

Aus dem Institut für Pathologie, Abteilung Paidopathologie und Placentologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Gefäßentwicklung bei
Plazentabildungsstörungen unter dem
Gesichtspunkt der Expression der
angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF,
bFGF und Angiopoietin-1.**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Uta Wilke
aus Königs Wusterhausen

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. M. Guschmann
 2. Prof. Dr. med. W. Friedmann
 3. Prof. Dr. med. J. W. Dudenhausen

Datum der Promotion: 18.09.2009

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	4
1.1	Die Plazenta	4
1.1.1	Reifung der Plazenta	4
1.1.2	Das vaskuläre System	6
1.1.2.1	Vaskulogenese	6
1.1.2.2	Angiogenese	7
1.1.2.3	Plazentare Gefäßausbildung	8
1.2	Die Rolle der Wachstumsfaktoren	9
1.2.1	VEGF	10
1.2.1.1	VEGF-Rezeptoren	13
1.2.2	BFGF	15
1.2.2.1	BFGF-Rezeptoren	17
1.2.3	Angiopoietine	17
1.2.3.1	Angiopoietin-1-und 2	17
1.2.3.2	Angiopoietin-Rezeptoren	19
1.3	Plazentabildungsstörungen	20
1.3.1	Definition, Einteilung und Häufigkeit der Plazentabildungsstörungen	20
1.3.2	Embryonalmolen	21
1.3.3	Partialmolen	22
1.3.4	Blasenmolen	24
1.3.5	Windmolen	26
2	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	28
3	MATERIAL UND METHODEN	31
3.1	Das Untersuchungskollektiv	31
3.1.1	Einschlusskriterien	31
3.1.2	Ausschlusskriterien	31
3.2	Materialien	32
3.2.1	Chemikalien	32
3.2.2	Geräte und sonstige Materialien	33

3.3	Methoden	33
3.3.1	Die Herstellung und Vorbehandlung der Paraffinschnitte	33
3.3.2	Immunhistochemische Färbung-„APAAP-Methode“	35
3.3.2.1	Theoretische Abhandlung	35
3.3.2.2	Protokoll der immunhistochemischen Färbung mit VEGF (Ab-3)	36
3.3.2.3	Protokoll der immunhistochemischen Färbung mit bFGF (Ab-3)	38
3.3.2.4	Protokoll der immunhistochemischen Färbung mit Ang-1/4 (C-19):sc 9360	39
3.3.2.5	Die Gegenfärbung der Gewebeschnitte	40
3.3.3	Auswertung mit Hilfe des Lichtmikroskopes	40
3.4	Statistik	43
4	ERGEBNISSE	44
4.1	Klinische Befunde und deskriptive Statistik	44
4.2	Auswertung der immunhistochemischen Färbung	45
4.2.1	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit VEGF	45
4.2.1.1	Embryonalmolen	45
4.2.1.2	Partialmolen	48
4.2.1.3	Blasenmolen	48
4.2.1.4	Windmolen	50
4.2.2	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit bFGF	54
4.2.2.1	Embryonalmolen	54
4.2.2.2	Partialmolen	55
4.2.2.3	Blasenmolen	56
4.2.2.4	Windmolen	56
4.2.3	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit Angiopietin-1	59
4.2.3.1	Embryonalmolen	59
4.2.3.2	Partialmolen	61
4.2.3.3	Blasenmolen	62
4.2.3.4	Windmolen	63

5	DISKUSSION	68
5.1	Diskussion des Expressionsverhaltens von VEGF, bFGF und Angiopoietin-1 innerhalb der Plazentabildungsstörungen	69
5.2	Diskussion des Expressionsverhaltens von VEGF, bFGF und Angiopoietin-1 im Vergleich zu regelhaften Plazenten	70
5.3	Diskussion des Einflusses von VEGF, bFGF und Angiopoietin-1 auf die Gefäßentwicklung von Plazentabildungsstörungen	74
6	ZUSAMMENFASSUNG	80
7	LITERATURVERZEICHNIS	83
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	94
9	DANKSAGUNG	95
10	LEBENS LAUF	96
11	ERKLÄRUNG AN EIDES STATT	97

1 Einleitung

1.1 Die Plazenta

1.1.1 Reifung der Plazenta (Frühentwicklung)

Die Plazenta als Stoffwechselorgan zur Erhaltung des intrauterinen Lebens des Embryos/Feten ist einer ständig zunehmenden Funktionsanforderung unterworfen. Die begrenzte Wachstumsmöglichkeit der Plazenta steht im Gegensatz zum immer steigenden Nährstoffbedarf des Kindes. Um dieser Aufgabe gerecht zu werden, macht die Plazenta eine Reihe von Wachstums- und Differenzierungsprozessen durch (Schneider, 2006; Horn, 1991). Hierfür ist eine extensive Angiogenese zur Bildung vaskulärer Strukturen innerhalb der fetalen Zotten sowie in der maternalen Dezidua unabdingbar (Cross, 1994).

Die Entwicklung der menschlichen Plazenta beginnt etwa am 4. Tag nach der Befruchtung. Die befruchtete Eizelle befindet sich im Morula-Stadium und hat das Cavum uteri erreicht. Es dringt Flüssigkeit aus dem Uteruslumen in die Morula ein und drängt die Blastomeren auseinander. In diesem Stadium lassen sich zwei Zellarten voneinander abgrenzen: eine äußere Zelllage (Trophoblast; spätere Plazenta) und eine innere Zelllage (Embryoblast; späterer Embryo) (Scheuner, 1989).

Es wird in der Frühphase der Plazentation ein lakunäres Stadium (noch ohne Zotten), ein Zottenstadium (Primärzotten) und ein Stadium der Zottenverzweigung (Sekundär- und Tertiärzotten) unterschieden.

Das lakunäre Stadium, am 5.- 6. Tag post conceptionem, beginnt mit der gerichteten Einnistung der Blastozyste, in dem der Embryoblasten tragende Pol die Oberfläche des Endometriums als erstes berührt und an dieser haftet. Mit der Implantation beginnt die Bildung der Leibesfrucht. Am Implantationspol erfährt der Trophoblast ein rasches Dickenwachstum und dringt infolge lytischer Aktivität in die mütterliche Schleimhaut ein. Die Implantation wird durch eine Reihe von löslichen Proteinen gesteuert, die vom Trophoblastepithel und den dezidualen Stroma- und Immunzellen produziert werden (Schneider, 2006). Zu diesem Zeitpunkt sind zwei Zelltypen am Trophoblasten zu unterscheiden: der sich am Implantationspol rasch ausbreitende Synzytiotrophoblast mit Kontakt zum mütterlichen Gewebe und der innen liegende Zytotrophoblast (Vogel, 1996). In der ersten Phase werden die erforderlichen Nährstoffe für den Keim und die Proliferation des Trophoblasten noch durch Resorption des verflüssigten Endometriums und über Phagozytose mütterlicher Zellen und Erythrozyten gewonnen.

Die Weiterleitung der Nährstoffe zum Keim erfolgt per Diffusion über Magma reticulare und Mesenchym. Etwa um den 9. bis 12. Tag post conceptionem entstehen innerhalb des Synzytiums mehr und mehr Lakunen (kommunizierendes System von Hohlräumen), dem späteren intervillösen Raum. Zwischen den Lakunen bleibt der Trophoblast in Form von Trabekeln erhalten. Bevor es zur Eröffnung mütterlicher Gefäße kommt, reagiert das Endometrium auf die Invasion des Trophoblasten mit einer Stauung, wodurch sich die Kapillaren zu Sinusoiden aufweiten. Erst dann erfolgt die Arrosion der Endometriumgefäße und die Lakunen füllen sich mit Blut und Sekret aus den arrodierten Uterusdrüsen. Mit der Durchströmung der Lakunen kommt der uteroplazentare Kreislauf in Gang. Die Keimanlage wird unmittelbar durch Diffusion aus dem mütterlichen Blut ernährt. Etwa am 12. Tag post conceptionem ist die Implantation abgeschlossen. Die Blastozyste ist in die oberflächliche Schicht des Endometriums eingedrungen und das Uterusepithel hat sich über dem Implantationsort wieder geschlossen (Wulff, 2003; Vogel, 1996; Scheuner, 1989).

Das Stadium der Zottenbildung beginnt mit der Formierung von Primärzotten zwischen dem 13. und 15. Tag post conceptionem, gekennzeichnet durch eine gesteigerte Proliferation des Zytotrophoblasten. Die Primärzotten sprossen seitlich aus den Trophoblasttrabekeln in Richtung mütterlicher Lakunen. Sie enthalten außen einen dem mütterlichen Blut zugewandten Saum von Synzytium und einen zentralen Kern aus Zytotrophoblastzellen. Durch weiteres Wachstum dringen immer neue Primärzotten in das Lakunensystem ein. Als Stammzotten gelten jene Trabekel, welche die Verbindung zwischen Chorionplattenanlage und basaler Trophoblastschale gewährleisten (Vogel, 1996). Die Umwandlung der Primärzotten in Sekundärzotten mit zentraler Stromaachse beginnt etwa am 15. bis 16. Tag post conceptionem. Sie ist gekennzeichnet durch das Eindringen von Mesenchymzellen in die bis dahin rein trophoblastären Primärzotten (Horn, 1991). Es handelt sich hierbei um primitive Bindegewebszellen des extraembryonalen Mesenchyms, die bereits ab dem 12. Tag post conceptionem aus der Chorionplattenanlage in die Fruchthöhle wandern. Innerhalb dieses anfänglich gefäßfreien bindegewebigen Zottenkerns entwickeln sich Blutgefäße. Die einzelnen Zottengefäße anastomosieren untereinander und liefern so das typische Bild der Tertiärzotte. Die Zottengefäße anastomosieren mit den Gefäßen von Chorion und Haftstiel, ab dem 21. Tag post conceptionem zirkuliert das Blut zwischen Plazenta und Keimling.

Mit Beginn der Zirkulation reduziert sich der Diffusionsweg auf die Schichten: Zottensynzytiotrophoblast,- Zottenzytotrophoblast (Langerhans-Zellen),- Zottenbindegewebe (einschließlich Basalmembran),- und Kapillarwand (Scheuner, 1989).

1.1.2 Das vaskuläre System

Die Herausbildung der Vaskulatur sowie deren Intaktheit in Hinblick auf Gas- und Nährstofftransport zwischen Mutter und Fetus sind wichtige Voraussetzungen für eine normale embryonale Entwicklung und späteres fetales Wachstum. Störungen in diesem Entwicklungsprozess erhöhen das Risiko für Frühaborte, Restriktion des fetalen Wachstums, sowie die Rate eines intrauterinen Fruchttods (Wulff, 2003; Zygmunt, 2001).

Die Entwicklung der Vaskulatur in der Plazenta gliedert sich in zwei unterschiedliche Prozesse, die Vaskulogenese und die Angiogenese.

1.1.2.1 Vaskulogenese

Das Blutgefäßsystem ist das erste Organsystem, dass sich während der Embryonalentwicklung ausbildet (Hawighorst, 2002; Kroll, 2000).

Die Bildung von Blutgefäßen während der frühen Embryogenese wird als Vaskulogenese bezeichnet. Sie beginnt mit der Differenzierung von Angioblasten und Hämangioblasten aus mesodermalen Vorläuferzellen (Seval, 2008; Jousen, 2003; Geva, 2000; Kaufmann, 2000; Tallquist, 1999). Angioblasten und hämatopoetische Vorläuferzellen formieren sich im Weiteren zu zellulären Aggregaten, zu Blutinseln, und bilden das primäre Gefäßsystem im Embryo und der Plazenta (Demir, 2007; Plendl, 2000). Es folgt die Differenzierung zu primitiven Endothelzellen. Diese bilden durch Fusion von intraendothelialen Vakuolen Gefäßlumina aus (Folkman, 1992). Infolge entsteht ein vaskuläres Netzwerk, welches sich im Verlauf zu einem komplexen Gefäßsystem entwickelt (Kroll, 2000; Risau, 1997; Poole, 1989). Ursprünglich wurde angenommen, dass die Vaskulogenese nur im embryonalen Zustand stattfindet und von mesodermalen Vorläuferzellen abhängig ist. Diese Vorstellung kann heute aber nicht mehr aufrechterhalten werden. Am Beispiel der Tumorangio-genese lässt sich zeigen, dass das Wachstum von Gefäßen häufig eine Kombination aus Angiogenese und Vaskulogenese ist, bei der zirkulierende Endothelzellvorläufer zum Wachstum der Endothelzellmasse beitragen (Jousson, 2003).

1.1.2.2 Angiogenese

Als zweiter Weg existiert das Modell der Gefäßbildung durch Teilung bereits vorhandener Gefäße im Sinne einer Ausdifferenzierung (Demir, 2007; Juhasz-Böss, 2006; Plendl, 2000). Die Bildung des Gefäßbaumes geschieht hier durch die Aussprossung neuer Kapillaren aus präexistenten Gefäßen.

Der Vorgang wird als Angiogenese bezeichnet. Sie ist ein in mehreren Schritten ablaufender, komplizierter Prozess. Durch Aktivierung von Endothelzellen kommt es zunächst zur Erhöhung der Permeabilität der Blutkapillaren und damit zum Austreten von Plasmaeiweißen, die zum Aufbau einer Matrix beitragen, in die neue Gefäße einsprossen können. Nach Destabilisierung des Gefäßes durch Aufhebung der Kontakte zwischen Endothelzellen und den sie umgebenden glatten Gefäßmuskelzellen oder Perizyten und Auflösen der vaskulären Basalmembran durch proteolytische Enzyme, migrieren die Endothelzellen in Richtung eines angiogenen Reizes und beginnen unter der Einwirkung von Mitogenen zu proliferieren (Neukomm, 2007; Hawighorst, 2002; Risau, 1997; Folkman, 1992). Im Rahmen der Proliferation entwickeln sich erneut Gefäßlumina mit transkapillären Gewebepfeilern, die durch die Integration von Gefäßmuskelzellen/Perizyten schließlich stabilisiert werden (Sherer, 2001; Risau, 1997; Klagsbrun, 1991).

Im sich entwickelnden Embryo existieren beide Möglichkeiten der Gefäßbildung nebeneinander und zeitgleich (Risau, 1997). Die Abläufe der Gefäßbildung und deren Anpassung werden einerseits physiologisch geregelt und sind Bestandteil der Ontogenese, können andererseits auch überschießend ablaufen (Folkman, 2006; Geva, 2000; Sherer 2001; Risau, 1997).

Im adulten Organismus wird mit Ausnahme des Haarzyklus sowie in Geweben des weiblichen Reproduktionssystems unter physiologischen Bedingungen keine Angiogenese beobachtet (Wulff, 2004; Hawighorst, 2002; Gordon, 1995). Hingegen eine unphysiologische und mitunter überschießende Angiogenese zeigt sich unter pathologischen Gesichtspunkten bei der Wundheilung, bei entzündlichen Reaktionen, bei der proliferativen diabetischen Retinopathie, Tumorwachstum und Psoriasis (Shibuya, 2008; Folkman, 2006; Hawighorst, 2002; Zygmunt, 2001; Sherer, 2001; Amann, 2000; Stegmann, 2000; Heits, 1998; Torry, 1997; Schaper, 1996; Gordon, 1995). Hingegen zeigen jüngere Studien, dass in ischämischem Gewebe des adulten Organismus das Kollateralwachstum durch Arteriogenese erfolgt. Dabei proliferieren

Arteriolen, die erhöhtem Scherstress ausgesetzt sind. Dies führt zu einer Aktivierung des Endothels sowie zur Adhäsion und Infiltration von Monozyten. Diese produzieren in der Folge Wachstumsfaktoren und Proteasen, die für die Erweiterung der Gefäße notwendig sind (Breier, 2006; Schaper, 2003).

Eine Fülle differierender Proteine, einschließlich Zelladhäsionsmoleküle, Komponenten der extrazellulären Matrix, Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptorstellen sind an der Differenzierung und am Wachstum von Blutgefäßen beteiligt (Folkman, 2006; Sherer, 2001; Klagsbrun, 1991).

1.1.2.3 Plazentare Gefäßausbildung

Die Entwicklung der plazentaren Vaskulatur beginnt am 21. Tag post conceptionem. Der Prozess der Vaskulogenese kann zum ersten Mal im Stadium der Tertiärzotten beobachtet werden. Hier können erstmals runde, in Schnüren angeordnete Zellen (Hämangioblasten), welche sich aus mesenchymalen Vorläuferzellen gebildet haben, differenziert werden (Schmidt, 2007; Demir, 2007; Zygumt, 2001). Sie stellen die späteren Kapillarendothelien dar. Als weitere Zellpopulation finden wir Hofbauerzellen (in Stroma eingelagerte Makrophagen), die sich ebenfalls aus mesenchymalen Vorläuferzellen differenzieren. Sie sind an der fetoplazentaren Infektabwehr beteiligt und steuern mit ihren Zytokinen die Zottenentwicklung (Kaufmann, 2000). Am 28. Tag post conceptionem können Lumina in den neu entstandenen Gefäßen differenziert und ab dem 32. Tag die ersten Erythrozyten in den Gefäßen festgestellt werden. Auch die Kapillarentstehung in Form der Angiogenese kann jetzt beobachtet werden, wobei die Vaskulogenese bis zur 10. bis 12. SSW anhält. Bei der Angiogenese wird zwischen „branching“ und „non-branching“ Angiogenese unterschieden. „Branching angiogenesis“ beinhaltet die Neubildung von Kapillaren durch Verzweigung und Neuaussprossung präexistenter Kapillaren. Sie führt zu reich verzweigten Kapillarnetzen. Sie wird durch VEGF stimuliert und durch PlGF gehemmt. Da die Sekretion von VEGF durch Hypoxie stimuliert wird, die von PlGF gehemmt wird, ist Hypoxie ein Promoter der „branching angiogenesis“. Auch „non-branching angiogenesis“ führt zur Neubildung von Kapillaren aus präexistenten Kapillaren, allerdings nicht durch Verzweigung, sondern durch Längenwachstum, d.h. durch Elongation bereits existierender Kapillaren. Dieser Prozess ist eine Folge dominierender Sekretion von PlGF. Er findet bevorzugt bei höheren Sauerstoffpartialdrücken statt. Moderate Formen von „non-branching

angiogenesis“ mit begrenzter Verzweigungstendenz der Kapillaren stellen eine normale Entwicklungsphase bei der Bildung von Terminalzotten dar (Kaufmann, 2000).

In der 6. SSW findet die Reifung der Gefäße statt. Sie werden durch eine komplette Schicht von Perizyten sowie eine Basalmembran bedeckt. Ab der 12. SSW formieren die Kapillaren Sinusoide und wachsen dicht in die Trophoblastschicht hinein (Zygmunt, 2001). Die Zahl der Blutgefäße nimmt mit weiterem Verlauf der Schwangerschaft zu (Demir, 2007; Castellucci, 1990). Ab der 26. SSW verändern sich die Zottenkapillaren. Es bilden sich an der Oberfläche der Zotten so genannte synzytiokapilläre Membranen. Hierbei handelt es sich um Zottengefäße, die die Oberfläche der Zotten vorwölben, durch eine schmale Membran von intervillösen Raum abgegrenzt werden und die primäre Funktion der Oxygenierung des fetalen Blutes haben (Kaufmann, 2000; Demir, 1989). Unterstützt wird die Bildung dieses Kapillartyps einerseits durch eine Versmälerung des Trophoblastzellsaums, andererseits durch ein verstärktes Längenwachstum der Zotten.

Die menschliche Plazenta bildet eine Vielfalt von angiogenen Faktoren aus (VEGF-vascular endothelial growth factor, bFGF- basic fibroblast growth factor, PlGF- placental growth factor, Angiopoietine), welche u.a. von Trophoblasten, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten exprimiert werden (Seval, 2008; Schmidt, 2007; Demir, 2007; Schneider, 2006; Demir, 2004; Kaufmann, 2000; Geva, 2000; Gordon, 1995; Ahmed, 1995). Das diese Zellen angiogene Faktoren exprimieren, lässt an eine parakrine Rolle in der Initiation der Vaskulogenese denken (Seval, 2008; Demir, 2004; Beck, 1997; Ahmed, 1995; Demir, 1989).

1.2 Die Rolle der Wachstumsfaktoren

Die Regulation der Vaskulogenese und Angiogenese innerhalb der Plazenta ist eine wesentliche Grundlage für deren Entwicklung (Schmidt, 2007, Schneider, 2006, Zygmunt, 2001, Clark, 1998, Ahmed, 1995, Gordon, 1995).

Das Zottenwachstum sowie die Entwicklung der darin verlaufenden Gefäße unterliegt der Regulation durch eine Reihe von angiogenetisch wirksamen Faktoren wie dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), dem Plazentawachstumsfaktor (PlGF), Angiopoietin und den zugehörigen Rezeptoren (Schmidt, 2007; Schneider, 2006; Geva, 2002; Dunk, 2000; Graham, 1992; Cattini, 1991).

Es handelt sich hierbei um Proteine, die auf mannigfaltige Weise die Proliferation von Zellen beeinflussen (Amann, 2000).

1.2.1 VEGF

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) gehört zu den wichtigsten bislang beschriebenen angiogenen Substanzen. Er stellt einen endothelspezifischen Wachstums- und Permeabilitätsfaktor dar (Schmidt, 2007; Juhasz-Böss, 2006; Geva, 2002; Zygmunt, 2001; Kroll, 2000; Heits, 1998; Folkmann, 1992). Er wird auch von einigen Autoren als multifunktionaler Wachstums- und Differenzierungsfaktor beschrieben, der in verschiedene Prozesse der Gefäßentwicklung und in die pathologische Angiogenese involviert ist. Darüber hinaus wird ihm eine Funktion in der Hämatopoese und der Neuronalentwicklung zugewiesen (Breier, 2006).

Der am besten untersuchte Vertreter dieser Gruppe ist das VEGF-A. VEGF-A ist ein basisches, Heparin-bindendes homodimeres Glykoprotein mit zwei Untereinheiten und einer Molekülmasse von 46 kDa, dessen Gen auf dem Chromosom 6p12-p21 lokalisiert ist (Kroll, 2000; Neufeld, 1999; Heits, 1998). Es besteht aus 8 Exonen, wobei durch alternatives Exon-Splicing 6 Isoformen mit folgender Aminosäureanzahl entstehen: VEGF-A_{121,145,165,183,189}, und -206. Die größte biologische bzw. am besten untersuchte Wirksamkeit hat das VEGF-A mit 165 Aminosäuren. Die Splice-Varianten haben prinzipiell die gleiche Wirkung auf Endothelzellen, jedoch mit unterschiedlicher Affinität zur Zelloberfläche (Simon, 2004; Agostini, 2003; Neufeld, 1999; Clark, 1998). Die VEGF-Familie der endothelialen Wachstumsfaktoren hat außerdem weitere Mitglieder wie: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, svVEGF (snake venom-derived) sowie placental growth factor (PlGF). Im Gegensatz von VEGF-A-D wurden VEGF-E bisher nur bei einem Virus, dem Orf-Virus aus der Familie der pockenähnlichen Viren, nachgewiesen, welche in Schafen, Ziegen und Menschen stark vaskularisierte Läsionen bilden können (Shibuya, 2008; Agostini, 2003; Zygmunt, 2001; Kroll, 2000).

In Gewebeuntersuchungen und Zellkulturen konnte die mRNA für VEGF in verschiedenen Zelltypen wie Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, T-Lymphozyten, Leberzellen, Lungengewebe, Neuroektodermalzellen, Myozyten sowie in zahlreichen Tumorzellen nachgewiesen werden. Ein fördernden Einfluss auf die VEGF-Freisetzung konnte in tierexperimentellen Modellen und in Zellkulturen für verschiedene Mediatoren wie z.B. Interleukin-1 β , TGF- β , Östrogene, Prostaglandin E gezeigt werden,

hingegen hemmende Einflüsse durch TNF-alpha und Dexamethason (Zygmunt, 2001; Heits, 1998). Den bekanntlich jedoch größten Einfluss auf die RNA-Expression des Wachstumsfaktor VEGF hat das lokale Sauerstoffangebot. Die Gewebhypoxie führt sowohl zu einer verstärkten Expression als auch zu einer Stabilisierung der VEGF-mRNA (Shibuya, 2008; Juhasz-Böss, 2006; Joussem, 2003; Neufeld, 1999; Heits, 1998; Schaper, 1996). Die verstärkte Expression wird u.a. durch ein Protein, den sogenannten hypoxieinduzierbaren Transkriptionsfaktor (HIF-1) vermittelt, welcher an die Promotorregion des VEGF-A-Gens bindet und somit eine verstärkte Expression von VEGF induziert (Joussem, 2003; Neufeld, 1999; Heits, 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor die Angiogenese durch mehrere Mechanismen fördert. Zum einen wirkt er chemotaktisch auf Makrophagen, Mastzellen und Endothelzellen (Schmidt, 2007; Juhasz-Böss, 2006; Gruber, 1995; Sunderkotter, 1994). Eine weitere biologische Funktion ist die Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Elektronenmikroskopische Aufnahmen konnten die Auflösung des engen Zell-Zell-Kontaktes (Fenestration) nach VEGF-Rezeptorbindung aufzeigen. Es kommt zur Ausbildung eines perifokalen Ödems mit Übertritt von Plasmaproteinen in das umliegende Gewebe, so auch eine erleichterte Migration junger Endothelzellen in das Gewebe (Juhasz-Böss, 2006; Roberts, 1995; Senger, 1993).

Das Expressionsmuster von VEGF und seiner Rezeptoren während der Embryogenese zeigt, dass Ligand und Rezeptor eine wichtige Rolle während der Entwicklung des vaskulären Systems spielen (Kroll, 2000; Ferrara, 1997; Gordon, 1995). VEGF-mRNA wird sowohl in villösen Trophoblastzellen, Endothelien und Makrophagen im Zottenstroma exprimiert, als auch im Implantationsbett des Endometriums sowie während der Embryogenese von Endodermalzellen im Dottersack (Schmidt, 2007; Schneider, 2006; Clark, 1998; Gordon, 1995; Ahmed, 1995; Sharkey, 1994). Unter seiner Mitwirkung migrieren die Angioblasten und formieren sich zu Gefäßen (Joussem, 2003). VEGF scheint zudem eine Signalfunktion zwischen dem implantierten Embryo sowie den vaskulären Strukturen im maternalen Endometrium auszuüben (Sherer, 2001). In der späteren Entwicklung der Plazenta zeigen die Kapillaren in den sich entwickelnden Organen die Expression von VEGF und seiner Rezeptoren, so dass eine parakrine, VEGF abhängige, Blutgefäßentwicklung postuliert wird (Carmeliet, 1997, 1996). Sowohl in der frühen als auch späten Schwangerschaft zeigen sich Endothelzellen im villösen Stroma. Diese differenzieren zu Kapillaren und exprimieren

sowohl VEGF als auch dessen Rezeptoren (Demir, 2007; Clark, 1998). Im Rahmen von Serumuntersuchungen bei Erwachsenen konnten signifikante Unterschiede der VEGF-Konzentration zwischen gesunden und unbehandelten Tumorpatienten aufgezeigt werden, wobei die gesunden Probanden eine niedrige basale VEGF-Konzentration im Serum aufwiesen, hingegen die VEGF-Konzentration bei den Patienten mit ausgedehnten Tumoren abnormal hoch war (Heits, 1998).

Makrophagen, T-Lymphozyten, Fibroblasten, Muskelzellen und Endothelzellen sind jedoch unter pathologischen Bedingungen, wie z. B. der Myokardischämie, der Arteriosklerose, der Retinopathie, der Arthritis, der Wundheilung sowie bei der Tumorneoangiogenese in der Lage, VEGF und seine Rezeptoren in großer Zahl zu exprimieren (Joussen, 2003; Zygmunt, 2001; Kroll, 2000; Heits, 1998; Risau, 1997). Unter pathophysiologischen Bedingungen, z.B. nach einem Myokardinfarkt, konnte ein signifikanter Anstieg des VEGF- Spiegels im Serum beobachtet werden (Kranz, 2000). Des Weiteren konnte in hochmalignen, schnell proliferierenden Tumorgewebe deutlich erhöhte Konzentrationen von VEGF und seinen Rezeptoren aufgezeigt werden (Brown, 1995). Der spezifische Wachstumsfaktor für Endothelzellen wurde erstmals aus der Aszitesflüssigkeit von Patienten mit intraperitoneal wachsenden Tumoren isoliert (Heits, 1998). Das deutet darauf hin, dass auch im adulten Organismus unter bestimmten Voraussetzungen VEGF eine wesentliche Rolle bei der Gefäßneubildung einnimmt. In Mäuseembryonen konnte bereits tierexperimentell durch Inaktivierung von VEGF-A ein Absterben des Feten am 11.-12. Tag nach Konzeption nachgewiesen werden. Heterozygot defiziente Mäuse zeigten diverse Entwicklungsanomalien wie eine verminderte Gefäßbildung im Dottersack mit einer gestörten Fusion von Angioblasten als Vorläufer für das Endothel und damit eine verminderte Vaskularisation des Embryos (Schmidt, 2007).

Eine außergewöhnliche Eigenschaft des VEGF ist seine dosisabhängige Wirkungsweise: Mäuse, die ein defektes VEGF-Allel tragen, sterben in utero (Haploinsuffizienz), und bereits geringe Änderungen der VEGF-Konzentrationen in der einen oder anderen Richtung führen zur abortiven Gefäßentwicklung. Die Fähigkeit von Endothelzellen, die VEGF-Konzentrationen wahrzunehmen, ermöglicht das gerichtete Kapillarwachstum entlang des VEGF-Gradienten, z.B. im Gehirn und in der Retina. Die Wahrnehmung des VEGF-Gradienten erfolgt durch spezialisierte Zellen an der Spitze der Gefäßsprossen. Diese Zellen exprimieren VEGFR2 und PDGFB und proliferieren im

Gegensatz zu den anderen Zellen des Sprosses nicht (Breier, 2006; Gerhardt, 2005; Kroll, 2000).

1.2.1.1 VEGF- Rezeptoren

Es konnten drei Rezeptoren der VEGF- Familie im plazentaren Gewebe identifiziert und charakterisiert werden. Zu ihnen zählen VEGFR-1/Flt-1 (fms-like receptor tyrosine kinase), VEGFR-2/KDR/Flk-1 (kinase-insert domain containing receptor oder fetal liver kinase-1) und VEGFR-3/Flt-4 (Shibuya, 2008; Leach, 2002; Neufeld, 1999; Shore, 1997; Cooper, 1995). VEGFR-1 ist der Rezeptor für PlGF, VEGF-A und VEGF-B, während VEGFR-2 der Rezeptor für VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D ist, VEGFR-3 ist der Rezeptor für VEGF-C und VEGF-D (Demir, 2007; Agostini, 2003; Tallquist, 1999; de Vries, 1992; Termann, 1992).

Die Rezeptoren besitzen eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität. Durch die Bindung von VEGF an seine Rezeptoren erfolgt eine Tyrosinphosphorylierung intrazellulärer Funktionsproteine und damit eine Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration (Kroll, 2000; Heits, 1998). Durch die beschriebene Phosphorylierung von Tyrosinresten in den Zielproteinen aktivieren sie direkt das Zellwachstum und die Differenzierung. Die aktivierten Rezeptoren können in der Endothelzelle zahlreiche Proteine durch Kaskaden von Phosphorylierungsreaktionen aktivieren und so spezifische Signalwege im Endothel einleiten (Agostini, 2003; Kroll, 2000).

Flt-1 und Flk-1 bestehen aus mehreren Immunglobulinähnlichen Domänen, einer Transmembran-Domäne und einer intrazellulären Juxtamembran-Domäne sowie einer Tyrosinkinase-Domäne, die durch ein Insert von ca. 100 Aminosäuren unterbrochen ist. Bindungsstudien zeigen, dass VEGF-A mit hoher Affinität an die Rezeptoren bindet und deren intrazelluläre Tyrosin-Kinase-Domäne aktiviert (Waltenberger, 1994). Beide Rezeptoren werden überwiegend, jedoch nicht ausschließlich von Endothelzellen exprimiert (Agostini, 2003; Zygmunt, 2001; Kroll, 2000; Kranz, 1999; Ferrara, 1997).

Die VEGF- Rezeptoren (Flt- und Flk-1) sind in allen Trimestern der Schwangerschaft in den Trophoblasten einer normalen Plazenta nachweisbar (Shore, 1997; Burton, 1996; Shiraishi, 1996). Flt-1 und Flk-2 konnten zu dem auch in Monozyten, hämatopoetischen Stammzellen, Megakaryozyten und renalen Mesangiumzellen nachgewiesen werden (Agostini, 2003; Neufeld, 1999; Heits, 1998).

Knock-out Experimente für Flt-1 und Flk-1 zeigten, dass beide Rezeptoren eine wichtige, aber unterschiedliche Funktion während der Embryogenese besitzen (Fong, 1999; Shalaby, 1995).

Flk-1/VEGFR-2 ist der Hauptmediator des mitogenen und angiogenen Effektes von VEGF (Schmidt, 2007). Ihm wird eine wichtige Rolle für die Bildung von Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen während der Vaskulogenese zugeschrieben. Er ist hier für die Formierung der Blutinseln und für die Hämatopoese notwendig. In knock-out Experimenten mit Flk-1 knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese ca. am 9. Tag während der Embryonalentwicklung versterben. Es konnten weder Endothelzellen noch Blutinseln im Dottersack ausgebildet werden. Hieraus wurde geschlossen, dass VEGF über den Flk-1 Rezeptor die Differenzierung der Endothelzellen und der hämatopoetischen Zellen vermittelt während der Vaskulogenese (Wulff, 2004; Kroll, 2000; Shalaby, 1995).

Flt-1/VEGFR-1 hingegen spielt eine entscheidende Rolle bei der endothelialen Organisation während der Gefäßentwicklung (Winther, 1999; Shore, 1997; Mustonen, 1995). Er scheint die Funktion eines „Dekoy-Rezeptors“ zu haben, d. h. er inhibiert die Funktion des VEGF, indem er die Bindung von VEGF an den Flk-1/VEGFR-2 Rezeptor verhindert.

Flt-1/VEGFR-1-Rezeptor besitzt 2 Isoformen: eine transmembranöse Form und eine lösliche Form. Die lösliche Form beinhaltet die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne. Hier kann VEGF binden und damit seine biologischen Aktivitäten unterdrücken. PlGF potenziert die angiogenetische Aktivität des VEGF. Auch PlGF kann an den VEGFR-1-Rezeptor binden und wird dadurch in seiner potentiellen Wirkung abgeschwächt (Schmidt, 2007).

In knock-out Experimenten mit Flt-1 knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass auch diese Mäuse ca. am 9. Tag der Embryonalentwicklung versterben, aber Endothelzellen ausbilden, jedoch eine generelle Fehlorganisation der Endothelzellen aufweisen, so dass eine Tubulusbildung nicht zustande kam. Der Flt-Rezeptor scheint also für die Tubulusformation verantwortlich zu sein (Wulff, 2004; Kroll, 2000; Fong, 1999; Neufeld, 1999; Winther, 1999; Shore, 1997; Mustonen, 1995).

Im Rahmen von serologischen Untersuchungen konnten Konzentrationsunterschiede des löslichen VEGFR-1-Rezeptors bei normalen unauffälligen Schwangerschaften und präeklampsischen Schwangeren (hypertensive Schwangerschaftserkrankung) beobach-

tet werden. Es zeigte sich bei Schwangeren mit Präeklampsie eine vermehrte Expression des löslichen VEGFR-1-Rezeptors, welcher durch Bindung von VEGF die Menge an freiem und damit biologisch aktivem VEGF reduziert (Schmidt, 2007). Weitere tierexperimentelle Untersuchungen an schwangeren Mäusen führten nach gezielter intravenöser Applikation von löslichen VEGFR-1 zu präeklampsischen Symptomen wie Hypertonie, Proteinurie und Nierenfunktionsstörungen (Maynard, 2003). Diese Untersuchungsergebnisse lassen vermuten, dass eine veränderte Angiogenese ein ätiologisch bedeutsamer Faktor bei der Entstehung der Präeklampsie zu sein scheint (Schmidt, 2007; Schneider, 2006).

Neben Flk-1 und Flt-1 gehört noch der Rezeptor Tyrosin Kinase Flt-4 (VEGF-Rezeptor-3) zur Gruppe der VEGF-Rezeptoren. Flt-4 kann jedoch kein VEGF-A binden, dafür aber VEGF-C und VEGF-D, welche primär in die Lymphangiogenese involviert sind (Breier, 2006; Alitalo, 2005). Das Fehlen des Flt-4-Gens in der Entwicklung der Maus führt zu Defekten in der Entwicklung des kardiovaskulären Systems (Kroll, 2000).

1.2.2 BFGF

Der primäre Fibroblastenwachstumsfaktor (basic fibroblastic growth factor, bFGF) gehört zur großen Gruppe der Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF), bei denen es sich um Wachstums- und Differenzierungsfaktoren handelt. Bislang wurden mindestens 18 Mitglieder dieser Familie beschrieben. Die beiden wichtigsten sind bFGF und aFGF (acidic fibroblast growth factor), die eine 50% Strukturhomologie aufweisen. Beide FGF haben eine proliferative und funktionsmodulierende Auswirkung auf die Endothelzellen. Sie inhibieren die Apoptose und wirken chemotaktisch auf diese Zellen (Joussen, 2003; Zygmunt, 2001).

BFGF ist ein mitogenes heparinbindendes Polypeptid und besitzt ein Molekulargewicht von 18000 Dalton. Es zeigt typische Charakteristika hinsichtlich klassischer Polypeptidhormone, z.B. die Einflussnahme auf zelluläre Funktionen über einen Rezeptor-vermittelten Weg (Cattini, 1991; Klagsbrun, 1989). Es existieren verschiedene Subtypen von bFGF, alle jedoch mit der gleichen biologischen Aktivität. Die prädominante Form besitzt 155 Aminosäuren (Pötgens, 1995). Erstmals identifiziert und charakterisiert wurde bFGF 1985 durch Cospodarowicz et al (Plendl, 2000). BFGF ist ein angiogener Wachstumsfaktor, unter dessen Einfluss es zu einer verstärkten Proliferation von Endothelzellen und Zellwachstum in Organen und Tumoren kommt

(Folkman, 2006; Folkman, 1992; Cattini, 1991). Es konnte in Chorangiomen (tumorartige Läsionen im Sinne eines Hamartoms) eine verstärkte Expression von bFGF im Vergleich zu tumorfreien Plazentaanteilen aufgezeigt werden (Guschmann, 2002). Aber auch in anderen neoplastischen Geweben wurde eine vermehrte Expression von bFGF registriert, u.a. in hepatozellulären Karzinomen, Nierenzellkarzinom, Phäochromozytom, Astrozytom und Malignomen des Gastrointestinaltraktes (Singh, 1994; Li, 1994; Statuto, 1993; Brem, 1992).

Exprimiert wird bFGF in der Plazenta von Endothelzellen und glatten Muskelzellen der placentaren Gefäße, daneben von Makrophagen des Zottenstromas, einschließlich der sich entwickelnden Zytotrophoblastzellen (Hamai, 1998; Crescimanno, 1995; Gordon, 1995; Ferriani, 1994). In experimentellen Untersuchungen konnte ein essentieller Einfluss von bFGF bei der Angiogenese der Plazenta nachgewiesen werden (Hamai, 1998; Cattini, 1991). BFGF stimuliert die Endothelzellen und induziert vor allem die Produktion von Proteasen, u.a. dem Plasminogen-Aktivator und Kollagenase, welche die Penetration neuer Gefäße in die extrazelluläre Matrix ermöglicht (Mustonen, 1995; Pierce, 1992). Insbesondere unter hypoxischen Bedingungen entfaltet bFGF seinen proliferativen Effekt auf Endothelzellen. Normalerweise reagieren Endothelzellen unter hypoxischen Gegebenheiten mit einem reduzierten Wachstum, aber in Anwesenheit von Makrophagen (Hofbauerzellen in der Plazenta) kommt es zu einer gesteigerten Proliferation der Endothelzellen mit nachfolgender Kapillarsprossung. Hierunter ist die Expression von Zytokinen in den Makrophagen deutlich erhöht. Zusätzlich verschmälert sich in der Plazenta unter Hypoxie die Zytotrophoblastdicke, mit Verkürzung der Diffusionsstrecke (Zheng, 1997; Cattini, 1991; Ogawa, 1991). Den wesentlichen Einfluss der Hypoxie auf die Expression des Faktors und seiner Rezeptoren konnte auch in adultem Gewebe u.a. am Beispiel der Myokardischämie aufgezeigt werden. Wo im normalen Myokard keine oder nur eine geringe Synthese nachzuweisen ist, wurde im Rahmen einer Hypoxie die gesteigerte Expression von bFGF und der Rezeptoren registriert (Stegmann, 2000).

Außerhalb der Plazenta konnte bFGF in zahlreichen anderen Geweben und deren entsprechenden Zellen nachgewiesen werden. Hierzu zählen Hautzellen, Gehirn, Leber, in Komponenten des männlichen und weiblichen Genitaltrakt, im Intestinum, endokrinen Zellen und lymphoidem Gewebe (Plendl, 2000; Gordon, 1995; Hughes, 1993; Schulze Osthoff, 1990).

1.2.2.1 BFGF- Rezeptoren

Es wurden sowohl Hoch als auch Niedrigaffinitätsbindungsstellen für FGF beschrieben. Zwei Hochaffinitätsrezeptoren wurden für bFGF nachgewiesen: FGFR-1 und FGFR-2. Sie gehören zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren und sind für die Signalübertragung verantwortlich. Die Niedrigaffinitätsrezeptoren sind für die Sequestrierung und Stabilisierung zuständig. Ebenfalls in löslicher Form sind sie in der extrazellulären Matrix exprimiert (Zygmunt, 2001; Baird, 1991).

1.2.3 Angiopoietine

Eine ebenfalls wichtige Familie angiogener Faktoren sind die Angiopoietine. Bis 2003 wurden fünf verschiedene Angiopoietine (Ang1- Ang5) beschrieben, von denen Ang1 und Ang2 gegenwärtig die bekanntesten und bestuntersuchten Faktoren dieser Gruppe darstellen mit einem wesentlichen Einfluss auf die Gefäßentwicklung im menschlichen Organismus (Zeng, 2003; Valenzuela, 1999; Maisonpierre, 1997; Davis, 1996). Ang1 und Ang2 haben im Gegensatz zu VEGF keinen Anteil an der Vaskulogenese, der initialen Phase der Gefäßentwicklung. Stattdessen sind beide Faktoren beim angiogenetischen Wachstum, beim Gefäßumbau und der Gefäßreifung mitbeteiligt und spielen daher eine wichtige Rolle bei der Regulation der Stabilität und Integration von Gefäßen (Seval, 2008; Babischkin, 2007; Juhasz-Böss, 2006; Wulff, 2004). Alle bisher bekannten Angiopoietine sind Liganden am Tie-2 Rezeptor („tyrosine kinase with immunoglobulin- and EGF like domains“), einer Rezeptortyrosinkinase, die an vaskulären Endothelzellen exprimiert wird (Maisonpierre, 1997). Liganden für den Tie-1 Rezeptor sind bislang unbekannt (Wulff, 2004; Hawighorst, 2002).

1.2.3.1 Angiopoietin- 1-und 2

Ang1 ist ein Glykoprotein, bestehend aus 498 Aminosäuren, welches durch ein auf Chromosom 8 gelegenes Gen kodiert wird. Es weist eine 60% Strukturhomologie zu seinem Gegenspieler innerhalb des Angiopoietinsystems, dem Ang2 auf (Geva, 2000). Das Glykoprotein besteht aus einer so genannten „coiled-coil“ Struktur am Aminoterminus, die verantwortlich ist für die Bildung von Oligomeren, und einer Fibrinogen-ähnlichen Domäne am Karboxylende, die für die Phosphorylierung des

Rezeptors eine Rolle spielt (Procopio, 1999). Eine Expression von Ang1 konnte innerhalb der Plazenta in Zyto- und Synzytiotrophoblasten, sowie in Endothelzellen und Makrophagen nachgewiesen werden. Es wurde hier besonders eine Anreicherung im perivaskulären Zottenstroma der Stammzotten registriert, was als Hinweis für den wesentlichen Einfluss in der späteren Gefäßreifung aufgefasst wird (Seval, 2008; Babischkin, 2007; Geva, 2000; Dunk, 2000).

Ang1, als endogener Agonist des Endothelzellrezeptors Tie-2 (Tunica internal endothelial cell kinase), ist ein natürlich vorkommender Antipermeabilitätsfaktor, der durch Förderung der Perizytenendothelinteraktion eine Gefäßstabilisierung bewirkt (Seval, 2008; Babischkin, 2007; Joussem, 2003). Durch Interaktion der Endothelzellen mit der umgebenden Zellmatrix bzw. den umgebenden supportiven Zellen führt Ang1 zu einer Ausdifferenzierung des durch VEGF induzierten Gefäßsystems (Juhasz-Böss, 2006). Ang1 stimuliert die Proliferation von Endothelzellen nicht, fördert aber in vitro die Migration von Endothelzellen, die tubuläre Formation und die Gefäßsprossung (Joussem, 2003; Kim, 2000; Witzenbichler, 1998; Davis, 1996).

Ang2, ebenfalls ein Glykoprotein, besteht aus 496 Aminosäuren, kodiert durch ein Gen, dass ebenfalls auf Chromosom 8 lokalisiert ist (Geva, 2000). Das Glykoprotein besteht aus einer so genannten „coiled-coil“ Struktur am Aminoterminal, die verantwortlich ist für die Bildung von Oligomeren, und einer Fibrinogen-ähnlichen Domäne am Karboxylende, die für die Phosphorylierung des Rezeptors eine Rolle spielt (Procopio, 1999). Eine Expression von Ang2 findet in Zyto- und Synzytiotrophoblasten, Makrophagen sowie Endothelzellen und Muskelzellen statt (Seval, 2008; Babischkin, 2007; Geva, 2000; Witzenbichler, 1998). Ang2 ist ein endogener Antagonist für den endothelzellspezifischen Tie-2-Rezeptor. Ein Überschuss an Ang2 ist in der Lage, die Bindung von Ang1 an Tie-2 zu blockieren. Eine Aktivierung des Rezeptors erfolgt nicht. Es kommt zu einer Gefäßdestabilisierung und Aussprossung von Endothelzellen. Ang2 trägt dazu bei, glatte Muskelzellen von Endothelzellen abzulösen und die extrazelluläre Matrix aufzulösen. Somit wird der Zugang zum Endothel für VEGF erleichtert und es kommt zur Induktion der Endothelzellproliferation, Migration und Tubuli-Bildung. Ang1 wird im Anschluss wiederum zur Stabilisierung des neuen Gefäßes durch Perizytenrekrutierung benötigt (Juhasz-Böss, 2006; Wulff, 2004; Joussem, 2003).

Durch Auflösen der extrazellulären Matrix können komplexe Interaktionen zwischen Wachstumsfaktoren (VEGF, FGF u.a.) und Differenzierungsfaktoren (z.B. Angiopoie-

tine) einsetzen, welche dazu führen, dass verschiedene Stoffwechselwege ein und denselben Angiogeneseschritt mehrfach stimulieren. Dies bedeutet für die Angiopoietine, dass Ang1 durch Bindung an den Tie-2-Rezeptor eine Aussprossung der Endothelzellen induziert, so auch Ang2, aber nur in Kombination mit VEGF. In Abwesenheit von VEGF kommt es hingegen zur Gefäßregression (Juhasz-Böss, 2006; Hawighorst, 2002; Joussem, 2003; Suri, 1996).

Studien belegen, dass Embryonen mit Defekten im Angiopoietin- System eine fehlerhafte Ausbildung des Kapillarnetzes im Gewebe aufweisen (Geva, 2000; Maisonpierre, 1997; Suri, 1996; Davis, 1996). Dies spricht dafür, dass ohne Angiopoietin kein komplexes Gefäßnetzwerk ausgebildet werden kann und er neben VEGF einer der entscheidenden Faktoren der Angiogenese ist (Juhasz-Böss, 2006).

Ang1-defiziente Mäuse entwickeln multiple kardiovaskuläre Defekte: Kapillarsprossung, Remodellierung des primitiven Gefäßsystems und die Ausbildung der Herztrabekel sind beeinträchtigt. Die Beobachtung, dass die Vaskulogenese in Ang1-defizienten Mäusen nicht gestört ist, zeigt das ANG-/TIE-System zu einem späteren Zeitpunkt als das VEGF-/VEGFR-System in der Gefäßentwicklung aktiv ist (Breier, 2006).

Die Expression der beiden gegensätzlich wirkenden Angiopoietine stellt ein ausgewogenes Verhältnis an Faktoren dar, das für die Balance zwischen physiologischer und pathologischer Angiogenese mitverantwortlich ist (Otani, 1999).

1.2.3.2 Angiopoietin- Rezeptor

Die Tie-Rezeptoren (tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains) besitzen eine extrazelluläre Region mit zwei Immunglobulin- ähnlichen Domänen, die durch drei epidermale Wachstumsfaktor (EGF)- ähnliche Cystein-Wiederholungen getrennt sind. Daran schließen sich drei Fibronectin-Typ-III-homologe Domänen an. Intrazellulär haben die Tie-Rezeptoren eine ähnliche Domänenstruktur wie die VEGF-Rezeptoren. Beide Rezeptorfamilien bestehen intrazellulär aus zwei Tyrosinkinase-Domänen, die jeweils durch einen kurzen Bereich von Aminosäuren getrennt sind. Die Bindung von Ang1 an den Tie-2-Rezeptor führt zu einer Phosphorylierung. Durch eine Bindung von Ang2 an den Rezeptor wird der Rezeptor blockiert und somit eine Aktivierung durch Ang1 verhindert. Daher wird angenommen, dass Ang2 der natürliche Antagonist von Ang1 am Tie-2- Rezeptor ist (Agostini, 2003; Maisonpierre, 1997).

Die Tie-Rezeptoren scheinen für das angiogene Remodelling und die Stabilisierung der Gefäße nach der initialen Vaskulogenese notwendig zu sein. Mäuseembryonen mit Defekten im Tie-2- Rezeptor starben später in der Embryonalentwicklung zwischen Tag 9,5 und Tag 12,5. Endothelzellen waren in normaler Anzahl vorhanden und Tubuli waren ausgebildet, jedoch fehlte diesen Mäuseembryonen ein in sich verzweigendes Netzwerk und eine Differenzierung in Arterien, Arteriolen und Venen (Wulff, 2004; Sato, 1995).

Bei Ausfall des Tie-1-Rezeptors starben die Embryonen wenig später in der Entwicklung (Tag 13,5) aufgrund unvollständig entwickelter Gefäße. Tie-1 und Tie-2 werden früh während der Gefäßentwicklung exprimiert und werden von den meisten Blutgefäßen und Kapillaren koexprimiert (Maisonpierre, 1993). Eine Expression in der Plazenta erfolgt durch die Endothelzellen, Trophoblasten und Hofbauerzellen (Seval, 2008)

1.3 Plazentabildungsstörungen

1.3.1 Definition, Einteilung und Häufigkeit der Plazentabildungsstörungen

Die Plazentabildungsstörungen werden zu den gestationsbedingten Trophoblast-erkrankungen gezählt. Es liegt ihnen eine primäre Entwicklungsstörung des villösen Trophoblasten und des extraembryonalen Mesenchyms zugrunde, sowie eine mangelhafte Gefäßausbildung. Bei einer diffusen Ausbildung dieser Entwicklungsstörung ist die davon betroffene Fruchtanlage nicht entwicklungsfähig. Entweder fehlt in diesen Fällen der Embryo oder es liegt eine globale Entwicklungsstörung vor (Vogel, 2004). Die Allantoisgefäße können dabei fehlen oder sie sind nur ungenügend in diesen Fällen ausgebildet. Es werden vier große Gruppen der Plazentabildungsstörungen in der Literatur ausgewiesen. Zu ihnen zählen die Embryonalmolen mit einer relativen Häufigkeit von 55%; die Partialmolen mit 14,5%; die Blasenmolen mit 2,5%; und die Windmolen mit 28,0% (Vogel, 1996).

Bei ca. 50% aller Spontanaborte (4% aller induzierten Aborte) des 1. Trimenons (5. – 14. SSW) wurden im Rahmen von morphologischen Untersuchungen Plazentabildungsstörungen nachgewiesen, in absteigender Häufigkeit des weiteren Zottenreifungsstörungen, Durchblutungsstörungen, Implantationsschäden und in seltenen Fällen Entzündungen des Choriongewebes. In ca. 10,0% der Fälle konnte

aufgrund fortgeschrittener Retentionszeichen keine weitere Klassifikation der Veränderungen erfolgen (Vogel, 1996).

Im Rahmen der Beurteilung von Material aus Spontanaborten muss sich die morphologische Untersuchung in rund 75,0% der Fälle auf die Plazenta beschränken, da ein Embryo oder embryonale Anlage nicht nachweisbar ist (Vogel, 2004).

In 50%-60% liegen Spontanaborten chromosomale Aberrationen zugrunde (Vogel, 2004; Röckelein, 1989). Seit den klassischen Untersuchungen von Honoré (1976) und Boué (1975) weiß man, dass chromosomale Aberrationen nicht nur Veränderungen am Embryo/Feten, sondern auch unter dem Bild der Plazentabildungsstörungen Strukturstörungen an den Chorionzotten hervorrufen (Vogel, 2004). Die Klassifizierung bzw. Zuordnung des Abortmaterials erfolgt nach Art der Histologie von Fruchtsack und Plazenta durch den Pathologen.

Wichtige Beurteilungskriterien im Hinblick auf die einzelnen Formen der Plazentabildungsstörungen sind hier das morphologische Bild des Trophoblastepithels, die Beurteilung der Zottenvaskularisation sowie Veränderungen des Zottenstromas und die Anwesenheit bzw. das Fehlen einer Embryonalanlage (Emmrich, 1990). Diese Kriterien waren die Grundlage für die neue Einteilung der Plazentabildungsstörungen (wie oben aufgeführt), die für den deutschsprachigen Raum erstmals durch Vogel (1984) publiziert wurden.

1.3.2 Embryonalmolen

Bei der Embryonalmole handelt es sich um die häufigste Ausprägungsform einer Plazentabildungsstörung. Wichtigstes makroskopisches Merkmal der Embryonalmole ist das Vorhandensein eines Embryos, mit einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Entwicklungsstörung (vollständig desorganisierter Embryo in Form eines nodulären oder zylindrischen Embryos oder in Form eines so genannten Kümmerlings). Bei makroskopischen Fehlen eines Embryos ist die Abgrenzung zur Windmole schwierig, so kann hier nur histologisch der Nachweis von Allantoisgefäßausläufern in der Chorionplatte Rückschlüsse auf die primäre Ausbildung eines Embryos geben (Vogel; 2004, 1996; Emmrich, 1990).

Histologische Kriterien einer Embryonalmole:

- hypoplastische zartwandige Allantoisgefäße in der Chorionplatte,
- abortive Ausbildung von Stammzotten,
- ungleich große Zottendurchmesser,
- ein- und zweischichtiges Trophoblastepithel unterschiedlicher Breite,
- unregelmäßig gebuchtete Zottenoberfläche,
- buntes Zottenstromabild (embryonal, hydropisch-molig, retikulär, fibrös)
- mangelnde Gefäßausstattung der peripheren Zotten

(Vogel, 2004)

Pathogenese und Ätiologie der Embryonalmole:

Es handelt sich bei der Embryonalmole um eine Entwicklungsstörung mit erhaltener Embryonalanlage, deren terminationskritische Phase gegen Ende der 3. bis Anfang der 4. Entwicklungswoche und später angenommen wird.

Nicht selten liegt dieser Form der Plazentabildungsstörung eine chromosomale Aberration zugrunde. Vogel konnte in seinen Untersuchungen zeigen, dass vier Fünftel der untersuchten Embryonalmolen mit Karyotypisierung Chromosomenaberrationen aufwiesen, meist in Form einer Trisomie (10,13-15,16,18, 21 und 22), des weiteren auch Monosomie X und Strukturaberrationen (Vogel, 1996).

1.3.3 Partialmolen

Es handelt sich bei den Partialmolen um eine Form der Plazentabildungsstörung, die aufgrund der Trophoblastzellhyperplasie auch zu den tumorähnlichen Läsionen gerechnet wird, ähnlich den Blasenmolen.

Makroskopisch auffällig ist eine übergroße Plazenta, deren Gewebe herdförmig von zahlreichen wechselnd großen Zottenblasen durchsetzt ist. Ein Embryo bzw. Fetus ist angelegt, aber wachstumsretardiert und weist in unterschiedlich starkem Maße innere und/ oder äußere Fehlbildungen auf (Vogel, 2004).

Histologische Kriterien einer Partialmole:

- Allantoisgefäßäste in Chorionplatte und Stammzotten (Hinweis für embryo- bzw. fetoplazentaren Kreislauf)
 - sehr ungleich große Zottendurchmesser (Nebeneinander sehr großkalibriger und schmaler Zottendurchmesser)
 - fokale Trophoblasthyperplasie, vor allem des Synzytiotrophoblasten mit Ausbildung von Epithelzungen und- girlanden
 - stark gezähnelte Zottenoberfläche
 - fokale Ausbildung von Zottenblasen wechselnder Größe
 - restliches Zottenstroma teils zellreich, fibrosiert und/ oder hydropisch degeneriert
 - Hypovaskularität peripherer Zotten
- (Vogel, 2004, Horn, 2003; Emmrich, 1990)

Pathogenese und Ätiologie der Partialmole:

Die Ausbildung von Partialmolen ist hauptsächlich durch chromosomale Aberration bedingt, die zu einer Fehldifferenzierung des Trophoblasten bzw. Entgleisung des Trophoblastenwachstums führen. Es handelt sich hierbei am häufigsten um die Triploidie, die als chromosomale Störung der Partialmole zugrunde liegt, nachgewiesen durch zytogenetische Untersuchungen in bis zu neun Zehntel der Fälle. In absteigender Häufigkeit treten folgende Karyotypen auf: 69, XXX; 69, XXY; und selten 69, XYY. 69, YYY ist nicht entwicklungsfähig (Vogel, 1993; Szulmann, 1981; Vassilakos, 1977). Die Triploidie, die für das morphologische Vollbild der Partialmole verantwortlich ist, gründet sich auf dem überzähligen Chromosomensatz väterlicher Herkunft, bei der die Befruchtung des Eis entweder durch ein diploides Spermium (Diandrie) oder durch disperme Befruchtung der haploiden Oocyte erfolgt (Vogel, 2004; Horn, 2003; Röckelein, 1989). Infolgedessen stammen zwei Drittel des Genoms vom Vater und nur ein Drittel von der Mutter. Man nimmt an, dass dies zu einer Abschwächung bzw. Unterdrückung der mütterlichen Geninformation führt. Des Weiteren sollen väterliche

Chromosomen Gene tragen, die im aktiven Zustand für die Hyperproliferation des Trophoblastepithels verantwortlich sind (Horn, 1996). Die Therapie der Wahl ist die vollständige Kürettage des Uterus unter sonographischer Kontrolle. Im Gegensatz zur Blasenmole ist das Risiko für die Entwicklung einer persistierenden und invasiven Mole bzw. malignen Entartung zu einem Chorioncarcinom bei der Partialmole geringer einzustufen. In der Literatur werden prozentuale Angaben von 0,5-2% ausgewiesen (Horn, 2003). Trotzdem erscheint es sinnvoll, auch diesen Patienten eine engmaschige Kontrolle (z. B. Bestimmung des Serum-beta-HCG-Wertes) zu empfehlen, wie solchen mit Blasenmolen, da bei plateauartigen oder ansteigenden HCG-Werten weitere Maßnahmen indiziert wären (Horn, 2003; Bilek, 1994).

1.3.4 Blasenmolen (Synonym: komplette Mole)

Die Blasenmole wird zu den tumorähnlichen Läsionen gestationsbedingter Trophoblasterkrankungen gezählt, aufgrund ihrer Synzytio- und Zytotrophoblastzellhyperplasie sowie anaplasie (Vogel, 2004).

Sie zeigen ein charakteristisches soziogeographisches Verteilungsmuster mit weitaus häufigerem Auftreten in Ostasien als in Europa (Herbst, 1999).

Makroskopisch imponiert eine übergroße Plazenta, die nicht dem Tragezeitalter entspricht und diffus von wenigen bis mehreren Millimetern großen Zottenblasen durchsetzt ist. Die Schnittfläche dieser hydropisch geschwollenen Zotten weist eine „Apfelsinen- Fruchtfleisch“ ähnliche Textur auf. Ein Embryo bzw. Fetus fehlt stets (Vogel, 2004; Horn, 2003; Herbst, 1999; Vogel, 1996; Emmrich, 1990).

Histologische Kriterien einer Blasenmole:

- Fehlen von Allantoisgefäßen in der Chorionplatte
- Fehlen von Stammzotten
- ein überwiegend großkalibriger Zottendurchmesser
- die gesamte Zirkumferenz der Zotten erfassende Synzytio- und Zytotrophoblasthyperplasie mit Zell- und Kernatypien
- hydropische vergrößerte, blasig aufgetriebene Chorionzotten mit teilweise erhaltener schmaler Bindegewebssaum unterhalb des Chorionepithels

- gelegentlich einzelne Kapillaren im subepithelial erhaltenen schmalen Bindegewebssaum

(Vogel, 2004; Horn, 2003; Herbst, 1999; Emmrich; 1990)

Pathogenese und Ätiologie der kompletten Blasenmole:

Es handelt sich bei der kompletten Blasenmole um die Folge einer Befruchtungsstörung mit diploidem Chromosomensatz (Vogel, 2004).

Das Genom der kompletten Blasenmole, meist 46 XX, ist dabei rein väterlichen (androgenetischen) Ursprungs, infolge der Befruchtung einer Oozyte, deren Kern entweder durch einen Fehler in der zweiten Reifeteilung als diploides Polkörperchen ausgestoßen wurde, oder aus unbekannter Ursache inaktiviert wurde. Die Befruchtung der leeren (kernlosen) Oozyte durch ein haploides Spermium, mit nachfolgender Duplikation des Spermigenoms steht dabei im Vordergrund. Es entsteht hierbei ein diploider Chromosomensatz (46, XX), dessen Genom homozygot und ausschließlich väterlichen Ursprungs ist. Da fast ausschließlich 46, XX in kompletten Blasenmolengewebe aufgefunden wurde, ist anzunehmen, dass 46, YY nicht entwicklungsfähig ist. In seltenen Fällen findet sich ein 46, XY-Karyotyp. Dieser ist entweder die Folge einer Befruchtung durch zwei haploide Spermien (X und Y), genannt Dispermie oder durch ein diploides Spermium (Diandrie) infolge des Ausfalls der ersten Reifeteilung (Vogel, 2004; Horn, 2003; Herbst, 1999; Vogel; Kircheisen, 1991).

In etwa 15% der Blasenmolen findet sich ein Übergang in eine invasive Mole, in etwa 2,5% folgt ein Chorionkarzinom nach. Es besteht vermutlich ein 10-fach erhöhtes Wiederholungsrisiko in den folgenden Schwangerschaften (Vogel, 2004). Die Komplikation einer invasiven Mole fällt klinisch meist durch Blutungen primär oder mehrere Wochen nach Absaugung bzw. Kürettage einer Molenschwangerschaft auf und es zeigen sich persistierende und/oder ansteigende β -HCG- Werte im 24h-Urin oder Serum der Patientin. Makroskopisch findet man einen hämorrhagischen Knoten am Ort der Implantationsstelle oder gar einen von Blutkoageln ausgefüllten Gewebsdefekt im Myometrium. Mikroskopisch wird die invasive Mole charakterisiert durch hydropische Zotten innerhalb des Myometriums, innerhalb dort befindlicher

Gefäße oder, nach Transport mit dem Blutstrom, in entfernten Lokalisationen, z.B. Vagina oder die Lunge (Vogel, 2004; Herbst, 1999). Die Therapie der Wahl ist die sonographisch kontrollierte Kürettage mit vollständiger Ausräumung des Cavum uteri. Eine prophylaktische Chemotherapie von Patientinnen, die nach Molenausräumung abfallende bzw. negative β -HCG-Werte aufweisen, ist nicht indiziert. Bei persistierenden bzw. ansteigenden β -HCG-Werten, ist in rund 10 % der Fälle eine Chemotherapie indiziert (Horn, 2003).

1.3.5 Windmolen

Die Windmole ist die zweithäufigste Ausprägungsform einer Plazentabildungsstörung (in 28% d. F.) nach der Embryonalmole. Im Gegensatz zu dieser Molenform fehlt eine Embryonalanlage. Dabei sind zwei Unterformen zu unterscheiden. Bei der ersten Form fehlt nicht nur die Embryonalanlage, sondern auch das embryonale Hüllengewebe. Entsprechend ist nur eine meist sehr dünne und unregelmäßig mit Zotten besetzte Chorionhaut ausgebildet. Im Inneren des Fruchtsacks befindet sich eine unterschiedlich dichte gallertige Masse. Bei der zweiten Form ist zusätzlich ein Amnion und/oder Dottersack unterschiedlich gut ausgebildet (Vogel, 1996).

Histologische Kriterien einer Windmole:

- Fehlen von Allantoisgefäßen in der Chorionplatte
 - keine Ausbildung von Stammzotten
 - überwiegend plumpe Zottendurchmesser
 - hypoplastisches, überwiegend ein-,teils zweischichtiges Zottenepithel
 - wenige Kernknospen an der Zottenoberfläche und Zellinseln im Zwischenzottenraum
 - meist hydropisch oder mukoid degeneriertes Zottenstroma, seltener auch fibrös
 - selten Endothelschläuche oder Kapillaren in den Stromamaschen, in den gefäßhaltigen Zotten gelegentlich auch Hofbauer-Zellen
- (Vogel, 2004)

Pathogenese und Ätiologie der Windmole:

Die Windmole stellt eine Entwicklungsstörung der Frucht dar mit Untergang der Embryonalanlage noch vor Etablierung eines embryoplazentaren Gefäßsystems. Die terminationskritische Phase kann etwa Mitte bis Ende der dritten Entwicklungswoche angenommen werden (am Ende des Sekundärzotten- bzw. zu Beginn des Tertiärzottenstadiums).

Bei etwa 60% der Windmolen mit Karyotypisierung wurde eine Chromosomenaberration gefunden. Es handelt sich um autosomale Trisomien oder Tetraploidien ohne diploides Mosaik. Die autosomalen Trisomieformen betrafen überwiegend die Chromosomen 6 bis 12 und 13 bis 16 sowie das Chromosom 20 (Vogel, 1996).

2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Entwicklung des vaskulären Systems in der fetomaternalen Einheit sowie dessen uneingeschränkte Funktion hinsichtlich des Gas- und Nährstofftransportes ist für die normale embryonale Entwicklung von entscheidender Bedeutung. Die Entwicklung der Vaskulatur umfasst zwei wichtige Prozesse, die Vaskulogenese und die Angiogenese. Erste Zelldifferenzierungen im Hinblick auf die Ausbildung einer Vaskulatur sind auf den 21. Tag post partum zu datieren (Zygmunt, 2001). Ab diesem Zeitpunkt bilden die Vorläuferzellen der Endothelialzellen das primäre Gefäßsystem im Embryo und der Plazenta aus (Vaskulogenese). Die Bildung des restlichen Gefäßbaumes erfolgt durch Aussprossung neuer Kapillaren aus bereits präexistierenden Gefäßen (Angiogenese). Der Prozess kann physiologisch geregelt oder überschießend ablaufen (Schmidt, 2007; Demir, 2007; Zygmunt, 2001; Kaufmann, 2000; Ahmed, 1997; Risau, 1997).

Auch die Angiogenese der Plazenta ist abhängig von Wachstumsfaktoren, sowie den entsprechenden Rezeptorstellen innerhalb des Gewebes (Demir, 2007). Es konnten zahlreiche Wachstumsfaktoren (u.a. VEGF, PlGF, Angiopoietin, bFGF) in den letzten Jahren in der Plazenta (in Endothelzellen, glatten Muskelzellen der plazentaren Gefäße, Langerhanszellen und Trophoblastzellen) nachgewiesen werden (Schmidt, 2007; Demir, 2007; Schneider, 2006; Kaufmann, 2000; Geva, 2000; Heits, 1998; Shore, 1997; Shiraishi, 1996; Burton, 1996). Dabei handelte es sich jedoch um normale und ausgereifte Plazenten. Des Weiteren konnte in zahlreichen Geweben und Tumoren eine verstärkte Angiogenese im Rahmen einer vermehrten Expression von Wachstumsfaktoren aufgezeigt werden (Folkmann, 2006; Guschmann, 2002; Paradis, 2000; Neufeld, 1999; Heits, 1998; Hatva, 1996).

Im Gegensatz dazu gibt es kaum Untersuchungen zur Expression der bekanntesten angiogenen Wachstumsfaktoren und deren Einfluss auf die Gefäßentwicklung in Plazentabildungsstörungen.

Die Plazentabildungsstörungen werden der Gruppe der gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen zugeordnet, denen eine primäre Entwicklungsstörung des villösen Trophoblasten mit einer mangelhaften Gefäßausbildung zugrunde liegt (Vogel, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass bei einer höhergradigen Störung die Fruchtanlage nicht entwicklungsfähig ist, ein Embryo in diesen Fällen fehlt oder eine globale Entwicklungsstörung aufweist (Vogel, 2004; Vogel, 1996; Göcke, 1985) mit einer hohen Rate an Spontanaborten.

Man weiß, dass in 50-60% der Fälle chromosomale Aberrationen den Spontanaborten zugrunde liegen, die nicht nur zu Veränderungen an Embryo/Feten führen, sondern auch Strukturstörungen an den Chorionzotten, die Gefäßentwicklung einschließend, hervorrufen, die das Bild der Plazentabildungsstörungen prägen (Vogel, 2004; Herbst, 1999; Vogel, 1996; Horn, 1996; Röckelein, 1989; Göcke, 1985).

Inwieweit die angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF, bFGF und Angiopoietin-1 als Regulationsfaktoren einen Einfluss auf die gestörte Gefäßentwicklung der frühen Fetalperiode in Plazentabildungsstörungen ausüben, soll die vorliegende Arbeit zu neuen Erkenntnissen beitragen.

Es wurden hierzu Plazenten der 7.–16. Gestationswoche bei einer nachgewiesenen Plazentabildungsstörung untersucht. Die Untersuchungen bezogen sich hierbei auf Embryonalmolen, Partialmolen, Blasenmolen und Windmolen.

Hypothese in Bezug auf die Expression von Wachstumsfaktoren in Plazentabildungsstörungen:

1. Es wird sich die Expression der Wachstumsfaktoren VEGF, bFGF und Angiopoietin-1 nur unwesentlich zwischen den einzelnen Formen der Plazentabildungsstörungen unterscheiden.
2. Es werden sich signifikante Differenzen der Expression von Wachstumsfaktoren im Vergleich zu Plazenten mit einer regelhaften Gefäßentwicklung der frühen Fetalperiode zeigen. Die Plazenten mit einer Molenbildung werden die Wachstumsfaktoren in einem geringeren Maße exprimieren.

Hieraus ergaben sich folgende Fragen für die vorliegende Arbeit:

I. Welchen Einfluss haben die Wachstumsfaktoren VEGF, bFGF und Angiopoietin-1 auf die Gefäßentwicklung von Plazentabildungsstörungen?

II. Werden in den betrachteten Gestationswochen alle untersuchten Wachstumsfaktoren in morphologisch gleicher Stärke und in den gleichen Zellen (Chorionepithel, Hofbauerzellen, Fibroblasten, Endothelzellen) innerhalb der Plazentabildungsstörungen exprimiert?

III. Bestehen zwischen den einzelnen Formen der Plazentabildungsstörungen Differenzen in der Expression einzelner oder aller Wachstumsfaktoren?

IV. Gibt es hinsichtlich des Gestationsalters Unterschiede in der Expression der einzelnen Wachstumsfaktoren?, d. h. werden einzelne oder alle angiogenen Wachstumsfaktoren erst ab einer bestimmten Gestationswoche in bestimmter Quantität exprimiert?

V. Wenn Differenzen nachweisbar sind, betreffen diese alle exprimierenden Zellen?

VI. Lassen sich Unterschiede in der Expression der Wachstumsfaktoren zwischen regelhaftem Plazentagewebe der frühen Fetalperiode und Plazentabildungsstörungen aufzeigen?

3 Material und Methoden

3.1 Das Untersuchungskollektiv

Bei dem für die Studie herangezogenen Plazentagewebe handelt es sich um Abortmaterial von Frauen, die sich im Zeitraum von 1996 bis 2000 in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Charité, Standort Virchow-Klinikum aufhielten.

Das Plazentagewebe wurde im Rahmen eines therapeutischen Eingriffs mittels Kürettage gewonnen:

- Teils induzierter Abort bei sonographisch nachgewiesener Molenschwangerschaft
- Nachkürettage bei Spontanabort
- Kürettage aus medizinischer oder sozialer Indikation

3.1.1 Einschlusskriterien

- Plazentagewebe der frühen Fetalperiode (ca. 7.-16. SSW)
- Vorliegen einer Plazentabildungsstörung vom Typ:
 - Embryonalmole
 - Partialmole
 - Blasenmole
 - Windmole

3.1.2 Ausschlusskriterien

- bekannte Medikamenteneinnahmen mit Einfluss auf die Blutgefäßbildung
- Nachweis von Entzündungszeichen im placentaren Gewebe
- bekannte lokale oder systemische Infektionen der Schwangeren

Durch den zusätzlichen Ausschluss von Entzündungszeichen im placentaren Gewebe mit vorliegender Plazentabildungsstörung sowie lokalen oder systemischen Infektionen der Schwangeren sollte sichergestellt werden, dass diese nicht die mögliche oder sogar alleinige Ursache für den Abort darstellt, sondern die mit hoher Wahrscheinlichkeit vorliegende chromosomale Aberration bei Plazentabildungsstörungen.

Im Hinblick auf die unter 3.1.1 und 3.1.2 aufgeführten Ein- und Ausschlusskriterien wurden 43 Plazenten für die vorliegende Studie ausgewählt, die die einzelnen Molentypen repräsentierten:

- 12 Embryonalmolen
- 12 Partialmolen
- 9 Blasenmolen
- 10 Windmolen

Aus diesem Gewebe wurde dann in den folgenden Arbeitsschritten die entsprechenden Gewebeschnitte zur Untersuchung der angiogenen Wachstumsfaktoren angefertigt.

3.2 Materialien

3.2.1 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden zur Vorbereitung und Anfärbung der Gewebeschnitte benötigt:

- Ethanol 50 Vol.-%, 70 Vol.-%, 96 Vol.-%, 100 Vol.-% (Herbeta Arzneimittel)
- Xylol (Baker)
- Citronensäure-Monohydrat (Merck)
- Natriumhydroxid (Merck)
- Aqua dest.
- Vitro-Clud (Langenbrinck)
- Tris-Base (Sigma)
- Tris-HCL (Sigma)
- Natriumchlorid (Merck)
- Primärantikörper Ang-1/4 (C-19):sc-9360 (Santa Cruz Biotechnology)
- Primärantikörper bFGF (Ab-3), (Calbiochem Cat# GF 22)
- Primärantikörper VEGF (Ab-3), (Calbiochem Cat# GF 25)
- Antikörperverdünnungsmedium (DAKO, Code No. S2022)
- Biotinyliertes Kaninchen Anti-Mausimmunglobulin, „Brückenantikörper“ (DAKO K5005)
- Streptavidin-Enzym-Konjugat, „APAAP-Immunkomplex“ (DAKO K5005)
- Naphtolphosphat, „Chromogen-Substrat“ (DAKO K5005)

- AP-Substratpuffer (DAKO K5005)
- Hämatoxylin (DAKO Code No. S2020)
- Endothelzellmarker CD 31 (DAKO Code No. M0823)
- Proliferationsmarker MiB-1 (DAKO Code No. M7240)

3.2.2 Geräte und sonstige Materialien

Die nachfolgend aufgeführten Geräte und Materialien wurden für die Herstellung der Gewebeschnitte sowie für die Durchführung und Auswertung der Versuchsreihe benötigt.

- In Paraffin eingebettetes Plazentagewebe
- Immunologische Objektträger (DAKO)
- Wasserbad
- Wärmeschrank (Heraeus)
- Objektträgerhalter
- Mikrowelle (Bosch)
- DAKO-Pen (DAKO Code No. S2002)
- Feuchte Kammer (quartett GmbH)
- Acryl- und Aluminiumtrays (quartett GmbH)
- Schlittenmikrotom (Leica SM2000R)
- Lichtmikroskop (Leica DMRB) mit aufsitzender Fotoeinrichtung und angeschlossenen Photoautomat (Leica Wild MPS 28)
- Glasküvetten

3.3 Methoden

3.3.1 Die Herstellung und Vorbehandlung der Paraffinschnitte

Von dem zuvor in Formalin fixierten und später in Paraffin eingebetteten Plazentagewebe wurden mit dem Schlittenmikrotom 4 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt.

Im Anschluss erfolgte das Aufziehen des jeweiligen Paraffinschnittes auf einen immunologischen Objektträger aus einem vorgeheizten, mit Aqua dest. gefülltem Wasserbad.

Für die weitere Verwendung der hergestellten Gewebeschnitte im immunhistochemischen Färbeprozess schloss sich eine Vorbehandlung aus:

1. Trocknung
2. Entparaffinierung
3. und Demaskierung an.

Die einzelnen Arbeitsschritte dienten dem Ziel einer besseren Haftung der Gewebeschnitte auf den Objektträgern (Trocknungsvorgang), einer Reduzierung der unspezifischen Hintergrundfärbung (Entparaffinierung) sowie einer verbesserten Anfärbung der jeweils gesuchten Antigene durch deren Freilegung (Demaskierung).

Zu 1.) Hierzu wurden die Gewebeschnitte über Nacht in einem Wärmeschrank bei 56,0°C aufbewahrt.

Zu 2.) Zur Entparaffinierung hat man die Gewebeschnitte im Anschluss für dreimal zehn Minuten in ein Xylolbad gestellt.

Daraufhin erfolgte eine Behandlung in der absteigenden Alkoholreihe. Die Schnitte wurden für jeweils zweimal fünf Minuten in 100% Ethanol, im Weiteren für zweimal fünf Minuten in 50% Ethanol gelagert und anschließend zweimal zwei Minuten in Aqua dest. hydratisiert.

Zu 3.) Die Gewebeschnitte wurden in einer mit Citratpuffer gefüllten Kunststoffküvette für zweimal fünf Minuten einer Mikrowellenbehandlung bei 600°C unterzogen.

Nach einem fünfzehnminütigem Abkühlvorgang wurden die Schnitte jeweils dreimal für 1-2 Minuten mit Aqua dest., dann in TBS (Tris buffered saline) gespült und zur weiteren Behandlung in TBS aufbewahrt.

3.3.2 Immunhistochemische Färbung – „APAAP-Methode“

3.3.2.1 Theoretische Abhandlung

Immunhistochemische Verfahren werden zum Nachweis und zur Lokalisation von Antigenen in dem jeweils betrachteten Gewebe eingesetzt. In unserer Versuchsreihe bedienen wir uns der APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase-Methode).

Das Verfahren bedient sich löslicher Enzym-anti-Enzym-Immunkomplexe zur Signalverstärkung und Sichtbarmachung der Primärantikörperbindung an das jeweilig gesuchte Antigen im Gewebe. Dies wird vor allem durch die hohe Anzahl von Enzymmolekülen erreicht, die pro Gewebeantigen zur Verfügung stehen. Sowohl der Primärantikörper als auch der Antikörper des Enzym-Immunkomplexes stammen dabei von derselben Spezies ab, so dass der Sekundärantikörper (auch Brückenantikörper genannt), diese miteinander verbinden kann.

Zwei Anforderungen muss dieser Brückenantikörper erfüllen:

Zum einen muss er gegen die Immunglobuline der Spezies gerichtet sein, aus der sowohl der Primärantikörper, als auch die im Enzym-Komplex gebundenen Antikörper stammen.

Zum anderen muss dieser Brückenantikörper im Überschuss vorliegen, so dass einer der beiden Fab-Arme des Brückenantikörper an den Primärantikörper binden kann, der andere Fab-Arm des Brückenantikörper hingegen zur Anlagerung des Antikörpers aus dem Enzym-Komplex verfügbar ist.

Diese Enzym-Anti-Enzymkomplex-Techniken werden nach dem verwendeten Enzym-Immunkomplex benannt, in unserem Fall bei der APAAP-Methode bestehend aus zwei Molekülen alkalischer Phosphatase und einem dagegen gerichteten Antikörper (Naish, 1989).

Reihenfolge der Arbeitsschritte:

1. Auftragen des jeweiligen Primärantikörper auf die Gewebeschnitte
2. Hinzufügen des biotinylierten Brückenantikörper
3. Zugabe des Enzym-anti-Enzymkomplexes
4. Auftragen der Substratlösung

In unserer Versuchsreihe diente als Chromogen-Substrat modifiziertes Neufuchsin/Naphtolphosphat. Die alkalische Phosphatase spaltet dieses Substrat in seine Phenol- und Phosphatkomponenten und ermöglicht es so den Chromogenen (unlösliche Diazoniumsalze) mit den Phenolen zu unlöslichen Azofarbstoffen zu reagieren. Um das Ausmaß einer unspezifischen Anfärbung beurteilen zu können, wurde bei jeder Färbeserie ein Gewebeschnitt als Negativkontrolle mitgeführt. Hierzu wurde anstatt des jeweiligen Primärantikörpers ein negatives Kontrollreagenz aufgetragen, in unserem Fall handelte es sich um das Antikörperverdünnungsmedium.

3.3.2.2 Protokoll der immunhistochemischen Färbung mit VEGF (Ab-3)

Zum Nachweis der Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors im Plazentagewebe (mit Schwerpunkt auf Hofbauer-Zellen, Chorionepithel, Endothelzellen sowie Fibroblasten) wurde die VEGF (Ab-3)-Immunfärbung eingesetzt.

Der monoklonale Primärantikörper gehört der Klasse IgG1 an und wurde durch die Immunisierung von Mäusen gewonnen.

Verwendete Lösungen:

Citratpuffer (pH = 6,0) 5,0 l, bestehend aus:

Citronensäure-Monohydrat: 10,5 g in 4500 ml Aqua dest., mit NaOH 2N (2mol/l): 62 ml

TBS (Tris buffered saline, pH = 7,4-7,6), bestehend aus:

Tris-Base: 4,5 g, Tris-HCL: 34,85 g, NaCl: 43,8 g in 5,0 l Aqua dest.

- *Ansatz für Primärantikörper VEGF (Ab-3), 12 Schnitte a 300 µl:
Verdünnung (1:10)*

Primärantikörper: 360 µl

Antikörperverdünnungsmedium: 3240 µl

Negativkontrolle:

Antikörperverdünnungsmedium

Detektionskit DAKO 5005 bestehend aus:

- Biotinylierter Brückenantikörper (120 ml gebrauchsfertig)
Es handelt sich um Kaninchen Anti-Maus-Immunglobulin in Pufferlösung, die hintergrundreduzierende Komponenten und Natriumazid enthält.
- APAAP-Immunkomplex (120 ml gebrauchsfertig)
Die löslichen Immunkomplexe bestehen aus intestinaler alkalischer Phosphatase (vom Kalb) und monoklonalen Maus-Antikörpern gegen alkalische Phosphatase (vom Kalb) in einer Pufferlösung, die hintergrundreduzierende Komponenten, Stabilisatoren und Natriumazid enthält.
- Chromogen-Substrat-Ansatz (13 Schnitte a 300 µl)
Chromogen Red 1: 156 µl
Chromogen Red 2: 156 µl
Chromogen Red 3: 156 µl
- AP-Substratpuffer (13 Schnitte a 300 µl) = 3900 µl

Durchführung:

Im Anschluss an die *in Kapitel 3.3.1 erläuterte Herstellung und Vorbehandlung der Paraffinschnitte*, fanden alle nun folgenden Inkubationsschritte im Rahmen der immunhistochemischen Färbung, zur Vorbeugung einer Austrocknung der Gewebeschnitte, in einer feuchten Kammer und bei Raumtemperatur statt.

Nach Abtropfen der Objektträger aus der TBS-Lösung und Markierung der Gewebeschnittsränder (Verhinderung einer Antikörperabschwemmung), erfolgte das Auftragen des Primärantikörper VEGF (Ab-3).

Jeweils ein Schnitt in jeder Färbeserie, der als Negativkontrolle fungierte, wurde parallel anstatt des Primärantikörper mit dem negativen Kontrollreagenz (Antikörperverdünnungsmedium) behandelt.

Alle Schnitte wurden nun für die Zeit von dreißig Minuten inkubiert.

Nach dem jetzigen und den folgenden Inkubationsschritten wurden die Präparate für ein bis zwei Minuten jeweils mit Leitungswasser und anschließend mit TBS gespült.

Bei den folgenden Schritten konnte die Negativkontrolle analog zu den anderen Gewebeschnitten behandelt werden.

Es erfolgte nun das Auftragen des biotinylierten Brückenantikörpers mit einer weiteren Inkubationszeit von dreißig Minuten.

Im Anschluss, nach Abspülen der Präparate, wurden diese mit dem APAAP-Immunkomplex bedeckt, für dreißig Minuten inkubiert und daraufhin abgespült.

Mit der mindestens zwanzig Minuten vor Behandlung angesetzten Färbelösung aus Chromogen-Substrat und AP-Substratpuffer wurden die Gewebeschnitte abschließend bedeckt, für fünfzehn Minuten inkubiert und dann abgespült.

Diese immunhistochemische Färbeserie (mit VEGF (Ab-3)) wurde sowohl bei den Embryonalmolen als auch bei den Partialmolen, Blasenmolen und Windmolen durchgeführt.

Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte direkt im Anschluss (*siehe Kapitel 3.3.2.5*).

3.3.2.3 Protokoll der immunhistochemischen Färbung mit bFGF (Ab-3)

Für den Nachweis des primären Fibroblasten Wachstumsfaktors im Plazentagewebe der zu untersuchenden Molenformen, wurde die bFGF (Ab-3)-Immunfärbung eingesetzt.

Bei diesem monoklonalen Primärantikörper handelt es sich um einen IgG1-Antikörper, gewonnen durch die Immunisierung von Mäusen.

Verwendete Lösungen:

- *Ansatz für Primärantikörper bFGF (Ab-3), 12 Schnitte a 300 µl:*
Verdünnung (1:5)
Primärantikörper: 720 µl
Antikörperverdünnungsmedium: 2880 µl
- Die noch verbleibenden Lösungen sind identisch mit den *in Kapitel 3.3.2.2 Protokoll der immunhistochemischen Färbung mit VEGF (Ab-3)*.

Durchführung:

Die Reihenfolge der einzelnen Inkubationsschritte, bis auf den jeweiligen Primärantikörper, folgte dem *in Kapitel 3.3.2.2 (unter Durchführung)* dargelegten Schema.

Alle Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur ausgeführt.

Die Immunfärbung mit bFGF (Ab-3) fand in Folge bei Embryonalmolen, Partialmolen, Blasenmolen und Windmolen statt.

Anschließend folgte die Gegenfärbung der Gewebeschnitte (*siehe Kapitel 3.3.2.5*).

3.3.2.4 Protokoll der immunhistochemischen Färbung mit Ang-1/4(C-19): sc-9360

Als Nachweis für den angiogenen Wachstumsfaktor Angiopoietin-1 wurde die Ang-1/4 (C-19)-Immunfärbung durchgeführt. Es handelt sich hierbei um einen polyklonalen Antikörper.

Verwendete Lösungen:

- *Ansatz für Primärantikörper Ang-1/4 (C-19), 12 Schnitte a 300 µl:*
Verdünnung (1:100)
Primärantikörper: 36 µl
Antikörperverdünnungsmedium: 3564 µl
- Die zuzüglich zum Primärantikörper benötigten Lösungen und Ansätze sind *im Kapitel 3.3.2.2* aufgeführt.

Durchführung:

Die Reihenfolge der einzelnen Arbeitsschritte, bis auf die Verwendung des jeweiligen Primärantikörper (in diesem Fall Ang-1/4 (C-19)), folgten dem im *Kapitel 3.3.2.2 (unter Durchführung)* dargelegten Schema. Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Die Immunfärbung mit Ang-1/4 (C-19) fand in Folge bei Embryonalmolen, Partialmolen, Blasenmolen und Windmolen statt.

Im Anschluss erfolgte die sofortige Gegenfärbung der Gewebeschnitte (*Kapitel 3.3.2.5*).

3.3.2.5 Die Gegenfärbung der Gewebeschnitte

Nach Abschluss der immunhistochemischen Färbung mit VEGF (Ab-3), bFGF (Ab-3) und Ang-1/4 (C-19) wurden die Gewebeschnitte jeweils einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin unterzogen. Diese Kernfärbung dient der Sichtbarmachung der Antigen-negativen Zellkerne.

Verwendete Lösungen:

- *Hämatoxylin (gebrauchsfertig)*
- *Ethanol 70%, 96%, 100%*
- *Xylol*

Durchführung:

Die Gewebeschnitte wurden jeweils mit 300 µl Hämatoxylin bedeckt, für eine Minute inkubiert und anschließend mit Leitungswasser ein bis zwei Minuten gespült.

Zur Bläuung der Präparate erfolgte eine zehnminütige Lagerung der Schnitte in einem Wasserbad.

Im Anschluss wurden die Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert. Hierbei wurden sie jeweils 20x in 70%, 96% und 100% Ethanol geschwenkt.

Abschließend erfolgte eine Behandlung mit Xylol und die Eindeckung der Präparate mit Vitro-Clud.

3.3.3 Auswertung mit Hilfe des Lichtmikroskops

Die Auswertung der Präparate erfolgte im Hinblick auf die Expression der Wachstumsfaktoren semiquantitativ, unter Verwendung eines Lichtmikroskops der Firma Leica.

Das Okular besaß die Stärke 10 und die einzelnen Objektive, die verwendet wurden, hatten die Vergrößerung 1:2,5 bis 1:40.

Jeder Schnitt in dieser Versuchsreihe wurde nach der gleichen Vorgehensweise mikroskopisch beurteilt. In den kleinen Vergrößerungen von 1:2,5 – 1:10 erfolgte die Begutachtung der Schnitte auf Materialmenge, Färbequalität und Kriterien der einzelnen Plazentabildungsstörungen, um eventuelle Abweichungen und daraus resultierende systematische Fehler in der Auswertung der Ergebnisse zu vermeiden. Hierzu wurden die Präparate, wie auch in den folgenden Schritten, unter dem Mikroskop von links nach rechts meanderförmig inspiziert. In den stärkeren Vergrößerungen erfolgte die genaue Begutachtung und Beurteilung der Zottenanschnitte im Hinblick auf die Expression der jeweiligen Wachstumsfaktoren. Um eine repräsentative Aussage über den jeweils betrachteten Gewebeschnitt treffen zu können, wurden je nach der Größe des Schnittes 20 – 30 Gesichtsfelder eingestellt.

Die Auswertung der Zottenanschnitte legte ihren Schwerpunkt auf vier der dort vorhandenen Zelltypen. Zuerst erfolgte die Betrachtung des Chorionepithels, das zu diesem Zeitpunkt (frühe Plazentaperiode) noch größtenteils zweireihig vorliegt, mit Untergliederung in eine äußere Synzytiotrophoblastschicht und eine innere Zytotrophoblastenreihe. Es wurde darauf geachtet, ob ein Unterschied in der Anfärbung und damit abweichendes Expressionsverhalten in Bezug auf die untersuchten angiogenen Wachstumsfaktoren in den beiden Zellreihen auftrat.

In einem weiteren Schritt erfolgte die Begutachtung der Hofbauer-Zellen, befindlich im embryonalen Stroma. Es handelt sich bei diesen Zellen um eine Makrophagen-subpopulation, nachgewiesen über die Expression identischer Oberflächenantigene (Vogel; 1996).

Neben dem Chorionepithel und den Hofbauerzellen wurden ebenfalls Fibroblasten und Endothelzellen hinsichtlich der Expression angiogener Wachstumsfaktoren untersucht. Um die Vaskularisation der Zotten besser quantifizieren zu können, wurden die Gefäßanschnitte pro Zotte festgehalten.

Graduierung:

Zur Beurteilung (Objektivierung) des immunhistochemischen Färbeverhaltens der betrachteten Zelltypen in den Plazentabildungsstörungen wurde eine Graduierung der Färbereaktion vorgenommen.

- Grad I (keine Expression): Die jeweils betrachteten Zellgruppen des Präparates zeigten keine Reaktion nach Anfärbung durch den vorliegenden angiogenen Faktor („negativ“)
- Grad II (leichte Expression): Eine mäßige Rotfärbung in den zu beurteilenden Zellen konnte nachgewiesen werden („leicht positiv“)
- Grad III (kräftige Expression): Bei Vorliegen einer starken Expression des jeweils untersuchten Wachstumsfaktor, konnte eine kräftige Rotfärbung in der betrachteten Zellen nachgewiesen werden („kräftig positiv“)

Bekanntermaßen bildet sich im Rahmen der Gefäßentwicklung einer regelhaften Plazenta von Beginn der 6. Schwangerschaftswoche an eine kapilläre Basalmembran aus (Schneider, 2006; Kohen, 2000; Demir, 1989). Man kann vereinzelt Kapillaren regellos verteilt im peripheren Zottenstroma nachweisen, die zu diesem Zeitpunkt noch kernhaltige embryonale Blutkörperchen enthalten. Die Zahl der Blutgefäße nimmt mit weiterem Verlauf der Schwangerschaft stetig zu, man findet sie zunehmend subepithelial, in ihren Lichtungen überwiegend kernfreie Erythrozyten (Vogel, 2004; Vogel, 1996; Zygmunt, 2001).

Im Gegensatz hierzu weisen Plazentabildungsstörungen nachweislich Störungen in der Gefäßentwicklung auf, die durch eine starke Rarifizierung bzw. Fehlen von Gefäßen im Zottenwerk imponieren (Vogel, 2004; Herbst, 1999).

Im Hinblick darauf erschien es sinnvoll nicht nur das Fehlen oder Vorhandensein angeschnittener Gefäße festzuhalten, sondern eine zusätzliche Differenzierung zwischen lumenbildend und alleinigem Nachweis von Endothelknospen vorzunehmen. Hierdurch ergab sich die Möglichkeit eines Vergleiches einer eventuellen Veränderung der Gefäßentwicklung der betrachteten Plazentabildungsstörungen untereinander und zu regelhaft entwickelten Plazenten in Abhängigkeit vom Gestationsalter.

3.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte computergestützt mit Hilfe des SPSS-Programmes (Statistical Package for the Social Sciences), Version 11 auf einem Pentium-PC (Windows 98).

Die Erhebung der Diagnose „Plazentabildungsstörung“ erfolgte im Vorfeld durch Mitarbeiter der Abteilung für Paidopathologie und Placentologie des Institutes Pathologie der Charité.

Die Daten zum Expressionsverhalten der angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF, bFGF und Angiopoietin-1 wurden aus der immunhistochemischen Färbung (mit Hilfe der APAAP-Methode) gewonnen.

4 Ergebnisse

Die im Rahmen der Studie erfassten Daten über die Patientinnen sowie deren untersuchtes plazentares Gewebe wurden aus Gründen des Datenschutzes in einem Protokoll verschlüsselt aufgelistet unter Berücksichtigung der unter 3.1.1 und 3.1.2 aufgeführten Ein- und Ausschlusskriterien.

4.1 Klinische Befunde und deskriptive Statistik

Das Untersuchungskollektiv umfasste 43 Frauen (43 Plazenten). Die Einteilung in einzelne Gruppen erfolgte nach der Art der vorliegenden Plazentabildungsstörung (Embryonalmole, Partialmole, Blasenmole und Windmole).

Alter der Patientinnen: (Tab. 1)

- Embryonalmolen: Das Alter der Frauen lag im Mittel bei 31 Jahren und umfasste eine Spanne von 18 bis 39 Jahren.
- Partialmolen: Das Alter der Frauen lag im Mittel bei 30 Jahren und umfasste eine Spanne von 21 bis 43 Jahren.
- Blasenmolen: Das Alter der Frauen lag im Mittel bei 29 Jahren und umfasste eine Spanne von 21 bis 38 Jahren.
- Windmolen: Das Alter der Frauen lag im Mittel bei 30 Jahren und umfasste eine Spanne von 20 bis 37 Jahren

Gestationsalter: (Tab. 1)

- Embryonalmolen: Das Gestationsalter lag im Mittel bei 10 Wochen und variierte insgesamt zwischen der 8. und 12. Schwangerschaftswoche.
- Partialmolen: Das Gestationsalter lag im Mittel bei 11 Wochen und variierte insgesamt zwischen der 8. und 16. Schwangerschaftswoche.
- Blasenmolen: Das Gestationsalter lag im Mittel bei 9 Wochen und variierte insgesamt zwischen der 8. und 10. Schwangerschaftswoche.
- Windmolen: Das Gestationsalter lag im Mittel bei 10 Wochen und variierte insgesamt zwischen der 7. und 11. Schwangerschaftswoche.

Plazentabildungsstörung		Statistik		
Alter der Patientin/Gestationsalter	<u>Embryonalmole</u>	N	12	12
		Mittelwert	31	10
		Minimum	18	8
		Maximum	39	12
	<u>Partialmole</u>	N	12	12
		Mittelwert	30	11
		Minimum	21	8
		Maximum	43	16
	<u>Blasenmole</u>	N	9	9
		Mittelwert	29	9
		Minimum	21	8
		Maximum	38	10
	<u>Windmole</u>	N	10	10
		Mittelwert	30	10
		Minimum	20	7
		Maximum	37	11

Tab. 1: Explorative Datenanalyse zum Alter der Frauen und Gestationsalter im Untersuchungskollektiv

4.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Im Rahmen der Auswertung wurden 43 Plazenten begutachtet, von denen jeweils drei Stufenschnitte aus unterschiedlichen Abschnitten der Plazenta vorlagen, analog zu den drei zu bestimmenden angiogenen Wachstumsfaktoren (VEGF, bFGF, Angiopoietin-1). Die Beurteilung der einzelnen Zelltypen (Hofbauerzelle, Chorionepithel, Endothelzelle und Fibroblast) hinsichtlich der Expression der angiogenen Wachstumsfaktoren, richtete sich nach dem Färbeverhalten. Die Intensität der Färbereaktion wurde graduiert nach „negativ“, „leicht“ und „kräftig positiv“ festgehalten (*siehe Kapitel 3.3.3*).

Ebenso wurde der Stand der Gefäßentwicklung in den Gruppen der Plazentabildungsstörungen erfasst und graduiert nach „keine“ Gefäße, nur „Endothelzellknospen“ oder „vereinzelte Gefäßlumina“ vorhanden, wiedergegeben.

Hinsichtlich der Beurteilung von Unterschieden bei der Expression der angiogenen Wachstumsfaktoren bezüglich des Gestationsalters, wurden die einzelnen Gruppen der Plazentabildungsstörungen in zwei Untergruppen aufgeschlüsselt, um eine bessere Aussage treffen zu können. Es wurden jeweils die Plazenten der 7.-9. SSW als Gruppe 1 betrachtet und die Plazenten mit einem Gestationsalter über 9. SSW als Gruppe 2 gegenübergestellt.

Kritisch bleibt anzumerken, dass von den insgesamt 129 angefertigten Plazentaschnitten nur 120 (ca. 93%) hinsichtlich der oben aufgeführten Kriterien ausgewertet werden konnten. Die restlichen Plazentaschnitte (n=9, ca. 7%) ließen aufgrund einer zu geringen Materialmenge keine objektive Bewertung zu.

Die ausgewerteten 120 Plazentaschnitte gliederten sich wie folgt auf (Tab. 2):

Molenformen	Anzahl d. Schnitte		
	VEGF	bFGF	Angiopoietin-1
Embryonalmolen	12/12	12	10
Partialmolen	10/12	11	12
Blasenmolen	7/9	8	9
Windmolen	9/10	10	10
Gesamt	38	41	41

Tab. 2: Untersuchungskollektiv

4.2.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Anfärbung mit VEGF

4.2.1.1 Embryonalmolen (n=12)

Die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) erfolgte vornehmlich durch das Chorionepithel und die Hofbauerzellen im Zottenstroma (vergl. Tab. 3 und 4). Hierbei wies das Chorionepithel in 58,3% und die Hofbauerzellen in 83,3% der Fälle eine kräftige Expression aus (Abb. 1). Die übrigen Fälle zeigten eine leichte Expression von VEGF. Ein morphologisch nachweisbarer Unterschied hinsichtlich der Expression von VEGF in den zwei Zellschichten des Chorionepithels (Zyto- und Synzytiotrophoblast) konnte nicht festgehalten werden. Sowohl in Endothelzellen als auch in Fibroblasten wurde keine Expression von VEGF nachgewiesen.

In 16,7% der Fälle konnten Gefäßlumina mikroskopisch nachgewiesen werden, in 66,7% der Fälle zeigten sich nur vereinzelt Endothelzellknospen und in weiteren 16,7% fanden sich weder Endothelzellknospen noch Gefäßlumina. Bei unsicheren Fällen mit nicht eindeutiger Beurteilbarkeit der Endothelzellen, erfolgte eine zusätzliche Anfärbung mit CD-31. Es handelt sich bei CD-31 um einen spezifischen Endothelzellmarker, der in unklaren Fällen Aufschluss über das Vorhandensein von Endothelzellen ermöglicht. Bezüglich des Gestationsalters konnten keine Unterschiede hinsichtlich des Expressionsverhaltens von VEGF bei den betrachteten Zelltypen zwischen Gruppe 1 (7.-9. SSW) und Gruppe 2 (>9. SSW) aufgezeigt werden.

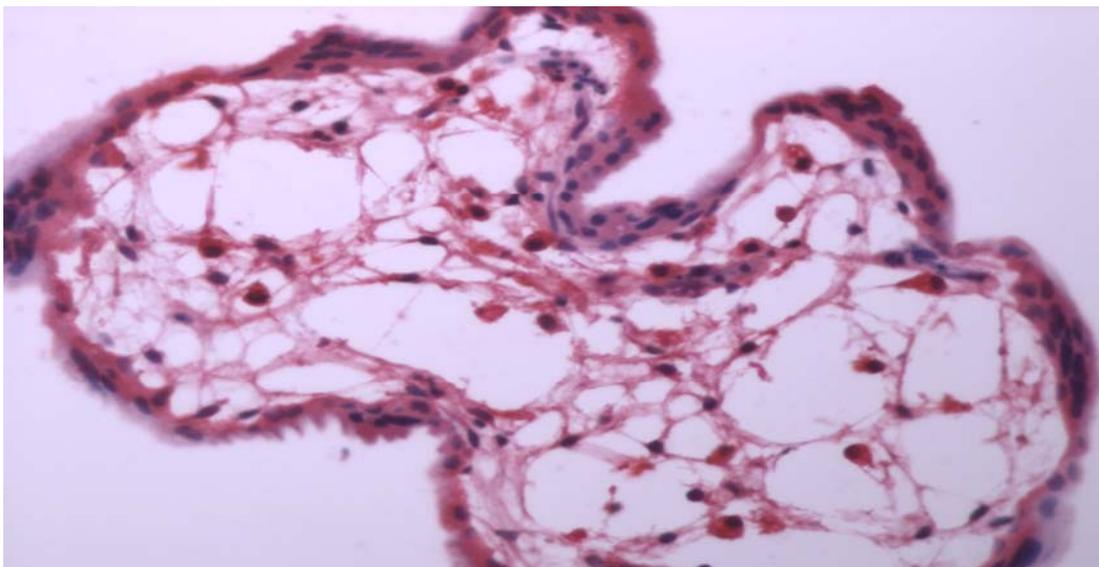


Abb. 1: Darstellung einer kräftigen Expression von VEGF im Chorionepithel und Hofbauerzellen einer Embryonalmole der 12. SSW, 200x Vergr. (K 3495)

4.2.1.2 Partialmolen (n=10)

Die immunhistochemischen Untersuchungen wiesen eine vornehmliche Expression von VEGF durch Chorionepithel und Hofbauerzellen auf. Das Chorionepithel zeigte in 80,0% eine leichte und in 20,0% der Fälle eine kräftige Expression von VEGF, ohne dass eine bevorzugte Expression in einer der beiden Zellschichten des Chorionepithels (Zyto- und Synzytiotrophoblast) festgehalten werden konnte. Die Hofbauerzellen ließen in 10,0% eine leichte und in 90,0% der Fälle eine kräftige Expression von VEGF erkennen (vergl. Tab. 3 und 4). Sowohl im Endothel als auch bei den Fibroblasten konnte keine Reaktion im Sinne einer Expression von VEGF nachgewiesen werden.

In 40% der Fälle konnten mikroskopisch Gefäßlumina identifiziert werden, in 10% Endothelzellknospen und in weiteren 50% zeigten sich weder Gefäßlumina noch Endothelzellknospen.

Bezüglich des Gestationsalters konnten keine Unterschiede hinsichtlich des Expressionsverhaltens von VEGF bei den betrachteten Zelltypen zwischen Gruppe 1 (7.-9. SSW) und Gruppe 2 (>9. SSW) aufgezeigt werden.

4.2.1.3 Blasenmolen (n=7)

Hinsichtlich der Expression von VEGF wiesen Chorionepithel und Hofbauerzellen ein einheitliches Ergebnis auf. Bei 42,9% der Fälle ließen sich sowohl im Chorionepithel als auch in den Hofbauerzellen eine leichte und in mehr als der Hälfte der Fälle (57,1%) eine kräftige Expression von VEGF nachweisen (vergl. Tab. 3 und 4). Ein morphologisch fassbarer Unterschied bezüglich des Expressionsverhaltens innerhalb der beiden Zellschichten des Chorionepithels (Zyto- und Synzytiotrophoblast) konnte nicht festgehalten werden. Sowohl im Endothel als auch bei den Fibroblasten konnte keine Reaktion im Sinne einer Expression von VEGF nachgewiesen werden. In 57,1% der Fälle zeigten sich mikroskopisch Endothelzellknospen, in 42,9% keine Gefäßlumina oder Endothelzellknospen. Im Hinblick auf das Gestationsalter konnten für die exprimierenden Zelltypen (Chorionepithel und Hofbauerzellen) Unterschiede bei der Expression von VEGF zwischen der Gruppe 1 (7.-9. SSW) und Gruppe 2 (>9.SSW) festgehalten werden. Die Gruppe 1 wies in 75,0 % der Fälle eine leichte und in nur 25,0% eine kräftige Expression aus, hingegen konnte in der Gruppe 2 in 100,0% der

Fälle eine kräftige Expression nachgewiesen werden (Abb. 2 a und 2 b).

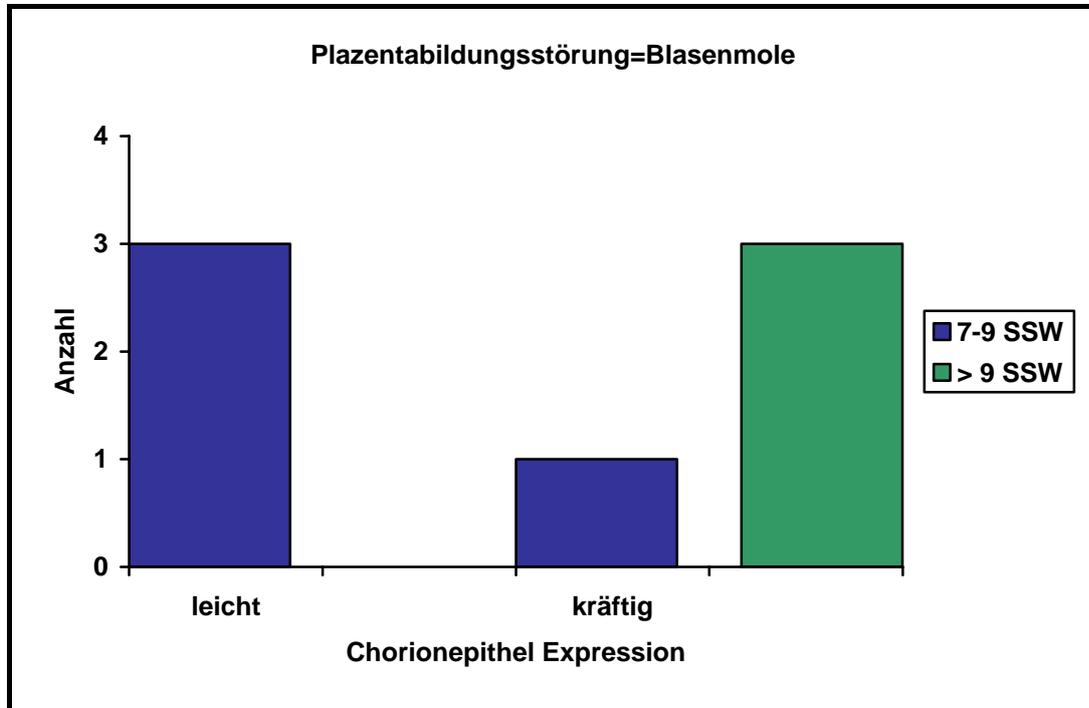


Abb. 2 a: Darstellung der Expression von VEGF im Chorionepithel in Abhängigkeit vom Gestationsalter (gssw).

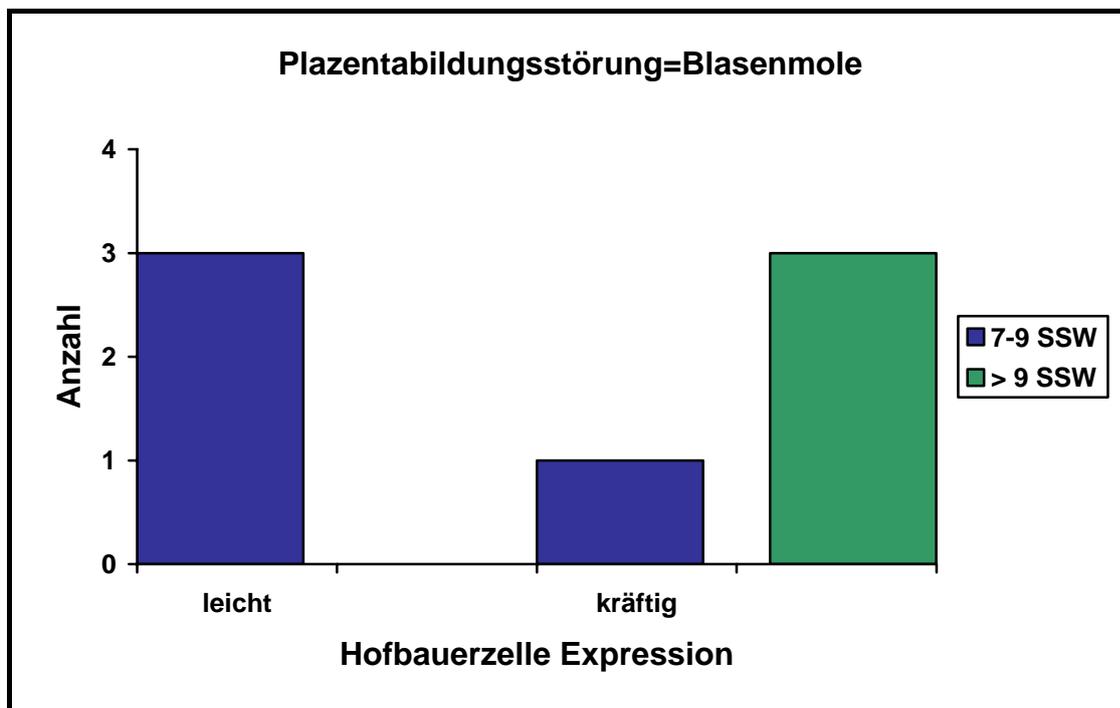


Abb. 2 b: Darstellung der Expression von VEGF in den Hofbauerzellen in Abhängigkeit vom Gestationsalter.

4.2.1.4 Windmolen (n=9)

Die immunhistochemischen Untersuchungen wiesen bei 77,8% der Windmolen eine leichte und in 22,2% der Fälle eine kräftige Expression von VEGF im Chorionepithel aus (Tab. 3). Ein morphologischer Unterschied hinsichtlich des Expressionsverhaltens in den beiden Zellschichten des Chorionepithels (Zyto- und Synzytiotrophoblast) konnte nicht aufgezeigt werden. Die Hofbauerzellen der Windmolen zeigten insgesamt ein im geringeren Maße ausgeprägtes Expressionsverhalten von VEGF. In 33,3% der Fälle konnte keine Reaktion im Sinne einer Expression von VEGF nachgewiesen werden, 44,4% zeigten eine leichte und 22,2% der Fälle eine kräftige Expression von VEGF in den Hofbauerzellen (Tab. 4 und Abb. 3). Sowohl das Endothel als auch die Fibroblasten der Windmolen wiesen keine Expression von VEGF aus. In 77,8% der Fälle konnten mikroskopisch Endothelzellknospen nachgewiesen werden, in 22,2% der Fälle weder Endothelzellknospen oder Gefäßlumina.

Bezüglich des Gestationsalters konnten keine Unterschiede hinsichtlich des Expressionsverhaltens von VEGF bei den betrachteten Zelltypen zwischen Gruppe 1 (7.-9. SSW) und Gruppe 2 (>9. SSW) aufgezeigt werden.

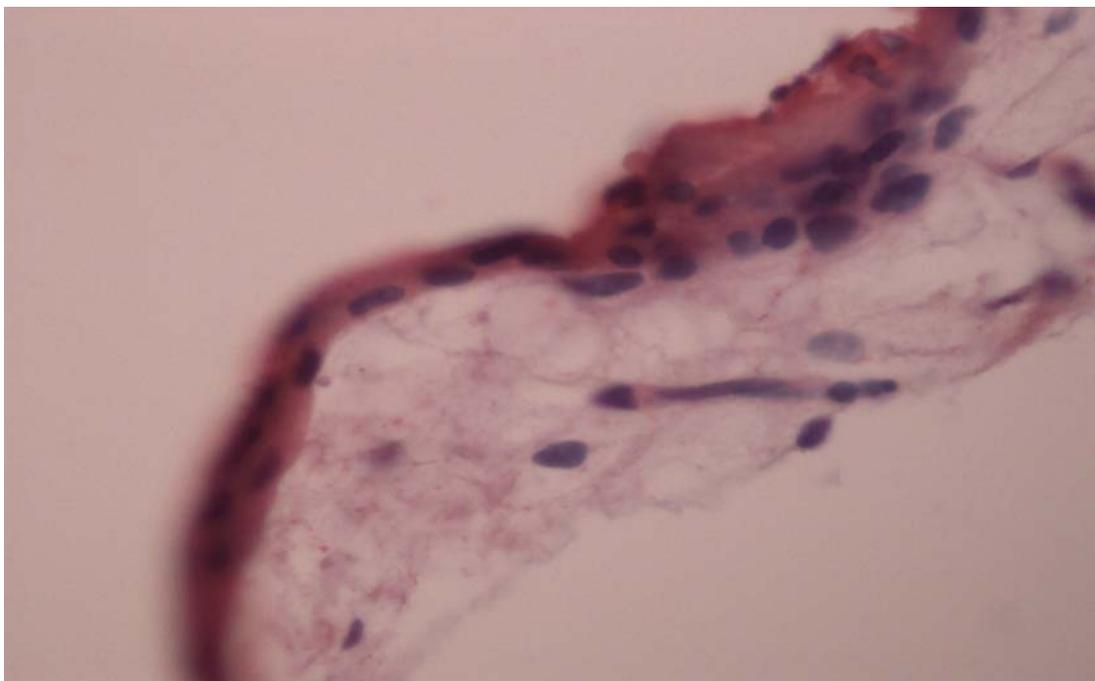


Abb. 3: Darstellung einer kräftigen Expression von VEGF im Chorionepithel einer Windmole der 10.SSW, 400x Vergr. (K 9603)

Zusammenfassend kann für die Expression von VEGF bei Gegenüberstellung der Plazentabildungsstörungen folgendes festgehalten werden:

Eine Expression von VEGF konnte in allen Formen der Plazentabildungsstörungen aufgezeigt werden, sowohl Embryonal- und Partialmolen als auch Blasen- und Windmolen wiesen eine positive Reaktion bei der immunhistochemischen Färbung mit VEGF-Antikörper auf.

Die Expression von VEGF innerhalb der jeweiligen Form von Plazentabildungsstörung erfolgte durch denselben Zelltyp, das Chorionepithel und die Hofbauerzellen, aber nicht durch Endothelzellen oder Fibroblasten. Bei Gegenüberstellung der verschiedenen Formen von Plazentabildungsstörungen zeigten sich Unterschiede in Bezug auf die Expression von VEGF durch die exprimierenden Zelltypen.

Das Chorionepithel der Embryonal- und Blasenmolen zeigte in mehr als der Hälfte der Fälle (58,3%; 57,1%) eine kräftige Expression von VEGF, das Epithel der Partial- und Windmolen hingegen nur in 20,0%- 22,2% der Fälle (Tab. 3, Abb. 4).

Die Hofbauerzellen der Embryonal-, Partial- und Blasenmolen wiesen in 57,1%- 90,0% eine kräftige Expression von VEGF auf, davon abweichend die Windmolen in 22,2% (Tab. 4, Abb. 5).

Eine Gefäßentwicklung mit der Ausbildung von Gefäßlumina konnte nur für Embryonalmolen und einige Partialmolen festgehalten werden.

Bezüglich des Gestationsalters konnten Unterschiede hinsichtlich des Expressionsverhaltens von VEGF bei den Blasenmolen im Vergleich zu den restlichen Molen aufgezeigt werden.

Sowohl für das Chorionepithel wie auch für die Hofbauerzellen zeigte sich eine stärkere Expression von VEGF in Gruppe 2 (> 9.SSW) als in Gruppe 1 (7.-9 SSW.).

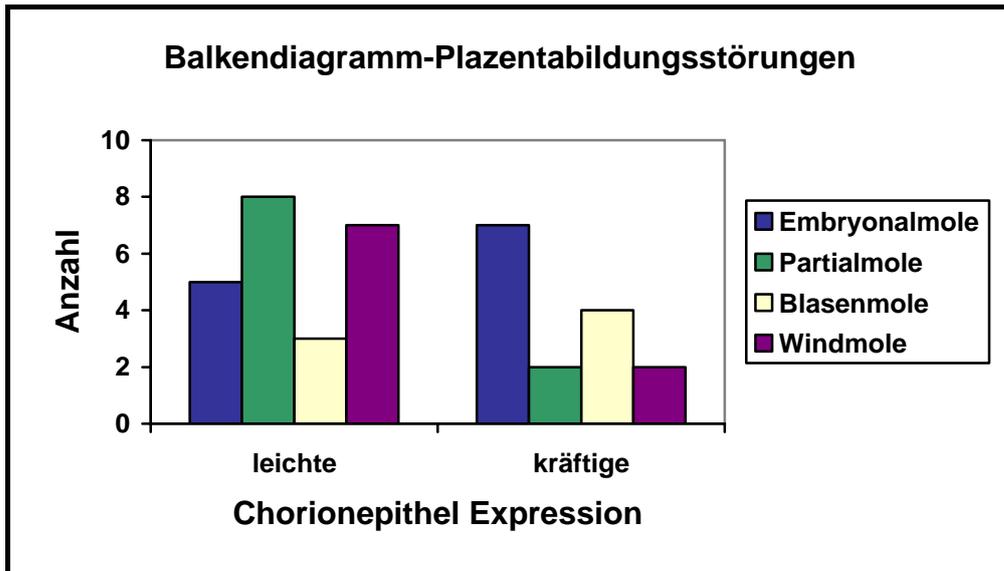


Abb. 4: Darstellung der Expression von VEGF im Chorionepithel d. Plazentabildungsstörungen

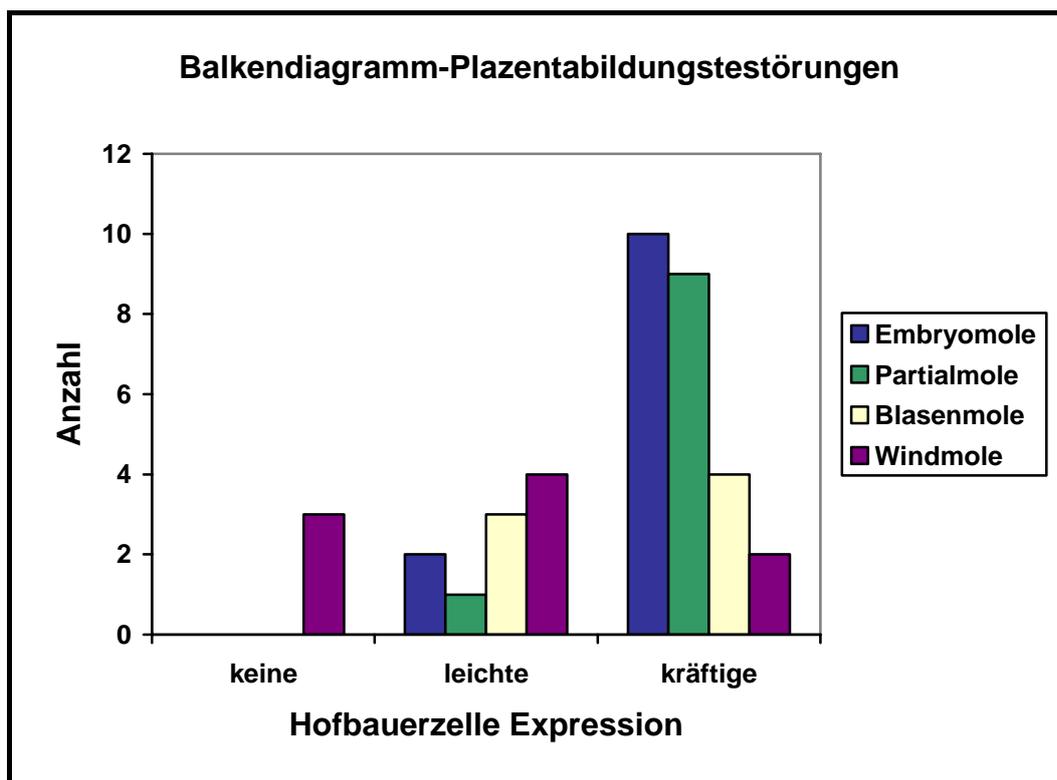


Abb. 5: Darstellung der Expression von VEGF in Hofbauerzellen d. Plazentabildungsstörungen

			Chorionepithel Expression	
			leichte	kräftige
Bildungsstörung	Embryonalmole	Anzahl	5	7
		% von Bildungsstörung	41,7	58,3
	Partialmole	Anzahl	8	2
		% von Bildungsstörung	80	20
	Blasenmole	Anzahl	3	4
		% von Bildungsstörung	42,9	57,1
	Windmole	Anzahl	7	2
		% von Bildungsstörung	77,8	22,2
Gesamt		Anzahl	23	15
		% von Bildungsstörung	60,5	39,5

Tab. 3: Expression von VEGF im Chorionepithel der Plazentabildungsstörungen

			Hofbauerzelle Expression		
			keine	leichte	kräftige
Bildungsstörung	Embryonalmole	Anzahl	0	2	10
		% von Bildungsstörung	0	16,7	83,3
	Partialmole	Anzahl	0	1	9
		% von Bildungsstörung	0	10	90
Blasenmole	Anzahl	0	3	4	
	% von Bildungsstörung	0	42,9	57,1	
Windmole	Anzahl	3	4	2	
	% von Bildungsstörung	33,3	44,4	22,2	
Gesamt	Anzahl	3	10	25	
	% von Bildungsstörung	7,9	26,3	65,8	

Tab. 4: Expression von VEGF in Hofbauerzellen der Plazentabildungsstörungen

4.2.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Anfärbung mit bFGF

4.2.2.1 Embryonalmolen (n=12)

Die immunhistochemischen Untersuchungen bezüglich der Expression des primären Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF) im Chorionepithel wiesen eine einheitliche Reaktion (100,0%) in Form einer leichten Expression aus (Tab. 5). Ein morphologischer Unterschied zwischen den beiden Zellschichten des Epithels (Zyto- und Synzytiotrophoblastenschicht) konnte nicht aufgezeigt werden. In etwa der Hälfte der Fälle (58,3%) konnte bei den Hofbauerzellen im Stroma und in 25,0% der Fälle bei Endothelzellen eine leichte Expression von bFGF nachgewiesen werden (Tab. 6 u. 7). Es fand keine Expression von bFGF durch Fibroblasten statt.

In 33,3% der Fälle konnten mikroskopisch Gefäßlumina nachgewiesen werden, in 66,7% der Fälle zeigten sich Endothelzellknospen in den Schnittpräparaten. Bei unsicheren Fällen mit nicht eindeutiger Beurteilbarkeit der Endothelzellen erfolgte eine zusätzliche Anfärbung mit CD-31. Es handelt sich bei CD-31 um einen spezifischen

Endothelzellmarker, der in unklaren Fällen Aufschluss über das Vorhandensein von Endothelzellen ermöglicht. Bezüglich des Expressionsverhaltens in Abhängigkeit vom Gestationsalters konnten keine Unterschiede bei den betrachteten Zelltypen zwischen Gruppe 1 (7.-9.SSW) und der Gruppe 2 (>9. SSW) aufgezeigt werden.

4.2.2.2 Partialmolen (n=11)

Das Chorionepithel der Partialmolen wies in 90,9%, das der Hofbauerzellen in 63,6% der Fälle eine leichte Expression von bFGF auf (vergl. Tab. 5 und 6). Es zeigte sich keine bevorzugte Expression von bFGF durch eine der beiden Zellschichten des Chorionepithels. Ebenfalls konnte in den Partialmolen eine leichte Expression (45,5%) durch das Endothel nachgewiesen werden (Tab. 7 und Abb. 6). Eine Expression von bFGF durch Fibroblasten fand nicht statt. In 72,7% der Fälle konnten mikroskopisch einzelne Gefäßlumina nachgewiesen werden, in 27,3% hingegen keine. Hinsichtlich des Expressionsverhaltens bezogen auf das Gestationsalter, konnte bei den Partialmolen keine Unterschiede zwischen der Gruppe 1 (7.-9. SSW) und Gruppe 2 (>9. SSW) festgehalten werden.

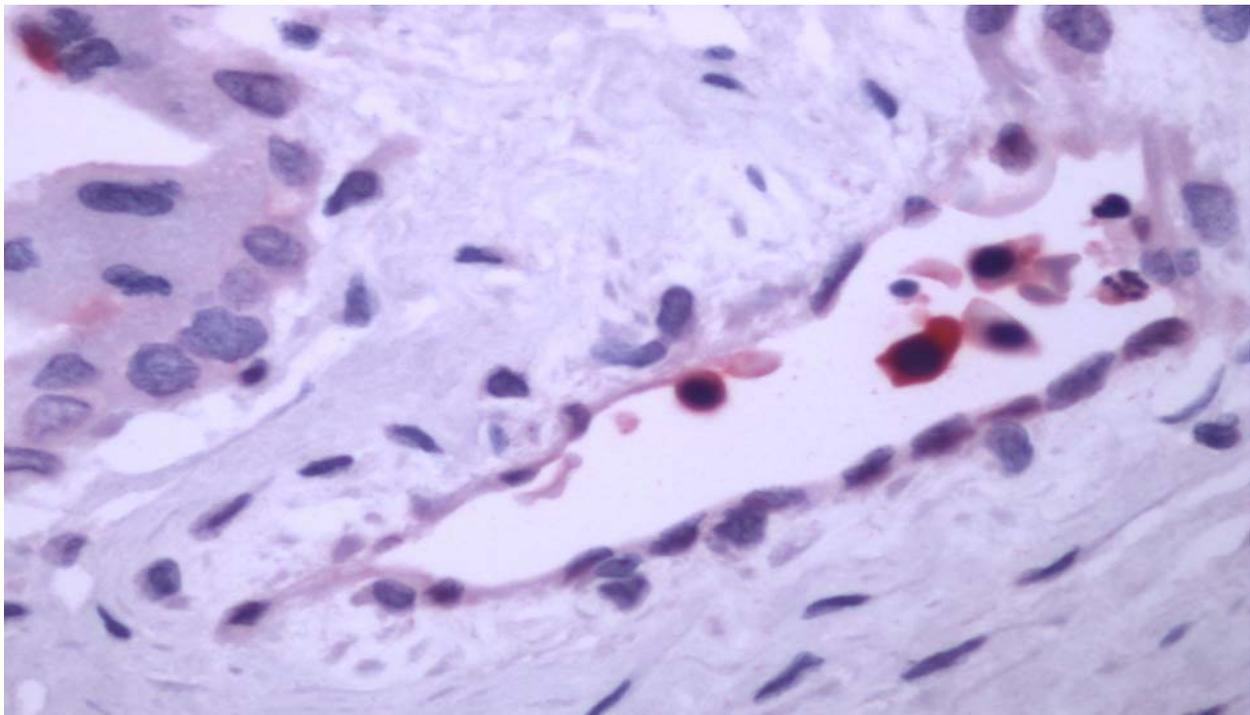


Abb. 6: Darstellung der leichten Expression von bFGF in Endothelzellen einer Partialmole der 11.SSW,400x Vergr. (K7887)

4.2.2.3 Blasenmolen (n=8)

In 62,5% zeigte das Chorionepithel in Blasenmolen eine leichte, in 12,5% der Fälle eine kräftige Expression von bFGF. Ein morphologischer Unterschied hinsichtlich des Expressionsverhaltens innerhalb der zwei Zellschichten des Chorionepithels konnte nicht festgehalten werden. Die Hofbauerzellen zeigten nur in 37,5% eine leichte Expression von bFGF, die übrigen Fälle wiesen keine Expression von bFGF aus (Tab. 5 und 6). Eine Expression von bFGF durch Endothelzellen und Fibroblasten konnte in den Blasenmolen nicht nachgewiesen werden. In 62,5% der Fälle konnten mikroskopisch lediglich Endothelzellknospen nachgewiesen werden, 37,5% wiesen weder Gefäßlumina noch Endothelzellknospen auf.

Hinsichtlich des Gestationsalters konnten keine Unterschiede im Expressionsverhalten der Zelltypen zwischen Gruppe 1 (7.-9. SSW) und Gruppe 2 (>9. SSW) aufgezeigt werden.

4.2.2.4 Windmolen (n=10)

Die immunhistochemischen Untersuchungen wiesen in 80,0% beim Chorionepithel und in 40,0% der Fälle bei Hofbauer- und Endothelzellen eine leichte Expression von bFGF aus (vergl. Tab. 5, 6 und 7). Eine bevorzugte Expression von bFGF durch eine der beiden Zellschichten des Chorionepithels konnte nicht aufgezeigt werden. Die Fibroblasten wiesen wiederum keine Expression von bFGF auf. In 50% der Fälle zeigten sich mikroskopisch lediglich Endothelzellknospen, in weiteren 50% weder Endothelzellknospen, noch Gefäßlumina.

Bezüglich des Gestationsalters konnten keine Unterschiede im Expressionsverhalten der betrachteten Zelltypen zwischen Gruppe 1 (7.-9. SSW) und Gruppe 2 (>9. SSW) nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann für die Expression von bFGF bei Gegenüberstellung der Plazentabildungsstörungen folgendes festgehalten werden:

Eine Expression von bFGF konnte in allen Formen der Plazentabildungsstörungen aufgezeigt werden, sowohl Embryonal- und Partialmolen als auch Blasen- und Windmolen wiesen positive Reaktionen bei der Inkubation mit bFGF auf.

Die Expression von bFGF innerhalb der jeweiligen Plazentabildungsstörung erfolgte vergleichbar bevorzugt durch denselben Zelltyp, das Chorionepithel und die Hofbauerzellen (Tab. 5 und 6). Unterschiede zwischen den verschiedenen Formen der Plazentabildungsstörungen ergaben sich bei der mikroskopischen Auswertung der Endothelzellen. Im Gegensatz zu den Embryonal-, Partial- und Windmolen, die in 25,0%- 45,5% der Fälle eine leichte Expression von bFGF in Endothelzellen auswiesen, konnte in den Blasenmolen keine Expression festgehalten werden (Tab. 7). Eine wiederum einheitliche Reaktion zwischen den verschiedenen Formen der Plazentabildungsstörungen zeigte sich bei der Auswertung neben Chorionepithel und Hofbauerzellen auch bei den Fibroblasten, die in 100,0% der Fälle keine Expression von bFGF aufwiesen. Eine Gefäßentwicklung mit der Ausbildung von Gefäßlumina konnte nur für Embryonalmolen und einige Partialmolen festgehalten werden. Bezüglich des Gestationsalters konnten keine Unterschiede hinsichtlich des Expressions-verhaltens von bFGF bei den betrachteten Zelltypen zwischen Gruppe 1 (7.-9. SSW) und Gruppe 2 (>9. SSW) aufgezeigt werden.

			Chorionepithel Expression		
			keine	leichte	kräftige
Bildungsstörung	Embryonalmole	Anzahl	0	12	0
		% von Bildungsstörung	0	100	0
	Partialmole	Anzahl	1	10	0
		% von Bildungsstörung	9,1	90,9	0
Blasenmole	Anzahl	2	5	1	
	% von Bildungsstörung	25	62,5	12,5	
Windmole	Anzahl	2	8	0	
	% von Bildungsstörung	20	80	0	
Gesamt	Anzahl	5	35	1	
	% von Bildungsstörung	12,2	85,4	2,4	

Tab. 5: Expression von bFGF im Chorionepithel der Plazentabildungsstörungen

			Hofbauerzelle Expression	
			keine	leichte
Bildungsstörung	Embryonalmole	Anzahl % von Bildungsstörung	5 41,7	7 58,3
	Partialmole	Anzahl % von Bildungsstörung	4 36,4	7 63,6
	Blasenmole	Anzahl % von Bildungsstörung	5 62,5	3 37,5
	Windmole	Anzahl % von Bildungsstörung	6 60	4 40
Gesamt		Anzahl % von Bildungsstörung	20 48,8	21 51,2

Tab. 6: Expression von bFGF in Hofbauerzellen der Plazentabildungsstörungen

			Endothel Expression	
			keine	leichte
Bildungsstörung	Embryonalmole	Anzahl % von Bildungsstörung	9 75	3 25
	Partialmole	Anzahl % von Bildungsstörung	6 54,5	5 45,5
	Blasenmole	Anzahl % von Bildungsstörung	8 100	0 0
	Windmole	Anzahl % von Bildungsstörung	6 60	4 40
Gesamt		Anzahl % von Bildungsstörung	29 70,7	12 29,3

Tab. 7: Expression von bFGF in Endothelzellen der Plazentabildungsstörungen

4.2.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Anfärbung mit Angiopoietin-1 (Ang1)

4.2.3.1 Embryonalmolen (n=10)

Die immunhistochemischen Untersuchungen wiesen eine vornehmliche Expression des angiogenen Wachstumsfaktors (Ang1) in Chorionepithel und Hofbauerzellen nach (vergl. Tab.8 und 9). Diesbezüglich zeigte das Chorionepithel in 80% der Fälle und die Hofbauerzellen in 70% der Fälle eine leichte Expression. Bei den betrachteten Embryonalmolen konnten keine Unterschiede in der Expression von Ang1 innerhalb der zwei Zellschichten des Chorionepithels (Zytotrophoblast, Synzytiotrophoblast) nachgewiesen werden. Sowohl Endothelzellen als auch Fibroblasten ließen keine Expression des angiogenen Wachstumsfaktors erkennen. Die Auswertung des Endothels erwies sich hierbei als schwierig, da nur in zwei von zehn Fällen eindeutig mikroskopisch beurteilbare Gefäßanschnitte im Sinne eines lumenbildenden Gefäßes mit Endothelauskleidung nachweisbar waren. Hier konnte aufgrund der eindeutigen Lokalisation und Negativität der Zellen eine Expression von Ang1 ausgeschlossen werden. In den übrigen Fällen, in denen mikroskopisch keine Gefäßlumina und damit keine eindeutige Lokalisation und Beurteilbarkeit von Endothelzellen möglich war, wurde zur Absicherung eine CD-31 Färbung durchgeführt. So konnten in drei der verbliebenen acht Fälle Endothelzellproliferationen im Zottenstroma nachgewiesen werden (Abb. 7). Nach Lokalisation dieser einzelnen Endothelzellproliferate durch CD-31 wurde in Parallelschnitten die Anfärbung der Endothelzellen mit Ang1 durchgeführt, deren Auswertung keine Expression von Ang1 durch Endothelzellen ergab (Abb. 8). In Bezug auf das Gestationsalter konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Expression von Angiopoietin-1 zwischen Gruppe 1 (7.-9.SSW) und Gruppe 2 (>9.SSW) festgehalten werden.

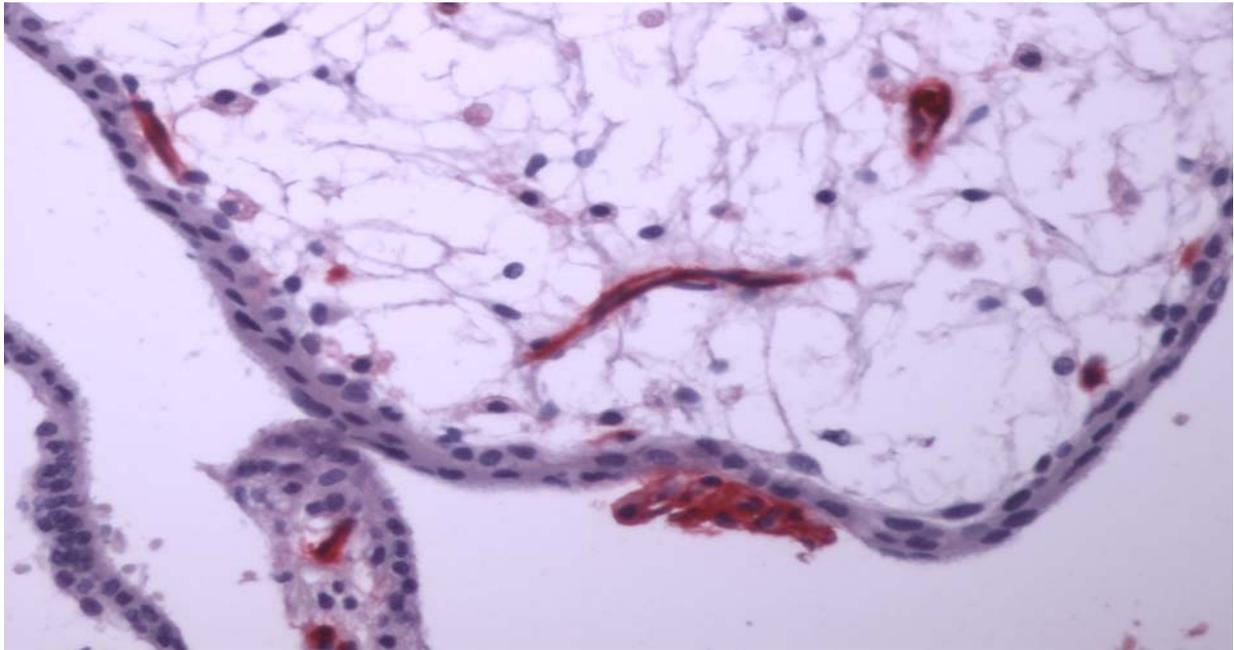


Abb. 7: Darstellung von Endothelzellen mit Hilfe des Endothelzellmarkers CD 31 in einer Embryonalmole der 12.SSW, 200x Vergr. (K 3495)

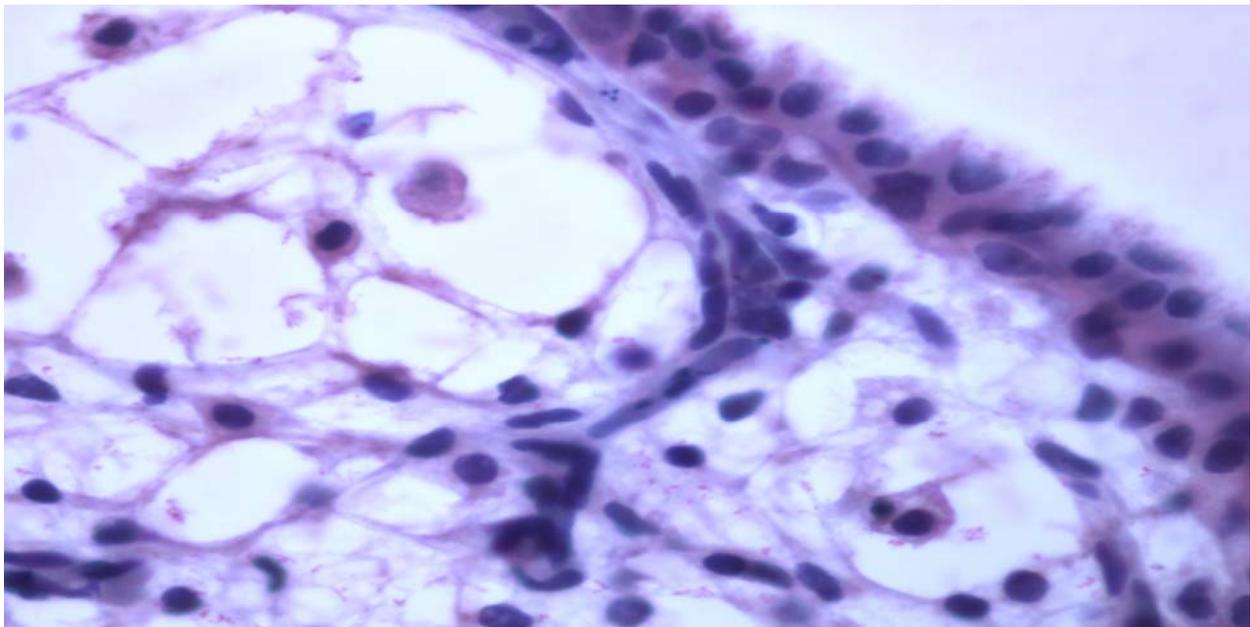


Abb. 8: Expression des Wachstumsfaktors Ang1 in einer Embryonalmole. Keine Anfärbung von Endothel in der Embryonalmole der 12.SSW, 400x Vergr. (K3495)

4.2.3.2 Partialmolen (n=12)

Die immunhistochemischen Untersuchungen wiesen im Chorionepithel in über der Hälfte der Fälle (66,7%) eine leichte Expression von Ang1 auf, im geringeren Maße (25%) auch in Hofbauerzellen (vergl. Tab. 8 und 9). Eine bevorzugte Expression von Ang1 in einer der beiden Zellschichten des Chorionepithels konnte nicht aufgezeigt werden. Ähnlich den Embryonalmolen, wiesen Endothel und Fibroblasten in den Partialmolen keine Expression von Ang1 auf. Hinsichtlich der Beurteilung der Gefäßanschnitte konnten in 58,3% der Fälle Gefäßlumina mikroskopisch nachgewiesen werden (Abb. 9), die wiederum in ihrer Anzahl und Ausprägung zwischen den einzelnen Zottenanschnitten stark schwankten. In den verbliebenen 41,7% konnten weder Gefäßlumina noch Endothelzellknospen nachgewiesen werden.

In Hinblick auf das Gestationsalter wiesen die Partialmolen keine Unterschiede bezüglich der Expression von Ang1 zwischen Gruppe 1 (7.-9.SSW) und Gruppe 2 (>9.SSW) aus.

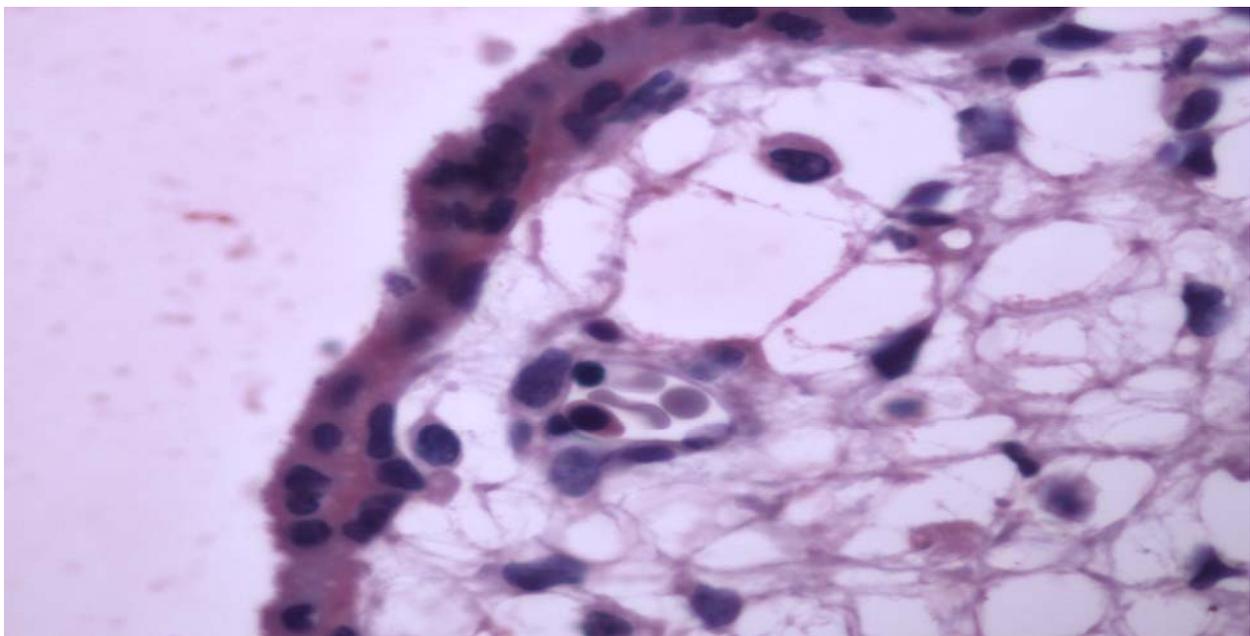


Abb. 9: leichte Expression von Ang1 durch Chorionepithel und Hofbauerzellen, Darstellung eines Gefäßlumens mit fehlender Expression von Angiopoetin-1 durch Endothelzellen in einer Partialmole, 11.SSW, 400xVergr.(K-7887)

4.2.3.3 Blasenmolen (n=9)

In den Blasenmolen fand eine überwiegend leichte Expression von Ang1 im Chorionepithel (66,7%) und den Hofbauerzellen (77,8%) statt (vergl. Tab. 8 und 9). Nur in einem Drittel der Fälle wies das Chorionepithel eine kräftigere Expression auf, ohne einen morphologisch nachweislichen Unterschied zwischen Zyto- und Synzytiotrophoblast. Es fand keine Expression von Ang1 in Endothel und Fibroblasten statt.

In den Plazentaschnitten der Blasenmolen konnten keine Gefäßlumina mikroskopisch nachgewiesen werden, in zwei von neun Fällen (22,9%) ließen sich Endothelzellknospen durch CD-31 Färbung gesichert, darstellen (Abb. 11). Bei der Beurteilung des Expressionsverhaltens bezüglich des Gestationsalters, zeigten sich Unterschiede beim Chorionepithel. Die Gruppe 1 (7.-9. SSW) wies eine einheitlich leichte Expression von Ang1 aus, demgegenüber die Gruppe 2 (>9. SSW) in 75,0% der Fälle eine kräftige Expression (Abb. 10). Ein solches Expressionsverhalten konnte bei den Hofbauerzellen nicht nachgewiesen werden.

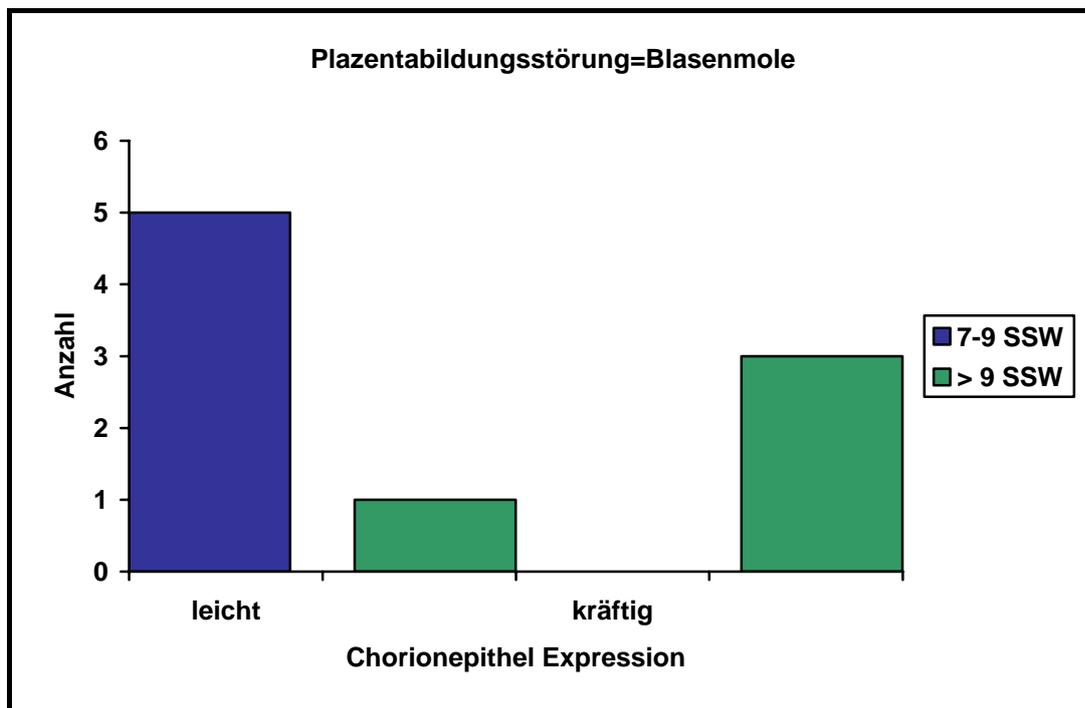


Abb. 10: Darstellung der Expression von Ang1 im Chorionepithel in Abhängigkeit vom Gestationsalter

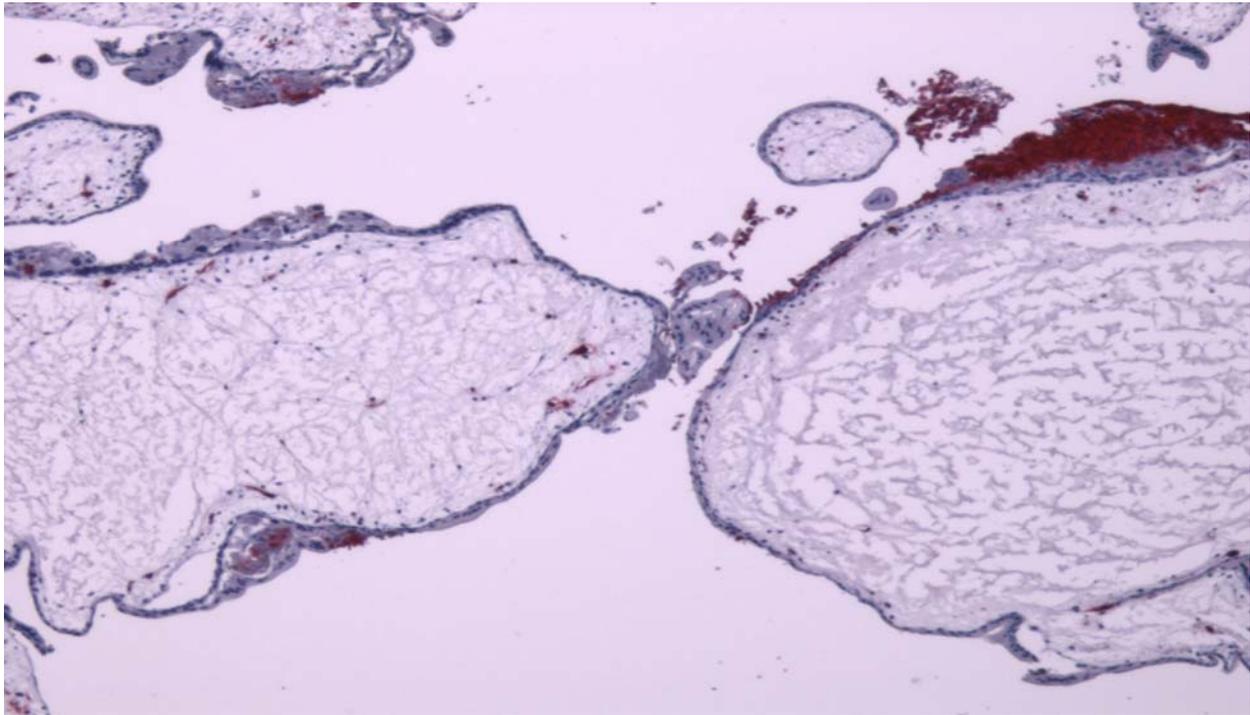


Abb. 11: Nachweis von Endothelzellknospen durch CD-31 v. a. subepithelial in einer Blasenmole der 10.SSW, 40x Vergr. (K-5579)

4.2.3.4 Windmolen (n=10)

Die immunhistochemischen Untersuchungen wiesen eine alleinige Expression von Ang1 durch das Chorionepithel auf (Tab. 8 und Abb. 12). In der Mehrzahl der Fälle (70%) zeigte sich eine leichte und in einem geringeren Anteil (30%) eine kräftige Expression von Ang1 im Chorionepithel. Ein morphologisch nachweisbarer Unterschied hinsichtlich der Expression in den zwei Zellschichten des Epithels (Zyto- und Synzytiotrophoblastschicht) konnte nicht festgehalten werden.

Im Gegensatz dazu wiesen weder die Hofbauerzellen, noch das Endothel und die Fibroblasten eine Expression von Ang1 auf (vergl. Tab. 9 und Abb. 12).

Innerhalb des Zottenstromas konnten keine Gefäßlumina nachgewiesen werden, in 40% der Fälle zeigten sich lediglich Endothelzellknospen.

In Hinblick auf das Gestationsalter wiesen die Windmolen keine Unterschiede hinsichtlich der Expression von Ang1 zwischen Gruppe 1 (7.-9. SSW) und Gruppe 2 (>9. SSW) aus.

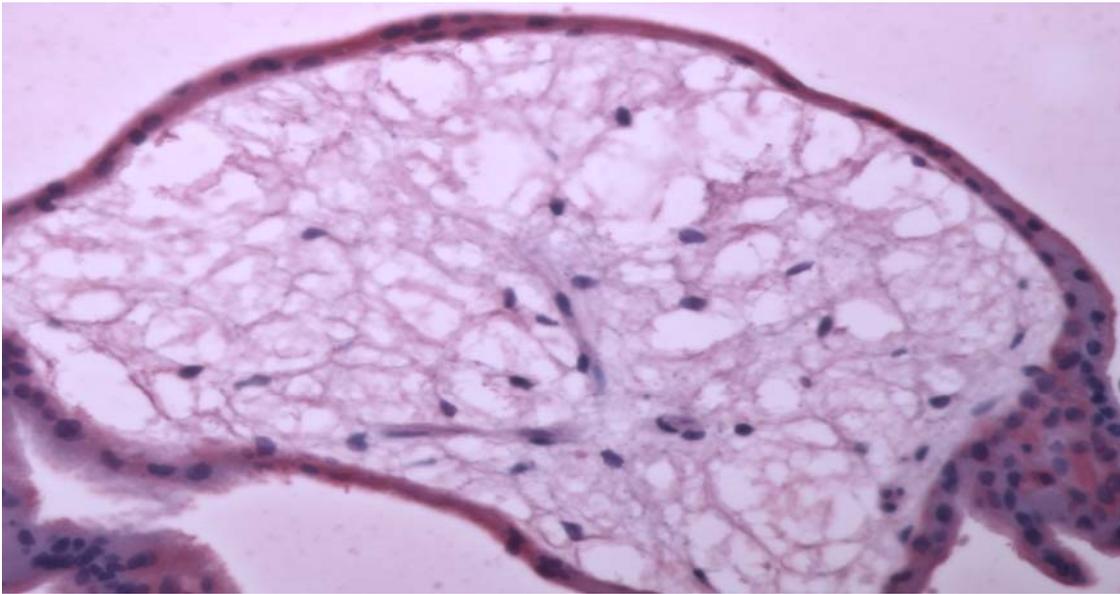


Abb. 12: Expression von Ang1 im Chorionepithel einer Windmole der 10.SSW, keine Expression in Hofbauer- und Endothelzellen. 200x Vergr.(K-9603)

Zusammenfassend kann für die Expression von Ang1 bei Gegenüberstellung der Plazentabildungsstörungen folgendes festgehalten werden:

Es konnte eine Expression von Ang1 in allen Formen der Plazentabildungsstörungen nachgewiesen werden, sowohl Embryonal- und Partialmolen als auch Blasen- und Windmolen wiesen positive Reaktionen bei der Inkubation mit Ang1 auf. Die Expression von Ang1 innerhalb der jeweiligen Plazentabildungsstörung erfolgte vergleichbar bevorzugt durch denselben Zelltyp, das Chorionepithel (Tab. 8). Abweichende Tendenzen hinsichtlich des Expressionsverhaltens zeigten die verschiedenen Formen der Plazentabildungsstörung bei Expression von Ang1 durch die Hofbauerzellen im Zottenstroma. Im Gegensatz zu den Embryonal- und Blasenmolen, die in 70% und 77,8% der Fälle eine leichte Expression von Ang1 auswiesen, zeigten die Partialmolen in 25% eine leichte Expression und die Windmolen keine Expression (Tab. 9 u. Abb. 13). Ein einheitliches Verhalten, im Sinne einer negativen Reaktion, zeigten die verschiedenen Formen der Plazentabildungsstörungen bei der Expression von Ang1 durch Endothel und Fibroblasten. Eine Gefäßentwicklung mit der Ausbildung von Gefäßlumen konnte nur für Partialmolen und einige Embryonalmolen festgehalten werden (Abb. 14). Hinsichtlich des Gestationsalters zeigten sich Unterschiede beim Chorionepithel der Blasenmolen im Vergleich zu den restlichen Molen. Es konnte hier

eine deutlich stärkere Expression von Angiopoietin-1 in Gruppe 2 (> 9.SSW) als in Gruppe 1 (7.-9. SSW) nachgewiesen werden.

			Chorionepithel Expression		
			keine	leichte	kräftige
Bildungsstörung	Embryonalmole	Anzahl	1	8	1
		% von Bildungsstörung	10	80	10
	Partialmole	Anzahl	4	8	0
		% von Bildungsstörung	33,3	66,7	0
Blasenmole	Anzahl	0	6	3	
	% von Bildungsstörung	0	66,7	33,3	
Windmole	Anzahl	0	7	3	
	% von Bildungsstörung	0	70	30	
Gesamt		Anzahl	5	29	7
		% von Bildungsstörung	12,2	70,7	17,1

Tab. 8: Expression von Ang1 im Chorionepithel der Plazentabildungsstörungen

			Hofbauerzelle Expression	
			keine	leichte
Bildungsstörung	Embryonalmole	Anzahl % von Bildungsstörung	3 30	7 70
	Partialmole	Anzahl % von Bildungsstörung	9 75	3 25
	Blasenmole	Anzahl % von Bildungsstörung	2 22,2	7 77,8
	Windmole	Anzahl % von Bildungsstörung	10 100	0 0
Gesamt		Anzahl % von Bildungsstörung	24 58,5	17 41,5

Tab. 9: Expression von Ang1 in Hofbauerzellen der Plazentabildungsstörungen

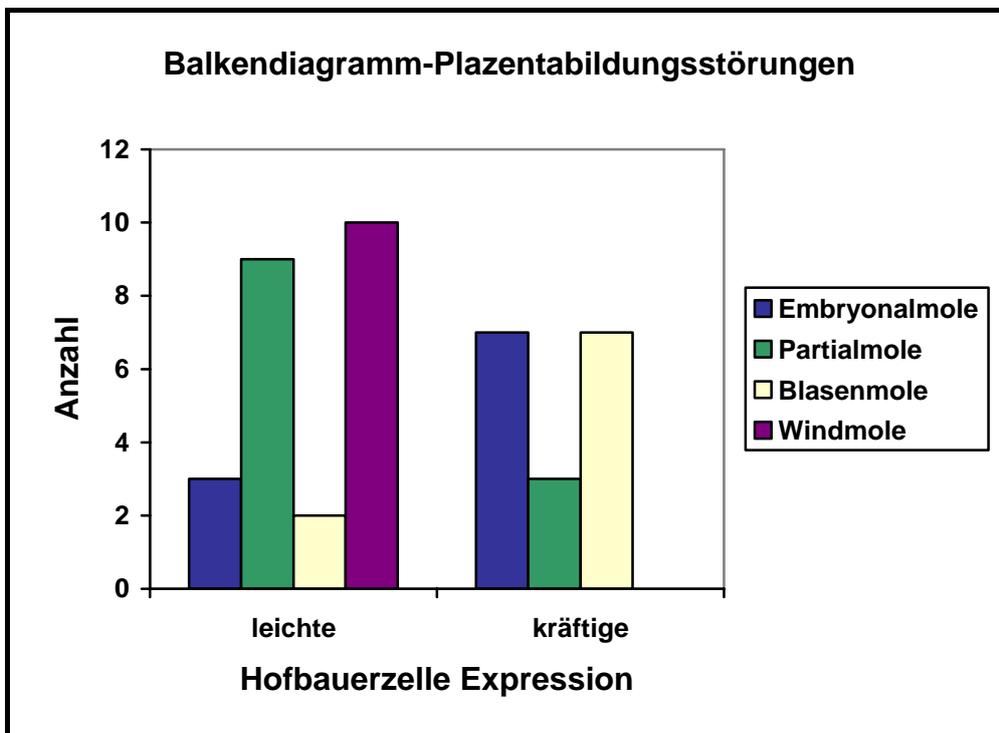


Abb. 13: Darstellung der Expression von Ang1 in den Hofbauerzellen der Plazentabildungsstörungen

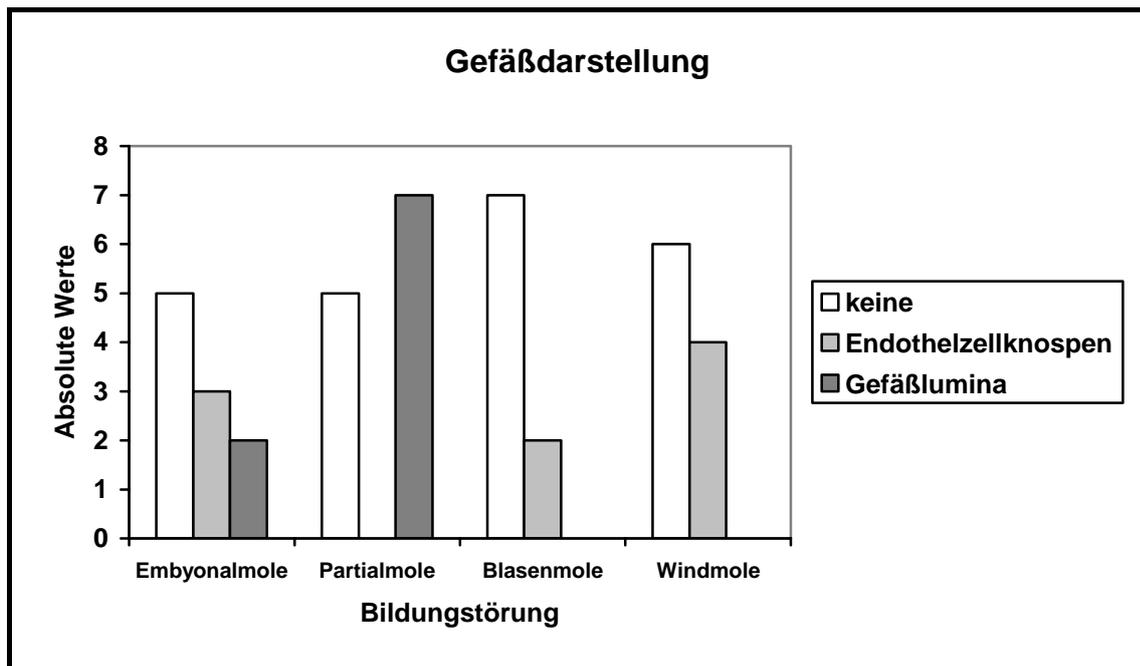


Abb. 14: Darstellung der Gefäßanschnitte innerhalb der Plazentabildungsstörungen

5 Diskussion

Das Blutgefäßsystem ist das erste Organ, welches im Rahmen der Embryonalentwicklung entsteht. Die Herausbildung der Vaskulatur sowie deren Intaktheit in Hinblick auf Gas- und Nährstofftransport zwischen Mutter und Fetus sind wichtige Voraussetzungen für eine normale embryonale Entwicklung und späteres fetales Wachstum. Störungen in diesem Entwicklungsprozess erhöhen das Risiko für Frühaborte, Restriktion des fetalen Wachstums, sowie die Rate eines intrauterinen Fruchttods (Wulff, 2004; Zygmunt, 2001; Kroll, 2000).

Das Ziel dieser Arbeit ist die Beurteilung der Gefäßentwicklung innerhalb der Plazentabildungsstörungen unter dem Gesichtspunkt der Expression angiogener Wachstumsfaktoren wie VEGF, bFGF und Angiopoietin-1 in der frühen Fetalperiode (7.-16. SSW). Wie in Kapitel 2 bereits erläutert, wurden aus diesem Ziel heraus Fragestellungen formuliert.

Werden die angiogenen Wachstumsfaktoren in gleicher Stärke und den gleichen Zellen der Plazentabildungsstörungen exprimiert oder bestehen Differenzen zwischen den einzelnen Formen der Plazentabildungsstörungen und deren exprimierenden Zellen sowie den betrachteten Gestationswochen? Lassen sich Unterschiede in der Expression der angiogenen Wachstumsfaktoren im Vergleich zu regelhaftem Plazentagewebe der frühen Fetalperiode aufzeigen? Kann man Rückschlüsse aus den Ergebnissen dieser Arbeit ziehen, welchen Einfluss die angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF, bFGF und Angiopoietin-1 auf die Gefäßentwicklung von Plazentabildungsstörungen haben?

Hierzu wurden die Ergebnisse dieser Arbeit mit den bisherigen Veröffentlichungen verglichen. Es muss angemerkt werden, dass nur wenige Veröffentlichungen zur Gefäßentwicklung in Plazentabildungsstörungen im Hinblick auf die jeweiligen Wachstumsfaktoren existieren.

5.1 Diskussion des Expressionsverhaltens von VEGF, bFGF und Angiopoietin-1 innerhalb der Plazentabildungsstörungen

Die immunhistochemische Untersuchung der Plazentabildungsstörungen und die Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Expression von VEGF, bFGF und Angiopoietin-1 in allen Formen der Plazentabildungsstörung erfolgte.

Vergleichbar waren auch die Ergebnisse für den exprimierenden Zelltyp bei den verschiedenen Plazentabildungsstörungen. Alle drei Wachstumsfaktoren wurden vornehmlich durch das Chorionepithel (Zyto- und Synzytiotrophoblast) und die Hofbauerzellen exprimiert. Es konnten hier keine Unterschiede bezüglich des Expressionsverhaltens zwischen Zyto- und Synzytiotrophoblast festgehalten werden. Keine Expression erfolgte einheitlich in Fibroblasten.

Lediglich die Endothelzellen wiesen Unterschiede im Hinblick auf die Expression bestimmter Wachstumsfaktoren auf zwischen den einzelnen Formen der Plazentabildungsstörung. Es zeigte sich eine leichte Expression von bFGF, keine hingegen für VEGF und Ang1. Die Expression erfolgte nur in den Embryonal-, Partial- und Windmolen, nicht aber in den Blasenmolen.

Im Hinblick auf die Expressionsstärke konnten geringfügige Unterschiede innerhalb der Plazentabildungsstörungen für VEGF (Chorionepithel und Hofbauerzellen) und Ang1 (Hofbauerzellen), jedoch nicht für bFGF nachgewiesen werden. Das Chorionepithel wies für VEGF in den Embryonal- und Blasenmolen eine quantitativ stärkere Expression auf als in den Partial- und Windmolen. Die Hofbauerzellen zeigten für VEGF in Embryonal-, Partial- und Blasenmolen eine quantitativ stärkere Expression als in den Windmolen, für Ang1 eine quantitativ stärkere Expression in Embryonal- und Blasenmolen, eine nur leichte Expression in Partial- und keine Expression in den Windmolen.

Bei der Auswertung des Gestationsalters zeigten sich keine Unterschiede innerhalb der Plazentabildungsstörungen und deren exprimierende Zelltypen bis auf die Blasenmolen. Hier konnte für den Wachstumsfaktor VEGF sowohl im Chorionepithel als auch den Hofbauerzellen eine quantitativ stärkere Expression in Gruppe 2 (>9. SSW) als in Gruppe 1 (7.-9. SSW) nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse finden wir bei der Expression von Ang1 durch das Chorionepithel in den Blasenmolen. Auch nur hier weist Gruppe 2 im Vergleich zu den anderen Plazentabildungsstörungen eine quantitativ stärkere Expression auf als in Gruppe 1. Ein Vergleich der hier dargelegten Ergebnisse mit ähnlichen Untersuchungen zum Expressionsverhalten dieser Wachstumsfaktoren

bei Plazentabildungsstörungen gestaltete sich schwierig, da diesbezüglich die Datenlage der zur Verfügung stehenden Literatur kaum Aufschluss gibt.

5.2 Diskussion des Expressionsverhaltens von VEGF, bFGF und Angiopoietin-1 im Vergleich zu regelhaften Plazenten

Im Vergleich zu Plazentabildungsstörungen gibt es zahlreiche Untersuchungen zur Expression angiogener Wachstumsfaktoren in normal entwickelten Plazenten.

Das Spektrum der nachgewiesenen Wachstumsfaktoren in der normalen Plazenta umfasst u.a. PlGF, bFGF, Angiopoietine, VEGF und deren entsprechende Rezeptoren (Seval, 2008; Schmidt, 2007; Schneider, 2006; Demir, 2004; Wulff, 2003; Dunk, 2000; Graham, 1992; Cattini, 1991).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen erkennen, dass im Vergleich zu normalen Plazenten, die von uns untersuchten Wachstumsfaktoren im Zeitraum der 7.-16.SSW zunächst ebenfalls nachweisbar waren.

Insbesondere sind in der Literatur Untersuchungen zu VEGF und Angiopoietin im Hinblick auf die plazentare Gefäßentwicklung ausgewiesen (Seval, 2008; Babischkin, 2007; Demir, 2004; Geva, 2002; Dunk, 2000; Clark, 1998).

Seval et al. sowie Demir et al. untersuchten die Expression von VEGF und Angiopoietin im ersten Trimenon der plazentaren Gefäßentwicklung, Babischkin et al. führte zusätzliche Untersuchungen im zweiten und dritten Trimenon der Plazentaentwicklung durch (Seval, 2008; Babischkin, 2007; Demir, 2004).

Demir et al. untersuchten gezielt die Lokalisation und Expression von VEGF und seinen Rezeptoren in der frühen Phase der Gefäßentwicklung normaler Plazenten.

Die Untersuchungsergebnisse zeigten initial die Expression durch das Chorionepithel, insbesondere durch die Zytotrophoblasten, ähnliche Ergebnisse werden von Gordon et al. beschrieben (Demir, 2004; Gordon, 1995). Im Weiteren exprimierten Hofbauerzellen sowie Endothelzellen und Fibroblasten (Schmidt, 2007; Schneider, 2006; Demir, 2004; Clark, 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnten keine Unterschiede im Expressionsverhalten innerhalb des Chorionepithels festgehalten werden, ähnlich wie in normalen Plazenten, erfolgte eine einheitliche Expression von VEGF in den Hofbauerzellen aller Formen der Plazentabildungsstörungen.

Im Vergleich zu den Untersuchungsergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigen sich hinsichtlich des Expressionsverhaltens von Endothelzellen und Fibroblasten zu normalen Plazenten Unterschiede auf.

In allen Formen der Plazentabildungsstörungen konnte keine Expression von VEGF in Endothelzellen oder Fibroblasten nachgewiesen werden.

Eine Expression von VEGF konnte in diesen Zellen von normalen Plazenten bereits in der frühen plazentaren Gefäßentwicklung aufgezeigt werden (Babischkin, 2007; Demir, 2004).

Seval et al. untersuchten gezielt die Lokalisation und Expression von Angiopoietin-1 und -2 sowie deren Rezeptoren während der frühen Phase der Vaskulo- und Angiogenese in normalen Plazenten. Die Ergebnisse zeigten eine vornehmliche Expression durch Chorionepithel, Endothel- und Hofbauerzellen, wobei eine Immunreaktivität für Ang1 nur in den Synzytiotrophoblasten des Chorionepithels nachgewiesen wurde (Seval, 2008). Vergleichbare Ergebnisse zu Untersuchungen im 1. Trimenon fanden sich bei Geva et al (Geva, 2002).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen eine Expression von Ang1 im Chorionepithel sowohl für Zytotrophoblasten als auch Synzytiotrophoblasten aus. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit Arbeiten an normalen plazentaren Gewebe (1. sowie 2. und 3. Trimenon) durch Dunk et al. sowie Babischkin et al. (Babischkin, 2007; Dunk, 2000). Das unterschiedliche Expressionsverhalten von Angiopoietin im Chorionepithel in den einzelnen Arbeiten wird am ehesten auf das nicht exakt übereinstimmende Gestationsalter der untersuchten Plazenten zurückgeführt (Seval, 2008).

Generelle Unterschiede im Expressionsverhalten von Ang1 zeigten sich bei Plazentabildungsstörungen im Vergleich zu Untersuchungen von normalen Plazenten ebenfalls für die Endothelzellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen vergleichbar wie bei VEGF keine Expression von Ang1 in Endothelzellen der einzelnen Formen der Plazentabildungsstörungen aus.

Hingegen zeigen Arbeiten an normalen Plazenten, dass bereits in der frühen plazentaren Gefäßentwicklung eine Expression von Angiopoietin in den Endothelzellen erfolgt (Seval, 2008; Babischkin, 2007).

VEGF und Angiopoietin wird eine Schlüsselrolle während der Entwicklung des vaskulären Systems in der Embryonalentwicklung im Hinblick auf die Endothelzell-

proliferation und -migration sowie Gefäßreifung zugeschrieben. Durch die Expression von VEGF u. a. durch Endothelzellen dient er als Signalmolekül während der Vaskulo- und Angiogenese. Er fördert die Proliferation und Migration der Endothelzellen sowie die Formierung eines primitiven Gefäßnetzes (Babischkin, 2007; Breier, 2006; Kroll, 2000). Durch die Expression von Ang1 u.a. durch die Endothelzellen entfaltet der Wachstumsfaktor seine stabilisierende Wirkung auf die neu gebildeten Blutgefäße (Seval, 2008; Babischkin, 2007; Breier, 2006; Kroll, 2000). Eine ausbleibende Expression der beiden Wachstumsfaktoren durch die Endothelzellen könnte u.a. ein Hinweis für die gestörte Gefäßentwicklung in den untersuchten Plazentabildungsstörungen sein.

In der Literatur findet man nicht exakt übereinstimmende Daten zum Expressionsverhalten der Wachstumsfaktoren in normalen Plazenten im Bezug auf das Gestationsalter.

Babischkin et al. führte Untersuchungen zur Regulation der Expression von VEGF, Ang1 und-2 in der normalen Plazenta während der frühen (Tag 60), der mittleren (Tag 100) und der späten (Tag 170) Schwangerschaft durch. Er konnte Abweichungen des Expressionsverhaltens im Sinne der Expressionsstärke der einzelnen Wachstumsfaktoren (VEGF, Ang-1 und-2) in Abhängigkeit vom Gestationsalter aufzeigen. Dies betraf aber nur das Chorionepithel, während alle anderen Zelltypen eine gleichmäßige Expression unabhängig vom Gestationsalter aufwiesen (Babischkin, 2007). VEGF wurde von Zytotrophoblasten in steigender Konzentration mit zunehmendem Schwangerschaftsverlauf exprimiert.

Demgegenüber existieren Arbeiten von Demir et al. und Seval et al., welche zunächst hohe Konzentrationen von VEGF in Zytotrophoblasten der frühen plazentaren Gefäßentwicklung nachweisen, aber im Verlauf abfallende, mit sekundärem Anstieg von VEGF in stromalen Zellen wie Hofbauerzellen und Fibroblasten (Seval, 2008; Demir, 2004). Auf Grund des sich ändernden Expressionsverhaltens von VEGF in Stärke und Zelltyp während zunehmender Gestationsdauer wird vermutet, dass die plazentare Vaskulogenese initial durch Zytotrophoblasten, im weiteren die Angiogenese durch Hofbauerzellen in Kombination mit Trophoblastzellen kontrolliert und reguliert wird (Seval, 2008; Demir, 2004).

Ang1 zeigte in Zyto- und Synzytiotrophoblasten die höchste Konzentration um den Tag 60, um dann im weiteren Verlauf kontinuierlich abzufallen (Babischkin, 2007). Ähnliche

Ergebnisse erbrachten Untersuchungen von Seval et al. zur Expression von Ang1 in der frühen plazentaren Gefäßentwicklung. Ang2 wurde unverändert in der frühen, mittleren wie späten Schwangerschaft durch Zyto- und Synzytiotrophoblasten exprimiert. Eine unveränderte Expression erfolgte in den Hofbauerzellen und Endothelzellen. (Seval, 2008).

Das unterschiedliche Expressionsverhalten des plazentaren Trophoblasten für die Wachstumsfaktoren VEGF, Ang1 und-2 in der frühen plazentaren Gefäßentwicklung scheint wichtig zu sein für einen kontrollierten und regulierten Ablauf der Vaskulo- und Angiogenese in der Plazenta.

Die Untersuchung und Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit lassen bis auf die Blasenmolen keine Unterschiede des Expressionsverhaltens der Wachstumsfaktoren in Plazentabildungsstörungen in Bezug auf das Gestationsalter erkennen. Nur in den Blasenmolen konnte für das Chorionepithel eine quantitativ stärkere Expression von VEGF und Ang1 für Gruppe 2 (>9. SSW) im Vergleich zu Gruppe 1 (7.-9. SSW) registriert werden. Die Ergebnisse für VEGF scheinen daher vergleichbar mit den Untersuchungsergebnissen von Babischkin et al. an normalen Plazenten. Hingegen zeigen die Ergebnisse von Ang1 in Blasenmolen einen späteren Expressionspeak als in der Literatur von normalen Plazenten beschrieben. Da bei den anderen Formen der Plazentabildungsstörungen keine Veränderungen der Expressionsstärke der Wachstumsfaktoren im Hinblick auf das Gestationsalter im Chorionepithel vorliegt, wie in normalen Plazenten vorbeschrieben, bei Blasenmolen nur mit zeitlicher Verzögerung für Ang1, könnte dies ein Hinweis für das gestörte Funktionsverhalten des villösen Trophoblasten im Hinblick auf die plazentare Gefäßentwicklung darstellen.

Weniger umfassende Literatur existiert zu bFGF und seinen Einfluss auf die plazentare Gefäßentwicklung in der normalen Plazenta. In experimentellen Untersuchungen von Hamai et al. konnte der Einfluss von bFGF auf die Angiogenese in normalen Plazenten nachgewiesen werden mit vornehmlicher Expression von bFGF durch Trophoblastzellen, Endothelzellen und Hofbauerzellen. Er fördert die Proliferation von Endothelzellen und induziert in den Endothelzellen vor allem die Produktion von Proteasen, u.a. dem Plasminogen- Aktivator und Kollagenase, welche die Penetration neuer Gefäße in die extrazelluläre Matrix ermöglicht (Folkmann, 2006; Hamai, 1998; Gordon, 1995; Mustonen, 1995). Gezielte Untersuchungen zum Expressionsverhalten im Chorionepithel oder Expressionsveränderungen im Hinblick auf das Gestationsalter

konnte zu bFGF während der normalen plazentaren Gefäßentwicklung in der Literatur nicht gefunden werden, so dass ein Vergleich diesbezüglich schwierig erscheint.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen erkennen, dass die Expression von bFGF ähnlich wie in normalen Plazenten durch das Chorionepithel, die Hofbauerzellen und Endothelzellen erfolgte. Es lies sich kein Unterschied des Expressionsverhaltens innerhalb des Chorionepithels erkennen.

Im Vergleich zu den anderen untersuchten Wachstumsfaktoren ist bFGF der einzige Faktor, der durch die Endothelzellen einzelner Formen der Plazentabildungsstörungen (Embryonal-, Partial- und Windmole) exprimiert wurde. Aus der relativ uneingeschränkten Expression von bFGF bei trotzdem vorliegender Gefäßentwicklungsstörung in den Plazentabildungsstörungen könnte man schlussfolgern, dass VEGF und Angiopoietin-1 einen wesentlich stärkeren Einfluss auf die Gefäßentwicklung ausüben, bFGF eher eine untergeordnete Rolle zukommt. Des Weiteren das ungestörte Zusammenspiel der Faktoren sowie weiterer hier nicht untersuchter Cofaktoren wichtig sind für den kontrollierten Ablauf der plazentaren Gefäßentwicklung.

5.3 Diskussion des Einflusses von VEGF, bFGF und Angiopoietin-1 auf die Gefäßentwicklung von Plazentabildungsstörungen

VEGF und seine Rezeptoren spielen unter physiologischen wie auch einer Vielzahl von pathologischen Zuständen eine entscheidende Schlüsselrolle in der Formierung und Instandhaltung neu gebildeter Gefäße. Seine Wirkung entfaltet er hauptsächlich über die bekannten Tyrosin-Kinase-Rezeptoren Flt1 (VEGFR1) und Flk1/KDR (VEGFR2). Er ist beteiligt an der embryonalen Gefäßentwicklung, aber auch an einer Reihe von pathologischen Prozessen, wie Tumorwachstum, Erblindung des Auges (z.B. diabetische Retinopathie oder altersabhängige Makuladegeneration) und Präeklampsie (Shibuya, 2008; Schmidt, 2007; Yao, 2005).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen erkennen, dass die Expression von VEGF in den Plazentabildungsstörungen von der in normalen Plazenten abweicht.

Es wurde zwar VEGF exprimiert, aber nicht durch alle von uns untersuchten Zellen, wie in der Literatur bei normaler plazentarer Gefäßentwicklung ausgewiesen (z.B. Endothel). Des Weiteren konnte innerhalb der Plazentabildungsstörungen bis auf die Blasenmolen, keine vom Gestationsalter abhängige Änderung des Expressionsverhal-

tens registriert werden, welche der Literatur nach Einfluss auf den Entwicklungsprozess der plazentaren Vaskulatur nimmt. Dies könnten bereits zwei Anhaltspunkte für die Einflussnahme von VEGF auf die gestörte Gefäßentwicklung in den Plazentabildungsstörungen darstellen, bei denen neben einer primären Entwicklungsstörung des Trophoblasten, eine verminderte Vaskularisation der Plazenta vorliegt.

In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu wissen, wie es sich mit dem Expressionsverhalten der VEGF-Rezeptoren (Flt-1/VEGFR1; Flk-1/VEGFR2) in den Plazentabildungsstörungen verhält, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht Untersuchungsbestandteil waren.

In der Literatur werden Studien mit Flt-1 und Flk-1 knock-out Mäusen beschrieben, die je nachdem welcher Rezeptor betroffen ist, in unterschiedlich starkem Ausmaß Störungen der Gefäßentwicklung aufweisen. Bei Flt-1/VEGFR1 knock-out Mäusen zeigte sich eine fehlende Tubulusausbildung bei noch erhaltener Endothelzellausbildung, aber mit deutlicher Fehlorganisation. Hingegen bei Flk-1/VEGFR2 knock-out Mäusen konnten weder Blutinseln noch Endothelzellen im Dottersack ausgebildet werden (Wulff, 2004; Kroll, 2000).

Da bei allen Formen der Plazentabildungsstörungen vereinzelt Endothelzellknospen, aber nur in Embryonal- und Partialmolen wenige Gefäßlumina nachgewiesen wurden, sind Untersuchungen hinsichtlich des Expressionsverhaltens von Flt-1/VEGFR1 im Gestationsverlauf eventuell bedeutsam. Insbesondere wäre hier die lösliche Form des VEGFR1-Rezeptor (sFlt-1) interessant, dem anti-angiogenetische Eigenschaften zugesprochen werden. Die Bindung von VEGF erfolgt hier über eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, dadurch wird die Menge an freien und damit biologisch aktivem VEGF reduziert (Schmidt, 2007). Sein nicht unerheblicher Einfluss als endogener Antagonist von VEGF konnte in mehreren Studien belegt werden, wo Änderungen des Expressionsverhaltens zu einer Veränderung der plazentaren Vaskularisation und Trophoblastinvasion geführt haben (z.B. Präeklampsie).

Die Präeklampsie wird zu den hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen gezählt, die bei 5-10% der Schwangerschaften am Ende des zweiten Trimenon auftreten. Als pathogenetisches Grundprinzip gilt die inadäquate Umwandlung der myometranen Segmente der Spiralarterien in uteroplazentaren Arterien durch eine unzureichende endovaskuläre Invasion des Trophoblasten (Schmidt, 2007). Die Untersuchungsergeb-

nisse bei präeklampsischen Schwangeren zeigten eine deutlich Abnahme von VEGF und zusätzlich seiner biologischen Wirksamkeit durch eine gleichzeitig erhöhte Expression von sFlt-1 (Shibuya, 2008; Schmidt, 2007; Wulff, 2003; Maynard, 2003).

Unter physiologischen Bedingungen finden wir eine Erhöhung von sFlt1 in der Cornea des Auges, um eine Vaskularisierung dieser durch Antagonisierung von VEGF zu unterbinden (Sela, 2008).

In einer weiteren aktuelleren Studie von Sela et al. wurde eine neue Splicing-Variante des VEGF-Rezeptor Flt1 entdeckt, bei der es sich auch um eine lösliche Form handelt (sFlt1-14), die sich aber qualitativ von sFlt1 unterscheidet. Es handelt sich hier ebenfalls um einen potenten humanen VEGF-Inhibitor, der nicht wie sFlt1 in Endothelzellen, sondern vorzugsweise in nichtendothelialen Zellen, wie glatten Muskelzellen und Synzytiotrophoblasten exprimiert wird. Die Expression steigt während der normalen Schwangerschaft im zweiten und dritten Trimenon an, zeigt aber u.a. deutlich erhöhte Konzentrationen in synzytialen Knoten wiederum bei Patientinnen mit Präeklampsie (Sela, 2008).

Eine Untersuchung von sFlt1-14 in Plazentabildungsstörungen könnte ebenfalls zu neuen Erkenntnissen der gestörten Gefäßentwicklung beitragen.

Den Angiopoietinen (Ang1 und Ang2) wird neben VEGF eine wichtige Schlüsselrolle während der Entwicklung des vaskulären Systems in der Embryonalentwicklung im Hinblick auf die Gefäßreifung (Ausdifferenzierung, Stabilisierung und Integrität der Gefäße) zugeschrieben (Seval, 2008; Babischkin, 2007; Wulff, 2004).

Ihre Wirkung entfalten Sie im Wesentlichen über den Tyrosin-Kinase-Rezeptor Tie2. Studien belegen, dass Embryonen mit Defekten im Angiopoietin- System eine fehlerhafte Ausbildung des Kapillarnetzes im Gewebe aufweisen (Breier, 2006; Wulff, 2004; Geva, 2000; Maisonpierre, 1997; Suri, 1996; Davis, 1996). Dies zeigt, dass ohne das Angiopoietin-System kein komplexes Gefäßnetzwerk ausgebildet werden kann und er neben VEGF einer der entscheidenden Faktoren der Angiogenese ist (Juhász-Böss, 2006).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen erkennen, dass die Expression von Ang1 in den Plazentabildungsstörungen von der in normalen Plazenten abweicht. Es wurde zwar Ang1 exprimiert, aber nicht durch alle von uns untersuchten Zellen, wie in der Literatur bei normaler plazentarer Gefäßentwicklung ausgewiesen. Des Weiteren

konnte innerhalb der Plazentabildungsstörungen bis auf die Blasenmolen, keine vom Gestationsalter abhängige Änderung des Expressionsverhaltens registriert werden, welche der Literatur nach Einfluss auf den Entwicklungsprozess der placentaren Vaskulatur nimmt. Die nur in den Blasenmolen registrierte Änderung des Expressionsverhaltens zeigte außerdem einen späteren Expressionspeak von Ang1, als in Untersuchungen von normalen Plazenten durch Babischkin et al (2007).

Die hier erhobenen Ergebnisse lassen daher neben VEGF ebenfalls eine Einflussnahme von Ang1 auf die gestörte Gefäßentwicklung in Plazentabildungsstörungen vermuten.

In diesem Zusammenhang wären auch Untersuchungen zum Expressionsverhalten von Ang2 in Plazentabildungsstörungen interessant, welcher als endogener Antagonist von Ang1 am Tie2-Rezeptor gilt. Er führt zur Verdrängung von Ang1 am Tie2-Rezeptor und induziert damit eine Gefäßdestabilisierung, so dass Endothelzellen bei Anwesenheit von VEGF in der Lage sind, auf den angiogenen VEGF-Stimulus hin auszusprossen.

In der Literatur gibt es Untersuchungen über das Expressionsverhalten von Ang2, die nachweisen, dass bei Fehlen oder geringen Konzentrationen von VEGF und der im Vergleich zur Ang1 überproportionalen Expression von Ang2 eine Gefäßregression die Folge ist (Babischkin, 2007; Wulff, 2004).

In den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten bei Embryonal- und Partialmolen vereinzelte Gefäßlumina und Endothelzellknospen nachgewiesen so dass möglicherweise erhöhte Expressionsspiegel von Ang2 im Vergleich zu Ang1 eine Rolle spielen, die im Verlauf zu einer Gefäßregression führen.

In der Literatur sind Untersuchungen zu Tie2-knock-out-Mäusen ausgewiesen, die belegen, dass diese Mäuseembryonen nicht in der Lage waren ein verzweigtes Gefäßnetzwerk auszubilden und keine Differenzierung in Arterien, Arteriolen und Venen stattfand, obwohl Endothelzellen vorhanden und einige Tubuli ausgebildet waren (Wulff, 2004). Da die angiogenetische Wirkung von Ang1 und Ang2 hauptsächlich über den Tie2-Rezeptor zu erfolgen scheint, ist in diesem Zusammenhang auch das Expressionsverhalten von Tie2 in Plazentabildungsstörungen bedeutsam und kann eventuell weitere Aufschlüsse über die gestörte Gefäßentwicklung bringen.

Generell muss berücksichtigt werden, dass beide Wachstumsfaktoren (VEGF und Angiopoietin-1) den regulierenden Einflüssen durch Hormone (z.B. Östrogen) und Hypoxie unterliegen. Mehrere Studien belegen hier einen regulierenden Einfluss auf

das Expressionsverhalten in der frühen Phase der placentaren Gefäßentwicklung. Es konnte hier gezeigt werden, dass mit steigenden Östrogenwerten während der Schwangerschaft die VEGF-Expression im Trophoblasten stimuliert wird, hingegen die Expression von Ang1 abfällt. Durch eine zusätzlich bestehende Hypoxie wird die Expression von Ang2 und VEGF gefördert (Shibuya, 2008; Babischkin, 2007; Albrecht, 2004; Robb, 2004; Ye, 2002; Zhang, 2001).

BFGF wird ebenfalls zum breiten Spektrum der angiogenetischen Faktoren gezählt, die in der Plazenta identifiziert wurden. Seine Expression erfolgt vornehmlich durch Trophoblastzellen, Endothelzellen und Hofbauerzellen. BFGF fördert während der Gefäßentwicklung die Proliferation von Endothelzellen und induziert hier die Produktion von Proteasen (z.B. Plasminogen-Aktivator, Kollagenasen), welche die Penetration neuer Gefäße in die extrazelluläre Matrix ermöglichen (Seval, 2008; Folkmann, 2006; Stegmann, 2000; Hamai, 1998; Gordon, 1995).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen erkennen, dass die Expression von bFGF in den Plazentabildungsstörungen ähnlich wie in normalen Plazenten durch die in der Literatur ausgewiesenen Zelltypen erfolgte. Im Vergleich zu den anderen untersuchten Wachstumsfaktoren, VEGF und Ang1, ist bFGF der einzige Faktor, der auch durch die Endothelzellen einzelner Formen der Plazentabildungsstörungen (Embryonal-, Partial- und Windmole) exprimiert wurde. Vergleiche zum Expressionsverhalten von bFGF in normalen Plazenten bezüglich der Gestationsdauer waren aufgrund der eingeschränkten Datenlage bei der zur Verfügung stehenden Literatur nicht möglich gewesen.

Hingegen gibt es mehrere Studien, die sich mit dem Expressionsverhalten von bFGF in Tumoren, tumorartigen Läsionen und proliferativen Netzhauterkrankungen befassen haben. Guschmann konnte am Beispiel des Chorangioms zeigen, dass neben einer deutlich verstärkten Expression von VEGF in Plazenta und Tumor, hingegen die Zahl der bFGF-exprimierenden Zellen im Tumor deutlich höher waren als im Vergleich zur tumorfreien Plazenta. Bei Chorangiomen handelt es sich um tumorartige Läsionen im Sinne eines Hamartoms. Diese kapillarreichen Läsionen werden meist ab dem zweiten Schwangerschaftsdrittel beobachtet (Guschmann, 2002).

Untersuchungen zu proliferativen Netzhauterkrankungen mit Ausbildung von Neovaskularisationen (diabetische Retinopathie, altersbedingte Makuladegeneration)

zeigten ebenfalls neben VEGF eine deutlich erhöhte Expression von bFGF (Amann, 2000).

Aus der relativ uneingeschränkten Expression von bFGF bei trotzdem vorliegender Gefäßentwicklungsstörung in den Plazentabildungsstörungen, scheint bFGF hier in diesem Fall im Vergleich zu den beiden anderen Wachstumsfaktoren eine eher untergeordnete Rolle zu spielen.

Neben den in dieser Arbeit untersuchten Wachstumsfaktoren (VEGF, Angiopoietin-1 und bFGF) werden noch weitere Cofaktoren in der Literatur ausgewiesen, die einen regulierenden Einfluss auf die Gefäßentwicklung innerhalb der Plazenta nehmen. Zu dieser Gruppe zählen u.a. die so genannten CCN-Proteine (CYR61-„Cystein-rich 61“, CTGF-„Connective tissue growth factor“, NOV-„Nephroblastoma overexpressed“).

Es handelt sich um Wachstums- und Angiogenesefaktoren, die einen regulierenden Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Migration, Proliferation, Differenzierung, Wundheilung sowie Angiogenese nehmen und neben der Plazenta u.a. in Niere, Nervensystem, Lunge, Herz, Leber, Endothel und Muskel exprimiert werden (Perbal; 2004).

Die Expression in der Plazenta erfolgt in den Endothelzellen der Gefäße sowie villösen Stromazellen, für NOV vorzugsweise im ersten Trimenon, für CYR61 aber erst ab dem 2. Trimenon. Auf Grund des unterschiedlichen Expressionsverhaltens im Hinblick auf die Gestationsalter, scheint NOV eher einen regulierenden Einfluss auf die Vaskulogenese und CYR61 auf die „branching angiogenesis“ zu haben (Schmidt, 2007). In der Literatur sind Studien zu CYR61 und NOV ausgewiesen, die eine hohe Expression in Gefäßen während der Embryogenese festgestellt haben.

In Untersuchungen mit CYR61-defizienten Mäusen kam es zu einem intrauterinen embryonalen Absterben aufgrund ausbleibender Gefäßverzweigung und damit nachfolgender unzureichender Vaskularisation der Plazenta (Schmidt, 2007).

Schmidt et al. führte zusätzliche Untersuchungen bei präeklampsischen Schwangeren durch. Es zeigten sich hier deutlich erniedrigte Expressionslevel von CYR61 und NOV in den Plazenten (Schmidt, 2007). Auf Grund des nachgewiesenen nicht unerheblichen Einflusses dieser proangiogenetischen Faktoren während der Embryogenese, wären Untersuchungen zum Expressionsverhalten in Plazentabildungsstörungen ein weiterer möglicher Ansatzpunkt, um neue Erkenntnisse zur Gefäßentwicklungsstörung zu erhalten.

6 Zusammenfassung

Einleitung

Die Plazenta ist ein Stoffwechselorgan, das einer ständig zunehmenden Funktionsanforderung unterworfen ist, um dem immer steigenden Nährstoffbedarf des Kindes gerecht zu werden. Um diese Aufgabe erfüllen zu können, macht die Plazenta eine Reihe von Wachstums- und Differenzierungsprozessen durch. Hierfür essentiell ist die Herausbildung einer intakten Vaskulatur im Rahmen der Vaskulo- und Angiogenese innerhalb der Plazenta, die den Gas- und Nährstofftransport zwischen Mutter und Fetus garantieren soll, um eine normale embryonale Entwicklung und späteres fetales Wachstum zu ermöglichen. Die Regulation der Vaskulo- und Angiogenese innerhalb der Plazenta unterliegt einer Reihe von angiogenetisch wirksamen Faktoren wie VEGF, bFGF, Angiopoietin und den zugehörigen Rezeptoren. Störungen in diesem Entwicklungsprozess erhöhen das Risiko für Frühaborte, Restriktion des fetalen Wachstums, sowie die Rate eines intrauterinen Fruchttods. Die Plazentabildungsstörungen werden zu den gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen gezählt. Ihnen liegt eine primäre Entwicklungsstörung des villösen Trophoblasten und des extraembryonalen Mesenchyms zugrunde, sowie eine mangelhafte Gefäßausbildung. Bei einer diffusen Ausbildung dieser Entwicklungsstörung ist die davon betroffene Fruchtanlage nicht entwicklungsfähig. Entweder fehlt in diesen Fällen der Embryo oder es liegt eine globale Entwicklungsstörung vor.

Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, inwieweit angiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF, bFGF und Angiopoietin-1 Einfluss auf die gestörte Gefäßentwicklung der frühen Fetalperiode der Plazentabildungsstörungen ausüben, da es hierzu so gut wie keine Untersuchungen im Vergleich zu normalen Plazenten gibt. Es sollte eine Beurteilung der Expression von VEGF, bFGF und Angiopoietin-1 hinsichtlich der exprimierenden Zelltypen, der Expressionsstärke und Abhängigkeit vom Gestationsalter innerhalb der Plazentabildungsstörungen sowie im Vergleich zu normalen Plazenten erfolgen.

Material und Methode

In einer retrospektiven Studie wurde Plazentagewebe der frühen Fetalperiode (ca. 7.-16. SSW) von 43 Frauen, die sich im Zeitraum von 1996-2000 in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Charité aufhielten, untersucht. Die Erhebung der Diagnose Plazentabildungsstörung erfolgte im Vorfeld durch Mitarbeiter der Abteilung für Paidopathologie und Placentologie des Institutes Pathologie der Charité. Die Anfertigung der Plazentaschnitte sowie deren semi-quantitative Auswertung mittels Lichtmikroskop hinsichtlich der Expression von VEGF, bFGF und Angiopoietin-1, erfolgte nach immunhistochemischer Anfärbung mit Hilfe der „APAAP-Methode“ in der gleichen Abteilung.

Ergebnisse

Die immunhistochemische Untersuchung der Plazentabildungsstörungen und die semiquantitative Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Expression von VEGF, bFGF und Angiopoietin-1 in allen Formen der Plazentabildungsstörung erfolgte, aber nicht in allen zu untersuchenden Zelltypen. Alle drei Wachstumsfaktoren wurden vornehmlich durch das Chorionepithel (Zyto- und Synzytiotrophoblast) und die Hofbauerzellen exprimiert, ohne morphologisch fassbaren Unterschied innerhalb des Chorionepithels (Zytotrophoblast <-> Synzytiotrophoblast). Keine Expression erfolgte einheitlich durch die Fibroblasten. Bei den Endothelzellen zeigten sich Unterschiede hinsichtlich der Expression der Wachstumsfaktoren innerhalb der Plazentabildungsstörungen. bFGF war der einzige Faktor der durch die Endothelzellen exprimiert wurde, aber nur in Embryonal-, Partial- und Windmolen, nicht in den Blasenmolen. Bei der Auswertung des Gestationsalters im Hinblick auf das Expressionsverhalten der Wachstumsfaktoren, zeigten sich nur Unterschiede bei den Blasenmolen für VEGF und Ang1. VEGF wies im Chorionepithel sowie Hofbauerzellen eine quantitativ stärkere Expression in Gruppe 2 als in Gruppe 1 auf, ähnliche Ergebnisse zeigten sich für Ang1 im Chorionepithel.

Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen erkennen, dass keine regelhafte Expression von VEGF und Ang1 in den Plazentabildungsstörungen erfolgte, bFGF jedoch vergleichbare Ergebnisse zu normalen Plazenten aufwies. Es zeigten sich nur

geringfügige Unterschiede zwischen den einzelnen Plazentabildungsstörungen. Daraus könnte man schlussfolgern, dass VEGF und Ang1 einen Einfluss auf die gestörte Gefäßentwicklung in Plazentabildungsstörungen ausüben.

Diese Arbeit stellt nur einen Anfang dar, Erkenntnisse über die Ursache der mangelhaften Gefäßausbildung in Plazentabildungsstörungen zu erhalten und könnte als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen, da die Gefäßentwicklung von einer Vielzahl verschiedener Proteine reguliert wird. Hierbei könnten Untersuchungen zum Expressionsverhalten der Rezeptoren der oben aufgeführten Wachstumsfaktoren, insbesondere sFlt1 und sFlt1-14, hormonelle Einflüsse (z.B. Östrogen) und die große Gruppe der CCN-Proteine (z.B. CYR61 und NOV) interessante Ergebnisse liefern.

7 Literaturverzeichnis

- Agostini HT, Hansen LL. Angioproliferative Netzhauterkrankungen bei Ischämie. *Ophthalmologie* 2003;100: 371-377.
- Ahmed A, Li XF, Dunk C, Whittle MJ, Rushton DI, Rollason T. Colocalisation of vascular endothelial growth factor and its Flt-1 receptor in human placenta. *Growth Factors* 1995; 12: 235-243.
- Albrecht ED, Robb VA, Pepe GJ. Regulation of placental vascular growth/permeability factor expression and angiogenesis by estrogen during early baboon pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5803-5809.
- Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Nature* 2005; 438: 946-950.
- Amann J, Kaven C, Spraul CW, Lang GK. Einfluss von Octreotid in Kombination mit Wachstumsfaktoren auf die Proliferation von RPE- Zellen in vitro. *Ophthalmologie* 2000; 97: 737-741.
- Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM. Tie2 Receptor Ligands, Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2, Modulate VEGF-Induced Postnatal Neovascularization. *Circ Res* 1998; 83: 233-240.
- Babischkin JS, Suresch DL, Pepe GJ, Albrecht ED. Differential Expression of Placental Villous Angiopoietin-1 and -2 During Early, Mid and Late Baboon Pregnancy. *Placenta* 2007; 28: 212-218.
- Baird A, Klagsbrun M. The fibroblast growth factor family. *Cancer Cells* 1991; 3: 239-243.
- Beck, 1997 Beck L, D'Amore PA. Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J* 1997; 11: 365-373.
- Bilek K, Horn L C, Abu-Hmeidan F, Pretzsch G. Gestationsbedingte Trophoblast-erkrankungen - Ergebnisse der Jahre 1976-1992. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1994; 54: 519-523.
- Boué J, Boué A, Lazar P. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous abortions. *Teratology* 1975; 12: 11-26.
- Breier G. Molekulare Steuerung der Angiogenese. *Med Gen* 2006; 18: 309-313.

- Brem S, Tsanaclis AM, Gately S, Gross JL, Herblin WF. Immunolocalization of basic fibroblast growth factor to the microvasculature of human brain tumors. *Cancer* 1992; 70: 2673-2680.
- Brown LC, 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 receptor in breast cancer. *Hum. Pathol.* 1995; 26: 86-91.
- Burton GJ, Reshetnikova OS, Milanov AP, Teleshova OV. Stereological Evaluation of Vascular Adaptations in Human Placental Villi to Differing Forms of Hypoxic Stress. *Placenta* 1996; 17: 49-55.
- Carmeliet P, Collen D. Molecular analysis of blood vessel formation and disease. *Am J Physiol* 1997; 42: H 2091- H 2104.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380: 435-439.
- Castellucci M, Scheper M, Scheffen I, Celona A, Kaufmann P. The development of the human placental villous tree. *Anat Embryol* 1990; 181(2): 117-128.
- Cattini PA, Nickel B, Bock M, Kardami E. Immunolocalisation of basic fibroblast growth factor (bfgf) in growing and growth-inhibited placental cells: a possible role for bfgf in placental cell development. *Placenta* 1991; 12: 341-352.
- Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Boocock CA, Ahmed A, Plevin R, Ferrara N, Smith SK. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Localization and Activation in Human Trophoblast and Chorioncarcinoma Cells. *Biology of Reproduction* 1994; 51: 524-530.
- Clark DE, Smith SK, Licence D, Evans AI, Charnock-Jones DS. Comparison of expression patterns for placenta growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in human placenta throughout gestation. *J Endocrinol* 1998; 159: 459-467.
- Cooper JC, Sharkey AM, McLaren J, Charnock-Jones DS, Smith SK. Localization of vascular endothelial growth factor and its receptor, flt, in human placenta and decidua by immunohistochemistry. *J Reprod Fertil* 1995; 105: 205-213.
- Crescimmano C, Marzioni D, Persico MG, Vuvkovic M, Muhauser J, Castellucci M. Expression of bFGF, PlGF and their receptors in the human placenta. *Placenta* 16; A 13:

- Cross JC, Werb Z, Fischer SJ. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 1994; 266: 1508-18.
- Davis S, Aldrich TH, Jones PF et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996; 27: 1161-1169.
- Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*. 1996; 87: 1153-5.
- 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.
- Demir R, Kaufmann P, Castelluci M, Erbenli T, Kotowski A. Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat* 1989; 136: 190-203.
- Demir R, Kayisli UA, Seval Y, Celik-Ozenci C, Korgun ET, Demir-Weusten AY et al. Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* 2004; 25: 560-572.
- Demir R, Seval Y, Huppertz B. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *ScienceDirect- Acta Histochemica* 2007; 109: 257-265.
- Emmrich P. Pathology of placenta, II. Malformations of umbilical cord and placenta. *Zentralbl. allg. Pathol.* 1990; 136: 395-409.
- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Rev* 1997; 18: 4-25.
- Ferriani RA, Ahmed A, Sharkey AM, Smith SK. Colocalization of acidic and basic fibroblast growth factor (FGF) in human placenta and the cellular effects of bFGF in trophoblast cell line JEG-3. *Growth Factors* 1994; 10(4): 259-268.
- Folkman J. Angiogenesis. *Annual Review of Medicine* 2006; 57: 1-18.
- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol. Chem.* 1992; 267: 10931-10934.
- Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. Increased hemangioblast commitment, vascular disorganization, is primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* 1999; 126: 3015-3025.
- Gerhardt H, Betsholtz C. How do endothelial cells orientate? *Exs.* 2005; 94: 3-15.

- Geva E, Ginzinger DG, Zaloudek CJ, Moore DH, Byrne A, Jaffe RB. Human Placental Vascular Development: Vasculogenic and Angiogenic (Branching and Nonbranching) Transformation is regulated by Vascular Endothelial Growth Factor-A, Angiopoietin-1, and Angiopoietin-2. *J Endocrinol* 2002; 87: 4213-4224.
- Geva E, Jaffe RB. Role of Angiopoietins in Reproductive Tract Angiogenesis. *Obstet Gynecol Surv* 2000; 55: 511-519.
- Göcke H, Schwanitz G, Muradow I, Zerres K. Pathomorphologie und Genetik der Frühschwangerschaft. *Pathologe* 1985; 6: 249-259.
- Gordon JD, Shifren JL, Foulk RA, Taylor RN, Jaffe RB. Angiogenesis in the Human Female Reproductive Tract. *Obstet Gynecol Surv* 1995; 50: 688-697.
- Goto S, Yamada A, Ishizuka T, Tomada Y. Development of postmolar trophoblastic disease after partial molar pregnancy. *Gynecol Oncol* 1993; 48: 165-170.
- Gruber BL, Marchese MJ, Kew R. Angiogenic factors stimulate mastcell migration. *Blood* 1995; 86: 2488-2493.
- Guschmann M. Großes Chorangiom bei HELLP- Syndrom. *Gynäkol. Prax.* 2002; 26: 325-330.
- Hamai Y, Fujii T, Yamashita T, Kozuma S, Okai T, Taketani Y. Evidence for basic fibroblast growth factor as a crucial angiogenic growth factor, released from human trophoblasts during early gestation. *Placenta* 1998; 19: 149-155.
- Hatva E, Böhling T, Jääskeläinen J, Persico MG, Haltia M, Atlitalo K. Vascular Growth Factors and Receptors in Capillary Hemangioblastomas and Hemangiopericytomas. *Am J Pathol* 1996; 148: 763-775.
- Hawighorst T. Angiogenese, Lymphangiogenese und Tumorprogression. *Zentralbl Gynakol* 2002; 124: 497-505.
- Heits F, Wiedermann GJ, Jelkmann W. Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF stimuliert die Angiogenese im Guten wie im Bösen. *Dtsch. med. Wschr.* 1998; 123: 259-265.
- Herbst H, Horn LC, Löning T. Trophoblasterkrankungen und Trophoblasttumoren. *Pathologe* 1999; 20: 72-81.
- Honoré LH, Dill FJ, Poland BJ. Placental morphology in spontaneous human abortuses with normal and abnormal karyotype. *Teratology* 1976; 14: 151-166.

- Horn LC, Emmrich P, Bilek K, Bruder E. Der frühe plazentare Trophoblast. II. Tumorförmige Störungen der trophoblastären Entwicklung. Zentralb Gynäkologie, 1996; 118: 591-597.
- Horn LC, Ackermann S, Beckmann MW, Eienkel J. Gestationsbedingte Trophoblasterkrankungen. Geburtsh Frauenheilk 2003; 63: 205-228.
- Horn LC, Rosenkranz M. Histologische Altersbestimmung von Plazentazotten: Eine Übersicht mit schematischen Darstellungen. Der Pathologe 1991; 12: 24-27.
- Horn LC, Rosenkranz M, Bilek K. Wertigkeit der Plazentahistologie für die Erkennung genetisch bedingter Aborte. Z. Geburtsh. Perinatologie 1991; 195: 47-53.
- Hughes SE, Hall PA. Immunlocalization of fibroblast growth factor receptor 1 and its ligands in human tissue. Lab Invest 1993; 69: 173-182.
- Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. EMBO J 1996; 15: 1751.
- Joussen AM, Kirchhof B, Gottstein C. Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese. Ophthalmologie 2003; 100: 284-291.
- Juhasz-Böss I, Staede A, Treeck O, Ortmann O, Malik E. Zyklische Expression von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Angiopoietin 1 und 2 im Endometrium. Geburtsh Frauenheilk 2006; 66: 876-881.
- Kaufmann P, Kertschanska S, Frank H-G. Morphologische und zellbiologische Grundlagen der sog. Plazentainsuffizienz. Reproduktionsmedizin 2000; 16: 405-419.
- Kim I, Kim HG, Moon SO et al. Angiopoietin-1 Induces Endothelial Cell Sprouting Through the Activation of Focal Adhesion Kinase and Plasmin Secretion. Circ Res 2000; 86: 952.
- Kim I, Kim JH, Moon SO et al. Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3`-kinase/Akt signal transduction pathway. Oncogene 2000; 19: 4549-4552.
- Kircheisen R, Schroeder- Kurth T. Familiäres Blasenmolen- Syndrom und genetische Aspekte dieser gestörten Trophoblastentwicklung. Geburtsh u. Frauenheilk 1991; 51: 569-571.
- Klagsbrun M. The fibroblast growth factor family: structural and biological properties. Progress in Growth Factor Res 1989; 1: 207-235.

- Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of Angiogenesis. *Ann Rev Physiol* 1991; 53: 217-239.
- Kohen G, Kingdom JPC. Villous development and the pathogenesis of IUGR. Springer Verlag 2000; 131-145.
- Kranz A, Mayr U, Frank H, Waltenberger J. The coronary endothelium: A target for VEGF. Human coronary artery endothelial cells express functional receptor for VEGF in vitro and in vivo. *Lab Invest* 1999; 79: 985-991.
- Kranz A, Rau C, Kochs M, Waltenberger J. Elevation of vascular endothelial growth factor-A serum levels following acute myocardial infarction. Evidence for its origin and functional significance. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 65-72.
- Kroll J, Waltenberger J. Regulation der Endothelfunktion und der Angiogenese durch den Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor-A (VEGF-A). *Z Kardiol* 2000; 89: 206-218.
- Leach L, Babawale MO, Anderson M, Lammiman M. Vasculogenesis, angiogenesis and the molecular organisation of endothelial junctions in the early human placenta. *J Vasc Res* 2002; 39: 246-259.
- Li D, Bell J, Brown A, Berry CL. The observation of angiogenin and basic fibroblast growth factor gene expression in human colonic adenocarcinoma, gastric adenocarcinoma and hepatocellular carcinomas. *J Pathol* 1994; 172: 171-175.
- Maisonpierre PC, Goldfarb M, Yancopoulos GD, Gao G. Distinct rat genes with related profiles of expression define a TIE receptor tyrosine kinase family. *Oncogene* 1993; 8(6): 1631-7.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277: 55-60.
- Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillmann IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. 2003; 111: 649-658.
- Naish SJ, Boenisch. Handbuch II immunhistochemischer Färbemethoden. (Hrsg.) DAKO-Corporation 1989: 9-29.

- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13: 9-22.
- Neukomm C, Mueller MD. Neues zur Pathophysiologie der Endometriose. *Gynäkol Geburtshilfliche Rundsch* 2007; 47: 113-117.
- Ogawa S, Leavy J, Clauss M, Koga S, Shreeniwa R, Silverstein J, Furie M, Stern D. Modulation of endothelial (EC) function in hypoxia: alterations in cell growth and the response to monocyte-derived mitogenic factors. *J Cell Biochem* 1991; 15F: 213.
- Otani A, Takagi H, Oh H, Koyama S, Matsumura M, Honda Y. Expression of Angiopoietins and Tie2 in human choroidal neovascular membranes. *Ophtal vis Sci* 1999; 40: 1912-1920.
- Paradis V, Ben Lagha N, Zeimoura L, Blanchet P, Eschwege P, Ba N, Benoit G, Jardin A, Bedossa P. Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas. *Virchows Arch*; 2000; 436: 351-356.
- Perbal B. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet* 2004; 363: 62-64.
- Pierce GF, Tarpley JE, Yanagihara D, Mustoe TA, Fox GM, Thomason A. Platelet-derived growth factor (BB monodimer), transforming growth factor-b1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. *Am J Pathol* 1992; 140: 1375-1388.
- Plendl J. Angiogenesis and Vascular Regression in the Ovary. *Anat. Histol. Embryol.* 2000; 29: 257-266.
- Poole TJ, Coffin JD. Vasculogenesis and angiogenesis: two distinct morphogenetic mechanism establish embryonic vascular pattern. *J Exp Zool* 1989; 251: 224-231.
- Pötgens AJG, Westphal HR, de Waal RMW, Ruiter DJ. The role of vascular permeability factor and basic fibroblast growth factor in tumor angiogenesis. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1995; 376: 57-70.
- Procopio WN, Pelavin PI, Lee WMF, Yeilding NM. Angiopoietin-1 and -2 Coiled Coil Domains Mediate Distinct Homo-oligomerization Patterns, but Fibrinogen-like Domains Mediate Ligand Activity. *J Biol Chem* 1999; 274: 30196-30201.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674.

- Robb VA, Pepe GJ, Albrecht ED. Acute temporal regulation of placental vascular endothelial growth/permeability factor expression in baboons by estrogen. *Biol Reprod* 2004; 71: 1694-1698.
- Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995; 108: 2369-2379.
- Röckelein G, Ulmer R, Schröder J. Korrelation von Karyotyp und Plazentamorphologie beim Frühabort. *Pathologe* 1989; 10: 306-314.
- Schaper W, Scholz D. Factors Regulating Arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1143-1151.
- Scheuner G, Mitzscherling CP, Pfister C, Pöge A, Seidler E. Funktionelle Morphologie der menschlichen Plazenta. *Zentralbl allg Pathol pathol Anat.* 1989; 135: 307-328.
- Schiele S. Histologische Plazentabefunde bei Schwangerschaftsabbrüchen der 7.-14. SSW mit besonderer Berücksichtigung klinisch-anamnestischer Daten. Band Ingauredissertation. FU Berlin
- Schmidt M, Gellhaus A, Kasimir-Bauer S, Winterhager E, Kimmig R. Angiogenesefaktoren in der Schwangerschaft: Indikatoren für die Präeklampsie. *Geburtsh Frauenheilk* 2007; 67: 228-235.
- Schneider H, Raio L, Knöfler M. Präimplantation, Implantation und Plazentation: Bedeutung für den Schwangerschaftsverlauf. 2006: 1-14.
- Schulze Osthoff K, Risau W, Vollmer E, Sorg C. In situ detection of basic fibroblast growth factor by highly specific antibodies. *Am J Pathol* 1990; 137(1): 85-92.
- Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackmann RW, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 1993; 12: 303-324.
- Seval Y, Sati L, Celik-Ozenci C, Taskin O, Demir R. The Distribution of Angiopoietin-1, Angiopoietin-2 and Their Receptors Tie-1 and Tie-2 in the Very Early Human Placenta. *Placenta* 2008; 29: 809-815.
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-islands formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376: 62-66.

- Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Boocock CA, Brown KD, Smith SK. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. *J Reprod Fertil* 1994; 99: 609-615.
- Sherer DM, Abulafia O. Angiogenesis during implantation, and placental and early embryonic development. *Placenta* 2001; 22: 1-13.
- Shibuya M. Vascular endothelial growth factor-dependent and-independent regulation of angiogenesis. *BMB reports* 2008; 41: 278-286.
- Shiraishi S, Nakagawa K, Kinukawa N, Nakano H, Sueishi K. Immunohistochemical Localization of Vascular Endothelial Growth Factor in the Human Placenta. *Placenta* 1996; 17: 111-121.
- Shore VH, Wang TH, Wang CL, Torry RJ, Caudle MR, Torry DS. Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* 1997; 18: 657-665.
- Simon MC. Vascular Morphogenesis and the Formation of Vascular Networks. *Development Cell* 2004; 6: 479-482.
- Singh RK, Bucana CD, Gutman M, Fan D, Wilson MR, Fidler IJ. Organ site-dependent expression of basic fibroblast growth factor in human renal cell carcinoma cells. *Am J Pathol* 1994; 145: 365-374.
- Statuto M, Ennans MG, Zamboni G, Bonetti F, Pea M, Bernardello F, Pozzi A, Rusnati M et al. Basic fibroblast growth factor in human pheochromocytoma: a biochemical and immunohistochemical study. *Int J Cancer* 1993; 53: 5-10.
- Stegmann TJ, Hoppert T, Schneider A, Gemeinhardt S, Köcher M, Ibing R, Strupp G. Induktion der myokardialen Neoangiogenese durch humane Wachstumsfaktoren. *Herz* 2000; 6: 589-598.
- Sundekotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 1994; 410-422.
- Suri C, Jones PF, Patan S et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996; 87: 1171-1180.
- Szulman A, Phillippe E, Boue` JG, Boue` A. Human triploidy: association with partial hydatiform mole and non-molar conceptuses. *Hum Pathol* 1981; 12: 1016-1021.
- Tallquist MD, Soriano P, Klinghoffer RA. Growth factor signaling pathways in vascular development. *Oncogene* 1999; 18: 7917-7932.

- Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D. Identification of KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187: 1579-1586.
- Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1999; 286: 2511-4.
- Torry DS, Torry RJ. Angiogenesis and the expression of the vascular endothelial growth factor in endometrium and placenta. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37: 21-29.
- Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, Aldrich TH, Jones PF et al. Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(5): 1904-9.
- Vassilakos P, Riotton G, Kajii T. Hydatiform mole: Two entities. A morphologic and cytogenetic study with some clinical considerations. *Am J Obstet Gynecol* 1977; 127: 167-170.
- Vogel M. Atlas der morphologischen Plazentadiagnostik. 2. Auflage, Berlin Heidelberg New York Tokyo Springer 1996
- Vogel M, Horn LC. Gestationsbedingte Trophoblasterkrankungen, Villöse Trophoblasterkrankungen. *Pathologe* 2004; 25: 269-280.
- Vogel M. Genetisch bedingte Frühaborte. *Gynaekol Prax* 1993; 17: 334-336.
- Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994; 269: 26988-26995.
- Winther H, Ahmed A, Dantzer V. Immunohistochemical Localization of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its two specific Receptors, Flt-1 and KDR, in the Porcin Placenta and Non-pregnant Uterus. *Placenta* 1999; 20: 35-43.
- Witzenbichler B, Maisonpierre PC, Jones P et al. Chemotactic properties of angiopoietin-1 and-2, ligands for the endothel-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *J Biol Chem* 1998; 273: 18514-18521.
- Wulff C, Fraser HM, Kreienberg R. Angiogenese im Corpus luteum des menstruellen Zyklus und der Frühgravidität. *Geburtsh Frauenheilk* 2004; 64: 690-699.

- Wulff C, Weigand M, Kreienberg R, Fraser HM. Angiogenesis during primate placentation in health and disease. *Reproduction* 2003; 126: 569-577.
- Yao YG, Yang HS, Cao Z, Danielsson J, Duh EJ. Upregulation of placental growth factor by vascular endothelial growth factor via a post-transcriptional mechanism. *FEBS Letters* 2005; 579: 1227-1234.
- Ye F, Florian M, Magder SA, Hussain SN. Regulation of angiopoietin and Tie-2 receptor in non-reproductive tissues by estrogen. *Steroids* 2002; 67: 305-310.
- Zeng L, Dai J, Ying K, Zhao E et al. Identification of a novel human angiopoietin-like gene expressed mainly in heart. *J Hum Genet* 2003; 48(3): 159-62.
- Zhang EG, Smith SK, Baker PN, Charnock-Jones DS. The regulation and localization of angiopoietin-1, and angiopoietin-2 and their receptor Tie2 in normal and pathologic human placentae. *Mol Med* 2001; 7: 624-635.
- Zheng J, Vagnoni KE, Bird IM, Magness RR. Expression of basic fibroblast growth factor, endothelial mitogenic activity, and angiotensin II typ-1 receptor in the ovine placenta during the third trimester of pregnancy. *Biol Reprod* 1997; 56: 1189-1197.
- Zhu WH, MacIntyre A, Nicosia RF. Regulation of Angiogenesis by Vascular Endothelial Growth Factor and Angiopoietin-1 in the Rat Aorta Model: Distinct Temporal Patterns of Intracellular Signaling Correlate with Inducation of Angiogenic Sprouting. *Am J Pathol* 2002; 161: 823-830.
- Zygmunt M, Münstedt K, Lang U. Die Rolle der Vaskulo- und Angiogenese in der embryonalen und fetalen Entwicklung. *Gynäkologe* 2001; 34: 812-819.

8 Abkürzungsverzeichnis

Ang1	Angiopoietin-1
Ang2	Angiopoietin-2
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase bFGF basic fibroblastic growth factor
CYR61	Cystein-rich 61
CTGF	Conective tissue growth factor
Fab-Arm	antigenbindendes Fragment
FGFR	Rezeptor für den Fibroblastenwachstumsfaktor
HCG	human chorionic gonadotropine
HIF-1	hypoxieinduzierbarer Transkriptionsfaktor
NOV	Nephroblastoma overexpressed
PIGF	Placental growth factor, plazentarer Wachstumsfaktor
sFlt	lösliche Form der fms-like receptor tyrosine kinase
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SSW	Schwangerschaftswoche
svVEGF	snake venom-derived
TBS	Tris buffered saline
TGF- β	transforming growth factor
Tie-2	Tunica internal endothelial cell kinase
TNF-alpha	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR-1/Flt-1	fms-like receptor tyrosine kinase
VEGFR-2/KDR/Flk-1	kinase-insert domain containing receptor oder fetal liver kinase-1

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. M. Guschmann, der diese Arbeit ermöglicht hat und mich trotz der widrigen Umstände hervorragend über die Jahre hinweg betreut hat.

Gedankt sei den medizinisch-technischen Assistentinnen des Labors der Pathologie der Charité für die geduldige Einweisung in die immunhistochemischen Verfahrensweisen.

Insbesondere danke ich meiner Familie, die mich während meines gesamten beruflichen Werdeganges und auch bei dieser Arbeit unterstützt haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

10 Lebenslauf

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

11 Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde. Diese Arbeit stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur wurden vollständig angegeben.

Uta Wilke