

Untersuchungen zum vaskulären
endothelialen Wachstumsfaktor
im Rahmen von Gestationsdiabetes

Janina Theresia Driedger

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und
Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Axel Wehrend

und

Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Innenstadt, München

Betreuerin: Prof. Dr. Barbara Schiessl

Dr. Maria Günthner-Biller

**Untersuchungen zum vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor im Rahmen von
Gestationsdiabetes**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Janina Theresia Driedger

Tierärztin aus Frankenthal

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h .c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Axel Wehrend
Prof. Dr. Barbara Schiessl
Prof. Dr. Joachim Roth

Tag der Disputation: 10.10.2014

1	Einleitung und Fragestellung.....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	VEGF.....	3
2.1.1	VEGF A.....	4
2.1.2	VEGF165b.....	4
2.1.3	Regulation von VEGF	7
2.1.4	VEGF-Rezeptoren	8
2.1.4.1	Regulation der Rezeptor-Expression.....	10
2.1.5	Biologische Aktivität von VEGF	11
2.2	VEGF in Gesundheit und Krankheit	12
2.2.1	Die Rolle von VEGF in der physiologischen Angiogenese	13
2.2.2	Die Rolle von VEGF in der pathologischen Angiogenese	15
2.3	VEGF in der Schwangerschaft	17
2.3.1	VEGF in der physiologischen Schwangerschaft	17
2.3.2	Diabetes mellitus	18
2.3.2.1	Diabetes mellitus Typ I.....	19
2.3.2.2	Diabetes mellitus Typ II.....	20
2.3.2.3	Gestationsdiabetes.....	21
2.3.2.3.1	Einteilung des Diabetes mellitus in der Schwangerschaft.....	23
2.3.2.4	Diabetes und VEGF	23
2.3.2.4.1	VEGF in der Schwangerschaft bei Gestationsdiabetes.....	24
2.4	VEGF beim Hund.....	25

2.4.1	VEGF in der Trächtigkeit bei Tieren.....	27
2.4.2	Diabetes mellitus beim Hund	28
2.4.2.1	Kaniner Gestationsdiabetes	29
3	Material und Methoden	32
3.1	Material ELISA	32
3.1.1	Allgemeine Reagenzien für ELISA.....	32
3.1.2	Reagenziensätze für ELISA.....	32
3.1.3	Spezielle Reagenzien für VEGF A.....	32
3.1.4	Spezielle Reagenzien für VEGF165b.....	33
3.1.5	Puffer und Verdünnungen	33
3.1.6	Geräte.....	34
3.1.7	Sonstiges Material	34
3.2	Material Immunhistochemie.....	35
3.2.1	Reagenziensatz und Chromogen für die Immunhistochemie VEGF A.....	35
3.2.2	Antikörper für die Immunhistochemie VEGF A.....	35
3.2.3	Puffer und Verdünnungen VEGF A	35
3.2.4	Reagenziensatz und Chromogen für die Immunhistochemie VEGF165b.....	36
3.2.5	Antikörper für die Immunhistochemie VEGF165b.....	36
3.2.6	Puffer und Verdünnungen VEGF165b	36
3.2.7	Geräte (VEGF A und VEGF165b).....	37
3.2.8	Sonstiges Material (VEGF A und VEGF165b).....	37
3.3	Patientenkollektiv	37

3.3.1	Schwangeres Patientenkollektiv	39
3.3.1.1	„Schwangere mit Gestationsdiabetes“	39
3.3.1.1.1	50g-Glukose-Belastungstest (Glucose-Challenge-Test, GCT).....	39
3.3.1.1.2	Oraler Glukosetoleranztest (75g oGTT)	40
3.3.1.2	Vergleichskollektiv „Gesunde Schwangere“	40
3.3.1.3	Einschlusskriterien	41
3.3.1.4	Ausschlusskriterien	41
3.3.1.5	Blutentnahme, Aufbereitung und Lagerung der Proben	41
3.3.1.6	Aufklärungsbogen und Einverständniserklärung	42
3.3.2	Gesundes, nicht schwangeres Patientenkollektiv	42
3.3.2.1	Einschlusskriterien	42
3.3.2.2	Ausschlusskriterien	42
3.3.2.3	Blutentnahme, Aufbereitung und Lagerung der Proben	43
3.3.3	Plazenten.....	43
3.4	Methoden	44
3.4.1	ELISA	44
3.4.1.1	Quantitative Bestimmung von VEGF in Serum und Plasma	44
3.4.2	Immunhistochemie	47
3.4.2.1	Herstellung und Vorbehandlung der Schnitte	47
3.4.2.2	Durchführung der Immunhistochemie	48
3.4.2.2.1	VEGF A	48
3.4.2.2.2	VEGF165b	49

3.4.2.3	Auswertung der Schnitte unter dem Lichtmikroskop	51
3.5	Statistik.....	52
3.5.1	Auswertung.....	52
3.5.2	Statistische Tests	52
3.5.3	Signifikanz und p-Werte.....	53
4	Ergebnisse.....	54
4.1	VEGF-Konzentrationen in Serum und Plasma.....	54
4.1.1	Morphologische Daten	54
4.1.2	Vergleich der VEGF-Konzentrationen zwischen Serum und Plasma in der Gruppe „Gesunde Schwangere“	55
4.1.2.1	VEGF A.....	56
4.1.2.2	VEGF165b	57
4.1.3	Vergleich der VEGF-Konzentrationen zwischen Serum und Plasma in der Gruppe „Schwangere mit Gestationsdiabetes“	58
4.1.3.1	VEGF A.....	58
4.1.3.2	VEGF165b	59
4.1.4	Vergleich der VEGF-Konzentrationen zwischen Serum und Plasma in der Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“.....	60
4.1.4.1	VEGF A.....	60
4.1.4.2	VEGF165b	62
4.1.5	Vergleich der VEGF-Konzentrationen zwischen verschiedenen Plasmen in der Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“	63
4.1.5.1	VEGF A.....	63

4.1.5.2	VEGF165b	65
4.1.6	Einfluss des Messzeitpunkts auf die VEGF-Konzentration	66
4.1.6.1	VEGF A.....	66
4.1.6.2	VEGF165b	67
4.1.7	Vergleich der VEGF-Konzentrationen zwischen den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ und „Gesunde Schwangere“	68
4.1.7.1	VEGF A.....	69
4.1.7.2	VEGF165b	71
4.1.8	Vergleich des Verlaufs der VEGF-Konzentrationen zwischen den Gruppen „Gesunde Schwangere“ und „Schwangere mit Gestationsdiabetes“	74
4.1.8.1	VEGF A Serum	74
4.1.8.2	VEGF A Plasma	75
4.1.8.3	VEGF165b Serum	77
4.1.8.4	VEGF165b Plasma	78
4.2	Immunhistochemie	80
4.2.1	Morphologische Daten	80
4.2.2	Expression von VEGF und VEGF165b in Plazenten.....	81
4.2.2.1	Statistische Auswertung des Immunreaktiven Scores.....	86
4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	87
4.3.1	ELISA.....	87
4.3.2	Immunhistochemie	88
5	Diskussion	89
5.1	Diskussion der Fragestellung	89

5.2	Diskussion der Methoden	90
5.2.1	ELISA.....	90
5.2.2	Immunhistochemie	91
5.3	Diskussion der Ergebnisse.....	92
5.3.1	Vergleich der Konzentrationen von VEGF A und VEGF165b zwischen Serum und Plasma	92
5.3.2	Vergleich der Konzentrationen von VEGF A und VEGF165b zwischen verschiedenen Plasmen.....	94
5.3.3	Einfluss des Messzeitpunkts auf die VEGF-Konzentration	96
5.3.4	Vergleich der Konzentrationen von VEGF A und VEGF165b zwischen den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ und „Gesunde Schwangere“.....	96
5.3.5	Vergleich des Verlaufs der VEGF-Konzentrationen zwischen den Gruppen „Gesunde Schwangere“ und „Schwangere mit Gestationsdiabetes".....	98
5.3.5.1	VEGF A.....	98
5.3.5.2	VEGF165b	100
5.3.6	Expression von VEGF in gesunden und in diabetischen Plazenten	101
5.3.6.1	VEGF A.....	101
5.3.6.2	VEGF165b	104
5.4	Vergleich zwischen Mensch und Hund.....	105
6	Schlussbetrachtung	107
7	Zusammenfassung	109
8	Summary.....	112
9	Literaturverzeichnis	115

Inhaltsverzeichnis

10	Erklärung	143
11	Danksagung	144

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation des Diabetes in der Schwangerschaft nach White 23

Tabelle 2: Diagnose-Grenzwerte des GCT nach Angaben der Deutschen Diabetes
Gesellschaft, die zum begründeten Verdacht eines GDM führen 39

Tabelle 3: Neue Diagnose-Grenzwerte des oGTT für GDM im venösen Plasma nach
International Association of Diabetes and Pregnancy Study Group
(IADPSG)-Konsensus-Empfehlungen im Vergleich zu den bisher gültigen
Grenzwerten nach Carpenter/Coustan 40

Tabelle 4: Ermittlung des IRS (Produkt aus Färbeintensität und Anteil positiv
gefärbter Zellen) 52

Tabelle 5: Morphologische Daten der schwangeren Patientinnen in den
Vergleichskollektiven (ELISA) 54

Tabelle 6: Daten zu Schwangerschaft und Geburt in den Vergleichskollektiven
(ELISA) 55

Tabelle 7: Deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der
VEGF A-Serum- und Plasmakonzentrationen in der Gruppe „Gesunde
Nichtschwangere“ 61

Tabelle 8: Deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der
VEGF165b-Serum- und Plasmakonzentrationen in der Gruppe „Gesunde
Nichtschwangere“ 63

Tabelle 9: Deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der
VEGF A-Konzentrationen in EDTA-, CTAD- und Citratplasma in der
Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“ 64

Tabelle 10: Deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der
VEGF165b-Konzentrationen in EDTA-, CTAD- und Citratplasma in der
Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“ 66

Tabelle 11: Lineares gemischtes Modell zum Einfluss des Messzeitpunkts auf die
VEGF A-Serumkonzentration 67

Tabelle 12: Lineares gemischtes Modell zum Einfluss des Messzeitpunkts auf die
VEGF A-Plasmakonzentration 67

Tabelle 13: Lineares gemischtes Modell zum Einfluss des Messzeitpunkts auf die
VEGF165b-Serumkonzentration 68

Tabelle 14: Lineares gemischtes Modell zum Einfluss des Messzeitpunkts auf die
VEGF165b-Plasmakonzentration 68

Tabelle 15: Deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der VEGF A-Serumkonzentrationen in den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ und „Gesunde Schwangere“	70
Tabelle 16: Deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der VEGF A-Plasmakonzentrationen in den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ und „Gesunde Schwangere“	71
Tabelle 17: Deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der VEGF165b-Serumkonzentrationen in den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ und „Gesunde Schwangere“	72
Tabelle 18: Deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der VEGF165b-Plasmakonzentrationen in den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ und „Gesunde Schwangere“	73
Tabelle 19: VEGF A-Serumkonzentrationen in pg/ml (MW±SEM) in den Gruppen „Gesunde Schwangere“ und „Schwangere mit GDM“ zu den 10 Messzeitpunkten.	75
Tabelle 20: VEGF A-Plasmakonzentrationen in pg/ml (MW±SEM) in den Gruppen „Gesunde Schwangere“ und „Schwangere mit GDM“ zu den 10 Messzeitpunkten.	76
Tabelle 21: VEGF165b-Serumkonzentrationen in pg/ml (MW±SEM) in den Gruppen „Gesunde Schwangere“ und „Schwangere mit GDM“ zu den 10 Messzeitpunkten.	78
Tabelle 22: VEGF165b-Plasmakonzentrationen in pg/ml (MW±SEM) in den Gruppen „Gesunde Schwangere“ und „Schwangere mit GDM“ zu den 10 Messzeitpunkten.	79
Tabelle 23: Morphologische Daten der schwangeren Patientinnen in den Vergleichskollektiven (IHC)	80
Tabelle 24: Daten zu Schwangerschaft und Geburt in den Vergleichskollektiven (IHC)...	81
Tabelle 25: Auswertung der Immunhistochemie mittels des IRS für VEGF A	82
Tabelle 26: Auswertung der Immunhistochemie mittels des IRS für VEGF165b	82
Tabelle 27: Statistische Auswertung des IRS auf Gruppenunterschiede.	86

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das VEGF-Gen und seine Spleißprodukte..... 5

Abbildung 2: Interaktion von VEGF mit Tyrosinkinase-Rezeptoren 10

Abbildung 3: Bearbeitungsschema ELISA in 96 Well Platte..... 46

Abbildung 4: Verlauf der mittleren VEGF A-Serum- und Plasmakonzentrationen in
pg/ml zu den 10 Messzeitpunkten in der Gruppe „Gesunde Schwangere“.. 56

Abbildung 5: Verlauf der mittleren VEGF165b-Serum- und Plasmakonzentrationen in
pg/ml zu den 10 Messzeitpunkten in der Gruppe „Gesunde Schwangere“.. 57

Abbildung 6: Verlauf der mittleren VEGF A-Serum- und Plasmakonzentrationen in
pg/ml zu den 10 Messzeitpunkten in der Gruppe „Schwangere mit GDM“. 59

Abbildung 7: Verlauf der mittleren VEGF165b-Serum- und Plasmakonzentrationen
in der Gruppe „Schwangere mit GDM“ 60

Abbildung 8: Grafische Darstellung der VEGF A-Serum-und Plasmakonzentrationen
in der Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“ 61

Abbildung 9: Grafische Darstellung der VEGF165b-Serum-und Plasmakonzentrationen
in der Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“ 62

Abbildung 10: Grafische Darstellung der VEGF A-Konzentrationen in EDTA-, CTAD-
und Citratplasma in der Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“ 64

Abbildung 11: Grafische Darstellung der VEGF165b-Konzentrationen in EDTA-,
CTAD- und Citratplasma in der Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“ 65

Abbildung 12: Grafische Darstellung der VEGF A-Serumkonzentrationen in den
Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ und „Gesunde Schwangere“ 69

Abbildung 13: Grafische Darstellung der VEGF A-Plasmakonzentrationen in den
Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ und „Gesunde Schwangere“ 70

Abbildung 14: Grafische Darstellung der VEGF165b-Serumkonzentrationen in den
Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ und „Gesunde Schwangere“ 72

Abbildung 15: Grafische Darstellung der VEGF165b-Plasmakonzentrationen in den
Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ und „Gesunde Schwangere“ 73

Abbildung 16: Expression von VEGF A im Synzytiotrophoblast 83

Abbildung 17: Expression von VEGF A im extravillösen Trophoblast..... 84

Abbildung 18: Expression von VEGF165b im Synzytiotrophoblast 84

Abbildung 19: Expression von VEGF165b im extravillösen Trophoblast..... 85

Abbildung 20: Positivkontrolle (links) und Negativkontrolle (rechts) eines
Plazentapräparats. 85

Abkürzung	Bedeutung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex (engl. Avidin-Biotin-Complex)
ADA	Amerikanische Diabetes Gesellschaft (engl. American Diabetes Association)
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
ATG	Adenin, Thymin, Guanin
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BÄK	Bundesärztekammer
BMI	Body-Mass-Index
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CTAD	Citrat, Theophyllin, Adenosin, Dipyridamol
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DM I	Diabetes mellitus Typ I
DM II	Diabetes mellitus Typ II
DSS	Distale Spleißstelle
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)
ERK	Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase (engl. extracellular signal-regulated kinases)
flk-1/KDR	KDR-Tyrosinkinase-Rezeptor (engl. kinase insert domain receptor)
flt-1	fms-ähnliche Tyrosinkinase 1 (engl. fms-like tyrosine kinase-1)
GCT	Glucose-Challenge-Test
GDM	Gestationsdiabetes mellitus
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horseradish-peroxidase)

Abkürzungsverzeichnis

IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (engl. insulin-like growth factor 1)
IgG	Immunglobulin G
IADPSG	International Association of Diabetes and Pregnancy Study Group
IRS	Immunreaktiver Score
KBV	Kassenärztliche Bundesvereinigung
kDA	Kilodalton
mRNA	Botenstoff-RNA (engl. messenger RNA)
MW	Mittelwert
NO	Stickstoffmonoxid
oGTT	Oraler Glukosetoleranztest
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PlGF	Plazenta-Wachstumsfaktor (engl. placental growth factor)
PSS	Proximale Spleißstelle
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
sFlt-1	lösliche fms-ähnliche Tyrosinkinase 1 (engl. soluble fms-like tyrosine kinase 1)
SS	Schwangerschaft
SSW	Schwangerschaftswoche
SD	Standardabweichung (engl. standard deviation)
SEM	Standardfehler (engl. standard error of the mean)
STH	Somatropin
TGA	Thymin, Guanin, Adenin
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (engl. transforming growth factor)
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl. vascular endothelial growth factor)
VEGFR	VEGF-Rezeptor

1 Einleitung und Fragestellung

Die Wachstumsfaktorenfamilie des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) umfasst fünf Glykoproteine, die als VEGF A, VEGF B, VEGF C, VEGF D und Plazenta-Wachstumsfaktor (PlGF) bezeichnet werden (Koch et al., 2011). Das hiervon am besten untersuchte Glykoprotein ist VEGF A, oft nur als VEGF bezeichnet. Es handelt sich hierbei um ein Heparin bindendes Protein mit einer Größe von 45kDA (Ferrara und Henzel, 1989). VEGF A besitzt mehrere Isoformen, die aufgrund unterschiedlicher Spleißstellen entstehen (Tischer et al., 1991, Ferrara und Henzel, 1989). VEGF165 ist die als Erstes beschriebene und bisher am besten untersuchte Variante (Plouet et al., 1989, Connolly et al., 1989, Ferrara und Henzel, 1989, Senger et al., 1983). Im Jahr 2002 wurde eine weitere Isoform entdeckt, die sich in ihrer Funktion fundamental von den bisher bekannten Formen unterscheidet und durch einen Spleißvorgang am distalen Ende des Exons 8 entsteht. Diese neue Spleißvariante wurde als VEGF165b bezeichnet und unterscheidet sich von VEGF165 durch sechs Aminosäuren am carboxy-terminalen Ende. VEGF165b scheint sich neben strukturellen Unterschieden auch in der Funktion von VEGF165 zu unterscheiden (Bates et al., 2002).

Die schwangerschaftsspezifische Erkrankung Gestationsdiabetes mellitus (GDM) zählt mit einer Inzidenz von 5% zu den am häufigsten auftretenden Komplikationen in der Schwangerschaft (Schiessl, 2012). Bei GDM liegt eine Dysfunktion des Endothels vor und die Komplikation geht mit einer veränderten Angiogenese und Vaskularisierung der Plazenta einher. VEGF ist als Regulator der Angiogenese und Vaskulogenese bekannt und könnte in diesem Zusammenhang eine Rolle im Rahmen von GDM spielen.

Auch in der Tiermedizin gewinnt VEGF zunehmend an Bedeutung. Darüber hinaus können auch Hunde wie der Mensch an Diabetes mellitus bzw. GDM erkranken, weshalb der aktuelle Kenntnisstand hierzu in die Dissertationsschrift aufgenommen wurde.

Ziel dieser Arbeit war es, die VEGF-Konzentration im Rahmen von gesunden Schwangerschaften sowie bei Schwangerschaften mit GDM zu untersuchen. Hierzu wurde die Konzentration von VEGF A (Synonym zu VEGF165 verwendet) und VEGF165b

sowohl im Serum als auch im Plasma von Patientinnen mit GDM bestimmt und mit gesunden Kontrollen verglichen. Dabei sollte evaluiert werden, inwiefern die Methodik der VEGF-Messung einen Einfluss auf das Ergebnis der Konzentrationsbestimmung hat. Ferner wurde die Expression des Wachstumsfaktors VEGF A und der Variante VEGF165b in Plazenten von Patientinnen mit GDM untersucht und mit der in Plazenten gesunder Schwangerschaften verglichen.

2 Literaturübersicht

2.1 VEGF

VEGF wurde als Heparin-bindendes Polypeptid-Mitogen identifiziert dessen Zielzellen vaskuläre Endothelzellen sind (Houck et al., 1991, Ferrara und Henzel, 1989). Es wurde erstmals von Senger et al. (1983) in Aszitesflüssigkeit von Säugetieren mit malignen Neoplasien beschrieben und zunächst als vaskulärer Permeabilitätsfaktor bezeichnet. Im Jahr 1989 wurde dieses vasoaktive Peptid von drei verschiedenen Arbeitsgruppen gleichzeitig isoliert und die Bezeichnung VEGF setzte sich aufgrund seiner Zielzellenspezifität durch (Plouet et al., 1989, Connolly et al., 1989, Ferrara und Henzel, 1989). Einige Jahre später wurde unter Verwendung eines humanen Chromosomen-Mapping-Panels das VEGF-Gen auf dem Chromosom 6p21.3 lokalisiert (Vincenti et al., 1996).

Die VEGF-Familie umfasst fünf Glykoproteine: VEGF A (der Prototyp), VEGF B, VEGF C, VEGF D und den PlGF (Koch et al., 2011). Am besten untersucht ist VEGF A, das oft nur als VEGF bezeichnet wird und eine besondere Rolle bei der vaskulären Homöostase und Angiogenese im Tumorgewebe spielt. Durch molekulare Klonierung konnte die Existenz von mindestens sechs verschiedenen Isoformen des VEGF A nachgewiesen werden, die sich jeweils in der Anzahl der vorhandenen Aminosäuren unterscheiden (121, 145, 165, 183, 189 und 206 Aminosäuren). Dies kommt durch alternatives Spleißen der mRNA zustande (Pritchard-Jones et al., 2007, Tischer et al., 1991). Die mit Abstand am weitesten verbreitete Isoform, auch bezüglich der biologischen Wirksamkeit, ist VEGF165, auf das sich die folgende Darstellung konzentriert. Dabei wird in dieser Arbeit der Begriff VEGF A synonym zu VEGF165 verwendet, um Verwechslungen mit der Spleißvariante VEGF165b zu vermeiden (Ausnahmen können Zitate darstellen).

2.1.1 VEGF A

Das VEGF A hat eine Größe von 45kDA, bestehend aus acht Exons, die durch sieben Introns getrennt werden (Tischer et al., 1991, Ferrara und Henzel, 1989). Alle Isoformen enthalten Exon 1-5 und das terminale Exon 8. Exon 6 und 7, welche Heparin-bindende Domänen kodieren, können ein-oder ausgeschlossen sein. Das Exon 8 am 3' Ende besitzt zwei verschiedene Spleißstellen in der Nukleotidsequenz. Je nachdem welche dieser Stellen von der Zelle zum Spleißen genutzt wird, werden zwei Familien von Isoformen erzeugt, die zwar identische Länge, aber unterschiedliche C-terminale Aminossequenzen besitzen. Wird die proximalste Sequenz in Exon 8 zum Spleißen genutzt, wird Exon 8a erhalten und es entstehen die als proangiogenetische Familie bezeichneten VEGFxxx-Isoformen. Die erst später beschriebenen VEGFxxx-b-Isoformen werden durch die Verwendung einer 66 Basenpaare weiter distal gelegenen Spleißstelle generiert. Dies führt zum Spleißen von Exon 8a und der Erzeugung von mRNA-Sequenzen, die für die VEGFxxx-b-Familie kodieren (Abbildung 1) (Bates et al., 2002, Varey et al., 2008). Die verschiedenen Isoformen zeigen deutlich unterschiedliche Sekretionsmuster, was vermuten lässt, dass sie mehrere physiologische Rollen erfüllen könnten. In-situ-Hybridisierung zeigt, dass die VEGF-mRNA in den meisten Geweben und Organen vorhanden ist und in Bereichen aktiver vaskulärer Proliferation, wie zum Beispiel im ovariellen Gelbkörper, in besonders hohen Konzentrationen nachgewiesen werden kann (Ferrara et al., 1991).

2.1.2 VEGF165b

Bates et al. (2002) beschrieben eine interessante Spleißvariante, das VEGF165b. Diese Isoform enthält Sequenzen, die am C-terminalen Ende durch das Exon 9, statt durch das Exon 8 kodiert werden. Entsprechend der verwendeten Nomenklatur für Exon 6 (Houck et al., 1991), wird das initial als Exon 9 benannte Exon nun als Exon 8b bezeichnet. Dieses alternative Spleißen resultiert in Spleißprodukten mit gleicher Länge, aber einem veränderten C-terminalen Ende, da durch die Kodierung von sechs unterschiedlichen Aminosäuren bei den VEGFxxx-b-Isoformen ein Austausch der Basen Cystein gegen Serin stattfindet. Dies führt dazu, dass die mRNA der Familie der VEGFxxx-b-Isoformen 18 Basen vom Exon 8b statt vom Exon 8a enthält (Abbildung 1) (Bates et al., 2002, Woolard et al., 2004, Hua et al., 2010).

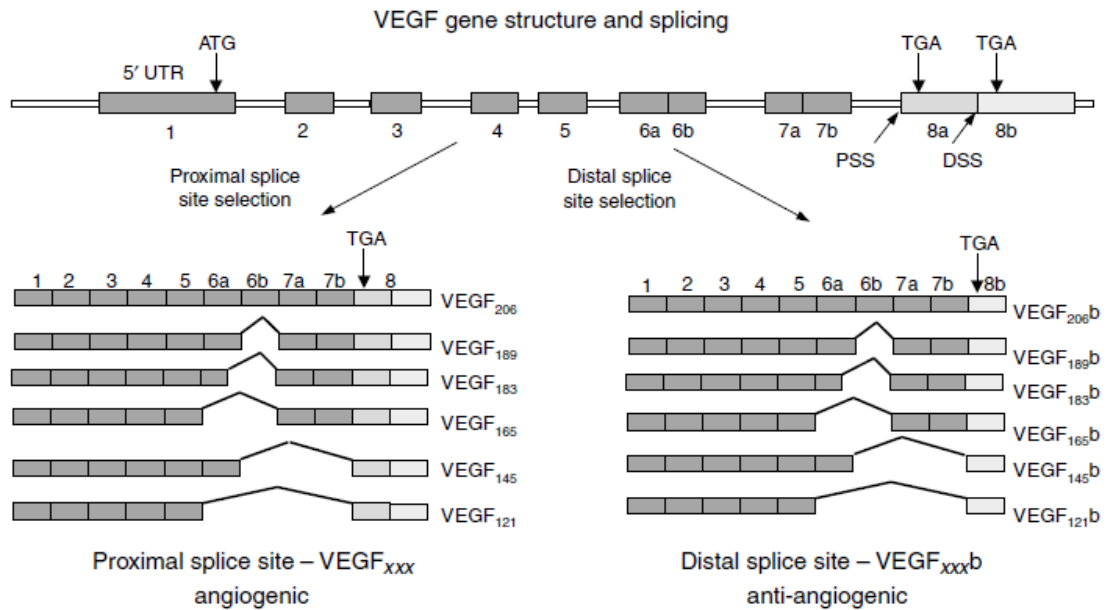


Abbildung 1: Das VEGF-Gen und seine Spleißprodukte (Pritchard-Jones et al., 2007)

Alternatives Spleißen des VEGF-Gens im terminalen Exon 8 führt zur Entstehung von zwei Familien von Isoformen – den angiogenen VEGF_{xxx}- und den antiangiogenen VEGF_{xxx-b}-Isoformen (Pritchard-Jones et al., 2007); ATG = Adenin, Thymin, Guanin (Startcodon); TGA = Thymin, Guanin, Adenin (Stoppcodon); PSS = proximale Spleißstelle; DSS = distale Spleißstelle

VEGF_{165b} wurde als erste dieser Exon 8b-kodierten Isoformen identifiziert und stellt einen wesentlichen Anteil des Gesamt-VEGF dar (Perrin et al., 2005). Im Plazentagewebe macht VEGF_{165b} 1% (Bates et al., 2006), im normalen Darmgewebe über 90% aus (Varey et al., 2008). Nach der Entdeckung von VEGF_{165b} konnte in weiteren Studien die Existenz von VEGF_{121b}, VEGF_{183b}, VEGF_{145b} (Perrin et al., 2005), VEGF_{189b} (Miller-Kasprzak und Jagodzinski, 2008) und VEGF_{206b} belegt werden (Pritchard-Jones et al., 2007). Die funktionelle Folge des veränderten C-terminalen Endes ist die Konkurrenz von VEGF_{165b}-Homodimeren mit VEGF₁₆₅-Homodimeren um die Bindung an ihren wichtigsten Rezeptor VEGFR-2 in einem 1:1-Verhältnis. VEGF_{165b} blockiert dabei als endogener Antagonist die angiogenetische Wirkung an diesem Rezeptor, da es selbst keine Phosphorylierung auslöst und somit die durch VEGF₁₆₅ vermittelte Phosphorylierung und nachfolgende Signalkaskade unterdrückt (Woolard et al., 2004). Dadurch wird *in vitro* die VEGF₁₆₅-induzierte endotheliale Zellproliferation, Migration und Vasodilatation gehemmt (Bates et al., 2002) sowie *in vivo* die physiologische Angiogenese und das Tumorwachstum inhibiert (Woolard et al., 2004, Cebe Suarez et al., 2006). Eine Erklärung für die ineffiziente angiogene Aktivierung des Rezeptors scheint zu sein, dass VEGF_{165b} nicht an Neuropilin bindet und dadurch eine für die

Signaltransduktion wichtige Phosphorylierung an der Stelle Y1052 nicht stattfindet (Kawamura et al., 2008). Bei Neuropilin handelt es sich um ein Zelloberflächenprotein, das an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt ist (Fujisawa et al., 1997). Die Neuropilin-Bindungsstelle befindet sich auf dem Exon 8 und geht beim alternativen Spleißen zu VEGF165b scheinbar verloren (Jia et al., 2006). VEGF165b ist somit nur zu einer schwachen und transienten Aktivierung der ERK 1/2 (extrazelluläre Signal-regulierte Kinase)-Signalwege fähig (Cebe Suarez et al., 2006) und wird daher als antiangiogenetische bzw. inhibitorische Spleißvariante des VEGF A beschrieben (Bates et al., 2002).

In der physiologischen Angiogenese spielt VEGF165b vor allem bei reproduktiven Prozessen eine Rolle und wird in vielen daran beteiligten Geweben exprimiert. Dabei scheint vor allem das Gleichgewicht zwischen den pro-sowie den antiangiogenetischen Isoformen eine wichtige Funktion in der Fertilitätskontrolle zu haben. Eine im Mausmodell induzierte ovarielle Überexpression von VEGF165b führte zu einer kleineren Wurfgröße und gestörter Follikelbildung (Qiu et al., 2009b, Qiu et al., 2009c). Wurde VEGF165b im Ovar durch neutralisierende Antikörper gehemmt, resultierte dies in einer Progression der Follikel, was gleichermaßen auch durch die Stimulation mit angiogenen Isoformen hervorgerufen werden konnte. Diese Beobachtung lässt eine regulierende Funktion des antiangiogenetischen VEGF auf die Follikelentwicklung vermuten (Artac et al., 2009).

Neben seiner Rolle in reproduktiven Prozessen kommt VEGF165b auch als Regulator der renalen Funktion und Filtration eine Bedeutung zu. VEGF165b wird in den Glomerula der Niere exprimiert und kann hier Einfluss auf die glomeruläre Permeabilität nehmen. Dies konnte bei Mäusen mit diabetischer Nephropathie gezeigt werden. Hier war VEGF165b durch Überexpression in der Lage die erhöhte Wasserdurchlässigkeit zu verringern (Ferguson et al., 2009).

In der pathologischen Angiogenese besitzt VEGF165b vor allem bei Neoplasien eine große Bedeutung. Im Gegensatz zu anderen VEGF-Isoformen wird VEGF165b bei einigen Tumorerkrankungen abreguliert. Dazu zählen Nierenzellkarzinome (Bates et al., 2002), Karzinome der Prostata (Woolard et al., 2004), des Kolons (Varey et al., 2008) und das maligne Melanom (Pritchard-Jones et al., 2007). *In vivo* Studien konnten in diesem Zusammenhang einen möglichen therapeutischen Nutzen von VEGF165b zeigen: Eine

induzierte Überexpression von VEGF165b führte zu einer Hemmung des Tumorwachstums in einigen der genannten Neoplasien und stellt somit einen interessanten Ansatz einer möglichen Tumorthherapie dar (Rennel et al., 2008).

Darüber hinaus findet bei anderen Erkrankungen, wie der diabetischen Retinopathie und der Präeklampsie eine veränderte Expression von VEGF-Spleißvarianten statt (Perrin et al., 2005, Bates et al., 2006). Bei Augenerkrankungen, die mit einer Neovaskularisierung assoziiert sind (diabetische Retinopathie, altersabhängige Makuladegeneration), kann VEGF165b therapeutisch genutzt werden. Es ist in der Lage die präretinale Gefäßneubildung signifikant zu reduzieren und hat dabei einen zytoprotektiven Effekt auf bereits existierende Retinazellen. Aus diesem Grund wird die physiologische intraretinale Neovaskularisierung nicht beeinträchtigt (Konopatskaya et al., 2006).

2.1.3 Regulation von VEGF

Die Expression von VEGF wird durch eine Vielzahl von Faktoren wie Hypoxie, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone und Onkogene beeinflusst.

Hypoxie ist ein wichtiger Regulationsfaktor für die Expression von VEGF. Durch einen Feedbackmechanismus wird bei reduzierter Sauerstoffversorgung des Gewebes die Bildung neuer Blutgefäße induziert (Shweiki et al., 1992). Die Regulation dieser durch Hypoxie vermittelten Expression von VEGF wird durch die Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren (HIF) gesteuert, welche die Transkription des VEGF-Gens steigern (Pugh und Ratcliffe, 2003, Forsythe et al., 1996). Zudem kommt es unter hypoxischen Zuständen zu einer Akkumulation von Adenosin, welches den A₂-Rezeptor aktiviert und dadurch die cAMP-Konzentrationen erhöht. Dies wiederum führt über einen Proteinkinase A-Signalweg zu gesteigerten VEGF-mRNA-Werten (Takagi et al., 1996), wobei diese auch auf einer erhöhten mRNA-Stabilität beruhen (Levy et al., 1998). Da im hypoxischen Zustand die Transkription der VEGF-mRNA sehr effizient stattfindet, kommt es trotz einer eigentlich verminderten Proteinsynthese zur Bildung einer großen Menge an VEGF (Banai et al., 1994).

Zytokine wie der epidermale Wachstumsfaktor, der transformierende Wachstumsfaktor-beta 1 (TGF-beta 1) und der Keratinozyten-Wachstumsfaktor fördern ebenfalls durch verschiedene Mechanismen die VEGF-Expression (Frank et al., 1995). Umgekehrt können die antiangiogenen Eigenschaften von Interferon alpha, zumindest teilweise, eine Hemmung der VEGF-Gen-Transkription vermitteln (von Marschall et al., 2003). An Zellkulturen konnte die Induktion der VEGF-Expression durch Prostaglandin E₂ und Interleukin-1 alpha gezeigt werden, was auf ein Mitwirken dieser Faktoren in der entzündlichen Angiogenese hinweist (Ben-Av et al., 1995). Auch Interleukin-6 (Cohen et al., 1996) und der insulinähnliche Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) (Warren et al., 1996) induzieren die VEGF-Expression, wobei IGF-1 ähnlich der Hypoxie eine zusätzliche VEGF-mRNA Stabilität bewirkt.

Auch Hormone agieren als wichtige Regulatoren der VEGF-Expression. Soh et al. (1996) konnten zeigen, dass das Thyreoidea-stimulierende Hormon die Sekretion von VEGF in Schilddrüsenkarzinomzelllinien steigert. Außerdem wurden sowohl das Adrenocorticotrope Hormon (Shifren et al., 1998) als auch die Gonadotropine als Induktoren für die VEGF-Expression identifiziert, wobei letztere die VEGF-Expression in Ovarien und Leydigzellen stimulieren (Ferrara et al., 1998, Christenson und Stouffer, 1997, Schwarzenbach et al., 2004).

Schließlich kann die VEGF-Expression als Folge onkogener Mutationen oder einer Amplifikation von ras, einem Protein, das bei der Tumorentstehung eine Rolle spielt, stattfinden (Okada et al., 1998).

2.1.4 VEGF-Rezeptoren

VEGF bindet im Organismus an zwei unterschiedliche Rezeptoren, den flt-1 (fms-ähnliche Tyrosinkinase 1, VEGFR-1)-Rezeptor (de Vries et al., 1992) und den flk-1/KDR (kinase-insert domain region, VEGFR-2)-Rezeptor (Terman et al., 1992). Obwohl VEGF A mit höchster Affinität an VEGFR-1 bindet (Abbildung 2) scheint der primäre Vermittler der angiogenen Aktivität des Wachstumsfaktors der VEGFR-2 zu sein (Robinson und Stringer, 2001, de Vries et al., 1992). VEGFR-1 besitzt zwei Isoformen, eine transmembranöse Form (flt-1) und eine lösliche Form (sFlt-1). Da die lösliche Form die extrazelluläre

Ligandenbindungsdomäne beinhaltet, bewirkt eine Bindung von VEGF an den sFlt-1-Rezeptor eine Inhibition des angiogenetischen Effektes, weil hierdurch die Bindung von freiem VEGF an VEGFR-2 verhindert wird (Kendall und Thomas, 1993, Kendall et al., 1996). Sowohl VEGFR-1 als auch VEGFR-2 besitzen sieben extrazelluläre Immunglobulin-Domänen, eine Transmembran-Domäne und eine Tyrosinkinase-Domäne (Shibuya et al., 1990, Matthews et al., 1991). Nach Rezeptorbindung durch VEGF wird intrazellulär eine Signalkaskade aktiviert, die zur Phosphorylierung verschiedener Proteine, die eine SH₂-Domäne (bestehend aus ca. 100 Aminosäuren) enthalten, führt. Darunter fallen die Phospholipase C gamma, GTPase-aktivierende Proteine, das onkogene Adapterprotein NcK und die Phosphatidylinositol-3-Kinase (Guo et al., 1995).

Vor einigen Jahren konnten Soker et al. (1998) einen weiteren VEGF-Rezeptor identifizieren, der VEGF₁₆₅, nicht aber VEGF₁₂₁ erkennt, da er im Unterschied zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen VEGF im Bereich von Exon 7 bindet. Dieser Isoform-spezifische Rezeptor ist identisch mit Neuropilin-1 aus der Familie der Neuropiline, die schon seit längerem als Membranprotein (Semaphorin-)-Rezeptoren bekannt sind und eine Rolle bei der Axon-Führung in der Neuronalentwicklung spielen (Fujisawa und Kitsukawa, 1998). Wird Neuropilin-1 zusammen mit VEGFR-2 in Zellen exprimiert, fungiert er als Co-Rezeptor für VEGF₁₆₅ und verstärkt sowohl die Bindung an den KDR als auch die VEGF₁₆₅-vermittelte Chemotaxis (Soker et al., 1998).

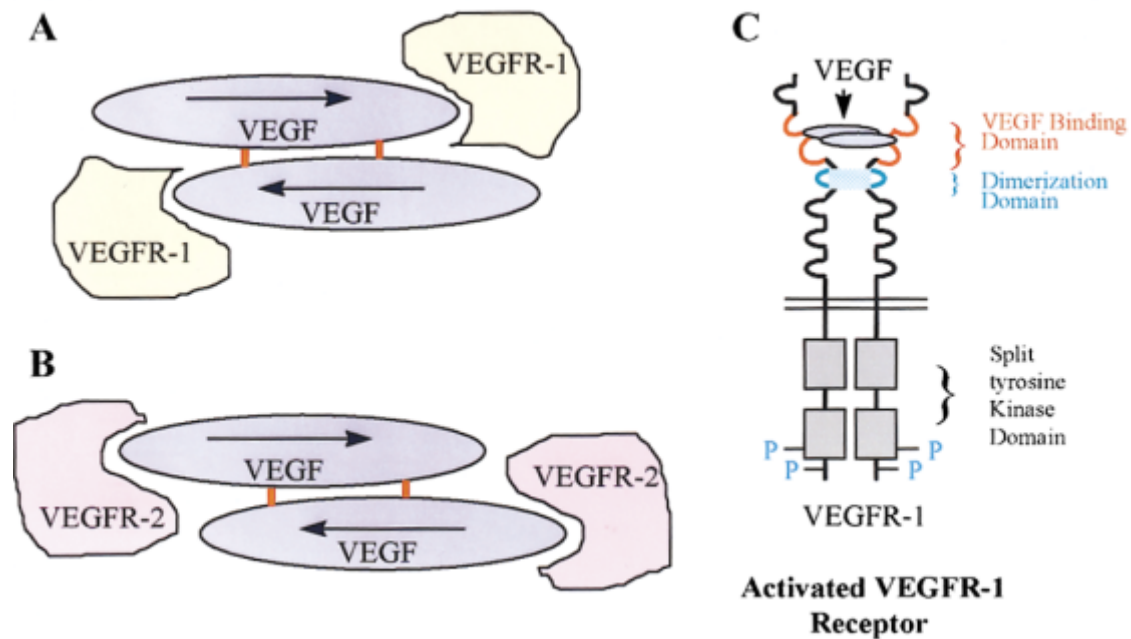


Abbildung 2: Interaktion von VEGF mit Tyrosinkinase-Rezeptoren (Neufeld et al., 1999)

Die zwei VEGF Monomere werden in einer head-to-tail-Orientierung, welche durch den Pfeil angedeutet ist, dargestellt und durch Disulfidbrücken (orange) zusammengehalten. Die Hauptbindungsstelle, die von VEGFR-1 gebunden wird, ist an einem Ende des VEGF-Monomers lokalisiert (A); die von VEGFR-2 liegt am entgegengesetzten Pol (B), wobei sich die Bindungsstellen überlappen. Die zwei VEGFR-1 Rezeptoren formen ein Dimer, welches durch Tyrosinreste, die im zytoplasmatischen Teil des VEGFR-1 Rezeptors lokalisiert sind (P), autophosphoryliert wird. Dies leitet die Signaltransduktion ein. Das Dimer wird durch die Interaktion des VEGFR-1 Rezeptors mit einem gemeinsamen VEGF-Dimer zusammengehalten und durch Interaktionen zwischen Aminosäuren, die an der Loop 4 Dimersierungsdomäne lokalisiert sind, stabilisiert (C) (Neufeld et al., 1999).

2.1.4.1 Regulation der Rezeptor-Expression

Wie bei der Regulation von VEGF wird auch die Expression der VEGF-Rezeptoren durch Hypoxie beeinflusst, jedoch in geringerem Ausmaß. Unter hypoxischen Zuständen wird die Transkription von *flt-1*, nicht aber die von *KDR* gesteigert. Diese nimmt zwar ebenfalls zu, der zugrunde liegende Mechanismus scheint aber posttranskriptionalen Ursprungs zu sein (Waltenberger et al., 1996, Gerber et al., 1997). Auch VEGF selbst besitzt einen regulatorischen Einfluss auf die Rezeptor-Expression und ist in der Lage sowohl *flt-1* als auch *sFlt-1* in der Zellkultur hochzuregulieren (Barleon et al., 1997). Die Mitogene Tumornekrosefaktor-alpha (Patterson et al., 1996) und TGF-beta 1 (Mandriota et al., 1996) führen zur Inhibition der Expression des VEGFR-2.

2.1.5 Biologische Aktivität von VEGF

Angiogenese und Lymphangiogenese

VEGF zeigt verschiedene biologische Aktivitäten und besitzt als Regulator der Angiogenese *in vitro* die Fähigkeit direkt mit Endothelzellen zu interagieren und deren Wachstum in Arterien, Venen und Lymphgefäßen zu stimulieren (Ferrara und Davis-Smyth, 1997, Connolly et al., 1989). Auch *in vivo* hat VEGF eine proangiogenetische Aktivität, was an mehreren Modellen gezeigt werden konnte: Die Applikation von VEGF in die Kornea von Kaninchen führte zu einer Neovaskularisation (Phillips et al., 1994) und auch in der Iris von Primaten (Tolentino et al., 1996) ruft VEGF eine Neubildung von Gefäßen hervor. Zusätzlich zur angiogenetischen Aktivität konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass der Wachstumsfaktor auch in der Lage ist die Lymphangiogenese in der Maus zu induzieren. Dabei wurde beobachtet, dass im Gegensatz zur Angiogenese die neu gebildeten Lymphgefäße nicht VEGF-abhängig sind und auch nach Beendigung der VEGF-Expression bestehen bleiben. Daraus resultieren stark vergrößerte Lymphgefäße ohne nennenswerte Funktion, die dauerhaft vorhanden sind (Nagy et al., 2002).

Überlebensfaktor für Endothelzellen

VEGF wirkt nicht nur als Aktivator auf Endothelzellen, sondern auch als Überlebensfaktor für diese und trägt so zur Aufrechterhaltung neu gebildeter Blutgefäße bei. So führt eine Unterdrückung von VEGF in der sich entwickelnden Retina zu einer Rückbildung der Blutgefäße und auch im Tumorgewebe kann durch die Gabe monoklonaler anti-VEGF Antikörper ein Rückgang des Gefäßsystems beobachtet werden (Yuan et al., 1996, Alon et al., 1995). Gerber et al. (1998b) konnten zeigen, dass diese antiapoptotische Wirkung von VEGF über einen Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweg vermittelt wird und mit der Expression antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2, A1 (Gerber et al., 1998a), XIAP und Survivin (Tran et al., 1999) einhergeht.

Erhöhung der vaskulären Permeabilität

Ursprünglich wurde VEGF als vaskulärer Permeabilitätsfaktor bezeichnet, da er in der Lage ist die Permeabilität für Plasmaproteine zu erhöhen und dadurch bei entzündlichen Prozessen eine wichtige Rolle spielt (Senger et al., 1983). Außerdem kann VEGF eine

endotheliale Fenestration in Endothelzellen hervorrufen, was wiederum zu erhöhter vaskulärer Permeabilität führt (Roberts und Palade, 1995). Diese durch VEGF hervorgerufene Hyperpermeabilität wird vor allem über den VEGFR-1 Rezeptor vermittelt, was durch selektive Hemmung von VEGFR-2 gezeigt werden konnte (Whittles et al., 2002). Dabei spielt Stickstoffmonoxid (NO) eine Rolle, indem es die Proliferation und Migration endothelialer Zellen stimuliert und die durch VEGF hervorgerufenen Effekte an postkapillären Endothelzellen verstärkt. Wird NO inhibiert, wird auch der mitogene Effekt von VEGF auf Endothelzellen verhindert (Morbidelli et al., 1996).

Hämodynamische Effekte

Wie andere angiogene Faktoren kann VEGF hämodynamische Effekte hervorrufen. Eine Applikation von VEGF führt *in vitro* zu einer dosisabhängigen Vasodilatation (Ku et al., 1993) und intravenös in Ratten injiziert zu Hypotension, transienter Tachykardie und einer verringerten kardialen Auswurfleistung. Dies beruht auf einer NO-vermittelten Reduktion des venösen Rückstroms (Yang et al., 1996).

Effekte auf Blutzellen

VEGF kann in verschiedener Weise auf Zellen des Blutes einwirken. Zu diesen zählen unter anderem Monozyten, die durch VEGF zur Chemotaxis angeregt werden. Dieser Mechanismus könnte das Vorhandensein aktivierter Makrophagen in Tumoren erklären (Clauss et al., 1990). VEGF wirkt hämatopoetisch auf Knochenmarkszellen, rekrutiert Stammzellen (Hattori et al., 2001) und bewirkt eine Koloniebildung von Granulozyten-Makrophagen-Progenitorzellen (Broxmeyer et al., 1995). Außerdem wurde berichtet, dass VEGF einen hemmenden Effekt auf die Entwicklung dendritischer Zellen haben kann (Gabilovich et al., 1996).

2.2 VEGF in Gesundheit und Krankheit

VEGF besitzt eine große Bedeutung als Regulator der Angiogenese und Vaskulogenese und spielt somit sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen eine wichtige Rolle. Als Vaskulogenese wird die Bildung neuer Blutgefäße aus endothelialen Vorläuferzellen, welche im Knochenmark gebildet werden, bezeichnet.

Diese Form der Blutgefäßbildung findet vor allem in der embryonalen Entwicklung statt. Im erwachsenen Organismus steht die Angiogenese im Vordergrund. Diese bezeichnet das Wachstum kleiner Blutgefäße (Kapillaren), die überwiegend durch Sprossung und Invagination aus einem vorgebildeten Kapillarsystem entstehen (Joussen et al., 2003). Die Entwicklung eines Gefäßsystems ist sowohl essentiell für die Wundheilung als auch für reproduktive Funktionen und die Aufrechterhaltung der Gefäßhomöostase im adulten Organismus. Eine beeinträchtigte Gefäßfunktion, die aus Defekten der VEGF-Liganden oder ihrer Rezeptoren resultiert, wird mit als Ursache vieler Krankheiten gesehen. Dazu zählen beispielsweise Arteriosklerose, diabetische Retinopathie, Psoriasis, Arthritis, malignes Zellwachstum, neurodegenerative Erkrankungen und Präeklampsie (Ferrara, 2004).

2.2.1 Die Rolle von VEGF in der physiologischen Angiogenese

Für eine Vielzahl physiologischer Prozesse ist die Proliferation von Blutgefäßen entscheidend. Sie hat große Bedeutung in der Embryonalentwicklung, im normalen Wachstum und Differenzierung, in der Wundheilung sowie in reproduktiven Funktionen.

Bereits in der Embryonalentwicklung spielt VEGF eine Schlüsselrolle, schon der Verlust eines einzigen VEGF-Allels führt zu embryonaler Letalität (Carmeliet et al., 1996). Die VEGF-Expression kann innerhalb der ersten Tage nach Implantation in den Riesenzellen der Trophoblasten nachgewiesen werden. In späteren Entwicklungsstadien wird die VEGF-mRNA in verschiedenen Organen wie Herz, Wirbelsäule, Niere und entlang der Oberfläche des Rückenmarks und des Gehirns exprimiert (Jakeman et al., 1993, Breier et al., 1992). Das VEGF Protein wird dabei von fetalen Epithelzellen und Myocyten, nicht aber von vaskulären Endothelzellen ausgeschüttet. Dies konnte in immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt werden (Shifren et al., 1994). Auch in der postnatalen Entwicklung ist VEGF essentiell, was in einer Studie an neugeborenen Mäusen gezeigt werden konnte. Die Inaktivierung des Wachstumsfaktors führte zu Wachstumsstörungen, abnormer Organentwicklung und Letalität (Gerber et al., 1999a).

VEGF ist ein Vermittler des in weiblichen Fortpflanzungsorganen stattfindenden zyklischen Wachstums von Blutgefäßen. Studien haben gezeigt, dass die VEGF-mRNA

zeitlich und räumlich mit der Proliferation von Blutgefäßen in den Eierstöcken von Ratten und Primaten im Zusammenhang steht (Phillips et al., 1990, Ravindranath et al., 1992, Cullinan-Bove und Koos, 1993, Shweiki et al., 1993). Tatsächlich wurde als Erstes in Studien zu in situ-Hybridisierung bei Eierstöcken von Ratten bewiesen, dass VEGF ein Regulator physiologischer Angiogenese sein kann (Phillips et al., 1990). Follikelwachstum und Gelbkörperbildung können nur stattfinden, wenn neue Kapillargefäße gebildet werden, weshalb die Angiogenese ein wichtiger Aspekt der normalen ovariellen zyklischen Funktion darstellt (Ferrara, 2004, Ferrara et al., 1998).

Im adulten Organismus ist eine VEGF-Expression auch um Mikrogefäße herum in Regionen nachweisbar, in denen Endothelzellen normalerweise untätig sind, wie in den Glomeruli der Nieren, der Hypophyse, in Herz, Lunge und Gehirn (Ferrara et al., 1992, Monacci et al., 1993, Brown et al., 1992). Diese Erkenntnis ließ vermuten, dass VEGF nicht nur für die Induktion aktiver vaskulärer Proliferation benötigt wird, sondern unter Umständen auch für die Aufrechterhaltung des differenzierten Zustands der Blutgefäße (Ferrara et al., 1992). Diese Hypothese belegten Alon et al. (1995), die zeigten, dass VEGF zumindest für die sich entwickelnden retinalen Gefäße als Überlebensfaktor fungiert. Sie nahmen an, dass durch Hyperoxie hervorgerufene vaskuläre Regression in der Retina neonataler Tiere eine Folge der unterdrückten VEGF-Produktion durch die Gliazellen darstellt. Die intraokuläre VEGF-Verabreichung an neugeborene Ratten zu Beginn der Hyperoxie konnte Apoptose und Regression der retinalen Gefäße verhindern (Alon et al., 1995).

VEGF ist auch am Prozess der Wundheilung beteiligt und wird in einer heilenden Wunde von Keratinozyten exprimiert. Im Gegensatz dazu konnte in der Haut von genetisch diabetischen Mäusen eine verminderte Expression von VEGF-mRNA beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass eine veränderte Regulation der VEGF-Genexpression zu defekter Angiogenese und Wundheilungsstörungen führt, die charakteristisch für eine Diabetes-Erkrankung sind (Frank et al., 1995).

Auch im Prozess des Skelettwachstums und der enchondralen Knochenbildung ist VEGF involviert. Über die Bildung metaphysärer Blutgefäße wird ein gerichtetes Knochenwachstum sowie das Eindringen von Knorpel vermittelt. Wird dabei die chondrozytäre Expression von VEGF-mRNA in der Epiphysenfuge unterdrückt, wird auch

die Blutgefäßbildung fast vollständig inhibiert was in einer eingeschränkten Knochenbildung und reduziertem Längenwachstum resultiert (Gerber et al., 1999b).

2.2.2 Die Rolle von VEGF in der pathologischen Angiogenese

VEGF spielt auch unter pathologischen Bedingungen wie bei Tumoren, inflammatorischen Erkrankungen und neovaskulären Syndromen wie der diabetischen Retinopathie und der altersabhängigen Makuladegeneration eine wichtige Rolle. Im Rahmen der Forschung wird in diesem Zusammenhang an der Entwicklung neuer Therapien zur Behandlung dieser Erkrankungen gearbeitet.

Als Regulator der Angiogenese hat VEGF im Tumorwachstum, das durch eine exzessive Angiogenese gekennzeichnet ist, eine große Bedeutung und gilt als ein Vermittler der pathologischen Gefäßbildung. Ihm wird außerdem eine Rolle in der abnormen Gefäßpermeabilität im tumorösen Gefäßsystem zugesprochen, was zum Austritt von Fibrin und Plasmaproteinen führt, das wiederum als Substrat für sowohl Tumor- als auch Endothelzellwachstum dient (Ferrara et al., 1992, Senger et al., 1983). VEGF-mRNA konnte in den meisten der bis jetzt untersuchten Tumoren nachgewiesen werden und wird unter anderem von Karzinomen der Lunge (Volm et al., 1997), der Leber (Suzuki et al., 1996), des Gastrointestinaltrakts (Brown et al., 1993), der Mammae (Brown et al., 1995) und des Endometriums (Guidi et al., 1996) exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung von VEGF zur Unterdrückung des Tumorwachstums *in vivo* führt (Kim et al., 1993). Diese Tatsache bietet einen interessanten Ansatzpunkt für Therapiestrategien bei Krebserkrankungen, die sich meist auf die Blockade des VEGF konzentrieren.

Auch bei nicht malignen Erkrankungen, wie der altersabhängigen Makuladegeneration, die in den Industrieländern die häufigste Erblindungsursache darstellt, kommt dem Wachstumsfaktor eine zentrale Rolle zu. Bei dieser progredient und multifaktoriell verlaufenden Erkrankung kommt es zur kapillaren Gefäßeinsprossung in die Netzhaut mit nachfolgender Ödembildung und Netzhautablösung. Studien konnten zeigen, dass im Rahmen der altersabhängigen Makuladegeneration eine gesteigerte Expression von VEGF stattfindet und eine Inhibition des Wachstumsfaktors den Visusverlust verhindern und in

manchen Fällen sogar eine Sehverbesserung hervorrufen kann (Finger et al., 2007, Kvanta et al., 1996).

Im Rahmen einer Erkrankung an Diabetes führt die diabetische Retinopathie ebenfalls zu einem Verlust der Sehkraft, wobei hier die Entstehung des Makulaödems Ursache des Visusverlustes ist. Durch eine vorangegangene retinale Ischämie, die auch Folge eines Verschlusses der Zentralvene der Retina sein kann, kommt es nachfolgend zu einer retinalen Neovaskularisation, die zu Hämorrhagie, Netzhautablösung, Glaukom und Blindheit führen kann. Dabei können erhöhte intraokulare Werte von VEGF gemessen werden und Tierversuche bestätigten, dass bei einer Blockade von VEGF die intraokuläre Neovaskularisation gehemmt werden kann (Aiello et al., 1994, Aiello et al., 1995). Im Gegensatz dazu kann durch Applikation von exogenem VEGF an Primaten eine retinale Ischämie und vaskuläre Hyperpermeabilität hervorgerufen werden, was einen Zusammenhang zwischen VEGF und intraokularer Neovaskularisation bestätigt (Tolentino et al., 1996).

Auch im Verlauf einiger inflammatorischer Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis oder der Psoriasis spielt Angiogenese eine bedeutende Rolle und es können erhöhte VEGF-Konzentrationen nachgewiesen werden. Bei der Psoriasis kommt es wie auch bei der Wundheilung zu einer erhöhten mikrovaskulären Permeabilität und einer gesteigerten Expression von VEGF durch Keratinozyten (Detmar et al., 1995). Eine Behandlung mit Antikörpern gegen VEGF führt zu einer deutlichen Reduktion der bestehenden Hautentzündung (Schonthaler et al., 2009). Die rheumatoide Arthritis geht mit einer proliferativen Synovitis einher und sowohl im Serum als auch in der Synovialflüssigkeit finden sich erhöhte VEGF-Spiegel, die mit der Aktivität der Erkrankung korrelieren (Sone et al., 2001, Fava et al., 1994).

Die Ausführungen zeigen, dass dem Protein VEGF sowohl im Rahmen der physiologischen als auch der pathologischen Angiogenese eine entscheidende Funktion zukommt.

2.3 VEGF in der Schwangerschaft

2.3.1 VEGF in der physiologischen Schwangerschaft

Als Regulatoren der Vaskulo- und Angiogenese kommen Wachstumsfaktoren eine entscheidende Bedeutung bei der Entstehung sowie Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft zu. In der physiologischen Schwangerschaft wird für eine erfolgreiche Implantation und Plazentation die Beteiligung von mindestens drei zeitlich aufeinander folgenden vaskulären Prozessen angenommen: Zum Zeitpunkt der Implantation findet eine adäquate uterine Gefäßentwicklung statt, danach entwickelt sich das Gefäßsystem der Zotten und zuletzt erfolgt ein Umbau des maternal-uterinen Blutkreislaufs an der fetomaternalen Austauschfläche (Torry et al., 2004). Dabei kommt es sowohl auf der maternalen als auch auf der fetalen Seite zu einer massiven Gefäßneubildung, die von einem merklichen Anstieg des uterinen und umbilikalen Blutflusses begleitet wird (Reynolds und Redmer, 2001). VEGF ist hier als autokriner/parokriner Faktor von Bedeutung und regt das Gefäßwachstum an (Geva et al., 2002). Kommt es in diesem Prozess zu Störungen der uterinen Blutzufuhr, kann dies zu Schwangerschaftskomplikationen wie der Präeklampsie oder der intrauterinen Wachstumsretardierung führen (Zygmunt et al., 2003). VEGF konnte als eines der am frühesten aktivierten Gene während der Präimplantation identifiziert werden und spielt bei der Implantation und Entwicklung des Embryos eine Rolle (Krüssel et al., 2003). Außerdem scheint VEGF regulierend an der Entstehung sowie Invasion des Trophoblasten beteiligt zu sein (Wulff et al., 2002). Eine Expression von VEGF findet sowohl in den Endothelien, im villösen Trophoblasten, den Hofbauer-Zellen, im Stroma der Zotten als auch in den maternalen Makrophagen der Dezidua statt. Bereits ab Tag 30 nach einem Embryotransfer kann eine Zunahme der VEGF-Konzentration im mütterlichen Plasma nachgewiesen werden (Clark et al., 1998b, Evans et al., 1998, Jackson et al., 1994). Dabei spielt Sauerstoffmangel eine entscheidende Rolle für die Freisetzung der Angiogenese-Faktoren ins umliegende Gewebe (Levy et al., 1996). So kommt es durch den geringen Sauerstoffpartialdruck während der Frühschwangerschaft zu einem Anstieg der VEGF-Produktion, welche wiederum die aktive Angiogenese, die in der Plazenta stattfindet, aufrechterhält und unterstützt (Charnock-Jones, 2002). Welche essentielle Bedeutung VEGF für die proliferativen Prozesse im Uterus und damit für die Schwangerschaft

zukommt, machten Versuche mit VEGF-genmanipulierten Tieren deutlich. Sie zeigten, dass keine intakte Trächtigkeit möglich war, wenn nur ein einziges VEGF-Allel deletiert wurde (Carmeliet et al., 1996). Auch bei der Deckung des Bedarfs des Feten an Sauerstoff und Nährstoffen während der frühen Schwangerschaft spielt VEGF eine Rolle, da es als Gefäßpermeabilitätsfaktor die fetomaternale Diffusion ermöglicht (Rowe et al., 2003).

Die Ausführungen zeigen, dass Angiogenese und damit auch VEGF für eine erfolgreiche Implantation und Plazentation notwendig sind und mehrere vaskuläre Prozesse aufeinander folgen müssen, um einen Schwangerschaftsverlauf möglich zu machen.

2.3.2 Diabetes mellitus

„Diabetes mellitus ist der Sammelbegriff für heterogene Störungen des Stoffwechsels, deren Leitbefund die chronische Hyperglykämie ist. Ursache ist entweder eine gestörte Insulinsekretion oder eine gestörte Insulinwirkung oder auch beides“ (Kerner und Brückel, 2013).

Die Amerikanische Diabetes Gesellschaft (ADA) teilt die Erkrankung in vier Typen unterschiedlicher Genese ein (ADA, 2008):

- Diabetes mellitus Typ I (DM I): Resultiert aus einer Zerstörung der Beta-Zellen des Pankreas, die zu absolutem Insulinmangel führt.
- Diabetes mellitus Typ II (DM II): Es liegt ursächlich eine Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel vor.
- Diabetes mellitus Typ III (DM III): Andere spezifische Diabetes-Typen, z.B. genetische Defekte der Beta-Zellfunktion oder Insulinausschüttung, Krankheiten des exokrinen Pankreas, durch Medikamente oder chemisch induziert.
- Gestationsdiabetes (GDM): Diabetes, der während der Schwangerschaft diagnostiziert wird.

2.3.2.1 Diabetes mellitus Typ I

Beim DM I liegt ein meist immunologisch vermittelter absoluter Insulinmangel vor (Kerner und Brückel, 2013). Dieser ist Folge einer progressiven Zerstörung der Beta-Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas, die für die Insulinproduktion zuständig sind. Das begleitende Insulinmangelsyndrom äußert sich klinisch durch Polyurie, Polydipsie, Ketoazidose und Gewichtsverlust (Böhm et al., 2011). In den meisten Fällen tritt der Typ-1-Diabetes im Kinder- und Jugendalter auf, wobei auch eine Manifestation in höheren Lebensaltern möglich ist. Der Krankheitsbeginn äußert sich meist durch plötzlich einsetzende Symptome. Bei 15 - 25% der Patienten mit schweren ketoazidotischen Stoffwechsellagen wird am Beginn der Erkrankung ein sogenanntes Manifestationskoma beobachtet (Böhm et al., 2011, Johnson et al., 1980). Die Therapie des DM I besteht aus verschiedenen Komponenten, zu denen von der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) Insulintherapie, Ernährung, Schulung und psychosoziale Betreuung gezählt werden. Die Zufuhr exogenen Insulins ist bei allen Patienten mit DM I „immer und lebenslang“ indiziert (Böhm et al., 2011). Patienten mit nicht oder unzureichend behandeltem DM I haben ein hohes Risiko mikroangiopathische (Retinopathie, Nephropathie) und andere diabetesassoziierte Folgeerkrankungen (Neuropathie, beschleunigte Makroangiopathie) zu entwickeln. Außerdem können schwere Stoffwechsellagen auftreten, die mit Hypo- oder Hyerglykämie einhergehen und zur Ketoazidose oder zum Coma diabeticum führen können (Böhm et al., 2011).

Innerhalb des DM I kann zwischen zwei Subtypen unterschieden werden, der immunologisch vermittelten Form (Typ 1a) und der idiopathischen Form (Typ 1b) (Böhm et al., 2011).

Typ-1a-Diabetes

Beim Typ-1a-Diabetes ist eine chronische, immunvermittelte Erkrankung die Ursache für die Zerstörung der Beta-Zellen (Böhm et al., 2011). Dieser Diabetes-Typ kann durch serologische Marker wie Inselzellantikörper, Insulinautoantikörper, Autoantikörper gegen die Glutamat-Decarboxylase der Beta-Zelle und Autoantikörper gegen die Tyrosinphosphatase IA-2, sowie Autoantikörper gegen den Zink Transporter 8 der Beta-Zelle nachgewiesen werden (Bottazzo et al., 1974, Palmer et al., 1983, Wiest-Ladenburger et al., 1997, Bingley et al., 2003, Torn et al., 2008, Schlosser et al., 2010). Eine

prädisponierende Rolle für die Entwicklung eines Typ-1a-Diabetes spielen genetische Faktoren (Cordell und Todd, 1995). Auch der sogenannte latent insulinpflichtige Diabetes mellitus, der sich im Erwachsenenalter manifestiert, wird gemäß Klassifikation der ADA dem Typ-1a-Diabetes zugeordnet (ADA, 1997).

Typ-1b-Diabetes

Dem Typ-1b-Diabetes liegt keine ätiopathogenetische Ursache für die Zerstörung der Beta-Zellen zugrunde und es können keine Marker eines Autoimmunprozesses identifiziert werden. Diese nichtimmunogene Diabetesform wird vererbt und als idiopathischer Typ-1-Diabetes bezeichnet (Böhm et al., 2011). Bei einigen Patienten mit Typ-1b-Diabetes besteht ein permanenter Insulinmangel. Diese Patientengruppe neigt dazu eine Ketoazidose zu entwickeln (Imagawa et al., 2000).

2.3.2.2 Diabetes mellitus Typ II

Beim DM II handelt es sich um eine chronisch fortschreitende Erkrankung, bei der eine Insulinresistenz in Verbindung mit eher relativem als absolutem Insulinmangel vorliegt (BÄK, KBV und AWMF, 2013, Matthaer et al., 2011). Dieser Diabetes-Typ manifestiert sich meist im Erwachsenenalter und stellt mit 90 - 95% aller auftretenden Fälle die am häufigsten vorkommende Diabetes-Form dar. Als Risikofaktoren für die Entwicklung eines DM II gelten neben der genetischen Disposition unter anderem Übergewicht, Bewegungsmangel und falsche Ernährung (BÄK, KBV und AWMF, 2013). Die Diagnosestellung erfolgt meist zufällig – klassische Symptome wie beim DM I sind eher selten (Matthaer et al., 2011). Da im Gegensatz zum DM I keine autoimmune Zerstörung der Beta-Zellen stattfindet, reichen zur Therapie oftmals Diät, Bewegung und orale Antidiabetika aus. Auch kommt es nur selten zu akuten Stoffwechsellentgleisungen, dafür ist die Entwicklung schwerer Mikro- und Makroangiopathien sowie Neuropathien häufig und über 80% der Patienten entwickeln eine arterielle Hypertonie (BÄK, KBV und AWMF, 2013). In vielen Fällen wird ein DM II von einem metabolischen Syndrom begleitet, das die Symptome abdominale Adipositas, Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, gestörte Glukosetoleranz, Dyslipoproteinämie, Albuminurie und Hypertonie umfasst (BÄK, KBV und AWMF, 2013).

2.3.2.3 Gestationsdiabetes

Beim GDM handelt es sich laut DDG um „eine Glukosetoleranzstörung, die erstmals in der Schwangerschaft mit einem 75g oralen Glukosetoleranztest (oGTT) unter standardisierten Bedingungen und qualitätsgesicherter Glukosemessung aus venösem Plasma diagnostiziert wird. Die Diagnose ist auch bereits mit einem erhöhten Glukosewert möglich“ (Kleinwechter et al., 2012).

Angaben zur Prävalenz dieser Erkrankung variieren in der Literatur. In Deutschland zeigt die Prävalenz in den letzten Jahren einen leichten Anstieg: Während im Jahr 2010 laut Perinatalstatistik 3,7% aller Schwangeren von einem GDM betroffen waren, waren es im darauffolgenden Jahr 4,4%. Damit zählt diese Erkrankung zu den häufigsten Schwangerschaftskomplikationen (Kleinwechter et al., 2012).

Obwohl es in den meisten Fällen nach der Entbindung zu einer Normalisierung des Stoffwechsels kommt, lässt die Definition des GDM offen, ob der Zustand nach der Schwangerschaft weiter anhält. Außerdem wird nicht ausgeschlossen, dass eine unbemerkte Glukoseintoleranz der Schwangerschaft schon vorausgegangen ist oder gleichzeitig mit ihr begonnen hat (ADA, 2008).

Bei den betroffenen Frauen liegt eine chronische Funktionsstörung vor, „die durch zunehmende Insulinresistenz mit abfallender Beta-Zell-Kompensation gekennzeichnet ist“. Die Pathogenese gleicht zum großen Teil der des DM II (Kleinwechter et al., 2012). Auch normal verlaufende Schwangerschaften gehen mit einer progressiven Insulinresistenz einher, welche meist in der Mitte der Schwangerschaft beginnt und gegen Ende ein ähnliches Niveau wie bei Patienten mit DM II erreicht. Diese wird sowohl durch die mütterliche Gewichtszunahme als auch durch die vermehrte Bildung von antiinsulinären Hormonen durch die Plazenta hervorgerufen (Buchanan und Xiang, 2005). Im Falle eines GDM liegt gleichzeitig ein Insulinsekretionsdefekt vor, weshalb der vermehrte Bedarf an Insulin nicht gedeckt werden kann und es in der Folge zu einer Hyperglykämie kommt (Kautzky-Willer et al., 1997).

Der GDM kann nur durch ein Glukosetesting als Routine-Maßnahme in der Schwangerschaft entdeckt werden (Xiang et al., 2010). Dieses sollte zwischen der 24. und

28. Schwangerschaftswoche (SSW) durchgeführt werden, da der Test vor der 20. SSW wenig Aussagekraft besitzt (Jovanovic und Peterson, 1985) und ein Therapiebeginn nach der 32. SSW geringeren Einfluss auf den weiteren Verlauf der Schwangerschaft hat (Lin et al., 1986). Als Goldstandard gilt der orale Glukosetoleranztest (75g-Test, oGTT), vereinzelt wird auch der 50g-Glucose-Challenge-Test (GCT) angewendet (Kleinwechter et al., 2012). Die Durchführung dieser Tests wird im Abschnitt 3.3.1.1.1 und 3.3.1.1.2 näher beschrieben.

Die Therapie des GDM beruht zum einen auf diätetischer Behandlung mit definierten Mengen an Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten und zum anderen auf einem Bewegungsprogramm, was diätunterstützend die Blutzuckerspiegel bei Gestationsdiabetikerinnen senken kann (Jovanovic-Peterson et al., 1989, Jovanovic-Peterson und Peterson, 1992, Kleinwechter et al., 2012). Ist eine Erreichung der Stoffwechselziele durch diese Maßnahmen nicht möglich und kommt es weiterhin mehrfach zu einer Überschreitung der Zielwerte für die Blutzuckermessung, sollte eine Therapie mit Insulin eingeleitet werden. Ob ein Bedarf für eine Insulintherapie besteht, sollte innerhalb der ersten zwei Wochen nach Diagnosestellung evaluiert werden (Kleinwechter et al., 2012). Orale Antidiabetika und GLP-1-Analoga, die zur Therapie des DM II eingesetzt werden, sollten aufgrund fehlender Zulassung, Erfahrung und Studien nicht bei Schwangeren angewendet werden (Kleinwechter et al., 2012).

Neben der Blutzuckerselbstkontrolle und einer systematischen Urinketonmessung wird in der neuen Leitlinie zur Therapie des GDM auch das fetale Wachstum (der fetale Abdominalumfang) berücksichtigt. Hierdurch sollen Feten mit Hyperinsulinismus identifiziert und die Therapie entsprechend angepasst werden (Kleinwechter et al., 2012).

Schwangerschaften, in denen ein GDM auftritt, sind oftmals mit Komplikationen und erhöhter fetaler Morbidität und Mortalität assoziiert. Der zugrunde liegende pathologische Metabolismus beruht auf maternaler Hyperglykämie, dadurch gesteigerter Stimulierung der fetalen Insulinsekretion sowie Einlagerung von Glykogen und Fett. Dies führt zu Makrosomie und Zunahme des Bauchumfangs sowie zu reduzierter fetaler Surfactantbildung. Daraufhin entwickelt der Fetus infolge des erhöhten Sauerstoffbedarfs eine Polyglobulie. Postnatal können im Rahmen dieser Stoffwechselstörung Hypoglykämie, Atemstörungen, Polyglobulie, Hypokalzämie, Hypomagnesiämie,

Hyperbilirubinämie und sehr selten eine Nierenvenenthrombose auftreten. Außerdem besitzen sowohl die Mutter als auch das Kind ein erhöhtes Langzeitrisiko einen manifesten Diabetes zu entwickeln (Kleinwechter et al., 2012).

2.3.2.3.1 Einteilung des Diabetes mellitus in der Schwangerschaft

Ein in der Schwangerschaft diagnostizierter Diabetes wird nach bestimmten Kriterien eingeteilt (Tabelle 1). Dies dient der besseren Einschätzung von Therapie und Behandlungsaufwand. Die Klassifikation erfolgt nach dem Schema der amerikanischen Diabetologin Priscilla White und richtet sich nach Manifestationsalter, Diabetesdauer sowie Vorliegen arteriosklerotischer vaskulärer Folgeerkrankungen und renaler Komplikationen (White, 1978).

Tabelle 1: Klassifikation des Diabetes in der Schwangerschaft nach White (1978)

White A	Nicht insulinpflichtiger, diätetisch eingestellter Diabetes
White B	Diabetes-Manifestation ≥ 20 . Lebensjahr oder Dauer ≤ 10 Jahre; keine vaskulären Läsionen
White C	Diabetes-Manifestation 10.– 19. Lebensjahr oder Dauer 10-19 Jahre; keine vaskulären Läsionen
White D	Diabetes-Manifestation ≤ 10 . Lebensjahr oder Dauer ≥ 20 Jahre, oder Arteriosklerose großer Beingefäße oder Hypertonie oder benigne Retinopathie
White E	Arteriosklerose pelviner Arterien
White F	Nephropathie

2.3.2.4 Diabetes und VEGF

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass akute und chronische Hyperglykämien zu einer endothelialen Dysfunktion führen (Han et al., 2005, Sogawa et al., 2010). Da VEGF spezifisch auf Endothelzellen wirkt (Ferrara und Henzel, 1989), ist es

in diesem Zusammenhang sehr interessant zu untersuchen inwieweit VEGF hierbei eine Rolle spielt.

Die endotheliale Dysfunktion tritt als erstes Anzeichen einer diabetesassoziierten Gefäßerkrankung auf. Das gesunde Endothel ist in der Lage auf vermehrten Blutstrom durch die Abgabe vasodilatatorischer Substanzen zu reagieren. Dieser Adaptationsmechanismus des Endothels wird hauptsächlich durch die Synthese von NO durch die endotheliale NO-Synthase sowie durch Bildung von Prostazyklin vermittelt. Bei Patienten mit Diabetes mellitus ist diese Funktion abgeschwächt. Die mit pathophysiologischen Veränderungen verbundene Funktionseinschränkung des Endothels wird als endotheliale Dysfunktion bezeichnet. Sie gilt als Frühform der Arteriosklerose (Rask-Madsen und King, 2007).

Außerdem beeinflusst eine diabetische Stoffwechsellage die Angiogenese und prädisponiert zu diabetesspezifischen Gefäßerkrankungen im Rahmen der Mikro- und Makroangiopathie. Dabei betreffen mikrovaskuläre Folgeerkrankungen vorwiegend Retina und Niere und können in der Folge zu Sehinderung bis hin zur Erblindung sowie zur Niereninsuffizienz führen (Janka, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass hohe Glukosewerte im Blut über die Induktion einer Hypoxie in der Retina eine vermehrte Produktion von VEGF A bewirken. Dies führt zu überschießender Angiogenese mit nachfolgender Visuseinschränkung, einer typischen Veränderung der diabetischen Retinopathie (Crawford et al., 2009). Im weiteren Krankheitsverlauf tritt häufig auch eine diabetische Neuropathie auf (Ziegler et al., 2012). Bei den makrovaskulären Folgeerkrankungen sind Herz, Gehirn sowie die peripheren Arterien betroffen. Als Komplikationen treten dabei häufig Myokardinfarkte und Schlaganfälle auf (Janka, 2011).

2.3.2.4.1 VEGF in der Schwangerschaft bei Gestationsdiabetes

Als Schlüsselfaktor in sowohl physiologischen als auch pathologischen Zuständen spielt VEGF dahingehend auch in einer Schwangerschaft eine bedeutende Rolle (Lygnos et al., 2006, Sharkey et al., 1996, Bates et al., 2006). Vaskuläre und metabolische Funktionsstörungen, wie zum Beispiel Diabetes mellitus, können die plazentare Funktion verändern und die fetale Entwicklung beeinträchtigen (Jirkovska et al., 2002). Bei

Vorliegen eines Diabetes in der Schwangerschaft wird das Auftreten von Atherosklerose gefördert, die den uteroplazentaren Blutfluss beeinträchtigt und dadurch zu Hypoxie und Ischämie führt. Zusätzlich kommt es zu einer beschleunigten perivillösen Ablagerung von Fibrin, was eine plazentare Hyperkapillarisation verursachen kann (Eriksson et al., 1991). Diese steht in engem Zusammenhang mit der Stimulation von Endothelzellen durch VEGF als Antwort auf eine Hypoxie. Es wird vermutet, dass im Falle eines Sauerstoffmangels über den VEGFR-2 eine effektive Angiogenese vermittelt wird, die zur Bildung villöser Kapillaren führt. Dadurch wird eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Gewebes gewährleistet (Kumazaki et al., 2002). Desweiteren konnte ein Zusammenhang zwischen dem fetomaternalen Gasaustausch und morphofunktionalen Veränderungen in der Plazenta in verschiedenen Untersuchungen an Plazenten aus Schwangerschaften mit GDM gezeigt werden. Es wurden strukturelle und metabolische Veränderungen des Trophoblasten beschrieben und die Gefäße zeigten Veränderungen in der Struktur. Dies lässt den Schluss zu, dass ein hyperglykämisches Milieu in der Schwangerschaft zu morphofunktionalen Veränderungen in der Plazenta führt und möglicherweise auch die Expression von VEGF verändert ist (Marini et al., 2008). Am Tiermodell mit Ratten konnte beobachtet werden, dass eine diabetische Stoffwechsellage eine signifikante Reduktion der VEGF A-Konzentration in den Embryonen der Tiere zur Folge hatte, mit der Folge einer erhöhten Missbildungsrate. Ursächlich hierfür scheint eine eingeschränkte Angiogenese zu sein. Möglicherweise treten diabetesassoziierte Angiopathien als Folge veränderter Blutkonzentrationen angiogener Faktoren auf (Salim et al., 2009).

2.4 VEGF beim Hund

Wie der Mensch besitzt auch der Hund mehrere Isoformen von VEGF, die durch alternatives Spleißen während der Transkription zustande kommen. Mittlerweile konnten mindestens vier Spleißvarianten des Wachstumsfaktors identifiziert werden: VEGF 120, 164, 182 und 188 (Jingjing et al., 2000).

Da die humanen VEGF-Varianten in der N-terminalen Region des VEGF-Gens immer um einen Aminosäure-Rest länger sind als die meisten anderen Säugetier-VEGF-Varianten (Scheidegger et al., 1999), unterscheiden sich die kaninen VEGF-Varianten dementsprechend in der Anzahl der vorhandenen Aminosäuren immer um eine

Aminosäure im Vergleich zum Menschen. Dabei zeigen die Aminosäure-Sequenzen lediglich bei 4,8% veränderte Reste zwischen kaninem und humanem VEGF-Gen. Somit sind kanines und humanes VEGF strukturell gesehen fast identisch (Scheidegger et al., 1999). Bemerkenswert ist, dass keiner der Unterschiede an einer Position lokalisiert ist, die eine Relevanz für die biologische Aktivität der Wachstumsfaktoren besitzt. In den Loop-Regionen, die für die Rezeptorbindung verantwortlich sind, weist die Anordnung der Aminosäuren eine Identität zwischen Mensch und Hund auf (Christinger et al., 1996, Muller et al., 1997, Scheidegger et al., 1999, Wiesmann et al., 1997). Auch die kaninen VEGF-Rezeptoren selbst sind den humanen Rezeptoren sehr ähnlich und die Struktur des kaninen VEGFR-2 entspricht genau der des entsprechenden humanen Rezeptors (Scheidegger et al., 1999).

Funktionell weisen die kaninen VEGF-Varianten die gleichen Zellbindungseigenschaften wie die humanen Varianten auf. Es wird davon ausgegangen, dass die Signalwege sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen bei Hund und Mensch gleich sind (Scheidegger et al., 1999).

Beim Hund ist das VEGF₁₆₄ die vorherrschende Form und jede Isoform besitzt spezifische biologische Aktivitäten (Uchida et al., 2008). Obwohl angiogene Faktoren wie VEGF und seine Rezeptoren beim Hund immer noch wenig untersucht und verstanden sind, gibt es Untersuchungen zur Rolle von VEGF im Rahmen von neovaskulären Syndromen (Binder et al., 2012, Lutty et al., 2011), entzündlichen Erkrankungen (Balicki und Sobczynska-Rak, 2014, Maiolini et al., 2013) und Tumoren (Kato et al., 2007, Rebuzzi et al., 2007, Yonemaru et al., 2006, Dickinson et al., 2008, Wolfesberger et al., 2007, de Queiroz et al., 2010, Yhee et al., 2012). Wie beim Menschen kann auch beim Hund eine signifikante Korrelation zwischen dem Differenzierungsgrad verschiedener Tumoren (u. a. Karzinome, Sarkome, Melanome, Seminome) und angiogenen Faktoren beziehungsweise der Gefäßdichte der Tumoren nachgewiesen werden (Maiolino et al., 2000, Restucci et al., 2002, Restucci et al., 2003, Wergin und Kaser-Hotz, 2004).

2.4.1 VEGF in der Trächtigkeit bei Tieren

Wie bereits für die humane Schwangerschaft beschrieben, besitzt VEGF auch im Tierreich eine große Bedeutung als Regulator der Angiogenese während der Implantation und Plazentation. Abgesehen von der menschlichen Plazenta konnte der Wachstumsfaktor in verschiedenen Plazentationstypen nachgewiesen werden, darunter in der Plazenta des Goldhamsters, des Schweines, der Ratte, des Kaninchens, des Schafes und des Rindes sowie bei Hund und Katze (Bogic et al., 2001, Pfarrer et al., 2006, Watanabe et al., 1998, Yi et al., 1999, Winther et al., 1999, Das et al., 1997, Bezler, 2008). Interessanterweise ist bei Spezies und Rassen, die auf plazentare Effizienz selektiert wurden und eine große Zahl von Embryonen beziehungsweise Feten hervorbringen, eine erhöhte Expression von VEGF- und VEGFR-1-mRNA zu beobachten (Vonnahme und Ford, 2004).

Wie eine an Nerzen durchgeführte Studie zeigen konnte, sind VEGF und seine Rezeptoren plazentar nicht nur in Endothelzellen sondern auch im Epithel des Endometriums und der Drüsen sowie im Trophoblasten lokalisiert. Dies lässt neben der angiogenetischen Funktion des VEGF weitere Funktionen, vor allem im Hinblick auf Gefäßpermeabilität und Zelldifferenzierung, vermuten (Winther und Dantzer, 2001). Dabei ist interessant, dass VEGF auch in Uteri von pseudograviden Nerzen hochreguliert wird, was anhand des hohen Gehalts von mRNA des Proteins in diesem Gewebe beobachtet werden konnte. Daraus lässt sich schließen, dass die Regulation des Wachstumsfaktors wohl eher von maternalen als von fetalen Faktoren abhängig zu sein scheint (Lopes et al., 2003).

In einer Studie zum Vergleich der VEGF-Expression im kaninen Uterus zwischen gravider und nichtgravider Hündin, kann im graviden Uterus eine erhöhte Expression von VEGF-mRNA beobachtet werden (Bukowska et al., 2011). Dabei scheint VEGF vor allem in der frühen kaninen Trächtigkeit von Bedeutung zu sein, da in einer Untersuchung zum Verlauf eine signifikant höhere Expression während der Präimplantation im Vergleich zu den anderen Stadien nachgewiesen wurde (Schäfer-Somi et al., 2013). Die gesteigerte Expression lässt vermuten, dass VEGF regulierend auf die Uterusfunktion während der Implantation kaniner Embryonen wirkt (Bukowska et al., 2011).

2.4.2 Diabetes mellitus beim Hund

Diabetes mellitus zählt zu den häufigsten endokrinen Erkrankungen bei Hunden im mittleren und fortgeschrittenen Alter und zeigt steigende Prävalenz (Guptill et al., 2003).

Aufgrund eingeschränkter diagnostischer Möglichkeiten in der Kleintiermedizin ist eine exakte Klassifizierung des kaninen Diabetes mellitus schwieriger als beim Menschen. Werden die auf der Pathogenese basierenden Kriterien zur Klassifikation des humanen Diabetes mellitus auf den kaninen Diabetes mellitus übertragen, können drei Formen unterschieden werden (Rand et al., 2004). Bei der ersten Form liegt ursächlich eine autoimmune Zerstörung der Beta-Zellen vor - die Ätiologie ist mit dem humanen DM I vergleichbar (Hoenig und Dawe, 1992). Die zweite Form umfasst „andere spezifische Diabetes-Typen“, denen unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen (Rand et al., 2004). Bei dieser Form kommt es in ca. einem Drittel der Fälle aufgrund chronischer Pankreatitiden zu einer Zerstörung der Langerhans-Inseln (Hoenig, 2002, Rand et al., 2004). In den anderen Fällen entwickelt sich der Diabetes als Folge einer Kortikosteroidtherapie (Campbell und Latimer, 1984), eines Hyperadrenokortizismus (Peterson et al., 1984) oder einer Akromegalie (Selman et al., 1994a). Die dritte Form steht in engem Zusammenhang mit einer Insulinresistenz und betrifft Hündinnen im Diöstrus oder während einer Trächtigkeit. Diese Form des Diabetes wird als kaniner Gestationsdiabetes bezeichnet (Rand et al., 2004).

Zum Zeitpunkt der Diagnose, die durch die klinische Symptomatik, eine persistierende Nüchtern-Hyperglykämie sowie Glukosurie gestellt wird, weisen fast alle Hunde einen insulinabhängigen Diabetes mellitus auf. Als klinische Symptomatik treten infolge der Hyperglykämie und Glukosurie klassischerweise Polyurie, Polydipsie, Polyphagie und Gewichtsverlust auf (Nelson, 2010).

Ähnlich der humanmedizinischen Therapie des DM I wird der kanine Diabetes mellitus in den meisten Fällen mit einer lebenslangen Insulinsubstitution therapiert, da der Funktionsverlust der Beta-Zellen irreversibel ist. Als Behandlungsziele stehen die Linderung der durch Hyperglykämie und Glukosurie ausgelösten Symptome sowie die Vermeidung diabetischer Folgeerkrankungen (Katarakt, Gewichtsverlust, Hypoglykämie, rezidivierende Ketose, rezidivierende Polyurie/-dipsie) im Vordergrund. Diese Ziele

können meist durch eine Insulintherapie in Kombination mit einer Diät und entsprechender Bewegung erreicht werden. Wichtig ist eine gute Kontrolle der Blutglukosekonzentration durch den Besitzer sowie die Erstellung von Blutzuckertagesprofilen um das Auftreten einer Hypoglykämie zu vermeiden. Diese stellt als Folge einer zu hohen Insulindosis eine schwerwiegende Komplikation der Therapie dar (Nelson, 2010).

2.4.2.1 Kaniner Gestationsdiabetes

Der Diabetes mellitus stellt eine der häufigsten Endokrinopathien beim Hund dar. Wird die Diagnose während der Trächtigkeit oder während des Diöstrus gestellt, ist diese Form des Diabetes mit dem humanen GDM vergleichbar (Rand et al., 2004).

Dem kaninen GDM liegt eine Insulinresistenz zugrunde, die sich bei nicht kastrierten Hündinnen unter dem Einfluss von Progesteron entwickeln kann (Rand et al., 2004, Batista et al., 2005). Auch bei gesunden Hündinnen tritt ab Mitte der Trächtigkeit eine physiologische Insulinresistenz auf, die bis zum Trächtigkeitende zunimmt (Concannon, 1986, Connolly et al., 2004). Durch Progesteron wird zum einen die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor, zum anderen die Tyrosinkinase-Aktivität des Rezeptors unterdrückt was zu einer Insulinresistenz im gesamten Körper führt (Batista et al., 2005, Ryan und Enns, 1988). Auch gestagenhaltige Medikamente, die zur Läufigkeitsunterdrückung eingesetzt werden, haben eine diabetogene Wirkung und können eine Insulinresistenz induzieren (Selman et al., 1994a, Wehrend, 2009a). Außerdem kommt es unter Progesteroneinfluss zur Bildung des diabetogenen Wachstumshormons Somatotropin (STH) das ebenfalls als Insulinantagonist agiert. Dies geschieht sowohl während des Diöstrus, der in seiner Dauer und im Hormonprofil einer kaninen Trächtigkeit ähnlich ist, als auch während der Gestation oder einer Pseudogravidität (Rand et al., 2004, Eigenmann et al., 1983, Selman et al., 1994a, Selman et al., 1994b). Die Mechanismen über die STH zu einer Insulinresistenz führt, sind bisher nicht genau geklärt. Da die Affinität der Insulinrezeptoren zu ihrem Liganden nicht vermindert ist (Flier, 1983), wird vermutet, dass STH die Signaltransduktion des Insulinrezeptors verändert. Außerdem führt ein länger anhaltender STH-Überschuss zu einer Verminderung der Zahl der Insulinrezeptoren (Dominici und Turyn, 2002). Es scheint, dass STH die Insulinsensitivität über mehrere

intrazelluläre Mechanismen aufgrund der Interaktion zwischen STH/IGF-1 und dem Insulinsignal beeinflusst (Dominici et al., 2005).

Ähnlich wie beim Menschen ist eine kanine Gravidität mit GDM mit einer hohen neonatalen Morbidität und Mortalität verbunden. Außerdem haben die Welpen ein erhöhtes Risiko im weiteren Leben einen Diabetes mellitus zu entwickeln (Yudelman, 2010). Ein kaniner GDM kann analog dem humanen GDM auch nach dem Partus bzw. des Diöstrus persistieren und wird dann entsprechend in insulinabhängigen Diabetes mellitus bzw. in nicht-insulinabhängigen Diabetes mellitus anderer Ursache klassifiziert (Rand et al., 2004).

Meist handelt es sich beim kaninen GDM um einen transienten Diabetes mellitus, der durch eine Kastration aufgehoben werden kann. Daher ist bei Hündinnen mit Diabetes die therapeutische Kastration das Mittel der Wahl (Nelson, 2010, Pöpl et al., 2013, Wehrend, 2009b). Nach dem chirurgischen Eingriff kommt es zu einer Senkung des STH-Spiegels im Blut und der Insulinantagonismus bleibt aus. Somit kann der Glukosespiegel im Falle eines GDM häufig auch ohne Insulintherapie durch Kastration korrigiert werden (Nelson, 2010). In einer retrospektiven Studie wurde gezeigt, dass durch die Beseitigung einer Insulinresistenz, die mit ovarieller Aktivität im Zusammenhang steht (Diöstrus, Gestation, Ovarian-Remnant-Syndrom, zystische Endometriumhyperplasie/Pyometra-Komplex) in einem Teil der Fälle eine Remission des Diabetes mellitus erreicht werden konnte. Dies war selbst bei Hündinnen möglich, die mit schwerer diabetischer Ketose vorgestellt wurden oder erst einige Zeit nach der Diagnosestellung kastriert wurden. Neben der Remission nach Kastration konnte auch ein Fall der spontanen Remission am Ende des Diöstrus beobachtet werden. Allerdings sind solche Hündinnen gefährdet im darauffolgenden Zyklus einen permanenten Diabetes zu entwickeln, wenn sie nicht kastriert werden (Pöpl et al., 2013). Hier zeigt sich wiederum eine Gemeinsamkeit zum humanen GDM – auch Frauen mit einem transienten GDM haben ein erhöhtes Risiko in einer weiteren Schwangerschaft wieder einen Diabetes zu entwickeln (Kleinwechter et al., 2012). Voraussetzung für eine Remission des Diabetes nach Beseitigung der Faktoren, die eine Insulinresistenz hervorrufen, ist eine noch ausreichende Anzahl funktionierender Beta-Zellen im Pankreas. Diese ist bei betroffenen Hündinnen oftmals schon vor der Entstehung eines GDM signifikant reduziert, was als subklinischer Diabetes bezeichnet wird. Diese Hunde sind auch nach der Kastration anfälliger für eine erneute

Hyperglykämie und die Entstehung eines Diabetes mellitus, der einer lebenslangen Insulintherapie bedarf (Nelson, 2010).

3 Material und Methoden

3.1 Material ELISA

3.1.1 Allgemeine Reagenzien für ELISA

PBS Dulbecco	Biochrom AG (Berlin, D)
Tween R 20	Carl Roth GmbH+Co. KG (Karlsruhe, D)
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)

PBS = phosphatgepufferte Salzlösung

3.1.2 Reagenziensätze für ELISA

Reagent Diluent Concentrate 2	Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)
Substrate Reagent Pack (Color reagent A [H ₂ O ₂] und Color reagent B [Tetramethylbenzidine])	Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)
Stop Solution	Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)

3.1.3 Spezielle Reagenzien für VEGF A

DuoSet Human VEGF	Fa. R&D Systems, Cat. No. DY293B
<i>Capture Antibody (mouse anti-human VEGF 180 µg/ml)</i>	<i>Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)</i>
<i>Detection Antibody (biotinylierter goat anti-human VEGF 18 µg/ml)</i>	<i>Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)</i>
<i>Streptavidin-horseradish-peroxidase (Streptavidin-HRP)</i>	<i>Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)</i>
<i>Standard (human VEGF 120 ng/ml)</i>	<i>Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)</i>

3.1.4 Spezielle Reagenzien für VEGF165b

DuoSet Human VEGF165b	Fa. R&D Systems, Cat. No. DY3045
<i>Capture Antibody (mouse anti-human VEGF165b 360 µg/ml)</i>	<i>Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)</i>
<i>Detection Antibody (biotinylierter mouse anti-human VEGF165b 45 µg/ml)</i>	<i>Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)</i>
<i>Streptavidin-horseradish-peroxidase (Streptavidin-HRP)</i>	<i>Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)</i>
<i>Standard (human VEGF165b 120 ng/ml)</i>	<i>Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)</i>

3.1.5 Puffer und Verdünnungen

Waschpuffer	0,05% Tween [®] 20 pH 7,2-7,4 in PBS
Substrate solution	Color reagent A (H ₂ O ₂) und Color reagent B (Tetramethylbenzidine) in 1:1 Mixtur
Reagent Diluent	Reagent Diluent concentrate (1% BSA) pH7,2-7,4 in Aqua ad iniectabilia
Capture Antibody Verdünnung	Capture Antibody 180 µg/ml (VEGF A) bzw. 360 µg/ml (VEGF165b) in PBS Konzentration von 1,0 µg/m bzw. 2,0 µg/ml
Detection Antibody Verdünnung	Detection Antibody 18 µg/ml (VEGF A) bzw. 45 µg/ml (VEGF165b) in Reagent Diluent Konzentration von 100 ng/ml bzw. 250 ng/ml
Standard für VEGF A	rhVEGF A 120ng/ml in Reagent Diluent Standard ab 1000 pg/ml
Standard für VEGF165b	rhVEGF165b 120 ng/ml in Reagent Diluent Standard ab 2000 pg/ml

3.1.6 Geräte

ELISA Reader	Fa. Dynatech-Laboratories (Guernsey, GB)
Vortexer MS 1 Minishaker IKA	Fa. IKA (Staufen, D)
Magnetrührer RCT basic	Fa. IKA (Staufen, D)
Zentrifuge (5417 R)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Pipetten (Eppendorf Research plus 20, 200, 100 µl; Eppendorf Research 300 µl)	Eppendorf

3.1.7 Sonstiges Material

Pipettenspitzen	SARSTEDT 1000 µl blau SARSTEDT 200 µl gelb Eppendorf epT.I.P.S Standard 20-300 µl
96-Well-Platten Nunc-Immuno™	VWR International (Pennsylvania, USA)
50 ml Centrifuge Tubes with Flat Top Cap	BIOLOGIX Research Company
Reaktionsgefäße 20 ml, farblos	Biozym, Scientific GmbH
Blutentnahmeröhrchen Blutentnahmesysteme	Fa. BD Diagnostics (Franklin Lakes, USA), Fa. Sarstedt (Nümbrecht, D)
Parafilm „M“	Laboratory Film, Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL.
Computerprogramme	Revelation, Word, Excel, SPSS

3.2 Material Immunhistochemie

3.2.1 Reagenziensatz und Chromogen für die Immunhistochemie VEGF A

Detektionssystem: Vectastain ABC-Kit Elite Universal	Fa.Vector, Cat. No. PK6200
<i>Normalserum (Blockierserum)</i>	<i>Fa.Vector, Cat. No. PK6200</i>
<i>Sekundärantikörper</i>	<i>Fa.Vector, Cat. No. PK6200</i>
<i>ABC-Komplex*</i>	<i>Fa.Vector, Cat. No. PK6200</i>
<i>AEC+ (Substratchromogen)</i>	<i>Fa.Dako, Cat.No. K3461</i>

*Reagenz A (Avidin-Lösung) und B (biotinyliertes Enzym) = Avidin-Biotin-Enzym (Peroxidase)-Komplex

3.2.2 Antikörper für die Immunhistochemie VEGF A

Primärantikörper VEGF (monoclonal mouse)	Fa. Dako, Cat.No. M7273
Sekundärantikörper aus ABC-Kit*	Fa.Vector, Cat. No. PK6200

*Biotinylierter Sekundärantikörper Pferd-anti-Maus/Kaninchen, entwickelt für die Verwendung mit Primärantikörpern aus Maus oder Kaninchen

3.2.3 Puffer und Verdünnungen VEGF A

Epitope Retrieval Solution	Fa.Novocastra, Cat.No.RE7116
TRIS-Puffer (Waschpuffer)	*selbst hergestellt
Antibody Diluent	Fa. Dako, Cat.No. S2022

*Herstellung der Stammlösung für 1000 ml: 60,5 g Trizma-Base in 700 ml Aqua dest. lösen, mit 2N Salzsäure (Fa. Merck) mit pH-Meter auf pH 7,6 einstellen und mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen; wiederholte Messung des pH-Werts und 90 g NaCl darin lösen; Herstellung der Gebrauchslösung: Stammlösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnen

3.2.4 Reagenziensatz und Chromogen für die Immunhistochemie VEGF165b

Real Detection System APAAP, Mouse	Fa. Dako, Cat.No.K5000
<i>Sekundärantikörper</i>	<i>Fa. Dako, Cat.No.K5000</i>
<i>APAAP-Komplex*</i>	<i>Fa. Dako, Cat.No.K5000</i>
<i>Chromogen Red</i>	<i>Fa. Dako, Cat.No.K5000</i>

*besteht aus intestinaler alkalischer Phosphatase (AP, vom Kalb) und monoklonalen Mausantikörpern gegen AP (vom Kalb) in einer Pufferlösung, die hintergrundreduzierende Komponenten, Stabilisatoren und Natriumazid enthält; APAAP = Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase

3.2.5 Antikörper für die Immunhistochemie VEGF165b

Primärantikörper VEGF165b	Fa. R&D System, Cat.No. MAB3045
Sekundärantikörper aus APAAP-Kit*	Fa. Dako

*Kaninchen Anti-Maus-Immunglobulin in Pufferlösung, die hintergrundreduzierende Komponenten und Natriumazid enthält; APAAP = Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase

3.2.6 Puffer und Verdünnungen VEGF165b

Target Retrieval Solution	Fa. Dako, Cat.No. S1699
TRIS-Puffer (Waschpuffer)	*selbst hergestellt
Antibody Diluent	Fa. Dako, Cat.No. S2022

*Herstellung der Stammlösung für 1000 ml: 60,5 g Trizma-Base in 700 ml Aqua dest. lösen, mit 2N Salzsäure (Fa. Merck) mit pH-Meter auf pH 7,6 einstellen und mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen; wiederholte Messung des pH-Werts und 90 g NaCl darin lösen; Herstellung der Gebrauchslösung: Stammlösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnen

3.2.7 Geräte (VEGF A und VEGF165b)

Schlittenmikrotom Hn40	Fa. Reichert-Jung
pH-Meter CG 825	Fa. Schott
Mikrowelle	Fa. Bosch
Lichtmikroskop DIAPLAN	Fa. Leitz
Color Video Camera 3-CCD KY-F55B	Fa. JVC

3.2.8 Sonstiges Material (VEGF A und VEGF165b)

Ethanol 50 Vol.-%, 70 Vol.-%, 96 Vol.-%, 100 Vol.-%	Klinik Apotheke
Xylol	Fa. J.T. Baxter; Cat.No. 8118
Hematoxylin Gill's Formula	Fa. Vector, Cat.No. H-3401
Kaisers Glyceringelatine	Fa. Merck, Cat.No. 1.09242.0100
Objektträger	Menzel; Cat.No. J1800AMNZ
Aqua dest.	Braun; Lot. 122838003
Feuchte Kammer	Klinik-Werkstatt ; selbst angefertigt

3.3 Patientenkollektiv

Zur Durchführung der Studie wurden Blutproben aus einer bestehenden Biodatenbank verwendet. Diese Proben stammen aus einer prospektiven longitudinalen klinischen Kohortenstudie für die insgesamt 87 schwangere Patientinnen eingeschlossen und in vierwöchigen Abständen bis zu ihrer Entbindung untersucht wurden. Aus diesem Kollektiv standen für die vorliegende Studie 33 Blutproben zur Verfügung (gesunde Schwangere $n = 18$, Schwangere mit GDM $n = 15$). Zusätzlich wurden im Rahmen der vorliegenden Studie 100 gesunde nicht schwangere Frauen als Vergleichskollektiv für eine einmalige Blutabnahme rekrutiert.

Insgesamt sieben Blutentnahmen erfolgten während der Schwangerschaft (Angabe der vollendeten SSW plus der einzelnen Tage darüber hinaus):

- SSW 11+6 - 13+6
- SSW 14+0 - 17+6
- SSW 18+0 - 22+6
- SSW 23+0 - 27+6
- SSW 28+0 - 32+6
- SSW 33+0 - 36+6
- SSW 38+0 - 41+6

Weitere drei Blutabnahmen erfolgten nach der Geburt:

- 1. - 6. Tag post partum
- 6 Wochen post partum
- 6 Monate post partum

Bei Studieneinschluss wurde eine gynäkologische Anamnese durchgeführt und dabei besonders nach schwangerschaftsspezifischen Erkrankungen wie Präeklampsie, HELLP, schwangerschaftsinduzierte Hypertonie sowie vorbestehenden Erkrankungen gefragt. Auch die Einnahme von Medikamenten sowie das Nikotinverbrauchsverhalten wurden dokumentiert. Bei jeder Folgeuntersuchung wurde das aktuelle gesundheitliche Befinden erfragt und eine Anamnese bezüglich Gewichtszunahme, Ödemen, Auffälligkeiten der Schwangerschaft und eventuelle Neuerkrankungen erhoben und dokumentiert.

Die Durchführung dieser Studie wurde durch ein positives Votum der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität für ethisch-rechtlich unbedenklich erklärt und genehmigt (Protokoll-Nr. 183-05, 2005). Ein Studieneinschluss der Patientinnen erfolgte nach schriftlicher Einverständniserklärung und unter Berücksichtigung der definierten Ein- und Ausschlusskriterien.

3.3.1 Schwangeres Patientenkollektiv

3.3.1.1 „Schwangere mit Gestationsdiabetes“

In die Gruppe mit GDM wurden Patientinnen eingeschlossen, bei denen während ihrer Gravidität mittels oralem Glukosetoleranztest (oGTT) bzw. 50g-Glukosetest zwischen der 24+0 und 27+6 SSW erstmals eine pathologische Glukosetoleranz festgestellt wurde.

Von den ursprünglich insgesamt 87 eingeschlossenen Schwangeren standen für die vorliegende Studie Blutproben von 15 Gestationsdiabetikerinnen zur Verfügung.

3.3.1.1.1 50g-Glukose-Belastungstest (Glucose-Challenge-Test, GCT)

Der Patientin wird zu einem beliebigen Tageszeitpunkt 200 ml Wasser mit 50 g gelöster Glukose verabreicht. Verdacht auf Diabetes besteht, wenn der in Tabelle 2 angegebene Wert erreicht oder überschritten wird. Ist dies der Fall, muss der Verdacht durch einen anschließenden oralen Glukosetoleranztest (75g oGTT) bestätigt oder widerlegt werden (Kleinwechter et al., 2011).

Tabelle 2: Diagnose-Grenzwerte des GCT nach Angaben der Deutschen Diabetes Gesellschaft, die zum begründeten Verdacht eines GDM führen (Kleinwechter et al., 2011)

	Venöses Plasma	
	mg/dl	mmol/l
Nach 1 Stunde	≥ 135	$\geq 7,5$

3.3.1.1.2 Oraler Glukosetoleranztest (75g oGTT)

Dieser Test wird nach mindestens achtstündiger Nahrungskarenz mit 75 g Glukose in 300 ml Wasser durchgeführt. Die Lösung soll innerhalb von 3 bis 5 Minuten von der Patientin getrunken werden. Wird mindestens einer der drei in Tabelle 3 definierten Grenzwerte erreicht oder überschritten, besteht ein GDM (Kleinwechter et al., 2011).

Tabelle 3: Neue Diagnose-Grenzwerte des oGTT für GDM im venösen Plasma nach International Association of Diabetes and Pregnancy Study Group (IADPSG)-Konsensus-Empfehlungen im Vergleich zu den bisher gültigen Grenzwerten nach Carpenter/Coustan (Kleinwechter et al., 2011)

	Grenzwerte neu IADPSG venöses Plasma		Grenzwerte alt* Carpenter/ Coustan venöses Plasma	
	mg/dl	mmol/l	mg/dl	mmol/l
SSW 24+0 - 27+6**				
Nüchtern	92	5,1	95	5,3
Nach 1 Stunde	180	10,0	180	10,0
Nach 2 Stunden	153	8,5	155	8,6

*Zum Zeitpunkt der Probennahme für die vorliegende Studie galten noch die alten Grenzwerte, welche sich nur geringfügig von den neu festgelegten Grenzwerten unterscheiden.

**Angabe der vollendeten SSW plus der einzelnen Tage darüber hinaus.

3.3.1.2 Vergleichskollektiv „Gesunde Schwangere“

In die Gruppe „Gesunde Schwangere“ wurden ab der 11+0 bis 14+6 SSW insgesamt 18 Patientinnen (n = 18) aufgenommen, auf die keines der unter 3.3.1.4 aufgeführten Ausschlusskriterien zutraf.

3.3.1.3 Einschlusskriterien

- Alter > 18 Jahre bzw. < 45 Jahre
- Intakte Einlingsschwangerschaft
- Zustimmungsfähigkeit und Einverständniserklärung in schriftlicher Form
- Mächtigkeit der deutschen Sprache: aus rechtlichen Gründen durfte die Aufklärung sowie die Anamnese nur direkt und nicht über Dritte erfolgen

3.3.1.4 Ausschlusskriterien

- Vorbestehende oder anamnestische Erkrankungen des kardiovaskulären Systems (Hypertonie, Thrombose, Embolie, Präeklampsie, Eklampsie)
- Nierenerkrankungen
- Blutgerinnungsstörungen
- Adipositas III (BMI > 40)
- Lebererkrankungen
- Infektionskrankheiten (HIV, Hepatitis, etc.)
- Medikamenteneinnahme im Zeitraum der Studienteilnahme
- Andere schwerwiegende vorbestehende Erkrankungen

3.3.1.5 Blutentnahme, Aufbereitung und Lagerung der Proben

Bei jeder Untersuchung fand eine standardisierte Blutentnahme statt. Dabei wurde der Patientin mittels Vakuümröhrchen (BD Vacutainer[®] System, Fa. BD Diagnostics [Franklin Lakes, USA]) und Aspirationsröhrchen (S-Monovette[®], Fa. Sarstedt [Nürmbrecht, D]) 7,5 ml Blut aus der Oberarmvene entnommen. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 3000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Das gewonnene Serum und Plasma wurde nach Aufbereitung bis zur Bestimmung in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

3.3.1.6 Aufklärungsbogen und Einverständniserklärung

Vor der ersten Untersuchung wurden die Patientinnen ausgiebig über die Durchführung und den Verlauf der Studie informiert sowie ihr Einverständnis zur Teilnahme schriftlich dokumentiert.

3.3.2 Gesundes, nicht schwangeres Patientenkollektiv

3.3.2.1 Einschlusskriterien

- Weiblich
- Keine Schwangerschaftskomplikationen in der Vergangenheit
- > 18 Jahre

3.3.2.2 Ausschlusskriterien

- Vorbestehende oder anamnestische Erkrankungen des kardiovaskulären Systems (Hypertonie, Thrombose, Embolie, Präeklampsie, Eklampsie)
- Nierenerkrankungen
- Blutgerinnungsstörungen
- Adipositas III (BMI > 40)
- Lebererkrankungen
- Infektionskrankheiten (HIV, Hepatitis, etc.)
- Medikamenteneinnahme im Zeitraum der Studienteilnahme, ausschließlich hormonelle Antikonzeption
- Andere schwerwiegende vorbestehende Erkrankungen

3.3.2.3 Blutentnahme, Aufbereitung und Lagerung der Proben

Die Serum- und Plasmaproben des gesunden Vergleichskollektives wurden mit sterilen Blutentnahmeröhrchen abgenommen. Die Abnahme fand an einem peripheren Venenzugang mittels Vakuümrohrrchen (BD Vacutainer[®] System, Fa. BD Diagnostics (Franklin Lakes, USA) und Aspirationsrohrrchen (S-Monovette[®], Fa. Sarstedt [Nürmbrecht, D]) statt. Entnommen wurden jeweils zwei Serumproben und zwei CTAD-, Citrat- und EDTA-Plasmaproben. Anschließend wurden die Proben nach einer Ruhezeit von 30 Minuten bei 3000 Umdrehungen/Minute zehn Minuten lang zentrifugiert.

Die CTAD-Röhrrchen, die vier Antikoagulantien enthalten (Citrat, Theophyllin, Adenosin, Dipyridamol), wurden direkt nach der Abnahme auf Eis gekühlt, um eine maximale Thrombozyten-Stabilisation zu gewährleisten. Die Proben wurden nach maximal 30 Minuten Kühlung bei 2500 Umdrehungen/Minute zentrifugiert.

Das gewonnene Serum und Plasma wurde nach Aufbereitung bis zur Bestimmung in Kryoröhrrchen aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

3.3.3 Plazenten

Die untersuchten Plazenten stammen zum einen von Patientinnen mit GDM (n = 40) zum anderen von gesunden schwangeren Frauen, die als Kontrollgruppe dienten (n = 40). Bei allen Plazenten handelt es sich um Nachgeburten reifgeborener Feten ab der 37+0 SSW. Die Plazenten wurden nach Entnahme bis zur weiteren Verarbeitung in Formalin fixiert und wie unter 3.4.2.1 beschrieben aufgearbeitet.

3.4 Methoden

3.4.1 ELISA

3.4.1.1 Quantitative Bestimmung von VEGF in Serum und Plasma

Zur Bestimmung der Konzentration von VEGF A und VEGF165b in den verschiedenen Blutproben wurde ein ultrasensitiver enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA) durchgeführt. Verwendet wurde das DuoSet[®] ELISA Development System der Firma R&D Systems, Minneapolis, USA.

Hierfür wurden 96 Well Platten über Nacht mit einem Fängerantikörper (Capture Antibody) inkubiert. Dieser wurde am nächsten Tag mittels mehrerer Waschschriffe entfernt. Nun wurde Verdünnungsreagenz (Reagent Diluent) in jedes Well pipettiert, was dazu führt, dass jedes Well so von Verdünnungsreagenz ausgekleidet und dadurch geblockt wird, dass der Antikörper nicht unspezifisch binden kann. Nach einstündiger Inkubation wurde dieses auch mittels dreier Waschschriffe entfernt und danach erfolgte der Probenauftrag. Neben einer Standardreihe im Doppelansatz, die eine bekannte Konzentrationsmenge an VEGF A bzw. VEGF165b enthält, wurden alle Serum- und Plasmaproben in die Wells pipettiert (Abbildung 3). Während der zweistündigen Inkubationszeit bindet das in den Proben vorhandene Protein an die Antikörper. Nach weiteren drei Waschschriffen wurde ein zweiter (biotinylierter) Antikörper (Detection Antibody) zugegeben, der während einer zweistündigen Inkubation das bereits gebundene Protein an einem anderen Epitop bindet. Nach einem weiteren Waschschriff wurde Streptavidin-HRP (Meerrettichperoxidase) zugegeben, welches an Biotin bindet. Pro Antikörper wurden mehrere Biotin-Streptavidin-Brücken verwendet, was zu einer Signalverstärkung und somit zu einer höheren Sensitivität führt. Nach 30 Minuten Inkubation wurde das Konjugat mittels weiterer Waschschriffe entfernt und die Substratlösung zugegeben. Während einer 30-minütigen Inkubation kann das Substrat vom Enzym umgesetzt werden, was in einer Farbstoffbildung sichtbar wird. Diese Reaktion wurde nach weiteren 30 Minuten durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt. Im Anschluss wurde direkt die Farbintensität, die proportional zur Protein-Konzentration der Probe ist,

mittels eines ELISA-Readers eingelesen. Durch die Standardreihe konnte die genaue in der Probe enthaltene Konzentration errechnet werden.

Durchführungsvorschrift (R&D Systems, 2011)

A) Vorbereiten der Platten

1. Verdünnung des Capture Antibody in PBS (55 μ l in 9945 μ l). Sofort nach Verdünnung pipettieren von jeweils 100 μ l in jedes Well der Platte. Versiegelung der Platte mit Parafilm und Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur.
2. Nach Inkubation absaugen jeder Plattenvertiefung und Waschung der Platte insgesamt drei Mal mit jeweils 400 μ l Waschpuffer. Nach dem letzten Waschschrift Ausklopfen der Platte auf sauberen Papierhandtüchern, um jegliche Pufferreste zu entfernen.
3. Blockieren der Platten durch Pipettieren von 300 μ l Reagent Diluent (Herstellung Reagent Diluent: 1:10 Verdünnung Reagent Diluent in Aqua ad iniectabilia) in jedes Well. Anschließende Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde.
4. Wiederholung der Waschschrift wie im Schritt 2. Anschließend Auftragen der Proben.

B) Testdurchführung

1. Herstellen einer Standardreihe:

Pipettieren von 33 μ l Stock (Human VEGF A bzw. VEGF165b Standard, 120 ng/ml) in 967 μ l Reagent Diluent (1% BSA) (4000 pg/ml) und Herstellung einer Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:2 (Verdünnung auf 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml und 31 pg/ml).

2. Pipettieren der VEGF-Standards 1-8 sowie des Probenmaterials (Serum- und Plasmaproben) in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Dabei je 100 μ l des Materials in zwei Vertiefungen einbringen, um Doppelbestimmungen zu erhalten. Für 2h bei Raumtemperatur inkubieren.
3. Wiederholung der Waschschrift aus Schritt 2 (Vorbereiten der Platten).
4. Jeweils 100 μ l des in Reagent Diluent gelösten Detection Antibody in jedes Well pipettieren und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Wiederholung der Waschschrift aus Schritt 2 (Vorbereiten der Platten).

6. Zugabe von 100 µl Working Dilution (Streptavidin-HRP in Reagent Diluent gelöst im Verhältnis 1:200) in jede Vertiefung. Abdecken mit Parafilm und 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im abgedunkelten Raum.
7. Wiederholung der Waschschritte aus Schritt 2 (Vorbereiten der Platten).
8. 100 µl Substrate Solution (1:1 Mixtur aus Color Reagent A und Color Reagent B) in jede Vertiefung pipettieren. 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im abgedunkelten Raum.
9. 50 µl Stop Solution (2N Schwefelsäure) in jede Vertiefung geben. Um eine gute Durchmischung zu gewährleisten, vorsichtiges Klopfen der Platte auf einer ebenen Fläche.
10. Sofortige Messung der Absorption der Lösung bei 450 nm (Wellenlängenkorrektur: 595 nm) im ELISA-Reader.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ST 1	ST 1	Pat 1	Pat 1	Pat 9	Pat 9	Pat 17	Pat 17	Pat 25	Pat 25	Pat 33	Pat 33
B	ST 2	ST 2	Pat 2	Pat 2	Pat 10	Pat 10	Pat 18	Pat 18	Pat 26	Pat 26	Pat 34	Pat 34
C	ST 3	ST 3	Pat 3	Pat 3	Pat 11	Pat 11	Pat 19	Pat 19	Pat 27	Pat 27	Pat 35	Pat 35
D	ST 4	ST 4	Pat 4	Pat 4	Pat 12	Pat 12	Pat 20	Pat 20	Pat 28	Pat 28	Pat 36	Pat 36
E	ST 5	ST 5	Pat 5	Pat 5	Pat 13	Pat 13	Pat 21	Pat 21	Pat 29	Pat 29	Pat 37	Pat 37
F	ST 6	ST 6	Pat 6	Pat 6	Pat 14	Pat 14	Pat 22	Pat 22	Pat 30	Pat 30	Pat 38	Pat 38
G	ST 7	ST 7	Pat 7	Pat 7	Pat 15	Pat 15	Pat 23	Pat 23	Pat 31	Pat 31	Pat 39	Pat 39
H	ST 8	ST 8	Pat 8	Pat 8	Pat 16	Pat 16	Pat 24	Pat 24	Pat 32	Pat 32	Pat 40	Pat 40

Abbildung 3: Bearbeitungsschema ELISA in 96 Well Platte (ST = Standard, Pat = Patientenmaterial; Standards: Recombinantes humanes VEGF A bzw. VEGF165b)

3.4.2 Immunhistochemie

3.4.2.1 Herstellung und Vorbehandlung der Schnitte

1. Fixierung

Zur Fixierung wird 4%iges neutral gepuffertes Formalin verwendet. Dabei kommt es zu einer Vernetzung der Eiweißmoleküle untereinander, indem jeweils ein Formaldehydmolekül an ein Eiweißmolekül angelagert wird. Dadurch bildet sich ein starres Gitternetz und die Proteine werden nahezu nicht denaturiert. Die Dauer der Fixierung richtet sich nach der Größe des Gewebes. Nach der Fixierung wird das Formalin mit Leitungswasser herausgewaschen und es folgt der Vorgang des Einbettens (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000b).

2. Einbetten

Beim Einbetten wird das Gewebe mit einem flüssigen Stoff durchtränkt, der sich in eine feste homogene Masse umwandelt. Bei den untersuchten Schnitten wurde dafür Paraffin verwendet. Das Paraffin lagert sich überall dort ab, wo sich Wasser im Gewebe befindet. Daher wird das Gewebe zuvor mittels einer Alkoholreihe, die aus einem 70%igen und mehreren absoluten Ethanolen besteht, entwässert. Als Intermedium fungiert Xylol, dieses mischt sich sowohl mit Ethanol als auch mit Paraffin. Nun wird das Paraffin auf 60°C erhitzt, wodurch es flüssig wird und ins Gewebe eindringen kann. Dieser Vorgang erfolgt in einem Automaten. Anschließend wird das Gewebe mit flüssigem Paraffin mit Hilfe eines Förmchens in Form eines Blockes gegossen. Nach Erkalten wird der Block aus der Form herausgelöst und im Eisfach gekühlt (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000a).

3. Schneiden

Vom Paraffinblock werden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms 2-3 µm dicke Gewebsschnitte hergestellt und auf speziell für die Immunhistochemie (IHC) beschichtete Objektträger aufgezogen. Diese bekommen durch das Beschichtungsverfahren eine positive Ladung und sorgen dadurch für eine bessere Haftung der Schnitte (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000c).

Die Schnitte können nun mittels Immunhistochemie gefärbt werden.

3.4.2.2 Durchführung der Immunhistochemie

Die Paraffinschnitte der Plazenten von Patientinnen mit GDM sowie gesunder Kontrollen wurden sowohl auf VEGF A als auch auf VEGF165b gefärbt. Die immunhistochemische Färbung erfolgte im Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Frau PD Dr. Doris Mayr.

3.4.2.2.1 VEGF A

Zur Färbung auf VEGF A wurde die ABC (Avidin-Biotin-Komplex)-Methode verwendet. Bei dieser Methode ist der sekundäre Antikörper durch Biotin markiert. An das Biotin kann Avidin binden, das seinerseits drei weitere Bindungsstellen für Biotin besitzt. Diese können nun durch Markermoleküle, z.B. Meerrettichperoxidase (HRP) besetzt werden, die ihrerseits mit Biotin gekoppelt sind. Die Avidin-Biotin-Methode beruht auf der Affinität von Avidin für Biotin, die zur Bildung von Komplexen aus enzymmarkierten Avidin-Biotin-Komplexen mit biotinylierten Sekundärantikörpern führt (Herbst und Hübner, 2014). Die Reihenfolge der Applikation ist Primärantikörper - biotinylierter Sekundärantikörper - vorgeformte Avidin-Biotin-Enzymkomplexe (mit Peroxidase) – Substratlösung (AEC+). In der vorliegenden Versuchsreihe wurde mit dem Detektionssystem Vectastain ABC-Kit Elite Universal gearbeitet. Dieses Kit enthält den sekundären Antikörper (biotinyliertes Anti-Maus IgG/Kaninchen IgG) und den ABC-Komplex (Reagenz A [Avidin-Lösung] und B [biotinyliertes Enzym] = Avidin-Biotin-Enzym [Peroxidase]-Komplex). Aus den Reagenzien werden in mitgelieferten Mixtropffläschchen nach Gebrauchsanweisung die Gebrauchslösungen hergestellt.

Folgendes Protokoll wurde für die immunhistochemische Färbung auf VEGF A erstellt:

- Entparaffinierung

Nach 20-minütiger Xylol-Behandlung Entwässerung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe.

- Vorbehandlung (Demaskierung)

Kochen der Schnitte mit dem Puffer Epitope Retrieval Solution (pH 8) in der Mikrowelle bei 750 Watt 2x15 Minuten. Anschließend 20-minütige Abkühlung bei Raumtemperatur.

Nach der Entparaffinierung und Vorbehandlung erfolgte die eigentliche Färbung:

- 2x5 Minuten spülen in TRIS-Puffer pH 7,5
- Blockierung der endogenen Peroxidase:
 - o 10 Minuten 7,5% wässriges Wasserstoffperoxid bei Raumtemperatur
 - o 10 Minuten fließend wässern
- 2x5 Minuten spülen in TRIS-Puffer
- 20 Minuten Blockierserum (ABC- Kit), danach Überstand abkippen
- Primärantikörper VEGF 1:50; 60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
- 2x5 Minuten spülen in TRIS-Puffer
- 30 Minuten biot. Sekundärantikörper (ABC-Kit)
- 2x5 Minuten spülen in TRIS-Puffer
- 30 Minuten ABC-Komplex (ABC-Kit)
- 2x5 Minuten spülen in TRIS-Puffer
- Chromogen: 10 Minuten AEC+
- 10 Minuten fließend wässern
- Gegenfärbung: 10 Sekunden Hematoxylin Gill´s Formula
- 10 Minuten fließend wässern
- Eindecken mit Kaisers Glyceringelatine

3.4.2.2.2 VEGF165b

Zur Detektierung der Spleißvariante VEGF165b wurden die Schnitte mittels der APAAP (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase)-Methode immunhistochemisch gefärbt. Mit dieser Methode kann unter Verwendung eines Brückenantikörpers (Sekundärantikörper) die Bindung eines Primärantikörpers indirekt nachgewiesen werden (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000d). Dafür wurde in der vorliegenden Versuchsreihe mit dem Dako REAL Detection System, APAAP, Mouse gearbeitet. Dieses Kit enthält den sekundären Antikörper, der mit allen Isotypen von Maus-Immunglobulinen reagiert und als Brücken-Antikörper zwischen dem primären Mausantikörper und dem APAAP (lösliche, zwischen einem monoklonalen, an die AP aus fötalem Kalbsdarm gebundenen IgG1-Mausantikörper und AP aus fötalem Kalbsdarm gebildete Immunkomplexe) fungiert. Der sekundäre Antikörper sowie der APAAP-Immunkomplex werden gebrauchsfertig in Tropffläschchen geliefert. Das Substratsystem besteht aus vier Komponenten: Chromogen

Red 1, Chromogen Red 2, Chromogen Red 3 und AP Substrate Buffer. Bei dem Chromogen handelt es sich um ein Fast Red Chromogen. Chromogen Red 1, Red 2 und Red 3 müssen vor Gebrauch mit AP Substrate Buffer verdünnt werden. Das Substratchromogen führt zu einem kontrastreichen roten Endprodukt am Ort des Zielantigens.

Folgendes Protokoll wurde für die immunhistochemische Färbung auf VEGF165b erstellt:

- Entparaffinierung

Nach 20-minütiger Xylol-Behandlung Entwässerung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe.

- Vorbehandlung (Demaskierung)

Kochen der Schnitte mit dem Puffer Target Retrieval Solution in der Mikrowelle bei 750 Watt 2x15 Minuten. Anschließend 20-minütige Abkühlung bei Raumtemperatur.

Nach der Entparaffinierung und Vorbehandlung erfolgte die eigentliche Färbung:

- 2x5 Minuten spülen in TRIS-Puffer pH 7,5
- Auftragen des Primärantikörpers VEGF165b (Verdünnung 1:30 in Antibody Diluent); 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
- 2x5 Minuten spülen in TRIS-Puffer
- Auftragen des Sekundärantikörpers (Brückenantikörpers); 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
- 2x5 Minuten spülen in TRIS-Puffer
- Auftragen des APAAP-Komplex; 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
- 2x5 Minuten spülen in TRIS-Puffer
- Wiederholtes Auftragen des Sekundärantikörpers (dient der Verstärkung des Farbsignals); 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
- 2x5 Minuten spülen in TRIS-Puffer
- Wiederholtes Auftragen des APAAP-Komplex (dient der Verstärkung des Farbsignals); 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
- 2x5 Minuten spülen in TRIS-Puffer
- Auftragen des Chromogens: Inkubation mit Chromogen Red für 10 Minuten bei Raumtemperatur
- 10 Minuten fließend wässern

- Gegenfärbung mit Hematoxylin Gill's Formula für 10 Sekunden
- 10 Minuten fließend wässern
- Eindecken mit Kaisers Glyceringelatine

3.4.2.3 Auswertung der Schnitte unter dem Lichtmikroskop

Die Auswertung der gefärbten Präparate erfolgte im Hinblick auf die Expression der Wachstumsfaktoren semiquantitativ unter Verwendung des Lichtmikroskops Diaplan der Firma Leitz.

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 bis 1:10 erfolgte die Begutachtung der Schnitte auf Materialmenge und der Färbequalität. 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 untersuchten Wachstumsfaktoren.

Die Auswertung der Zottenanschnitte legte ihren Schwerpunkt auf die Beurteilung des Trophoblasten. Es wurde darauf geachtet, ob ein Unterschied in der Anfärbung und damit abweichendes Expressionsverhalten in Bezug auf die untersuchten angiogenen Wachstumsfaktoren in den Anschnitten auftrat.

Zur Beurteilung (Objektivierung) des immunhistochemischen Färbeverhaltens der betrachteten Zelltypen in den Plazenten wurde eine Graduierung der Färbereaktion durch die Ermittlung des immunreaktiven Scores (IRS) vorgenommen. Diese Bewertungsskala erlaubt eine Quantifizierung der gefärbten Zellen und wird normalerweise zur Quantifizierung von Progesteron- und Östrogenrezeptoren auf der Oberfläche von Tumorzellen genutzt. Der IRS setzt sich aus der Färbeintensität und dem Anteil positiv

gefärbter Zellen zusammen. Durch Multiplikation dieser beiden Parameter ergibt sich das Ergebnis des Scores (Tabelle 4).

Tabelle 4: Ermittlung des IRS (Produkt aus Färbeintensität und Anteil positiv gefärbter Zellen)

Färbeintensität	Anzahl der gefärbten (positiven) Zellen in %	IRS
0 = negativ	0 = keine	0-2 = negativ
1 = schwach	1 = weniger als 10%	3-4 = schwach positiv
2 = mittel	2 = zwischen 10-50%	6-8 = mäßig positiv
3 = stark	3 = zwischen 51-80%	9-12 = stark positiv
	4 = mehr als 80%	

3.5 Statistik

3.5.1 Auswertung

Die erhobenen Daten wurden zu einem Datensatz in elektronischer Form zusammengefasst und mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 20.0 für das Betriebssystem Windows sowie mit Excel ausgewertet. Zusätzlich wurden mit Hilfe von Excel einige Grafiken erzeugt, die in SPSS nicht möglich waren oder in Excel aufbereitet. Die statistische Auswertung erfolgte durch das Statistikbüro „STAT-UP Intelligent Business Solutions“.

3.5.2 Statistische Tests

Zur Auswertung der erhobenen Daten kamen in dieser Arbeit je nach Datenlage und Fragestellung verschiedene statistische Tests zum Einsatz. Die Abhängigkeit zweier kategorialer Merkmale wurde über den exakten Fisher-Test geprüft. Für den Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben wurde bei metrisch normalverteilten Stichproben der T-Test und bei nicht normalverteilten Stichproben der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Für den Vergleich abhängiger nicht normalverteilter Stichproben wurde bei zwei

Stichproben der Wilcoxon-Test und bei mehr als zwei Stichproben der Friedman-Test verwendet. Der Test auf Normalverteilung erfolgte über den Kolmogorov-Smirnov-Test oder bei geringem Stichprobenumfang über den Shapiro-Wilk-Test. Diese Tests wurden bei separater Betrachtung jedes Messzeitpunktes verwendet. Steht primär der Verlauf im Vordergrund, sollten die Zeitpunkte nicht separat, sondern gemeinsam betrachtet werden und es kam ein lineares gemischtes Modell zum Einsatz. Lineare gemischte Modelle treffen die Annahme, dass zusätzlich zu den populationsübergreifenden Effekten auch individuenspezifische Abweichungen von diesen Populationseffekten vorliegen können. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Modellform gewählt, um den Einfluss des Messzeitpunkts sowie der Gruppenzugehörigkeit auf das Ergebnis der VEGF-Konzentrationsbestimmung zu untersuchen.

3.5.3 Signifikanz und p-Werte

In dieser Arbeit wurde für alle Tests das Signifikanzniveau von 5% festgelegt, d.h. um die Nullhypothese zu verwerfen, muss der p-Wert kleiner 0,05 sein.

4 Ergebnisse

4.1 VEGF-Konzentrationen in Serum und Plasma

4.1.1 Morphologische Daten

In die Studie wurden insgesamt 133 Frauen mit einem durchschnittlichen Alter von 31 Jahren eingeschlossen (gesund/nicht schwanger: mittleres Alter 24,5 Jahre [n = 100], gesund/schwanger: mittleres Alter 35,4 Jahre [n = 18], GDM: mittleres Alter 32,1 Jahre [n = 15]). Darunter waren 15 Frauen mit GDM („Schwangere mit GDM“), 18 gesunde Schwangere („Gesunde Schwangere“) sowie 100 gesunde nicht schwangere Frauen („Gesunde Nichtschwangere“).

Die Tabellen 5 und 6 zeigen eine detaillierte Aufstellung der morphologischen Daten der Patientinnen sowie Daten zu Schwangerschaft und Geburt in den Vergleichskollektiven.

Tabelle 5: Morphologische Daten der schwangeren Patientinnen in den Vergleichskollektiven (ELISA)

	Gesunde Schwangere (n = 18)		Schwangere mit GDM (n = 15)		p-Wert
	MW±SD	Spannweite	MW±SD	Spannweite	T-Test
Alter (Jahre)	35,4±5	22	32,1±4	17	0,0476
Körpergröße (cm)	168±7	27	166±7	29	0,4200
BMI vor SS (kg/m ²)	23,8±3	9	30,8±7	21	0,0006

BMI = Body-Mass-Index, GDM = Gestationsdiabetes, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SS = Schwangerschaft

Tabelle 6: Daten zu Schwangerschaft und Geburt in den Vergleichskollektiven (ELISA)

	Gesunde Schwangere (n = 18)		Schwangere mit GDM (n = 15)		p-Wert
	MW±SD	Spannweite	MW±SD	Spannweite	T-Test
SS-Dauer (Wochen + Tage)	39,6±1	3+1	38,2±1	3+4	0,0004
Geburtsgewicht (g)	3413,8±361	1370	3497,3±589	2560	0,6206
Geburtsgröße (cm)	51,6±3	8	51,2±3	11	0,7055
Geburtsmodus	Anzahl		Anzahl		Fisher- Test
Vaginal	9		6		0,8935
Vaginal-operativ	3		2		
Sectio caesarea	6		7		

GDM = Gestationsdiabetes, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SS = Schwangerschaft

4.1.2 Vergleich der VEGF-Konzentrationen zwischen Serum und Plasma in der Gruppe „Gesunde Schwangere“

Um die VEGF-Konzentrationen zwischen Serum und Plasma in der Gruppe der gesunden Schwangeren zu vergleichen, wurde für jeden Messzeitpunkt (= Zeitpunkt der Probennahme) ein Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Auf diese Weise wurde überprüft, ob es zu irgendeinem Zeitpunkt in der Gruppe der gesunden Schwangeren bei VEGF A oder VEGF165b zu signifikanten Konzentrationsunterschieden zwischen Serum und Plasma kommt. Die Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler erfolgt unter Abschnitt 4.1.8.

4.1.2.1 VEGF A

In den Messungen 1-7 kann kein signifikanter Unterschied in der VEGF A-Konzentration zwischen Serum und Plasma gezeigt werden.

In den post partum abgenommenen Blutproben besteht bei VEGF A ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen Serum und Plasma ($p = 0,025$ [Messzeitpunkt 8]; $p = 0,047$ [Messzeitpunkt 9]; $p = 0,012$ [Messzeitpunkt 10]).

Der Verlauf der Serum- und Plasmakonzentrationen von VEGF A wird in Abbildung 4 dargestellt.

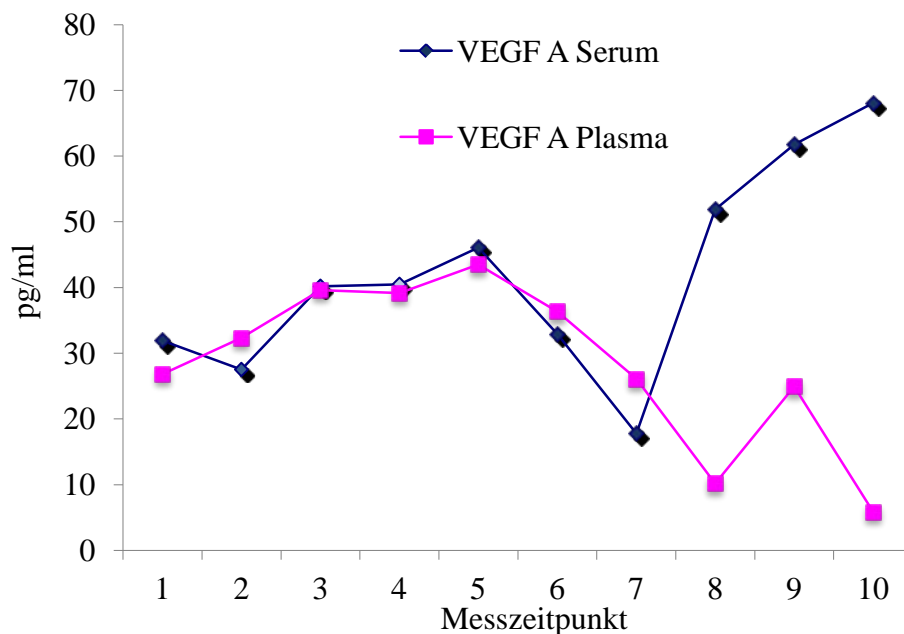


Abbildung 4: Verlauf der mittleren VEGF A-Serum- und Plasmakonzentrationen in pg/ml zu den 10 Messzeitpunkten in der Gruppe „Gesunde Schwangere“ ($n = 18$). Post partum besteht ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen Serum und Plasma ($p = 0,025$ [Messzeitpunkt 8]; $p = 0,047$ [Messzeitpunkt 9]; $p = 0,012$ [Messzeitpunkt 10]).

4.1.2.2 VEGF165b

Bei der Messung von VEGF165b kann während der gesamten Schwangerschaft und auch nach der Entbindung kein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen Serum und Plasma gezeigt werden.

Der Verlauf der Serum- und Plasmakonzentrationen von VEGF165b wird in Abbildung 5 dargestellt.

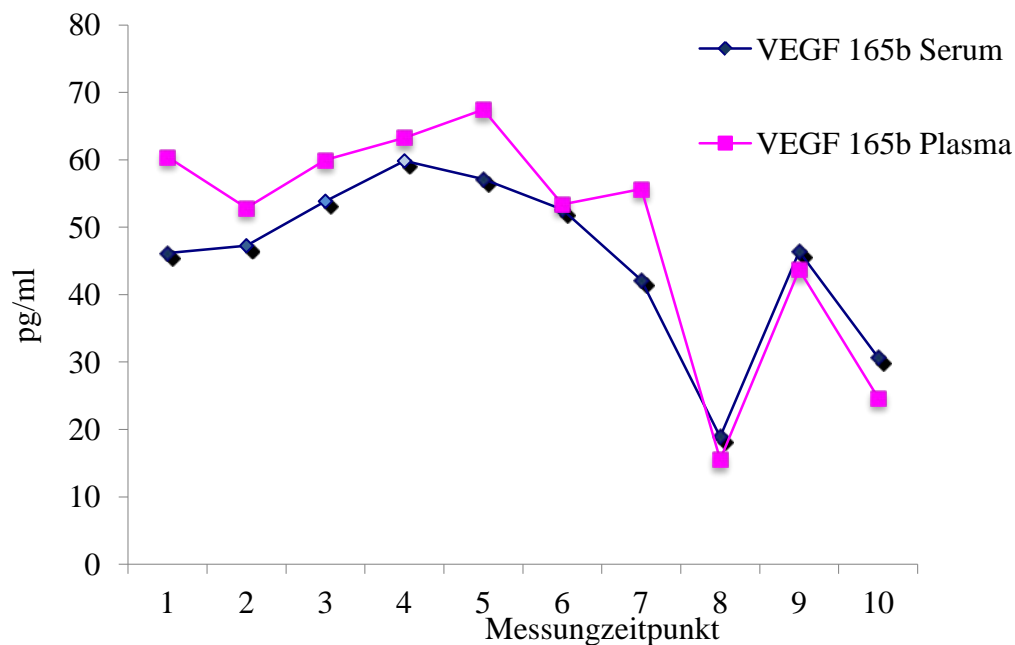


Abbildung 5: Verlauf der mittleren VEGF165b-Serum- und Plasmakonzentrationen in pg/ml zu den 10 Messzeitpunkten in der Gruppe „Gesunde Schwangere“ (n = 18). Zu keinem Zeitpunkt besteht ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen Serum und Plasma.

4.1.3 Vergleich der VEGF-Konzentrationen zwischen Serum und Plasma in der Gruppe „Schwangere mit Gestationsdiabetes“

Um die VEGF-Konzentrationen zwischen Serum und Plasma in der Gruppe der Gestationsdiabetikerinnen zu vergleichen, wurde für jeden Messzeitpunkt (= Zeitpunkt der Probennahme) ein Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Auf diese Weise wurde getestet, ob es zu irgendeinem Zeitpunkt in der Gruppe der Gestationsdiabetikerinnen bei VEGF A oder VEGF165b zu signifikanten Konzentrationsunterschieden zwischen Serum und Plasma kommt. Die Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler erfolgt unter Abschnitt 4.1.8.

4.1.3.1 VEGF A

In den Messungen 1-7 kann kein signifikanter Unterschied in der VEGF A-Konzentration zwischen Serum und Plasma gezeigt werden.

In den post partum abgenommenen Blutproben besteht bei VEGF A ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen Serum und Plasma ($p = 0,043$ [Messzeitpunkt 8]; $p = 0,028$ [Messzeitpunkt 9]; $p = 0,018$ [Messzeitpunkt 10]).

Der Verlauf der Serum-und Plasmakonzentrationen von VEGF A wird in Abbildung 6 dargestellt.

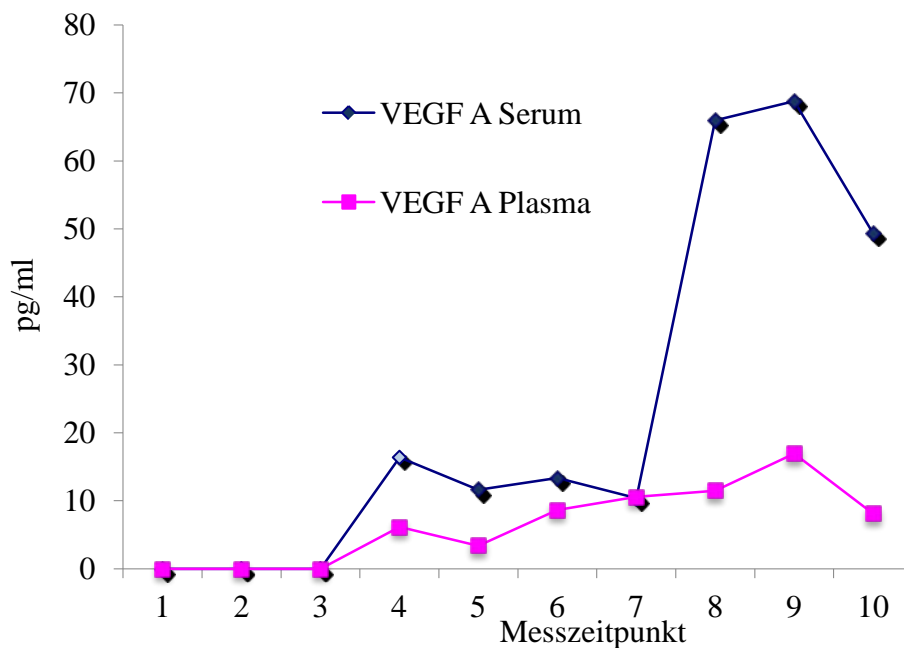


Abbildung 6: Verlauf der mittleren VEGF A-Serum- und Plasmakonzentrationen in pg/ml zu den 10 Messzeitpunkten in der Gruppe „Schwangere mit GDM“ (n = 15). Post partum besteht ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen Serum und Plasma ($p = 0,043$ [Messzeitpunkt 8]; $p = 0,028$ [Messzeitpunkt 9]; $p = 0,018$ [Messzeitpunkt 10]).

4.1.3.2 VEGF165b

Bei der Messung von VEGF165b kann während der gesamten Schwangerschaft und auch nach der Entbindung kein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen Serum und Plasma gezeigt werden.

Der Verlauf der Serum- und Plasmakonzentrationen von VEGF165b wird in Abbildung 7 dargestellt.

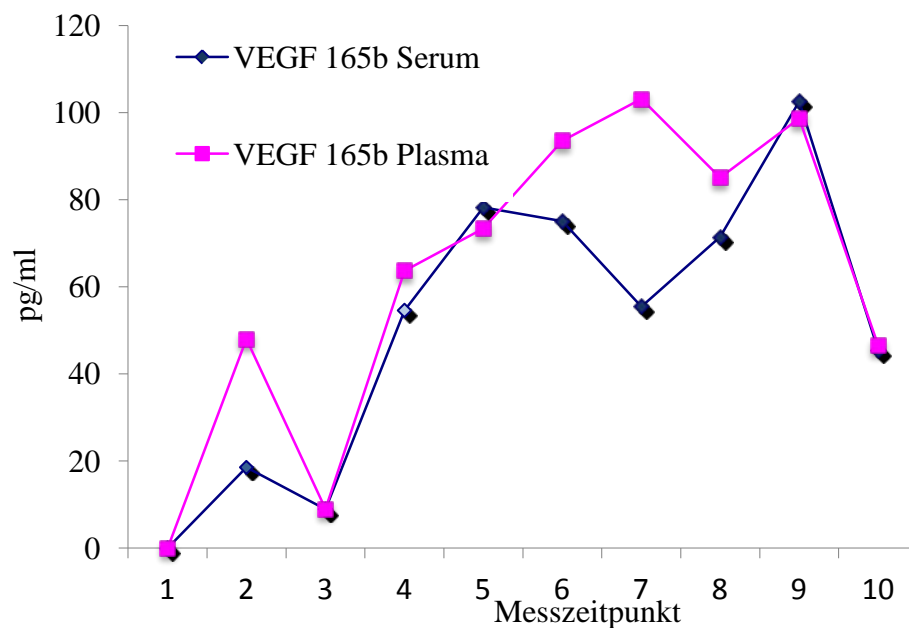


Abbildung 7: Verlauf der mittleren VEGF165b-Serum- und Plasmakonzentrationen in der Gruppe „Schwangere mit GDM“ (n = 15). Zu keinem Zeitpunkt besteht ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen Serum und Plasma.

4.1.4 Vergleich der VEGF-Konzentrationen zwischen Serum und Plasma in der Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“

Um die VEGF-Konzentrationen zwischen Serum und Plasma in der Gruppe der gesunden Nichtschwangeren zu vergleichen, wurde ein Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Auf diese Weise wurde getestet, ob es bei VEGF A oder VEGF165b zu signifikanten Konzentrationsunterschieden zwischen Serum und Plasma kommt.

4.1.4.1 VEGF A

Bei VEGF A besteht ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen Serum und Plasma ($p = 0,000$). In Tabelle 7 erfolgt die deskriptive Darstellung der Mittelwerte und

Standardfehler der Serum- und Plasmakonzentrationen. Abbildung 8 zeigt grafisch eine vergleichende Boxplotdarstellung der Serum- und Plasmakonzentrationen.

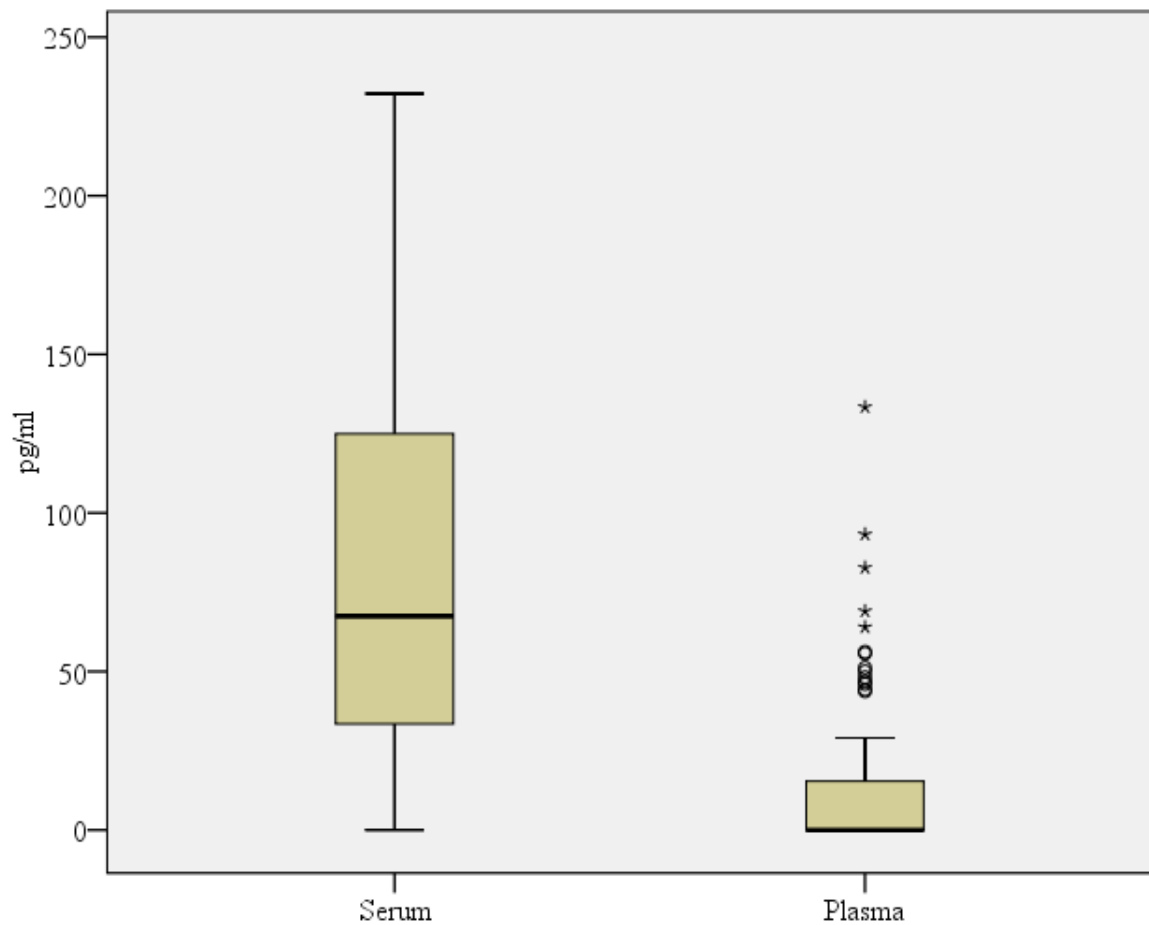


Abbildung 8: Grafische Darstellung der VEGF A-Serum- und Plasmakonzentrationen in der Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“ (n = 100). Es besteht ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen Serum und Plasma ($p = 0,000$).

Tabelle 7: Deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der VEGF A-Serum- und Plasmakonzentrationen in der Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“ (n = 100).

VEGF A Serum	Mittelwert (pg/ml)	119,45
	Standardfehler	28,87
VEGF A Plasma	Mittelwert (pg/ml)	36,49
	Standardfehler	17,91

4.1.4.2 VEGF165b

Bei VEGF165b besteht ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen Serum und Plasma ($p = 0,000$). In Tabelle 8 erfolgt die deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der Serum- und Plasmakonzentrationen. Abbildung 9 zeigt grafisch eine vergleichende Boxplotdarstellung der Serum- und Plasmakonzentrationen.

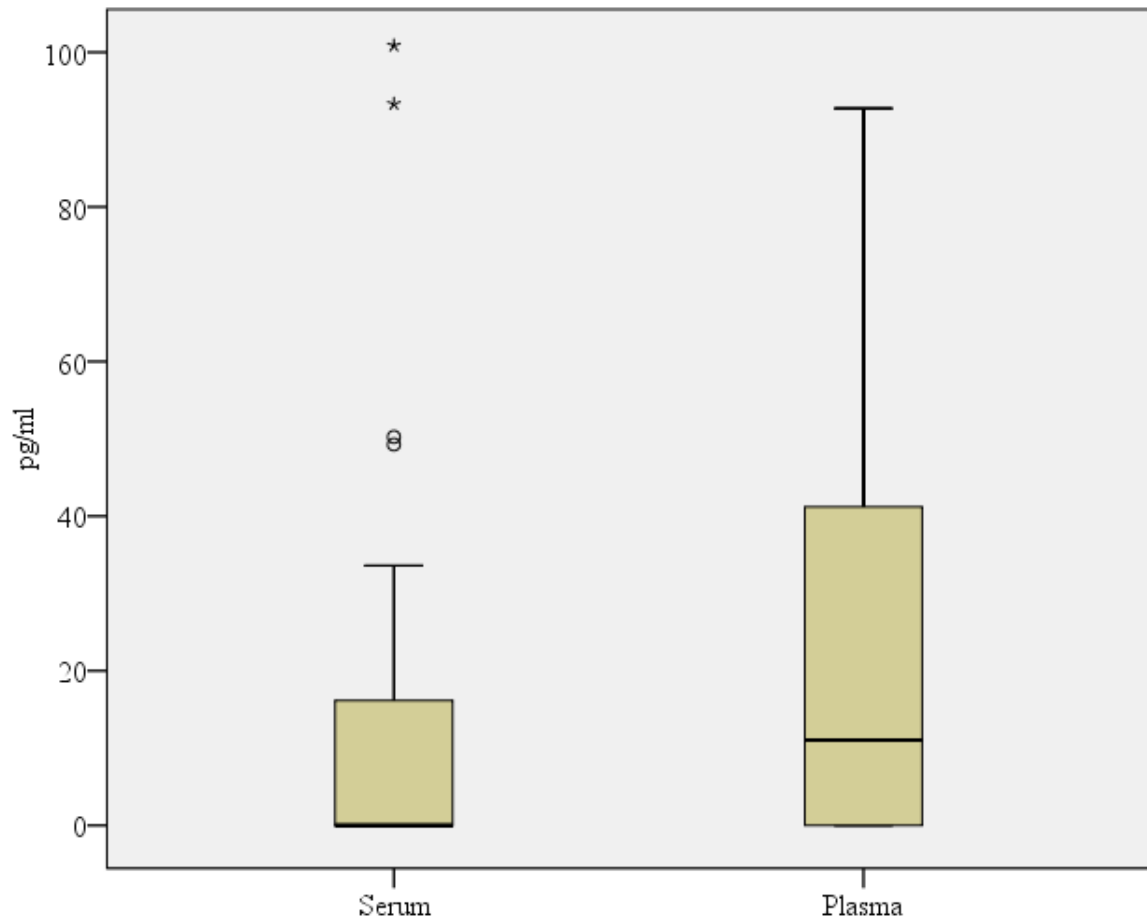


Abbildung 9: Grafische Darstellung der VEGF165b-Serum- und Plasmakonzentrationen in der Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“ ($n = 100$). Es besteht ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen Serum und Plasma (p -Wert = 0,000).

Tabelle 8: Deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der VEGF165b-Serum- und Plasmakonzentrationen in der Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“ (n = 100).

VEGF165b Serum	Mittelwert (pg/ml)	478,31
	Standardfehler	199,69
VEGF165b Plasma	Mittelwert (pg/ml)	489,00
	Standardfehler	199,32

4.1.5 Vergleich der VEGF-Konzentrationen zwischen verschiedenen Plasmen in der Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“

Um die VEGF-Konzentrationen in verschiedenen Plasmen zu vergleichen, wurde in der Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“ die VEGF-Konzentration in EDTA-, CTAD-, Citrat-Plasma bestimmt und statistisch überprüft (Friedman-Test, Wilcoxon-Test), ob es zu unterschiedlichen Ergebnissen zwischen den verschiedenen Plasmen kommt.

4.1.5.1 VEGF A

Bei VEGF A besteht kein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den Plasmen. In Tabelle 9 erfolgt die deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der Serum- und Plasmakonzentrationen. Abbildung 10 zeigt grafisch eine vergleichende Boxplotdarstellung der Serum- und Plasmakonzentrationen.

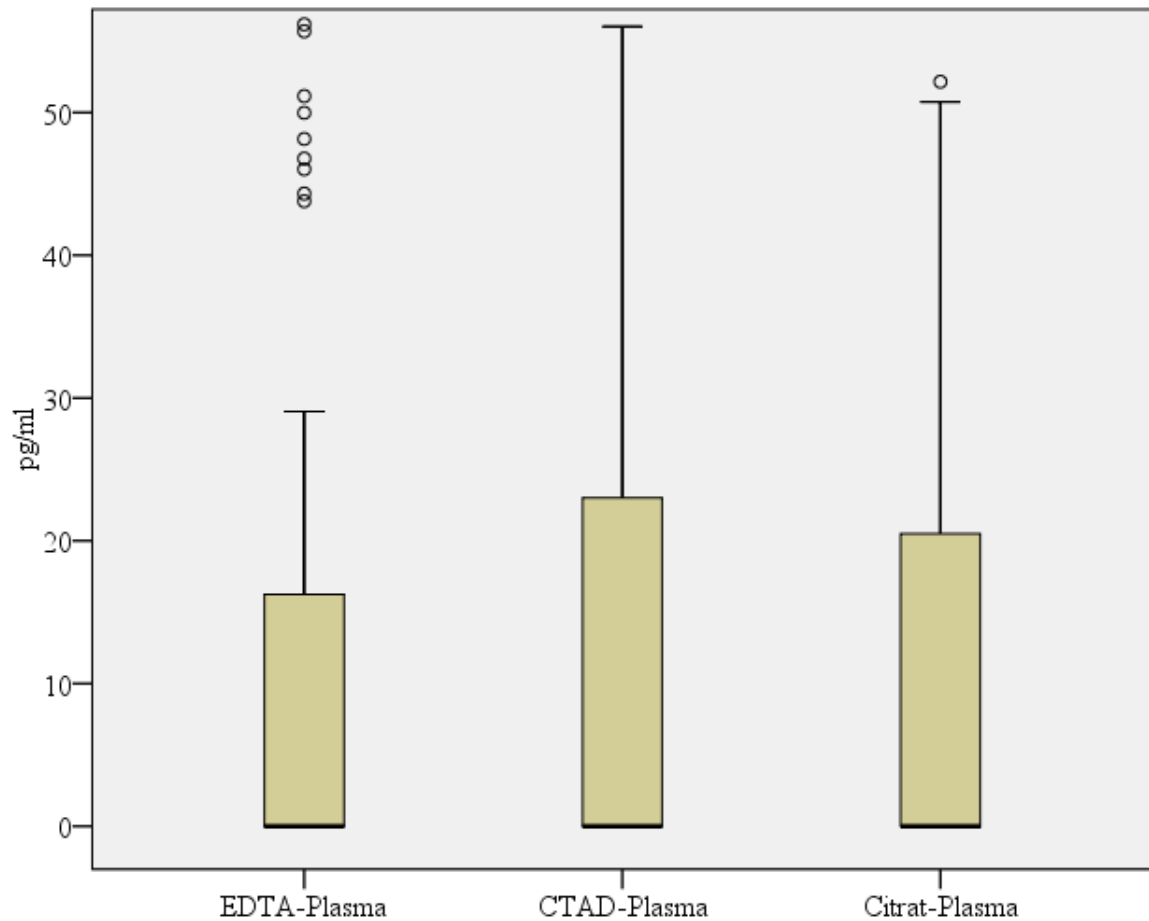


Abbildung 10: Grafische Darstellung der VEGF A-Konzentrationen in EDTA-, CTAD- und Citratplasma in der Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“ (n = 100). Es besteht kein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den Plasmen.

Tabelle 9: Deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der VEGF A-Konzentrationen in EDTA-, CTAD- und Citratplasma in der Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“ (n = 100).

EDTA-Plasma	Mittelwert (pg/ml)	38,75
	Standardfehler	18,34
CTAD-Plasma	Mittelwert (pg/ml)	47,10
	Standardfehler	23,35
Citrat-Plasma	Mittelwert (pg/ml)	48,15
	Standardfehler	23,85

4.1.5.2 VEGF165b

Bei VEGF165b besteht ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen EDTA- und CTAD-Plasma ($p = 0,000$) sowie zwischen EDTA- und Citrat-Plasma ($p = 0,000$). In Tabelle 10 erfolgt die deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der Serum- und Plasmakonzentrationen. Abbildung 11 zeigt grafisch eine vergleichende Boxplotdarstellung der Serum- und Plasmakonzentrationen.

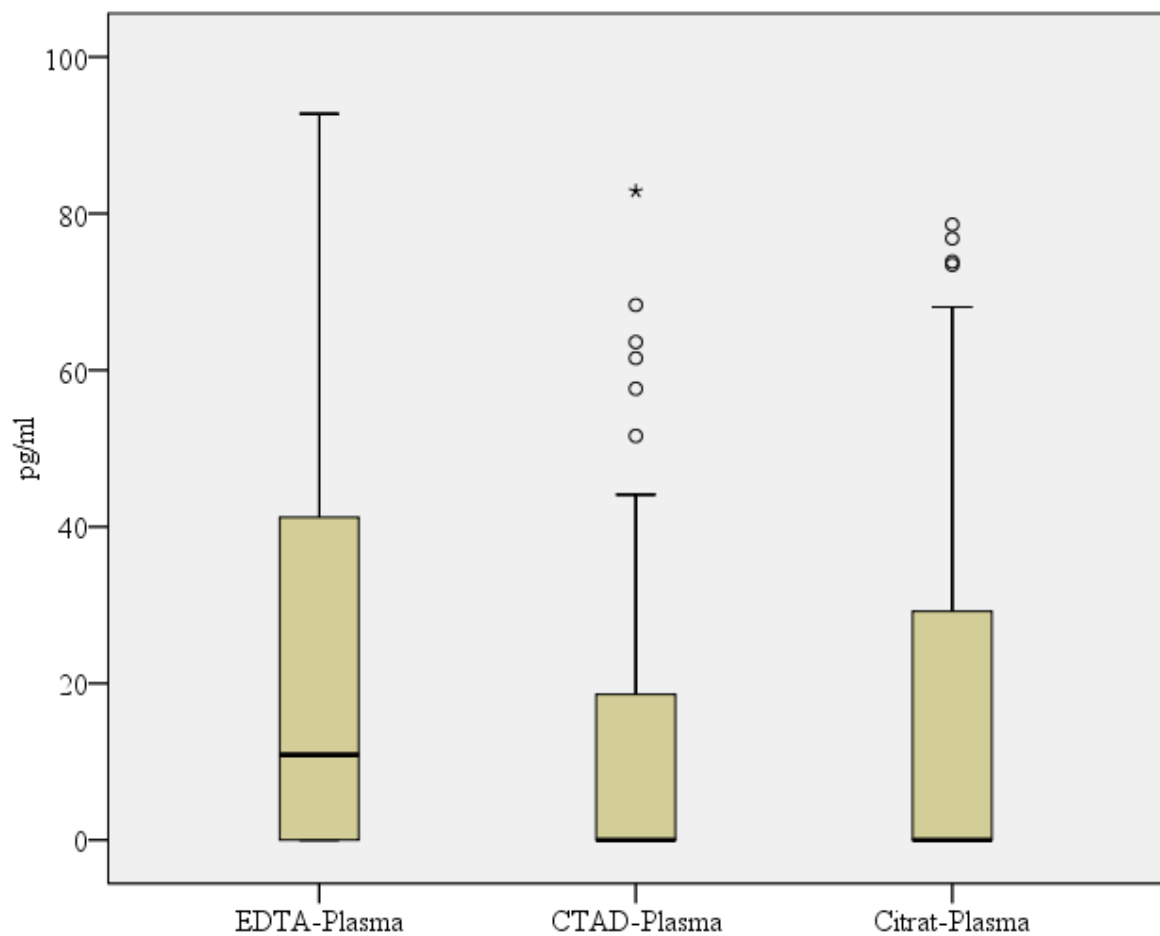


Abbildung 11: Grafische Darstellung der VEGF165b-Konzentrationen in EDTA-, CTAD- und Citratplasma in der Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“ ($n = 100$). Es besteht ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen EDTA- und CTAD-Plasma ($p = 0,000$) sowie zwischen EDTA- und Citrat-Plasma ($p = 0,000$).

Tabelle 10: Deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der VEGF165b-Konzentrationen in EDTA-, CTAD- und Citratplasma in der Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“ (n = 100).

EDTA-Plasma	Mittelwert (pg/ml)	512,90
	Standardfehler	209,68
CTAD-Plasma	Mittelwert (pg/ml)	501,32
	Standardfehler	210,24
Citrat-Plasma	Mittelwert (pg/ml)	508,83
	Standardfehler	210,98

4.1.6 Einfluss des Messzeitpunkts auf die VEGF-Konzentration

Mittels eines linearen gemischten Modells wurde geprüft, ob der Messzeitpunkt (= Zeitpunkt der Probennahme) bei den Gruppen „Gesunde Schwangere“ und „Schwangere mit GDM“ das Ergebnis der VEGF-Konzentrationsbestimmung beeinflusst. Verwendet wurden dabei jeweils die VEGF-Werte als Zielvariablen und die Gruppenzugehörigkeit („Gruppe“), die Messung („Messung“) sowie die Interaktion zwischen Gruppenzugehörigkeit und Messung („Gruppe*Messung“) als Einflussgrößen.

4.1.6.1 VEGF A

In Tabelle 11 wird mittels eines linearen gemischten Modells getestet, ob der Messzeitpunkt bei den Gruppen „Gesunde Schwangere“ und „Schwangere mit GDM“ einen Einfluss auf die VEGF A-Serumkonzentration hat. Der Effekt der Messung ist signifikant ($p = 0,0025$). Der Messzeitpunkt beeinflusst die VEGF A-Serumkonzentration.

Tabelle 11: Lineares gemischtes Modell zum Einfluss des Messzeitpunkts auf die VEGF A-Serumkonzentration. Der Effekt der Messung ist signifikant ($p = 0,0025$). Der Messzeitpunkt beeinflusst die VEGF A Serumkonzentration.

VEGF A Serum	B	Standardfehler	T	p-Wert
(Konstante)	-14.48	23.85	-0.607	0.5447
Gruppe	28.84	29.99	0.961	0.3437
Messung	6.77	2.21	3.064	0.0025**
Gruppe*Messung	-0.52	2.49	-0.210	0.8341

**zum 1%-Niveau signifikant

In Tabelle 12 wird mittels eines linearen gemischten Modells getestet, ob der Messzeitpunkt bei den Gruppen „Gesunde Schwangere“ und „Schwangere mit GDM“ einen Einfluss auf die VEGF A-Plasmakonzentration hat. Der Effekt der Messung ist nicht signifikant.

Tabelle 12: Lineares gemischtes Modell zum Einfluss des Messzeitpunkts auf die VEGF A-Plasmakonzentration. Der Effekt der Messung ist nicht signifikant.

VEGF A Plasma	B	Standardfehler	T	p-Wert
(Konstante)	7.43	18.91	0.393	0.695
Gruppe	22.14	24.62	0.899	0.376
Messung	0.46	1.31	0.352	0.725
Gruppe*Messung	0.72	1.47	0.487	0.627

4.1.6.2 VEGF165b

In Tabelle 13 wird mittels eines linearen gemischten Modells getestet, ob der Messzeitpunkt bei den Gruppen „Gesunde Schwangere“ und „Schwangere mit GDM“ einen Einfluss auf die VEGF165b-Serumkonzentration hat. Der Effekt der Messung ist signifikant ($p = 0,0471$). Der Messzeitpunkt beeinflusst die VEGF165b Serumkonzentration.

Tabelle 13: Lineares gemischtes Modell zum Einfluss des Messzeitpunkts auf die VEGF165b-Serumkonzentration. Der Effekt der Messung ist signifikant ($p = 0,0471$). Der Messzeitpunkt beeinflusst die VEGF165b-Serumkonzentration.

VEGF 165b Serum	B	Standardfehler	T	p-Wert
(Konstante)	64.5	19.14	3.37	0.0009
Gruppe	-18.8	25.46	-0.74	0.4649
Messung	3.1	1.56	2.00	0.0471 **
Gruppe*Messung	1.1	1.96	-0.57	0.5724

**zum 5%-Niveau signifikant

In Tabelle 14 wird mittels eines linearen gemischten Modells getestet, ob der Messzeitpunkt bei den Gruppen „Gesunde Schwangere“ und „Schwangere mit GDM“ einen Einfluss auf die VEGF165b Plasmakonzentration hat. Der Effekt der Messung ist nicht signifikant.

Tabelle 14: Lineares gemischtes Modell zum Einfluss des Messzeitpunkts auf die VEGF165b-Plasmakonzentration. Der Effekt der Messung ist nicht signifikant.

VEGF 165b Plasma	B	Standardfehler	T	p-Wert
(Konstante)	97.5	25.3	3.86	0.0002
Gruppe	-41.5	33.6	-1.24	0.2256
Messung	-0.5	1.2	-0.40	0.6927
Gruppe*Messung	1.0	1.3	0.72	0.4727

4.1.7 Vergleich der VEGF-Konzentrationen zwischen den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ und „Gesunde Schwangere“

Um die VEGF-Konzentrationen zwischen den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ und „Gesunde Schwangere“ miteinander zu vergleichen, wurden die Absolutwerte in der Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“ und die Mittelwerte der Zeitreihen während der Schwangerschaft (Messzeitpunkt 1-7) in der Gruppe „Gesunde Schwangere“ verwendet

und mittels des Mann-Whitney-U-Tests auf Unterschiede getestet. Die Werte werden grafisch und deskriptiv dargestellt.

4.1.7.1 VEGF A

Bei VEGF A besteht im Serum ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ und „Gesunde Schwangere“ ($p < 0,000$). In Tabelle 15 erfolgt die deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der Serumkonzentrationen der jeweiligen Gruppe. Abbildung 12 zeigt grafisch eine vergleichende Boxplotdarstellung der Serumkonzentrationen in den Gruppen.

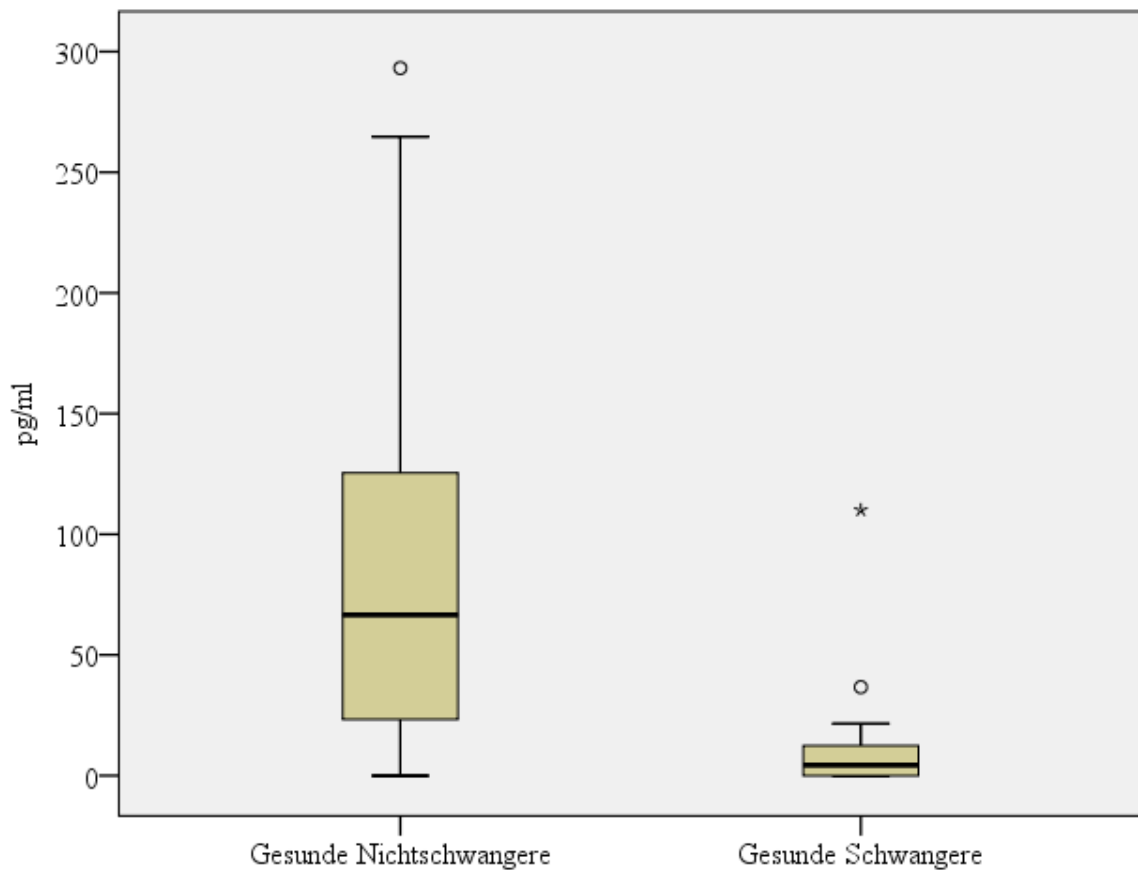


Abbildung 12: Grafische Darstellung der VEGF A-Serumkonzentrationen in den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ (n = 100) und „Gesunde Schwangere“ (n = 18). Die Gruppen unterscheiden sich signifikant ($p < 0,000$).

Tabelle 15: Deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der VEGF A-Serumkonzentrationen in den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ (n = 100) und „Gesunde Schwangere“ (n = 18).

Gesunde Nichtschwangere	Mittelwert (pg/ml)	115,96
	Standardfehler	27,01
Gesunde Schwangere	Mittelwert (pg/ml)	35,77
	Standardfehler	23,50

Bei VEGF A besteht im Plasma kein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ und „Gesunde Schwangere“. In Tabelle 16 erfolgt die deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der Plasmakonzentrationen der jeweiligen Gruppe. Abbildung 13 zeigt grafisch eine vergleichende Boxplotdarstellung der Plasmakonzentrationen in den Gruppen.

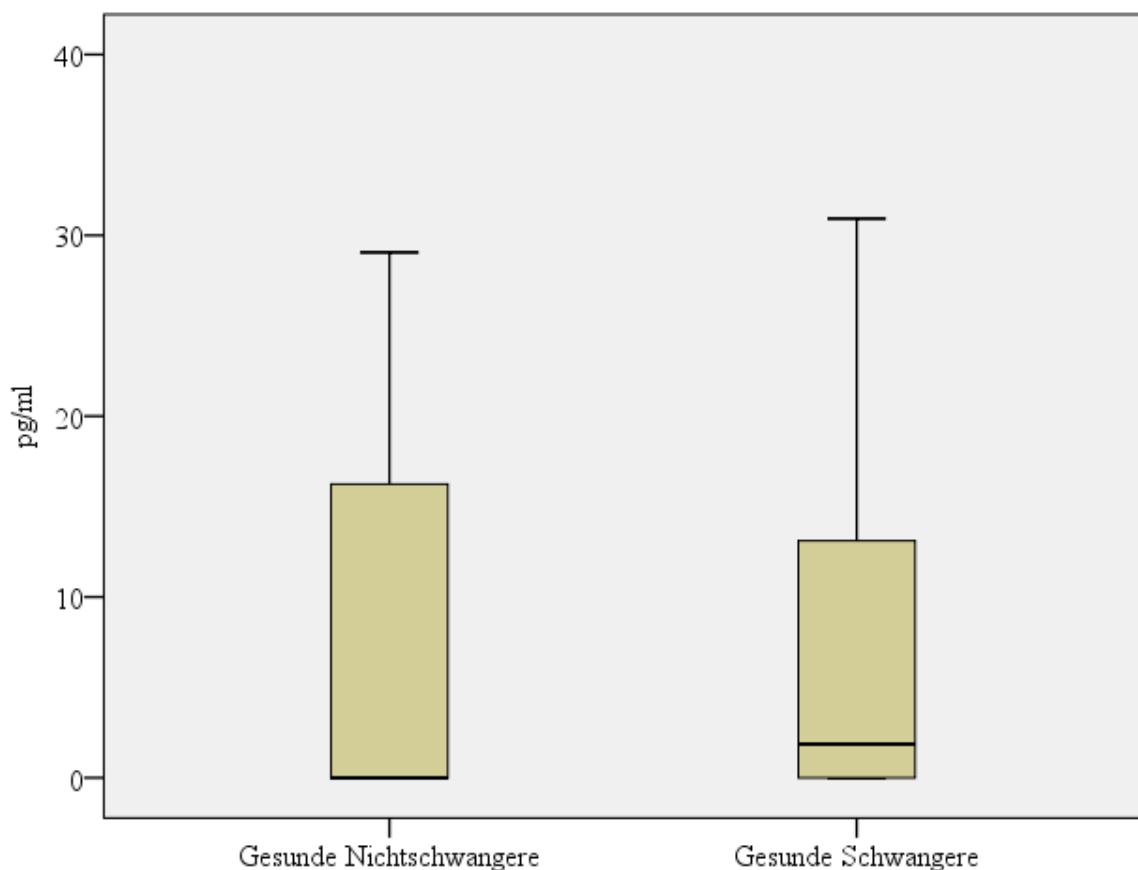


Abbildung 13: Grafische Darstellung der VEGF A-Plasmakonzentrationen in den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ (n = 100) und „Gesunde Schwangere“ (n = 18). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Tabelle 16: Deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der VEGF A-Plasmakonzentrationen in den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ (n = 100) und „Gesunde Schwangere“ (n = 18).

Gesunde Nichtschwangere	Mittelwert (pg/ml)	37,32
	Standardfehler	17,57
Gesunde Schwangere	Mittelwert (pg/ml)	35,17
	Standardfehler	21,05

4.1.7.2 VEGF165b

Bei VEGF165b besteht im Serum ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ und „Gesunde Schwangere“ ($p = 0,009$). In Tabelle 17 erfolgt die deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der Serumkonzentrationen der jeweiligen Gruppe. Abbildung 14 zeigt grafisch eine vergleichende Boxplotdarstellung der Serumkonzentrationen in den Gruppen.

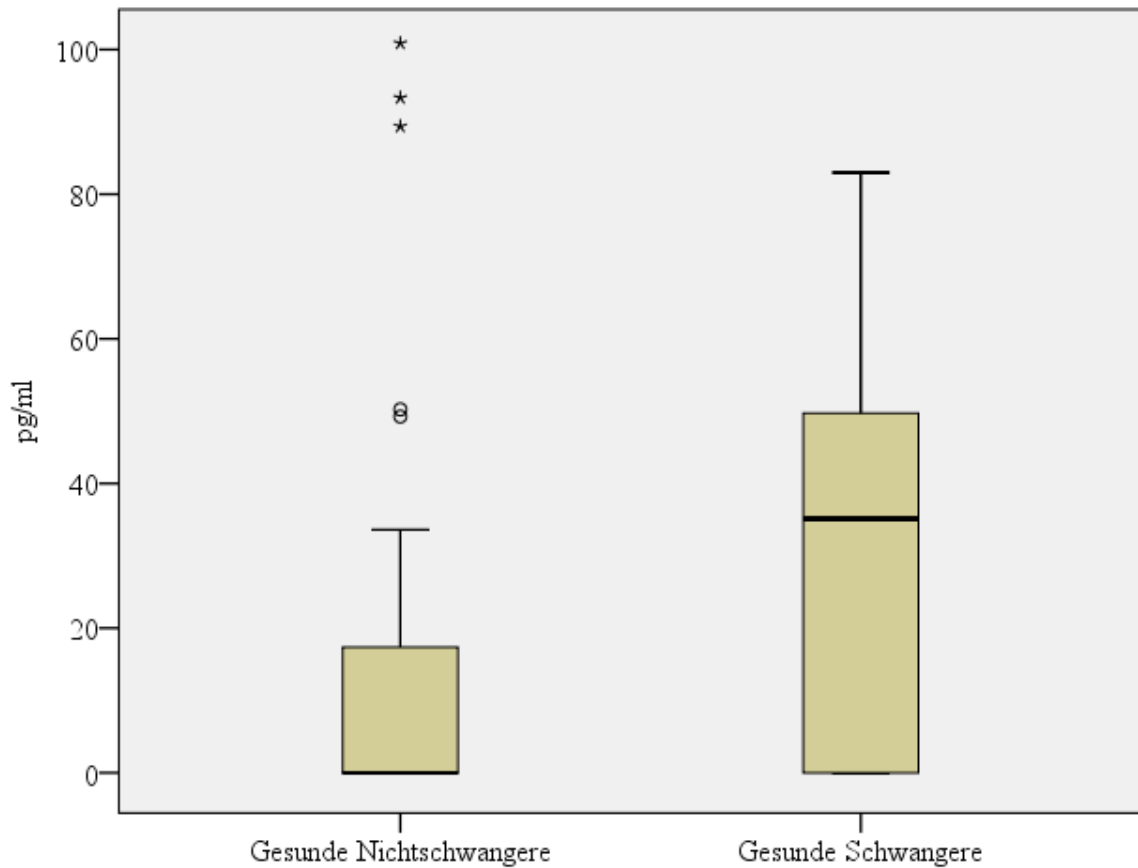


Abbildung 14: Grafische Darstellung der VEGF165b-Serumkonzentrationen in den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ (n = 100) und „Gesunde Schwangere“ (n = 18). Die Gruppen unterscheiden sich signifikant ($p = 0,009$).

Tabelle 17: Deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der VEGF165b-Serumkonzentrationen in den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ (n = 100) und „Gesunde Schwangere“ (n = 18).

Gesunde Nichtschwangere	Mittelwert (pg/ml)	452,24
	Standardfehler	188,51
Gesunde Schwangere	Mittelwert (pg/ml)	53,31
	Standardfehler	19,73

Bei VEGF165b besteht im Plasma kein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ und „Gesunde Schwangere“. In Tabelle 18 erfolgt die deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der

Plasmakonzentrationen der jeweiligen Gruppe. Abbildung 15 zeigt grafisch eine vergleichende Boxplotdarstellung der Plasmakonzentrationen in den Gruppen.

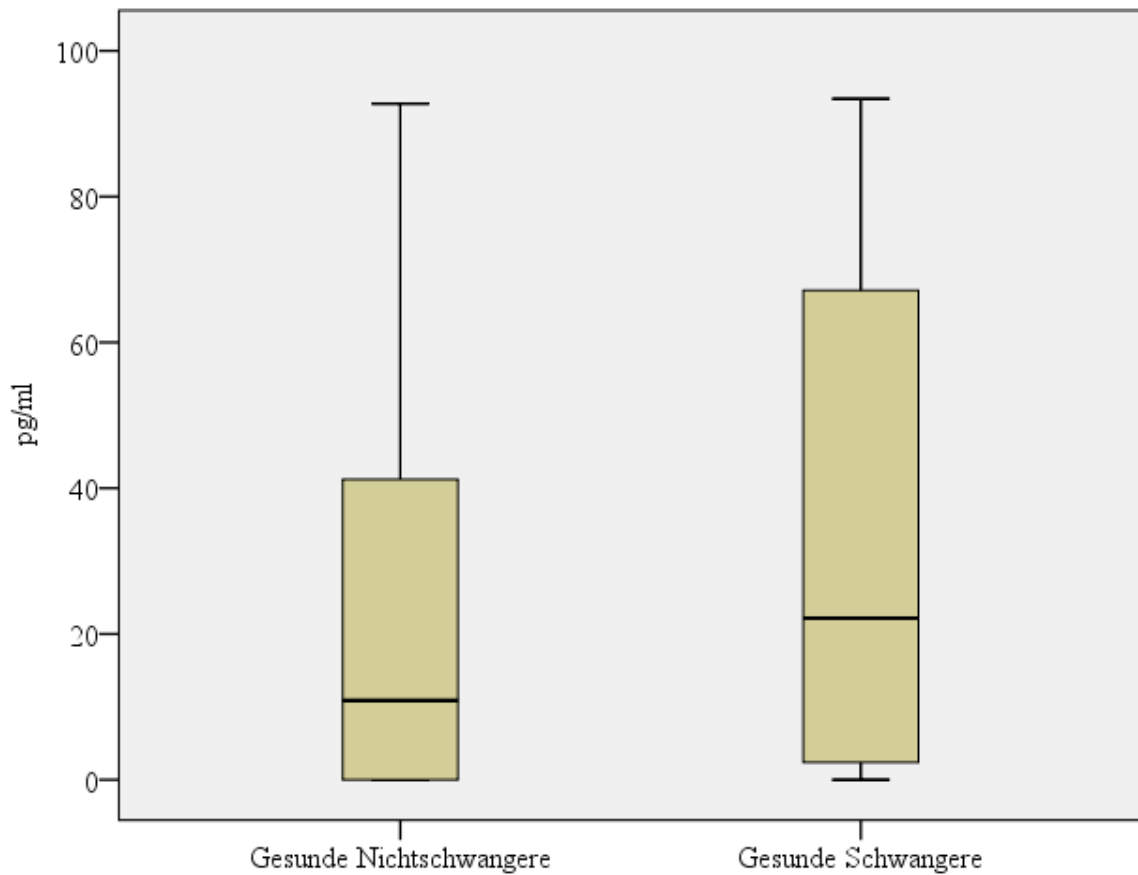


Abbildung 15: Grafische Darstellung der VEGF165b-Plasmakonzentrationen in den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ (n = 100) und „Gesunde Schwangere“ (n = 18). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Tabelle 18: Deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der VEGF165b-Plasmakonzentrationen in den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ (n = 100) und „Gesunde Schwangere“ (n = 18).

Gesunde Nichtschwangere	Mittelwert (pg/ml)	484,21
	Standardfehler	197,37
Gesunde Schwangere	Mittelwert (pg/ml)	58,66
	Standardfehler	21,43

4.1.8 Vergleich des Verlaufs der VEGF-Konzentrationen zwischen den Gruppen „Gesunde Schwangere“ und „Schwangere mit Gestationsdiabetes“

Um den Verlauf der VEGF-Konzentrationen zu den 10 Messzeitpunkten zwischen den Gruppen „Gesunde Schwangere“ und „Schwangere mit GDM“ zu vergleichen, wurde ein lineares gemischtes Modell verwendet. Dieses Modell wird eingesetzt, wenn primär der Verlauf im Vordergrund steht und berücksichtigt zusätzlich zu den populationsübergreifenden Effekten auch individuenspezifische Abweichungen von diesen Populationseffekten. Die Darstellung dieses Modells erfolgte bereits im Abschnitt 4.1.6 und zeigt, dass der Effekt der Gruppe nicht signifikant ist, das heißt die Gruppenzugehörigkeit hat keinen Einfluss auf die VEGF-Konzentration. Zusätzlich wurden auch die Mittelwerte bzw. die Verteilungen separat nach Messzeitpunkt gegenübergestellt und statistisch auf signifikante Unterschiede überprüft.

4.1.8.1 VEGF A Serum

Bei den gesunden Schwangeren lag zu Beginn der Schwangerschaft die VEGF A-Serumkonzentration im Mittel bei 31,9 pg/ml, stieg bis zur 28+0 - 32+6 SSW auf 46,1 pg/ml an, fiel dann zum Ende der Schwangerschaft auf den niedrigsten Wert von 17,8 pg/ml ab. Im Wochenbett stieg die VEGF A-Serumkonzentration wieder an und erreichte 6 Monate post partum mit 68,1 pg/ml den höchsten Wert (Tabelle 19).

Bei den Schwangeren mit GDM konnten bei den ersten drei Untersuchungsterminen keine messbaren VEGF A-Serumkonzentrationen ermittelt werden. Erst in der 23+0 - 27+6 SSW wurde eine mittlere VEGF A-Serumkonzentration von 16,4 pg/ml gemessen, die bis zum Ende der Schwangerschaft relativ unverändert blieb. Im Wochenbett erreichte der Parameter 6 Wochen nach der Geburt den maximalen Wert von 68,8 pg/ml und fiel 6 Monate post partum wieder auf 49,3 pg/ml ab (Tabelle 19).

Vergleicht man den Verlauf der VEGF A-Serumkonzentrationen zwischen den beiden Gruppen weist die Gruppe mit GDM bis zum Ende der Schwangerschaft im Mittel niedrigere Werte als das gesunde Vergleichskollektiv auf. Nach der Geburt nähern sich die die VEGF A-Serumkonzentrationen beider Gruppen an.

Statistische Tests auf Gruppenunterschiede (T-Test, Mann-Whitney-U-Test) ergeben keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

Tabelle 19: VEGF A-Serumkonzentrationen in pg/ml (MW \pm SEM) in den Gruppen „Gesunde Schwangere“ (n = 18) und „Schwangere mit GDM“ (n = 15) zu den 10 Messzeitpunkten. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Messung	Gesunde Schwangere (MW \pm SEM)	Schwangere mit GDM (MW \pm SEM)
1	31,9 \pm 18	0,0 \pm 0
2	27,5 \pm 19	0,0 \pm 0
3	40,2 \pm 31	0,0 \pm 0
4	40,5 \pm 30	16,4 \pm 8
5	46,1 \pm 29	11,6 \pm 7
6	32,9 \pm 20	13,4 \pm 6
7	17,8 \pm 11	10,4 \pm 7
8	51,9 \pm 17	66,0 \pm 20
9	61,8 \pm 12	68,8 \pm 26
10	68,1 \pm 17	49,3 \pm 20

GDM = Gestationsdiabetes, MW = Mittelwert, SEM = Standardfehler

4.1.8.2 VEGF A Plasma

Bei den gesunden Schwangeren lag zu Beginn der Schwangerschaft die VEGF A-Plasmakonzentration im Mittel bei 26,8 pg/ml, erreichte in der 23+0 - 27+6 SSW den höchsten Wert von 43,5 pg/ml und fiel am Ende der Schwangerschaft auf 26,1 pg/ml ab. Im Wochenbett lag die VEGF A-Plasmakonzentration anfangs niedriger als am Schwangerschaftsende, stieg 6 Wochen post partum wieder auf 25,0 pg/ml und fiel 6 Monate post partum auf den niedrigsten Wert von 5,8 pg/ml. Die Plasmakonzentrationen liegen meistens etwas unter den im Serum gemessenen Werten (Tabelle 20).

Bei den Schwangeren mit GDM konnten, wie auch im Serum, im Plasma bei den ersten drei Untersuchungsterminen keine messbaren VEGF A-Konzentrationen ermittelt werden. Erst in der 23+0 - 27+6 SSW konnte eine mittlere VEGF A-Plasmakonzentration von 6,2

pg/ml gemessen werden. Dieser Wert blieb stieg zum Ende der Schwangerschaft auf 10,6 pg/ml an, erreichte 6 Wochen post partum einen Wert von 16,9 pg/ml und fiel 6 Monate post partum auf 8,1 pg/ml ab. Im Vergleich zu den im Serum gemessenen Werten sind die VEGF A-Konzentrationen im Plasma deutlich niedriger (Tabelle 20).

Vergleicht man den Verlauf der VEGF A-Plasmakonzentrationen weist die Gruppe mit GDM im Mittel niedrigere Werte als das gesunde Vergleichskollektiv auf. Wie bereits bei den Serum-Messungen beobachtet, nähern sich die Werte der zwei Gruppen nach der Geburt einander an.

Statistische Tests auf Gruppenunterschiede (T-Test, Mann-Whitney-U-Test) ergeben keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

Tabelle 20: VEGF A-Plasmakonzentrationen in pg/ml (MW \pm SEM) in den Gruppen „Gesunde Schwangere“ (n = 18) und „Schwangere mit GDM“ (n = 15) zu den 10 Messzeitpunkten. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Messung	Gesunde Schwangere (MW \pm SEM)	Schwangere mit GDM (MW \pm SEM)
1	26,8 \pm 16	0,0 \pm 0
2	32,3 \pm 19	0,0 \pm 0
3	39,6 \pm 26	0,0 \pm 0
4	39,1 \pm 26	6,2 \pm 4
5	43,5 \pm 27	3,4 \pm 3
6	36,3 \pm 21	8,7 \pm 5
7	26,1 \pm 21	10,6 \pm 7
8	10,2 \pm 4	11,5 \pm 7
9	25,0 \pm 17	16,9 \pm 11
10	5,8 \pm 4	8,1 \pm 7

GDM = Gestationsdiabetes, MW = Mittelwert, SEM = Standardfehler

4.1.8.3 VEGF165b Serum

Bei den gesunden Schwangeren lag zu Beginn der Schwangerschaft die VEGF165b-Serumkonzentration im Mittel bei 46,1 pg/ml, stieg bis zur 23+0 - 27+6 SSW auf den maximalen Wert von 59,8 pg/ml an und fiel zum Schwangerschaftsende auf 42,1 pg/ml. Der niedrigste Wert von 18,9 pg/ml wurde im Wochenbett erreicht und stieg 6 Wochen post partum wieder auf 46,4 pg/ml an (Tabelle 21).

Bei den schwangeren mit GDM lag beim ersten Untersuchungszeitpunkt die mittlere Serumkonzentration von VEGF165b im nicht messbaren Bereich. Bei der zweiten Blutabnahme konnte eine VEGF165b-Serumkonzentration von 18,5 pg/ml gemessen werden und erreichte in SSW 28+0 - 32+6 mit 78,2 pg/ml den höchsten gemessenen Wert während der Schwangerschaft. Der Maximalwert von 102,6 pg/ml wurde 6 Wochen post partum erreicht (Tabelle 21).

Vergleicht man den Verlauf der VEGF165b-Serumkonzentrationen liegen die gemessenen Werte im Mittel bei den Gestationsdiabetikerinnen in der ersten Hälfte der Schwangerschaft unter und in der zweiten Hälfte sowie post partum über den Werten der gesunden Schwangeren. Nach der Geburt zeigen beide Gruppen ähnliche Verläufe.

Statistische Tests auf Gruppenunterschiede (T-Test, Mann-Whitney-U-Test) ergeben keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

Tabelle 21: VEGF165b-Serumkonzentrationen in pg/ml (MW \pm SEM) in den Gruppen „Gesunde Schwangere“ (n = 18) und „Schwangere mit GDM“ (n = 15) zu den 10 Messzeitpunkten. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Messung	Gesunde Schwangere (MW \pm SEM)	Schwangere mit GDM (MW \pm SEM)
1	46,1 \pm 15	0,0 \pm 0
2	47,3 \pm 18	18,5 \pm 19
3	53,9 \pm 24	8,9 \pm 9
4	59,8 \pm 25	54,6 \pm 33
5	57,1 \pm 23	78,2 \pm 30
6	52,6 \pm 19	75,0 \pm 31
7	42,1 \pm 14	55,4 \pm 47
8	18,9 \pm 7	71,5 \pm 46
9	46,4 \pm 17	102,6 \pm 50
10	30,6 \pm 11	45,4 \pm 31

GDM = Gestationsdiabetes, MW = Mittelwert, SEM = Standardfehler

4.1.8.4 VEGF165b Plasma

Bei den gesunden Schwangeren lag zu Beginn der Schwangerschaft die VEGF165b-Plasmakonzentration im Mittel bei 60,4 pg/ml, stieg bis zur 28+0 - 32+6 SSW auf den maximalen Wert von 67,5 pg/ml an und fiel dann zum Ende der Schwangerschaft auf 55,7 pg/ml ab. Der niedrigste Wert von 15,5 pg/ml wurde im Wochenbett erreicht. Die Werte liegen damit etwas höher als im Serum (Tabelle 22).

Bei den Schwangeren mit GDM lag beim ersten Untersuchungszeitpunkt die mittlere Plasmakonzentration von VEGF165b wie auch im Serum im nicht messbaren Bereich. Bei der zweiten Blutabnahme konnte eine VEGF 165b-Plasmakonzentration von 48,0 pg/ml gemessen werden und es folgte ein diskontinuierlicher Konzentrationsanstieg bis zu einem Maximum von 103,2 pg/ml am Ende der Schwangerschaft. Die Konzentrationen im Plasma liegen etwas höher als im Serum (Tabelle 22).

Vergleicht man den Verlauf der VEGF165b-Plasmakonzentrationen liegen die Werte im Mittel bei den Gestationsdiabetikerinnen in der ersten Hälfte der Schwangerschaft unter und in der zweiten Hälfte sowie post partum über den Werten der gesunden Schwangeren. Nach der Geburt zeigen beide Gruppen ähnliche Verläufe. Dies konnte auch bei den VEGF165b-Serumkonzentrationen beobachtet werden.

Statistische Tests auf Gruppenunterschiede (T-Test, Mann-Whitney-U-Test) ergeben keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

Tabelle 22: VEGF165b-Plasmakonzentrationen in pg/ml (MW±SEM) in den Gruppen „Gesunde Schwangere“ (n = 18) und „Schwangere mit GDM“ (n = 15) zu den 10 Messzeitpunkten. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Messung	Gesunde Schwangere (MW±SEM)	Schwangere mit GDM (MW±SEM)
1	60,4±21	0,0±0
2	52,9±21	48,0±48
3	60,0±25	9,0±9
4	63,3±24	63,7±45
5	67,5±28	73,4±27
6	53,4±21	93,5±32
7	55,7±24	103,2±55
8	15,5±5	85,0±43
9	43,7±19	98,7±41
10	24,7±10	46,5±32

GDM = Gestationsdiabetes, MW = Mittelwert, SEM = Standardfehler

4.2 Immunhistochemie

4.2.1 Morphologische Daten

Für die immunhistochemische Färbung wurden jeweils 40 Plazenten von gesunden Schwangeren, die als Vergleichskollektiv dienten und von Patientinnen mit GDM verwendet. Es handelt sich bei diesen Patientinnen um andere als bei den ELISA-Untersuchungen.

Die nachfolgenden Tabellen 23 und 24 zeigen eine detaillierte Aufstellung der morphologischen Daten der Patientinnen sowie Daten zu Schwangerschaft und Geburt in den Vergleichskollektiven.

Tabelle 23: Morphologische Daten der schwangeren Patientinnen in den Vergleichskollektiven (IHC)

	Gesunde Schwangere (n = 40)		Schwangere mit GDM (n = 40)		p-Wert
	MW±SD	Spannweite	MW±SD	Spannweite	T-Test
Alter (Jahre)	31,2±6	14	32,8±5	20	0,1989
Körpergröße (cm)	167±6	29	166±7	28	0,4948
BMI vor SS (kg/m ²)	23,4±6	28	28,1±7	29	0,0018

BMI = Body-Mass-Index, GDM = Gestationsdiabetes, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SS = Schwangerschaft

Tabelle 24: Daten zu Schwangerschaft und Geburt in den Vergleichskollektiven (IHC)

	Gesunde Schwangere (n = 40)		Schwangere mit GDM (n = 40)		p-Wert
	MW±SD	Spannweite	MW±SD	Spannweite	T-Test
SS-Dauer (Wochen)	39,8±1	5	39,9±1	6	0,4689
Geburtsgewicht (g)	3316,9±502	2285	3611,4±536	2750	0,0132
Geburtsgröße (cm)	50,9±3	10	51,9±2	11	0,0833
Geburtsmodus	Anzahl		Anzahl		Fisher- Test
Vaginal	22		19		0,4487
Vaginal-operativ	10		8		
Sectio caesarea	8		13		

GDM = Gestationsdiabetes, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SS = Schwangerschaft

4.2.2 Expression von VEGF und VEGF165b in Plazenten

Die mittels Immunhistochemie gefärbten Plazentaschnitte wurden unter dem Lichtmikroskop durch Ermittlung des IRS ausgewertet. Der IRS wurde jeweils für den Synzytiotrophoblasten als auch für den extravillösen Trophoblasten der Plazenta bestimmt. Die Ergebnisse dieser Auswertung werden in den Tabellen 25 und 26 dargestellt.

Tabelle 25: Auswertung der Immunhistochemie mittels des IRS für VEGF A

IRS	Synzytio- trophoblast GDM	Synzytio- trophoblast Kontrolle	Extravillöser Trophoblast GDM	Extravillöser Trophoblast Kontrolle
0-2 = negativ	12,5%	10%	30%	27,5%
3-4 = schwach positiv	25%	22,5%	32,5%	27,5%
6-8 = mäßig positiv	50%	55%	27,5%	35%
9-12 = stark positiv	12,5%	12,5%	10%	10%

IRS = Immunreaktiver Score, GDM = Gestationsdiabetes (n = 40), Kontrolle = gesunde Schwangere (n = 40)

Tabelle 26: Auswertung der Immunhistochemie mittels des IRS für VEGF165b

IRS	Synzytio- trophoblast GDM	Synzytio- trophoblast Kontrolle	Extravillöser Trophoblast GDM	Extravillöser Trophoblast Kontrolle
0-2 = negativ	55%	50%	50%	42,5%
3-4 = schwach positiv	40%	42,5%	35%	40%
6-8 = mäßig positiv	5%	7,5%	15%	17,5%
9-12 = stark positiv	0%	0%	0%	0%

IRS = Immunreaktiver Score, GDM = Gestationsdiabetes (n = 40), Kontrolle = gesunde Schwangere (n = 40)

In den gefärbten Plazenten konnte sowohl bei VEGF A als auch bei VEGF165b eine Anfärbung des Trophoblasten gesehen werden. Das Zytoplasma der Synzytiotrophoblastzellen und der Zellen des extravillösen Trophoblasten war schwach, mittel oder stark angefärbt. Ein kleiner Prozentteil des Kollektivs zeigte eine so schwache Anfärbung, dass sich durch Bestimmung des IRS ein negatives Ergebnis ergab. Außerdem konnte eine positive Farbreaktion in fetalen und maternalen Endothelzellen, in villösen Gefäßen und im Stroma der Dezidua beobachtet werden.

VEGF A konnte überall dort gesehen werden, wo auch VEGF165b detektiert wurde. Umgekehrt war die Spleißvariante nicht an allen Stellen, an denen eine Expression von VEGF A beobachtet werden konnte, sichtbar bzw. zeigte eine schwächere Anfärbung.

Mittels statistischer Auswertung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ausgemacht werden (Abschnitt 4.2.2.1).

In Abbildung 16 bis Abbildung 20 werden Fotos der immunhistochemischen Färbungen dargestellt.

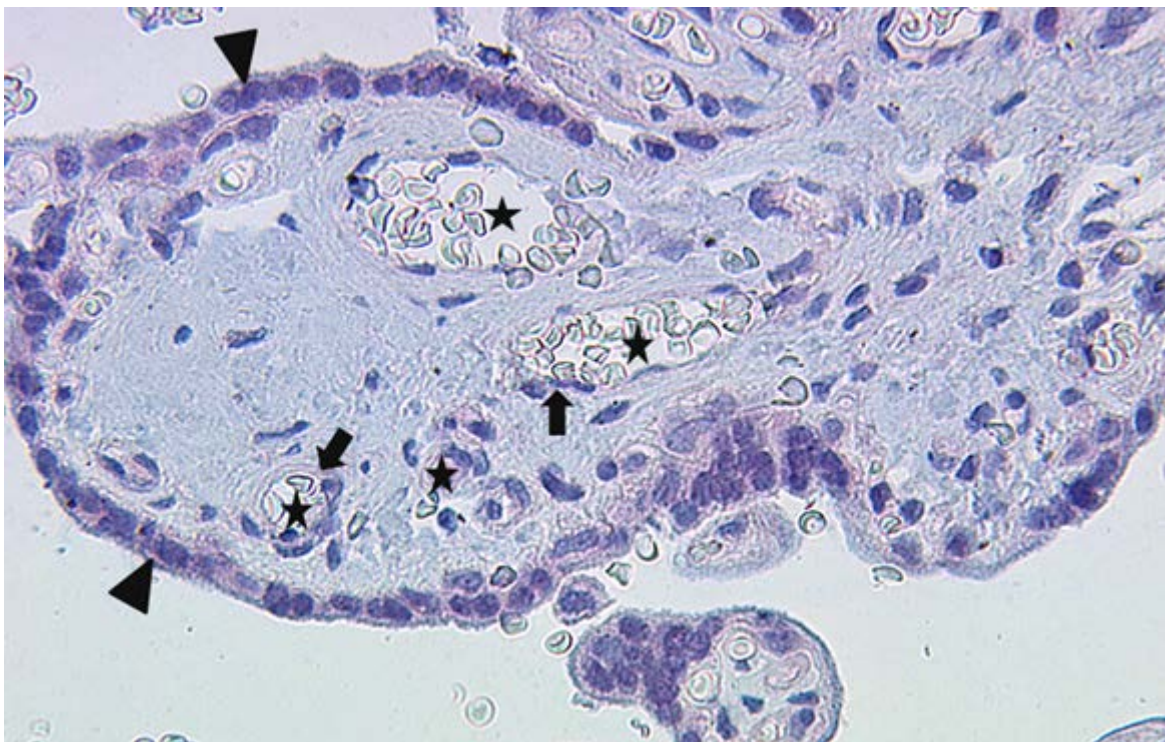


Abbildung 16: Expression von VEGF A im Synzytiotrophoblast (Pfeilspitzen), villöse Gefäße (Sterne), Endothelzellen (Pfeile), Vergrößerung Objektiv = 25x

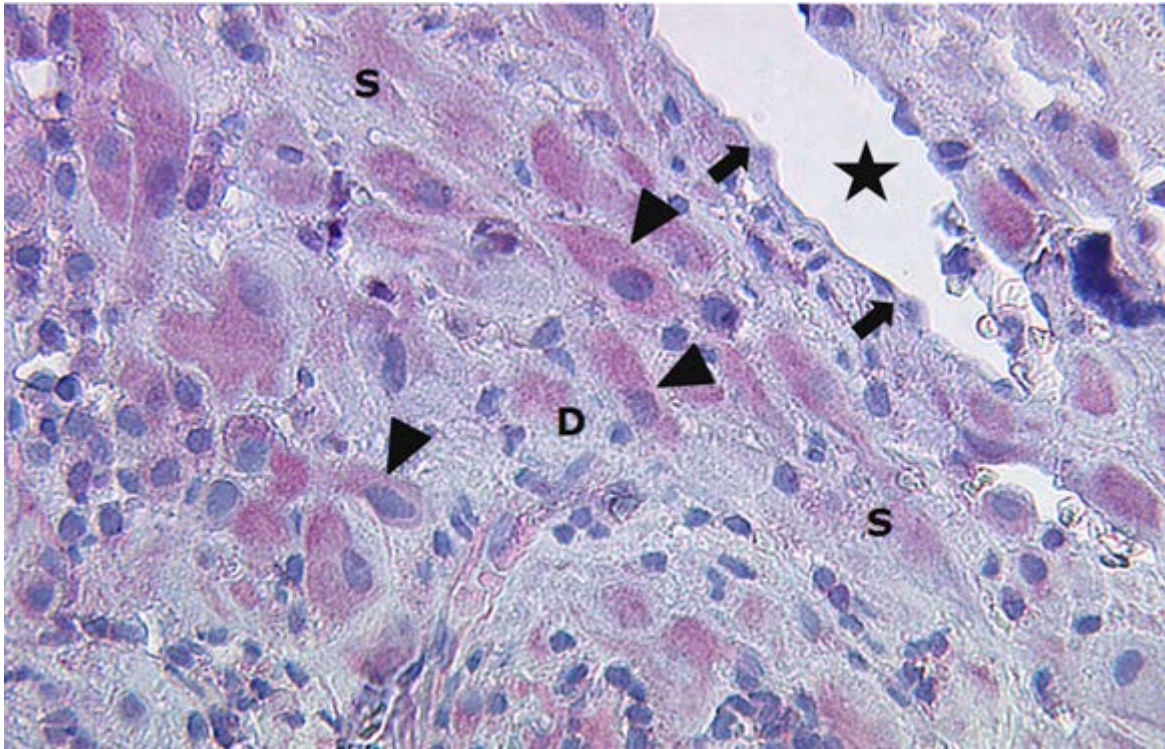


Abbildung 17: Expression von VEGF A im extravillösen Trophoblast (Pfeilspitzen),
Dezidua (D), Stroma (S) der Dezidua, maternale Endothelzellen (Pfeile),
maternales Gefäß (Stern), Vergrößerung Objektiv = 25x

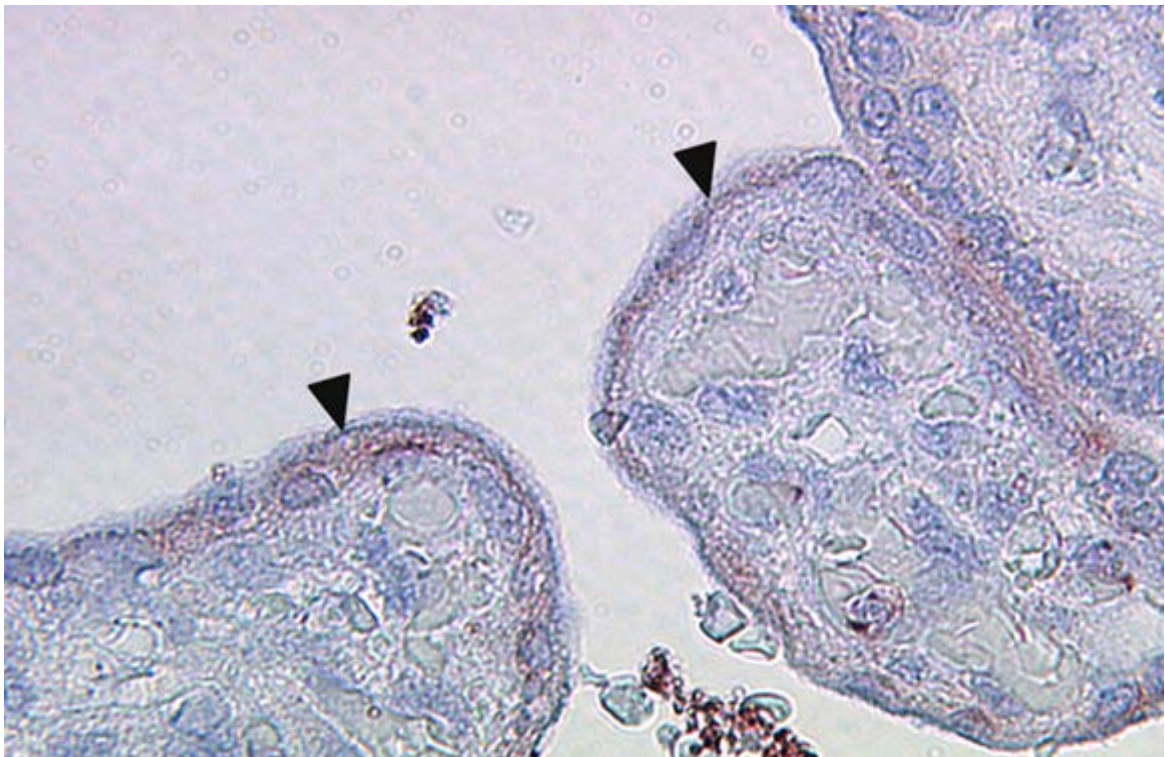


Abbildung 18: Expression von VEGF165b im Synzytiotrophoblast (Pfeilspitzen),
Vergrößerung Objektiv = 25x

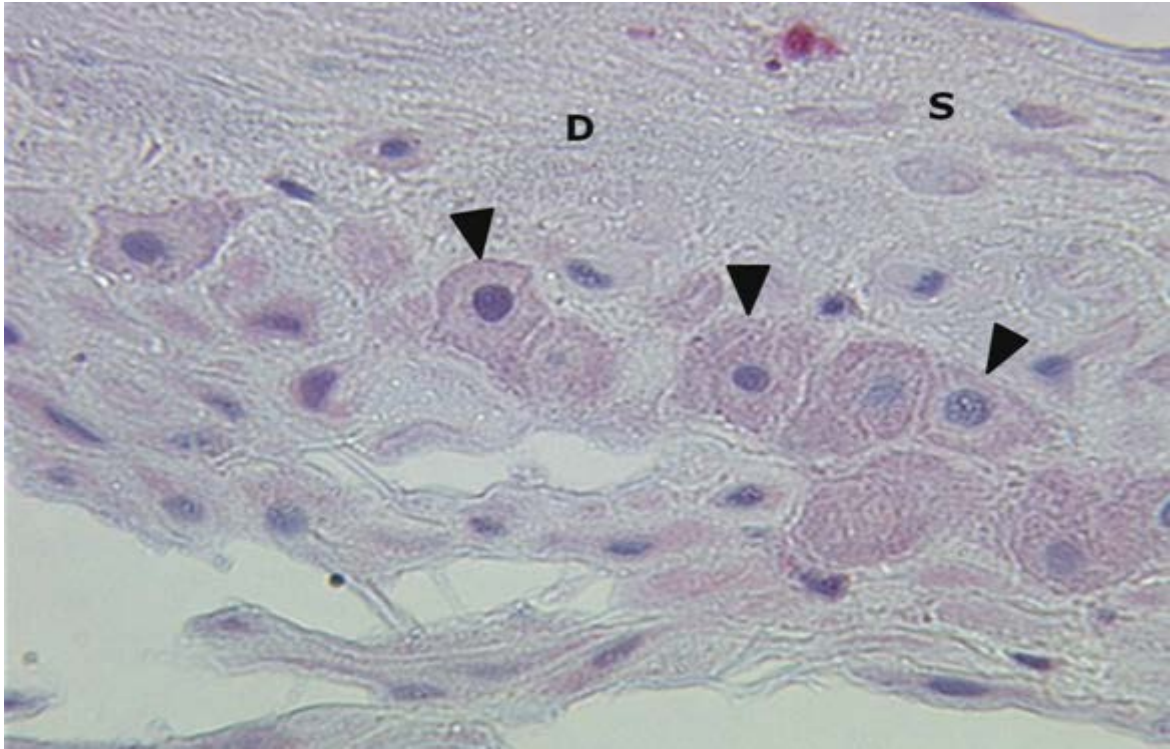


Abbildung 19: Expression von VEGF165b im extravillösen Trophoblast (Pfeilspitzen), Stroma (S) der Dezidua (D), Vergrößerung Objektiv = 25x

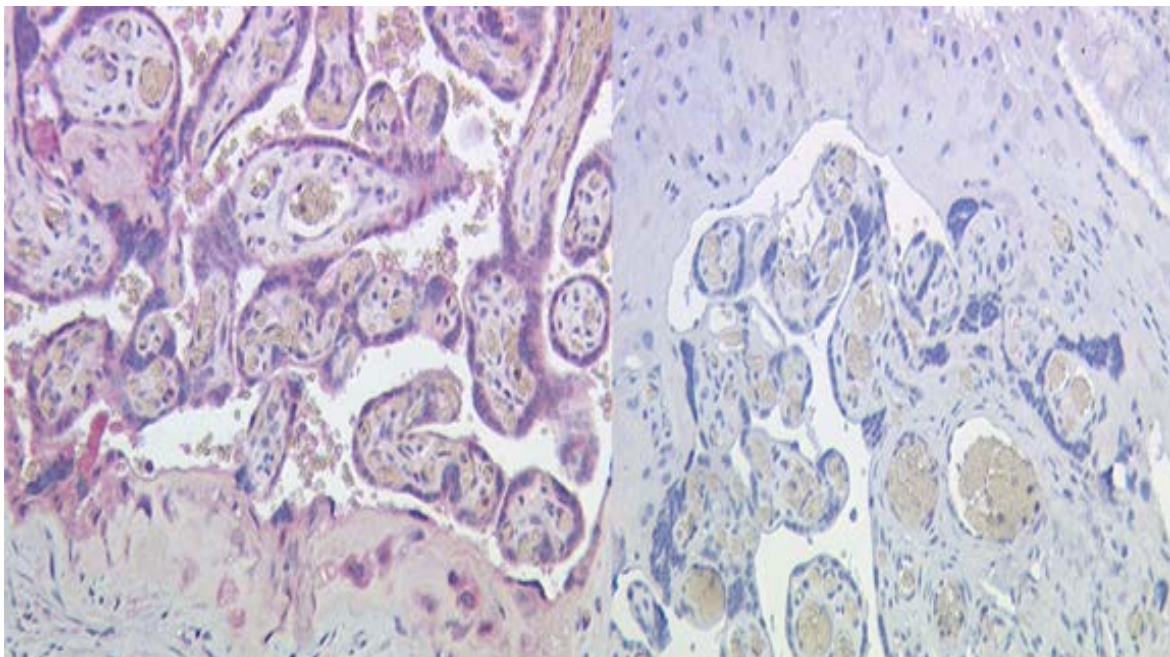


Abbildung 20: Positivkontrolle (links) und Negativkontrolle (rechts) eines Plazentapräparats; die Negativkontrollen wurden mit irrelevanten IgG1 (Maus)-Antikörpern durchgeführt

4.2.2.1 Statistische Auswertung des Immunreaktiven Scores

Anhand der ermittelten IRS in den Vergleichskollektiven wurde statistisch geprüft, ob es zu einem signifikanten Unterschied in der Expression von VEGF A oder VEGF165b im Synzytiotrophoblast bzw. extravillösen Trophoblast zwischen den Gruppen (GDM und Kontrolle) kommt. Die Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Tabelle 27).

Tabelle 27: Statistische Auswertung des IRS auf Gruppenunterschiede. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

	VEGF A	VEGF165b
	p-Wert des exakten Fisher-Tests	
Synzytiotrophoblast	0,9706	0,8832
Extravillöser Trophoblast	0,9326	0,8304

GDM n = 40; Kontrolle n = 40

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.3.1 ELISA

Vergleich der VEGF-Konzentrationen zwischen Serum und Plasma

Gruppe „Gesunde Schwangere“ und Gruppe „Schwangere mit GDM“:

Während der Schwangerschaft zeigt sich bei VEGF A kein Konzentrationsunterschied zwischen Serum und Plasma, post partum ist der Unterschied signifikant (Serum > Plasma). Bei der Messung von VEGF165b kann während der gesamten Schwangerschaft und auch danach kein signifikanter Unterschied zwischen Serum und Plasma bewiesen werden.

Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“:

Die Konzentrationen von VEGF A zeigen im Serum signifikant höhere Werte als im Plasma. Bei VEGF165b werden im Plasma signifikant höhere Konzentrationen als im Serum gemessen.

Vergleich der VEGF-Konzentrationen zwischen verschiedenen Plasmen

Bei VEGF A kann kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Plasmen gezeigt werden. Bei VEGF165b gibt es jeweils einen signifikanten Unterschied zwischen der Messung aus EDTA- und CTAD-Plasma sowie zwischen EDTA- und Citrat-Plasma (EDTA-Plasma > CTAD-, Citrat-Plasma).

Einfluss des Messzeitpunkts auf die VEGF-Konzentration

Der Messzeitpunkt hat in den Serumproben Einfluss auf die VEGF-Konzentration.

Vergleich der VEGF-Konzentrationen zwischen den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ und „Gesunde Schwangere“

Im Serum unterscheiden sich sowohl die VEGF A- als auch die VEGF165b-Konzentrationen signifikant zwischen den Gruppen (im Mittel höhere Konzentrationen in der Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“); im Plasma gibt es keinen signifikanten Konzentrationsunterschied.

Vergleich des Verlaufs der VEGF-Konzentrationen zwischen den Gruppen „Gesunde Schwangere“ und „Schwangere mit GDM“

Zwischen den Gruppen kann zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der Konzentration von VEGF A und VEGF165b gezeigt werden.

VEGF A: Im Verlauf betrachtet, weist die Gruppe „Schwangere mit GDM“ bis zum Ende der Schwangerschaft sowohl im Serum als auch im Plasma im Mittel niedrigere VEGF A-Werte als das gesunde Vergleichskollektiv auf. Postpartal nähern sich die VEGF A-Konzentrationen beider Gruppen einander an.

VEGF165b: Die gemessenen Werte liegen bei den Gestationsdiabetikerinnen in der ersten Hälfte der Schwangerschaft sowohl im Serum als auch im Plasma im Mittel unter und in der zweiten Hälfte sowie post partum über den Werten der gesunden Schwangeren. Nach der Geburt zeigen beide Gruppen ähnliche Verläufe.

4.3.2 Immunhistochemie

Expression von VEGF und VEGF165b in Plazenten

In der immunhistochemischen Auswertung der Plazentaschnitte kann kein signifikanter Unterschied in der Expression von VEGF bzw. VEGF165b zwischen gesunden Plazenten und denen aus diabetischen Schwangerschaften gesehen werden.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Fragestellung

Der GDM stellt eine der wichtigsten und häufigsten schwangerschaftsspezifischen Erkrankungen dar. Da die Pathogenese dieses Krankheitsbildes analog des Erscheinungsbildes unterschiedlich und noch nicht vollständig geklärt ist (Kleinwechter et al., 2011), ist weitergehende Forschung auf diesem Gebiet notwendig.

Der Wachstumsfaktor VEGF ist für die Vaskulogenese und Angiogenese zuständig und spielt somit in reproduktionszyklischen Zuständen eine herausragende Rolle (Ferrara, 2004). In der schwangerschaftsspezifischen Erkrankung Präeklampsie konnte bereits ein Zusammenhang zwischen veränderten Blutkonzentrationen von VEGF und dem Krankheitsbild erforscht werden (Bills et al., 2009). Ziel dieser Arbeit war es, die VEGF-Konzentration im Rahmen von gesunden Schwangerschaften sowie bei Schwangerschaften mit GDM zu untersuchen. Dazu wurde die Konzentration von VEGF A sowie deren als antiangiogenetisch beschriebene Spleißvariante VEGF165b mittels ELISA in Blutproben (Serum und Plasma) aus gesunden Schwangerschaften sowie aus Schwangerschaften mit GDM bestimmt und miteinander verglichen. Dabei sollte evaluiert werden inwiefern die Methodik der VEGF-Messung einen Einfluss auf das Ergebnis der Konzentrationsbestimmung hat - methodische Schwierigkeiten wurden herausgearbeitet und aufgezeigt. Außerdem wurde mittels immunhistochemischer Färbung die Expression von VEGF A und VEGF165b in Plazenten aus gesunden sowie diabetischen Schwangerschaften durchgeführt und verglichen.

Das Krankheitsbild GDM kann auch bei der Hündin auftreten und ist bei Diagnose während der Trächtigkeit oder während des Diöstrus mit dem humanen GDM vergleichbar (Rand et al., 2004). Auch VEGF konnte im Hund identifiziert werden (Jingjing et al., 2000) – wurde jedoch noch nicht im Zusammenhang mit kaninem GDM untersucht. Daher wäre die Fragestellung von Bedeutung, ob dahingehend ein Analogieschluss zwischen Mensch und Hund gezogen werden kann, was in Folgestudien untersucht werden könnte.

Da bisher nur wenige Untersuchungen zu VEGF im Rahmen von GDM vorliegen, ist die in dieser Studie untersuchte Fragestellung für die Forschung bedeutend. Große Wichtigkeit besitzt hierbei die methodische Durchführung der Konzentrationsmessungen von VEGF, da in bislang veröffentlichten Studien kein methodischer Standard eingehalten wurde und Ergebnisse daher schwer zu vergleichen sind. Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit methodische Aspekte der VEGF-Konzentrationsbestimmung berücksichtigt und evaluiert, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

5.2 Diskussion der Methoden

5.2.1 ELISA

In der vorliegenden Studie wurden die Wachstumsfaktoren VEGF A und VEGF165b mittels eines ELISA-Sandwich-Assays gemessen. Dieses etablierte, einfach anzuwendende und kostengünstige Verfahren wird schon seit vielen Jahren sowohl in der Klinik als auch im experimentellen Bereich zum quantitativen Nachweis von Zytokinen genutzt (Engvall und Perlmann, 1971, Lequin, 2005). Dennoch gibt es einige Gründe, die es schwierig machen den absoluten Anteil an VEGF A und VEGF165b mittels ELISA zu bestimmen. Dies beruht darauf, dass die kommerziell erhältlichen ELISA Antikörper verwenden, die das gleiche Epitop der verschiedenen Isoformen von VEGF erkennen (Qiu et al., 2009a). Aus diesem Grund besteht die Möglichkeit, dass Inhibitoren des VEGF an den Antikörper binden und dadurch die gemessenen VEGF-Werte beeinflussen können (Anthony et al., 1997, Maynard et al., 2003). Dies zeigen alternative Messmethoden, die 10-100 Mal so hohe VEGF-Konzentrationen erreichten als mittels ELISA gemessen wurden (McKeeman et al., 2004). Im Gegensatz dazu erkennt ein ELISA zur Konzentrationsbestimmung von VEGF165b, welcher auch in der eigenen Studie verwendet wurde, verschiedene Epitope und umgeht damit dieses Problem. Aber auch ein ELISA zur Detektion von VEGF165b kann unter Umständen nicht alles tatsächlich vorhandene VEGF165b detektieren, wenn ein anti-pan-VEGF Antikörper verwendet wurde und dieser möglicherweise schon mit VEGF165 gesättigt ist (Qiu et al., 2009a). Daher wurde in der vorliegenden Studie ein VEGF165b-spezifischer Antikörper eingesetzt (R&D Systems, 2011). Die Sensitivität der ELISA für die verschiedenen Isoformen und deren Spleißvarianten ist unbekannt, jedoch

muss berücksichtigt werden, dass die kommerziell erhältlichen pan-VEGF ELISA eine geringere Affinität für VEGF165b als für VEGF165 aufweisen (Varey et al., 2008).

5.2.2 Immunhistochemie

Zur Darstellung von VEGF A und VEGF165b im Plazentagewebe wurden in der vorliegenden Studie immunhistochemische Färbemethoden angewandt. Die Immunhistochemie ist schon seit vielen Jahren ein etabliertes Verfahren zum Nachweis spezifischer Antigene im Gewebe (Neil und Dixon, 1959). Im Rahmen dieser Studie wurden die ABC-Methode und die APAAP-Methode eingesetzt.

Zur Färbung von VEGF A wurde die ABC-Methode angewandt, die vor über 30 Jahren von Hsu et al. (1981) beschrieben wurde und im Labor für VEGF A bereits etabliert war. Diese Methode beruht auf der Affinität von Avidin für Biotin, die zur Bildung von Komplexen aus enzymmarkierten Avidin-Biotin-Komplexen mit biotinylierten Sekundärantikörpern führt (Herbst und Hübner, 2014). Es handelt sich bei diesem Verfahren um einen sehr sensitiven immunologischen Nachweis (ca. 4-8 fach stärker als bei der APAAP-Methode), der zur Detektion vieler Antigene aus unterschiedlichsten Proben eingesetzt werden kann. Allerdings ist bei dieser Methode keine Signalverstärkung durch Wiederholungen möglich wie dies bei der APAAP-Methode der Fall ist (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000d).

Zur Durchführung der immunhistochemischen Färbung von VEGF165b musste zunächst der Antikörper dieser Spleißvariante etabliert werden, was auf Mammagewebe durchgeführt wurde, da dieses physiologischer Weise eine sehr hohe VEGF-Expression aufweist (Qiu et al., 2008). Dabei wurde zuerst ein HRP-konjugiertes ABC-System getestet und im Anschluss ein HRP-konjugiertes Mikropolymersystem. Mit beiden Detektionssystemen war das Ergebnis nur sehr schwach. Um eine Wasserstoffperoxid-Empfindlichkeit des Antikörpers auszuschließen, wurden daraufhin ein AP-konjugiertes Mikropolymersystem sowie die APAAP-Methode verwendet. Bei dieser Methode wird die natürliche Affinität des Antikörpers gegenüber dem Antigen genutzt und stabile Immunkomplexe anstelle der relativ unsanften chemischen Konjugation eingesetzt (Herbst und Hübner, 2014). Außerdem kann durch Wiederholungen das Farbsignal verstärkt

werden, wobei sich dadurch auch die Gefahr unspezifischer Hintergrundfärbungen erhöhen kann (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000d). Die Reaktion ist nach dieser Modifikation deutlich stärker ausgefallen. Bevor diese Methodik auf Plazentagewebe angewendet wurde, wurde mittels Systemkontrolle überprüft, ob sich die endogene alkalische Phosphatase in der Plazenta anfärbt. Da die Systemkontrolle negativ war, was eine unspezifische Färbung ausschließt, sprach kein Grund gegen die Verwendung des AP-konjugierten Detektionssystems mit dessen ein deutlich besseres Ergebnis erzielt werden konnte. Die APAAP-Methode wurde bereits vor 40 Jahren von Cordell et al. (1984) beschrieben. Durch die Anwendung des Enzyms AP können Störungen vermieden werden, die in Zellen häufig durch die Aktivität endogener Peroxidasen auftreten (Cordell et al., 1984). Außerdem kann durch die APAAP-Methode im Vergleich zu vielen anderen Methoden eine höhere Sensitivität erreicht werden, die vor allem auf der größeren Anzahl an Enzymmolekülen, die pro Gewebsantigen zur Verfügung steht, beruht (Herbst und Hübner, 2014).

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Vergleich der Konzentrationen von VEGF A und VEGF165b zwischen Serum und Plasma

Die Konzentration von VEGF wurde in anderen Studien oftmals entweder nur aus Serum (Gagne et al., 2003, Kemik et al., 2010, Zou et al., 2013) oder Plasma gemessen (Lygnos et al., 2006, Madazli et al., 2008, Kupferminc et al., 1997). Die Messung aus Serum ist jedoch kritisch zu bewerten, da bekannt ist, dass die im Serum enthaltenen Thrombozyten VEGF speichern und während der Blutgerinnung freisetzen (Webb et al., 1998). Ein Zusammenhang zwischen VEGF und Thrombozyten wurde erstmals festgestellt als Veränderungen von VEGF-Konzentrationen im Serum Änderungen in der Thrombozytenzahl widerspiegeln (Verheul et al., 1997). Weitere Untersuchungen zeigten einen Anstieg der VEGF-Konzentration im Serum in Abhängigkeit von der Zeit, wohingegen die VEGF-Spiegel im Plasma nicht durch die Zeit beeinflusst wurden (Webb et al., 1998). In einer Studie von Banks et al. (1998a) wurde ein mittlerer VEGF-Gehalt in Thrombozyten von 0,56 pg pro 10^6 in plättchenreichem Plasma bzw. 0,64 pro 10^6 in Serum ermittelt. Aufgrund dieser gespeicherten VEGF-Fraktion in den Blutplättchen kann

die Konzentrationsbestimmung von VEGF aus Serum zu erhöhten Werten führen, weshalb die Messung aus Plasma vorgezogen werden sollte. Es ist beachtenswert, dass dabei die Art des Plasmas Einfluss auf die VEGF-Konzentration ausübt. So können im EDTA-Plasma höhere Werte als im Citrat-Plasma gemessen werden. Dies beruht möglicherweise auf einer partiellen Thrombozyten- oder Leukozytenaktivierung in EDTA-Plasma (Banks et al., 1998a). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Verwendung von EDTA-Plasma zu ungenauen Messergebnissen führt, da die VEGF-Konzentrationen zu einem nicht bekannten Grad durch die Freisetzung aus Blutplättchen beeinflusst werden (George et al., 2000).

Um einen laborinternen Vergleich der VEGF-Konzentrationen aus verschiedenem Material anstellen zu können, wurden in der vorliegenden Studie die Konzentrationen von VEGF A und VEGF165b sowohl im Serum als auch im Plasma gemessen. Die Erkenntnisse aus der Literatur, welche erhöhte VEGF-Werte im Serum erwarten lassen, konnten in der Gruppe der gesunden, nicht schwangeren Frauen für VEGF A bestätigt werden. In dieser Gruppe waren die VEGF A-Werte im Serum signifikant höher als im Plasma, was die Theorie bestätigt, dass VEGF A aus aktivierten Thrombozyten freigesetzt wird. Interessanterweise zeigte sich in dieser Gruppe bei VEGF165b eine signifikant höhere Konzentration im Plasma, was der beschriebenen VEGF-Freisetzung aus Thrombozyten widerspricht. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte ein Nicht-Vorhandensein der Spleißvariante in Thrombozyten sein. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten Thrombozyten-Lysate beispielsweise mittels ELISA auf den Gehalt bzw. das Vorhandensein von VEGF165b untersucht werden. Die Eignung eines solchen ELISA wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt.

Bei Betrachtung des Kollektivs der schwangeren Frauen („Gesunde Schwangere“ und „Schwangere mit GDM“) zeigte sich im Vergleich zu den gesunden Nichtschwangeren ein differentes Bild. Während der Schwangerschaft bestand kein Unterschied zwischen den VEGF A-Konzentrationen in Serum und Plasma. Nach der Schwangerschaft zeigten sich die gleichen Verhältnisse wie in der nicht schwangeren Gruppe. Diese Beobachtung spricht für die Hypothese, dass der VEGF-Gehalt in Thrombozyten schwangerschaftsabhängig ist. Bekanntermaßen unterliegen verschiedene Komponenten des Gerinnungssystems reproduktionszyklischen Veränderungen (Brenner, 2004). Bei der Messung von VEGF165b kann während der gesamten Schwangerschaft und auch danach kein

signifikanter Unterschied zwischen Serum und Plasma bewiesen werden. Diese Beobachtung ist mit Hilfe des derzeitigen Kenntnisstandes nicht zu erklären. Wie bereits angesprochen, sind weitere Untersuchungen zum VEGF-Gehalt in Thrombozyten notwendig. Dabei sollte auch evaluiert werden, ob sich der Gehalt an VEGF165b zu verschiedenen Zeitpunkten des Reproduktionszyklus verändert. Beachtenswert ist, dass sich sowohl in der Gruppe „Gesunde Schwangere“ als auch „Schwangere mit GDM“ die gleichen Verhältnisse zeigen. Damit scheint die Erkrankung GDM keinen Einfluss auf die VEGF-Konzentration in Serum und Plasma zu haben - vielmehr spielt die Schwangerschaft selbst eine Rolle.

Die aufgestellte Hypothese, dass man zu unterschiedlichen Ergebnissen gelangt, je nachdem aus welchen Proben die VEGF-Konzentration bestimmt wird, konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Aufgrund der Angaben in der Literatur und der eigenen Ergebnisse kann die Messung von VEGF im Serum nicht empfohlen werden.

5.3.2 Vergleich der Konzentrationen von VEGF A und VEGF165b zwischen verschiedenen Plasmen

Um die Labordiagnostik von VEGF weitergehend zu evaluieren, wurde die Konzentration von VEGF A und VEGF165b in verschiedenen Plasmen gemessen. Diese Untersuchungen erfolgten in der Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“, da hier die größte Probenzahl (n = 100) vorlag. Als Probenmaterial kam Citrat-, CTAD- und EDTA-Plasma zum Einsatz. In diesen Plasmen wird das Blut durch Zusatz von Gerinnungshemmern ungerinnbar gemacht. Eine weitere Verarbeitung der Blutprobe muss damit nicht sofort erfolgen, sondern ist auch zu einem späteren Zeitpunkt noch möglich (Schwendenwein, 2013).

In Citrat-Plasma erfolgt durch die Zugabe von Natriumcitrat eine Bindung von Calciumionen, die für die Blutgerinnung benötigt werden. Damit wird das Blut ungerinnbar gemacht (Schwendenwein, 2013).

CTAD-Röhrchen enthalten zusätzlich zur Natriumcitratlösung Theophyllin, Adenosin und Dipyridamol, wobei die letzten drei Substanzen eine Thrombozytenaktivierung

unterbinden. Dadurch wird verhindert, dass Blutplättchen in das Plasma gelangen und dadurch zu verfälschten Untersuchungsergebnissen führen (Wynendaele et al., 1999).

Die verwendeten EDTA-Röhrchen sind mit K_3EDTA , einem Salz der Ethylendiamintetraessigsäure versetzt. Diese Salze binden Calcium und verhindern dadurch die Blutgerinnung (Schwendenwein, 2013)

Die statistische Auswertung ließ keinen Unterschied in der VEGF A-Konzentration zwischen den verschiedenen Plasmen erkennen. Bei VEGF165b gab es einen Unterschied zwischen der Messung aus EDTA- und CTAD-Plasma sowie EDTA- und Citrat-Plasma. Dies führte zu der Überlegung, ob das in EDTA-Röhrchen zugesetzte K_3EDTA die Konzentration von VEGF165b bzw. das Messergebnis verändert. Es ist bekannt, dass Antikoagulanzen die Ergebnisse von Laboruntersuchungen beeinflussen können (Schwendenwein, 2013). So besitzt EDTA eine Wirkung auf die Thrombozytenform, indem es durch Komplexbildung die Ca^{2+} -Konzentrationen verändert (Wynendaele et al., 1999). Dies könnte in der Folge die Thrombozytenaktivierung und damit die VEGF-Konzentrationsbestimmung beeinflussen. Sowohl die Anfrage beim Hersteller des Blutabnahmesystems als auch Literaturrecherche konnte keine Erklärung dafür liefern, dass nur bei der Spleißvariante VEGF165b ein Unterschied zwischen den verschiedenen Plasmen detektiert wurde.

In der Literatur wird CTAD-Plasma als die Probenart der Wahl zur Bestimmung von zirkulierendem extrazellulärem VEGF beschrieben (Wynendaele et al., 1999). Anhand der Ergebnisse, die in der vorliegenden Studie erzielt wurden, kann für die Messung von VEGF A abgeleitet werden, dass es keinen Einfluss hat, welche Art von Plasma zur Messung verwendet wird. Die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von VEGF165b zeigten jedoch einen signifikanten Unterschied zwischen der Messung aus EDTA- und CTAD-Plasma und EDTA- und Citrat-Plasma. Dies bestätigt die in der Literatur beschriebene Beeinflussung der Thrombozytenaktivierung durch EDTA (Wynendaele et al., 1999). Aus diesem Grund kann die Empfehlung ausgesprochen werden, den Wachstumsfaktor aus CTAD-oder Citrat-Plasma zu bestimmen, nicht jedoch aus EDTA-Plasma.

5.3.3 Einfluss des Messzeitpunkts auf die VEGF-Konzentration

In Studien wurde beschrieben, dass der Wachstumsfaktor in ungestörten Schwangerschaften erhöht (Madazli et al., 2003, Pang et al., 2013), normal (Bosio et al., 2001, Mahmoud und Abdel-Raouf, 2006) oder erniedrigt (Kupferminc et al., 1997, Zou et al., 2013) sein kann. Als wahrscheinliche Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Bestimmung des Parameters zu verschiedenen Messzeitpunkten/Schwangerschaftszeitpunkten sein (Lygnos et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Hypothese geprüft, indem Blut zu verschiedenen Messzeitpunkten abgenommen wurde. Mit Hilfe statistischer Tests wurde dann untersucht, ob die Messzeitpunkte Einfluss auf die VEGF-Konzentration im peripheren Blut haben. Die Ergebnisse bestätigen, dass die gemessene Konzentration abhängig vom Messzeitpunkt ist. Allerdings ist diese Abhängigkeit nur in den Serumproben zu erkennen. Da in der Vergangenheit oftmals Studien durchgeführt wurden, die nur zu einem Schwangerschaftszeitpunkt die VEGF-Konzentration gemessen haben, sind diese Aussagen unter Berücksichtigung der Abhängigkeit vom Messzeitpunkt zu betrachten.

5.3.4 Vergleich der Konzentrationen von VEGF A und VEGF165b zwischen den Gruppen „Gesunde Nichtschwangere“ und „Gesunde Schwangere“

Um einen Vergleich anzustellen, ob es einen Unterschied der Konzentrationen von VEGF A und VEGF165b zwischen gesunden Nichtschwangeren und Schwangeren gibt, wurden die Absolutwerte in der Gruppe „Gesunde Nichtschwangere“ und die Mittelwerte der Zeitreihen während der Schwangerschaft (Messzeitpunkt 1-7) in der Gruppe „Gesunde Schwangere“ verwendet. Die Ergebnisse der Konzentrationen des Wachstumsfaktors zeigten sowohl bei VEGF A als auch bei VEGF165b nur im Serum einen signifikanten Unterschied zwischen gesunden Nichtschwangeren und gesunden Schwangeren. Im Plasma konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Wie in der Diskussion des Probenmaterials beschrieben wurde (Abschnitt 5.3.1), können die Werte im Serum verfälscht sein, da die im Serum enthaltenen Thrombozyten während der Blutgerinnung gespeichertes VEGF freisetzen (Webb et al., 1998). Aufgrund dieser Erkenntnis ist das Ergebnis im Plasma aussagekräftiger.

In früheren Studien wurde beschrieben, dass die Konzentrationen von VEGF A während ungestörten Schwangerschaften im Vergleich zu nicht schwangeren Kontrollen erhöht (Lygnos et al., 2006), normal (Mahmound und Abdel-Raouf, 2006) oder erniedrigt sein können (Zou et al., 2013). Auch wenn die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Plasma keine Signifikanz aufweisen, liegen die gemessenen VEGF A-Plasmakonzentrationen im Mittel in der Gruppe der Nichtschwangeren etwas höher als in der Gruppe der gesunden Schwangeren. Diese Beobachtung lässt sich auch bei den Serumproben nachvollziehen und ist hier sogar signifikant, was dem Ergebnis der Studie von Zou et al. (2013) entspricht. In der Studie von Lygnos et al. (2006), in der unter anderem die Konzentration von VEGF A im Blut schwangerer und nichtschwangerer Frauen gemessen wurde, konnte eine signifikant höhere VEGF A-Konzentration im Plasma schwangerer Patientinnen gezeigt werden. Dies spiegelt die Tatsache wider, dass während der Schwangerschaft eine gesteigerte Angiogenese stattfinden muss, die für den Aufbau der Plazenta sowie für die Bildung fetaler Blutgefäße benötigt wird und daher eine erhöhte VEGF A-Konzentration im Blut schwangerer Patientinnen erwarten lässt. Außerdem ist beschrieben, dass die infolge einer Schwangerschaft einhergehende Hypoxie sowie die Bildung von endogenem Östrogen zu einer erhöhten Expression von VEGF führt (Trollmann et al., 2003, Reynolds und Redmer, 2001, Pugh und Ratcliffe, 2003, Koos et al., 2005). Dies konnte in dem in dieser Studie untersuchten Kollektiv nicht beobachtet werden. Allerdings ist zu beachten, dass mittels des verwendeten ELISA eine erhöhte VEGF-Konzentration im Blut schwangerer Patientinnen möglicherweise nicht vollständig nachgewiesen werden kann, da während der Schwangerschaft eine plazentare Produktion des sFlt-1 stattfindet und dieser ab einer bestimmten Konzentration mit dem ELISA interferiert (Clark et al., 1998a, Banks et al., 1998b, R&D Systems, 2011). Zudem ist zu bemerken, dass die gemessenen VEGF-Konzentrationen bereits bei gesunden und nicht schwangeren Menschen eine große Streuung zeigen, weshalb es schwierig ist Normal- bzw. Referenzwerte festzulegen. Die im Mittel etwas höheren VEGF A-Plasmakonzentrationen in der Gruppe der gesunden Nichtschwangeren können auch durch wenige sehr hohe Werte in dieser Gruppe ausgelöst werden. Dies muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Für die Spleißvariante VEGF165b wurde von der Arbeitsgruppe um Bills et al. (2009) in den ersten Wochen einer normalen Schwangerschaft eine signifikant erhöhte Konzentration - verglichen mit nicht schwangeren Kontrollen - beschrieben. Im untersuchten schwangeren Kollektiv der eigenen Studie wurden im Mittel niedrigere

VEGF165b-Werte gemessen als in der Gruppe der Nichtschwangeren. Dies steht im Einklang zu der Tatsache, dass während der Schwangerschaft eine starke angiogenetische Aktivität im Organismus stattfindet (Zygmunt et al., 2003). Daher ist eine niedrige Konzentration von VEGF165b zu erwarten, da dieser Spleißvariante eine antioangiogene Wirkung zugeschrieben wird (Bates et al., 2002).

5.3.5 Vergleich des Verlaufs der VEGF-Konzentrationen zwischen den Gruppen „Gesunde Schwangere“ und „Schwangere mit Gestationsdiabetes“

5.3.5.1 VEGF A

Die Bestimmung der VEGF-Konzentration bei Schwangerschaften mit GDM zeigt in der Literatur kontroverse Resultate. Die Arbeitsgruppe um Lygnos et al. (2006) fand heraus, dass VEGF im Rahmen von GDM höhere Plasmakonzentrationen aufwies im Vergleich zu unkomplizierten Schwangerschaften, wobei der Unterschied nicht signifikant war. Auch andere Autoren konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen feststellen (Madazli et al., 2008). Im Tiermodell konnten Salim et al. (2009) bei Ratten mit experimentell induziertem GDM signifikant erniedrigte VEGF A-Konzentrationen im Plasma der diabetischen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen. Es wurde geschlussfolgert, dass diese niedrigen Konzentrationen zu einer defekten Plazenta-Vaskularisierung und als Folge zu einer gestörten fetoplazentaren Zirkulation führen könnten. Dies wäre eine Erklärung für die häufig im Rahmen eines GDM beobachteten Komplikationen wie fetale Missbildungen. Allerdings bleibt unklar, ob die veränderten VEGF A-Konzentrationen Folge oder Ursache der Abnormalitäten, die im Rahmen eines Diabetes mellitus auftreten, sind (Salim et al., 2009).

Im Patientenkollektiv, das in vorliegender Studie untersucht wurde, konnten unter Betrachtung der Mittelwerte Unterschiede in der Konzentration von VEGF A zwischen der Gruppe mit GDM und dem gesunden Kollektiv ermittelt werden, statistische Tests zeigen jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Dieses Ergebnis stimmt mit den von Madazli et al. (2008) erhobenen Daten überein. Ein Grund hierfür könnte das mögliche Vorhandensein anderer angiogenetischer Faktoren und eine multifaktorielle Entwicklung der Plazenta sein.

Sowohl im Serum als auch im Plasma wurden im Kollektiv der gesunden Schwangeren während der Schwangerschaft im Mittel höhere Konzentrationen von VEGF A gemessen als bei den Patientinnen mit GDM, was den Ergebnissen aus dem oben beschriebenen Tiermodell (Salim et al., 2009) entspricht, jedoch der Hypothese einer gesteigerten VEGF-Expression mit nachfolgend erhöhter VEGF-Konzentration im Blut bei Schwangerschaften mit GDM widerspricht. Die aufgestellte Hypothese beruht auf den Erkenntnissen, dass in Schwangerschaften mit GDM häufig große Plazenten mit einer durch Hypervaskularisierung vergrößerten Plazentaendotheloberfläche auftreten. Diesem Phänomen liegt wahrscheinlich ein Kompensationsmechanismus zugrunde, der der fetalen Hypoxie entgegenwirkt (Hiden et al., 2009). Eine fetale Hypoxie tritt in Schwangerschaften mit GDM häufiger auf als in komplikationslosen Schwangerschaften. Dies beruht zum einen auf gesteigertem fetalem Sauerstoffverbrauch, der durch eine erhöhte Stoffwechselaktivität zustande kommt, zum anderen auf einem eingeschränkten fetalen Sauerstofftransport aufgrund einer verdickten Basalmembran (Desoye, 2003). Eine verminderte Sauerstoffkonzentration hat schwerwiegende Auswirkungen auf Fetus und Plazenta und führt zu einer Stimulation der VEGF-Expression, welche die Vaskularisierung der Plazenta fördert (Shweiki et al., 1992, Trollmann et al., 2003, Hiden et al., 2009). Außerdem führt die bei GDM auftretende hohe Blutglukosekonzentration und/oder Insulinmangel zu einer veränderten Hämoglobinstruktur mit gesteigerter Glykosylierung dieses Proteins, was eine Erythrozytendeformation und erhöhte Blutviskosität hervorruft. Dies resultiert in einem verschlechterten Sauerstofftransport mit lokaler Hypoxie, was wiederum die VEGF-Expression steigert (Iino et al., 1997, Pietro et al., 2010, Watala et al., 1996).

Um den Verlauf der VEGF A-Konzentrationen zu betrachten, wurden die im Plasma gemessenen Konzentrationen herangezogen. Bei den gesunden Schwangeren kann bis zur Hälfte der Schwangerschaft ein Anstieg der mittleren VEGF A-Plasmakonzentration beobachtet werden, in der zweiten Hälfte kommt es zu einem Abfall von VEGF A. Dies kann dadurch erklärt werden, dass zu Beginn einer Schwangerschaft durch die damit einhergehende Hypoxie eine erhöhte Expression von VEGF stattfindet (Trollmann et al., 2003, Reynolds und Redmer, 2001, Pugh und Ratcliffe, 2003). Im Laufe der Schwangerschaft schreitet die Blutgefäßbildung fort und die Sauerstoffversorgung wird vor allem durch eine NO-induzierte Vasodilatation gesichert (Lang et al., 2011). Die in der

Folge zunehmende Sauerstoffkonzentration und die progressiv abnehmende Hypoxie bewirken eine Suppression des Wachstumsfaktors (Schneider et al., 2011).

Bei den Patientinnen mit GDM kann dies nicht nachvollzogen werden. In dieser Gruppe steigt die mittlere VEGF A-Plasmakonzentration während der gesamten Dauer der Schwangerschaft relativ stetig an. Ursache hierfür könnte eine in diabetischen Schwangerschaften länger anhaltende Hypoxie sein, die als Stimulator für die VEGF-Expression fungiert (Pugh und Ratcliffe, 2003, Trollmann et al., 2003, Shweiki et al., 1992). Außerdem kommt es bei diabetischen Schwangerschaften vor allem im dritten Trimester oftmals zu einem überschießenden fetalen und placentaren Wachstum (Desoye, 2003).

Vergleicht man den Verlauf der beiden untersuchten Kollektive nähern sich die VEGF A-Konzentrationen nach der Geburt einander an, was dafür spricht, dass die bei GDM auftretende pathologische Stoffwechsellage in der Schwangerschaft sich post partum wieder normalisiert. Dies bestätigt, dass ein GDM oftmals ein auf die Schwangerschaft begrenztes Krankheitsbild darstellt und sich nach der Entbindung wieder eine physiologische Stoffwechsellage einstellt.

5.3.5.2 VEGF165b

Bei anderen schwangerschaftsspezifischen Erkrankungen, die auf eine endotheliale Dysfunktion zurückzuführen sind, wie der Präeklampsie, konnte eine veränderte Blutkonzentration von VEGF165b nachgewiesen werden (Bills et al., 2009).

Ein Vergleich der dargelegten Ergebnisse mit Untersuchungen zum Konzentrationsverlauf dieses Wachstumsfaktors im Blut aus Schwangerschaften mit GDM gestaltete sich schwierig, da diesbezüglich die Datenlage der zur Verfügung stehenden Literatur kaum Aufschluss gibt. Bisher gibt es nach unserem Kenntnisstand keine vergleichbare Studie, die sich mit dieser Fragestellung beschäftigt.

Im untersuchten Kollektiv lagen die mittleren Serum- und Plasmakonzentrationen von VEGF165b bei den Patientinnen mit GDM in der ersten Hälfte der Schwangerschaft unter

und in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft über denen der gesunden Kontrollgruppe. Nach der Geburt zeigen beide Gruppen ähnliche Verläufe. Diese Beobachtungen sprechen, wie die Ergebnisse zu VEGF A, für Störungen bei Patientinnen mit GDM während der Schwangerschaft, die reversibel sind.

Die niedrigen Konzentrationen in der ersten Schwangerschaftshälfte bei GDM lassen die Hypothese zu, dass in dieser pathologischen Stoffwechselsituation VEGF165b abreguliert ist. Patientinnen mit GDM haben meist große Plazenten, die relativ stark vaskularisiert sind (Hiden et al., 2009). Diese Tatsache könnte die Erniedrigung der antioangiogenetischen Variante des Wachstumsfaktors erklären. Allerdings widerspricht dieser Hypothese die niedrige Gesamtkonzentration des VEGF A, die bei einer gesteigerten Gefäßbildung im Vergleich zu den gesunden Schwangerschaften erhöht sein müsste. Zu diesem Sachverhalt sind weitergehende Untersuchungen notwendig.

5.3.6 Expression von VEGF in gesunden und in diabetischen Plazenten

5.3.6.1 VEGF A

VEGF induziert als einer der wichtigsten Angiogenesefaktoren die Migration und Proliferation von Endothelzellen und ist damit essentiell für die Entwicklung der Plazenta (Clark et al., 1998b). Da Gefäßerkrankungen, wie sie typischerweise in Diabetes vorkommen, die plazentare Funktion beeinträchtigen können, sollte in dieser Studie die Expression der Wachstumsfaktoren zwischen Plazenten gesunder Schwangerer sowie Schwangerer mit GDM verglichen werden.

Die in dieser Arbeit immunhistologisch dargestellten Expressionsmuster zeigen, dass VEGF in Zellen des Synzytiotrophoblasten als auch des extravillösen Trophoblasten der Dezidua exprimiert wird. Außerdem konnte eine positive Farbreaktion in fetalen und maternalen Endothelzellen, in villösen Gefäßen und im Stroma der Dezidua gesehen werden. Dieses Muster findet sich sowohl in der gesunden als auch in der diabetischen Gruppe wieder. Dabei konnte nach statistischer Auswertung kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Die Expression des Wachstumsfaktors in der Vielzahl von Zelltypen deutet darauf hin, welche große Bedeutung der

Wachstumsfaktor für die Etablierung und Aufrechterhaltung einer erfolgreichen Schwangerschaft besitzt. Durch VEGF werden neue Gefäße und Kapillaren gebildet, wodurch eine adäquate Nährstoffversorgung des Fetus ermöglicht wird (Pietro et al., 2010).

Die plazentare Expression von VEGF in der humanen Plazenta aus komplikationslosen Schwangerschaften wird in der Literatur diskutiert und verändert sich während der Schwangerschaft. Dies ist bei einem Vergleich der eigenen Ergebnisse mit derer aus der Literatur zu beachten. In einer Studie von Shiraishi et al. (1996) wird beschrieben, dass das VEGF-Protein während der gesamten Schwangerschaft in den Synzytiotrophoblasten und im extravillösen Trophoblasten sichtbar ist. In den Stromazellen terminaler Zotten und den dezidualen Zellen wurde VEGF nur im ersten Trimester detektiert. Die Arbeitsgruppe um Jackson et al. (1994) berichtet von einer positiven Farbreaktion im villösen Zytotrophoblasten im ersten Trimester und im Synzytiotrophoblasten danach. In einer anderen Untersuchung von Cooper et al. (1995) konnte im ersten Trimester keine Anfärbung des extravillösen Trophoblasten nachgewiesen werden, dafür zeigte sich eine immunhistochemische Lokalisation von VEGF in den Hofbauerzellen, in extrazellulärer Matrix sowie im Drüsenepithel und den Makrophagen der Dezidua. Im letzten Trimester war auch der extravillöse Trophoblast angefärbt. Diese teils unterschiedlichen Ergebnisse könnten aus der Verwendung unterschiedlicher Antikörper bzw. Färbeprotokolle resultieren. Die beschriebene Anfärbung des Synzytiotrophoblasten und extravillösen Trophoblasten konnte auch in den untersuchten Schnitten der vorliegenden Studie, bei denen es sich um Plazenten aus dem dritten Trimester handelt, beobachtet werden.

Neben der Expression im Trophoblasten konnte in den Plazentaprobe der vorliegenden Studie auch eine positive Farbreaktion auf VEGF in extrazellulärer Matrix sowie in den Endothelzellen mütterlicher und fetaler Gefäße gesehen werden. Diese Beobachtungen stimmen mit denen anderer Studien überein (Cooper et al., 1995, Vuorela und Halmesmaki, 2006). Die positive Farbreaktion im Bereich extrazellulärer Matrix im Stroma der Dezidua könnte auf eine Bindung von Isoformen des VEGF durch Heparin in diesem Material erklärt werden. Dieses hier gebundene VEGF stellt ein Reservoir von biologisch aktivem VEGF dar, der bei Bedarf Endothelzellen oder dem Trophoblasten nach Freisetzung durch Proteasen zur Verfügung gestellt werden kann (Park et al., 1993).

Bemerkenswert ist, dass in der vorliegenden Studie kein Unterschied zwischen der gesunden und der kranken Gruppe gezeigt werden konnte. In der Literatur wurde unter hypoxischen Bedingungen eine erhöhte VEGF-Expression im Trophoblasten beschrieben (Shore et al., 1997). In einer Schwangerschaft mit GDM tritt infolge eines gesteigerten Sauerstoffverbrauchs des Feten, der auf eine erhöhte Stoffwechselaktivität zurück zu führen ist, häufig ein hypoxischer Zustand auf. Dieser kann durch einen eingeschränkten fetalen Sauerstofftransport aufgrund einer verdickten Basalmembran noch verstärkt werden (Desoye, 2003). Hypoxie stimuliert die Expression von VEGF (Shweiki et al., 1992, Trollmann et al., 2003) und ein länger andauernder hypoxischer Zustand führt zu einer Proliferation des Endothels plazentarer Gefäße (Steiner und Schneider, 2012). Diese Umstände sowie die Annahme, dass die Plazenta den pränatalen Hauptproduktionsort von VEGF darstellt (Sharkey et al., 1993), würden eine erhöhte Expression des Wachstumsfaktors in den diabetischen Plazenten erwarten lassen. Auch die Tatsache, dass VEGF eine Rolle bei der diabetischen Neovaskularisation spielt und Natajara et al. (1997) in einer Studie zeigen konnten, dass Glukose *in vitro* die VEGF-Expression stimuliert, ließ vermuten, dass VEGF in diabetischen Schwangerschaften in die vaskuläre Regulation des Plazentabetts involviert ist und im Vergleich zu normal verlaufenden Schwangerschaften eine veränderte Expression zeigt. Dies konnte an den untersuchten Schnitten dieser Studie nicht nachgewiesen werden, was sich mit den Ergebnissen der Studien von Helske et al. (2001) und Vuorela und Halmesmaki (2006) deckt, die beim immunhistochemischen Vergleich von Plazenten aus normalen mit denen aus diabetischen Schwangerschaften keinen signifikanten Unterschied in der VEGF-Expression zwischen den Gruppen detektierten. Eine ähnliche von Pietro et al. (2010) durchgeführte Studie zum Vergleich der VEGF-Expression in Plazenten aus normoglykämischen mit hyperglykämischen Schwangerschaften konnte ebenfalls eine gruppenunabhängige VEGF-Expression im Trophoblasten zeigen. Dabei bestand bei Plazenten von Frauen mit GDM kein Unterschied im Mesenchym und im Synzytiotrophoblasten im Vergleich zur normoglykämischen Gruppe, im Endothel und glatten Muskelzellen von Kapillaren sowie im extravillösen Trophoblasten wurde bei den Plazenten aus Schwangerschaften mit GDM eine geringere VEGF-Expression nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung für das in der vorliegenden Arbeit zu beobachtende gleichartige Färbeverhalten in beiden Gruppen wäre, dass in der Plazenta sowohl in der gesunden als auch in der diabetischen Gruppe bereits eine maximale Expression von VEGF vorliegt und eine vorhandene Expressionssteigerung mittels der verwendeten semiquantitativen Auswertung nicht dargestellt werden kann. Eine

andere Erklärung könnte sein, dass es erst nach chronischer Hypoxie zu einer gesteigerten VEGF-Expression und Endothelproliferation kommt. Es ist möglich, dass die Plazenten von Frauen mit GDM keiner chronischen Hypoxie ausgesetzt waren, da sich ein GDM erst im Schwangerschaftsverlauf manifestiert und dadurch eine gleichartige Expression in beiden Gruppen erfolgte.

5.3.6.2 VEGF165b

Die als antiangiogenetisch beschriebene Spleißvariante VEGF165b macht in manchen Geweben über 50% des gesamten VEGF aus (Qiu et al., 2009a), stellt jedoch in der Plazenta, bei der es sich um ein angiogenetisches Gewebe handelt, nur einen kleinen Teil dar (Bates et al., 2006).

Obwohl VEGF165b als antiangiogenetisch beschrieben wird, zeigt es Signalwirkung auf Endothelzellen und ist in der Lage die Permeabilität der Gefäße zu erhöhen (Glass et al., 2006). Plazenten, die aus Schwangerschaften mit GDM stammen, wird eine erhöhte vaskuläre Permeabilität zugeschrieben (Leach et al., 2006). Diese Erkenntnisse ließen die Hypothese zu, dass möglicherweise in den Plazenten aus Schwangerschaften mit GDM eine gesteigerte Expression der Spleißvariante VEGF165b stattfindet, die nachfolgend zu einer erhöhten Permeabilität in diesen Plazenten führt. Diese Hypothese wurde anhand der erzielten Ergebnisse in dieser Studie nicht bestätigt. VEGF165b wurde in dem von uns untersuchten Kollektiv sowohl von den gesunden als auch von den Plazenten aus Schwangerschaften mit GDM gleichartig exprimiert. Eine Anfärbung der Zellen war wie bei VEGF A im Bereich der Synzytiotrophoblastzellen als auch im extravillösen Trophoblasten sichtbar. Dabei konnte VEGF A überall dort detektiert werden, wo auch eine Anfärbung von VEGF165b stattfand. Umgekehrt wurde in keinem der Präparate eine Anfärbung von VEGF165b an Stellen gesehen, an denen keine Anfärbung auf VEGF A erfolgt war. Diese Beobachtung wurde bereits in einer Studie von Bates et al. (2006) gemacht, die gesunde Plazenten mit denen aus Schwangerschaften mit Präeklampsie untersuchten. Anhand dieses Ergebnisses kann der Schluss gezogen werden, dass VEGF165b nicht für die in Plazenten aus Schwangerschaften mit GDM beschriebene erhöhte Gefäßpermeabilität verantwortlich zu sein scheint.

Wie bereits bei der Bestimmung von VEGF165b aus Blut von Patientinnen mit GDM der Fall, ist ein Vergleich der hier dargelegten Ergebnisse mit ähnlichen Untersuchungen zum Expressionsverhalten dieses Wachstumsfaktors bei Plazenten aus Schwangerschaften mit GDM schwierig, da diesbezüglich die Datenlage der zur Verfügung stehenden Literatur kaum Aufschluss gibt. Es gibt eine Studie von Leach et al. (2006), die mittels Immunhistochemie die Expression von VEGF165b in Plazenten von Patientinnen mit DM I und GDM im Vergleich zu gesunden Kontrollplazenten untersuchten. In dieser Untersuchung konnte in den gesunden Plazenten sowie in denen aus Schwangerschaften mit GDM eine gleichartige Expression von VEGF165b im Endothel, in perivaskulären Zellen und im Synzytiotrophoblasten gesehen werden. In einer weiteren Studie von Sciota et al. (2008) wurde bei Gestationsdiabetikerinnen ebenfalls keine veränderte Expression von VEGF165b detektiert. Diese Studienergebnisse bestätigen das Ergebnis der vorliegenden Studie, dass in Plazenten von Patientinnen mit GDM keine veränderte Expression der als antiangiogenetisch beschriebenen Spleißvariante stattfindet.

5.4 Vergleich zwischen Mensch und Hund

Untersuchungen zu VEGF im Zusammenhang mit kaninem GDM sind bisher nicht beschrieben. Es liegt jedoch eine Studie vor, die die Expression von VEGF in der endotheliochorialen Plazenta des Hundes und der Katze untersucht (Bezler, 2008). Dabei konnte das VEGF-Protein in den Endothelien der Gefäße, in fetalen Mesenchymzellen und Periendothelzellen nachgewiesen werden. Auch im Trophoblast war über den gesamten Graviditätsverlauf eine positive Immunreaktion zu beobachten, wobei der Synzytiotrophoblast teilweise eine etwas stärkere Anfärbung als der Zytotrophoblast erkennen ließ (Bezler, 2008). Diese Beobachtungen spiegeln die Expression von VEGF in der humanen Plazenta wider. Für die Forschung wäre es sinnvoll, an einem Modelltier zu untersuchen, inwiefern Störungen in der kaninen Gravidität eine veränderte Expression von VEGF, dem eine Schlüsselrolle in der Angiogenese zukommt, widerspiegeln. Bemerkenswert ist, dass es bei der Hündin den spontan auftretenden GDM gibt, der noch immer wenig untersucht ist (Pöppel et al., 2013). Wird die Diagnose während der Trächtigkeit oder während des Diöstrus gestellt, ist diese Form des Diabetes mit dem humanen GDM vergleichbar (Rand et al., 2004). Blutuntersuchungen mittels ELISA zur Konzentrationsbestimmung von VEGF, wie sie in der vorliegenden Studie durchgeführt

wurden, wären beim kaninen Diabetes-Patient prinzipiell auch möglich. Interessant wäre die Fragestellung, ob ein Analogieschluss zwischen Mensch und Tier gezogen werden kann.

6 Schlussbetrachtung

In der vorliegenden Studie wurde ein ELISA zur VEGF-Konzentrationsbestimmung eingesetzt, der ein sinnvolles Verfahren für die Messung von VEGF im peripheren Blut darstellt. Dabei sollten verschiedene methodische Aspekte der Konzentrationsmessung von VEGF evaluiert werden und es wurden signifikante Ergebnisse erzielt. Diese zeigten, dass die Verwendung von unterschiedlichem Probenmaterial bzw. der Zeitpunkt der Blutabnahme die Konzentrationen von VEGF und damit das Ergebnis beeinflussen. Um verschiedene Methoden zu testen, ist es besonders sinnvoll dies an verschiedenen Gruppen (gesund/krank) zu überprüfen, da ein bestehender Unterschied so besonders deutlich gemacht werden kann. Außerdem kann auf diese Weise beurteilt werden, ob die Methodik sowohl bei gesunden als auch bei kranken Kollektiven zum Einsatz kommen kann. Nur so können Ergebnisse erzielt werden, die reproduzierbar sind. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, sollten zur Konzentrationsbestimmung von VEGF dringend methodische Standards festgelegt und eingehalten werden.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen keinen signifikanten Konzentrationsunterschied von VEGF im Schwangerschaftsverlauf zwischen gesunden Schwangeren und Schwangeren mit GDM. Auf Basis der in dieser Studie erhobenen Ergebnisse ist VEGF kein geeigneter Parameter um als prädiktiver Faktor für die Entwicklung des GDM zu dienen. Für die schwangerschaftsspezifische Erkrankung Präeklampsie konnte in dieser Fragestellung bereits ein Zusammenhang erforscht werden (Bills et al., 2009) und demnach Patientinnen mit veränderter Expression von Angiogenesefaktoren noch intensiver betreut und gegebenenfalls frühzeitig therapiert werden. Aufgrund der geringen Fallzahl in dieser Studie wäre es sinnvoll weitere Untersuchungen zur Rolle des VEGF im Rahmen von GDM durchzuführen und die Repräsentativität der vorliegenden Ergebnisse zu überprüfen.

Weiterhin ist festzuhalten, dass sich auch in den durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen zur Expression von VEGF in Plazenten aus gesunden Schwangerschaften und Schwangerschaften mit GDM keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen zeigten. Eine veränderte VEGF-Expression, wie sie schon in Studien zu präexistentem Diabetes mellitus beschrieben wurde, kann an den untersuchten

Plazenten aus Schwangerschaften mit GDM nicht nachvollzogen werden. Da ein GDM erst im Laufe der Schwangerschaft manifest wird, beeinflusst er die Entwicklung und Funktion der Plazenta im Gegensatz zum präexistenten Diabetes mellitus nicht von Beginn der Schwangerschaft an. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass die gestationsdiabetischen Plazenten keinen Unterschied in der VEGF-Expression im Vergleich zu den gesunden Plazenten aufweisen. Damit scheint das VEGF selbst ursächlich nicht an auftretenden strukturellen Veränderungen in Plazenten aus Schwangerschaften mit GDM beteiligt zu sein

7 Zusammenfassung

Die schwangerschaftsspezifische Erkrankung Gestationsdiabetes mellitus (GDM) zählt zu den am häufigsten auftretenden Komplikationen in der Schwangerschaft. Bei GDM liegt eine Dysfunktion des Endothels vor und die Komplikation geht mit einer veränderten Angiogenese und Vaskularisierung der Plazenta einher.

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ist einer der hauptverantwortlichen Faktoren für die Vaskulo- und Angiogenese. Während der Schwangerschaft und der plazentaren Entwicklung ist diese von entscheidender Bedeutung und das Zustandekommen einer erfolgreichen Schwangerschaft setzt eine funktionierende Interaktion zwischen maternalem und fetalem Gewebe voraus. Diese ist nur bei adäquater Vaskularisierung der Plazenta möglich.

Die vorliegende Arbeit untersucht den Wachstumsfaktor VEGF im Rahmen von GDM. VEGF besitzt mehrere Isoformen, wobei der Spleißvariante VEGF165b eine antiangiogene Eigenschaft zugesprochen wird. Störungen in der Expression des Wachstumsfaktors könnten eine bei GDM auftretende Angiopathie und eine veränderte fetale Entwicklung erklären. Außerdem sollte in dieser Dissertation untersucht werden inwiefern die Methodik (Wahl des Probenmaterials, Messzeitpunkt) der Konzentrationsbestimmung von VEGF einen Einfluss auf das Ergebnis hat.

Für die Studie wurden insgesamt Blutproben von 133 Frauen untersucht, darunter 100 gesunde nicht schwangere Frauen, 18 gesunde schwangere Frauen sowie 15 Frauen mit GDM. Mittels ELISA wurde im Blut der Patientinnen die Konzentration von VEGF A und deren Spleißvariante VEGF165b gemessen. Dies fand insgesamt zu sieben definierten Zeitpunkten während der Schwangerschaft und drei Mal post partum statt. Außerdem wurden 40 Plazentaprobe aus Schwangerschaften mit GDM immunhistochemisch auf die Expression von VEGF A und VEGF165b untersucht und mit 40 gesunden Kontrollen verglichen.

Die Untersuchung der Konzentrationen von VEGF (VEGF A und VEGF165b) ergab signifikant unterschiedliche Ergebnisse zwischen Serum und Plasma. Zwar konnte nicht durchgehend ein einheitliches Ergebnis gewonnen werden, ob die Messung aus Serum oder Plasma höhere Werte liefert, aber es steht fest, dass das verwendete Medium einen Einfluss auf die VEGF-Konzentration ausübt. Aufgrund möglicherweise verfälschter Ergebnisse in Serummessungen, die auf die Freisetzung von gespeichertem VEGF aus Thrombozyten während der Blutgerinnung zurückzuführen sind, sollten Konzentrationsbestimmungen des Wachstumsfaktors aus Plasma erfolgen. Dabei konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass auch die Art des Plasmas das Ergebnis der VEGF-Konzentration beeinflusst. Außerdem übt auch der Messzeitpunkt Einfluss auf das Ergebnis aus. Um VEGF-Werte im Verlauf einer Schwangerschaft miteinander vergleichen zu können, muss darauf geachtet werden, dass die Konzentrationsmessung bzw. der Zeitpunkt der Probennahme zum gleichen Schwangerschaftszeitpunkt stattfand.

Zwischen den Gruppen „Gesunde Schwangere“ und „Schwangere mit GDM“ konnten Unterschiede in der Konzentration von VEGF A und VEGF165b ermittelt werden, die jedoch nicht signifikant waren. Es wird angenommen, dass weitere angiogenetische Faktoren innerhalb einer multifaktoriellen Entwicklung der Plazenta für die veränderte plazentare Angiogenese und Vaskularisierung bei GDM verantwortlich sind. Postpartal zeigen die Konzentrationen von VEGF A und von VEGF165b eine Annäherung zwischen den Gruppen. Dies könnte für eine Normalisierung des Stoffwechsels nach GDM sprechen und ist ein weiterer Aspekt im Modell, dass es sich bei einer Schwangerschaft um einen „Stresstest“ für den Kohlenhydratstoffwechsel des maternalen Organismus handelt. Analog dazu zeigt sich im Krankheitsbild der Präeklampsie eine Stresssituation für Blutdruck und Nieren, deren pathogenetische Faktoren sich ebenfalls nach Entbindung zu revidieren scheinen. Beide Entitäten haben jedoch ein erhöhtes Risiko des Wiederauftretens mit fortschreitendem Lebensalter oder erneuter Schwangerschaft, so dass eine intensivere internistische Nachsorge dringend erforderlich ist.

In der immunhistochemischen Auswertung der Plazentaschnitte konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von VEGF A und VEGF165b zwischen gesunden Plazenten und denen aus Schwangerschaften mit GDM gesehen werden. Diese Beobachtung steht im Einklang zu den erhobenen Daten aus den Blutuntersuchungen mittels ELISA, die keinen

signifikanten Unterschied der VEGF-Konzentration im peripheren Blut zwischen gesunden Schwangeren und Schwangeren mit GDM zeigten.

Die Fallzahl der präsentierten Studie ist zu gering, um endgültige Aussagen treffen zu können. Es wäre wünschenswert die Repräsentativität der Ergebnisse an größeren Kollektiven zu überprüfen.

Für die veterinärmedizinische Forschung wäre es sinnvoll, ein Modelltier auf ähnliche Parameter wie in der vorliegenden Studie zu untersuchen. Da auch Hunde an GDM erkranken können, würde sich die Untersuchung dieser Spezies anbieten. Dabei ist die Fragestellung interessant, ob ein Analogieschluss zwischen Mensch und Tier gezogen werden kann.

8 Summary

The pregnancy-specific illness gestational diabetes mellitus (GDM) is among the most common complications to arise during a pregnancy. In GDM cases there is an endothelium disorder, and the complication is accompanied by a change of angiogenesis and vascularization of the placenta.

The vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the main factors responsible for vasculo- and angiogenesis. It is of critical importance during pregnancy and placental development, and achieving a successful pregnancy depends on a functioning interaction between maternal and fetal tissue.

This paper examines the growth factor VEGF in connection with GDM. VEGF comprises several isoforms, though the splice variant VEGF165b is considered to have an antiangiogenic characteristic. Disruptions in the expression of the growth factor may explain angiopathy that arises in cases of GDM and altered fetal development. In addition to that, this dissertation examines the degree to which the methods (choice of sample material, time of measurement) for determining concentration of VEGF may affect the result.

Blood samples from a total of 133 women were examined for the study, including 100 healthy non-pregnant women, 18 healthy pregnant women and 15 women with GDM. Using ELISA, the concentrations of VEGF A and its splice variant VEGF165b in the patients' blood were measured. This took place at a total of seven defined points in time during the pregnancy and three times post partum. In addition to that, 40 placenta samples from pregnancies with GDM were examined immunohistochemically for the expression of VEGF A and VEGF165b and compared with 40 healthy controls.

The examination of concentrations of VEGF (VEGF A and VEGF165b) resulted in significantly different findings between serum and plasma. Though it was not possible to consistently achieve a uniform result as to whether the measurement of serum or plasma provided higher values, it is clear that the medium used does affect the VEGF

concentration. Because of possibly distorted results in serum measurements due to the release of stored VEGF from thrombocytes during blood clotting, the concentration of the growth factor should be determined using plasma. That said, it was possible to demonstrate in this study that plasma type also influences the VEGF concentration result. In addition, the time of measuring also affects results. In order to be able to compare VEGF values over the course of a pregnancy, it must be ensured that the concentration measurements and the point of time at which samples are taken occur at the same time during the pregnancy.

Differences in the concentration of VEGF A and VEGF165b could be ascertained between the groups "healthy pregnant women" and "pregnant women with GDM", but they were not significant. It is assumed that additional angiogenic factors within a multi-factor development of the placenta are responsible for the altered placental angiogenesis and vascularization in cases of GDM. Postpartally the concentrations of VEGF A and of VEGF165b show a convergence of the two groups. This could indicate a normalization of the metabolism after GDM and is an additional aspect of the model in which a pregnancy is a "stress test" for the metabolism of carbohydrates in the maternal organism. Analogously, the symptoms of preeclampsia indicate a stress situation for blood pressure and kidneys whose pathogenic factors also appear to revise after childbirth. Both entities, however, have an increased risk of recurrence with advanced age or subsequent pregnancy, urgently necessitating more intensive internistic follow-up care.

In the immunohistochemical analysis of placenta samples, no significant difference in the expression of VEGF A and VEGF165b could be ascertained between healthy placentas and those from pregnancies with GDM. This observation matches the data obtained from the blood examinations using ELISA which showed no significant difference of VEGF concentrations in peripheral blood between healthy pregnant women and pregnant women with GDM.

The number of cases in the study presented is too low to make conclusive observations. It would be desirable to test the representativeness of the results on larger collectives.

For veterinary medical research, it would be sensible to examine a model animal for similar parameters as in this study. Because dogs can contract GDM, an examination of

this species would suggest itself. Here it would be interesting to find out whether a conclusion by analogy could be drawn between humans and animals.

9 Literaturverzeichnis

- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA) 1997. American Diabetes Association: clinical practice recommendations 1997. *Diabetes Care*, 20 Suppl 1, S1-70.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA) 2008. Standards of medical care in diabetes--2008. *Diabetes Care*, 31 Suppl 1, S12-54.
- AIELLO, L. P., AVERY, R. L., ARRIGG, P. G., KEYT, B. A., JAMPEL, H. D., SHAH, S. T., PASQUALE, L. R., THIEME, H., IWAMOTO, M. A., PARK, J. E. & ET AL. 1994. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med*, 331, 1480-7.
- AIELLO, L. P., PIERCE, E. A., FOLEY, E. D., TAKAGI, H., CHEN, H., RIDDLE, L., FERRARA, N., KING, G. L. & SMITH, L. E. 1995. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 10457-61.
- ALON, T., HEMO, I., ITIN, A., PE'ER, J., STONE, J. & KESHET, E. 1995. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med*, 1, 1024-8.
- ANTHONY, F. W., EVANS, P. W., WHEELER, T. & WOOD, P. J. 1997. Variation in detection of VEGF in maternal serum by immunoassay and the possible influence of binding proteins. *Ann Clin Biochem*, 34 (Pt 3), 276-80.
- ARTAC, R. A., MCFEE, R. M., SMITH, R. A., BALTES-BREITWISCH, M. M., CLOPTON, D. T. & CUPP, A. S. 2009. Neutralization of vascular endothelial growth factor antiangiogenic isoforms is more effective than treatment with proangiogenic isoforms in stimulating vascular development and follicle progression in the perinatal rat ovary. *Biol Reprod*, 81, 978-88.
- BALICKI, I. & SOBCZYNSKA-RAK, A. 2014. Serum vascular endothelial growth factor concentration in dogs diagnosed with chronic superficial keratitis. *Acta Vet Hung*, 62, 22-32.
- BANAI, S., SHWEIKI, D., PINSON, A., CHANDRA, M., LAZAROVICI, G. & KESHET, E. 1994. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression

- induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc Res*, 28, 1176-9.
- BANKS, R. E., FORBES, M. A., KINSEY, S. E., STANLEY, A., INGHAM, E., WALTERS, C. & SELBY, P. J. 1998a. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer*, 77, 956-64.
- BANKS, R. E., FORBES, M. A., SEARLES, J., PAPPIN, D., CANAS, B., RAHMAN, D., KAUFMANN, S., WALTERS, C. E., JACKSON, A., EVES, P., LINTON, G., KEEN, J., WALKER, J. J. & SELBY, P. J. 1998b. Evidence for the existence of a novel pregnancy-associated soluble variant of the vascular endothelial growth factor receptor, Flt-1. *Mol Hum Reprod*, 4, 377-86.
- BARLEON, B., SIEMEISTER, G., MARTINY-BARON, G., WEINDEL, K., HERZOG, C. & MARME, D. 1997. Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial cells. *Cancer Res*, 57, 5421-5.
- BATES, D. O., CUI, T. G., DOUGHTY, J. M., WINKLER, M., SUGIONO, M., SHIELDS, J. D., PEAT, D., GILLATT, D. & HARPER, S. J. 2002. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 62, 4123-31.
- BATES, D. O., MACMILLAN, P. P., MANJALY, J. G., QIU, Y., HUDSON, S. J., BEVAN, H. S., HUNTER, A. J., SOOTHILL, P. W., READ, M., DONALDSON, L. F. & HARPER, S. J. 2006. The endogenous anti-angiogenic family of splice variants of VEGF, VEGFxxx_b, are down-regulated in pre-eclamptic placentae at term. *Clin Sci (Lond)*, 110, 575-85.
- BATISTA, M. R., SMITH, M. S., SNEAD, W. L., CONNOLLY, C. C., LACY, D. B. & MOORE, M. C. 2005. Chronic estradiol and progesterone treatment in conscious dogs: effects on insulin sensitivity and response to hypoglycemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289, R1064-73.
- BEN-AV, P., CROFFORD, L. J., WILDER, R. L. & HLA, T. 1995. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett*, 372, 83-7.

- BEZLER, L. 2008. *Expression zytoskeletaler Filamente und des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Systems in der endotheliochorialen Plazenta von Hund und Katze*. Justus-Liebig-Universität Gießen.
- BILLS, V. L., VARET, J., MILLAR, A., HARPER, S. J., SOOTHILL, P. W. & BATES, D. O. 2009. Failure to up-regulate VEGF165b in maternal plasma is a first trimester predictive marker for pre-eclampsia. *Clin Sci (Lond)*, 116, 265-72.
- BINDER, D. R., HERRING, I. P., ZIMMERMAN, K. L., PICKETT, J. P. & HUCKLE, W. R. 2012. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2 in normal and diseased canine eyes. *Vet Ophthalmol*, 15, 223-30.
- BINGLEY, P. J., BONIFACIO, E. & MUELLER, P. W. 2003. Diabetes Antibody Standardization Program: first assay proficiency evaluation. *Diabetes*, 52, 1128-36.
- BOGIC, L. V., BRACE, R. A. & CHEUNG, C. Y. 2001. Developmental expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and VEGF binding in ovine placenta and fetal membranes. *Placenta*, 22, 265-75.
- BÖHM, B. O., DREYER, M., FRITSCH, A., FÜCHTENBUSCH, M., GÖLZ, S. & MARTIN, S. 2011. Therapie des Typ-1-Diabetes. Version 1.0. Verfügbar: http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/fileadmin/Redakteur/Leitlinien/Evidenzbasierte_Leitlinien/AktualisierungTherapieTyp1Diabetes_1_20120319_TL.pdf [Zugriff 13.03.2014].
- BOSIO, P. M., WHEELER, T., ANTHONY, F., CONROY, R., O'HERLIHY, C. & MCKENNA, P. 2001. Maternal plasma vascular endothelial growth factor concentrations in normal and hypertensive pregnancies and their relationship to peripheral vascular resistance. *Am J Obstet Gynecol*, 184, 146-52.
- BOTTAZZO, G. F., FLORIN-CHRISTENSEN, A. & DONIACH, D. 1974. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*, 2, 1279-83.
- BREIER, G., ALBRECHT, U., STERRER, S. & RISAU, W. 1992. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development*, 114, 521-32.
- BRENNER, B. 2004. Haemostatic changes in pregnancy. *Thromb Res*, 114, 409-14.
- BROWN, L. F., BERSE, B., JACKMAN, R. W., TOGNAZZI, K., GUIDI, A. J., DVORAK, H. F., SENGER, D. R., CONNOLLY, J. L. & SCHNITT, S. J. 1995. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol*, 26, 86-91.

- BROWN, L. F., BERSE, B., JACKMAN, R. W., TOGNAZZI, K., MANSEAU, E. J., SENGHER, D. R. & DVORAK, H. F. 1993. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res*, 53, 4727-35.
- BROWN, L. F., BERSE, B., TOGNAZZI, K., MANSEAU, E. J., VAN DE WATER, L., SENGHER, D. R., DVORAK, H. F. & ROSEN, S. 1992. Vascular permeability factor mRNA and protein expression in human kidney. *Kidney Int*, 42, 1457-61.
- BROXMEYER, H. E., COOPER, S., LI, Z. H., LU, L., SONG, H. Y., KWON, B. S., WARREN, R. E. & DONNER, D. B. 1995. Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. *Int J Hematol*, 62, 203-15.
- BUCHANAN, T. A. & XIANG, A. H. 2005. Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 115, 485-91.
- BUKOWSKA, D., KEMPISTY, B., JACKOWSKA, M., WOZNA, M., ANTOSIK, P., PIOTROWSKA, H. & JASKOWSKI, J. M. 2011. Analysis of integrins and vascular endothelial growth factor isoforms mRNA expression in the canine uterus during perimplantation period. *Pol J Vet Sci*, 14, 253-8.
- BUNDESÄRZTEKAMMER (BÄK), KASSENÄRZTLICHE BUNDESVEREINIGUNG (KBV) & ARBEITSGEMEINSCHAFT DER WISSENSCHAFTLICHEN MEDIZINISCHEN FACHGESELLSCHAFTEN (AWMF). 2013. Nationale VersorgungsLeitlinie Therapie des Typ - 2 - Diabetes – Langfassung. 1. Auflage [Online], Version 1. Verfügbar: http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/diabetes2/dm2_Therapie [Zugriff 12.12.2013].
- CAMPBELL, K. L. & LATIMER, K. S. 1984. Transient diabetes mellitus associated with prednisone therapy in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, 185, 299-301.
- CARMELIET, P., FERREIRA, V., BREIER, G., POLLEFEYT, S., KIECKENS, L., GERTSENSTEIN, M., FAHRIG, M., VANDENHOECK, A., HARPAL, K., EBERHARDT, C., DECLERCQ, C., PAWLING, J., MOONS, L., COLLEN, D., RISAU, W. & NAGY, A. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380, 435-9.
- CEBE SUAREZ, S., PIEREN, M., CARIOLATO, L., ARN, S., HOFFMANN, U., BOGUCKI, A., MANLIUS, C., WOOD, J. & BALLMER-HOFER, K. 2006. A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell Mol Life Sci*, 63, 2067-77.

- CHARNOCK-JONES, D. S. 2002. Soluble flt-1 and the angiopoietins in the development and regulation of placental vasculature. *J Anat*, 200, 607-15.
- CHRISTENSON, L. K. & STOUFFER, R. L. 1997. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 2135-42.
- CHRISTINGER, H. W., MULLER, Y. A., BERLEAU, L. T., KEYT, B. A., CUNNINGHAM, B. C., FERRARA, N. & DE VOS, A. M. 1996. Crystallization of the receptor binding domain of vascular endothelial growth factor. *Proteins*, 26, 353-7.
- CLARK, D. E., SMITH, S. K., HE, Y., DAY, K. A., LICENCE, D. R., CORPS, A. N., LAMMOGLIA, R. & CHARNOK-JONES, D. S. 1998a. A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol Reprod*, 59, 1540-8.
- CLARK, D. E., SMITH, S. K., LICENCE, D., EVANS, A. L. & CHARNOK-JONES, D. S. 1998. Comparison of expression patterns for placenta growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in the human placenta throughout gestation. *J Endocrinol*, 159, 459-67.
- CLAUSS, M., GERLACH, M., GERLACH, H., BRETT, J., WANG, F., FAMILLETTI, P. C., PAN, Y. C., OLANDER, J. V., CONNOLLY, D. T. & STERN, D. 1990. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med*, 172, 1535-45.
- COHEN, T., NAHARI, D., CEREM, L. W., NEUFELD, G. & LEVI, B. Z. 1996. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 271, 736-41.
- CONCANNON, P. W. 1986. Canine pregnancy and parturition. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 16, 453-75.
- CONNOLLY, C. C., AGLIONE, L. N., SMITH, M. S., LACY, D. B. & MOORE, M. C. 2004. Insulin action during late pregnancy in the conscious dog. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286, E909-15.
- CONNOLLY, D. T., HEUVELMAN, D. M., NELSON, R., OLANDER, J. V., EPPLEY, B. L., DELFINO, J. J., SIEGEL, N. R., LEIMGRUBER, R. M. & FEDER, J. 1989.

- Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest*, 84, 1470-8.
- COOPER, J. C., SHARKEY, A. M., MCLAREN, J., CHARNOCK-JONES, D. S. & SMITH, S. K. 1995. Localization of vascular endothelial growth factor and its receptor, flt, in human placenta and decidua by immunohistochemistry. *J Reprod Fertil*, 105, 205-13.
- CORDELL, H. J. & TODD, J. A. 1995. Multifactorial inheritance in type 1 diabetes. *Trends Genet*, 11, 499-504.
- CORDELL, J. L., FALINI, B., ERBER, W. N., GHOSH, A. K., ABDULAZIZ, Z., MACDONALD, S., PULFORD, K. A., STEIN, H. & MASON, D. Y. 1984. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem*, 32, 219-29.
- CRAWFORD, T. N., ALFARO, D. V., 3RD, KERRISON, J. B. & JABLON, E. P. 2009. Diabetic retinopathy and angiogenesis. *Curr Diabetes Rev*, 5, 8-13.
- CULLINAN-BOVE, K. & KOOS, R. D. 1993. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology*, 133, 829-37.
- DAS, S. K., CHAKRABORTY, I., WANG, J., DEY, S. K. & HOFFMAN, L. H. 1997. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor messenger ribonucleic acids in the peri-implantation rabbit uterus. *Biol Reprod*, 56, 1390-9.
- DE QUEIROZ, G. F., DAGLI, M. L., FUKUMASU, H., ZAVALA, A. A. & MATERA, J. M. 2010. Vascular endothelial growth factor expression and microvascular density in soft tissue sarcomas in dogs. *J Vet Diagn Invest*, 22, 105-8.
- DE VRIES, C., ESCOBEDO, J. A., UENO, H., HOUCK, K., FERRARA, N. & WILLIAMS, L. T. 1992. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, 255, 989-91.
- DESOYE, G. 2003. Die Plazenta bei pathologischen Schwangerschaften. *Journal für Fertilität und Reproduktion*, 13.
- DETMAR, M., YEO, K. T., NAGY, J. A., VAN DE WATER, L., BROWN, L. F., BERSE, B., ELICKER, B. M., LEDBETTER, S. & DVORAK, H. F. 1995. Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth

- factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol*, 105, 44-50.
- DICKINSON, P. J., STURGES, B. K., HIGGINS, R. J., ROBERTS, B. N., LEUTENEGGER, C. M., BOLLEN, A. W. & LECOUTEUR, R. A. 2008. Vascular endothelial growth factor mRNA expression and peritumoral edema in canine primary central nervous system tumors. *Vet Pathol*, 45, 131-9.
- DOMINICI, F. P., ARGENTINO, D. P., MUNOZ, M. C., MIQUET, J. G., SOTELO, A. I. & TURYN, D. 2005. Influence of the crosstalk between growth hormone and insulin signalling on the modulation of insulin sensitivity. *Growth Horm IGF Res*, 15, 324-36.
- DOMINICI, F. P. & TURYN, D. 2002. Growth hormone-induced alterations in the insulin-signaling system. *Exp Biol Med (Maywood)*, 227, 149-57.
- EIGENMANN, J. E., EIGENMANN, R. Y., RIJNBERK, A., VAN DER GAAG, I., ZAPF, J. & FROESCH, E. R. 1983. Progesterone-controlled growth hormone overproduction and naturally occurring canine diabetes and acromegaly. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 104, 167-76.
- ENGVALL, E. & PERLMANN, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8, 871-4.
- ERIKSSON, U. J., BORG, L. A., FORSBERG, H. & STYRUD, J. 1991. Diabetic embryopathy. Studies with animal and in vitro models. *Diabetes*, 40 Suppl 2, 94-8.
- EVANS, P. W., WHEELER, T., ANTHONY, F. W. & OSMOND, C. 1998. A longitudinal study of maternal serum vascular endothelial growth factor in early pregnancy. *Hum Reprod*, 13, 1057-62.
- FAVA, R. A., OLSEN, N. J., SPENCER-GREEN, G., YEO, K. T., YEO, T. K., BERSE, B., JACKMAN, R. W., SENGER, D. R., DVORAK, H. F. & BROWN, L. F. 1994. Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J Exp Med*, 180, 341-6.
- FERGUSON, J., QIU, Y., NEAL, C., BATES, D., HARPER, S. & SALMON, A. 2009. Over-expression of VEGF165b in the kidney ameliorates diabetes induced albuminuria. Renal Association Annual Congress; Liverpool, U.K.. 21–24 April 2009.
- FERRARA, N. 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 25, 581-611.

- FERRARA, N., CHEN, H., DAVIS-SMYTH, T., GERBER, H. P., NGUYEN, T. N., PEERS, D., CHISHOLM, V., HILLAN, K. J. & SCHWALL, R. H. 1998. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med*, 4, 336-40.
- FERRARA, N. & DAVIS-SMYTH, T. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18, 4-25.
- FERRARA, N. & HENZEL, W. J. 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 161, 851-8.
- FERRARA, N., HOUCK, K., JAKEMAN, L. & LEUNG, D. W. 1992. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev*, 13, 18-32.
- FERRARA, N., HOUCK, K. A., JAKEMAN, L. B., WINER, J. & LEUNG, D. W. 1991. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem*, 47, 211-8.
- FINGER, R. P., FLECKENSTEIN, M., SCHOLL, H. P. & HOLZ, F. G. 2007. [Therapeutic anti-VEGF in ophthalmology: physiopathology and treatment of age-related macular degeneration]. *Pharm Unserer Zeit*, 36, 424-30.
- FLIER, J. S. 1983. Insulin receptors and insulin resistance. *Annu Rev Med*, 34, 145-60.
- FORSYTHE, J. A., JIANG, B. H., IYER, N. V., AGANI, F., LEUNG, S. W., KOOS, R. D. & SEMENZA, G. L. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, 16, 4604-13.
- FRANK, S., HUBNER, G., BREIER, G., LONGAKER, M. T., GREENHALGH, D. G. & WERNER, S. 1995. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*, 270, 12607-13.
- FUJISAWA, H. & KITSUKAWA, T. 1998. Receptors for collapsin/semaphorins. *Curr Opin Neurobiol*, 8, 587-92.
- FUJISAWA, H., KITSUKAWA, T., KAWAKAMI, A., TAKAGI, S., SHIMIZU, M. & HIRATA, T. 1997. Roles of a neuronal cell-surface molecule, neuropilin, in nerve fiber fasciculation and guidance. *Cell Tissue Res*, 290, 465-70.
- GABRILOVICH, D. I., CHEN, H. L., GIRGIS, K. R., CUNNINGHAM, H. T., MENY, G. M., NADAF, S., KAVANAUGH, D. & CARBONE, D. P. 1996. Production of

- vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med*, 2, 1096-103.
- GAGNE, D., PAGE, M., ROBITAILLE, G., HUGO, P. & GOSSELIN, D. 2003. Levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in serum of patients with endometriosis. *Hum Reprod*, 18, 1674-80.
- GEORGE, M. L., ECCLES, S. A., TUTTON, M. G., ABULAFI, A. M. & SWIFT, R. I. 2000. Correlation of plasma and serum vascular endothelial growth factor levels with platelet count in colorectal cancer: clinical evidence of platelet scavenging? *Clin Cancer Res*, 6, 3147-52.
- GERBER, H. P., CONDORELLI, F., PARK, J. & FERRARA, N. 1997. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem*, 272, 23659-67.
- GERBER, H. P., DIXIT, V. & FERRARA, N. 1998a. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 273, 13313-6.
- GERBER, H. P., HILLAN, K. J., RYAN, A. M., KOWALSKI, J., KELLER, G. A., RANGELL, L., WRIGHT, B. D., RADTKE, F., AGUET, M. & FERRARA, N. 1999a. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development*, 126, 1149-59.
- GERBER, H. P., MCMURTREY, A., KOWALSKI, J., YAN, M., KEYT, B. A., DIXIT, V. & FERRARA, N. 1998b. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*, 273, 30336-43.
- GERBER, H. P., VU, T. H., RYAN, A. M., KOWALSKI, J., WERB, Z. & FERRARA, N. 1999b. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med*, 5, 623-8.
- GEVA, E., GINZINGER, D. G., ZALOUDEK, C. J., MOORE, D. H., BYRNE, A. & JAFFE, R. B. 2002. 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 Clin Endocrinol Metab*, 87, 4213-24.

- GLASS, C. A., HARPER, S. J. & BATES, D. O. 2006. The anti-angiogenic VEGF isoform VEGF165b transiently increases hydraulic conductivity, probably through VEGF receptor 1 in vivo. *J Physiol*, 572, 243-57.
- GUIDI, A. J., ABU-JAWDEH, G., TOGNAZZI, K., DVORAK, H. F. & BROWN, L. F. 1996. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in endometrial carcinoma. *Cancer*, 78, 454-60.
- GUO, D., JIA, Q., SONG, H. Y., WARREN, R. S. & DONNER, D. B. 1995. Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *J Biol Chem*, 270, 6729-33.
- GUPTILL, L., GLICKMAN, L. & GLICKMAN, N. 2003. Time trends and risk factors for diabetes mellitus in dogs: analysis of veterinary medical data base records (1970-1999). *Vet J*, 165, 240-7.
- HAN, J., MANDAL, A. K. & HIEBERT, L. M. 2005. Endothelial cell injury by high glucose and heparanase is prevented by insulin, heparin and basic fibroblast growth factor. *Cardiovasc Diabetol*, 4, 12.
- HATTORI, K., DIAS, S., HEISSIG, B., HACKETT, N. R., LYDEN, D., TATENO, M., HICKLIN, D. J., ZHU, Z., WITTE, L., CRYSTAL, R. G., MOORE, M. A. & RAFII, S. 2001. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med*, 193, 1005-14.
- HELKSKE, S., VUORELA, P., CARPEN, O., HORNIG, C., WEICH, H. & HALMESMAKI, E. 2001. Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2 and 3 in placentas from normal and complicated pregnancies. *Mol Hum Reprod*, 7, 205-10.
- HERBST, H. & HÜBNER, J. H. 2014. in: Pathologie-Online: Immunhistologie. Verfügbar: <http://www.pathologie-online.de/methoden/immunhistologie/> [Zugriff 20.01.2014].
- HIDEN, U., LANG, U. & DESOYE, G. 2009. Fetoplazentare Störungen bei Gestationsdiabetes. *Gynäkologisch-geburtshilfliche Rundschau*, 49, 224-229.
- HOENIG, M. 2002. Comparative aspects of diabetes mellitus in dogs and cats. *Mol Cell Endocrinol*, 197, 221-9.

- HOENIG, M. & DAWE, D. L. 1992. A qualitative assay for beta cell antibodies. Preliminary results in dogs with diabetes mellitus. *Vet Immunol Immunopathol*, 32, 195-203.
- HOUCK, K. A., FERRARA, N., WINER, J., CACHIANES, G., LI, B. & LEUNG, D. W. 1991. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*, 5, 1806-14.
- HSU, S. M., RAINE, L. & FANGER, H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29, 577-80.
- HUA, J., SPEE, C., KASE, S., RENNEL, E. S., MAGNUSSEN, A. L., QIU, Y., VAREY, A., DHAYADE, S., CHURCHILL, A. J., HARPER, S. J., BATES, D. O. & HINTON, D. R. 2010. Recombinant human VEGF165b inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 4282-8.
- IINO, K., YOSHINARI, M., DOI, Y., SHINOHARA, N., IWASE, M. & FUJISHIMA, M. 1997. Reduced tissue oxygenation and its reversibility by glycemic control in diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*, 34, 163-8.
- IMAGAWA, A., HANAFUSA, T., MIYAGAWA, J. & MATSUZAWA, Y. 2000. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. Osaka IDDM Study Group. *N Engl J Med*, 342, 301-7.
- JACKSON, M. R., CARNEY, E. W., LYE, S. J. & RITCHIE, J. W. 1994. Localization of two angiogenic growth factors (PDEC GF and VEGF) in human placentae throughout gestation. *Placenta*, 15, 341-53.
- JAKEMAN, L. B., ARMANINI, M., PHILLIPS, H. S. & FERRARA, N. 1993. Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology*, 133, 848-59.
- JANKA, H. U. 2011. Allgemeiner Überblick über Gefäßkrankheiten bei Diabetes mellitus. In: HÄRING, H.-U., GALLWITZ, B., MÜLLER-WIELAND, D., USADEL, K.-H. & MEHNERT, H. (Hrsg.) *Diabetologie in Klinik und Praxis*. 6. Auflage. Stuttgart: Thieme; Kapitel 24, 354-363.
- JIA, H., BAGHERZADEH, A., HARTZOULAKIS, B., JARVIS, A., LOHR, M., SHAIKH, S., AQIL, R., CHENG, L., TICKNER, M., ESPOSITO, D., HARRIS, R., DRISCOLL, P. C., SELWOOD, D. L. & ZACHARY, I. C. 2006.

- Characterization of a bicyclic peptide neuropilin-1 (NP-1) antagonist (EG3287) reveals importance of vascular endothelial growth factor exon 8 for NP-1 binding and role of NP-1 in KDR signaling. *J Biol Chem*, 281, 13493-502.
- JINGJING, L., SRINIVASAN, B., BIAN, X., DOWNEY, H. F. & ROQUE, R. S. 2000. Vascular endothelial growth factor is increased following coronary artery occlusion in the dog heart. *Mol Cell Biochem*, 214, 23-30.
- JIRKOVSKA, M., KUBINOVA, L., JANACEK, J., MORAVCOVA, M., KREJCI, V. & KAREN, P. 2002. Topological properties and spatial organization of villous capillaries in normal and diabetic placentas. *J Vasc Res*, 39, 268-78.
- JOHNSON, D. D., PALUMBO, P. J. & CHU, C. P. 1980. Diabetic ketoacidosis in a community-based population. *Mayo Clin Proc*, 55, 83-8.
- JOUSSEN, A. M., KIRCHHOF, B. & GOTTSTEIN, C. 2003. Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese. *Der Ophthalmologe*, 100, 284-291.
- JOVANOVIC-PETERSON, L., DURAK, E. P. & PETERSON, C. M. 1989. Randomized trial of diet versus diet plus cardiovascular conditioning on glucose levels in gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol*, 161, 415-9.
- JOVANOVIC-PETERSON, L. & PETERSON, C. M. 1992. Nutritional management of the obese gestational diabetic pregnant woman. *J Am Coll Nutr*, 11, 246-50.
- JOVANOVIC, L. & PETERSON, C. M. 1985. Screening for gestational diabetes. Optimum timing and criteria for retesting. *Diabetes*, 34 Suppl 2, 21-3.
- KATO, Y., ASANO, K., MOGI, T., KUTARA, K., TESHIMA, K., EDAMURA, K., TSUMAGARI, S., HASEGAWA, A. & TANAKA, S. 2007. Clinical significance of circulating vascular endothelial growth factor in dogs with mammary gland tumors. *J Vet Med Sci*, 69, 77-80.
- KAUTZKY-WILLER, A., PRAGER, R., WALDHAUSL, W., PACINI, G., THOMASETH, K., WAGNER, O. F., ULM, M., STRELI, C. & LUDVIK, B. 1997. Pronounced insulin resistance and inadequate beta-cell secretion characterize lean gestational diabetes during and after pregnancy. *Diabetes Care*, 20, 1717-23.
- KAWAMURA, H., LI, X., HARPER, S. J., BATES, D. O. & CLAESSION-WELSH, L. 2008. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak in vitro agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. *Cancer Res*, 68, 4683-92.

- KEMIK, O., KEMIK, S. A., PURYSA, S. & TUZUN, S. 2010. Imbalance of VEGF family serum levels and receptors in patients with inflammatory bowel disease. *Bratisl Lek Listy*, 111, 439-42.
- KENDALL, R. L. & THOMAS, K. A. 1993. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 10705-9.
- KENDALL, R. L., WANG, G. & THOMAS, K. A. 1996. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun*, 226, 324-8.
- KERNER, W. & BRÜCKEL, J. 2013. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Diabetologie und Stoffwechsel*, 8 Suppl 2, 104-107.
- KIM, K. J., LI, B., WINER, J., ARMANINI, M., GILLET, N., PHILLIPS, H. S. & FERRARA, N. 1993. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, 362, 841-4.
- KLEINWECHTER, H., SCHÄFER-GRAF, U., BÜHRER, C., HOESLI, I., KAINER, F., KAUTZKY-WILLER, A., PAWLOWSKI, B., SCHUNCK, K., SOMVILLE, T. & SORGER, M. 2011. Gestationsdiabetes mellitus (GDM). Evidenzbasierte Leitlinie zu Diagnostik, Therapie u. Nachsorge der Diabetes-Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG). Verfügbar: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/057-008l_S3_Gestationsdiabetes_2011-08.pdf.
- KLEINWECHTER, H., SCHÄFER-GRAF, U., BÜHRER, C., HOESLI, I., KAINER, F., KAUTZKY-WILLER, A., PAWLOWSKI, B., SCHUNCK, K., SOMVILLE, T. & SORGER, M. 2012. Gestationsdiabetes mellitus (GDM). Diagnostik, Therapie u. Nachsorge. Praxisleitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG). *Diabetologie*, 7, 174-184.
- KOCH, S., TUGUES, S., LI, X., GUALANDI, L. & CLAESSEON-WELSH, L. 2011. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J*, 437, 169-83.
- KONOPATSKAYA, O., CHURCHILL, A. J., HARPER, S. J., BATES, D. O. & GARDINER, T. A. 2006. VEGF165b, an endogenous C-terminal splice variant of VEGF, inhibits retinal neovascularization in mice. *Mol Vis*, 12, 626-32.

- KOOS, R. D., KAZI, A. A., ROBERSON, M. S. & JONES, J. M. 2005. New insight into the transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor expression in the endometrium by estrogen and relaxin. *Ann N Y Acad Sci*, 1041, 233-47.
- KRÜSSEL, J. S., BIELFELD, P., POLAN, M. L. & SIMON, C. 2003. Regulation of embryonic implantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 110 Suppl 1, S2-9.
- KU, D. D., ZALESKI, J. K., LIU, S. & BROCK, T. A. 1993. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol*, 265, H586-92.
- KUMAZAKI, K., NAKAYAMA, M., SUEHARA, N. & WADA, Y. 2002. Expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathologic conditions. *Hum Pathol*, 33, 1069-77.
- KUPFERMINC, M. J., DANIEL, Y., ENGLENDER, T., BARAM, A., MANY, A., JAFFA, A. J., GULL, I. & LESSING, J. B. 1997. Vascular endothelial growth factor is increased in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*, 38, 302-6.
- KVANTA, A., ALGVERE, P. V., BERGLIN, L. & SEREGARD, S. 1996. Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37, 1929-34.
- LANG, U., HUSSLEIN, P., AHNER, R. & BIKAS, D. 2011. Physiologie des mütterlichen Organismus. In: SCHNEIDER, H., HUSSLEIN, P. & SCHNEIDER, K. T. M. (Hrsg.) *Die Geburtshilfe*. Berlin: Springer; Kapitel 1, 175-192.
- LEACH, L., REEVE, K. S., M.A., G. & D.O., B. 2006. Effects of gestational diabetes (GDM) on vascular integrity of the human placenta: the role of VEGF165b. *Microcirculation*, 13, 526.
- LEQUIN, R. M. 2005. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem*, 51, 2415-8.
- LEVY, A. P., LEVY, N. S. & GOLDBERG, M. A. 1996. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem*, 271, 2746-53.
- LEVY, N. S., CHUNG, S., FURNEAUX, H. & LEVY, A. P. 1998. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem*, 273, 6417-23.
- LIN, C. C., RIVER, J., RIVER, P., BLIX, P. M. & MOAWAD, A. H. 1986. Good diabetic control early in pregnancy and favorable fetal outcome. *Obstet Gynecol*, 67, 51-6.

- LOPES, F. L., DESMARAIS, J., GEVRY, N. Y., LEDOUX, S. & MURPHY, B. D. 2003. Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and receptors Flt-1 and KDR during the peri-implantation period in the mink, *Mustela vison*. *Biol Reprod*, 68, 1926-33.
- LUTTY, G. A., MCLEOD, D. S., BHUTTO, I. & WIEGAND, S. J. 2011. Effect of VEGF trap on normal retinal vascular development and oxygen-induced retinopathy in the dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 4039-47.
- LYGNOS, M. C., PAPPA, K. I., PAPADAKI, H. A., RELAKIS, C., KOUMANTAKIS, E., ANAGNOU, N. P. & ELIOPOULOS, G. D. 2006. Changes in maternal plasma levels of VEGF, bFGF, TGF-beta1, ET-1 and sKL during uncomplicated pregnancy, hypertensive pregnancy and gestational diabetes. *In Vivo*, 20, 157-63.
- MADAZLI, R., AYDIN, S., ULUDAG, S., VILDAN, O. & TOLUN, N. 2003. Maternal plasma levels of cytokines in normal and preeclamptic pregnancies and their relationship with diastolic blood pressure and fibronectin levels. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 82, 797-802.
- MADAZLI, R., TUTEN, A., CALAY, Z., UZUN, H., ULUDAG, S. & OCAK, V. 2008. The incidence of placental abnormalities, maternal and cord plasma malondialdehyde and vascular endothelial growth factor levels in women with gestational diabetes mellitus and nondiabetic controls. *Gynecol Obstet Invest*, 65, 227-32.
- MAHMOUND, R. A. & ABDEL-RAOUF, M. 2006. Serum endostatin and vascular endothelial growth factor levels in patients with pre-eclampsia. *East Mediterr Health J*, 12, 178-87.
- MAIOLINI, A., OTTEN, M., HEWICKER-TRAUTWEIN, M., CARLSON, R. & TIPOLD, A. 2013. Interleukin-6, vascular endothelial growth factor and transforming growth factor beta 1 in canine steroid responsive meningitis-arteritis. *BMC Vet Res*, 9, 23.
- MAIOLINO, P., DE VICO, G. & RESTUCCI, B. 2000. Expression of vascular endothelial growth factor in basal cell tumours and in squamous cell carcinomas of canine skin. *J Comp Pathol*, 123, 141-5.
- MANDRIOTA, S. J., MENOUD, P. A. & PEPPER, M. S. 1996. Transforming growth factor beta 1 down-regulates vascular endothelial growth factor receptor 2/flk-1 expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 271, 11500-5.

- MARINI, M., VICHI, D., TOSCANO, A., THYRION, G. D., BONACCINI, L., PARRETTI, E., GHERI, G., PACINI, A. & SGAMBATI, E. 2008. Effect of impaired glucose tolerance during pregnancy on the expression of VEGF receptors in human placenta. *Reprod Fertil Dev*, 20, 789-801.
- MATTHAEI, S., BIERWIRTH, R., FRITSCHKE, A., GALLWITZ, B., HÄRING, H.-U., JOOST, H.-G., KELLERER, M., KLOOS, C., KLUNT, T., NAUCK, M., SCHERNTHANER, G., SIEGEL, E. & THIENEL, F. 2011. Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2. *Diabetologie*, 6, 131-136.
- MATTHEWS, W., JORDAN, C. T., GAVIN, M., JENKINS, N. A., COPELAND, N. G. & LEMISCHKA, I. R. 1991. A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 9026-30.
- MAYNARD, S. E., MIN, J. Y., MERCHAN, J., LIM, K. H., LI, J., MONDAL, S., LIBERMANN, T. A., MORGAN, J. P., SELLKE, F. W., STILLMAN, I. E., EPSTEIN, F. H., SUKHATME, V. P. & KARUMANCHI, S. A. 2003. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*, 111, 649-58.
- MCKEEMAN, G. C., ARDILL, J. E., CALDWELL, C. M., HUNTER, A. J. & MCCLURE, N. 2004. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) is increased throughout gestation in patients who have preeclampsia develop. *Am J Obstet Gynecol*, 191, 1240-6.
- MILLER-KASPRZAK, E. & JAGODZINSKI, P. P. 2008. 5-Aza-2'-deoxycytidine increases the expression of anti-angiogenic vascular endothelial growth factor 189b variant in human lung microvascular endothelial cells. *Biomed Pharmacother*, 62, 158-63.
- MONACCI, W. T., MERRILL, M. J. & OLDFIELD, E. H. 1993. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am J Physiol*, 264, C995-1002.
- MORBIDELLI, L., CHANG, C. H., DOUGLAS, J. G., GRANGER, H. J., LEDDA, F. & ZICHE, M. 1996. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol*, 270, H411-5.

- MULLER, Y. A., CHRISTINGER, H. W., KEYT, B. A. & DE VOS, A. M. 1997. The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure*, 5, 1325-38.
- NAGY, J. A., VASILE, E., FENG, D., SUNDBERG, C., BROWN, L. F., DETMAR, M. J., LAWITTS, J. A., BENJAMIN, L., TAN, X., MANSEAU, E. J., DVORAK, A. M. & DVORAK, H. F. 2002. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med*, 196, 1497-506.
- NATARAJAN, R., BAI, W., LANTING, L., GONZALES, N. & NADLER, J. 1997. Effects of high glucose on vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 273, H2224-31.
- NEIL, A. L. & DIXON, F. J. 1959. Immunohisto-chemical detection of antibody in cell-transfer studies. *AMA Arch Pathol*, 67, 643-9.
- NELSON, R. W. 2010. Erkrankungen des endokrinen Pankreas. In: GUILLERMO COUTO, C. (Hrsg.) *Innere Medizin der Kleintiere*. München: Urban&Fischer; Kapitel 52, 793-838.
- NEUFELD, G., COHEN, T., GENGRINOVITCH, S. & POLTORAK, Z. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 13, 9-22.
- NOLL, S. & SCHAUB-KUHNEN, S. 2000a. Einbettung. In: HÖFLER, H. & MÜLLER, K.-M. (Hrsg.) *Praxis der Immunhistochemie*. München: Urban&Fischer; Kapitel 7, 23-25.
- NOLL, S. & SCHAUB-KUHNEN, S. 2000b. Fixierung. In: HÖFLER, H. & MÜLLER, K.-M. (Hrsg.) *Praxis der Immunhistochemie*. München: Urban&Fischer; Kapitel 6, 20-22.
- NOLL, S. & SCHAUB-KUHNEN, S. 2000c. Herstellung von Schnittpräparaten. In: HÖFLER, H. & MÜLLER, K.-M. (Hrsg.) *Praxis der Immunhistochemie*. München: Urban&Fischer; Kapitel 8, 26-32.
- NOLL, S. & SCHAUB-KUHNEN, S. 2000d. Nachweismethoden. In: HÖFLER, H. & MÜLLER, K.-M. (Hrsg.) *Praxis der Immunhistochemie*. München: Urban&Fischer; Kapitel 5, 13-19.
- OKADA, F., RAK, J. W., CROIX, B. S., LIEUBEAU, B., KAYA, M., RONCARI, L., SHIRASAWA, S., SASAZUKI, T. & KERBEL, R. S. 1998. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for

- tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 3609-14.
- PALMER, J. P., ASPLIN, C. M., CLEMONS, P., LYEN, K., TATPATI, O., RAGHU, P. K. & PAQUETTE, T. L. 1983. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*, 222, 1337-9.
- PANG, L., WEI, Z., LI, O., HUANG, R., QIN, J., CHEN, H., FAN, X. & CHEN, Z. J. 2013. An increase in vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF soluble receptor-1 (sFlt-1) are associated with early recurrent spontaneous abortion. *PLoS One*, 8, e75759.
- PARK, J. E., KELLER, G. A. & FERRARA, N. 1993. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell*, 4, 1317-26.
- PATTERSON, C., PERRELLA, M. A., ENDEGE, W. O., YOSHIZUMI, M., LEE, M. E. & HABER, E. 1996. Downregulation of vascular endothelial growth factor receptors by tumor necrosis factor-alpha in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*, 98, 490-6.
- PERRIN, R. M., KONOPATSKAYA, O., QIU, Y., HARPER, S., BATES, D. O. & CHURCHILL, A. J. 2005. Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia*, 48, 2422-7.
- PETERSON, M. E., ALTSZULER, N. & NICHOLS, C. E. 1984. Decreased insulin sensitivity and glucose tolerance in spontaneous canine hyperadrenocorticism. *Res Vet Sci*, 36, 177-82.
- PFARRER, C. D., RUZIWA, S. D., WINTHER, H., CALLESEN, H., LEISER, R., SCHAMS, D. & DANTZER, V. 2006. Localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in bovine placentomes from implantation until term. *Placenta*, 27, 889-98.
- PHILLIPS, G. D., STONE, A. M., JONES, B. D., SCHULTZ, J. C., WHITEHEAD, R. A. & KNIGHTON, D. R. 1994. Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. *In Vivo*, 8, 961-5.
- PHILLIPS, H. S., HAINS, J., LEUNG, D. W. & FERRARA, N. 1990. Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. *Endocrinology*, 127, 965-7.

- PIETRO, L., DAHER, S., RUDGE, M. V., CALDERON, I. M., DAMASCENO, D. C., SINZATO, Y. K., BANDEIRA, C. & BEVILACQUA, E. 2010. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor expression in placenta of hyperglycemic pregnant women. *Placenta*, 31, 770-80.
- PLOUET, J., SCHILLING, J. & GOSPODAROWICZ, D. 1989. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J*, 8, 3801-6.
- PÖPPL, A. G., MOTTIN, T. S. & GONZALEZ, F. H. 2013. Diabetes mellitus remission after resolution of inflammatory and progesterone-related conditions in bitches. *Res Vet Sci*, 94, 471-3.
- PRITCHARD-JONES, R. O., DUNN, D. B., QIU, Y., VAREY, A. H., ORLANDO, A., RIGBY, H., HARPER, S. J. & BATES, D. O. 2007. Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. *Br J Cancer*, 97, 223-30.
- PUGH, C. W. & RATCLIFFE, P. J. 2003. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*, 9, 677-84.
- QIU, Y., BEVAN, H., WEERAPERUMA, S., WRATTING, D., MURPHY, D., NEAL, C. R., BATES, D. O. & HARPER, S. J. 2008. Mammary alveolar development during lactation is inhibited by the endogenous antiangiogenic growth factor isoform, VEGF165b. *FASEB J*, 22, 1104-12.
- QIU, Y., HOAREAU-AVEILLA, C., OLTEAN, S., HARPER, S. J. & BATES, D. O. 2009a. The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease. *Biochem Soc Trans*, 37, 1207-13.
- QIU, Y., LANATI, S., MURPHY, D., HARPER, S. & BATES, D. 2009b. VEGF165b overexpression inhibits ovarian follicle development. *Microcirculation*, 16, 444-486.
- QIU, Y., MURPHY, D., HARPER, S. & BATES, D. 2009c. Overexpression of VEGF165b in mouse ovary results in reduced litter size. *FASEB J* 23, 592.17.
- R&D SYSTEMS 2011. DuoSet ELISA Development System (human VEGF/human VEGF165b).
- RAND, J. S., FLEEMAN, L. M., FARROW, H. A., APPLETON, D. J. & LEDERER, R. 2004. Canine and feline diabetes mellitus: nature or nurture? *J Nutr*, 134, 2072S-2080S.

- RASK-MADSEN, C. & KING, G. L. 2007. Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 3, 46-56.
- RAVINDRANATH, N., LITTLE-IHRIG, L., PHILLIPS, H. S., FERRARA, N. & ZELEZNIK, A. J. 1992. Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. *Endocrinology*, 131, 254-60.
- REBUZZI, L., WILLMANN, M., SONNECK, K., GLEIXNER, K. V., FLORIAN, S., KONDO, R., MAYERHOFER, M., VALES, A., GRUZE, A., PICKL, W. F., THALHAMMER, J. G. & VALENT, P. 2007. Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors Flt-1 and KDR in canine mastocytoma cells. *Vet Immunol Immunopathol*, 115, 320-33.
- RENDEL, E., WAINE, E., GUAN, H., SCHULER, Y., LEENDERS, W., WOOLARD, J., SUGIONO, M., GILLATT, D., KLEINERMAN, E., BATES, D. & HARPER, S. 2008. The endogenous anti-angiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice. *Br J Cancer*, 98, 1250-7.
- RESTUCCI, B., MAIOLINO, P., PACIELLO, O., MARTANO, M., DE VICO, G. & PAPPARELLA, S. 2003. Evaluation of angiogenesis in canine seminomas by quantitative immunohistochemistry. *J Comp Pathol*, 128, 252-9.
- RESTUCCI, B., PAPPARELLA, S., MAIOLINO, P. & DE VICO, G. 2002. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet Pathol*, 39, 488-93.
- REYNOLDS, L. P. & REDMER, D. A. 2001. Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod*, 64, 1033-40.
- ROBERTS, W. G. & PALADE, G. E. 1995. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci*, 108 (Pt 6), 2369-79.
- ROBINSON, C. J. & STRINGER, S. E. 2001. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci*, 114, 853-65.
- ROWE, A. J., WULFF, C. & FRASER, H. M. 2003. Localization of mRNA for vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietins and their receptors during the peri-implantation period and early pregnancy in marmosets (*Callithrix jacchus*). *Reproduction*, 126, 227-38.
- RYAN, E. A. & ENNS, L. 1988. Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*, 67, 341-7.

- SALIM, M. D., AL-MATUBSI, H. Y., EL-SHARAKY, A. S., KAMEL, M. A., ORIQUAT, G. A., HELMY, M. H. & EL-BASSIOUNI, E. A. 2009. The levels of vascular endothelial growth factor-A and placental growth factor-2 in embryopathy associated with experimental diabetic gestation. *Growth Factors*, 27, 32-9.
- SCHÄFER-SOMI, S., SABITZER, S., KLEIN, D., REINBACHER, E., KANCA, H., BECERIKLISOY, H. B., AKSOY, O. A., KUCUKASLAN, I., MACUN, H. C. & ASLAN, S. 2013. Vascular endothelial (VEGF) and epithelial growth factor (EGF) as well as platelet-activating factor (PAF) and receptors are expressed in the early pregnant canine uterus. *Reprod Domest Anim*, 48, 20-6.
- SCHEIDEGGER, P., WEIGLHOFER, W., SUAREZ, S., KASER-HOTZ, B., STEINER, R., BALLMER-HOFER, K. & JAUSSI, R. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in tumor-bearing dogs. *Biol Chem*, 380, 1449-54.
- SCHIESSL, B. 2012. Schwangerschaftspathologien. In: MAASS, N. & SCHIESSL, B. (Hrsg.) *Gynäkologie und Geburtshilfe in 5 Tagen*. Heidelberg: Springer; Kapitel 13, 133-198.
- SCHLOSSER, M., MUELLER, P. W., TORN, C., BONIFACIO, E. & BINGLEY, P. J. 2010. Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for insulin autoantibodies. *Diabetologia*, 53, 2611-20.
- SCHNEIDER, H., RAI0, L. & KNÖFLER, M. 2011. Präimplantation, Implantation und Plazentation: Bedeutung für den Schwangerschaftsverlauf. In: SCHNEIDER, H., HUSSLEIN, P. & SCHNEIDER, K. T. M. (Hrsg.) *Die Geburtshilfe*. 4. Auflage. Berlin: Springer; Kapitel 1, 3-18.
- SCHONTHALER, H. B., HUGGENBERGER, R., WCULEK, S. K., DETMAR, M. & WAGNER, E. F. 2009. Systemic anti-VEGF treatment strongly reduces skin inflammation in a mouse model of psoriasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 21264-9.
- SCHWARZENBACH, H., CHAKRABARTI, G., PAUST, H. J. & MUKHOPADHYAY, A. K. 2004. Gonadotropin-mediated regulation of the murine VEGF expression in MA-10 Leydig cells. *J Androl*, 25, 128-39.
- SCHWENDENWEIN, I. 2013. Allgemeine Labortechniken. In: MORITZ, A. (Hrsg.) *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. 7. Auflage. Stuttgart: Schattauer; Kapitel 4, 21-34.

- SCIOTA, F., LUCAS, J., THOMAS, R., IKRAM, A. & LEACH, L. 2008. Insulin perfusion decreases expression of the splice variant VEGF165b in large vessels of the human term chorionic stem villi but not in microvessels. *J. Vasc. Res* 45, 117.
- SELMAN, P. J., MOL, J. A., RUTTEMAN, G. R. & RIJNBERK, A. 1994a. Progestin treatment in the dog. I. Effects on growth hormone, insulin-like growth factor I and glucose homeostasis. *Eur J Endocrinol*, 131, 413-21.
- SELMAN, P. J., MOL, J. A., RUTTEMAN, G. R., VAN GARDEREN, E. & RIJNBERK, A. 1994b. Progestin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. *Endocrinology*, 134, 287-92.
- SENGER, D. R., GALLI, S. J., DVORAK, A. M., PERRUZZI, C. A., HARVEY, V. S. & DVORAK, H. F. 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219, 983-5.
- SHARKEY, A. M., CHARNOCK-JONES, D. S., BOOCOCK, C. A., BROWN, K. D. & SMITH, S. K. 1993. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. *J Reprod Fertil*, 99, 609-15.
- SHARKEY, A. M., COOPER, J. C., BALMFORTH, J. R., MCLAREN, J., CLARK, D. E., CHARNOCK-JONES, D. S., MORRIS, N. H. & SMITH, S. K. 1996. Maternal plasma levels of vascular endothelial growth factor in normotensive pregnancies and in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Eur J Clin Invest*, 26, 1182-5.
- SHIBUYA, M., YAMAGUCHI, S., YAMANE, A., IKEDA, T., TOJO, A., MATSUSHIME, H. & SATO, M. 1990. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*, 5, 519-24.
- SHIFREN, J. L., DOLDI, N., FERRARA, N., MESIANO, S. & JAFFE, R. B. 1994. In the human fetus, vascular endothelial growth factor is expressed in epithelial cells and myocytes, but not vascular endothelium: implications for mode of action. *J Clin Endocrinol Metab*, 79, 316-22.
- SHIFREN, J. L., MESIANO, S., TAYLOR, R. N., FERRARA, N. & JAFFE, R. B. 1998. Corticotropin regulates vascular endothelial growth factor expression in human fetal adrenal cortical cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 83, 1342-7.
- SHIRAIISHI, S., NAKAGAWA, K., KINUKAWA, N., NAKANO, H. & SUEISHI, K. 1996. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the human placenta. *Placenta*, 17, 111-21.

- SHORE, V. H., WANG, T. H., WANG, C. L., TORRY, R. J., CAUDLE, M. R. & TORRY, D. S. 1997. Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta*, 18, 657-65.
- SHWEIKI, D., ITIN, A., NEUFELD, G., GITAY-GOREN, H. & KESHET, E. 1993. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest*, 91, 2235-43.
- SHWEIKI, D., ITIN, A., SOFFER, D. & KESHET, E. 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359, 843-5.
- SOGAWA, K., NAGAOKA, T., IZUMI, N., NAKABAYASHI, S. & YOSHIDA, A. 2010. Acute hyperglycemia-induced endothelial dysfunction in retinal arterioles in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 2648-55.
- SOH, E. Y., SOBHI, S. A., WONG, M. G., MENG, Y. G., SIPERSTEIN, A. E., CLARK, O. H. & DUH, Q. Y. 1996. Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. *Surgery*, 120, 944-7.
- SOKER, S., TAKASHIMA, S., MIAO, H. Q., NEUFELD, G. & KLAGSBRUN, M. 1998. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 92, 735-45.
- SONE, H., SAKAUCHI, M., TAKAHASHI, A., SUZUKI, H., INOUE, N., IIDA, K., SHIMANO, H., TOYOSHIMA, H., KAWAKAMI, Y., OKUDA, Y., MATSUO, K. & YAMADA, N. 2001. Elevated levels of vascular endothelial growth factor in the sera of patients with rheumatoid arthritis correlation with disease activity. *Life Sci*, 69, 1861-9.
- STEINER, H. & SCHNEIDER, K. T. M. 2012. Morphologie, Physiologie und Pathologie des maternoplazentaren, fetoplazentaren und fetalen Kreislaufs. In: STEINER, H. & SCHNEIDER, K. T. M. (Hrsg.) *Dopplersonographie in Geburtshilfe und Gynäkologie*. 3. Auflage. Berlin: Springer; Kapitel 1, 3-11.
- SUZUKI, K., HAYASHI, N., MIYAMOTO, Y., YAMAMOTO, M., OHKAWA, K., ITO, Y., SASAKI, Y., YAMAGUCHI, Y., NAKASE, H., NODA, K., ENOMOTO, N., ARAI, K., YAMADA, Y., YOSHIHARA, H., TUJIMURA, T., KAWANO, K., YOSHIKAWA, K. & KAMADA, T. 1996. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 56, 3004-9.

- TAKAGI, H., KING, G. L., ROBINSON, G. S., FERRARA, N. & AIELLO, L. P. 1996. Adenosine mediates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor in retinal pericytes and endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37, 2165-76.
- TERMAN, B. I., DOUGHER-VERMAZEN, M., CARRION, M. E., DIMITROV, D., ARMELLINO, D. C., GOSPODAROWICZ, D. & BOHLEN, P. 1992. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 187, 1579-86.
- TISCHER, E., MITCHELL, R., HARTMAN, T., SILVA, M., GOSPODAROWICZ, D., FIDDES, J. C. & ABRAHAM, J. A. 1991. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*, 266, 11947-54.
- TOLENTINO, M. J., MILLER, J. W., GRAGOUDAS, E. S., CHATZISTEFANO, K., FERRARA, N. & ADAMIS, A. P. 1996. Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol*, 114, 964-70.
- TORN, C., MUELLER, P. W., SCHLOSSER, M., BONIFACIO, E. & BINGLEY, P. J. 2008. Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. *Diabetologia*, 51, 846-52.
- TORRY, D. S., HINRICHS, M. & TORRY, R. J. 2004. Determinants of placental vascularity. *Am J Reprod Immunol*, 51, 257-68.
- TRAN, J., RAK, J., SHEEHAN, C., SAIBIL, S. D., LACASSE, E., KORNELUK, R. G. & KERBEL, R. S. 1999. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 264, 781-8.
- TROLLMANN, R., AMANN, K., SCHOOF, E., BEINDER, E., WENZEL, D., RASCHER, W. & DOTSCHE, J. 2003. Hypoxia activates the human placental vascular endothelial growth factor system in vitro and in vivo: up-regulation of vascular endothelial growth factor in clinically relevant hypoxic ischemia in birth asphyxia. *Am J Obstet Gynecol*, 188, 517-23.
- UCHIDA, N., NAGAI, K., SAKURADA, Y. & SHIROTA, K. 2008. Distribution of VEGF and flt-1 in the normal dog tissues. *J Vet Med Sci*, 70, 1273-6.
- VAREY, A. H., RENNEL, E. S., QIU, Y., BEVAN, H. S., PERRIN, R. M., RAFFY, S., DIXON, A. R., PARASKEVA, C., ZACCHEO, O., HASSAN, A. B., HARPER, S.

- J. & BATES, D. O. 2008. VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br J Cancer*, 98, 1366-79.
- VERHEUL, H. M., HOEKMAN, K., LUYKX-DE BAKKER, S., EEKMAN, C. A., FOLMAN, C. C., BROXTERMAN, H. J. & PINEDO, H. M. 1997. Platelet: transporter of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res*, 3, 2187-90.
- VINCENTI, V., CASSANO, C., ROCCHI, M. & PERSICO, G. 1996. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*, 93, 1493-5.
- VOLM, M., KOOMAGI, R., MATTERN, J. & STAMMLER, G. 1997. Angiogenic growth factors and their receptors in non-small cell lung carcinomas and their relationships to drug response in vitro. *Anticancer Res*, 17, 99-103.
- VON MARSCHALL, Z., SCHOLZ, A., CRAMER, T., SCHAFER, G., SCHIRNER, M., OBERG, K., WIEDENMANN, B., HOCKER, M. & ROSEWICZ, S. 2003. Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 95, 437-48.
- VONNAHME, K. A. & FORD, S. P. 2004. Placental vascular endothelial growth factor receptor system mRNA expression in pigs selected for placental efficiency. *J Physiol*, 554, 194-201.
- VUORELA, P. & HALMESMAKI, E. 2006. Vascular endothelial growth factor, its receptors, and the tie receptors in the placental bed of women with preeclampsia, diabetes, and intrauterine growth retardation. *Am J Perinatol*, 23, 255-63.
- WALTENBERGER, J., MAYR, U., PENTZ, S. & HOMBACH, V. 1996. Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation*, 94, 1647-54.
- WARREN, R. S., YUAN, H., MATLI, M. R., FERRARA, N. & DONNER, D. B. 1996. Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem*, 271, 29483-8.
- WATALA, C., GOLANSKI, J., WITAS, H., GURBIEL, R., GWOZDZINSKI, K. & TROJANOWSKI, Z. 1996. The effects of in vivo and in vitro non-enzymatic glycosylation and glycooxidation on physico-chemical properties of haemoglobin in control and diabetic patients. *Int J Biochem Cell Biol*, 28, 1393-403.

- WATANABE, A., YASUMIZU, T., HOSHI, K., KATOH, R., KAWAOI, A. & SHIBUYA, M. 1998. Vascular Endothelial Growth Factor Expression in the Rat Uterus and Placenta throughout Pregnancy. *Acta Histochem Cytochem*, 31, 419-426.
- WEBB, N. J., BOTTOMLEY, M. J., WATSON, C. J. & BRENCHLEY, P. E. 1998. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: implications for measurement of circulating VEGF levels in clinical disease. *Clin Sci (Lond)*, 94, 395-404.
- WEHREND, A. 2009a. Gestagene. *Leitsymptome Gynäkologie und Geburtshilfe beim Hund. Diagnostischer Leitfaden und Therapie*. Stuttgart: Enke; Kapitel 28, 171-172.
- WEHREND, A. 2009b. Kastration. *Leitsymptome Gynäkologie und Geburtshilfe beim Hund. Diagnostischer Leitfaden und Therapie*. Stuttgart: Enke; Kapitel 23, 157-162.
- WERGIN, M. C. & KASER-HOTZ, B. 2004. Plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) measured in seventy dogs with spontaneously occurring tumours. *In Vivo*, 18, 15-9.
- WHITE, P. 1978. Classification of obstetric diabetes. *Am J Obstet Gynecol*, 130, 228-30.
- WHITTLES, C. E., POCOCK, T. M., WEDGE, S. R., KENDREW, J., HENNEQUIN, L. F., HARPER, S. J. & BATES, D. O. 2002. ZM323881, a novel inhibitor of vascular endothelial growth factor-receptor-2 tyrosine kinase activity. *Microcirculation*, 9, 513-22.
- WIESMANN, C., FUH, G., CHRISTINGER, H. W., EIGENBROT, C., WELLS, J. A. & DE VOS, A. M. 1997. Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell*, 91, 695-704.
- WIEST-LADENBURGER, U., HARTMANN, R., HARTMANN, U., BERLING, K., BOHM, B. O. & RICHTER, W. 1997. Combined analysis and single-step detection of GAD65 and IA2 autoantibodies in IDDM can replace the histochemical islet cell antibody test. *Diabetes*, 46, 565-71.
- WINTHER, H., AHMED, A. & DANTZER, V. 1999. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two specific receptors, Flt-1 and KDR, in the porcine placenta and non-pregnant uterus. *Placenta*, 20, 35-43.

- WINTHER, H. & DANTZER, V. 2001. Co-localization of vascular endothelial growth factor and its two receptors flt-1 and kdr in the mink placenta. *Placenta*, 22, 457-65.
- WOLFESBERGER, B., GUIJA DE ARESPOCHAGA, A., WILLMANN, M., GERNER, W., MILLER, I., SCHWENDENWEIN, I., KLEITER, M., EGERBACHER, M., THALHAMMER, J. G., MUELLAUER, L., SKALICKY, M. & WALTER, I. 2007. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in canine lymphoma. *J Comp Pathol*, 137, 30-40.
- WOOLARD, J., WANG, W. Y., BEVAN, H. S., QIU, Y., MORBIDELLI, L., PRITCHARD-JONES, R. O., CUI, T. G., SUGIONO, M., WAINE, E., PERRIN, R., FOSTER, R., DIGBY-BELL, J., SHIELDS, J. D., WHITTLES, C. E., MUSHENS, R. E., GILLATT, D. A., ZICHE, M., HARPER, S. J. & BATES, D. O. 2004. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res*, 64, 7822-35.
- WULFF, C., WILSON, H., DICKSON, S. E., WIEGAND, S. J. & FRASER, H. M. 2002. Hemochorial placentation in the primate: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy. *Biol Reprod*, 66, 802-12.
- WYNENDAELE, W., DERUA, R., HOYLAERTS, M. F., PAWINSKI, A., WAELKENS, E., DE BRUIJN, E. A., PARIDAENS, R., MERLEVEDE, W. & VAN OOSTEROM, A. T. 1999. Vascular endothelial growth factor measured in platelet poor plasma allows optimal separation between cancer patients and volunteers: a key to study an angiogenic marker in vivo? *Ann Oncol*, 10, 965-71.
- XIANG, A. H., KJOS, S. L., TAKAYANAGI, M., TRIGO, E. & BUCHANAN, T. A. 2010. Detailed physiological characterization of the development of type 2 diabetes in Hispanic women with prior gestational diabetes mellitus. *Diabetes*, 59, 2625-30.
- YANG, R., THOMAS, G. R., BUNTING, S., KO, A., FERRARA, N., KEYT, B., ROSS, J. & JIN, H. 1996. Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol*, 27, 838-44.
- YHEE, J. Y., YU, C. H., KIM, J. H., IM, K. S., KIM, N. H., BRODERSEN, B. W., DOSTER, A. R. & SUR, J. H. 2012. Angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor, tumour necrosis factor-alpha and hypoxia inducible factor-1alpha in canine renal cell carcinoma. *J Comp Pathol*, 147, 129-38.

- YI, X. J., JIANG, H. Y., LEE, K. K., O, W. S., TANG, P. L. & CHOW, P. H. 1999. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors during embryonic implantation in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Cell Tissue Res*, 296, 339-49.
- YONEMARU, K., SAKAI, H., MURAKAMI, M., YANAI, T. & MASEGI, T. 2006. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and their receptors (flt-1, flk-1, and flg-1) in canine vascular tumors. *Vet Pathol*, 43, 971-80.
- YUAN, F., CHEN, Y., DELLIAN, M., SAFABAKHSH, N., FERRARA, N. & JAIN, R. K. 1996. Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14765-70.
- YUDELMAN, C. 2010. Gestational diabetes in the bitch - a literature review. Verfügbar: http://equine.anzcvs.org.au/equine/science_week/australian%20college%20of%20veterinary%20scientist%202010%20equine%20chapter%20conference%20proceedings.pdf.
- ZIEGLER, D., KELLER, J., MAIER, C. & PANNEK, J. 2012. Diabetische Neuropathie. *Diabetologie*, 7, 88-98.
- ZOU, S., LI, X., FENG, Y., SUN, S., LI, J., EGECIOGLU, E., BILLIG, H. & SHAO, R. 2013. Comparison of the diagnostic values of circulating steroid hormones, VEGF-A, PIGF, and ADAM12 in women with ectopic pregnancy. *J Transl Med*, 11, 44.
- ZYGMUNT, M., HERR, F., MUNSTEDT, K., LANG, U. & LIANG, O. D. 2003. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 110 Suppl 1, S10-8.

10 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Janina Theresia Driedger

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Barbara Schiessl für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die sehr freundliche Unterstützung und Beratung. Vielen Dank für die Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Axel Wehrend herzlich bedanken, durch dessen Betreuung die Anfertigung und Einreichung der vorliegenden Arbeit ermöglicht wurde. Vielen Dank für das mir entgegen gebrachte Vertrauen und die immer prompte Hilfestellung bei sämtlichen Fragen.

Ein großer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Margit Günthner-Biller. Ihr danke ich sehr für die freundschaftliche Betreuung und Hilfestellung bei der Umsetzung dieses Themas und der Anfertigung sowie Korrektur dieser Arbeit.

Vielen herzlichen Dank an Christina Kuhn für die immer sehr engagierte und prompte Hilfe bei allen Fragen zur Immunhistochemie.

Ein weiterer Dank geht an das Institut der Pathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen. Hierbei gilt mein besonderer Dank Frau Sendelhofert.

Allen meinen Freunden danke ich dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für meine Probleme bezüglich der Doktorarbeit hatten, mich immer wieder aufbauten und Mut zusprachen. Vielen Dank an Alexandra Stürner für das Korrekturlesen. Außerdem ein riesiges „Danke“ an meinen Freund Michael Wassner für seine große Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meiner Familie! Nur durch sie wurde es mir überhaupt ermöglicht das Studium sowie die nachfolgende Promotion erfolgreich durchzuführen. Ich danke und liebe euch.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6234-7



9 783835 196234 7

Photo cover: © amtitus - istockphoto.com