75 mmol, Cl⁻ 112,00 mmol, HCO₃⁻ 32,00 mmol, NaHCO₃ 84,00 g, CH₃COO⁻ 3,00 mmol, Glucose 2,00 g.

Gemäß Protokoll enthält der Perfusionskreislauf 750 ml Dialysat, im Dialysekreislauf befinden sich 1250 ml des Dialysats.

Der Aufbau der Perfusionsapparatur ist der Abbildung Nr. 7 und der Abbildung Nr. 8 zu entnehmen. Der Aufbau der Perfusionskammer ist der Abbildung Nr. 5 und der Abbildung Nr. 6 zu entnehmen. Über Rollpumpe 1 wird das Perfusat aus dem venösen Reservoir in den Kapillardialysator (Hemoflow) geleitet, über den der Perfusions- und Dialysekreislauf miteinander verbunden sind. Er stellt den Beginn des arteriellen Schenkels dar. Während das Perfusat über die Dialysemembran (Oberfläche 1,6 m², Porengröße 5000 Dalton) fließt, findet der Gas-, Soluten- und Wärmeaustausch zwischen Dialysat und Perfusat bis zum Konzentrations- bzw. Gradientenausgleich im Sinne einer Oxygenierung und Normothermierung (37 °C) statt. Das aufbereitete Perfusat gelangt über Rollpumpe 2 zunächst in eine Luftfalle und dann in die Nabelschnurarterie. Unter Bildung eines arteriovenösen Shunts, der das Ende des arteriellen und den Beginn des venösen Schenkels darstellt, fließt das Perfusat über die Nabelschnurvene zurück in das venöse Reservoir, das derart gelagert ist, dass der Spiegel des Perfusats auf einer Ebene mit den Nabelschnurgefäßen liegt.

Der Wärmekreislauf dient, wie bereits erwähnt, der Erwärmung des Dialysats und der Perfusionskammer auf konstant 37 °C (Normothermie). In der Perfusionskammer selbst befindet sich in normothermer 0,9 % NaCl-Lösung die perfundierte Nabelschnur.

Direkt vor der Arteria umbilicalis wird der arterielle und unmittelbar vor der Vena umbilicalis wird der venöse Perfusionsdruck gemessen. Beide Drücke werden fortlaufend mittels Computer dokumentiert. Über die Größe des Flusses, der ebenfalls fortlaufend dokumentiert wird, wird der arterielle Mitteldruck reguliert, um ihn konstant bei 50 mmHg (+/- 3 mmHg) zu halten.

Die Temperatur wird im venösen Reservoir und in der Perfusionskammer fortlaufend gemessen und zum Perfusionsbeginn (Zeitpunkt 0), in der ersten Stunde alle 10 Minuten und danach stündlich protokolliert. Sie beträgt 37 °C (+/- 1 °C).

Die Bestimmung des Sauerstoffgehalts und der Solutenkonzentration im Perfusat erfolgt zum Zeitpunkt 0 sowie jede weitere Stunde mit dem ASM555/OSM3 Analysesystem.

Zum Zeitpunkt 0 befinden sich bereits 0,2 ml Evans Blau (Injektion vor Perfusionsbeginn) in der Arteria umbilicalis. Nach 1, 2 und 3 Stunden wird je 1 ml Evans Blau während der Perfusion über einen Dreiwegehahn in die Arterie injiziert.

Die Dauer der extrakorporalen Perfusion beträgt 4 Stunden.

Im Anschluss findet die Asservierung der Gewebeproben (*post perfusionem*) statt.

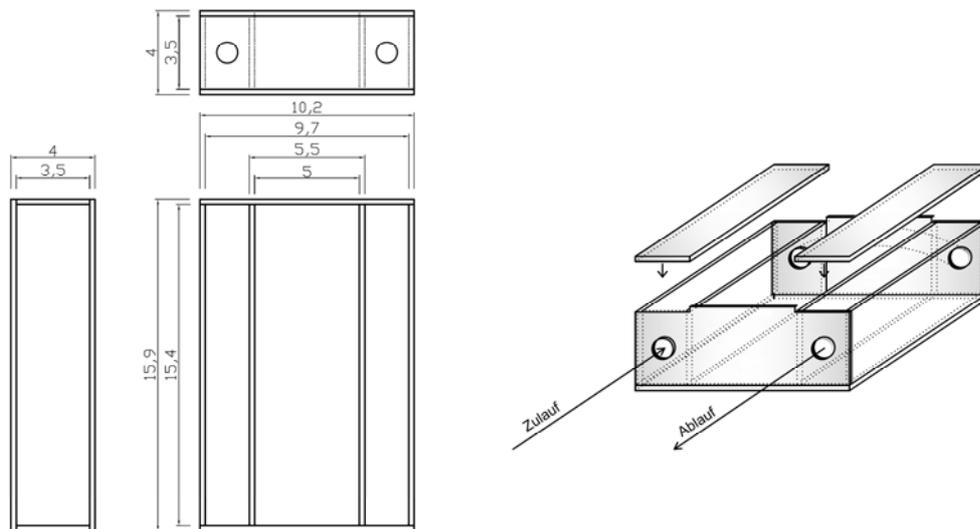


Abbildung 5: Konstruktionszeichnung der Perfusionskammer - Maßangaben in cm

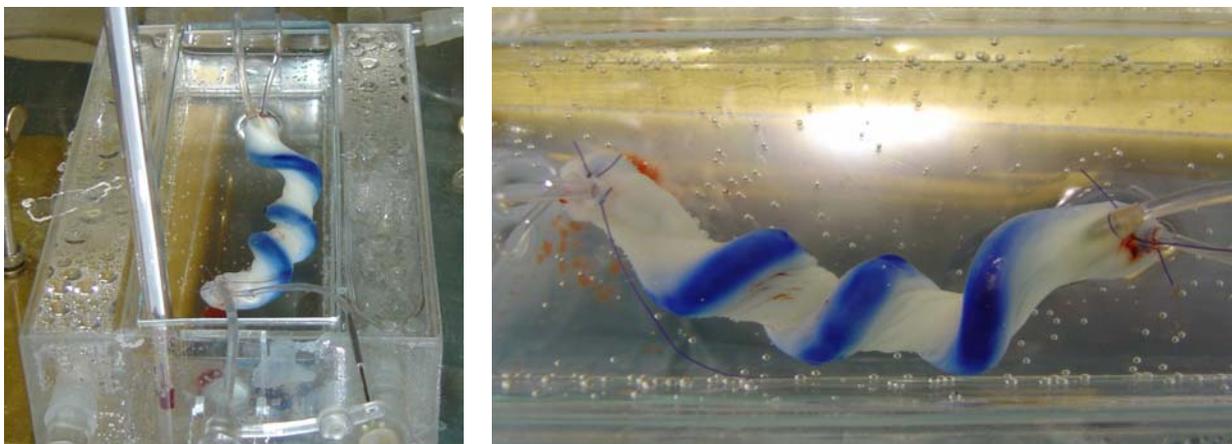


Abbildung 6: Foto der perfundierten Nabelschnur in der Perfusionskammer

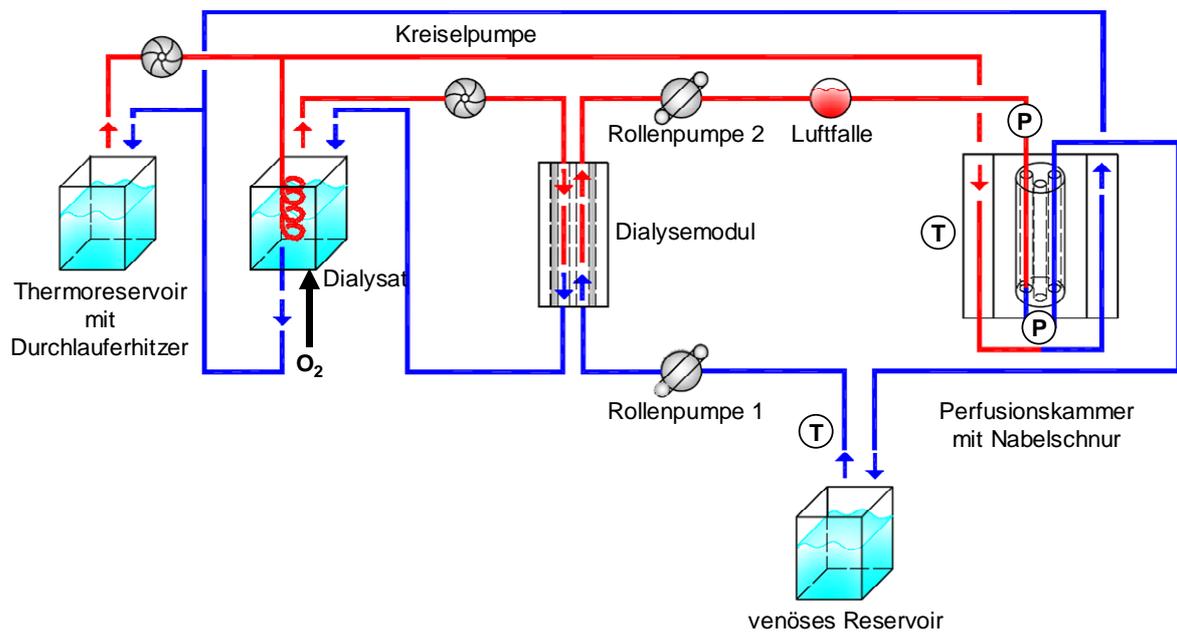


Abbildung 7: Schema des Aufbaus der Perfusionsapparatur
T: Temperaturmessung
P: Druckmessung



Abbildung 8: Foto der Perfusionsapparatur

2.2.1.5 Asservierung der Gewebeproben

Vor Beginn der Präparation der Arteria und der Vena umbilicalis werden etwa 1 cm dicke Segmente der Nabelschnur als Kontrolle für den Zeitpunkt 0 (0-Probe) entnommen. Für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wird die Probe in Methacarn fixiert, die Probe für die Analyse des Wassergehalts wird gewogen und für 24 Stunden bei 98 °C im Wärmeschrank getrocknet, die Fixierung der Probe für die elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgt in Karnowski-Lösung, nachdem die Arterie unter dem Operationsmikroskop unter Zuhilfenahme des mikrochirurgischen Operationsinstrumentariums aus der Wharton-Sulze herauspräpariert worden ist. Für die Proteinbestimmung mittels Western Blot wird die Arterie ebenfalls aus der Wharton-Sulze herauspräpariert, in einem Reaktionsgefäß der Firma Eppendorf in flüssigem Stickstoff schockgefroren (-195,79 °C) und bei -80 °C aufbewahrt.

Nach Abschluss des Versuches werden in Korrelation zu den 0-Proben entsprechend 1 cm dicke Segmente der Nabelschnur *post perfusionem* (-VEGF, +VEGF) asserviert. Das Methacarn-fixierte Präparat dient ferner der Ödembestimmung durch Extravasation des Farbstoffes Evans Blau

2.2.2 Untersuchungen

2.2.2.1 Histologie und indirekte Immunhistochemie

2.2.2.1.1 Vorbereitung der Gewebeproben

Fixierung

Um die Strukturen der Nabelschnur, insbesondere der Gefäße, möglichst natürlich in ihrer Architektur beurteilen zu können, wird je Versuch ein 1 cm langes Nabelschnursegment unbehandelt *prae perfusionem* (0-Probe) sowie ein ebenso langes Segment *post perfusionem* (-VEGF, +VEGF) über Nacht in frisch angesetzter Methacarn-Lösung (60 ml 100 % Methanol, 30 ml 100 % Chloroform, 10 ml 100 % Essigsäure) fixiert (Shibutani M et al., 2000).

Einbettung

Bevor die in Methacarn fixierten Nabelschnursegmente in dünnen Schnitten auf Objektträger gezogen werden können, erfolgt die Einbettung in Paraffin. Hierfür werden sie zunächst über Nacht in 80 % Ethanol gelegt, um mittels des Histokinette-Einbett-Automaten in einer aufsteigenden Ethanolreihe, Isopropanol, einer Intermediumlösung sowie dem 60 °C heißen Paraffin gemäß dem Standardprotokoll prozessiert zu werden: Je 120 Minuten 90 % Ethanol, 95 % Ethanol, zweimal 120 Minuten 100 % Ethanol, zweimal 90 Minuten 100 % Isopropanol, dreimal 180 Minuten Vulcite (Intermediumlösung), 300 Minuten Paraffin + Vulcite (1:1), 840 Minuten Paraffin.

Nach Lagerung des Segmentes in flüssigem Paraffin über Nacht wird es im Anschluss in 60 °C heißem Paraffin eingeblockt und nach der Abkühlung auf Raumtemperatur zur vollständigen Durchhärtung über Nacht bei -20 °C aufbewahrt. Danach werden sie bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Vorbehandlung der Objektträger

Um ein festes Haften der geschnittenen Präparate am Objektträger zu gewährleisten, müssen die Objektträger mit einem Adhaesivum vorbehandelt werden. Für die histologischen Standardfärbungen (Hämatoxylin-Eosin- und Sirius-Rot-Färbung), wird auf die Objektträger vor dem Aufziehen der Schnitte eine dünne Schicht Eiweiß-Glycerin aufgetragen.

Die Methode der Wahl für die immunhistochemischen Färbungen stellt die Behandlung mit APTS-Lösung (3-Aminopropyl-Triethoxysilane) dar. Hierzu werden die Objektträger gemäß Protokoll zunächst in einem Aceton-Bad gereinigt und entfettet (5 Minuten Aceton) und im Anschluss mit APTS-Lösung behandelt (5 Minuten 196 ml Aceton + 4 ml APTS) und gespült (zweimal je 5 Minuten Aqua bidest.).

Die Trocknung der silanisierten Objektträger erfolgt über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C.

Anfertigung von Paraffinschnitten

Die Schnitte werden mit einem Mikrotom angefertigt. Nachdem die Paraffinblöcke für 3 Minuten auf einem Bad flüssigen Stickstoffs gekühlt worden sind, um einen homogenen Schnitt zu gewährleisten, wird der Paraffin-Block in den Schlitten des Mikrotoms eingespannt und getrimmt. Sobald die geeignete Schnittebene erreicht ist, werden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, die in einem Warmwasserbad (37 °C) aufgefangen werden. Hier werden sie gestreckt, um glatt auf einen mit Eiweiß-Glycerin beschichteten Objektträger für die Standardfärbungen, beziehungsweise einen silanisierten Objektträger für die immunhistochemischen Färbungen aufgezogen werden zu können. Die aufgezogenen Schnitte werden zunächst auf einer Wärmeplatte (40 °C) vorgetrocknet. Anschließend werden sie im

Wärmeschrank über Nacht getrocknet (Schnitte für die Standardfärbungen bei 60 °C, Schnitte für immunhistochemische Färbungen bei 37 °C).

2.2.2.1.2 Histologie

Die Färbungen Hämatoxilin-Eosin (HE) und Sirius-Rot (SR) werden mit einem Färbeautomat gemäß den folgenden Protokollen durchgeführt.

Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Neoclear für 3 Minuten, absteigende Alkoholreihe (100 % Ethanol, 90 % Ethanol, 80 % Ethanol, 70 % Ethanol für je 5 Minuten), Spülen in Aqua bidest. für 3 Minuten, Aqua bidest. für 2 Minuten, Hämatoxilin-Lösung für 2 Minuten, Spülen in Aqua bidest. für 10 Minuten, Aqua bidest. für 2 Minuten, Eosin-Lösung für 8 Minuten, Aqua bidest. für 2 Minuten, aufsteigende Alkoholreihe (90 % Isopropanol für 2 Minuten, zweimal 95 % Isopropanol für je 3 Minuten, zweimal 100 % Isopropanol für je 5 Minuten), Neoclear für 30 Minuten.

Sirius-Rot-Färbung

Neoclear für 3 Minuten, absteigende Alkoholreihe (100 % Ethanol, 90 % Ethanol, 80 % Ethanol, 70 % Ethanol für je 5 Minuten), Spülen in Aqua bidest. für 3 Minuten, Aqua bidest. für 2 Minuten, Sirius-Rot F3BA für 60 Minuten, 0,01 molare HCl für 4 Minuten, aufsteigende Alkoholreihe (70 % Ethanol, 90 % Ethanol für je 3 Minuten, zweimal 95 % Isopropanol, zweimal 100 % Isopropanol für je 5 Minuten), Neoclear für 30 Minuten.

Im Anschluss werden die Präparate mit Entellan eingedeckelt, lichtmikroskopisch aufgenommen und mittels Videokamera digitalisiert.

2.2.2.1.3 Indirekte Immunhistochemie

Spezifische Antigene werden lichtmikroskopisch mittels indirekter Immunhistochemie nachgewiesen. Antikörper, die gegen das zu detektierende Antigen (z. B. Substruktur eines Proteins) gerichtet sind und an diesen Strukturen haften, werden als Primärantikörper bezeichnet. Bei der indirekten Immunhistochemie wird ein gegen den Primärantikörper gerichteter und enzymgekoppelter Sekundärantikörper verwendet, während bei der direkten

Immunhistochemie der Primärantikörper selbst enzymgekoppelt ist. Da der Sekundärantikörper an verschiedene Epitope des Primärantikörpers binden kann und somit die Bindung mehrerer Sekundärantikörper an einen Primärantikörper möglich ist, ist die indirekte immunhistochemische Methodik durch Amplifizierung der Färbung bei der Entwicklung deutlich sensitiver als die direkte Methodik. Die Entwicklung erfolgt durch enzymatische Umsetzung eines farblosen Substrates, das zu einem farbigen Niederschlag umgebaut wird und die Strukturen anfärbt, an die der Primärantikörper gebunden hat. (Noll S, Schaub-Kuhnen S, 2000)

Die Paraffinschnitte werden zur vollständigen Trocknung über Nacht bei 37 °C in einem Wärmeschrank gelagert, am nächsten Tag in einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils 10 Minuten lang: Xylol, 100 % Ethanol, 96 % Ethanol, 70 % Ethanol) entparaffiniert und dreimal mit PBS gewaschen und rehydriert. Anschließend werden sie 10 Minuten lang in Aceton bei -20 °C nachfixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Um zu gewährleisten, dass sich die in den folgenden Schritten auf das Präparat pipettierten Flüssigkeiten nicht auf dem gesamten Objektträger verteilen und somit verdünnt werden, wird das Präparat nach der Entparaffinierung mit einem DAKO PEN umrandet.

Da die zu detektierenden Antigene teilweise durch Proteinvernetzung infolge der Fixierung und Einbettung in ihrer dreidimensionalen Struktur verändert und somit für den Antikörper nicht mehr erkennbar - maskiert - sind, müssen die antigenen Epitope entweder enzym- oder hitze-induziert oder durch Kombination beider Methoden demaskiert werden. Für die enzym-induzierte Demaskierung werden die Schnitte 20 Minuten lang mit Trypsin inkubiert. Nach der Inkubation werden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Für die hitze-induzierte Demaskierung werden die Schnitte in der Mikrowelle, vollständig von Citratpuffer bedeckt, 20 Minuten lang gekocht.

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur und dreimaligem Waschen in PBS werden die Schnitte 30 Minuten lang mit Ziegenerum (Konzentration 1:100) inkubiert. Auf diese Weise werden elektrostatische Ladungen der Proteine abgesättigt, hydrophobe Bindungen blockiert und damit die unspezifische Bindung der Antikörper mit konsekutiver falsch-positiver Anfärbung verhindert.

Das Serum wird abgekippt und die Schnitte werden mit dem zuvor mit PBS verdünnten Primärantikörper beschichtet; Konzentration und Inkubationszeit sind antikörperspezifisch und der Tabelle Nr. 1 zu entnehmen. Nach der Inkubationszeit erfolgt ein dreimaliges Waschen mit PBS.

Hinsichtlich des weiteren Procedere werden zwei unterschiedliche in dieser Dissertation verwendete Sekundärantikörper unterschieden.

1. HRP (Horseradish Peroxidase)-gekoppelte Sekundärantikörper:

Bei Verwendung eines gegen den Primärantikörper gerichteten, HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers wird das Präparat für 60 Minuten mit diesem inkubiert. Die Konzentration ist antikörperspezifisch und in der Tabelle Nr.2 aufgeführt. Die Verdünnung erfolgt mit PBS. Nachdem der überschüssige Sekundärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt worden ist, erfolgt die fünfminütige Entwicklung mit 40 ml 3,3-Diaminobenzidin (DAB)-Entwicklungslösung (10 mg DAB = 1 Tablette gelöst in 20 ml PBS) und 800 µl 30 % H₂O₂-Lösung (100 µl 30 % H₂O₂ verdünnt in 10 ml PBS) je Küvette. Das durch die Horseradish Peroxidase enzymatisch umgesetzte Farbprodukt, das an Bindungsstellen des Primärantikörpers sichtbar wird, ist von braunem Kolorit.

Nach fließender Wässerung mit Aqua dest. für 5 Minuten zur vollständigen Entfernung des Entwicklungssubstrates erfolgt die blaue Gegenfärbung der Zellkerne für 2 Minuten mit Mayer's Hämatoxilin, das zuvor im Verhältnis 1:5 mit sterilem Aqua bidest. verdünnt worden ist.

Um das überschüssige Hämatoxilin zu eliminieren, werden die Schnitte erneut für 5 Minuten mit Aqua dest. fließend gewässert. Im Anschluss an die folgende Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 1 Minute lang: 70 % Ethanol, 96 % Ethanol, 100 % Ethanol, 5 Minuten: Xylol) werden die Präparate mit Entellan eingebettet.

2. HRP-gekoppelte, biotinylierte Sekundärantikörper:

Bei Verwendung eines gegen den Primärantikörper gerichteten HRP-gekoppelten, biotinylierten Sekundärantikörpers wird das Präparat für 20 Minuten mit diesem inkubiert. Es handelt sich um einen mit PBS bereits vorverdünnten Antikörper (siehe Tabelle Nr. 2). Nach dreimaligem Waschen mit PBS wird auf das Präparat für weitere 20 Minuten Avidin gekoppelte Peroxidase (Peroxidase Reagent) gegeben, die bereits mit PBS vorverdünnt ist. Durch die Affinität von Streptavidin (aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliertes tetrameres Glykoprotein) zu Biotin (Vitamin B7, Vitamin H) bilden sich Streptavidin-Biotin-Enzymkomplexe. Nachdem die Präparate dreimal mit PBS gewaschen worden sind, erfolgt zur Entwicklung die Inkubation mit AEC-Chromogen-Lösung direkt auf dem Präparat. Die Inkubation findet unter mikroskopischer Kontrolle statt und dauert 18 Minuten.

Nach fließender Wässerung für 5 Minuten mit Aqua dest. zur vollständigen Entfernung des Entwicklungssubstrates erfolgt die blaue Gegenfärbung der Zellkerne für 2 Minuten mit Mayer's Hämatoxilin, das zuvor im Verhältnis 1:5 mit sterilem Aqua bidest. verdünnt worden ist.

Um das überschüssige Hämatoxin zu eliminieren, werden die Schnitte erneut für 5 Minuten mit Aqua dest. fließend gewässert. Abschließend werden die Schnitte mit Kaiser's Glyceringelatine eingebettet.

Um die Spezifität der indirekten immunhistochemischen Färbung zu kontrollieren, wird für jedes Präparat eine Negativkontrolle angefertigt, die das gesamte Färbungsprotokoll parallel zu den zu untersuchenden Schnitten durchläuft, ohne jedoch mit dem antigenspezifischen Primärantikörper inkubiert zu werden. Demzufolge ist jedes Farbsignal in der Negativkontrolle auf eine unspezifische Reaktion zurückzuführen, die korrigiert werden muss.

Grundsätzlich findet jede Inkubation in einer feuchten Kammer statt, das bedeutet bei gesättigter Luftfeuchtigkeit und ohne Lichtexposition, um zu verhindern, dass die Schnitte austrocknen.

Primärantikörper	Demaskierung	Konzentration	Inkubationsdauer	Sekundärantikörper
Flk-1 (C-1158) Rabbit Polyclonal IgG	Citratpuffer	1:50	120 Minuten	Polyclonal Swine Anti-Rabbit IgG/HRP
Flt-1 (H-225) Rabbit Polyclonal IgG	Citratpuffer	1:50	120 Minuten	Polyclonal Swine Anti-Rabbit IgG/HRP
Monoclonal Mouse Anti-Human Collagen IV Rabbit Anti-Laminin (prediluted)	Trypsin + Citratpuffer	1:50	60 Minuten	Rabbit Anti-Mouse IgG/HRP
Monoclonal Mouse Anti-Osteopontin MPIIB10	Trypsin + Citratpuffer	vorverdünnt (prediluted)	60 Minuten	Polyclonal Swine Anti-Rabbit IgG/HRP
VEGF (A-20) Rabbit Polyclonal IgG	Trypsin + Citratpuffer	1:50	120 Minuten	Rabbit Anti-Mouse IgG/HRP
	Citratpuffer	1:200	120 Minuten	Goat-Anti-Rabbit IgG (biotinyliert)

Tabelle 1: Übersicht der Primärantikörper und der entsprechenden Demaskierungsmaßnahmen, Konzentrationen, Inkubationsdauer und verwendeten Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Konzentration	Inkubationsdauer	Peroxidase Reagenz	Entwicklung
Goat-Anti-Rabbit IgG (biotinyliert)	vorverdünnt (prediluted)	20 Minuten	vorverdünnt (prediluted)	AEC
Rabbit Anti-Mouse IgG/HRP	1:40	60 Minuten	0	DAB
Polyclonal Swine Anti-Rabbit IgG/HRP	1:50	60 Minuten	0	DAB

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper und der entsprechenden Konzentrationen, Inkubationsdauer und Entwicklungssubstrate

2.2.2.1.4 Bildanalyse der immunhistochemischen Färbungen

Um die morphologischen Veränderungen semiquantitativ beurteilen zu können, werden die immunhistochemisch gefärbten Präparate bildanalytisch ausgewertet.

Kollagen Typ IV, Laminin, Osteopontin

In den Nabelschnurperfusionsgruppen -VEGF und +VEGF wird in jedem Schnitt das perfundierte Gefäß unter dem Lichtmikroskop (Vergrößerung 200x) aufgesucht. In der Gruppe 0-Probe wird zufällig eine der beiden Nabelschnurarterien gewählt. Für die Auswertung dieser immunhistochemischen Färbungen werden 10 Gesichtsfelder zufällig ausgewählt, mit einer Videokamera digitalisiert und unter Verwendung des Bildanalyseprogramms Scion Image (Version 1.63 Mac Os, Scion Corporation, Washington D.C., USA) semiquantitativ ausgewertet. Hierfür wird zunächst die Farb- in eine Schwarz-Weiß-Aufnahme umgewandelt. Durch Justierung eines Schwellenwertes (Threshold) werden die in der Farbaufnahme angefärbten Areale geschwärzt, während nicht-angefärbte Areale weiß bleiben. Die geschwärzte Fläche wird in Relation zur Gesamtfläche der Aufnahme (75286,74 μm^2) gesetzt.

Flk-1, Flt-1, VEGF

Die Aufnahme findet bei diesen immunhistochemischen Färbungen mit 400x Vergrößerung statt. Die Umwandlung in eine Schwarz-Weiß-Aufnahme sowie die Justierung eines Schwellenwertes entfallen. Die Schichtdicke der immunhistochemisch angefärbten Areale wird unter Verwendung des Bildanalyseprogramms Scion Image direkt gemessen.

Diese Analyse wird von zwei unabhängigen Untersuchern durchgeführt, die hinsichtlich der Gruppenzugehörigkeit der einzelnen Präparate geblindet sind.

2.2.2.2 Gelelektrophorese und Western Blot

Um die mittels Immunhistochemie gewonnenen Daten zu verifizieren, werden definierte Proteinmengen nach Extraktion aus den Segmenten der Nabelschnurarterien mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf einen Trägerfilter übertragen. Da die Antigene der immobilisierten Proteine noch ihre Immunreaktivität besitzen, können sie mit Hilfe von Antikörpern und Enzymsubstraten qualitativ und semiquantitativ bestimmt werden; das bedeutet, dass Daten zu Mengenverhältnissen der Proteine, jedoch keine Daten zur Gesamtproteinkonzentration erhoben werden können. In Korrelation zur

immunhistochemischen Untersuchung handelt es sich um eine indirekte Immunmarkierung; der Primärantikörper ist gegen das zu detektierende Antigen, der markierte Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper gerichtet.

2.2.2.2.1 Vorbereitung der Proben

Protein-Extraktion

Um aus den 1 cm langen Segmenten der präparierten Nabelschnurarterien aller drei Gruppen (0-Probe, -VEGF, +VEGF) eine lösliche Proteinfraction zu extrahieren, werden sie zunächst in je 1 ml eisgekühltem Lysis-Puffer mittels Ultra-Turrax unter ständiger Kühlung für 30 Minuten homogenisiert und lysiert, das heißt, dass die Zellmembranen aufgeschlossen werden. Die dabei freiwerdenden Proteasen, die den Nachweis der Proteine durch deren Destruktion qualitativ und quantitativ beeinträchtigen, werden durch die Zugabe von 10 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 5 µl Pepstatin A je Milliliter Lysis-Puffer inhibiert. Die Homogenate werden für 30 Minuten bei 4 °C mit 10.000 U/Min. zentrifugiert. Die Überstände können bis zur weiteren Verarbeitung nach Überführung in Eppendorf-Reaktionsgefäße bei -80 °C gelagert werden. Die Pellets werden verworfen.

Gesamtproteinbestimmung und Konzentrationsangleichung

Die Konzentrationsbestimmung des Gesamtproteins erfolgt kolorimetrisch mit dem BC Assay-Kit UP40840A. Von der Proteinfraction einer jeden Gewebeprobe werden 10 µl mit 200 µl Bestimmungsreagenz (bestehend aus 196 µl Reagenz A und 4 µl Reagenz B) in je ein Well einer auf Eis stehenden 96 Well-Platte pipettiert. Als Referenzwert werden je 10 µl einer Standardverdünnungsreihe (S₁ 2000 µg/ml, S₂ 1000 µg/ml, S₃ 500 µg/ml, S₄ 250 µg/ml, S₅ 125 µg/ml, S₆ 62,5 µg/ml, S₇ 31,25 µg/ml) aus bovinem Serumalbumin (BSA), als Nullwert (Blank) werden 10 µl Lysis-Puffer mit 200 µl Bestimmungsreagenz eingesetzt. Um Pipettier- und Messfehler auszugleichen, erfolgt die Proteinbestimmung einer jeden Probe im Dreifachansatz. Das Pipettieren erfolgt zügig, um Unterschiede der Reaktionszeiten gering zu halten. Darauf wird die 96 Well-Platte abgedeckt, 30 Sekunden geschüttelt und 30 Minuten bei 60 °C im Wärmeschrank inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, werden die Proben anschließend 5 Minuten im Kühlschrank bei 4 °C abgekühlt. Die Messung der Extinktion von Proben, Standards und Nullwert erfolgt bei einer Wellenlänge von 540 nm photometrisch im Microplate Reader. Die Auswertungssoftware Mikroplate Manager PC (Version 4.0, Bio-Rad Laboratories,

Hercules, California, USA) errechnet anhand der Kurve der Extinktionswerte der definierten Standards die jeweilige Gesamtproteinkonzentration der Proben. Nach Kontrolle der Standardabweichung der Dreifachansätze wird der Mittelwert als Gesamtproteinkonzentration der Konzentrationsangleichung zugrunde gelegt.

Die anschließende Reduzierung der Proteinfractionen dient der Spaltung von Disulfidbindungen, um die Bindungsstellen den Antikörpern frei zugänglich zu machen. Hierzu wird in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß je 1 ml Proteinsuspension mit 250 µl Proben-Puffer und 62,5 µl 2-Mercaptoethanol versetzt und für 15 Minuten im Thermomixer bei 95 °C denaturiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur können die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt werden.

Um bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese gleiche Probenvolumina auftragen zu können, werden die unterschiedlichen Gesamtproteinkonzentrationen der einzelnen Proben mit Lysis-Puffer gemäß der folgenden Formel auf eine einheitliche Gesamtproteinkonzentration eingestellt, wobei der Wert in den eckigen Klammern dem benötigten Volumen der einzelnen Proteinsuspension entspricht:

$$V_{LP} [ml] = V_{Ziel} [ml] - \left[V_{Ziel} [ml] \times \left(\frac{K_{Ziel} [mg/ml]}{K_{Ausgang} [mg/ml]} \right) \right]$$

V_{LP} :	Zur Angleichung benötigtes Volumen Lysis-Puffer
V_{Ziel} :	Zielvolumen der Proteinsuspension
K_{Ziel} :	Einheitliche Konzentration der Proteine nach Angleichung
$K_{Ausgang}$:	Proteinkonzentration der jeweiligen Probe

2.2.2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der Proteine wird das Mini-PROTEAN 3-System verwendet, Aufbau und Verwendung der Apparatur erfolgen gemäß der Angabe des Herstellers. Das Verfahren wird als SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) bezeichnet. Nachdem die Glasplatten mit 80 % Ethanol gereinigt worden sind, werden sie in einem Abstand von 0,75 mm, der durch die Spacer gehalten wird, zusammengesetzt. Je nach Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins wird ein Laufgel mit unterschiedlicher Dichte verwendet: Proteine mit kleinem Molekulargewicht erfordern ein tendenziell dichtes Polyacrylamidgel und *vice versa*. Für die Detektion von β_1 -Integrin, FLK-1, FLT-1, Kollagen Typ IV, Laminin und Osteopontin wird ein

7,5 % Laufgel verwendet, die Proteine β -Actin und VEGF werden in einem 10 % Laufgel detektiert. Nach dem Ansetzen der Laufgel-Lösung (Zusammensetzung siehe Tabelle Nr. 3) werden je Gel 100 μ l einer 5 % APS-Lösung und 10 μ l TEMED als Polymerisationsbeschleuniger hinzu gegeben. Die Lösung wird mit einer Pasteurpipette zwischen die Glasplatten gefüllt und mit einer 1:1 Mischung aus Isopropanol und Aqua bidest. überschichtet, um eine ebene Oberfläche zu erhalten. Nach der Polymerisation (30 Minuten) wird die überschichtende Flüssigkeit abgegossen. Die Laufgeloberfläche wird mit Aqua bidest. gespült, kurz getrocknet und mit der Sammelgel-Lösung (Herstellung siehe Tabelle Nr. 3) nach Zugabe der Polymerisationsbeschleuniger überschichtet. Der 15 Slots umfassende Gelkamm wird eingesetzt und nach der Polymerisation (30 Minuten) entfernt.

Anschließend werden die Slots mit Lauf-Puffer gespült, die Elektrophoreseeinheit wird gemäß Herstellerangaben zusammengesetzt, obere und untere Pufferkammer werden mit Lauf-Puffer gefüllt und in den ersten Slot werden 10 μ l eines Markers gegeben, der aus einer definierten Mischung farblich markierter Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts besteht. Auf diese Weise lassen sich die Qualität von Elektrophorese und Transfer beurteilen sowie das Molekulargewicht der detektierten Banden abschätzen. Die übrigen Slots werden mit je 10 μ l Proteinextrakt gefüllt.

Nach Auftragen der Proben werden über eine Spannungsquelle für 15 Minuten konstant 80 Volt angelegt, um die Proben an dem Übergang zwischen Sammel- und Laufgel auf ein Niveau zu bringen. Dann werden für weitere 60 Minuten konstant 120 Volt angelegt.

Bestandteil	Laufgel		Sammelgel
	7,5 %	10 %	4 %
30 % Acrylamid [ml]	2,5	3,3	0,67
Tris-Gel-Puffer [ml]	2,5 (pH 8,8)	2,5 (pH 8,8)	1,25 (pH 6,8)
20 % SDS [ml]	50	50	25
Aqua bidest. [ml]	4,85	4,05	3
5 % APS [μ l]	100	100	50
TEMED [μ l]	10	10	10

Tabelle 3: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele; Mengenangaben für jeweils zwei Gele

2.2.2.2.3 Western Blot

Nach Abschluss der Elektrophorese werden die Glasplatten samt Spacer entfernt, das Sammelgel wird abgeschnitten und verworfen. Für die Übertragung und Fixierung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose wird das Mini Trans-Blot-System verwendet. Das Laufgel wird in einer mit Transfer-Puffer gefüllten Wanne vorsichtig mittels Deckglaspinzetten auf Gel-Blotting-Papier gezogen und luftblasenfrei mit einer Nitrocellulose-Membran bedeckt. Ein weiteres Gel-Blotting-Papier schützt die Membran vor etwaiger Beschädigung. Filter, Gel und Membran werden zwischen zwei Fiber-Pads in der Gelhalter-Kassette fixiert und im Mini Trans-Blot-Modul mit Transfer-Puffer überschichtet. Der Transfer der Proteine vom Laufgel auf die Nitrocellulose-Membran dauert bei konstant 120 Volt zweimal 30 Minuten. Der durch die hohe Stromstärke entstehenden Wärmeentwicklung wirkt ein in das System eingebrachter Kühlakku entgegen.

2.2.2.2.4 Immunmarkierung

Nach Abschluss des Transfers wird die Nitrocellulose-Membran aus der Gelhalter-Kassette genommen und zur Absättigung unspezifischer Bindungen über Nacht bei 4 °C in Block-Puffer inkubiert.

Der Primärantikörper zur Markierung des zu detektierenden Antigens wird mit Block-Puffer verdünnt (Verdünnungen sind Tabelle Nr. 4 zu entnehmen), die Nitrocellulose-Membran wird in eine Petrischale überführt und mit dem verdünnten Primärantikörper knapp bedeckt. Die Inkubation dauert bei Raumtemperatur 120 Minuten, Schwenkbewegungen mit einem Schüttler gewährleisten eine gleichmäßige Verteilung des Antikörpers. Im Anschluss wird die Membran dreimal jeweils 10 Minuten mit Block-Puffer unter Schwenkbewegungen gewaschen.

Der gegen den Primärantikörper gerichtete, mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Sekundärantikörper (siehe Tabelle Nr. 4) wird mit Block-Puffer 1:5000 verdünnt und auf die Nitrocellulose-Membranen gegeben. Für monoklonale in der Maus produzierte Primärantikörper wird ein entsprechender gegen Mausantigene gerichteter Sekundärantikörper, für polyklonale im Kaninchen entwickelte Primärantikörper wird ein gegen Kaninchenantigene gerichteter Sekundärantikörper verwendet. Die Inkubation auf dem Schüttler dauert bei Raumtemperatur 60 Minuten. Anschließend wird die Membran dreimal jeweils 10 Minuten mit Tris-Puffer unter Schwenkbewegungen gewaschen.

Nach Zugabe des Entwicklers BCIP/NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphat und Nitroblautetrazolium) werden die Banden durch das enzymatisch umgesetzte Farbprodukt

sichtbar. Die Entwicklung erfolgt lichtgeschützt auf dem Schüttler bis die Bandenfärbung die gewünschte Intensität erreicht hat.

Nach Abschluss der Entwicklung wird der Entwickler durch fließende Wässerung der Membranen mit Aqua bidest. abgewaschen, um ein weiteres Nachdunkeln zu verhindern. Im Folgenden werden die Membranen lichtgeschützt bei Raumtemperatur auf einem Filterpapier getrocknet.

Primärantikörper	Konzentration	Sekundärantikörper
Monoclonal Anti- β -Actin	1:1000	Sheep Anti-Mouse IgG
Integrin β_1 Mouse IgG	1:1000	Sheep Anti-Mouse IgG
Flk-1 (C-1158) Rabbit Polyclonal IgG	1:1000	Sheep Anti-Rabbit IgG
Flt-1 (H-225) Rabbit Polyclonal IgG	1:500	Sheep Anti-Rabbit IgG
Monoclonal Mouse Anti-Human Collagen IV	1:1000	Sheep Anti-Mouse IgG
Rabbit Anti-Laminin	1:500	Sheep Anti-Rabbit IgG
Monoclonal Mouse Anti Osteopontin MPIIB10	1:500	Sheep Anti-Mouse IgG
VEGF (A-20) Rabbit Polyclonal IgG	1:1000	Sheep Anti-Rabbit IgG

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Primärantikörper mit Konzentrationen und verwendeten Sekundärantikörper

2.2.2.2.5 Densitometrische Auswertung

Um Veränderungen des spezifischen Proteingehalts semiquantitativ beurteilen zu können, werden die getrockneten Nitrocellulose-Membranen mit einem Scanner digitalisiert und mit dem Programm AIDA (Aida Advanced Image Data Analyser, Version 2.11, Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt, Deutschland) densitometrisch ausgewertet. Hierzu werden gleichgroße Messfelder über die einzelnen Banden gelegt und die Hintergrundfärbung wird von dem Integral der einzelnen Farbflächen und -intensitäten abgezogen, die zueinander in Relation gesetzt werden (Integral-Bkg [%]).

2.2.2.3 Transmissionselektronenmikroskopie

2.2.2.3.1 Vorbereitung der Gewebeproben

Fixierung der Gewebeproben

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wird die Nabelschnurarterie sowohl in nativem Zustand als auch *post perfusionem* unter dem Operationsmikroskop unter Zuhilfenahme des mikrochirurgischen Operationsinstrumentariums aus der Wharton-Sulze eines 1 cm dicken Segments herauspräpariert und in frisch angesetzter, gekühlter Karnowski-Lösung über Nacht fixiert.

Einbettung der Gewebeproben

Nach Abnahme des Fixans wird das Gewebe für dreimal 15 Minuten in PBS (0,1 molar) gespült. Zur Kontrastierung wird die Nabelschnurarterie mit 2 ml einer frisch angesetzten Lösung aus 2 % Osmiumtetroxid und PBS (0,2 molar) im Verhältnis 1:1 für 2 Stunden beschichtet, um Lipid- und Proteinstrukturen elektronenmikroskopisch sichtbar zu machen. Nach Abnahme der Osmiumtetroxid-Lösung erfolgt eine erneute dreimalige Spülung mit PBS (0,1 molar) für jeweils 15 Minuten. Der Entwässerung des Gewebes in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 10 Minuten 30 % Ethanol und 50 % Ethanol, zweimal 20 Minuten 70 % Ethanol, 10 Minuten 90 % Ethanol, dreimal 20 Minuten 100 % Ethanol) schließt sich die Beschichtung der Nabelschnurarterie mit der Intermediumslösung Styrol für 15 Minuten, mit einer Mischung aus Epon und Styrol im Verhältnis 1:1 für 24 Stunden und mit reinem Epon für weitere 24 Stunden an. Das Gewebe wird in eine Flacheinbettungsgießform gegeben, zur Vermeidung von Luftblasen für 1 Stunde mit Epon beschichtet und im Folgenden für 72 Stunden im Wärmeschrank bei 60 °C bis zur vollständigen Polymerisation des Epons gelagert.

Vorbereitung der Objektträger

Um ein festes Haften und gerades Aufliegen der geschnittenen Präparate auf dem Kupfernetz (Grid) zu gewährleisten, müssen die Kupfer-Grids mit einem dünnen Film eines Elektronenstrahl-durchlässigen Adhäsivums überzogen werden, das gleichzeitig den Schnitt stabilisiert.

Die Methode der Wahl ist die Beschichtung der Kupfer-Grids mit Formvar. Gereinigte Objektträger werden luftblasenfrei in die gefilterte 1 % Formvar-Lösung gegeben, die darauf langsam ablaufen muss bis ein silber-grauer Film entsteht. Randständiges Formvar wird mit einer Rasierklinge entfernt. Der Formvar-Film wird im Folgenden durch Eintauchen in Aqua bidest. vom Objektträger gelöst. Die Kupfer-Grids werden auf den abgelösten Formvar-Film

gelegt, wieder aufgenommen und bis zur vollständigen Trocknung bei Raumtemperatur gelagert.

Anfertigung transmissionselektronenmikroskopischer Schnitte

Der fertige Epon-Block wird mit einer Rasierklinge zugeschnitten und mit der Fräse Leica EM TRIM getrimmt, bis die zu untersuchende Ebene erreicht ist. Die elektronenmikroskopischen Schnitte des in Epon eingebetteten Gewebes werden mit dem Mikrotom ULTRACUT E zunächst als lichtmikroskopisch beurteilbarer Dickschnitt (5 µm) und anschließend als Dünnschnitt (50 nm) angefertigt. Der Dünnschnitt wird auf einem Wasserbad aufgefangen und auf einem mit Formvar beschichteten Kupfer-Grid aufgezogen. Die aufgezogenen Schnitte werden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Nachkontrastierung transmissionselektronenmikroskopischer Schnitte

Um eine detaillierte Darstellung der morphologischen Verhältnisse bei der elektronenmikroskopischen Aufnahme zu erhalten, wird der aufgezogene Schnitt nachkontrastiert.

Der Schnitt wird für 15 Minuten mit einer 1 % Uranylacetat-Lösung beschichtet, zweimal in gefiltertem Aqua bidest. gespült und darauf bis zur völligen Trocknung staubfrei verwahrt. Anschließend wird er für 5 Minuten mit Bleicitrat beschichtet, erneut zweimal in gefiltertem Aqua bidest. gespült und vor der elektronenmikroskopischen Untersuchung für mindestens einen Tag unter staubfreien Kautelen getrocknet.

2.2.2.3.2 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme

Die Probenschnitte werden mit einem Transmissionselektronenmikroskop beurteilt und auf einen speziellen EM-Film für die Transmissionselektronenmikroskopie aufgenommen. Nach dessen Entwicklung werden die Bilder via Scanner digitalisiert und mit dem Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop CS2 (Adobe Photoshop CS2, Version 9.0, Adobe Systems, San Jose, California, USA) nachkontrastiert.

2.2.2.4 Wassergehaltsanalyse

Für die Bestimmung des Ödems wird der Wassergehalt der Nabelschnur *prae* und *post perfusionem* gemessen.

Ein 1 cm dickes Nabelschnursegment wird gewogen (Nassgewicht), daraufhin für 24 Stunden bei 95 °C im Wärmeschrank getrocknet und unmittelbar danach erneut gewogen (Trockengewicht). Die Berechnung des Wassergehaltes des Segmentes erfolgt anhand nachgestellter Formel:

$$\text{Wassergehalt [\%]} = \frac{(\text{Nassgewicht [g]} - \text{Trockengewicht [g]}) \times 100}{\text{Nassgewicht [g]}}$$

Die Werte des Wassergehaltes werden sowohl für die mit VEGF₁₆₅-behandelten Nabelschnüre, als auch für die Kontrollgruppe erhoben, jeweils *prae perfusionem* als Ausgangswert der Nativprobe zur internen Kontrolle und *post perfusionem*.

2.2.2.5 Ödembestimmung durch Evans Blau-Extravasation

Die Extravasation des *prae perfusionem* und *inter perfusionem* stündlich applizierten Farbstoffes Evans Blau ist ein Maß für die Permeabilität der Arteria umbilicalis und somit für die Messung des Ödems geeignet.

Nach Asservierung, Fixierung, Einbettung in Paraffin und Trimmen der Paraffin-Blöcke werden die perfundierten Nabelschnursegmente im Nahaufnahme-Modus mit der Digitalkamera DSC-P92 fotografiert. Der Präparat-Objektiv-Abstand beträgt 12 cm.

Um Veränderungen der Farbstoffextravasation zu quantifizieren, wird die Fläche des blauen Farbstoffes umfahren und unter Verwendung des zuvor geeichten Bildanalyseprogramms Scion Image (Version 1,63 Mac Os, Scion Corporation, Washington D.C., USA) ausgewertet.

Diese Analyse wird von zwei unabhängigen Untersuchern durchgeführt, die hinsichtlich der Gruppenzugehörigkeit der einzelnen Aufnahmen geblindet sind.

2.2.3 Statistik

Zur statistischen Auswertung werden die durch die beschriebenen Untersuchungsmethoden erhobenen Einzelwerte der jeweiligen Versuchsgruppe (0-Probe, -VEGF, +VEGF) zugeordnet. Im Folgenden werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung errechnet.

Die Durchführung eines statistischen Lagetests ermöglicht den Vergleich der Versuchsgruppen. Die Überprüfung der Einzelwerte auf das Vorliegen einer Normalverteilung ist der geringen Fallzahl je Gruppe ($n=10$) wegen nicht möglich. Der Wertebereich realer Daten ist in der Natur stets beschränkt und besteht dementsprechend aus endlich vielen diskreten Werten. Dies widerspricht der Normalverteilungsannahme (Trampisch HJ et al., 2000), sodass gefolgert werden darf, dass Normalverteilungen in der Natur nicht vorkommen.

Für den Vergleich von jeweils zwei unabhängigen Stichproben wird als nichtparametrisches Verfahren der U-Test nach Mann und Whitney (Mann HB, Whitney DR, 1947) durchgeführt. Um den Einfluss der Perfusion *per se* zu untersuchen, wird die perfundierte, unbehandelte Gruppe -VEGF mit der Kontrollgruppe 0-Probe verglichen; der Einfluss von VEGF₁₆₅ wird durch Vergleich der unbehandelten Gruppen 0-Probe und -VEGF mit der behandelten Gruppe +VEGF untersucht.

Anhand der Berechnung der Überschreitungswahrscheinlichkeiten (p-Wert) soll statistisch gezeigt werden, wie signifikant sich die verglichenen Untersuchungsgruppen voneinander unterscheiden. Eine statistische Signifikanz wird akzeptiert, wenn bei einer angenommenen Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$ der p-Wert $< 0,05$ ist. Da bei der Western Blot-Analyse die Fallzahl je Gruppe $n = 4$ ist, wird auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Für die Berechnung der arithmetischen Mittelwerte und der jeweiligen Standardabweichungen sowie für den statistischen Lagetest wird das Programm SPSS für Windows (Version 11.5, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) verwendet. Die grafischen Darstellungen der Einzelwerte als vertical points-scatter plots werden mit dem Programm SigmaPlot für Windows (Version 8.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Modell

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung eines Perfusionsmodells der humanen Nabelschnur. Dieses Modell ermöglicht die Homöostase physiologischer Parameter wie Temperatur, pH-Wert, Sauerstoff-Partialdruck (pO_2), Kohlenstoffdioxid-Partialdruck (pCO_2), sowie die Aufrechterhaltung der Konzentrationen von Bikarbonat, Kalium, Kalzium und Natrium während der 90 Minuten Inkubations-/Adaptationszeit und der 4 Stunden dauernden Perfusionsperiode. Nach anfänglicher Adaptation an den arteriellen Fluss und Perfusionsdruck am Startzeitpunkt der Perfusion (Zeitpunkt 0) bleiben alle Parameter für die gesamte Dauer des Experiments innerhalb der physiologischen Schwankungsbreite konstant.

Den Abbildungen Nr. 9 und Nr. 10 ist zu entnehmen, dass dieses Modell darüber hinaus durch einen nach Adaptationszeit konstanten arteriellen Perfusionsdruck und arteriellen Fluss charakterisiert ist. In diesem Experiment steht der arterielle Perfusionsdruck im Vordergrund. Dessen Konstanz ist durch Regulation des arteriellen Flusses gewährleistet. Dies ist für die Untersuchung des interstitiellen Ödems von erheblicher Bedeutung, da unter anderem die Differenz zwischen intravasalem und interstitiellem Druck die Größe des Ödems mitbestimmt.

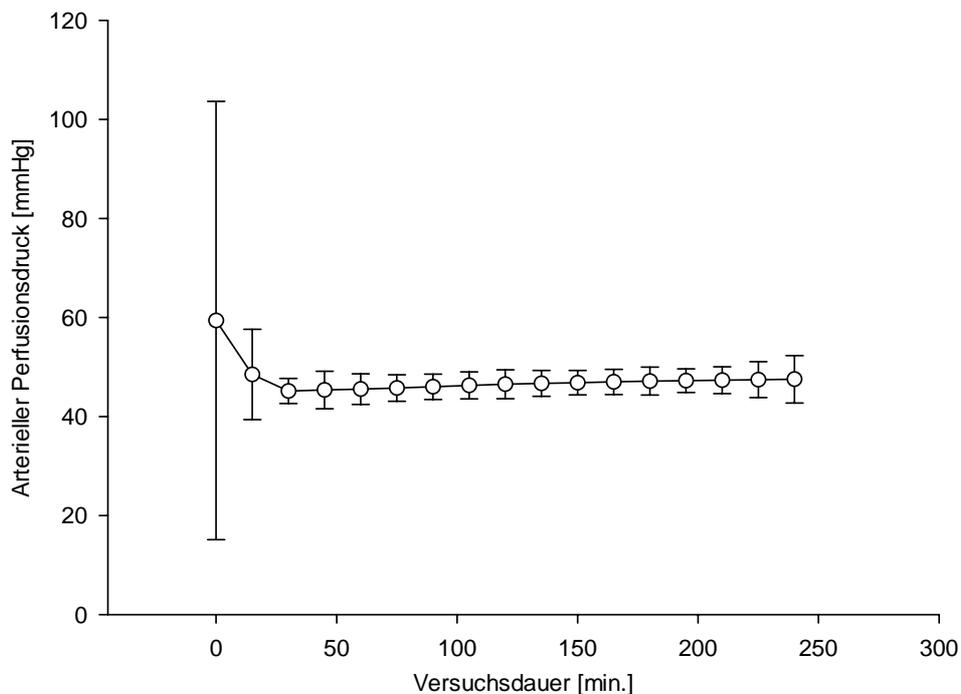


Abbildung 9: Grafische Darstellung des arteriellen Perfusionsdrucks [mmHg] während des Versuches

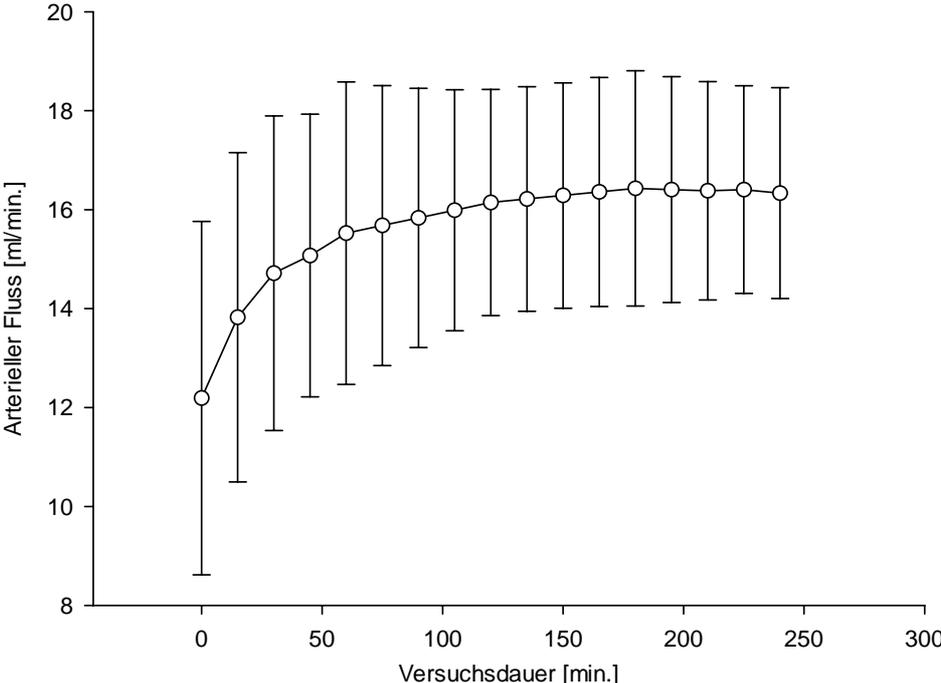


Abbildung 10: Grafische Darstellung des arteriellen Flusses [ml/min.] während des Versuches

3.2 Wassergehaltsanalyse

Für die quantitative Analyse des Wassergehalts werden in der nichtperfundierten Kontrollgruppe 0-Probe $n = 20$ Nabelschnursegmente, in den perfundierten Gruppen -VEGF und +VEGF jeweils $n = 10$ Nabelschnursegmente getestet.

Die Analyse des Wassergehalts zeigt einen Anstieg des Wassergehalts in den 4 Stunden perfundierten Nabelschnursegmenten gegenüber den nichtperfundierten Segmenten. Der Mittelwert der nichtperfundierten Kontrollgruppe 0-Probe beträgt $91,37\% \pm 1,22\%$, der Mittelwert der perfundierten Kontrollgruppe -VEGF liegt bei $93,18\% \pm 0,91\%$ und in der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF findet sich ein mittlerer Wassergehalt von $93,67\% \pm 1,05\%$.

Diese Zunahme ist sowohl im Vergleich der nichtperfundierten (0-Probe) mit der perfundierten Kontrollgruppe (-VEGF) mit $p = 0,001$, als auch im Vergleich der nichtperfundierten (0-Probe) mit der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe (+VEGF) mit $p < 0,001$ signifikant.

Die Applikation von VEGF₁₆₅ zeigt im Vergleich der 4 Stunden perfundierten Gruppen -VEGF und +VEGF einen leichten Anstieg des Wassergehalts, der jedoch mit $p = 0,406$ nicht signifikant ist.

Gruppe	Wassergehalt	
	MW	St. Abw.
0-Probe	91,3715	1,2181
-VEGF	93,1806	0,9097
+VEGF	93,6680	1,0507

Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Wassergehaltsanalyse mit Angabe der Mittelwerte in % (MW) und der Standardabweichung (St. Abw.)

Gruppe	0-Probe	-VEGF
-VEGF	0,001	
+VEGF	<0,001	0,406

Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der statistischen Auswertung der Wassergehaltsanalyse. Nichtparametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte ($p=$); Signifikanz bei $p < 0,05$.

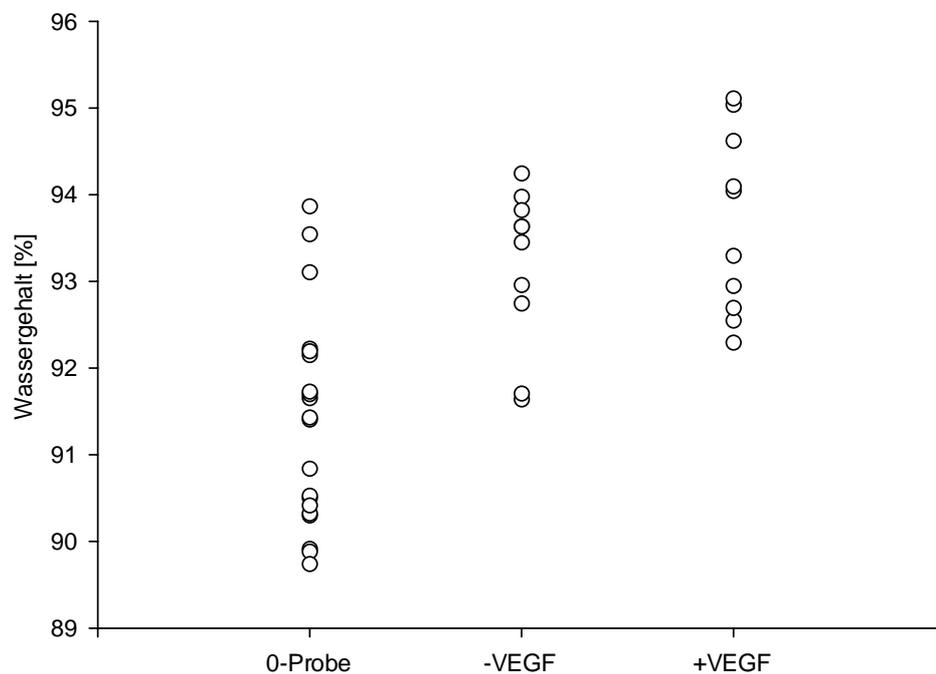


Abbildung 11: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Wassergehaltsanalyse - Einzelwerte

3.3 Ödembestimmung durch Evans Blau-Extravasation

Für die Größenbestimmung des interstitiellen Ödems durch Evans Blau-Extravasation werden in den perfundierten Gruppen -VEGF und +VEGF jeweils $n = 10$ Nabelschnursegmente getestet.

Die Bestimmung der Größe des interstitiellen Ödems erfolgt durch die Visualisierung der Extravasation des Farbstoffes Evans Blau.

Es zeigt sich eine deutliche Zunahme des Ödems durch Behandlung mit VEGF₁₆₅. Das Areal des über dem Nabelschnurquerschnitt bestimmten Farbstoffes Evans Blau hat eine mittlere Größe von $0,21 \text{ cm}^2 \pm 0,15 \text{ cm}^2$ in der 4 Stunden perfundierten Kontrollgruppe -VEGF, der Mittelwert der 4 Stunden perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF beträgt $0,37 \text{ cm}^2 \pm 0,1 \text{ cm}^2$. Diese Differenz ist mit $p = 0,018$ signifikant.

Gruppe	Evans Blau-Extravasationsareal	
	MW	St. Abw.
-VEGF	0,2100	0,1488
+VEGF	0,3695	0,1019

Tabelle 7: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Evans Blau-Extravasation mit Angabe der Mittelwerte in cm^2 (MW) und der Standardabweichung (St. Abw.)

Gruppe	-VEGF	+VEGF
+VEGF	0,018	

Tabelle 8: Tabellarische Darstellung der statistischen Auswertung der Evans Blau-Extravasation. Nichtparametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte ($p=$); Signifikanz bei $p < 0,05$.

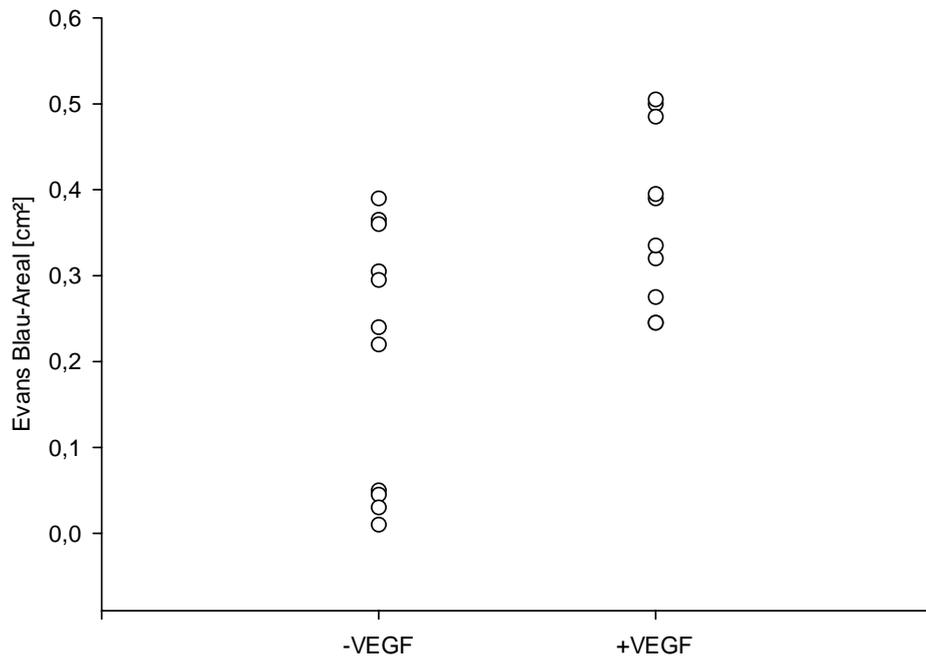


Abbildung 12: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Evans Blau-Extravasation - Einzelwerte

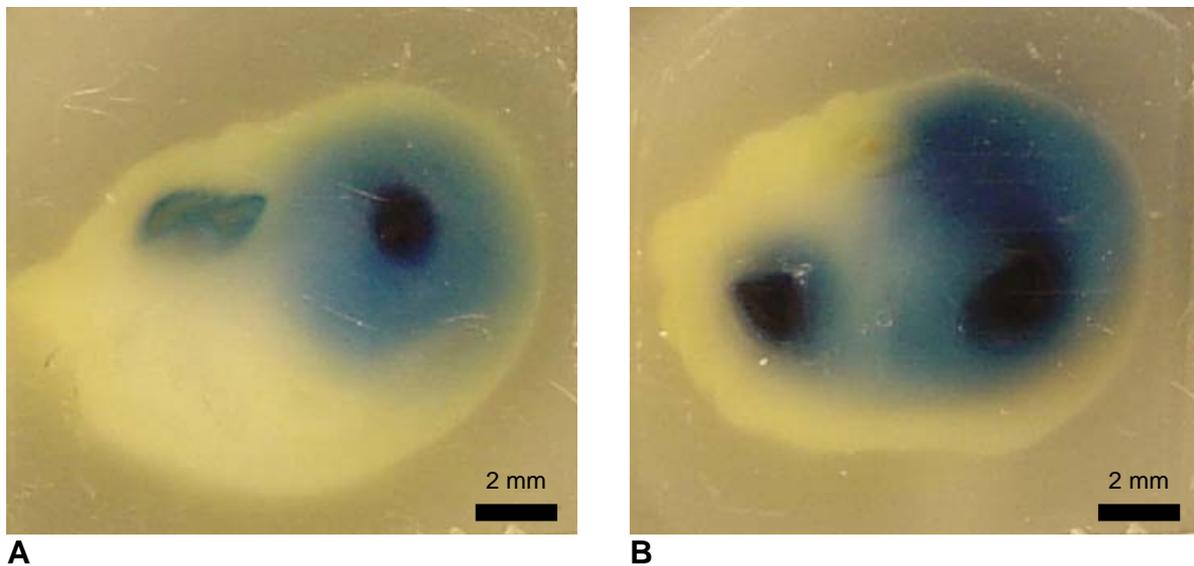


Abbildung 13: Fotografische Aufnahme der Evans Blau-Farbstoffextravasation. (nach Perfusion, Fixierung und Einbettung)
A: Perfundierte, unbehandelte Kontrollgruppe (-VEGF)
B: 4 Stunden Perfusion mit Applikation von VEGF(+VEGF)

3.4 Morphologie

3.4.1 Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxilin-Eosin-Färbung zeigt eine normale Gefäßmorphologie der Nabelschnurarterie in allen Gruppen. Die Struktur der Wharton-Sulze ist im Vergleich der nichtperfundierten Kontrollgruppe 0-Probe mit den 4 Stunden perfundierten Gruppen -VEGF und +VEGF nicht verändert. Auch die Behandlung mit VEGF₁₆₅ zeigt im Vergleich der perfundierten Kontrollgruppe -VEGF mit der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF keinen Effekt auf die Wharton-Sulze.

Die Media präsentiert sich bei der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF gegenüber den Kontrollgruppen 0-Probe und -VEGF dicker.

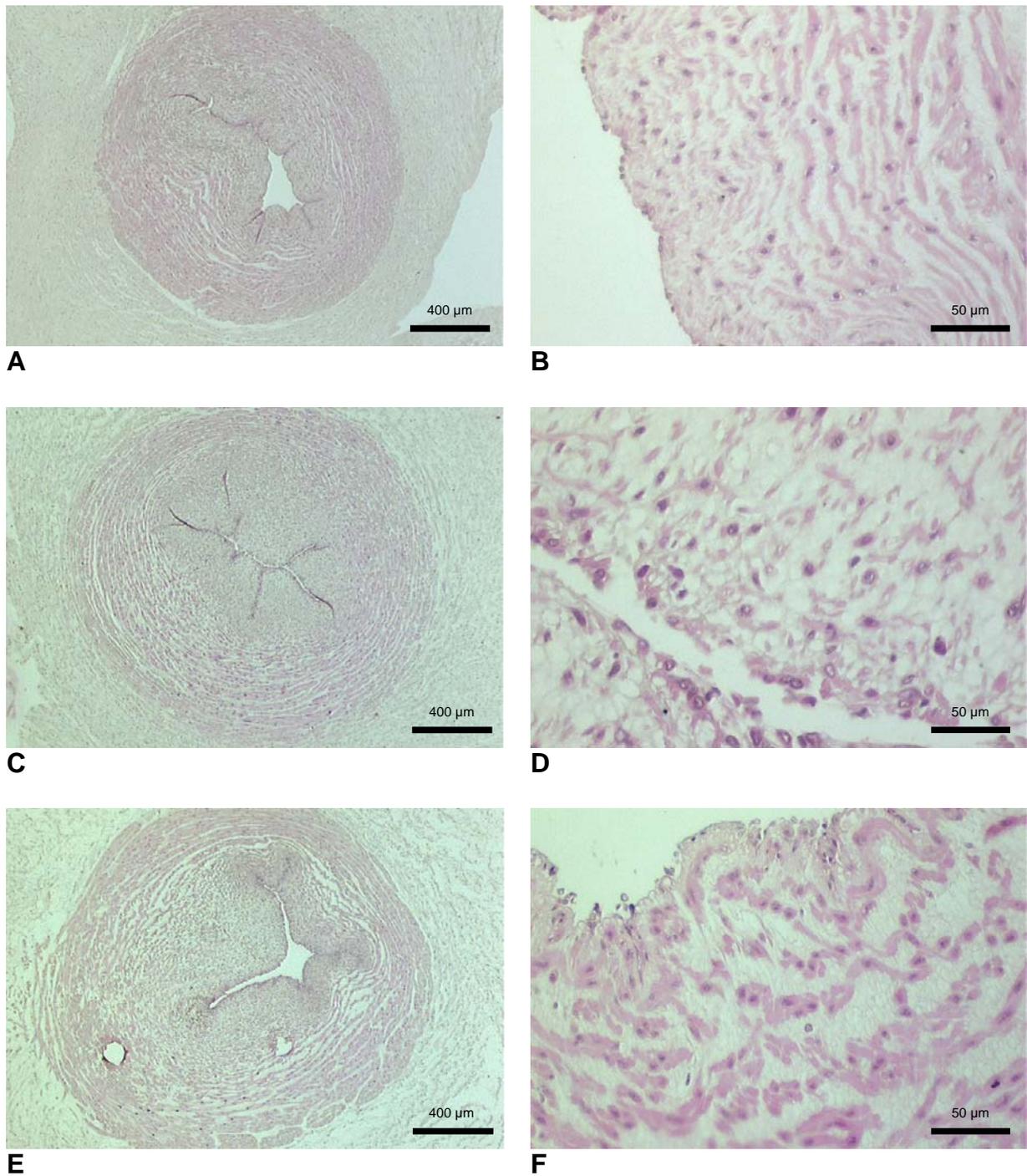


Abbildung 14: Mikroskopische Aufnahme der Hämatoxylin-Eosin-Färbung
A-B: Nichtperfundierte, unbehandelte Kontrollgruppe (0-Probe)
C-D: Perfundierte, unbehandelte Kontrollgruppe (-VEGF)
E-F: Perfundierte, VEGF₁₆₅-behandelte Gruppe (+VEGF)

3.4.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen des Endothels der Arteria umbilicalis zeigen in allen drei Gruppen eine normale Zellmorphologie. Die Nuclei sind groß und leicht gelappt; sie besitzen wenig kernmembrannah angeordnetes verdichtetes Heterochromatin, ein Zeichen für die hohe metabolische Aktivität. Auch Zeichen für Apoptose, wie Chromatinkondensation, Apoptosekörperchen und Integritätsverlust der Membranen sind in keiner der Gruppen zu erkennen. Zwischen den Zellen bestehen zahlreiche Zellkontakte.

Während sich die nichtperfundierte (0-Probe) und perfundierte (-VEGF) Kontrollgruppe morphologisch nicht voneinander unterscheiden, sind bei der mit VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF deutliche Aufweitungen der Interzellularräume zu dokumentieren. Darüber hinaus steigen Größe und Zahl intrazellulärer Vesikel massiv an.

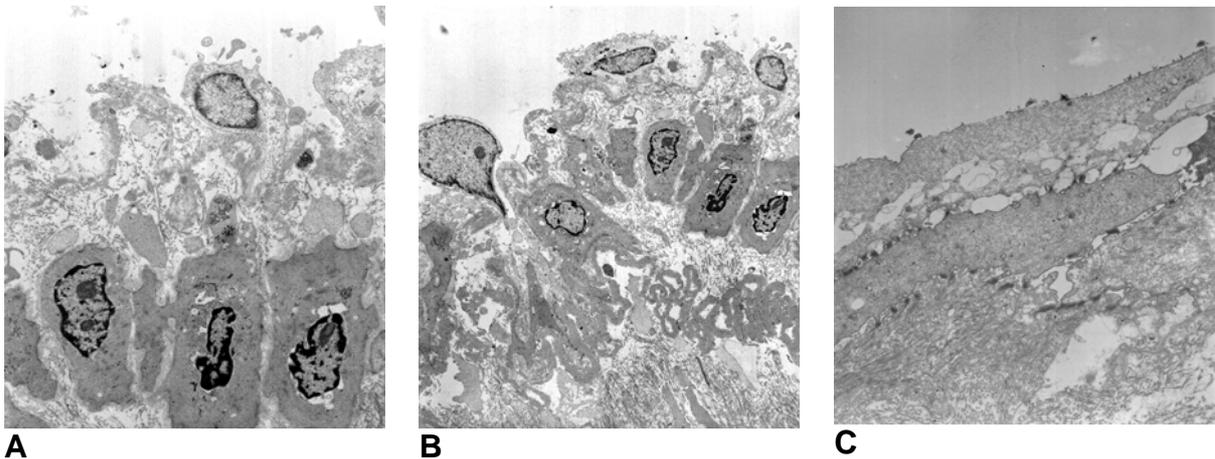


Abbildung 15: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme des Endothels
A: Nichtperfundierte, unbehandelte Kontrollgruppe (0-Probe)
B: Perfundierte, unbehandelte Kontrollgruppe (-VEGF)
C: Perfundierte, VEGF₁₆₅-behandelte Gruppe (+VEGF)

3.4.3 Sirius-Rot-Färbung und Polarisationsmikroskopie

Die Sirius-Rot-Färbung nach Junqueira et al. (1978) zeigt eine normale Gefäßmorphologie der Nabelschnurarterie in allen Gruppen.

Durch die mikroskopische Aufnahme mit Polarisationslicht ist eine Differenzierung der Kollagentypen I und III möglich. Kollagen Typ I besitzt unter polarisiertem Licht eine gelbe bis rötliche Färbung, während sich Kollagen Typ III mit grünlicher Färbung präsentiert. Hier zeigt sich ein klarer Anstieg von Kollagen Typ III nach Applikation von VEGF₁₆₅ in der behandelten Gruppe +VEGF gegenüber den unbehandelten Kontrollgruppen 0-Probe und -VEGF. Die Wharton-Sulze weist beide Typen von Kollagen auf mit identischem Verteilungsmuster in allen Gruppen.

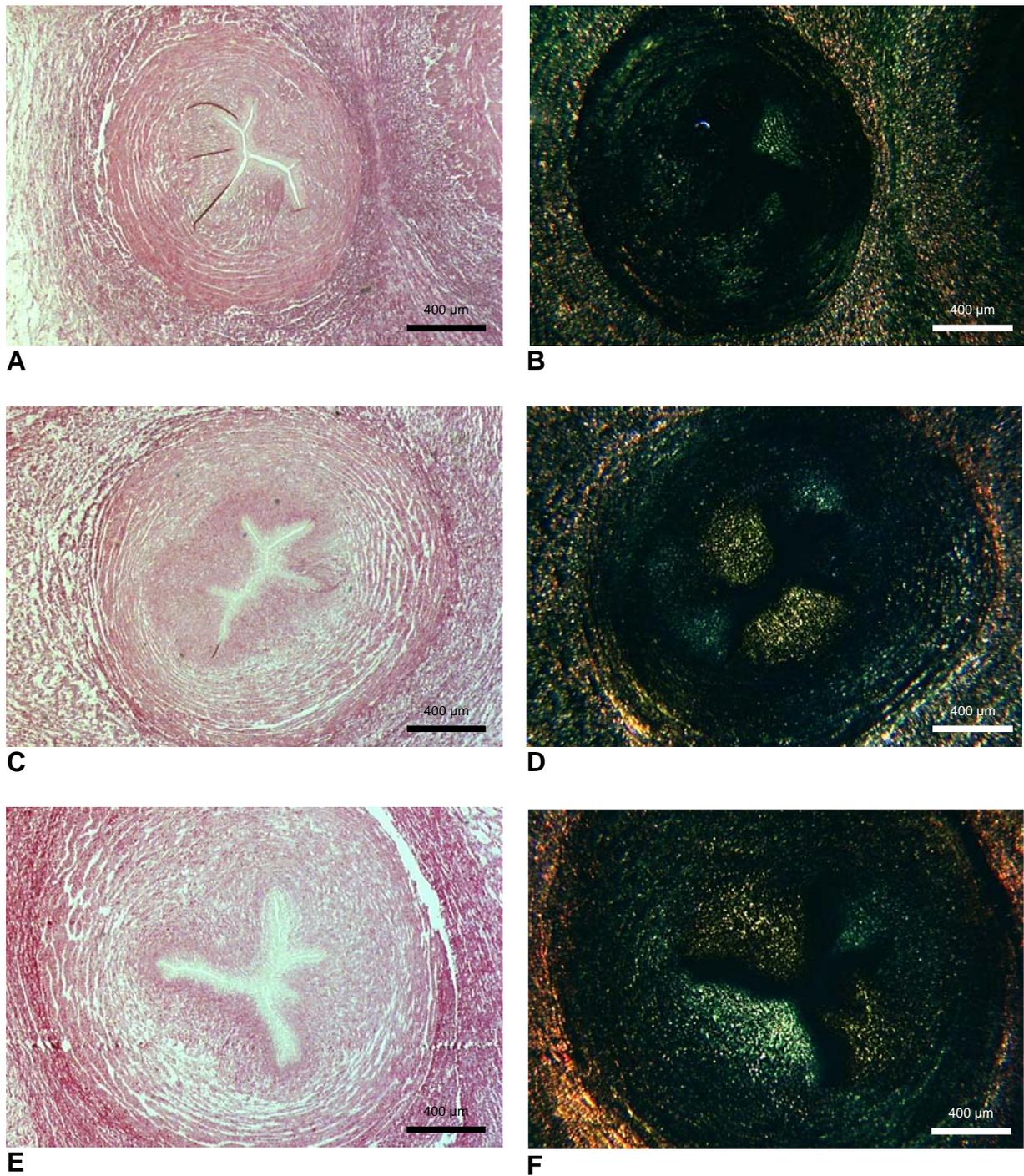


Abbildung 16: Lichtmikroskopische (LM) Aufnahme der Sirius-Rot-Färbung und polarisationsmikroskopische (PM) Aufnahme
A-B: Nichtperfundierte, unbehandelte Kontrollgruppe (0-Probe); A: LM, B: PM
C-D: Perfundierte, unbehandelte Kontrollgruppe (-VEGF); C: LM, D: PM
E-F: Perfundierte, VEGF₁₆₅-behandelte Gruppe (+VEGF); E: LM, F: PM

3.5 β_1 -Integrin

3.5.1 Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von β_1 -Integrin mit Western Blot-Analyse

Für den semiquantitativen Nachweis der Proteinsynthese von β_1 -Integrin mittels Western Blot-Analyse werden je Gruppe n = 4 Nabelschnurarterien untersucht.

Die Western Blot-Analyse der Proteinsynthese von β_1 -Integrin zeigt eine deutliche Zunahme des Proteins in den 4 Stunden perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Nabelschnursegmenten gegenüber den unbehandelten Segmenten, die etwa den gleichen Gehalt an β_1 -Integrin aufweisen. Der Mittelwert der densitometrischen Untersuchung (Integral-Bkg [%]) liegt für die nichtperfundierte Kontrollgruppe 0-Probe bei 21,61 % +/- 2,67 %. Bei der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF findet sich ein Mittelwert von 20,31 % +/- 3,12 %. In der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF beträgt der Mittelwert 58,08 % +/- 4,33 %. Wegen der geringen Fallzahl je Gruppe von n = 4 wird auf eine statistische Auswertung hinsichtlich der Signifikanzanalyse verzichtet.

Gruppe	β_1 -Integrin - Integral-Bkg	
	MW	St. Abw.
0-Probe	21,6131	2,6686
-VEGF	20,3100	3,1424
+VEGF	58,0775	4,3285

Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot-Analyse von β_1 -Integrin mit Angabe der Mittelwerte in Integral-Bkg [%] (MW) und der Standardabweichung (St. Abw.)

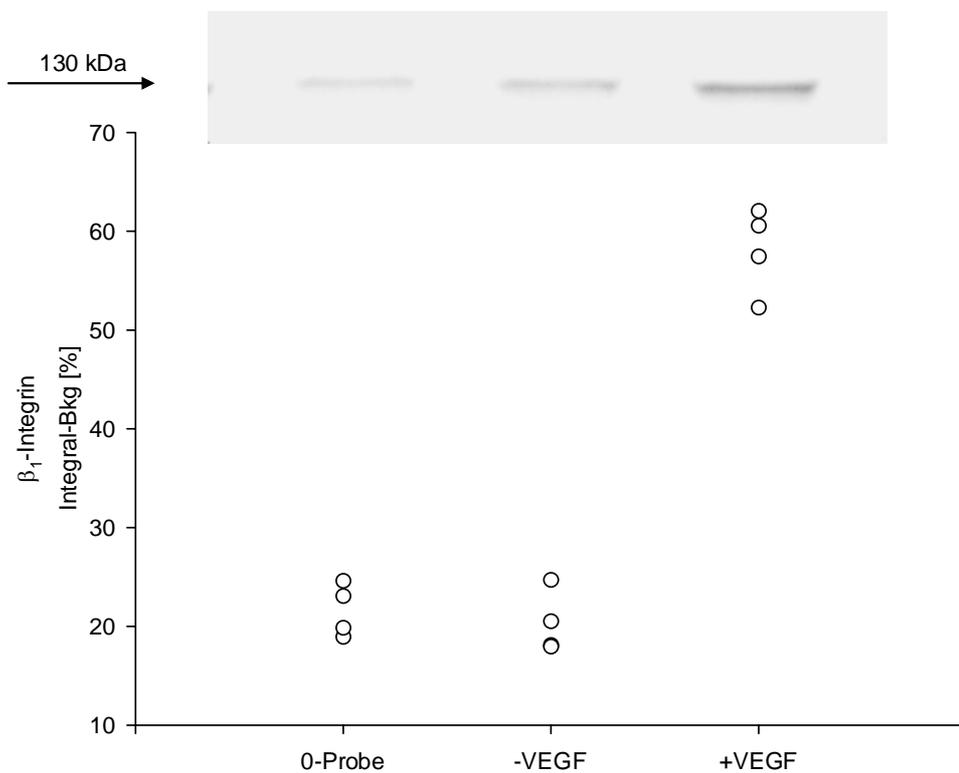


Abbildung 17: Grafische Darstellung der Western Blot-Analyse von β_1 -Integrin - Einzelwerte der Densitometrie und Beispielblot

3.6 Kollagen Typ IV

3.6.1 Immunhistochemische Färbung von Kollagen Typ IV

Kollagen Typ IV ist ein Protein der EZM und wichtiger Bestandteil der Basalmembran.

Für die bildanalytische Auswertung der immunhistochemischen Färbung von Kollagen Typ IV werden je Gruppe n = 10 Nabelschnurarterien untersucht.

Die bildanalytische Auswertung zeigt einen signifikanten Anstieg des Proteins Kollagen Typ IV in den 4 Stunden perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Nabelschnursegmenten gegenüber den unbehandelten Segmenten. Der Mittelwert (Kollagen Typ IV-Färbung in Relation zum Gesichtsfeld [%]) liegt für die nichtperfundierte Kontrollgruppe 0-Probe bei 52,58 % +/- 12,85 %. Bei der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF findet sich ein Mittelwert von 53,39 % +/- 11,07 %. In der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF beträgt der Mittelwert 69,58 % +/- 6,61 %.

Die geringe Differenz der Proteinsynthese von Kollagen Typ IV beim Vergleich der nicht perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe 0-Probe und der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF ist mit $p = 0,94$ nicht signifikant.

Der deutliche Anstieg von Kollagen Typ IV durch die Applikation von VEGF₁₆₅ in der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF ist mit $p = 0,002$ gegenüber der nichtperfundierten, unbehandelten Kontrollgruppen 0-Probe und mit $p = 0,004$ gegenüber der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF signifikant.

Gruppe	Kollagen Typ IV - % je Gesichtsfeld	
	MW	St. Abw.
0-Probe	52,5750	12,8519
-VEGF	53,3905	11,0663
+VEGF	69,5823	6,6052

Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen Kollagen Typ IV-Färbung mit Angabe der Mittelwerte in % je Gesichtsfeld (MW) und der Standardabweichung (St. Abw.)

Gruppe	0-Probe	-VEGF
-VEGF	0,940	
+VEGF	0,002	0,004

Tabelle 11: Tabellarische Darstellung der statistischen Auswertung der Bildanalyse von der immunhistochemischen Kollagen Typ IV-Färbung. Nichtparametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte ($p=$); Signifikanz bei $p < 0,05$.

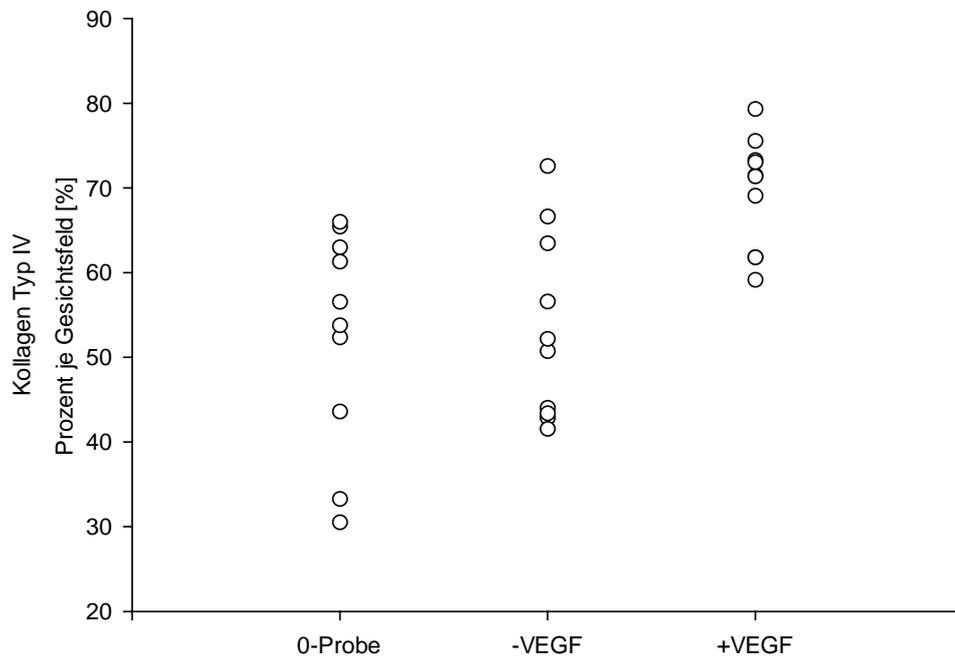


Abbildung 18: Grafische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen Kollagen Typ IV-Färbung - Einzelwerte der Bildanalyse

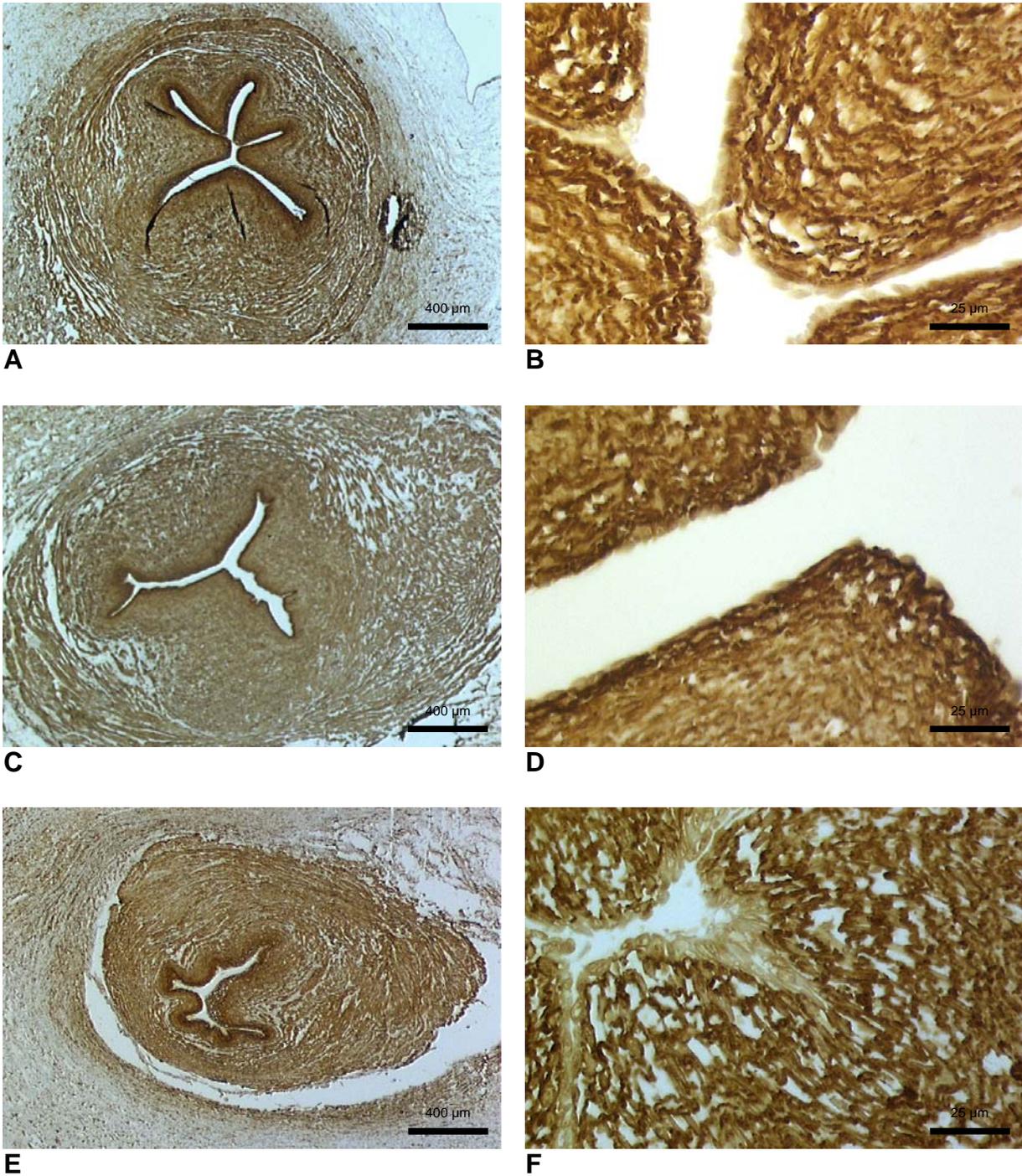


Abbildung 19: Mikroskopische Aufnahme der immunhistochemischen Färbung Kollagen Typ IV
A-B: 0-Probe
C-D: -VEGF
E-F: +VEGF

3.6.2 Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von Kollagen Typ IV mit Western Blot-Analyse

Für den semiquantitativen Nachweis der Proteinsynthese von Kollagen Typ IV mittels Western Blot-Analyse werden je Gruppe $n = 4$ Nabelschnurarterien untersucht.

Die Western Blot-Analyse der Proteinsynthese von Kollagen Typ IV zeigt eine Zunahme des Proteins in den 4 Stunden perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Nabelschnursegmenten gegenüber den unbehandelten Segmenten, die etwa den gleichen Gehalt an Kollagen Typ IV aufweisen. Der Mittelwert der densitometrischen Untersuchung (Integral-Bkg [%]) liegt für die nichtperfundierte Kontrollgruppe 0-Probe bei 22,58 % +/- 2,86 %. Bei der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF findet sich ein Mittelwert von 29,81 % +/- 7,19 %. In der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF beträgt der Mittelwert 47,61 % +/- 4,36 %.

Wegen der geringen Fallzahl je Gruppe von $n = 4$ wird auf eine statistische Auswertung hinsichtlich der Signifikanzanalyse verzichtet.

Somit werden die bildanalytisch gewonnenen Ergebnisse durch die Western Blot-Analyse bestätigt.

Gruppe	Kollagen Typ IV - Integral-Bkg	
	MW	St. Abw.
0-Probe	22,5833	2,8615
-VEGF	29,8100	7,1889
+VEGF	47,6083	4,3566

Tabelle 12: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot-Analyse von Kollagen Typ IV mit Angabe der Mittelwerte in Integral-Bkg [%] (MW) und der Standardabweichung (St. Abw.)

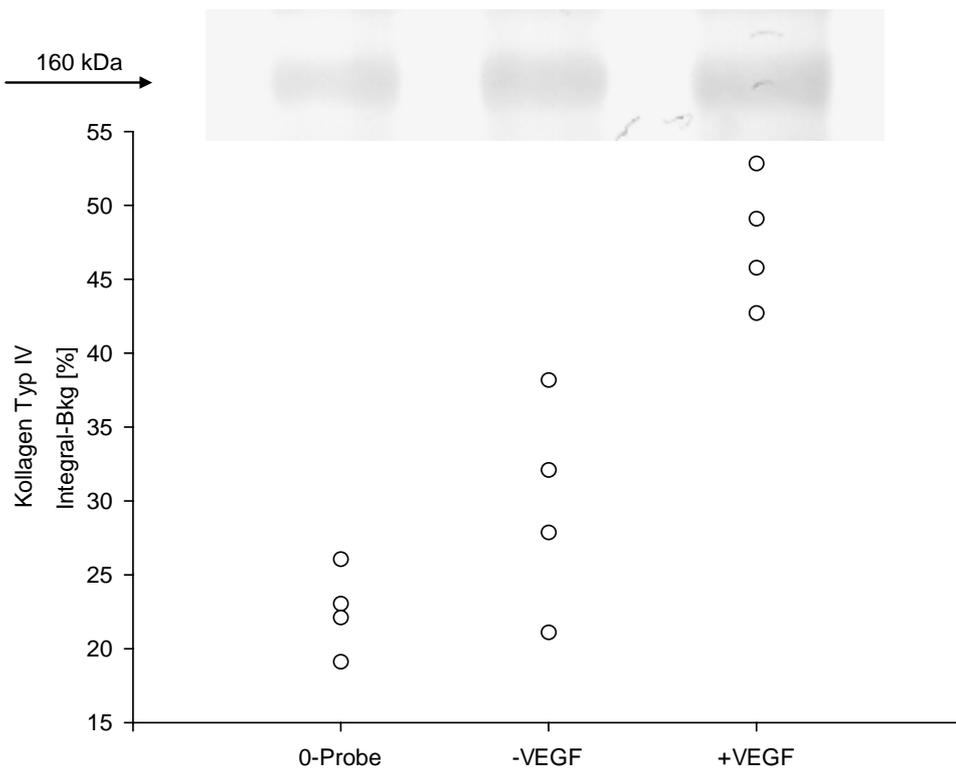


Abbildung 20: Grafische Darstellung der Western Blot-Analyse von Kollagen Typ IV - Einzelwerte der Densitometrie und Beispielblot

3.7 Laminin

3.7.1 Immunhistochemische Färbung von Laminin

Laminin ist in der Basalmembran endothelialer Zellen sowie in der Media von Arterien lokalisiert. Ferner ist es in der Wharton-Sulze und dem Amnionepithel der Nabelschnur detektierbar, ist hier aber unabhängig von Perfusion und VEGF₁₆₅-Behandlung ähnlich verteilt.

Für die bildanalytische Auswertung der immunhistochemischen Färbung von Laminin werden je Gruppe n = 10 Nabelschnurarterien untersucht.

Die bildanalytische Auswertung zeigt eine signifikante Zunahme des Proteins Laminin in den 4 Stunden perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Nabelschnursegmenten gegenüber den unbehandelten Segmenten. Der Mittelwert (Laminin-Färbung in Relation zum Gesichtsfeld [%]) liegt für die nichtperfundierte, unbehandelte Kontrollgruppe 0-Probe bei 50,47 % +/- 11,41 %. Bei der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF findet sich ein Mittelwert von 48,88 % +/- 12,77 %. In der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF beträgt der Mittelwert 65,43 % +/- 3,96 %.

Die geringe Differenz der Proteinsynthese von Laminin beim Vergleich der nicht perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe 0-Probe und der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF ist mit $p = 0,597$ nicht signifikant.

Der markante Anstieg von Laminin durch die Applikation von VEGF₁₆₅ in der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF ist mit $p = 0,001$ gegenüber der nichtperfundierten, unbehandelten Kontrollgruppen 0-Probe und mit $p = 0,003$ gegenüber der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF signifikant.

Gruppe	Laminin - % je Gesichtsfeld	
	MW	St. Abw.
0-Probe	50,4698	11,4103
-VEGF	48,8848	12,7713
+VEGF	65,4287	3,9555

Tabelle 13: Tabellarische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen Laminin-Färbung mit Angabe der Mittelwerte in % je Gesichtsfeld (MW) und der Standardabweichung (St. Abw.)

Gruppe	0-Probe	-VEGF
-VEGF	0,597	
+VEGF	0,001	0,003

Tabelle 14: Tabellarische Darstellung der statistischen Auswertung der Bildanalyse von der immunhistochemischen Laminin-Färbung. Nichtparametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (p=); Signifikanz bei $p < 0,05$.

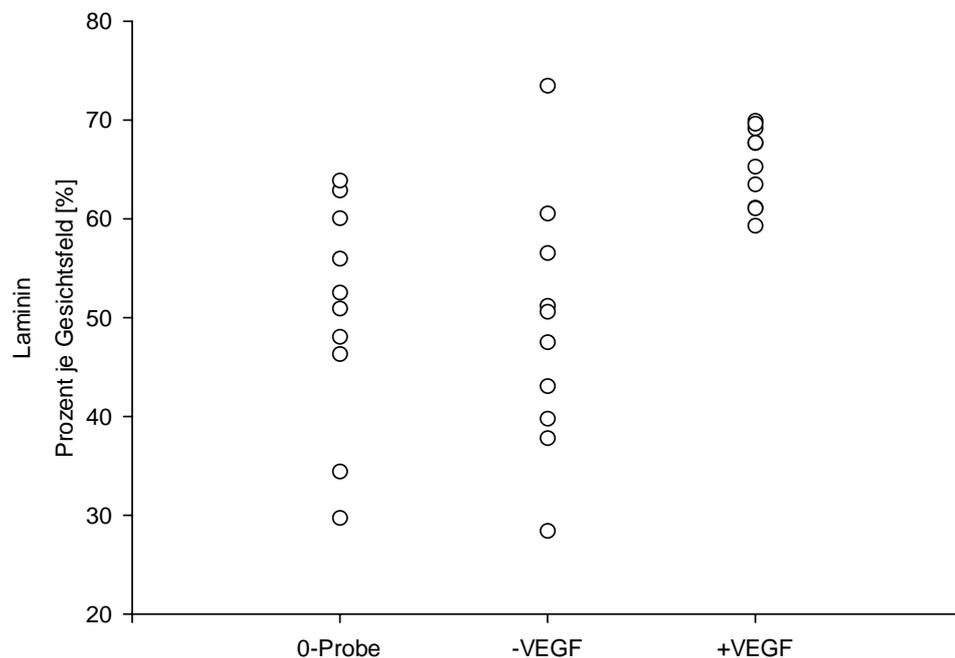


Abbildung 21: Grafische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen Laminin-Färbung - Einzelwerte der Bildanalyse

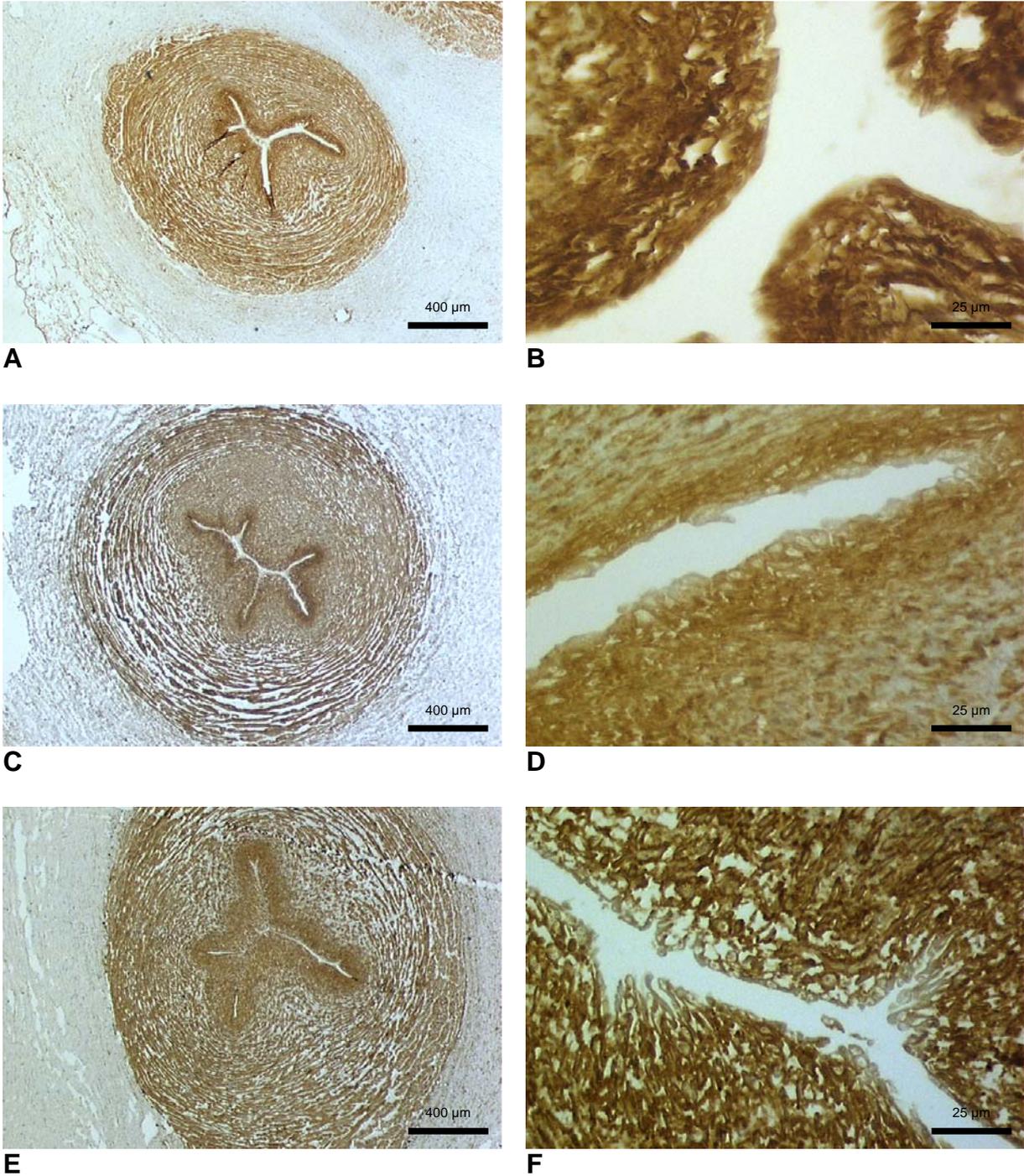


Abbildung 22: Mikroskopische Aufnahme der immunhistochemischen Färbung Laminin
A-B: 0-Probe
C-D: -VEGF
E-F: +VEGF

3.7.2 Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von Laminin mit Western Blot-Analyse

Für den semiquantitativen Nachweis der Proteinsynthese von Laminin mittels Western Blot-Analyse werden je Gruppe $n = 4$ Nabelschnurarterien untersucht.

Die Western Blot-Analyse der Proteinsynthese von Laminin zeigt eine Zunahme des Proteins in den 4 Stunden perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Nabelschnursegmenten gegenüber den unbehandelten Segmenten, die etwa den gleichen Gehalt an Laminin aufweisen. Der Mittelwert der densitometrischen Untersuchung (Integral-Bkg [%]) liegt für die nichtperfundierte, unbehandelte Kontrollgruppe 0-Probe bei 24,41 % +/- 4,54 %. Bei der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF findet sich ein Mittelwert von 26,71 % +/- 4,84 %. In der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF beträgt der Mittelwert 48,89 % +/- 3,49 %. Wegen der geringen Fallzahl je Gruppe von $n = 4$ wird auf eine statistische Auswertung hinsichtlich der Signifikanzanalyse verzichtet.

Die Western Blot-Analyse untermauert die bildanalytisch gewonnenen Ergebnisse.

Gruppe	Laminin - Integral-Bkg	
	MW	St. Abw.
0-Probe	24,4075	4,5427
-VEGF	26,7050	4,8383
+VEGF	48,8858	3,4896

Tabelle 15: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot-Analyse von Laminin mit Angabe der Mittelwerte in Integral-Bkg [%] (MW) und der Standardabweichung (St. Abw.)

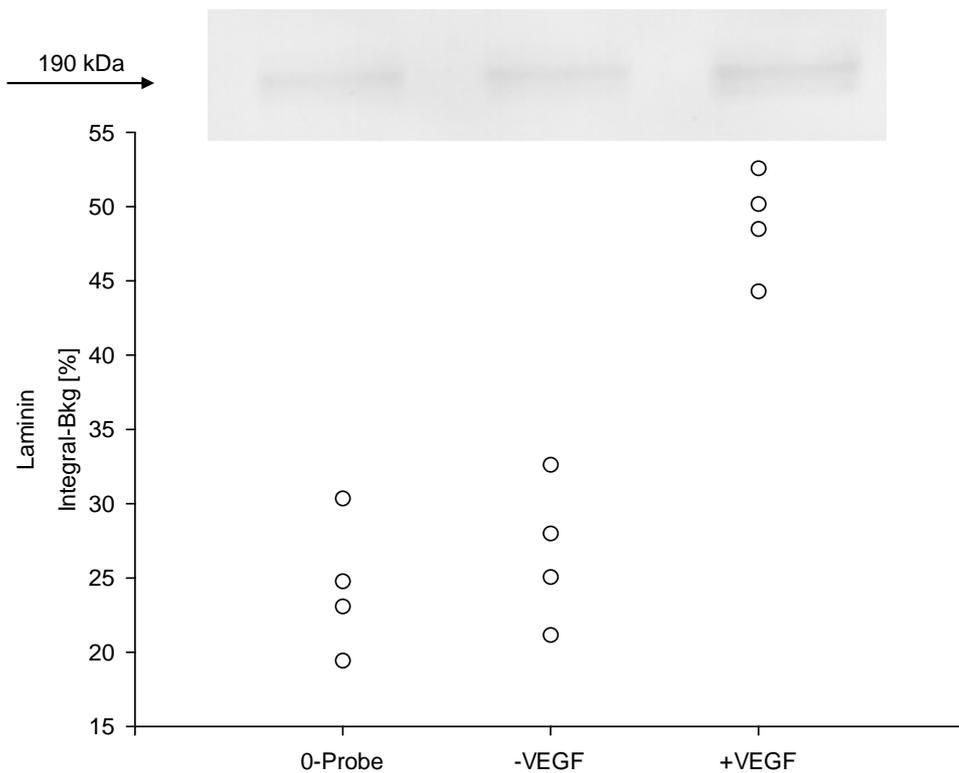


Abbildung 23: Grafische Darstellung der Western Blot-Analyse von Laminin - Einzelwerte der Densitometrie und Beispielblot

3.8 Osteopontin

3.8.1 Immunhistochemische Färbung von Osteopontin

Osteopontin ist in der gesamten Wand der Umbilikalarterie detektierbar unabhängig von Perfusion und VEGF₁₆₅-Behandlung. Die Endothelzellen der Intima und die vaskulären glatten Muskelzellen sind Osteopontin-positiv. In der Wharton-Sulze ist Osteopontin ebenfalls detektierbar.

Für die bildanalytische Auswertung der immunhistochemischen Färbung von Osteopontin werden je Gruppe n = 10 Nabelschnurarterien untersucht.

Die bildanalytische Auswertung zeigt eine signifikante Zunahme des Proteins Osteopontin in der Media der 4 Stunden perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Nabelschnursegmente gegenüber den unbehandelten Segmenten. Der Mittelwert (Osteopontin-Färbung in Relation zum Gesichtsfeld [%]) liegt für die nichtperfundierte, unbehandelte Kontrollgruppe 0-Probe bei 39,61 % +/- 11,31 %. Bei der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF findet sich ein Mittelwert von 39,11 % +/- 9,72 %. In der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF beträgt der Mittelwert 55,98 % +/- 10 %.

Die geringfügige Differenz der Proteinsynthese von Osteopontin beim Vergleich der nicht perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe 0-Probe und der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF ist mit $p = 0,762$ nicht signifikant.

Die klare Zunahme von Osteopontin durch die Applikation von VEGF₁₆₅ in der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF ist mit $p = 0,01$ gegenüber der nichtperfundierten, unbehandelten Kontrollgruppen 0-Probe und mit $p = 0,005$ gegenüber der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF signifikant.

Gruppe	Osteopontin - % je Gesichtsfeld	
	MW	St. Abw.
0-Probe	39,6097	11,3106
-VEGF	39,1093	9,7214
+VEGF	55,9836	9,9990

Tabelle 16: Tabellarische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen Osteopontin-Färbung mit Angabe der Mittelwerte in % je Gesichtsfeld (MW) und der Standardabweichung (St. Abw.)

Gruppe	0-Probe	-VEGF
-VEGF	0,762	
+VEGF	0,010	0,005

Tabelle 17: Tabellarische Darstellung der statistischen Auswertung der Bildanalyse von der immunhistochemischen Osteopontin-Färbung. Nichtparametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte (p=); Signifikanz bei $p < 0,05$.

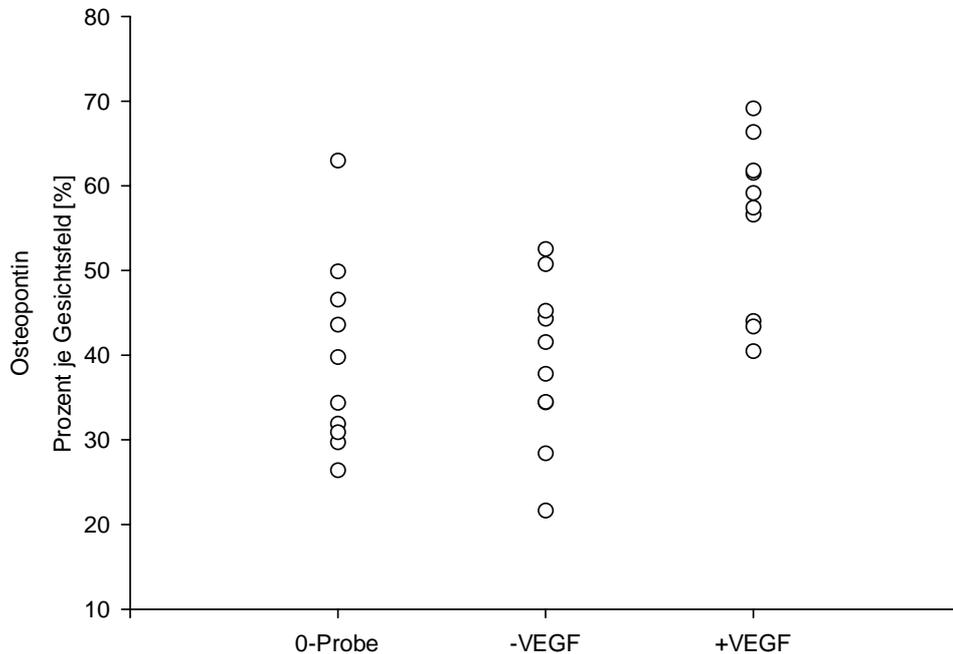


Abbildung 24: Grafische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen Osteopontin-Färbung - Einzelwerte der Bildanalyse

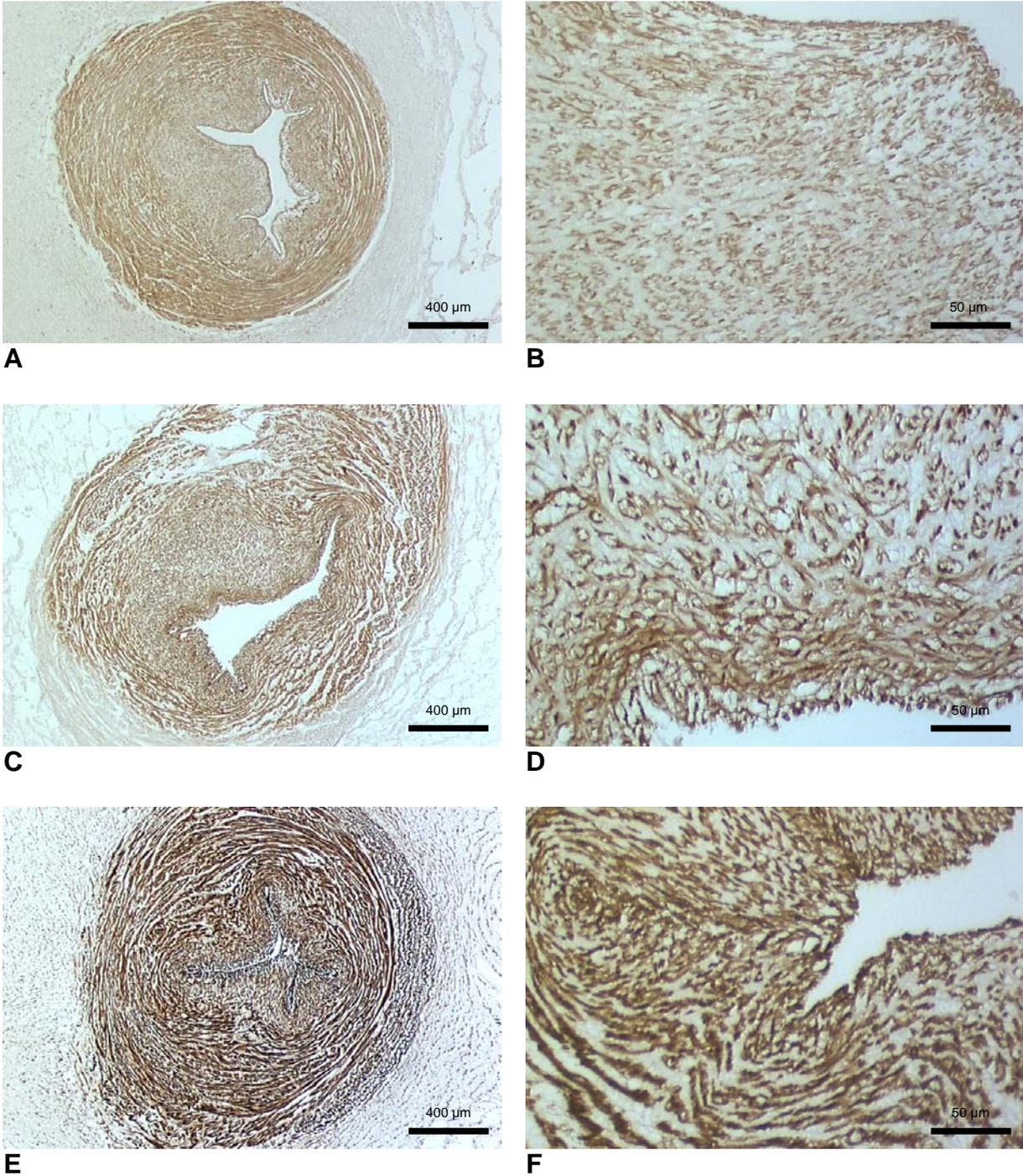


Abbildung 25: Mikroskopische Aufnahme der immunhistochemischen Färbung Osteopontin
A-B: 0-Probe
C-D: -VEGF
E-F: +VEGF

3.8.2 Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von Osteopontin mit Western Blot-Analyse

Für den semiquantitativen Nachweis der Proteinsynthese von Osteopontin mittels Western Blot-Analyse werden je Gruppe $n = 4$ Nabelschnurarterien untersucht.

Die Western Blot-Analyse der Proteinsynthese von Osteopontin zeigt eine deutliche Zunahme des Proteins in den 4 Stunden perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Nabelschnursegmenten gegenüber den unbehandelten Segmenten, die etwa den gleichen Gehalt an Osteopontin aufweisen. Der Mittelwert der densitometrischen Untersuchung (Integral-Bkg [%]) liegt für die nichtperfundierte, unbehandelte Kontrollgruppe 0-Probe bei 24,09 % +/- 5,28 %. Bei der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF findet sich ein Mittelwert von 23,38 % +/- 3,55 %. In der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF beträgt der Mittelwert 52,52 % +/- 6,25 %.

Wegen der geringen Fallzahl je Gruppe von $n = 4$ wird auf eine statistische Auswertung hinsichtlich der Signifikanzanalyse verzichtet.

Die Western Blot-Analyse bestätigt die bildanalytisch gewonnenen Ergebnisse.

Gruppe	Osteopontin - Integral-Bkg	
	MW	St. Abw.
0-Probe	24,0908	5,2754
-VEGF	23,3842	3,5450
+VEGF	52,5233	6,2467

Tabelle 18: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot-Analyse von Osteopontin mit Angabe der Mittelwerte in Integral-Bkg [%] (MW) und der Standardabweichung (St. Abw.)

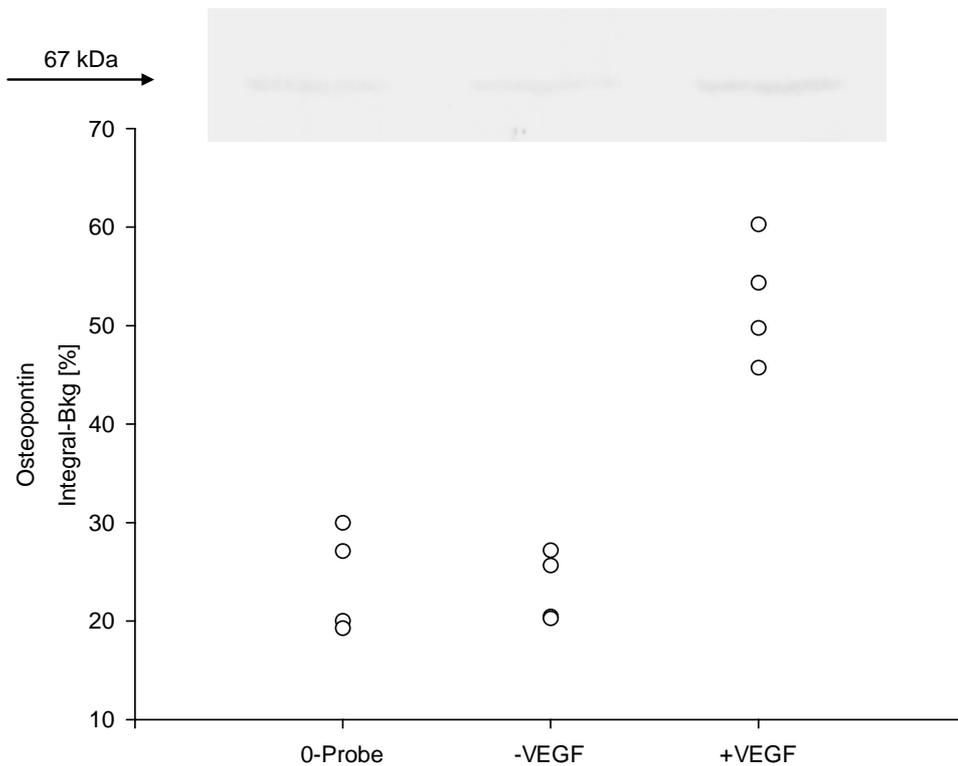


Abbildung 26: Grafische Darstellung der Western Blot-Analyse von Osteopontin - Einzelwerte der Densitometrie und Beispielblot

3.9 VEGF

3.9.1 Immunhistochemische Färbung von VEGF

Für die bildanalytische Auswertung der immunhistochemischen Färbung von VEGF werden je Gruppe $n = 10$ Nabelschnurarterien untersucht.

Die bildanalytische Auswertung zeigt eine signifikante Zunahme des Proteins VEGF in den 4 Stunden perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Nabelschnursegmenten gegenüber den unbehandelten Segmenten. In den nichtperfundierten und perfundierten unbehandelten Kontrollgruppen 0-Probe und -VEGF zeigt sich in der Intima ein ähnlich geringer Gehalt an VEGF. Der Mittelwert (Schichtdicke der VEGF-Färbung [μm]) liegt für die nichtperfundierte, unbehandelte Kontrollgruppe 0-Probe bei $4,37 \mu\text{m} \pm 1,13 \mu\text{m}$. Bei der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF findet sich ein Mittelwert von $4,09 \mu\text{m} \pm 1,2 \mu\text{m}$. In der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF beträgt der Mittelwert $6,14 \mu\text{m} \pm 1,56 \mu\text{m}$. Die Differenz der Proteinsynthese von VEGF beim Vergleich der nicht perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe 0-Probe und der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF ist mit $p = 0,705$ nicht signifikant.

Die deutliche Zunahme von VEGF durch die Applikation von VEGF₁₆₅ in der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF ist mit $p = 0,01$ gegenüber der nichtperfundierten, unbehandelten Kontrollgruppen 0-Probe und mit $p = 0,007$ gegenüber der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF signifikant.

Gruppe	VEGF - Schichtdicke	
	MW	St. Abw.
0-Probe	4,3745	1,1255
-VEGF	4,0918	1,1975
+VEGF	6,1369	1,5569

Tabelle 19: Tabellarische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen VEGF-Färbung mit Angabe der Mittelwerte in μm (MW) und der Standardabweichung (St. Abw.)

Gruppe	0-Probe	-VEGF
-VEGF	0,705	
+VEGF	0,010	0,007

Tabelle 20: Tabellarische Darstellung der statistischen Auswertung der Bildanalyse von der immunhistochemischen VEGF-Färbung. Nichtparametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte ($p=$); Signifikanz bei $p < 0,05$.

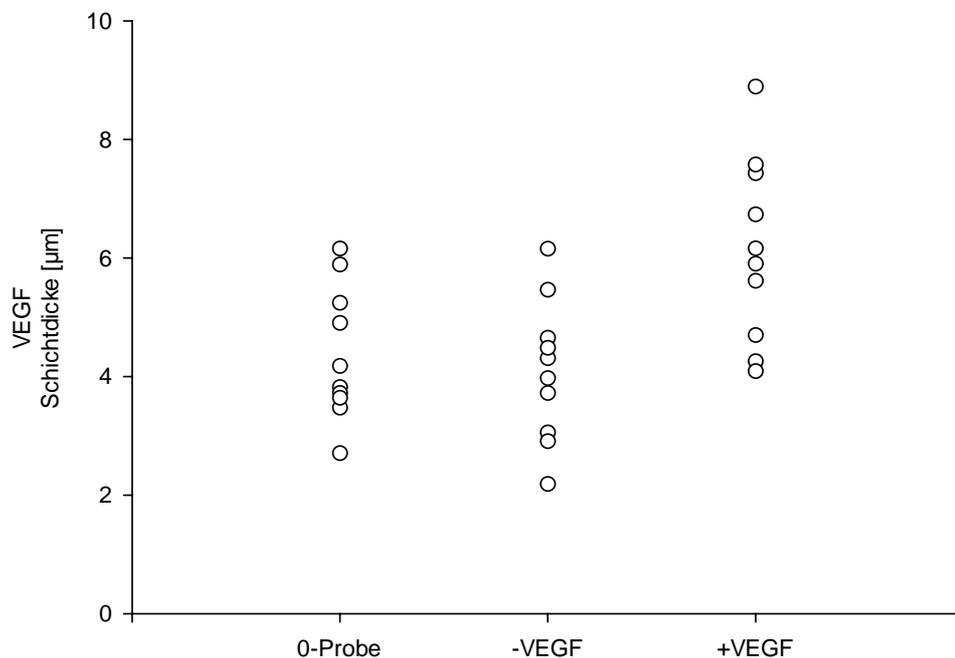
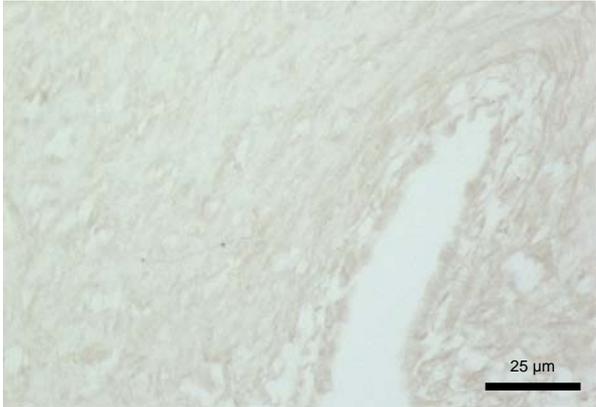
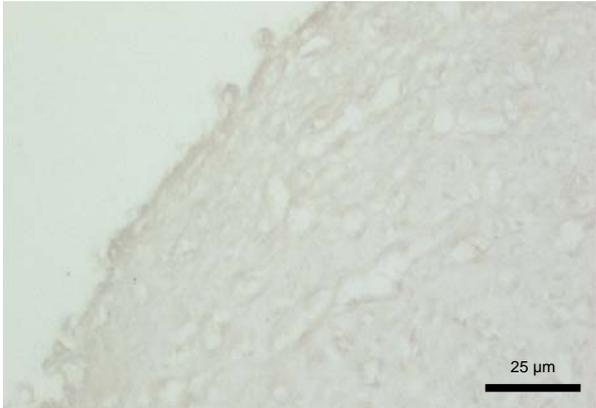


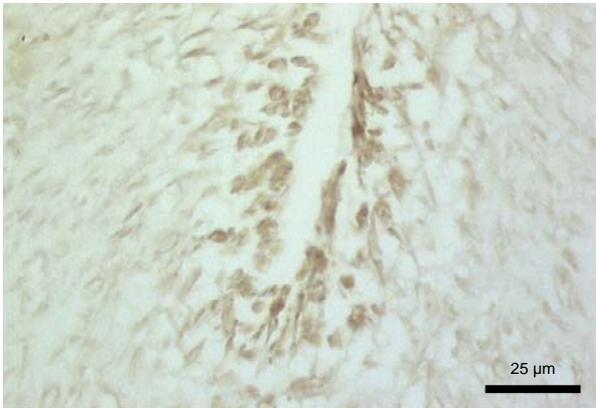
Abbildung 27: Grafische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen VEGF-Färbung - Einzelwerte der Bildanalyse



A



B



C

Abbildung 28: Mikroskopische Aufnahme der immunhistochemischen Färbung VEGF
A: 0-Probe
B: -VEGF
C: +VEGF

3.9.2 Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von VEGF mit Western Blot-Analyse

Für den semiquantitativen Nachweis der Proteinsynthese von VEGF mittels Western Blot-Analyse werden je Gruppe $n = 4$ Nabelschnurarterien untersucht.

Die Western Blot-Analyse der Proteinsynthese von VEGF zeigt eine deutliche Zunahme des Proteins in den 4 Stunden perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Nabelschnursegmenten gegenüber den unbehandelten Segmenten, die etwa den gleichen Gehalt an VEGF aufweisen. Der Mittelwert der densitometrischen Untersuchung (Integral-Bkg [%]) liegt für die nichtperfundierte, unbehandelte Kontrollgruppe 0-Probe bei 18,58 % +/- 4,79 %. Bei der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF findet sich ein Mittelwert von 19,91 % +/- 1,54 %. In der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF beträgt der Mittelwert 61,51 % +/- 4,56 %.

Wegen der geringen Fallzahl je Gruppe von $n = 4$ wird auf eine statistische Auswertung hinsichtlich der Signifikanzanalyse verzichtet.

Die Western Blot-Analyse bestätigt die bildanalytisch gewonnenen Ergebnisse.

Gruppe	VEGF - Integral-Bkg	
	MW	St. Abw.
0-Probe	18,5833	4,7926
-VEGF	19,9100	1,5424
+VEGF	61,5058	4,5602

Tabelle 21: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot-Analyse von VEGF mit Angabe der Mittelwerte in Integral-Bkg [%] (MW) und der Standardabweichung (St. Abw.)

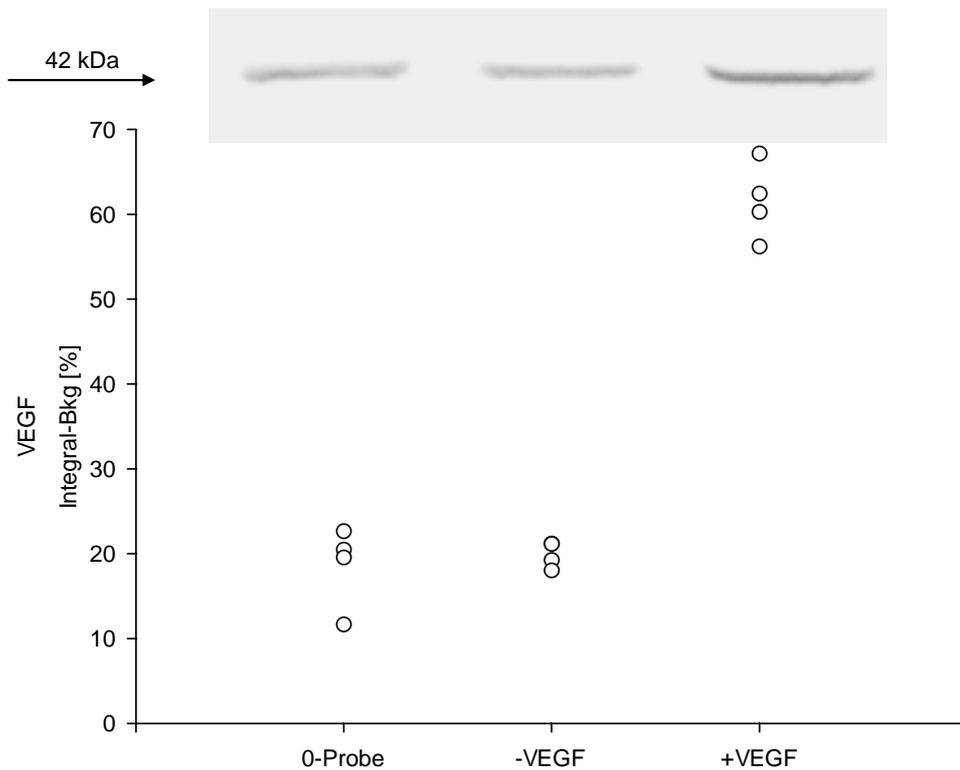


Abbildung 29: Grafische Darstellung der Western Blot-Analyse von VEGF - Einzelwerte der Densitometrie und Beispielblot

3.10 Flk-1

3.10.1 Immunhistochemische Färbung von Flk-1

Flk-1 ist ein Rezeptor für VEGF und wird von den Endothelzellen der Intima exprimiert.

Für die bildanalytische Auswertung der immunhistochemischen Färbung von Flk-1 werden je Gruppe n = 10 Nabelschnurarterien untersucht.

Die bildanalytische Auswertung zeigt eine signifikante Zunahme des Rezeptors Flk-1 in den 4 Stunden perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Nabelschnursegmenten gegenüber den unbehandelten Segmenten. In den nichtperfundierten und perfundierten unbehandelten Kontrollgruppen 0-Probe und -VEGF zeigt sich in der Intima ein ähnlich geringer Gehalt an Flk-1. Der Mittelwert (Schichtdicke der Flk-1-Färbung [μm]) liegt für die nichtperfundierte, unbehandelte Kontrollgruppe 0-Probe bei $4,22 \mu\text{m} \pm 1,91 \mu\text{m}$. Bei der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF findet sich ein Mittelwert von $3,92 \mu\text{m} \pm 1,53 \mu\text{m}$. In der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF beträgt der Mittelwert $6,37 \mu\text{m} \pm 1,8 \mu\text{m}$.

Die geringfügige Differenz der Proteinsynthese von Flk-1 beim Vergleich der nicht perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe 0-Probe und der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF ist mit $p = 0,762$ nicht signifikant.

Die deutliche Zunahme von Flk-1 durch die Applikation von VEGF₁₆₅ in der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF ist mit $p = 0,016$ gegenüber der nichtperfundierten, unbehandelten Kontrollgruppen 0-Probe und mit $p = 0,005$ gegenüber der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF signifikant.

Gruppe	Flk-1 - Schichtdicke	
	MW	St. Abw.
0-Probe	4,2233	1,9082
-VEGF	3,9209	1,5310
+VEGF	6,3667	1,7983

Tabelle 22: Tabellarische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen Flk-1-Färbung mit Angabe der Mittelwerte in μm (MW) und der Standardabweichung (St. Abw.)

Gruppe	0-Probe	-VEGF
-VEGF	0,762	
+VEGF	0,016	0,005

Tabelle 23: Tabellarische Darstellung der statistischen Auswertung der Bildanalyse von der immunhistochemischen Flk-1-Färbung. Nichtparametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte ($p=$); Signifikanz bei $p < 0,05$.

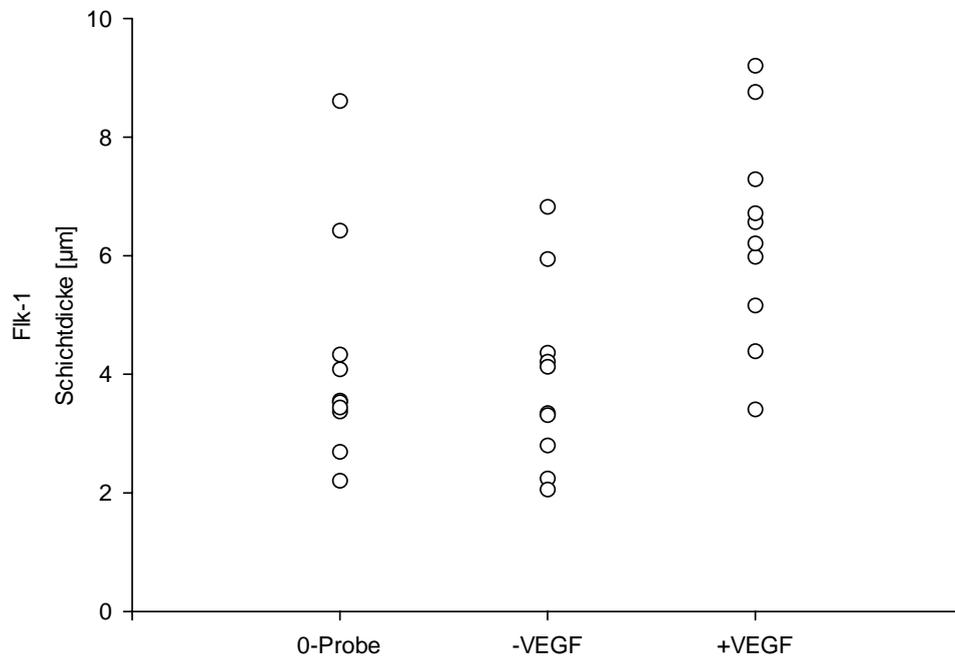
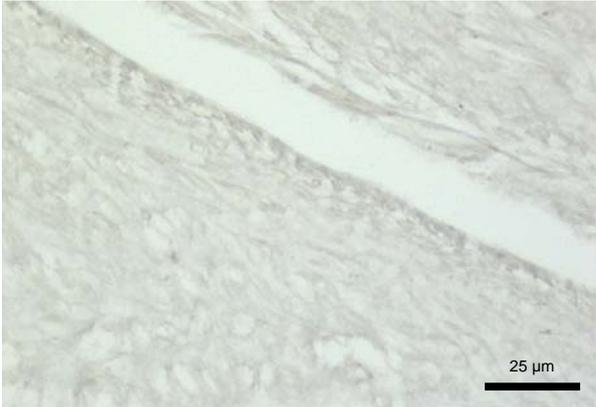
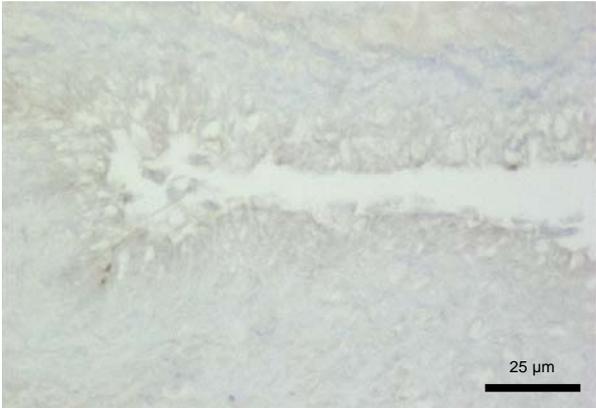


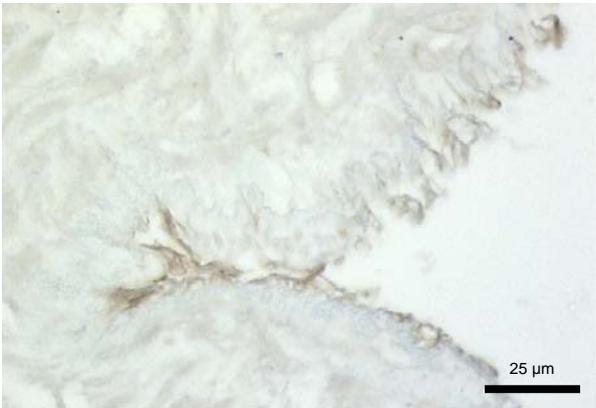
Abbildung 30: Grafische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen Flk-1-Färbung - Einzelwerte der Bildanalyse



A



B



C

Abbildung 31: Mikroskopische Aufnahme der immunhistochemischen Färbung Flk-1
A: 0-Probe
B: -VEGF
C: +VEGF

3.10.2 Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von Flk-1 mit Western Blot-Analyse

Für den semiquantitativen Nachweis der Proteinsynthese von Flk-1 mittels Western Blot-Analyse werden je Gruppe $n = 4$ Nabelschnurarterien untersucht.

Die Western Blot-Analyse der Proteinsynthese von Flk-1 zeigt eine deutliche Zunahme des Proteins in den 4 Stunden perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Nabelschnursegmenten gegenüber den unbehandelten Segmenten, die etwa den gleichen Gehalt an Flk-1 aufweisen. Der Mittelwert der densitometrischen Untersuchung (Integral-Bkg [%]) liegt für die nichtperfundierte, unbehandelte Kontrollgruppe 0-Probe bei 13,22 % +/- 7,03 %. Bei der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF findet sich ein Mittelwert von 13,5 % +/- 2,76 %. In der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF beträgt der Mittelwert 73,29 % +/- 9,59 %.

Wegen der geringen Fallzahl je Gruppe von $n = 4$ wird auf eine statistische Auswertung hinsichtlich der Signifikanzanalyse verzichtet.

Die Western Blot-Analyse bestätigt die bildanalytisch gewonnenen Ergebnisse.

Gruppe	Flk-1 - Integral-Bkg	
	MW	St. Abw.
0-Probe	13,2150	7,0258
-VEGF	13,5000	2,7622
+VEGF	73,2863	9,5912

Tabelle 24: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot-Analyse von Flk-1 mit Angabe der Mittelwerte in Integral-Bkg [%] (MW) und der Standardabweichung (St. Abw.)

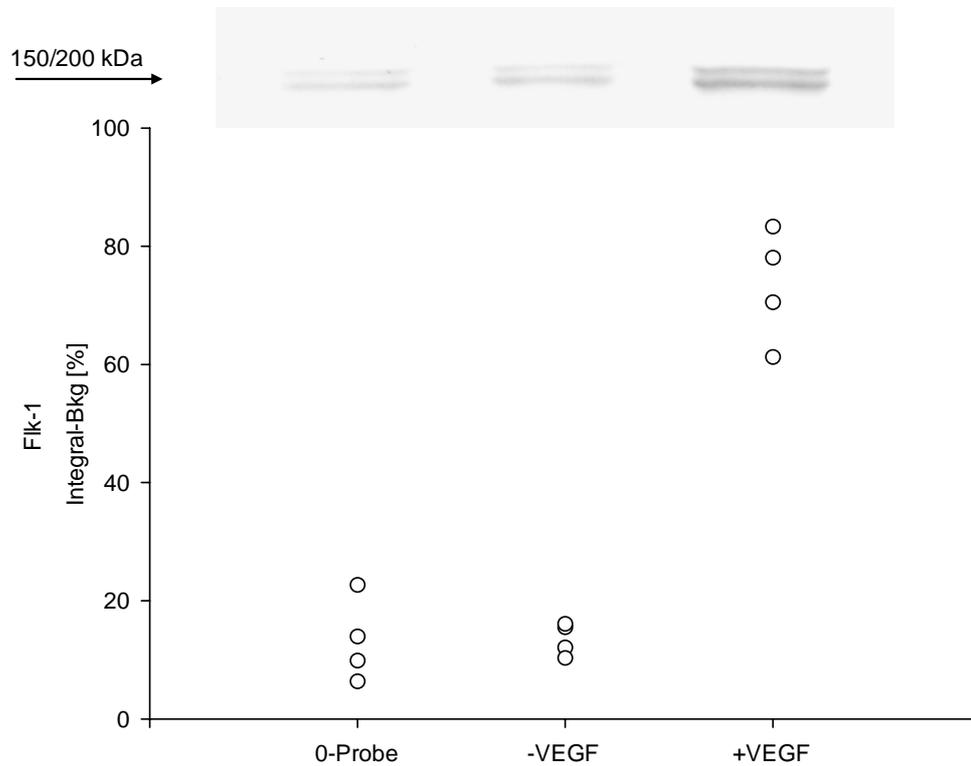


Abbildung 32: Grafische Darstellung der Western Blot-Analyse von Flk-1 - Einzelwerte der Densitometrie und Beispielblot

3.11 Flt-1

3.11.1 Immunhistochemische Färbung von Flt-1

Flt-1 ist ein weiterer Rezeptor für VEGF und wird ebenfalls von den Endothelzellen der Intima exprimiert.

Für die bildanalytische Auswertung der immunhistochemischen Färbung von Flt-1 werden je Gruppe n = 10 Nabelschnurarterien untersucht.

Die bildanalytische Auswertung zeigt eine signifikante Zunahme des Rezeptors Flt-1 in den 4 Stunden perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Nabelschnursegmenten gegenüber den unbehandelten Segmenten. Der Mittelwert (Schichtdicke der Flt-1-Färbung [μm]) liegt für die nichtperfundierte, unbehandelte Kontrollgruppe 0-Probe bei $4,47 \mu\text{m} \pm 1,25 \mu\text{m}$. Bei der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF findet sich ein Mittelwert von $3,81 \mu\text{m} \pm 1,81 \mu\text{m}$. In der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF beträgt der Mittelwert $7,49 \mu\text{m} \pm 2,2 \mu\text{m}$.

Die Differenz der Proteinsynthese von Flt-1 beim Vergleich der nicht perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe 0-Probe und der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF ist mit $p = 0,199$ nicht signifikant.

Die markante Zunahme von Flt-1 durch die Applikation von VEGF₁₆₅ in der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF ist mit $p = 0,004$ gegenüber der nichtperfundierten, unbehandelten Kontrollgruppen 0-Probe und mit $p = 0,002$ gegenüber der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF signifikant.

Gruppe	Flt-1 - Schichtdicke	
	MW	St. Abw.
0-Probe	4,4681	1,2478
-VEGF	3,8097	1,8072
+VEGF	7,4921	2,2014

Tabelle 25: Tabellarische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen Flt-1-Färbung mit Angabe der Mittelwerte in μm (MW) und der Standardabweichung (St. Abw.)

Gruppe	0-Probe	-VEGF
-VEGF	0,199	
+VEGF	0,004	0,002

Tabelle 26: Tabellarische Darstellung der statistischen Auswertung der Bildanalyse von der immunhistochemischen Flt-1-Färbung. Nichtparametrischer Test (Mann-Whitney U-Test); Angabe der Signifikanzwerte ($p=$); Signifikanz bei $p < 0,05$.

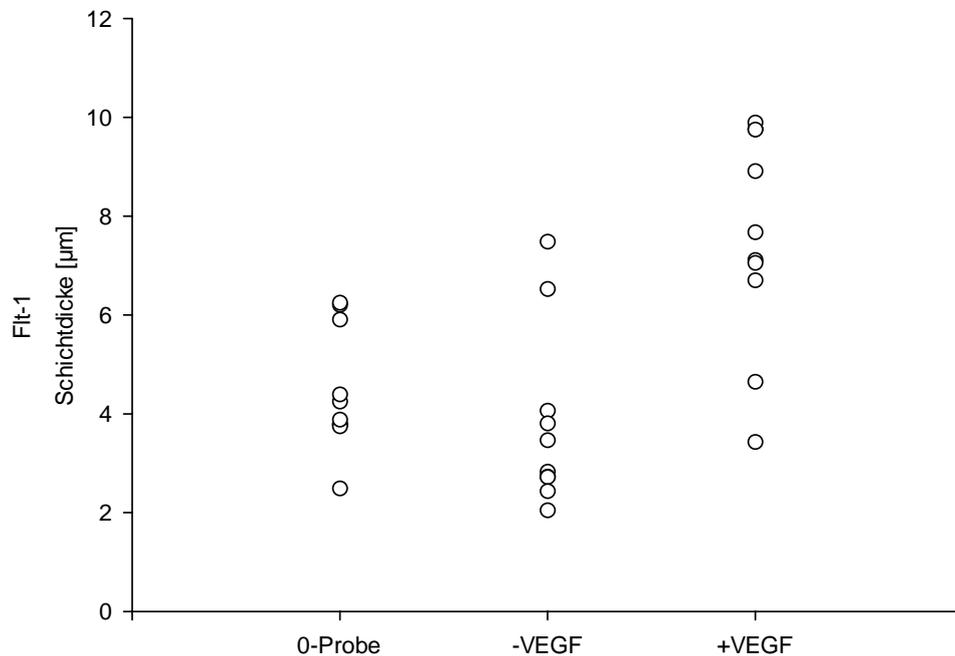
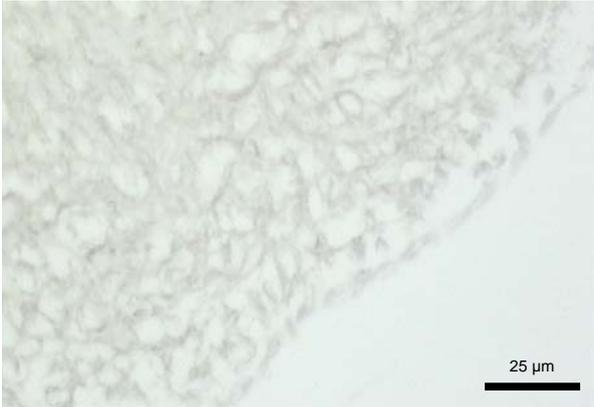
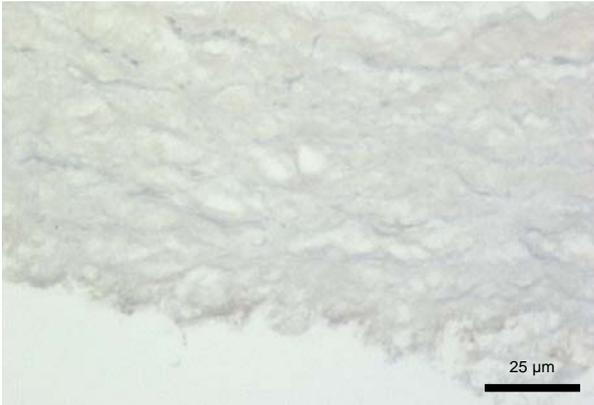


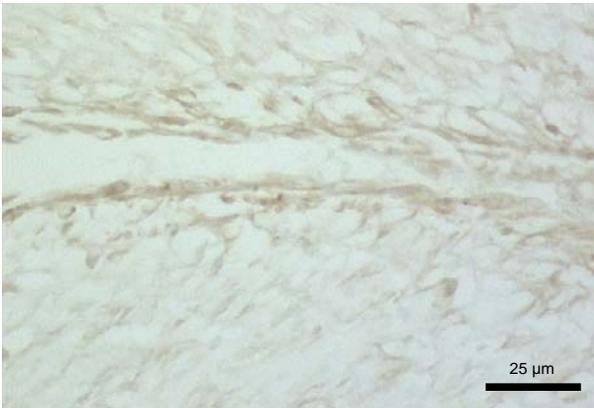
Abbildung 33: Grafische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen Flt-1-Färbung - Einzelwerte der Bildanalyse



A



B



C

Abbildung 34: Mikroskopische Aufnahme der immunhistochemischen Färbung Flt-1
A: 0-Probe
B: -VEGF
C: +VEGF

3.11.2 Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von Flt-1 mit Western Blot-Analyse

Für den semiquantitativen Nachweis der Proteinsynthese von Flt-1 mittels Western Blot-Analyse werden je Gruppe $n = 4$ Nabelschnurarterien untersucht.

Die Western Blot-Analyse der Proteinsynthese von Flt-1 zeigt eine deutliche Zunahme des Proteins in den 4 Stunden perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Nabelschnursegmenten gegenüber den unbehandelten Segmenten, die etwa den gleichen Gehalt an Flt-1 aufweisen. Der Mittelwert der densitometrischen Untersuchung (Integral-Bkg [%]) liegt für die nichtperfundierte, unbehandelte Kontrollgruppe 0-Probe bei 25,99 % +/- 1,38 %. Bei der perfundierten, unbehandelten Kontrollgruppe -VEGF findet sich ein Mittelwert von 25,09 % +/- 2,89 %. In der perfundierten, VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF beträgt der Mittelwert 48,93 % +/- 2,53 %.

Wegen der geringen Fallzahl je Gruppe von $n = 4$ wird auf eine statistische Auswertung hinsichtlich der Signifikanzanalyse verzichtet.

Die Western Blot-Analyse bestätigt die bildanalytisch gewonnenen Ergebnisse.

Gruppe	Flt-1 - Integral-Bkg	
	MW	St. Abw.
0-Probe	25,9867	1,3824
-VEGF	25,0883	2,8905
+VEGF	48,9250	2,5318

Tabelle 27: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot-Analyse von Flt-1 mit Angabe der Mittelwerte in Integral-Bkg [%] (MW) und der Standardabweichung (St. Abw.)

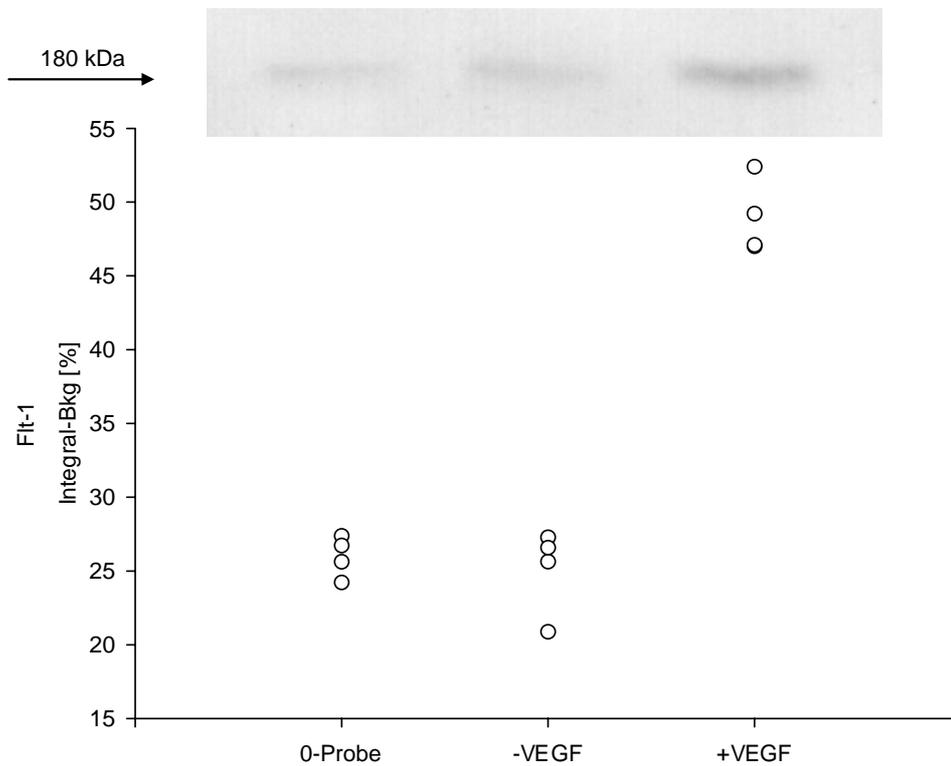


Abbildung 35: Grafische Darstellung der Western Blot-Analyse von Flt-1 - Einzelwerte der Densitometrie und Beispielblot

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Perfusionsmodell eines isolierten humanen Nabelschnursegmentes etabliert. Die Arteria umbilicalis und Vena umbilicalis wurden perfundiert. Die Rolle von VEGF₁₆₅ auf die Entstehung eines interstitiellen Ödems am arteriellen Schenkel wurde studiert. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand der Einfluss von VEGF₁₆₅ auf die extrazelluläre Matrix der humanen Nabelschnurgefäße.

4.1 Diskussion der Methode

Für die Untersuchung des vaskulären Systems stehen am Patienten die klinische Untersuchung, bildgebende Verfahren, die Erhebung laborchemischer Daten und in seltenen Fällen bioptische Eingriffe zur Verfügung. Letztere sind für die exakte Untersuchung von Morphologie, Proteinsynthese und Genexpression geeignet, aber aufgrund der Invasivität des Eingriffes speziellen diagnostischen Fragestellungen vorbehalten. Ferner ist die Menge des gewonnenen Untersuchungsmaterials für viele Fragestellungen unzureichend, die Funktionsuntersuchung eines isolierten Gefäßes ist nur eingeschränkt möglich.

Eine exakte qualitative und quantitative Analyse biologischer Parameter sowie die Untersuchung des Einflusses diverser Substanzen auf Morphologie und vaskuläre Funktion sind nur experimentell möglich.

Es sind diverse Perfusionsmodelle und Perfusionstechniken etabliert worden, die der Untersuchung des vaskulären Systems und der Gefäß-Interaktion dienen. Die meisten dieser Modelle sind Tiermodelle, die häufig mit hohen Kosten verbunden sind. Die Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen ist mitunter diffizil.

Zellkulturtechniken ermöglichen die differenzierte Untersuchung humaner Zellen des vaskulären Systems, bieten aber aufgrund der fehlenden Komplexität eine eingeschränkte Aussagekraft hinsichtlich funktioneller Fragestellungen.

Bei dem in dieser Arbeit etablierten *ex vivo*-Modell werden Arterie und Vene der humanen Nabelschnur perfundiert. Die Arteria umbilicalis wird nach einer 90 Minuten dauernden Adaptationszeit bei 37 °C und anschließender Perfusion untersucht. Während der 4 Stunden Perfusion werden funktionelle und klinisch-laborchemische Parameter kontinuierlich untersucht und präsentieren sich als stabil.

Dieses Modell bietet die Möglichkeit, pharmakologische und gefäßbiologische *ex vivo*-Studien an menschlichen Gefäßen durchzuführen, da die Konditionen der *in vivo*-Situation sehr ähnlich

sind und genau definiert werden können. Somit kann das Modell Tierversuche auf dem Gebiet der vaskulären Biologie und Pharmakologie ersetzen.

Der Vorteil dieses Perfusionsmodells der humanen Nabelschnur ist die Möglichkeit, Langzeitstudien unter definierten und kontrollierten Konditionen durchzuführen. Ein Zugriff auf funktionelle Parameter ist permanent gegeben. Das Modell ist durch einen normalen Perfusionsdruck und -fluss charakterisiert, die vergleichbar mit ähnlichen bereits beschriebenen Modellen sind (Gan L et al., 1999). Ein weiterer Vorzug ist die günstige Verfügbarkeit des zu untersuchenden Materials.

Voraussetzung und Basis für die Vergleichbarkeit und die statistische Auswertung ist ein möglichst homogenes Untersuchungsmaterial, das heißt, dass die Faktoren, die die Perfusion beeinflussen könnten, soweit wie möglich zu vereinheitlichen sind. So galten in dieser Arbeit folgende Einschlusskriterien für die zu untersuchenden Nabelschnüre: Gesundheit der Mutter (keine Nebendiagnosen wie Hypertonie, Diabetes oder prädiabetische Stoffwechsellage, Präeklampsie oder Plazentainsuffizienz), reifes gesundes Neugeborenes ohne Fehlbildungen und Infektion, unkomplizierter Schwangerschaftsverlauf und intakte Nabelschnur ohne Verletzung und Anomalie. Wegen erheblicher interindividueller Abweichungen hinsichtlich der Dauer einer Spontangeburt wurden nur Nabelschnüre von Neugeborenen verwendet, die via Sectio caesarea entbunden worden sind.

Dennoch ist eine gewisse Inhomogenität, die sich schon prinzipiell aus interindividuellen Unterschieden ergibt, der Nachteil dieses Modells. Insbesondere besteht eine eingeschränkte Beurteilbarkeit des Schwangerschaftsverlaufs. Zwar wurde Einsicht in die Akten genommen und die Nabelschnüre wurden *prae perfusionem* makroskopisch untersucht, aber Faktoren, die die Morphologie und Physiologie der Gefäße potentiell beeinflussen, können nicht gänzlich eruiert werden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Einfluss von VEGF₁₆₅ auf die vaskuläre Permeabilität

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF₁₆₅ übt seinen Einfluss vorwiegend auf die biologische Aktivität von Endothelzellen aus. Es konnte gezeigt werden, dass VEGF ein Endothelzell-spezifisches Mitogen *in vitro* und ein Schlüsselmediator der Angiogenese *in vivo* ist (Leung DW et al., 1989; Keck PJ et al., 1989). 2004 konnte von Infanger et al. gezeigt werden, dass der Serum-Spiegel von VEGF mit dem Gewebeödem nach

Verbrennungsverletzung korreliert (Infanger M et al., 2004). Frühere Studien konnten zeigen, dass die mRNA von VEGF und das Protein VEGF selbst in normalen Geweben und Organen von Ratten verteilt sind. Somit wird die Theorie gestützt, dass VEGF eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung und Kontrolle der vaskulären Funktion spielt (Jakeman LB et al., 1992). Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation gewonnenen Daten liefern die erste umfassende Analyse der Effekte von VEGF₁₆₅ auf die Arteria umbilicalis.

Hierdurch kann gezeigt werden, dass die Applikation von VEGF₁₆₅ in die Umbilikalarterie die Entstehung eines interstitiellen Gewebeödems in perfundierten Nabelschnüren induziert.

Die Farbstoffextravasation als Quantifizierungsparameter für das interstitielle Ödem wird nach einer Perfusionsdauer von 4 Stunden untersucht und bietet die Möglichkeit, auf Veränderungen der vaskulären Permeabilität zu schließen. Das über dem Nabelschnurquerschnitt gemessene Areal in der VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe präsentierte sich mit im Mittel 0,37 cm² signifikant größer ($p=0,018$) als die unbehandelte perfundierte Gruppe mit 0,21 cm². Das belegt die schon 1983 beschriebene Wirkung von VEGF, die vaskuläre Permeabilität zu erhöhen (Senger DR et al., 1983), in diesem Modell gezeigt an der perfundierten Arteria umbilicalis. Die Aufnahmen des Endothels, die mit der Transmissionselektronenmikroskopie gewonnen wurden, zeigen bei den VEGF₁₆₅-behandelten Umbilikalarterien massiv erweiterte Interzellularräume im Vergleich zu den beiden nicht-behandelten Gruppen. Dies ist das morphologische Korrelat einer verstärkten Fenestration des sonst kontinuierlichen Endothels. Auch die so dokumentierte Induktion der Fenestration durch VEGF₁₆₅ deckt sich mit in der Literatur gefundenen Daten (Esser S et al., 1998).

Die in dieser Arbeit durchgeführte Wassergehaltsanalyse als weiterer Parameter für die Ödembestimmung zeigt eine signifikante Zunahme des Wassergehalts im Vergleich der nicht perfundierten gegenüber den perfundierten Nabelschnüren. Dies verdeutlicht, dass auch ohne Anwendung vasoaktiver und permeabilitätssteigernder Substanzen ein Ödem nach einer Perfusion von 4 Stunden Dauer entsteht. Die Applikation von VEGF₁₆₅ zeigt hier einen tendenziellen, jedoch mit $p=0,406$ nicht signifikanten Anstieg des Wassergehalts. Eine mögliche Erklärung ist, dass es sich bei der Nabelschnur nicht um ein abgeschlossenes System handelt, dass also Flüssigkeit, die über die Gefäße in die Wharton-Sulze gelangt, bei entsprechendem interstitiellen Druck über das Amnionepithel nach außen diffundiert. Dieser Prozess ist physiologisch, da durch abgepresste Flüssigkeit aus der Nabelschnur ein Teil des Fruchtwassers *in utero* gebildet. Durch die Perfusion scheint nach 4 Stunden nahezu die maximale Wasseraufnahmekapazität des interstitiellen Bindegewebes der Nabelschnur erreicht zu sein.

4.2.2 Einfluss von VEGF₁₆₅ auf die extrazelluläre Matrix

Die Gefäßwand setzt sich neben verschiedenen Zellen wie beispielsweise Endothelzellen und glatten Muskelzellen aus Proteinen der extrazellulären Matrix zusammen. Diese befinden sich in einem Fließgleichgewicht aus Synthese durch die entsprechenden Zellen und katalytischem Abbau durch MMPs. Dieses Gleichgewicht wird durch viele Faktoren beeinflusst wie zum Beispiel durch Zytokine und Wachstumsfaktoren.

Zu den prominentesten Vertretern der EZM-Proteine gehören unterschiedliche Typen von Kollagen, die bis zu 80% des Trockengewichts ausmachen (Infanger M et al., 2005). Die Gefäße weisen hauptsächlich Kollagen Typ I und Kollagen Typ III auf. Kollagen Typ I ist hauptsächlich in der Adventitia, Kollagen Typ III überwiegend in der Intima und Media zu detektieren (Infanger M et al., 2005; Farquharson C, Robins SP, 1989). Beide Kollagentypen zeigen einen klaren Anstieg durch die Behandlung mit VEGF₁₆₅.

Kollagen Typ IV und Laminin sind Bestandteile von Basalmembranen. Basalmembranen sind der Fundus aller endothelialen und epithelialen Gewebe und darüber hinaus in Muskel und Nerven zu finden. Immunhistochemisch ist eine Visualisierung von Kollagen Typ IV und Laminin in der subendothelialen Basalmembran und der vaskulären Muskelzellschicht möglich (Hallmann R et al., 2005). Die in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Aufnahmen zeigen eine netzartige Anordnung von Kollagen Typ IV in der Intima und Media und darüber hinaus in der Wharton-Sulze und dem Amnionepithel.

Die Daten über den Gehalt an Kollagen Typ IV in der Arteria umbilicalis wurden durch bildanalytische Auswertung der immunhistochemischen Färbung gewonnen. Es zeigte sich im Vergleich der unbehandelten Gruppen 0-Probe (MW 52,57 % je Gesichtsfeld) und -VEGF (MW 53,39 % je Gesichtsfeld) kein signifikanter Unterschied, das bedeutet, dass die Perfusion keinen Einfluss auf den Gehalt an Kollagen Typ IV hat. Bei der Gegenüberstellung der perfundierten mit VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe +VEGF ist mit im Mittel 69,58 % Kollagen Typ IV je Gesichtsfeld ein signifikanter Anstieg vor allem in der Media zu dokumentieren. Somit erhöht VEGF₁₆₅ die Expression von Kollagen Typ IV an der Arterie der humanen Nabelschnur. Die mittels Western Blot-Analyse gewonnenen Ergebnisse untermauern die bildanalytischen Daten.

Analoge Ergebnisse lassen sich aus der bildanalytischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung von Laminin aquirieren. Auch hier zeigt sich im Vergleich der Gruppen 0-Probe (50,47 % Laminin je Gesichtsfeld) und -VEGF (48,88 % Laminin je Gesichtsfeld) keine signifikante Änderung des Lamingehalts durch die Perfusion ohne Behandlung, während eine klare Zunahme auf 65,43 % Laminin je Gesichtsfeld durch die

Applikation von VEGF₁₆₅ zu verzeichnen ist. Die Western Blot-Analyse zeigt konforme Ergebnisse.

Es wird deutlich, dass die EZM-Proteine Kollagen Typ IV und Laminin durch die Perfusion weder qualitativen noch quantitativen Änderungen unterworfen sind. VEGF₁₆₅ hingegen erhöht den Gehalt beider Proteine nach einer Perfusionsdauer von 4 Stunden und kann als Induktor für die Expression bestimmter EZM-Proteine gedeutet werden. Diese These ließ sich durch Genexpressionsanalysen mittels Polymerase-Kettenreaktion beweisen.

Die Befunde der Literatur bezüglich der Induktion von EZM-Proteinen durch VEGF bestätigen die in dieser Dissertation präsentierten Daten. So konnte bei Studien über den Heilungsprozess von mikrovaskulären Anastomosen am Rattenmodell gezeigt werden, dass die Applikation von VEGF₁₆₅ an der Arteria femoralis schon nach 10 Minuten zu einem signifikanten Anstieg verschiedener Kollagene, darunter auch Kollagen Typ IV, und dem EZM-Protein Fibronectin führt (Infanger M et al., 2005). Beim Xenograft-Tumor-Modell des wenig differenzierten Schilddrüsenkarzinoms, das sich unter anderem durch eine hohe Synthese von Proteinen der EZM auszeichnet, konnte eine deutliche Reduktion des Wachstums und der EZM-Produktion durch die Behandlung mit PTK787/ZK222584, einem Inhibitor der Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2, dokumentiert werden (Schoenberger J et al., 2004). Diese Reduktion der EZM-Synthese war sowohl in interstitiellen als auch perivaskulären Arealen nachzuweisen; untersucht wurden verschiedene Kollagene, insbesondere auch Kollagen Typ IV, und Laminin. Bei *in vitro*-Studien konnte an Endothelzellen gezeigt werden, dass die Behandlung mit VEGF₁₆₅ zu einem Anstieg der Laminin- und Kollagen Typ I-Expression führt (Infanger M et al., 2006).

OPN ist ein Wachstumsmediator sowie eine wichtige Komponente in der zellulären Immunabwehr und bei inflammatorischen Prozessen. Darüber hinaus agiert OPN als Überlebens-, Zelladhäsions und Chemotaxis-Faktor für Endothelzellen (Leali D et al., 2003).

Die bildanalytische Auswertung der immunhistochemischen Färbung und die Densitometrie der Western Blot-Analyse zeigen einen signifikanten Anstieg des Osteopontingehalts auf 55,98 % je Gesichtsfeld durch die Behandlung mit VEGF₁₆₅ in der Umbilikalarterie der humanen Nabelschnur. Im Vergleich der nichtbehandelten Gruppen 0-Probe (39,61 %) und -VEGF (39,11 %) ist kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen. Mit einem transgenen Mausmodell, das OPN überexprimiert, konnte demonstriert werden, dass OPN sowohl eine Verdickung der Media am unverletzten Gefäß induziert als auch neointimale Formation nach Verletzung bewirkt (Isoda K et al., 2002). Vor diesem Hintergrund ist der gleichbleibende Gehalt an OPN in den unbehandelten Gruppen 0-Probe und -VEGF ein Indiz dafür, dass aus der Perfusion kein relevanter Schaden an der perfundierten Arterie resultiert. Der Anstieg von OPN in der behandelten Arterie ist somit als Folge der Stimulation durch VEGF₁₆₅ zu werten.

Daten über den Anstieg von Osteopontin in Gefäßen der humanen Nabelschnur existieren in der Literatur derzeit nicht. Jedoch konnte an Endothelzellen *in vitro* durch Applikation von VEGF₁₆₅ nach 4 Stunden ein deutlicher Anstieg von Osteopontin dokumentiert werden (Infanger M et al., 2006). Auch bei der Untersuchung von mikrovaskulären Anastomosen am Rattenmodell präsentierte sich VEGF₁₆₅ als potenter Stimulator der OPN-Synthese an der Arteria femoralis (Infanger M et al., 2005).

Der genaue Mechanismus und der exakte Signaltransduktionsweg, die zu einer erhöhten Expression von EZM-Proteinen nach Stimulation mit VEGF führen, sind derzeit unbekannt, jedoch zeigte sich in einer Studie an VEGF-behandelten Arteriae femorales von Ratten, dass es verglichen mit einer Kontrollgruppe zu einem Anstieg von TGF- β_1 kam und parallel zu einer erhöhten Expression extrazellulärer Matrix-Proteine. Es ist bekannt, dass die Behandlung mit TGF- β_1 zum Beispiel an sinusoidalen Endothelzellen der Rattenleber *in vitro* zu einer vermehrten Expression von Kollagen Typ III und Typ IV, Laminin und Entactin führt (Neubauer K et al., 1999). Es darf also angenommen werden, dass VEGF₁₆₅ die Expression von EZM-Proteinen via TGF- β_1 stimuliert oder dass zumindest eine Interaktion mit diesem Transduktionsweg und möglicherweise anderen Wachstumsfaktoren stattfindet.

Der in der Literatur beschriebene Abbau extrazellulärer Matrixproteine, der mittelbare Folge eines erhöhten VEGF-Spiegels durch Induktion von MMPs ist (Hiratsuka S et al., 2002; Wang H, Keiser JA, 1998), zeigt sich in dieser Arbeit an der humanen Arteria umbilicalis nicht. Dies lässt darauf schließen, dass MMPs an der Nabelschnur möglicherweise eine untergeordnete Rolle spielen oder dass in der Bilanzierung der anabole Stimulus im Vergleich zum katabolen überwiegt.

Die exakte Untersuchung der Signaltransduktionswege und die Rolle der MMPs sowie der TIMPs sind Gegenstand zukünftiger Arbeiten.

4.2.3 Einfluss von VEGF₁₆₅ auf seine Rezeptor-Tyrosin-Kinasen

Über die Expression von VEGF und seinen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen in der humanen Umbilikalarterie ist wenig bekannt. In dieser Arbeit wird demonstriert, dass das Protein VEGF von den Endothelzellen der Intima der Arteria umbilicalis exprimiert wird.

Sowohl die Daten, die mittels bildanalytischer Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erhoben werden, als auch die densitometrischen Untersuchungen der Western Blots zeigen einen signifikanten Anstieg des VEGF-Gehalts in der Gruppe der VEGF₁₆₅-behandelten, perfundierten Nabelschnurarterien (+VEGF) gegenüber den unbehandelten Gruppen 0-Probe und -VEGF, deren Gehalt an VEGF sich nicht signifikant voneinander unterscheidet. Dieser

gemessene Anstieg ist nicht ausschließlich auf die Applikation von VEGF zurückzuführen, da lediglich die Endothelzellen eine verstärkte Immunreaktivität zeigen.

VEGF bindet an die Zelloberfläche über ligand-stimulierbare Tyrosin-Kinase-Rezeptoren. Die beiden wichtigsten Rezeptoren an den Endothelzellen der Blutgefäße sind VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (Flk-1/KDR). Die Expression von VEGFR-1 und VEGFR-2 am Endothel der Umbilikalarterie kann in dieser Dissertationsschrift dokumentiert werden.

Mittels Immunhistochemie und nachfolgender bildanalytischer Auswertung wird eine unterschiedliche Immunreaktivität in den einzelnen Gruppen nachgewiesen. Während sich die nichtperfundierte, nichtbehandelte Gruppe (0-Probe) und die perfundierte, nichtbehandelte Gruppe (-VEGF) sowohl in ihrem Gehalt an VEGFR-1, als auch in ihrem Gehalt an VEGFR-2 nicht signifikant voneinander unterscheiden, findet sich bei beiden Rezeptor-Tyrosin-Kinasen ein signifikanter Anstieg in der perfundierten, mit VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe (+VEGF). VEGF₁₆₅ übt also einen modulatorischen Effekt auf die Expression seiner Rezeptoren am Endothel der humanen Nabelschnurarterie aus. Auch bei *in vitro*-Studien an Endothelzellen konnte eine signifikant verstärkte Expression von VEGFR-2/Flk-1 als Folge einer Stimulation mit VEGF bereits nach 4 Stunden nachgewiesen werden (Infanger M et al., 2006); diese Wirkung war aber nach 12 Stunden wieder rückläufig. Dies stützt die Hypothese, dass die lokale Applikation von VEGF bzw. unter physiologischen Bedingungen die lokale Expression von VEGF und die konsekutive Erhöhung der Expression des VEGF-Rezeptors Flk-1 das vaskuläre Remodeling zum Beispiel nach einer vaskulären Läsion fördert (Infanger M et al., 2005). Die endotheliale Expression von Flt-1, die ebenfalls von VEGF stimuliert wird, scheint nötig zu sein, um unter pathologischen Konditionen, die mit einer erhöhten VEGF-Expression einhergehen, die Freisetzung von Überlebensfaktoren zu induzieren (LeCouter J et al., 2003). Ferner spielen VEGF und Flt-1 eine essenzielle Rolle in der Entwicklung einer neointimalen Formation nach Verletzung (Zhao Q et al., 2004).

VEGF wirkt konventionell als endothelzellspezifischer Wachstumsfaktor und vermindert zusammenfassend betrachtet vaskuläre Erkrankungen, indem er die Proliferation von Endothelzellen hauptsächlich über Flk-1 induziert. Darüber hinaus ist zu vermuten, dass die Expression von Flt-1 und Flk-1 in verletzten Gefäßen funktionell erhöht ist. In diesem Modell kann eine verstärkte Expression von VEGFR-1 und VEGFR-2 am Endothel der Nabelschnurarterie erst nach intraluminaler Applikation von VEGF beobachtet werden. Das legt nahe, dass das hier etablierte Perfusionsmodell ohne vaskuläre Perfusionsläsionen arbeitet.

4.2.4 Einfluss von VEGF₁₆₅ auf β_1 -Integrin

In der densitometrischen Auswertung der Western Blots wird mit durchschnittlich 21,61 % in der unbehandelten, unperfundierten Gruppe (0-Probe) und 20,31 % in der unbehandelten, perfundierten Gruppe (-VEGF) ein nahezu identischer Gehalt an β_1 -Integrin gefunden. Nach Applikation von VEGF₁₆₅ und Perfusion von 4 Stunden Dauer lässt sich ein deutlicher Anstieg von β_1 -Integrin verzeichnen. Wegen der geringen Fallzahl von n=4 je Gruppe wurde auf eine statistische Signifikanzanalyse verzichtet.

Wachstumsfaktoren wie beispielsweise Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) aber auch TGF- β_1 sind in der Lage, *in vivo* Angiogenese zu induzieren und *in vitro* das Migrations- und Proliferationsverhalten von Endothelzellen zu beeinflussen. Ein Mechanismus, der diese Effekte vermittelt, ist der regulatorische Einfluss dieser Substanzen auf die Expression und Aktivität von Integrin-Rezeptoren. Die Fähigkeit von Wachstumsfaktoren, die Expression spezifischer Integrine zu modulieren, ist an mikrovaskulären Endothelzellen *in vitro* dokumentiert. Endotheliale Zellen zeigen nach Stimulation mit bFGF oder TGF- β_1 einen Anstieg der Biosynthese von Integrinen, darunter auch β_1 -Integrine (Enestein J et al., 1992). Diese Daten sowie der in dieser Arbeit präsentierte Anstieg von β_1 -Integrin an der humanen Nabelarterie infolge der Applikation von VEGF deuten darauf hin, dass VEGF einen positiven Stimulus auf die Expression und das Profil von Integrinen darstellt und die Interaktion von Endothelzellen und EZM während der Neovaskularisation und vaskulären Remodeling-Prozessen beeinflusst. Da β_1 -Integrin auch als Kollagen- und Lamininrezeptor fungiert und bidirektional in der Kommunikation von Zelle und EZM vermittelt, erhalten Endothelzellen durch eine stärkere Expression von β_1 -Integrin nach Stimulus durch VEGF möglicherweise ein stärkeres Migrationspotential durch die Basalmembran und das interstitielle Bindegewebe.

5 Zusammenfassung

Diese Dissertation untersucht die frühen Effekte von VEGF auf die Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) und auf die vaskuläre Permeabilität an humanen Umbilikalarterien.

Es ist bekannt, dass VEGF die Akkumulation von Proteinen der EZM in mesangialen und endothelialen Zellen induziert und zu einer gesteigerten vaskulären Permeabilität führt. So ist eine Vielzahl an Erkrankungen, die mit lokalen und generalisierten Ödemen einhergehen, durch einen erhöhten Serumspiegel von VEGF gekennzeichnet.

Die Untersuchungen dieser Arbeit werden mit einem eigens etablierten Perfusionsmodell der humanen Nabelschnur durchgeführt. Die Nabelschnüre von reifen, gesunden Neugeborenen, die via Sectio caesarea entbunden wurden, werden in 3 Untersuchungsgruppen randomisiert:

1. nicht perfundierte unbehandelte Nabelschnursegmente (0-Probe),
2. perfundierte unbehandelte Nabelschnursegmente (-VEGF) sowie
3. perfundierte mit VEGF₁₆₅ behandelte Nabelschnursegmente (+VEGF).

Der Untersuchung, Präparation und intraarteriellen Applikation von VEGF₁₆₅ (2 ng/ml) oder Kontrollmedium folgt eine Adaptationszeit von 90 Minuten Dauer bei 37 °C. Im Anschluss werden die Nabelschnursegmente für 4 Stunden perfundiert. Arterieller Perfusionsdruck und vaskulärer Fluss werden kontinuierlich gemessen. Die Gefäße werden nach Abschluss des Experiments mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Sirius-Rot-Färbung, Polarisationslicht-Mikroskopie, Transmissionselektronenmikroskopie, Immunhistochemie und Western Blot-Analyse untersucht. Das interstitielle Ödem wird durch die Extravasation des Farbstoffes Evans Blau visualisiert und vermessen.

Durch die Extravasation von Evans Blau kann nach 4 Stunden Perfusion ein signifikantes interstitielles Ödem in der VEGF₁₆₅-behandelten Gruppe gefunden werden.

Mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen und Western Blot-Analysen wird nachgewiesen, dass die intraarterielle Applikation von VEGF₁₆₅ zu einer signifikanten Zunahme der EZM-Proteine Kollagen Typ IV und Laminin im Vergleich zur nicht perfundierten unbehandelten (0-Probe) und zur perfundierten unbehandelten Kontrollgruppe (-VEGF) führt.

Darüber hinaus kommt es zu einer signifikanten Induktion von Flt-1, Flk-1 und Osteopontin nach VEGF₁₆₅-Behandlung, die immunhistochemisch und mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen wird. Parallel findet sich ein Anstieg von β_1 -Integrin.

Die in dieser Dissertationsschrift präsentierten Daten dokumentieren, dass die intraluminale Applikation von VEGF₁₆₅ zu einem signifikanten Anstieg der Proteine der EZM in der humanen

Umbilikalarterie führt. Osteopontin und β_1 -Integrin werden ebenfalls von VEGF₁₆₅ induziert und sind möglicherweise von entscheidender Bedeutung bei vaskulären Remodeling-Prozessen.

Die Erhöhung der vaskulären Permeabilität durch die Interaktion von VEGF₁₆₅ mit seinen Rezeptoren spielt auch im Bereich der Umbilikalarterie eine Rolle.

Weitere Untersuchungen müssen an einem *in vivo*-Modell durchgeführt werden, um die Ergebnisse dieser Dissertation zu validieren.

Da die Konditionen der *in vivo*-Situation sehr ähnlich sind, können mit dem hier etablierten Modell pharmakologische und gefäßbiologische *ex vivo*-Studien an menschlichen Gefäßen durchgeführt werden. Dadurch können Tierversuche auf dem Gebiet der vaskulären Biologie und Pharmakologie ersetzt werden.

6 Summary

VEGF induces extracellular matrix (ECM) accumulation in mesangial and endothelial cells. The precise mechanisms that mediate VEGF-induced ECM expansion remain poorly characterized. Therefore, we established a human perfusion model to investigate the early effects of VEGF on ECM proteins and vascular leakage in human umbilical arteries.

In a human vessel perfusion model, we investigated the impact of intraluminal application of VEGF₁₆₅ (n=10; dose 2 ng/ml) on the umbilical artery. 10 other umbilical cords served as non-treated controls and 10 segments of umbilical cords served as non-perfused, non-treated controls. Arterial pressure and vascular flow were measured online. Vessels were evaluated by Hematoxylin Eosin staining, Sirius red staining, polarization microscopy, electron microscopy, Western blotting and immunohistochemistry. Evans blue extravasation was used to determine a tissue edema. A significant tissue edema was detected after 4 h in VEGF treated arteries. VEGF₁₆₅ significantly increased laminin and collagen type IV compared to perfused and non-perfused controls. Furthermore, VEGF treatment significantly induced Flt-1, Flk-1 and osteopontin. In parallel, we detected a significant increase in β_1 -integrin.

Our data clearly document for the first time that intraluminal application of VEGF increases ECM proteins in the umbilical artery. Osteopontin and β_1 -integrin induced by VEGF may play an important role in the vascular remodeling process.

7 Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
APS	Ammoniumpersulfat
APTS	3-Aminopropyl-Triethoxysilane
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphat
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
bidest.	bidestilliert
BMP	Bone morphogenetic proteins
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
DAB	3,3-Diaminobenzidin
EGF	Epidermal Growth Factor
EM	Elektronenmikroskopie
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGF	Fibroblast Growth Factor
Flk-1	Fetal liver kinase
Flt	Fms-like tyrosine kinase
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxilin-Eosin
HIF	Hypoxia-inducible Factor
HRP	Horseradish Peroxidase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IL	Interleukin
IUGR	Intrauterine growth retardation
kb	Kilo-Basen = 1000 Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton = 1000 Dalton
KGF	Keratinocyte Growth Factor
LM	Lichtmikroskopie
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger ribonucleic acid
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NBT	Nitroblautetrazolium

NO	Stickstoffmonoxid
NP	Neuropilin
OPN	Osteopontin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered Saline
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PI	Phosphatidyl-Inositol
PIGF	Placenta Growth Factor
PM	Polarisationsmikroskopie
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RER	Rauhes endoplasmatisches Retikulum
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sFlt-1	Soluble Flt-1
SR	Sirius-Rot
SUA	Singuläre Umbilikalarterie
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
u. a.	unter anderem
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	VEGF-Rezeptor
versch.	verschieden/e
VHL	von-Hippel-Lindau
VPF	Vaskulärer Permeabilitätsfaktor
WS	Wharton-Sulze

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Durch VEGF-Rezeptoren aktivierte Signaltransduktionswege (S. 5)
- Abbildung 2: VEGF-Molekül (S. 7)
- Abbildung 3: Schematische Darstellung der VEGF-Rezeptoren und ihrer Liganden (S. 9)
- Abbildung 4: Schematische Darstellung einer mittelgroßen muskulären Arterie mit ihren Schichten (S. 21)
- Abbildung 5: Konstruktionszeichnung der Perfusionskammer (S. 35)
- Abbildung 6: Foto der perfundierten Nabelschnur in der Perfusionskammer (S. 35)
- Abbildung 7: Schema des Aufbaus der Perfusionsapparatur (S. 36)
- Abbildung 8: Foto der Perfusionsapparatur (S. 36)
- Abbildung 9: Grafische Darstellung des arteriellen Perfusionsdrucks [mmHg] während des Versuches (S. 53)
- Abbildung 10: Grafische Darstellung des arteriellen Flusses [ml/min.] während des Versuches (S. 54)
- Abbildung 11: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Wassergehaltsanalyse (S. 56)
- Abbildung 12: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Evans Blau-Extravasation (S. 58)
- Abbildung 13: Fotografische Aufnahme der Evans Blau-Farbstoffextravasation (S. 58)
- Abbildung 14: Mikroskopische Aufnahme der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (S. 60)
- Abbildung 15: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme des Endothels (S. 61)
- Abbildung 16: Lichtmikroskopische (LM) Aufnahme der Sirius-Rot-Färbung und polarisationsmikroskopische (PM) Aufnahme (S. 63)
- Abbildung 17: Grafische Darstellung der Western Blot-Analyse von β_1 -Integrin (S. 65)
- Abbildung 18: Grafische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen Kollagen Typ IV-Färbung (S. 67)
- Abbildung 19: Mikroskopische Aufnahme der immunhistochemischen Färbung Kollagen Typ IV (S. 68)
- Abbildung 20: Grafische Darstellung der Western Blot-Analyse von Kollagen Typ IV (S. 70)
- Abbildung 21: Grafische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen Laminin-Färbung (S. 72)
- Abbildung 22: Mikroskopische Aufnahme der immunhistochemischen Färbung Laminin (S. 73)
- Abbildung 23: Grafische Darstellung der Western Blot-Analyse von Laminin (S. 75)

- Abbildung 24: Grafische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen Osteopontin-Färbung (S. 77)
- Abbildung 25: Mikroskopische Aufnahme der immunhistochemischen Färbung Osteopontin (S. 78)
- Abbildung 26: Grafische Darstellung der Western Blot-Analyse von Osteopontin (S. 80)
- Abbildung 27: Grafische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen VEGF-Färbung (S. 82)
- Abbildung 28: Mikroskopische Aufnahme der immunhistochemischen Färbung VEGF (S. 83)
- Abbildung 29: Grafische Darstellung der Western Blot-Analyse von VEGF (S. 85)
- Abbildung 30: Grafische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen Flk-1-Färbung (S. 87)
- Abbildung 31: Mikroskopische Aufnahme der immunhistochemischen Färbung Flk-1 (S. 88)
- Abbildung 32: Grafische Darstellung der Western Blot-Analyse von Flk-1 (S. 90)
- Abbildung 33: Grafische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen Flt-1-Färbung (S. 92)
- Abbildung 34: Mikroskopische Aufnahme der immunhistochemischen Färbung Flt-1 (S. 93)
- Abbildung 35: Grafische Darstellung der Western Blot-Analyse von Flt-1 (S. 95)

8.2 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Übersicht der Primärantikörper und der entsprechenden Demaskierungsmaßnahmen, Konzentrationen, Inkubationsdauer und verwendeten Sekundärantikörper (S. 42)
- Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper und der entsprechenden Konzentrationen, Inkubationsdauer und Entwicklungssubstrate (S. 42)
- Tabelle 3: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele (S. 46)
- Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Primärantikörper mit Konzentrationen und verwendeten Sekundärantikörper (S. 48)
- Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Wassergehaltsanalyse (S. 56)
- Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der statistischen Auswertung der Wassergehaltsanalyse (S. 56)
- Tabelle 7: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Evans Blau-Extravasation (S. 57)
- Tabelle 8: Tabellarische Darstellung der statistischen Auswertung der Evans Blau-Extravasation (S. 57)

- Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot-Analyse von β_1 -Integrin (S. 65)
- Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen Kollagen Typ IV-Färbung (S. 67)
- Tabelle 11: Tabellarische Darstellung der statistischen Auswertung der Bildanalyse von der immunhistochemischen Kollagen Typ IV-Färbung (S. 67)
- Tabelle 12: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot-Analyse von Kollagen Typ IV (S. 70)
- Tabelle 13: Tabellarische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen Laminin-Färbung (S. 72)
- Tabelle 14: Tabellarische Darstellung der statistischen Auswertung der Bildanalyse von der immunhistochemischen Laminin-Färbung (S. 72)
- Tabelle 15: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot-Analyse von Laminin (S. 75)
- Tabelle 16: Tabellarische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen Osteopontin-Färbung (S. 77)
- Tabelle 17: Tabellarische Darstellung der statistischen Auswertung der Bildanalyse von der immunhistochemischen Osteopontin-Färbung (S. 77)
- Tabelle 18: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot-Analyse von Osteopontin (S. 80)
- Tabelle 19: Tabellarische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen VEGF-Färbung (S. 82)
- Tabelle 20: Tabellarische Darstellung der statistischen Auswertung der Bildanalyse von der immunhistochemischen VEGF-Färbung (S. 82)
- Tabelle 21: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot-Analyse von VEGF (S. 85)
- Tabelle 22: Tabellarische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen Flk-1-Färbung (S. 87)
- Tabelle 23: Tabellarische Darstellung der statistischen Auswertung der Bildanalyse von der immunhistochemischen Flk-1-Färbung (S. 87)
- Tabelle 24: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot-Analyse von Flk-1 (S. 90)
- Tabelle 25: Tabellarische Darstellung der bildanalytischen Ergebnisse von der immunhistochemischen Flt-1-Färbung (S. 92)
- Tabelle 26: Tabellarische Darstellung der statistischen Auswertung der Bildanalyse von der immunhistochemischen Flt-1-Färbung (S. 92)

Tabelle 27: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot-Analyse von Flt-1 (S. 95)

9 Literaturverzeichnis

Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, Nguyen H, Aiello LM, Ferrara N, King GL. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med.* 1994;331:1480-1487

Aird WC. Spatial and temporal dynamics of the endothelium. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1392-1406

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the Cell.* Garland Publishing, New York and London 1994

Arens Y, Chapados RA, Cox BE, Kamm KE, Rosenfeld CR. Differential development of umbilical and systemic arteries. II. Contractile proteins. *Am J Physiol.* 1998;274:1815-1823

Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation in endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvas Res.* 1977;14:53-65

Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Shibuya M, Collen D, Conway EM, Carmeliet P. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med.* 2003;9:936-943

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996;87:3336-3343

Bassett DL The changes in the vascular pattern of the ovary of the albino rat during the estrous cycle. *Am J Anat.* 1943;73:251-278

Bates DO, Curry FE Vascular endothelial growth factor increases hydraulic conductivity of isolated perfused microvessels. *Am J Physiol.* 1996;271:2520-2528

Bates DO, Curry FE. Vascular endothelial growth factor increases microvascular permeability via a Ca(2+)-dependent pathway. *Am J Physiol.* 1997;273:687-694

Bates DO, Harper SJ. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul Pharmacol.* 2002;39:225-237

Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M, Mould A, Cahill MM, Tonks ID, Grimmond SM, Townson S, Wells C, Little M, Cummings MC, Hayward NK, Kay GF. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res.* 2000;86:29-35

Benirschke K, Brown WH. A vascular anomaly of the umbilical cord. *Obstet Gynecol.* 1995;6:399

Benirschke K, Kaufmann P. Pathology of the Human Placenta. 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 2000

Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:235-242

Borges E, Jan Y, Ruoslahti E. Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain. *J Biol Chem.* 2000;275:39867-39873

Boyd JD, Hamilton WJ. The human placenta. Heffer, Cambridge 1970

Brauchle M, Funk JO, Kind P, Werner S. Ultraviolet B and H₂O₂ are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. *J Biol Chem.* 1996;271:21793-21797

Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL, Schnitt SJ. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol.* 1995;26:86-91

Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol.* 1993;143:1255-1262

Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res.* 1993;53:4727-4735

Broxmeyer HE, Cooper S, Li ZH, Lu L, Song HY, Kwon BS, Warren RE, Donner DB. Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. *Int J Hematol.* 1995;62:203-215

Bühling KJ, Lepenies J, Witt K. Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pathologie. Urban und Fischer Verlag, München, Jena 2000

Byzova TV, Goldman CK, Pampori N, Thomas KA, Bett A, Shattil SJ, Plow EF. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol Cell.* 2000;6:851-860

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 1996;380:435-439

Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell.* 1999;98:147-157

Catini C, Gheri G. The glycosaminoglycans in the human umbilical cord. *Arch Ital Anat Embriol.* 1983;88:359-373

Christenson LK, Stouffer RL. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:2135-2142

Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pan YC, Olander JV, Connolly DT, Stern D. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med.* 1990;172:1535-1545

Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1996;271:736-741

Colognato H, Yurchenko PD. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn.* 2000;21:213-234

Deckers MM, van Bezooijen RL, van Der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE, Lowik CW. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology.* 2002;143:1545-1553

Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J.* 1993;7:1475-1482

Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest.* 2001;107:1055-1061

Deroanne CF, Hajitou A, Calberg-Bacq CM, Nusgens BV, Lapiere CM. Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine upregulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* 1997;57:5590-5597

Detmar M, Yeo KT, Nagy JA, Van de Water L, Brown LF, Berse B, Elicker BM, Ledbetter S, Dvorak HF. Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol.* 1995;105:44-50

Di Naro E, Ghezzi F, Raio L, Franchi M, D'Addario V. Umbilical cord morphology and pregnancy outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001;96:150-157

Dor Y, Porat R, Keshet E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol.* 2001;280:1367-1374

Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresh DA. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell*. 1999;4:915-924

Ellis LM, Takahashi Y, Fenoglio CJ, Cleary KR, Bucana CD, Evans DB. Vessel counts and vascular endothelial growth factor expression in pancreatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer*. 1998;34:337-340

EI-Tanani MK, Campbell FC, Kurisetty V, Jin D, McCann M, Rudland PS. The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006;17:463-474

Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94:4273-4278

Enestein J, Waleh NS, Kramer RH. Basic FGF and TGF-beta differentially modulate integrin expression of human microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res*. 1992;203:499-503

Engsig MT, Chen QJ, Vu TH, Pedersen AC, Therkidsen B, Lund LR, Henriksen K, Lenhard T, Foged NT, Werb Z, Delaisse JM. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol*. 2000;151:879-889

Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol*. 1998;140:947-959

Eyden BP, Ponting J, Davies H, Bartley C, Torgersen E. Defining the myofibroblast: normal tissues, with special reference to the stromal cells of Wharton's jelly in human umbilical cord. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1994;26:347-355

Farquharson C, Robins SP. Immunolocalization of collagens type I and III in the arterial wall of the rat. *Histochem J* 1989;21:172-178

Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocr Rev*. 2004;25:581-611

Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med.* 1998;4:336-340

Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997;18:4-25

Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;161:851-858

Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth family of proteins. *Endocr Rev.* 1992;13:18-32

Finkenzeller G, Sparacio A, Technau A, Marme D, Siemeister G. Sp 1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene.* 1997;15:669-676

Fournier E, Birnbaum D, Borg JP. Receptors for factors of the VEGF family. *Bull Cancer.* 1997;84:397-403

Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes- implication for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem.* 1995;270:12607-12613

Fraser HM, Dickson SE, Lunn SF, Wulff C, Morris KD, Carroll VA, Bicknell R. Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology.* 2000;141:995-1000

Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol.* 1994;124:619-626

Fuh G, Garcia KC, de Vos AM. The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J Biol Chem.* 2000;275:26690-26695

Fuh G, Li B, Crowley C, Cunningham B, Wells JA. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1998;273:11197-11204

Fukai F, Mashimo M, Akiyama K, Goto T, Tanuma S, Katayama T. Modulation of apoptotic cell death by extracellular matrix proteins and a fibronectin-derived antiadhesive peptide. *Exp Cell Res.* 1998;242:92-99

Gan L, Sjogren LS, Doroudi R, Jern S. A new computerized biomechanical perfusion model for ex vivo study of fluid mechanical forces in intact conduit vessels. *J Vasc Res.* 1999;36:78-78

Gebrane-Younes J, Hoang NM, Orcel L. Ultrastructure of human umbilical vessels: a possible role in amniotic fluid formation? *Placenta.* 1986;7:173-185

Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two VEGF receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem.* 1997;272:23659-23667

Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1998;273:13313-13316

Gerber HP, Ferrara N. The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. *J Mol Med.* 2003;81:20-31

Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller G-A, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development.* 1999;126:1149-1159

Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. VEGF regulates endothelial cell survival by the PI3-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem.* 1998;273:30336-30343

Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med.* 1999;5:623-628

Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck T, Pelletier N, Ferrara N. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific VEGF mutants. *J Biol Chem*. 2001;276:3222-3230

Goad DL, Rubin J, Wang H, Tashjian AH, Patterson C. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor 1. *Endocrinology*. 1996;137:2262-2268

Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D, Augustin HG. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest*. 1998;78:1385-1394

Grad S, Ertel W, Keel M, Infanger M, Vonderschmitt DJ, Maly FE. Strongly enhanced serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) after polytrauma and burn. *Clin Chem Lab Med*. 1998;36:379-383

Guerrin M, Moukadiri H, Chollet P, Moro F, Dutt K, Malecaze F, Plouet J. Vasculotropin/vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for human retinal pigment epithelial cells cultured in vitro. *J Cell Physiol*. 1995;164:385-394

Guidi AJ, Abu Jawdeh G, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in endometrial carcinoma. *Cancer*. 1996;78:454-460

Guo D, Jia Q, Song HY, Warren RS, Donner DB. Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *J Biol Chem*. 1995;270:6729-6733

Haigh JJ, Morelli PI, Gerhardt H, Haigh K, Tsien J, Damert A, Miquerol L, Muhlner U, Klein R, Ferrara N, Wagner EF, Betsholtz C, Nagy A. Cortical and retinal defects caused by dosagedependent reductions in VEGF-A paracrine signaling. *Dev Biol*. 2003;262:225-241

Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev*. 2005;85:979-1000

Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*. 1997;277:48-50

Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tateno M, Hicklin DJ, Zhu Z, Witte L, Crystal RG, Moore MA, Rafii S. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2001;193:1005-1014

Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, Hendrikx J, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Werb Z, Lyden D, Rafii S. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med.* 2002;8:841-849

Hay E. Cell biology of Extracellular Matrix. Plenum Press. New York and London 1951.

Heifetz SA. Single umbilical artery: a statistical analysis of 237 autopsy cases and review of the literature. *Perspect Pediatr Pathol.* 1984;8:345-352

Hippenstiel S, Krüll M, Ikemann A, Risau, W, Clauss, M, Suttorp N. VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells. *Am J Physiol.* 1998;274:678-684

Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lungspecific metastasis. *Cancer Cell.* 2002;2:289-300

Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol.* 1991;5:1806-1814

Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem.* 1992;267:26031-26037

Hull ML, Charnock-Jones DS, Chan CL, Bruner-Tran KL, Osteen KG, Tom BD, Fan TP, Smith SK. Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:2889-2899

Hyne RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002;110:673-687

Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin Jr WG, Goldberg MA. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci*. 1996;93:10595-10599

Infanger M, Kossmehl P, Shakibaei M, Baatout S, Witzing A, Grosse J, Bauer J, Cogoli A, Faramarzi S, Derradji H, Neefs M, Paul M, Grimm D. Induction of three-dimensional assembly and increase in apoptosis of human endothelial cells by simulated microgravity: impact of vascular endothelial growth factor. *Apoptosis*. 2006;11:749-764

Infanger M, Schmidt O, Kossmehl P, Grad S, Ertel W, Grimm D. Vascular endothelial growth factor serum level is strongly enhanced after burn injury and correlated with local and general tissue edema. *Burns*. 2004;30:305-311

Infanger M, Shakibaei M, Kossmehl P, Hollenberg SM, Grosse J, Faramarzi S, Schulze-Tanzil G, Paul M, Grimm D. Intraluminal application of vascular endothelial growth factor enhances healing of microvascular anastomosis in a rat model. *J Vasc Res*. 2005;42:202-213

Isoda K, Nishikawa K, Kamezawa Y, Yoshida M, Kusuhara M, Mroi M, Tada N, Ohsuzu F. Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation. *Circ Res*. 2002;91:77-82

Jakeman LB, Winer J, Benett GL, Altar CA, Ferrara N. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest*. 1992;89:244-253

Jingjing L, Xue Y, Agarwal N, Roque RS. Human Muller cells express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:752-759

Junqueira LC, Carneiro J. Histologie, 4. Auflage, Springer Verlag, 1996, Berlin

Junqueira LCU, Cossermelli W, Brentani. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn*. 1978;41:267-274

Kaartinen MT, Pirhonen A, Linnala-Kankkunen A, Maenpaa PH. Crosslinking of osteopontin by tissue transglutaminase increases its collagen binding properties. *J Biol Chem*. 1999;274:1729-1735

Kabrun N, Buhring HJ, Choi K, Ullrich A, Risau W, Keller G. Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development*. 1997;124:2039-2048

Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol*. 2004;5:74-80

Karkkainen MJ, Makinen T, Alitalo K. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat Cell Biol*. 2002;4:2-5

Kasper M, Moll R, Stosiek P. Distributions of intermediate filaments in human umbilical cord: Unusual triple expression of cytokeratins, vimentin and desmin. *Zool Jb Anat*. 1988;117:227-233

Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T, Fujisawa H. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development*. 1999;126:4895-4902

Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*. 1989;246:1309-1312

Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci*. 1993;90:10705-10709

Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, Ferrara N. The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem*. 1996;271:7788-7795

Koch AE, Harlow L, Haines GK, Amento EP, Unemori EN, Wong W-L, Pope RM, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: a cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 1994;152:4149-4156

Ku DD, Zaleski JK, Liu S, Brock TA. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol*. 1993;265:586-592

Lange T, Guttmann-Raviv N, Baruch L, Machluf M, Neufeld G. VEGF162, a new heparin-binding vascular endothelial growth factor splice form that is expressed in transformed human cells. *J Biol Chem*. 2003;278:17164-17169

Leali D, Dell'Era P, Stabile H, Sennino B, Chambers AF, Naldini A, Sozzani S, Nico B, Ribatti D, Presta M. Osteopontin (Eta-1) and fibroblast growth factor-2 cross-talk in angiogenesis. *J Immunol.* 2003;171:1085-1093

LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, Ferrara N. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science.* 2003;299:890-893

Lenmyr F, Ata KA, Funa K, Olsson Y, Terent A. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) following permanent and transient occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998;57:874-882

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* 1989;246:1306-1309

Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem.* 1995;270:13333-13340

Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, Endege WO, Zhou F, Lee ME. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin 1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1995;270:308-312

Li J, Zhang YP, Kirsner RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech.* 2003;60:107-114

Lopez PF, Sippy BD, Lambert HM, Thach AB, Hinton DR. Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:855-868

Mann HB, Whitney DR. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Statist.* 1947;18:50-60

Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE.* 2001;21:1-17

Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Gunther KP, Dehio C, Puhl W, Brenner RE. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone*. 2002;30:472-477

Meyer WW, Rumpelt HJ, Yao AC, Lind J. Structure and closure mechanism of the human umbilical artery. *Eur J Pediatr*. 1978;128:247-259

Miller JW, Adamis AP, Shima DT, D'Amore PA, Moulton RS, O'Reilly MS, Folkman J, Dvorak HF, Brown LF, Berse B, Yeo TK, Yeo KT. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol*. 1994;145:574-584

Miquerol L, Langille BL, Nagy A. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development*. 2000;127:3941-3946

Mole DR, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing. *IUBMB Life*. 2001;52:43-47

Morales-Ruiz M, Fulton D, Sowa G, Languino LR, Fujio Y, Walsh K, Sessa WC. Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt. *Circ Res*. 2000;86:892-896

Morbidelli L, Chang CH, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol*. 1996;270:411-415

Mueller MD, Vigne JL, Pritts EA, Chao V, Dreher E, Taylor RN. Progestins activate vascular endothelial growth factor gene transcription in endometrial adenocarcinoma cells. *Fertil Steril*. 2003;79:386-392

Muller YA, Li B, Christinger HW, Wells JA, Cunningham BC, de Vos AM. Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94:7192-7197

Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, Lawitts JA, Benjamin L, Tan X, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med*. 2002;196:1497-1506

Nanaev AK, Kohnen G, Milova AP, Domogatsky SP, Kaufmann P. Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta*. 1997;18:53-64

Neubauer K, Kruger M, Quondamatteo F, Knittel T, Saile B, Ramadori G. Transforming growth factor-beta1 stimulates the synthesis of basement membrane proteins laminin, collagen type IV and entactin in rat liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol*. 1999;31:692-702

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*. 1999;13:9-22

Neufeld G, Cohen T, Shraga N, Lange T, Kessler O, Herzog Y. The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovas Med*. 2002;12:13-19

Noll S, Schaub-Kuhnen S. Praxis der Immunhistochemie. 1. Auflage. Urban und Fischer Verlag, München, Jena, 2000

Oberg-Welsh C, Sandler S, Andersson A, Welsh M. Effects of vascular endothelial growth factor on pancreatic duct cell replication and the insulin production of fetal islet-like cell clusters in vitro. *Mol Cell Endocrinol*. 1997;126:125-132

Okada F, Rak JW, Croix BS, Lieubeau B, Kaya M, Roncari L, Shirasawa S, Sasazuki T, Kerbel RS. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95:3609-3614

Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95:11709-11714

Olson TA, Mohanraj D, Carson LF, Ramakrishnan S. Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries. *Cancer Res*. 1994;54:276-280

Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo R, Alitalo K. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res*. 1992;52:5738-5743

Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem.* 1994;269:25646-25654

Park JE, Keller G-A, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor isoforms (VEGF): differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell.* 1993;4:1317-1326

Parry EW, Abramovich DR. The ultrastructure of human umbilical vessel endothelium from early pregnancy to full term. *J Anat.* 1972;111:29-42

Patarca R, Freeman GJ, Singh RP, Wei FY, Durfee T, Blattner F, Regnier DC, Kozak CA, Mock BA, Morse, HC. Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. *J Exp Med.* 1989;170:145-161

Patz A. Studies on retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1980;19:1133-1138

Pepper MS. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost.* 2001;86:346-355

Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;189:824-831

Persutte WH, Lenke RR. Transverse umbilical arterial diameter: technique for the prenatal diagnosis of single umbilical artery. *J Ultrasound Med.* 1994;13:763-766

Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor- β in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem.* 1995;269:6271-6274

Phillips GD, Stone AM, Jones BD, Schultz JC, Whitehead RA, Knighton DR. Vascular endothelial growth factor (rh-VEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. *In Vivo.* 1994;8:961-965

Phillips HS, Armanini M, Stavrou D, Ferrara N, Westphal M. Intense focal expression of vascular endothelial growth factor mRNA in human intracranial neoplasms: association with regions of necrosis. *Int J Oncol.* 1993;2:913-919

Ploüet J, Schilling J, Gosporadowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT20 cells. *EMBO J.* 1989;8:3801-3808

Polanowska-Grabowska R, Simon CG Jr, Gear AR. Platelet adhesion to collagen type I, collagen type IV, von Willebrandt factor, fibronectin, laminin and fibrinogen: rapid kinetics under shear. *Thromb Haemost.* 1999;81:118-123

Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I, Keshet E, Neufeld G. VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem.* 1997;272:7151-7158

Raio L, Ghezzi F, Di Naro E, Gomez R, Franchi M, Mazor M, Bruhwiler H. Sonographic measurement of the umbilical cord and fetal anthropometric parameters. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999;83:131-135

Ryan AM, Eppler DB, Hagler KE, Bruner RH, Thomford PJ, Hall RL, Shopp GM, O'Neill CA. Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody. *Toxicol Pathol.* 1999;27:78-86

Scharl A. New knowledge concerning "Hoboken's valves" of the umbilical artery. *Z Geburtshilfe Perinatol.* 1986;190:266-274

Schiffrin EL. The endothelium and control of blood-vessel function in health and disease. *Clin Invest Med.* 1994;17:602-602

Schoenberger J, Grimm D, Kossmehl P, Infanger M, Kurth E, Eilles C. Effects of PTK787/ZK222584, a tyrosine kinase inhibitor, on the growth of a poorly differentiated thyroid carcinoma: An animal study. *Endocrinology.* 2004;145:1031-1038

Schwartz MA. Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol.* 2001;11:466-470

Schwarzenbach H, Chakrabarti G, Paust HJ, Mukhopadhyay AK. Gonadotropin-mediated regulation of the murine VEGF expression in MA-10 Leydig cells. *J Androl.* 2004;25:128-139

Selvaraj SK, Giri RK, Perelman N, Johnson C, Malik P, Kalra VK. Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. *Blood*. 2003;102:1515-1524

Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol*. 2002;64:993-998

Semenza G. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu Rev Med*. 2003;54:17-28

Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, Feder J, Dvorak HF. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res*. 1990;50:1774-1778

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219:983-985

Senger DR, Wirth DF, Hynes RO. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell*. 1979;16:885-893

Sexton AJ, Turmaine M, Cai WQ, Burnstock G. A study of the ultrastructure of developing human umbilical vessels. *J Anat*. 1996;188:75-85

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995;376:62-66

Shen H, Clauss M, Ryan J, Schmidt AM, Tijburg P, Borden L, Connolly D, Stern D, Kao J. Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes. *Blood*. 1993;81:2767-2773

Shibutani M, Uneyama C, Miyazaki K, Toyoda K, Hirose M. Methacarn fixation: a novel tool for analysis of gene expressions in paraffin-embedded tissue specimens. *Lab invest*. 2000;80:199-208

Shifren JL, Mesiano S, Taylor RN, Ferrara N, Jaffe RB. Corticotropin regulates vascular endothelial growth factor expression in human fetal adrenal cortical cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:1342-1347

Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992;359:843-845

Sinha AA. Ultrastructure of human amnion and amniotic plaques of normal pregnancy. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1971;122:1-14

Sixma JJ, van Zanten GH, Saelman EU, Verkleij M, Lankhof H, Nieuwenhuis HK, de Groot PG. Platelet adhesion to collagen. *Thromb Haemost.* 1995;74:454-459

Sobolewski K, Bankowski E, Chyczewski L, Jaworski S. Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly. *Biol. Neonate.* 1997;71:11-21

Soh EY, Duh QY, Sobhi SA, Young DM, Epstein HD, Wong MG, Garcia YK, Min YD, Grossman RF, Siperstein AE, Clark OH. Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:3741-3747

Soh EY, Sobhi SA, Wong MG, Meng YG, Siperstein AE, Clark OH, Duh QY. Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. *Surgery.* 1996;120:944-947

Sohn C, Tercanli S, Holzgreve W. Ultraschall in Gynäkologie und Geburtshilfe. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 2003

Soker S, Fidder H, Neufeld G, Klagsbrun M. Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF₁₆₅ via its exon 7-encoded domain. *J Biol Chem.* 1996;271:5761-5767

Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell.* 1998;92:735-745

Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci.* 1999;19:5731-5740

Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:573-583

Stewart RJ, Panigrahy D, Flynn E, Folkman J. Vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis are regulated by androgens in hormone responsive human prostate carcinoma: evidence for androgen dependent destabilization of vascular endothelial growth factor transcripts. *J Urol.* 2001;165:688-693

Street J, Bao M, DeGuzman L, Bunting S, Peale Jr FV, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, Van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99:9656-9661

Suzuki K, Hayashi N, Miyamoto Y, Yamamoto M, Ohkawa K, Ito Y, Sasaki Y, Yamaguchi Y, Nakase H, Noda K, Enomoto N, Arai K, Yamada Y, Yoshihara H, Tujimura T, Kawano K, Yoshikawa K, Kamada T. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 1996;56:3004-3009

Suzuki R, Fukai N, Nagashijma G, Asai JI, Itokawa H, Nagai M, Suzuki T, Fujimoto T. Very early expression of vascular endothelial growth factor in brain oedema tissue associated with brain contusion. *Acta Neurochir Suppl.* 2003;86:277-279

Takechi K, Kuwabara Y, Mizuno M. Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells. *Placenta.* 1993;14:235-245

Tavian M, Hallais MF, Peault B. Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. *Development.* 1999;126:793-803

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;187:1579-1586

Thakahashi T, Shirasawa T, Miyake K, Yahagi Y, Maruyama N, Kasahara N, Kawamura T, Matsumura O, Mitarai T, Sakai O. Protein tyrosine kinase expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: Flt-1 and VEGF expression in renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;209:218-226

Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Chatzistefanou K, Ferrara N, Adamis AP. Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol.* 1996;114:964-970

Trampisch HJ, Windeler J, Ehle B, Lange S. Medizinische Statistik. 2. Auflage. Springer Verlag. 2000

Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99:4349-4354

Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, Kerbel RS. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;264:781-788

Vaisman N, Gospodarowicz D, Neufeld G. Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1990;265:19461-19466

Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation.* 1996;93:1493-1495

Vizza E, Correr S, Goraa V, Heyn R, Muglia U, Papagianni V. The collagen fibrils arrangement in the Wharton's jelly of full-term human umbilical cord. *Ital J Anat Embryol.* 1995;100:495-501

Volm M, Koomagi R, Mattern J, Stammers G. Angiogenic growth factors and their receptors in non-small cell lung carcinomas and their relationships to drug response in vitro. *Anticancer Res.* 1997;17:99-103

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;255:989-991

Waltenberger J, Claesson Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 1994;269:26988-26995

Wang H, Keiser JA. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1. *Circ Res*. 1998;83:832-840

Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor, H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science*. 1996;271:509-512

Whittles CE, Pocock TM, Wedge SR, Kendrew J, Hennequin LF, Harper SJ, Bates DO. ZM323881, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor-receptor-2 tyrosine kinase activity. *Microcirculation*. 2002;9:513-522

Wizigmann Voos S, Breier G, Risau W, Plate KH. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in von Hippel-Lindau disease-associated and sporadic hemangioblastomas. *Cancer Res*. 1995;155:1358-1364

Wu LW, Mayo LD, Dunbar JD, Kessler KM, Baerwald MR, Jaffe EA, Wang D, Warren RS, Donner DB. Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation. *J Biol Chem*. 2000;275:5096-5103

Xu H, Zeng L, Peng H, Chen S, Jones J, Chew TL, Sadeghi MM, Kanwar YS, Danesh FR. HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin mitigates VEGF-induced „inside-out“ signaling to extracellular matrix by preventing RhoA activation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;291:995-1004

Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J, Jin H. Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996;27:838-844

Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, Breant C, Karkkainen MJ, Alitalo K, Eichmann A. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development*. 2002;129:4797-4806

Zawisch C. Die Whartonsche Sulze und die Gefäße des Nabelstrangs. *Zeitschrift für Zellforschung*. 1955;42:94

Zhao Q, Egashira K, Hiasa K, Ishibashi M, Inoue S, Ohtani K, Tan C, Shibuya M, Takeshita A, Sunagawa K. Essential role of vascular endothelial growth factor and Flt-1 signals in neointimal formation after periadventitial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:2284-2289

10 Publikationsverzeichnis

Infanger M, Ulbrich C, Baatout S, Wehland M, Kreutz R, Bauer J, **Grosse J**, Vadrucci S, Cogoli A, Derradji H, Neefs M, Küsters S, Spain M, Paul M, Grimm D. Modeled Gravitational Unloading Induced Downregulation of Endothelin-1 in Human Endothelial Cells. *J Cell Biochem.* 2007; [Epub ahead of print] PMID: 17340622

Infanger M, Kossmehl P, Shakibaei M, Baatout S, Witzing A, **Grosse J**, Bauer J, Cogoli A, Faramarzi S, Derradji H, Neefs M, Paul M, Grimm D. Induction of three-dimensional assembly and increase in apoptosis of human endothelial cells by simulated microgravity: impact of vascular endothelial growth factor. *Apoptosis.* 2006;11:749-64

Kossmehl P, Kurth E, Faramarzi S, Habighorst B, Shakibaei M, Wehland M, Kreutz R, Infanger M, J Danser AH, **Grosse J**, Paul M, Grimm D. Mechanisms of apoptosis after ischemia and reperfusion: role of the renin-angiotensin system. *Apoptosis.* 2006;11:347-58

Infanger M, Shakibaei M, Kossmehl P, Hollenberg SM, **Grosse J**, Faramarzi S, Schulze-Tanzil G, Paul M, Grimm D. Intraluminal application of vascular endothelial growth factor enhances healing of microvascular anastomosis in a rat model. *J Vasc Res.* 2005;42:202-13.

Poster und Abstracts

S. Baatout, M. Infanger, C. Ulbrich, M. Wehland, R. Kreutz, J. Bauer, **J. Grosse**, S. Vadrucci, A. Cogoli, H. Derradji, M. Neefs, S. Küsters, M. Spain, D. Grimm. Chemokine changes induced by space-related microgravity in human endothelial cells. Präsentation, 11th joint annual conference of the Belgian and French societies for cytometry, Bruges, Belgium, 18-20/10/2006

S. Baatout, H. Derradji, M. Infanger, C. Ulbrich, M. Wehland, R. Kreutz, J. Bauer, S. Bekaert, A. Chouker, **J. Grosse**, S. Vadrucci, A. Cogoli, M. Neefs, S. Küsters, M. Spain, D. Grimm. Multiplex array assay for space and radiation biology. Präsentation, annual Planet xMAP Europe Scientific and Technology Symposium, Amsterdam, Netherlands, 3-4/10/2006

S. Baatout, M. Infanger, C. Ulbrich, M. Wehland, R. Kreutz, J. Bauer, **J. Grosse**, S. Vadrucci, A. Cogoli, H. Derradji, M. Neefs, S. Küsters, M. Spain, D. Grimm. Space-related microgravity in human endothelial cells: chemokine changes. Poster und Abstract, annual Planet xMAP Europe Scientific and Technology Symposium, Amsterdam, Netherlands, 3-4/10/2006

S. M. Hollenberg, M. Infanger, P. Kossmehl, M. Paul, **J. Grosse**, D. Grimm. Die Rolle von VEGF bei der mikrovaskulären Anastomose im Rattenmodell. Poster und Abstract, 29. Wissenschaftlicher Kongress Deutsche der Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdruckes, Berlin, Deutschland, 2005

11 Danksagung

Ich danke Frau PD Dr. med. Daniela Grimm und Herrn PD Dr. med. Manfred Infanger für die Überlassung des interessanten Themas, die Balance zwischen selbstständigem Arbeiten und ausgezeichneter Betreuung von der Modellplanung bis zur Korrektur der Dissertation und die Möglichkeit, an anderen wissenschaftlichen Projekten mitzuwirken.

Herrn Prof. Dr. med. Martin Paul möchte ich für die Möglichkeit danken, am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie zu arbeiten.

Herrn Dr. med. Peter Koßmehl danke ich besonders für seine fachliche Unterstützung und seine Hilfe bei Planung, Experiment und Auswertung.

Frau Shideh Famarzi sei für die Einarbeitung in immunhistochemische Arbeitsmethoden gedankt.

Frau Claudia Ulbrich möchte ich sehr herzlich für ihre konstruktive Hilfe bei der kritischen Durchsicht der Dissertation danken.

Herrn Prof. Dr. med. vet. Mehdi Shakibaei und seiner Arbeitsgruppe gebührt Dank für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und die Einarbeitung in die Western Blot-Analyse. Benjamin Kohl danke ich ganz besonders für sein großes Engagement und seine ebenso freundliche wie freundschaftliche Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. med. Hopp, Herrn Prof. Dr. med. Dudenhausen sowie den Ärzten und Hebammen der Kreißsaalteams des Campus Benjamin Franklin und des Campus Rudolph Virchow möchte ich ebenso wie den Müttern für ihre freundliche Unterstützung herzlich danken.

Frau Ulrike Geister gebührt besonders herzlicher Dank für Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen.

Der herzlichste Dank gilt meinen Eltern.

12 Curriculum Vitae

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

13 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Jirka Grosse, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Induktion von Proteinen der extrazellulären Matrix durch VEGF in perfundierten Arterien der humanen Nabelschnur“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 28. März 2007

Jirka Grosse