

Aus der Klinik für Chirurgie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H.-P. Bruch

**Untersuchungen zur Serumkonzentration des
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)
bei Patienten im Rahmen einer Nierentransplantation**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Maren Jacobs
aus Detmold

Lübeck 2005

1. Berichterstatter:	<u>Priv.-Doz. Dr. med. Martin Strik</u>
2. Berichterstatter/Berichterstatterin:	<u>Prof. Dr. rer. nat. Horst Pagel</u>
Tag der mündlichen Prüfung:	<u>14.06.2005</u>
Zum Druck genehmigt, Lübeck den	<u>14.06.2005</u>

gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann
- Dekan der medizinischen Fakultät -

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung.....	3
I.A. Einführung	3
I.B. Das Hormon VEGF	4
I.B.1 Entwicklung der Forschung	4
I.B.2 Struktur und biologische Eigenschaften von VEGF	5
I.B.3 VEGF-Rezeptoren.....	7
I.B.4 VEGF und seine Zellwirkung	8
I.B.5 Drei Hauptwirkungen von VEGF am Endothel.....	9
I.B.5.a Angiogenese.....	9
I.B.5.b Proliferation	11
I.B.5.c Permeabilitätssteigerung	11
I.B.6 VEGF beeinflussende Faktoren	13
I.B.7 VEGF bei Tumoren.....	13
I.B.8 Reaktion von VEGF auf Hypoxie	14
I.B.9 VEGF und die Niere	16
I.C. Der Reperfusionsschaden.....	17
I.D. Zielsetzung.....	19
II. Material und Methoden.....	20
II.A. Durchführung der Blutentnahmen.....	20
II.A.1 Zeitlicher Ablauf der Blutentnahmen	20
II.A.1.a Nierentransplantation	20
II.A.1.b Carotis- Thrombendarteriektomie	21
II.A.2 Bearbeitung der Blutproben.....	21
II.B. Der VEGF-ELISA	22
II.C. Statistik.....	22

III. Resultate	23
III.A. Verlauf der VEGF-Konzentrationen im Serum bei Patienten mit Nierentransplantation.....	23
III.B. Verlauf der VEGF-Konzentrationen im Serum bei Patienten mit Carotis- Thrombendarteriektomie	25
IV. Diskussion.....	27
V. Zusammenfassung.....	37
VI. Literaturverzeichnis	38
VII. Abkürzungsverzeichnis	51
VIII. Danksagung.....	53
IX. Lebenslauf.....	54

I. Einleitung

I.A. Einführung

Die erste Organtransplantation erfolgte 1954 durch Murray, Merrill und Harrison, die erstmalig die Übertragung einer Niere von einem Lebendspender auf seinen eineiigen Zwillingsbruder durchführten. Durch die Entwicklung von Immunsuppressiva wurde bald auch die Übertragung von Nieren zwischen genetisch unterschiedlichen Individuen ermöglicht. In den 60er Jahren wurden dann in rascher Folge Herz-, Leber- und Pankreastransplantation beim Menschen etabliert. Durch die ständige Verbesserung der Immunsuppression und Abstoßungstherapie nahmen in den folgenden Jahrzehnten die Überlebensrate von Organempfängern, aber insbesondere auch die der transplantierten Organe so erheblich zu, daß heute Transplantationen von Niere, Leber, Herz, Pankreas und Cornea als Standardverfahren bei irreversiblen Organausfall durchgeführt werden (Schumpelick et al. 1999).

Trotz der verbesserten Therapie gibt es noch immer viele Faktoren während und nach einer Organtransplantation, die die spätere Funktionstüchtigkeit des Organs beeinflussen und zu einer hyperakuten, akuten oder chronischen Abstoßung führen können (Solez et al. 1993).

Das Reperfusionssyndrom ist einer dieser Faktoren. Wird ein Gewebe ischämisch, sei es im Rahmen von Organtransplantationen oder Gefäßverschlüssen, kommt es unter anderem zur Freisetzung von Zytokinen und freien Radikalen, die letztendlich zu einer Gewebsnekrose führen können. Wird das Gewebe wieder reperfundiert, werden dem Gewebe wieder Sauerstoff und Nährstoffe zugeführt. Gleichzeitig kann aber auch eine erhebliche Ödembildung auftreten, die durch eine gesteigerte Gefäßpermeabilität bedingt ist. Auch in der Reperusionsphase können immer noch viele Zellen absterben (Summers et Jarrison 1971, Fishbein 1990). Dieses Phänomen wird als Reperfusionssyndrom bezeichnet. Seine zugrundeliegenden Pathomechanismen sind derzeit zu großen Anteilen noch unbekannt. Es kann in transplantierten Organen wie auch in - nach Gefäßverschluß - reperfundierten Arealen auftreten.

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist ein Hormon, dessen Bildung stark durch hypoxische (Shima et al. 1995, Tudor et al. 1995, Marti et Risau 1998) und ischämische Bedingungen (Hashimoto et al. 1994) stimuliert wird. Neben der Angiogenese

ist eine seiner Hauptwirkungen die Steigerung der Gefäßpermeabilität (Connolly et al. 1989₂, Dvorak et al. 1995₁).

Die vorliegende Arbeit ist der Frage gewidmet, ob es einen Anhalt dafür gibt, daß VEGF an der Entstehung des Reperfusionsschadens beteiligt ist.

I.B. Das Hormon VEGF

I.B.1 Entwicklung der Forschung

Im Jahre 1969 finden Pick et al. zum ersten Mal einen von Lymphozyten freigesetzten Faktor, der in der Haut von Meerschweinchen zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität mit einer nachfolgenden inflammatorischen Reaktion führt (Pick et al. 1969). Er wird daher zunächst von ihnen als „skin reactive factor“ bezeichnet. 6 Jahre später beschreiben Lagrue und Mitarbeiter einen Faktor, der im Überstand von Lymphozyten von Patienten mit Nephrotischem Syndrom existiert und wie der skin reactive factor zu einer Steigerung der Gefäßpermeabilität führt (Lagrue et al. 1975). In weiteren Forschungsarbeiten dieser Gruppe wird er von nun an als Vascular Permeability Factor, VPF, bezeichnet (Sobel et al. 1977). 1983 wird er aus Aszitesflüssigkeit von Tumoren der Zelllinie 10 bei Mäusen isoliert (Senger et al. 1983). Die intradermale Injektion dieses Faktors führt zu einer schnellen (Maximum nach 5-10 Minuten) und reversiblen (nach 20 Minuten) Änderung der lokalen kutanen Gefäßpermeabilität. In weiteren Studien finden Senger und Mitarbeiter heraus, daß auch andere menschliche Tumorzelllinien diesen Faktor sezernieren. Dieser ist durch Antikörper gegen VPF, die aus Tumoren der Meerschweinchen-Linie-10 gewonnen werden, neutralisierbar (Senger et al. 1986).

Unabhängig von Forschungen, die über VPF weitergehen, wird 1989 ein Faktor aus dem Medium kultivierter Follikularzellen der Hypophyse von Rindern isoliert. Da er in vitro zu einer Proliferation von Endothelzellen führt, wird er Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) genannt (Ferrara et Henzel 1989). Zur gleichen Zeit wie Ferrara und Henzel isolieren auch Gospodarowicz und Mitarbeiter 1989 ein solches Endothelzellmitogen aus den folliculären Sternzellen der Hypophyse (Gospodarowicz et al. 1989). Sie nennen es Vasculotropin (Plouët et al. 1989). Es stellt sich heraus, daß es sich bei allen drei Faktoren um dasselbe Hormon handelt; von nun an sind nur noch die Namen VPF und VEGF in Gebrauch, wobei sich VEGF im Laufe der Jahre durchsetzt.

I.B.2 Struktur und biologische Eigenschaften von VEGF

VEGF kommt in fünf verschiedenen Formen vor, die durch alternatives Splicen entstehen (Abb. 1). Aufgrund des Unterschiedes in der Anzahl der Aminosäuren werden sie als VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ bezeichnet (Ferrara et al. 1991₁, Tischer et al. 1991, Poltorak et al. 1997).

Die VEGF codierende Region ist in 8 Exons aufgeteilt, Exon 1 enthält dabei hauptsächlich das Sekretionssignal des primären Translationsproduktes.

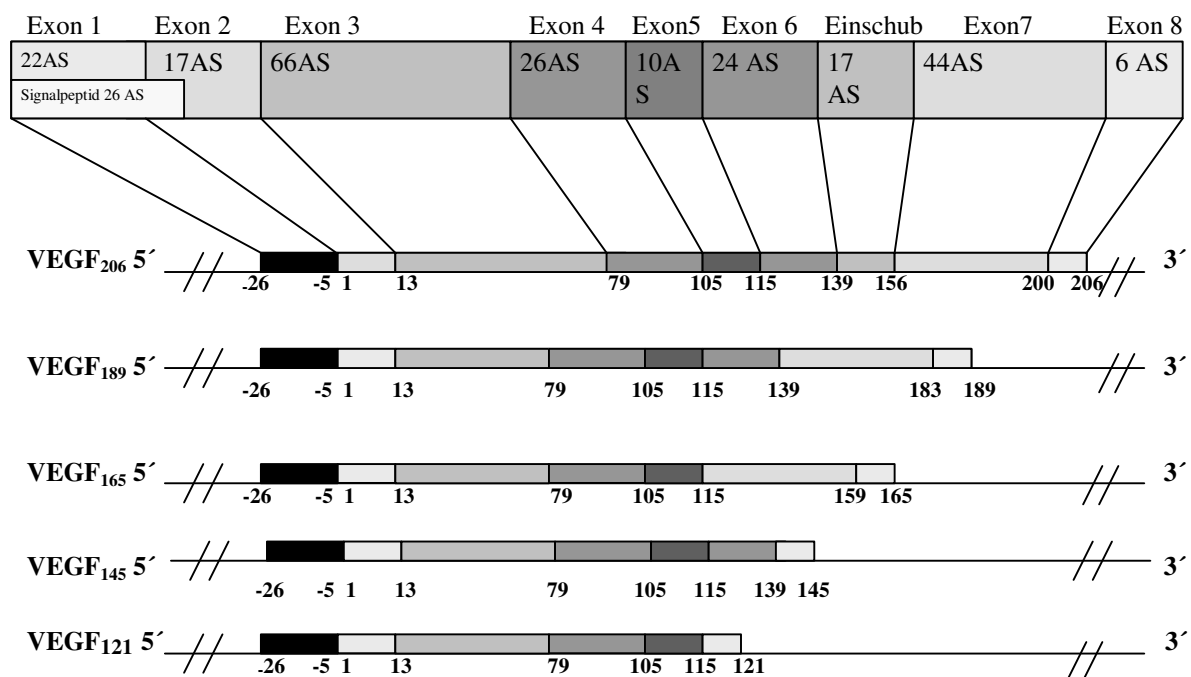


Abb. 1: Darstellung der Zusammensetzung der verschiedenen VEGF-Formen

- VEGF₂₀₆ beinhaltet alle Exons und einen Einschub von 17 Aminosäuren zwischen Exon 6 und 7,
- VEGF₁₈₉ beinhaltet die Codierungssequenz von Exon 1-8,
- VEGF₁₆₅ fehlen die Aminosäuren von Exon 6,
- VEGF₁₄₅ fehlen die Aminosäuren von Exon 7,
- VEGF₁₂₁ fehlen die Aminosäuren von Exon 6 und 7

(Leung et al. 1989, Houck et al. 1991, Tischer et al. 1991, Poltorak et al. 1997).

VEGF₁₆₅ ist die dominierende unter den Isoformen. Sie wird von einer Vielzahl kultivierter Zellen sezerniert, mit Ausnahme der Plazenta, in der VEGF₁₂₁ überwiegt (Ferrara et al. 1991₁). Sie ist, wie die anderen Formen auch, ein Dimer aus zwei Untereinheiten mit identischem NH₂-Terminus (Senger et al. 1990). Diese werden durch Disulfidbrücken miteinander verbunden (Conn et al. 1990).

Das Molekulargewicht von VEGF₁₆₅ als Dimer beträgt 46 kDa (Plouët et al. 1989, Ferrara et al. 1991₂). Sein isoelektrischer Punkt liegt im basischen Bereich, bei ca. pH 8,0-8,5. Es bindet Heparin und Heparansulfat (Ferrara et Henzel 1989, Gitay-Goren et al. 1992).

Die Isoform VEGF₁₂₁ wird ebenfalls freigesetzt, jedoch in einem geringeren Anteil (Kondo et al. 1995). Sie ist im Gegensatz zu VEGF₁₆₅ nur 34-36 kDa schwer (Houck et al. 1992). Ihre beiden Untereinheiten haben ein Gewicht von ca. 14 kDa und 18 kDa. Es ist ein eher saures Protein und bindet nur schwach an Heparin (Ferrara et al. 1991₁).

VEGF₁₄₅ wurde aus Tumorzellen des weiblichen Reproduktionstraktes isoliert (Poltorak et al. 1997). Es bindet wie VEGF₁₆₅ Heparin.

VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆, als längere Formen, sind überwiegend an Zellmembran und extrazellulärer Matrix gebunden. Über die biologische Funktion dieser membranassoziierten Isoformen ist bisher sehr wenig bekannt.

In letzter Zeit sind neue Mitglieder der VEGF-Familie entdeckt worden, VEGF-B (Olofsson et al. 1996), VEGF-C (Joukov et al. 1996) und VEGF-D (Li et Eriksson 2001). Ihre Funktion wird noch erforscht.

Es gibt Anzeichen dafür, daß der Abbau von VEGF über den lysosomalen Weg erfolgt, wobei VEGF in kleine Fragmente gespalten wird (Bikfalvi et al. 1991).

Das VEGF-Gen ist auf Chromosom 6 lokalisiert (Vincenti et al. 1996, Wei et al. 1996). Die Nukleotide 1-156 sind GC-reich und ähneln damit denen, die in cDNAs anderer Wachstumsfaktoren zu finden sind, wie der A- und B-Kette von PDGF (Collins et al. 1985, Betsholtz et al. 1986, Keck et al. 1989), TGF-β (Derynck et al. 1985), insuline like growth factor II (Dull et al. 1984), bFGF (Abraham et al. 1986) und cmcDNAs (Battey et al. 1983). Es besteht eine Homologie in der Aminosäuresequenz von VEGF und den A- und B-Ketten von PDGF (Tischer et al. 1989, Plouët et Moukadiri 1990). Außerdem besteht zu 46% eine Identität von VEGF mit der Aminosäuresequenz von PlGF (Hauser et Weich 1993).

Es existiert sogar ein Gefäßendothelzellmitogen, ein Heterodimer, das aus den Untereinheiten von VEGF und PlGF aufgebaut ist (DiSalvo et al. 1995).

I.B.3 VEGF-Rezeptoren

Es gibt zwei Rezeptoren, über die die Wirkung von VEGF auf die Zielzellen übertragen wird: Flt-1 (fms-like-tyrosine-kinase) und KDR (kinase insert domain-containing receptor) - auch in Versuchen an Mäusen bezeichnet als flk-1 (flk = fetal liver kinase).

Die mRNA des VEGF-Rezeptors flt-1 ist in embryonalen und adulten Geweben von Mäusen nachweisbar: am Gefäßendothel, in embryonalen Strukturen, aus denen Gefäße entstehen, und am Endothel des Gewebes von erwachsenen Tieren (Peters et al. 1993).

Humane Endothelzellen tragen beide Rezeptoren (Namiki et al. 1995). Die Dichte der Rezeptoren beträgt 3.000 (flk-1) bzw. 40.000 (flt-1) Rezeptoren pro Zelle (Vaisman et al. 1990); sie ist an Endothelzellen erhöht, die vermehrten Scherkräften des Blutflusses ausgesetzt sind, wie zum Beispiel an den Atrioventrikularklappen des Herzens (Ferrara et al. 1991₁). Die Affinität der Rezeptoren für VEGF variiert in verschiedenen Studien: Für den Rezeptor flk-1 wird eine Affinität im Bereich von 16-115 pM beschrieben, für den Rezeptor flt-1 400-1.000 pM (Zachary 1998). Die Bindung ist zeit- und konzentrationsabhängig, sättigbar, kompetitiv, reversibel und spezifisch (Plouët et Moukadiri 1990, Jakeman et al. 1993). Durch Heparin wird sie verstärkt (Gitay-Goren et al. 1992).

Der genaue Mechanismus der Signalübertragung von VEGF nach Bindung an seine Rezeptoren ist noch nicht vollständig geklärt. Dem aktuellen Wissensstand zu Folge löst die Bindung von VEGF an seinen Rezeptor KDR eine ligandeninduzierte Autophosphorylierung des Rezeptors und Tyrosinphosphorylierung verschiedener Zellsubstrate (wie zum Beispiel PLC- γ) aus. Hierauf folgt ein intrazellulärer Anstieg von Kalzium und IP₃ (Inositol-1,4,5-triphosphat) und eine Tyrosinkinase-abhängige Aktivierung der endothelialen NO-Synthetase (Brock et al. 1991, Zachary 1998). Weiterhin wird durch die Bindung von VEGF an KDR eine Translokation von KDR, NO-Synthetase und Caveolin-1 in den Zellkern induziert (Feng et al. 1999). Die genauen Vorgänge, die auf die Aktivierung der genannten Kaskaden folgen und die spezifischen Wirkungen des VEGFs hervorrufen, sind derzeit Gegenstand der Forschung.

I.B.4 VEGF und seine Zellwirkung

VEGF wird hauptsächlich in Makrophagen, aber auch in glatten Gefäßmuskelzellen (Tischer et al. 1991), Myoblasten und Fibroblasten gebildet (Shweiki et al. 1992). VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ sind in der Lage, eine Migration von Monozyten hervorzurufen. Hierbei verfügt VEGF₁₆₅ über eine stärkere Potenz als VEGF₁₂₁. Die Migration der Monozyten unter VEGF-Stimulation ist 3mal stärker als diejenige unter normalen Bedingungen (Clauss et al. 1990).

Der Rezeptor flt-1, der auch von den Monozyten exprimiert wird, vermittelt die chemotaktische Antwort. Die Migration der Monozyten wird durch einen positiven Konzentrationsgradienten von VEGF verstärkt und wahrscheinlich durch ein Pertussis-toxin-sensitives, GTP-bindendes Protein vermittelt. Bei Aktivierung der Monozyten durch LPS (Lipopolysaccharid) kommt es zu einer Hochregulation der flt-1-Rezeptor-mRNA. Dieser Vorgang steigert die spezifische Bindung für VEGF (Barleon et al. 1996).

Auch der VEGF-Rezeptor KDR findet sich an Zellen des hämatopoetischen Systems, den Megakaryozyten, Plättchen und menschlichen Leukämiezelllinien HEL und CMK 86. VEGF unterdrückt bei diesen Zellen die experimentell durch Gammastrahlung hervorgerufene Apoptose (Katoh et al. 1995).

Außerdem verhindert VEGF die Apoptose mikrovaskulärer Gefäßzellen. Es aktiviert zeit- und konzentrationsabhängig die Phosphorylierung einer extrazellulären signalregulierten Kinase, ERK-1 (p44 mitogen activated protein kinase MAPK) und ERK-2 (p42 MAPK). Zudem hemmt sein Vorhandensein die anhaltende Aktivierung der Streß-aktivierten Proteinkinase SAPK. Der Aktivierung von MAPK und Hemmung von SAPK scheint eine Schlüsselrolle in der Entscheidung zuzukommen, ob die jeweilige Zelle überlebt oder den programmierten Zelltod eingeht (Gupta et al. 1999).

Am Endothel führt VEGF zu einer Kette von Reaktionen, inklusive Hyperpermeabilität, Endothelzellwachstum, Angiogenese und vermehrtem Glucosetransport (Abb. 2). Es reguliert die Expression von Gewebefaktor und Glucosetransporter (Connolly 1991).

Daneben kommt es aber auch zu einer erhöhten Freisetzung des Plasminogenaktivators (Pepper et al. 1991, Mandriota et al. 1995), von Kollagenasen (Unemori et al. 1992) und des vanWillebrand-Faktors (Brock et al. 1991).

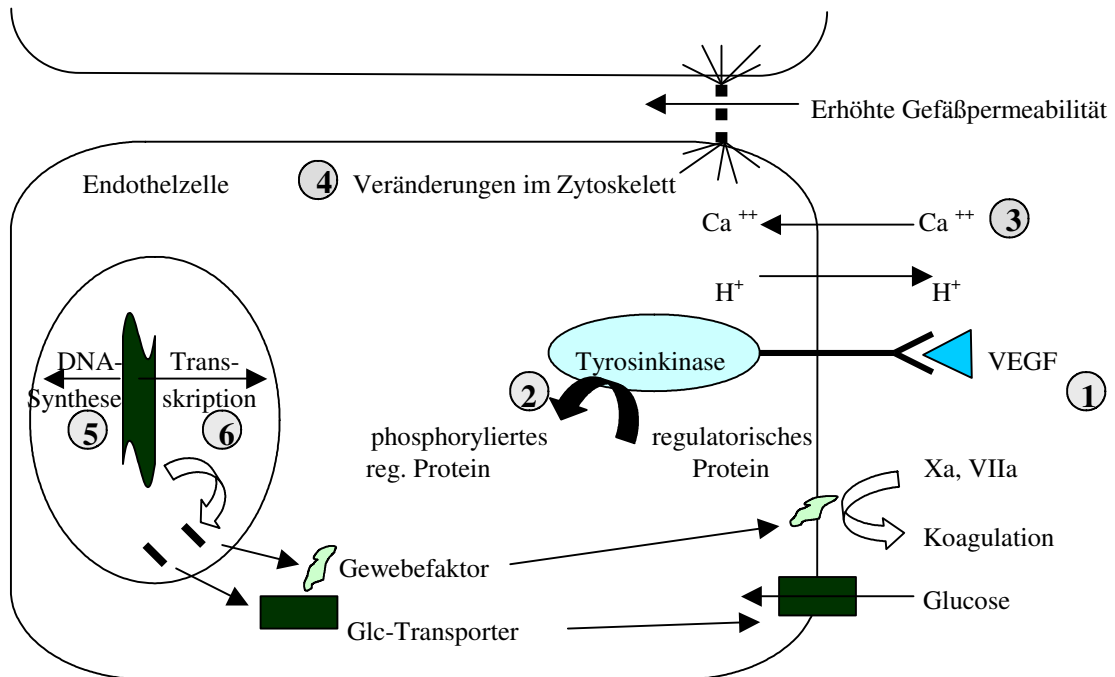


Abb. 2: Modell der Interaktion von VEGF mit Endothelzellen (nach Connolly et al. 1991).

1. VEGF bindet an den Hochaffinitätsrezeptor.
2. Die Tyrosinkinase wird durch Binden von VEGF aktiviert. Regulatorische Proteine werden phosphoryliert.
3. Intrazelluläres Kalzium, pH und Inositol-Tri-Phosphat steigen an.
4. Es treten Veränderungen im Zytoskelett auf, die zu einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität führen.
5. DNA-Synthese und Mitose werden initiiert.
6. Die Gene von Gewebefaktor und Glucosetransporter werden aktiviert, der Glucose-Transport wird gesteigert. Der Gewebefaktor kann mit Gerinnungsfaktoren reagieren und zur Koagulation führen.

I.B.5 Drei Hauptwirkungen von VEGF am Endothel

I.B.5.a Angiogenese

VEGF weist eine Spezifität für Endothelzellen auf. Es bewirkt deren Proliferation und übt einen angiogenen Effekt auf sie aus (Plouët et al. 1989); es fördert somit die Formierung neuer Kapillaren. Diese Effekte sind bereits in frühen Phasen der Embryogenese vorzufinden:

In Versuchen mit Ratten wurde gezeigt, daß die Ausbildung von VEGF-Rezeptoren eines der frühesten Ereignisse in der Endothelzeldifferenzierung ist. Schon in den ersten Tagen nach der Implantation wird VEGF in undifferenzierten Dezidualzellen und Vorläufern von großen Trophoblastzellen gebildet. Zu Beginn der Differenzierung in Embryoblast und Trophoblast scheint VEGF das Wachstum und die Proliferation von Endothelzellen der Dezidua, der Plazenta und von Gefäßmembranen zu stimulieren. So findet sich zum

Beispiel VEGF in den Blutinseln des Dottersackes. Auch Hämangioblasten vor ihrer Differenzierung in prämordiale Gefäße sind Ziel von VEGF. In der Dezidua finden sich Zellen in der Nähe von sich entwickelnden Gefäßen, die VEGF vor ihrer Formierung zu Endothelzellschläuchen binden (Jakeman et al. 1993).

Auch in der Entwicklung des Gehirns scheint VEGF eine entscheidende Rolle einzunehmen. Die Untersuchung verschiedener Stadien der Hirnentwicklung bei Mäusen zeigt, daß der VEGF-Rezeptor flt-1 vom Gefäßplexus des Neuralrohrs aufsteigend bis in neuorganisierende Hirnstrukturen lokalisierbar ist. VEGF-mRNA selbst ist in der Ventrikelzone des sich entwickelnden Gehirns zu finden. Diese stimmt mit dem Areal überein, in das neue Gefäße aus dem neuralen Gefäßplexus einwachsen.

Im Gehirn erwachsener Tiere finden sich weitaus weniger flt-1-Rezeptoren (Breier et al. 1992).

VEGF wurde von dieser Forschergruppe ebenfalls in sich bildenden Gefäßstrukturen der dorsalen Aorta, des Herzens, der Lunge, des Intestinaltraktes und des Thymus von Mäusen gefunden (Breier et al. 1995).

Die angiogenetische Wirkung von VEGF auf Endothelzellen wurde an VEGF stimulierten HUVE-Zellen (human umbilical vein endothelial cells) in vitro nachgewiesen. Bereits einen Tag nach Stimulation mit VEGF ist ein Zellwachstum dieser kultivierten Zellen zu erkennen. Nach drei Tagen formen sich kleine Gefäßschläuche, die mit bloßem Auge am 7. Tag erkennbar sind. Ohne VEGF-Stimulation ist diese Gefäßbildung nicht zu beobachten (Bikfalvi et al. 1991).

Es wird vermutet, daß der Mechanismus der Angiogenese in vier Schritten abläuft (Folkman et Haudenschild 1980; Folkman et Shing 1992):

1. Beginn mit proteolytischer Degeneration der Basalmembran:
VEGF stimuliert die Expression der interstitiellen Kollagenase (Matrix-Metalloproteinase-1) in menschlichen Endothelzellen. Seine Expression überträgt diesen Zellen eine gesteigerte Fähigkeit, interstitielles Kollagen abzubauen. Dieses stellt eine der Hauptbarrieren für Endothelzellen in der Angiogenese dar (Unemori et al. 1992).
2. Migration der Endothelzellen.

3. Proliferation der migrierten Endothelzellen.
4. Schlauchformierung.

Der letzte Schritt ist abgeschlossen, wenn die neuen Kapillaren von Perizyten umgeben sind.

Es wird vermutet, daß die Angiogenese in verschiedenen Gewebeabschnitten durch eine Erhöhung des VEGF-Spiegels hervorgerufen wird (Dvorak et al. 1995₂). Dabei nutzen Tumore den angiogenetischen Effekt von VEGF zur Expansion, indem sie selbst VEGF exprimieren (Claffey et al. 1992, Nagakawa et al. 1997).

VEGF ist also ein spezifischer Wachstumsfaktor für Endothelzellen. Er bindet mit hoher Affinität und führt zu Gefäßwachstum in vivo (Connolly et al. 1989₁).

I.B.5.b Proliferation

Die Proliferation von Endothelzellen wird von VEGF stimuliert. Unter anderem wird dieses Hormon in Nebennierenrinde, Großhirnrinde und Rückenmark, Hypophyse, Lunge, Magen, Milz, Pankreas, Niere, Ovar (vor allem im Corpus luteum), fetaler und adulter Aorta, Nabelschnurvenen (Ferrara et al. 1991₁) sowie in zahlreichen Tumoren gefunden (siehe Kapitel I.B.7).

Bei Nekrose von Leberzellen von Ratten nach Intoxikation findet sich zum Beispiel eine erhöhte Proliferation von sinusoidalen Endothelzellen und Kupffer-Zellen; hepatische Makrophagen und Sternzellen zeigen einen erhöhten VEGF-mRNA-Spiegel (Ishikawa et al. 1999).

VEGF hat so auch einen entscheidenden Beitrag an einer effektiven Wundheilung (Brown et al. 1992₂), da es zu einer verbesserten Organisation des Granulationsgewebes führt (Corral et al. 1999).

I.B.5.c Permeabilitätssteigerung

Schon die ersten Entdeckungen zu VEGF beschäftigten sich mit der Permeabilitätssteigerung in Blutgefäßen, die durch diesen Faktor hervorgerufen wird

(Lagruet al. 1975, Senger et al. 1983). Es stellte sich heraus, daß im Vergleich zu Histamin, einem weiteren und schon länger bekannten Verursacher von Permeabilitätssteigerung, VEGF über eine 50.000fach stärkere Potenz in der Entfaltung dieser Wirkung verfügt (Senger et al. 1990).

VEGF führt also infolge der Öffnung interzellulärer Verbindungen zu einer Permeabilitätssteigerung in den betroffenen Blutgefäßen. Die Öffnungen sind dabei groß genug, um den Eintritt von einem Tracer und zirkulierenden Blutzellen wie Erythrozyten und Thrombozyten in ein intramurales Lager zuzulassen. Es wird dabei aber auch eine Stase von Plättchen und Erythrozyten innerhalb des Lumens größerer Gefäße, Adhäsionen der Plättchen an die Endothelzellen und eine Plättchenmigration beobachtet (Roberts et Palade 1995).

Bei der Erhöhung der Gefäßpermeabilität scheint die Aktivität von sogenannten VVO, „vesiculo-vacuolären Organellen“ eine entscheidende Rolle zu spielen (Kohn et al. 1992, Qu-Hong et al. 1995, Roberts et Palade 1995). Diese Organellen bieten die Hauptroute für Extravasation von Makromolekülen. Eine typische Organelle besteht aus 124 kleinen Vesikeln und Vakuolen. Diese sind untereinander und mit der luminalen und abluminalen Seite der Plasmamembran der Endothelzelle verbunden. In den Membranen befinden sich Öffnungen, die nur durch dünne Diaphragmen von der Nachbarvakuole oder dem Lumen der Gefäße trennen. Der VEGF-Rezeptor KDR ist an den Vakuolen lokalisiert. Die Stimulation mit VEGF scheint hierbei - durch die Öffnung der Diaphragmen - eine Passage für Makromoleküle zu ermöglichen (Dvorak et Feng 2001). Unter Stimulation der Zellen mit VEGF, Histamin oder Serotonin kann experimentell eine Extravasation von Ferritin mittels der kleinen Organellen nachgewiesen werden (Feng et al. 1996).

Neben den VVOs gibt es sogenannte Caveolae, die durch Transzytose für den Transport von Plasmaproteinen über das kapilläre Gefäßendothel sorgen (Ghitescu et al. 1986, Milici et al. 1987). Sie interagieren wie die VVO mit Caveolin (Rothberg et al. 1992, Vasile et al. 1999). VEGF führt, wie oben bereits berichtet, zu einer Translokation von Caveolin-1 in den Zellkern. Es ist daher anzunehmen, daß VEGF auch diese Zellorganellen beeinflusst und somit an der Regulation der Transzytose von Plasmaproteinen beteiligt ist.

Die Erhöhung der vaskulären Permeabilität nach einer einzelnen Injektion von VEGF ist vorübergehend und reversibel, sie hält für ca. 30 Minuten an (Dvorak et al. 1995₁). VEGF

scheint hier eine endothelzellspezifische Antwort hervorzurufen, denn es entsteht kein Endothelzellschaden oder ein Schaden an anderen mikrovaskulären Komponenten; eingewanderte Plättchen und Mastzellen degranulieren nicht (Senger et al. 1986, Roberts et Palade 1995).

I.B.6 VEGF beeinflussende Faktoren

VEGF wird von einer Vielzahl von Faktoren positiv sowie negativ beeinflusst. So sind zum Beispiel IL-4, IL-10 und IL-13 (Parry et al. 2001), TNF- α , Dexamethason (Harada et al. 1994), Plättchenfaktor-4 (Gengrinovitch et al. 1995), α 2-Makroglobulin (Soker et al. 1993) und Suramin (Nakajima et al. 1991) als VEGF-hemmende Substanzen identifiziert worden. IL-1 β (Li et al. 1995), Prostaglandin-E1 und -E2 (Harada et al. 1994, Ben-Av et al. 1995), Endothelin-1 und -3 (Pedram et al. 1997), Cobaltchlorid (Ladoux et Frelin 1994) und Desferrioxamin (Wang et Semenza 1993) hingegen stimulieren die VEGF-Expression. TGF- β und PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) bewirken ansteigende mRNA-Level von VEGF (Dolecki et Connolly 1991). Ebenso führt die Behandlung von Zellen mit Kalzium oder cAMP zu einem erhöhten VEGF-mRNA-Spiegel (Claffey et al. 1992). Mg²⁺ scheint einen stabilisierenden Effekt auf VEGF zu haben (Chen et Chen 1987).

VEGF ist resistent gegenüber hohen Konzentrationen organischer Lösungen sowie Säuren und ist weder durch Antihistamine, Antikinine, Pepstatin A noch durch Indomethacin hemmbar (Lobb et al. 1985).

I.B.7 VEGF bei Tumoren

VEGF ist ein durch Hypoxie stimulierbarer angiogenetischer Faktor. Tumore breiten sich durch Wachstum neuer Gefäße mit anschließender Gewebeformation entlang dieser aus. Daher wurde schon zu frühen Zeitpunkten in der Forschung ein Zusammenhang von VEGF und Tumorwachstum vermutet. Tatsächlich stellte sich heraus, daß VEGF ein entscheidender Faktor im Tumorwachstum ist. Es ist in zahlreichen Tumoren nachweisbar, wie dem Phäochromozytom (Claffey et al. 1992), Osteosarkom (Iizuka et al. 1994), Lymphom (Connolly et al. 1989₂), Hepatom und Glioblastom (Kimura et al. 2000). Bei

letztenanntem Tumor ist der VEGF-Spiegel vor allem bei Zellen in der Nähe nekrotischer und somit Hypoxie ausgesetzter Zonen erhöht; unmittelbar hier findet sich auch eine Anhäufung von Kapillaren. Eine komplette Anoxie führt zu einer 13fachen Erhöhung des VEGF-mRNA-Spiegels, die sich bei normalen Sauerstoffspiegeln wieder zurückbildet (Shweiki et al. 1992).

Neben Glioblastomzellen zeigen auch Hepatoblastomzellen (Kimura et al. 2000) und PC-12-Zellen [eine Zelllinie des Phäochromozytoms bei Ratten (Levy et al. 1995)], eine durch NO und Hypoxie induzierte Expression des VEGF-Rezeptorgens. Eine aktive Sekretion findet sich unter anderem in Colonkarzinomzellen der Linie HT-29 (Lobb et al. 1985) und im Nierenzellkarzinom (Takahashi et al. 1994). Die Karzinomzellen produzieren, speichern und sezernieren VEGF. Dieses ist dann durch Induktion der Tubulogenese der mikrovaskulären Endothelzellen an der Angiogenese beteiligt (Nagakawa et al. 1997).

Die Tumore nutzen also die VEGF-Expression und -Sekretion zur Gefäßausbildung und somit zur weiteren Expansion. Es gibt daher inzwischen Therapieansätze, das Tumorwachstum durch die Hemmung der VEGF-Bildung zu beeinflussen (Cooke et al. 2001). Antikörper gegen VEGF verhindern die Stimulation von Endothelzellwachstum, Permeabilität und den Anstieg des cytosolischen Kalziums (Siossat et al. 1993). Sie führen so zu einer Hemmung der Angiogenese (Lu et al. 2001) und verhindern die weitere Ausbreitung und Metastasenbildung eines Tumors (Marme 2001).

I.B.8 Reaktion von VEGF auf Hypoxie

Die Hypoxie ist ein entscheidender Regulator der VEGF-Bildung. Viele Studien belegen die Hochregulation von VEGF unter hypoxischen Bedingungen. So führt zum Beispiel eine systemische Hypoxie zu einer VEGF-Induktion in Lunge, Gehirn, Nieren, Testes, Herz und Leber (Minchenko et al. 1994, Marti et Risau 1998). Betroffen sind vor allem die Endothelzellen und Perizyten. Diese Zellen bilden, einer Hypoxie ausgesetzt, vermehrt VEGF (Nomura et al. 1995); der KDR-Rezeptor findet sich autophosphoryliert, was unter Normoxie nicht der Fall ist (Namiki et al. 1995). Auch in kultivierten glatten Gefäßmuskulzellen kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von VEGF unter hypoxischen Bedingungen (Ambalavanan et al. 1999).

Eine erhöhte VEGF-Expression zeigt sich ebenfalls bei Krankheitsbildern, die durch einen hypoxischen Zustand hervorgerufen werden oder mit einem solchen einhergehen. So ist im

Versuch an Ratten in verschiedenen Gehirnabschnitten bei einem Insult eine erhöhte Expression von VEGF und seinen Rezeptoren wenige Stunden nach Beginn des hypoxisch ischämischen Zustandes nachweisbar. Diese dauert mehrere Tage an (Kovacs et al. 1996, Lenmyr et al. 1998). Durch die Aktivierung von VEGF und seinen Rezeptoren kommt es zu einer Endothelzellproliferation und zum Wachstum neuer Gefäße, ausgehend von gesundem Gewebe durch die Penumbra in Richtung Infarktkern (Marti et al. 2000).

Auch im Herz, das ischämischen Bedingungen ausgesetzt wird, findet sich im Rattenversuch bereits 15-30 Minuten nach Einsetzen der Ischämie eine Hochregulation der VEGF-mRNA (Hashimoto et al. 1994). Wird Lungengewebe von Ratten einem chronischen Sauerstoffmangel ausgesetzt (28-32 Tage), ist ein erhöhter VEGF-mRNA-Spiegel zu finden; die Transkriptionsrate ist vor allem in den Alveolarzellen, den glatten Gefäßmuskelzellen und den Alveolarmakrophagen erhöht (Tuder et al. 1995).

Aber nicht nur die Expression wird reguliert, sondern auch die VEGF-mRNA-Stabilität steigt unter hypoxischen Bedingungen (Shima et al. 1995). Außerdem findet in diesen Situationen eine Hochregulation der KDR-Rezeptordichte in den Zellen statt (Brogi et al. 1996).

In vitro Studien haben bisher 3 verschiedene Mechanismen aufgezeigt, die für den Anstieg von aktivem von Zellen sezernierten VEGF unter Hypoxie verantwortlich sind (Marti et al. 2000):

- 1) eine erhöhte Transkriptionsrate, die durch die Bindung von HIF-1 (Hypoxia inducible factor-1) an HRE in der 5'-flankierenden Region des VEGF-Gens hervorgerufen wird (Liu et al. 1995, Forsythe et al. 1996),
- 2) eine gesteigerte VEGF-mRNA-Stabilität (Ikeda et al. 1995), die wahrscheinlich durch Bindung an das RNA-bindende Protein HUR hervorgerufen wird (Levy et al. 1995, Levy et al. 1998),
- 3) eine interne Ribosomen-Eingangs-Seite, die die effiziente Translation von VEGF-mRNA auch unter Hypoxiebedingungen sichert (Stein et al. 1995, Stein et al. 1998).

I.B.9 VEGF und die Niere

Schon in der Entwicklung der Niere ist VEGF für die korrekte Glomerulogenese und Tubulogenese essentiell. Mit VEGF-Antikörpern behandelte Mäuse zeigen ein generalisiertes Ödem, eine gestörte Gefäßformation in der Nierenrinde und einen signifikanten Abfall an sich entwickelnden Nephronen. Daneben zeigen sich viele abnorme Glomeruli mit undichten Kapillarknäueln (Kitamoto et al. 1997).

In der menschlichen Niere ist VEGF spezifisches Produkt der glomerulären Endothelzellen (Parry et al. 2001). Es findet sich aber auch in glomerulären Epithelzellen (Brown et al. 1992₁), in proximalen und distalen Tubuluszellen sowie in interstitiellen Zellen kranker Nieren (Gröne et al. 1995). Aber nicht nur VEGF sondern auch seine Rezeptoren sind in der Niere vertreten: Sie sind in glomerulären Endothelzellen, Mesangiumzellen und in peritubulären Endothelzellen nachweisbar (Simon et al. 1995, Takahashi et al. 1995).

Bei Patienten mit Nephrotischem Syndrom liegt eine gesteigerte Gefäßpermeabilität mit nachfolgender Proteinurie vor. Sobel und Mitarbeiter brachten dieses 1981 erstmals in Zusammenhang mit VEGF (Sobel et al. 1981). Hierbei wird die Spliceform VEGF₁₆₅ verdächtigt, Mitverursacher der Proteinurie zu sein, da vor allem sie in den glomerulären Endothelzellen vertreten ist (Uchida et al. 1994). Die VEGF-Spiegel im Urin korrelieren mit dem Ausmaß der Proteinurie bei Patienten mit IgA-Nephropathie und Minimal Change Nephropathie (Matsumoto et Kanmatsuse 2001). VEGF steigt im Urin bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung mit zunehmendem Funktionsverlust an (Kitamoto et al. 2001).

Auf der anderen Seite übt VEGF unter experimentellen Bedingungen nach glomerulärem Zellschaden, wie zum Beispiel bei Glomerulonephritiden, einen positiven Effekt auf die Reparatur und Neuausbildung der geschädigten glomerulären Gefäße aus (Masuda et al. 2001). Es reduziert eine Fibrose und stabilisiert die Nierenfunktion (Kang et al. 2001).

Wie man sich diese positiven Eigenschaften therapeutisch zu Nutzen machen könnte, ist derzeit Gegenstand der Forschung.

I.C. Der Reperfusionsschaden

Sistiert die Versorgung eines Gewebes mit Blut, wie es bei Transplantationen oder akuten Gefäßverschlüssen der Fall ist, wird das betroffene Gewebe ischämisch. In der Folge werden verschiedenste Kaskaden aktiviert, die letztendlich zur Nekrose des Gewebes führen. Daher wird bei Transplantationen und bei akuten Gefäßverschlüssen eine rasche Wiederherstellung des Blutflusses angestrebt. Hierdurch soll der Schaden, den das Gewebe während der Ischämiezeit nimmt, minimiert werden. Doch obwohl das Gewebe nach erfolgreicher Transplantation oder Embolektomie wieder mit Blut versorgt wird, kann es nach Reperfusion zu einem weiteren Zelluntergang kommen, dem sogenannten Reperfusionsschaden.

Bei einem Reperfusionsschaden im Rahmen von Nierentransplantationen resultieren verschiedene pathologische Veränderungen, wie Zelltod (Apoptose und Nekrose), Verschlechterung der Nierenfunktion, morphologische Veränderungen der tubulären Mitochondrien, ein Abfall des kortikalen pH und die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (Daemen et al. 2002).

Die Apoptose wird hierbei durch extrazelluläre Faktoren wie Fas (Nogae et al. 1998) und TNF- α (Donnahoo et al. 1999) vermittelt, die an Apoptose-vermittelnde Rezeptoren binden. Einer der letzten Schritte der durch diese Faktoren eingeleiteten Kaskade ist die Aktivierung der intrazellulären Prokaspase-8, die wiederum weitere Kaspasen aktiviert. Ziel dieser aktivierten Kaspasen sind verschiedene funktionelle und strukturelle intrazelluläre Proteine. Es resultiert eine zelluläre Desorganisation, die letztendlich zum apoptotischen Zelltod führt.

Neben dieser extrazellulär initiierten Kaskade existiert ein zweiter intrazellulärer Mechanismus, der durch die Aktivierung intrazellulärer Faktoren wie AIF (Apoptosis Inducing Factor) und Cytochrom C ebenfalls den programmierten Zelltod hervorruft (Li et al. 1997).

Die Anlockung neutrophiler Granulozyten ist ein weiterer zentraler Mechanismus in der Entstehung des renalen Reperfusionsschaden (Klausner et al. 1989). Sauerstoffradikale, die bei der Reperfusion freigesetzt werden, sind an der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten beteiligt. Sie führen zur Aktivierung der Phospholipase A2, die wiederum die Bildung von Arachidonsäure und Lysophospholipid einleitet (Buschbeck et al. 1999). Diese stellen, zu Leukotrien B4 und PAF (platelet activating factor) metabolisiert, wichtige Chemotaxine

und funktionelle Mediatoren des renalen Reperfusionsschadens dar (Lopez-Farre et al. 1990, Torras et al. 1993).

Eine Beteiligung des Komplementsystems (Zhou et al. 2000) und von Interleukinen (Daemen et al. 2002) an dem Influx neutrophiler Granulozyten und Organschaden nach Ischämie ist ebenfalls nachweisbar.

Nach Anlockung findet ein Transmigration der neutrophilen Granulozyten durch die Zellmembran statt. Nach der Migration entfalten die Granulozyten ihre toxische Wirkung: Es kommt zur Bildung reaktiver Sauerstoffradikale und Liberation proteolytischer Enzyme wie Elastase, Gelatinase und Kollagenase, die zur Zerstörung von Zellen und Bindegewebe beitragen (Weiss 1989).

Weiterhin werden die Bildung von Matrix-Metalloproteinasen (Jain et al. 2000) und eine frühe Aktivierung des Immunsystems (Land 2002) als dem Reperfusionsschaden zugrunde liegende Mechanismen diskutiert. Ein anderes wesentliches Phänomen nach Reperfusion ist die Entwicklung eines Gewebeödems mit konsekutivem Anschwellen des Transplantats (Weight et al. 1996).

Bei der Nierentransplantation kommt es, nachdem das Nierentransplantat in dem Empfängerorganismus implantiert und wieder durchblutet ist, zum sogenannten postischämischen Reperfusionsschaden.

Die Pathomechanismen dieses Reperfusionsschadens sind komplex und noch nicht vollständig geklärt. Drei wesentliche Reaktionen, die zum Zellschaden beitragen, sind Apoptose, Inflammation und Nekrose (Daemen et al. 2002). Hinter diesen Reaktionen verbirgt sich unter anderem die Aktivierung verschiedener Kaskaden durch Faktoren wie zum Beispiel TNF- α (Donnahoo et al. 1999), die Anlockung neutrophiler Granulozyten, die Freisetzung verschiedener proteolytischer Enzyme wie Kollagenasen (Weiss 1989), die Bildung von freien Sauerstoffradikalen (Ratych et al. 1986), eine Aktivierung des Komplementsystems (Zhou et al. 2000) und die Bildung von Interleukinen.

Desweiteren kommt es zu der genannten Ausbildung eines Ödems des Transplantats, das zu einem Anschwellen des Organs führt (Brömme et al. 2002).

Bereits eine komplette Ischämie von 5 Minuten resultiert im Erscheinen apoptotischer Zellkörper während der Reperfusion mit gleichzeitigen Anzeichen einer Zellnekrose. Eine Verlängerung der kompletten Ischämie auf 35-45 Minuten führt zu einem drastischen

Anstieg apoptotischer Körper und Zellnekrosen, außerdem werden tubuläre Schäden sichtbar (Schumer et al. 1992).

Die hier geschilderten Vorgänge stellen einzelne Aspekte einer komplexen Reaktion auf die Reperfusion dar. Eine Wichtung der einzelnen beteiligten Faktoren ist derzeit noch nicht möglich; das Phänomen des Reperfusionsschadens ist in seiner Gesamtheit noch nicht geklärt und daher Grundlage der gegenwärtigen Forschungsarbeiten.

I.D. Zielsetzung

Das Nierentransplantat ist durch Transport und Operation einer mehrstündigen Ischämie ausgesetzt. Im Gefolge der Reperfusion treten Veränderungen auf, die denen ähnlich sind, die durch VEGF ausgelöst werden können.

So ist nachgewiesen, daß eine Hauptwirkung des VEGF unter anderem in einer Permeabilitätssteigerung liegt und diese durch hypoxische und ischämische Bedingungen stimuliert wird.

Es ist deshalb naheliegend, daß es während der Ischämiezeiten im Rahmen einer Nierentransplantation zu einer erhöhten Expression von VEGF im Transplantat kommt. Wird das Organ nach Implantation im Empfänger reperfundiert, könnte VEGF Mitverursacher des Reperfusionsschadens mit Transplantatödem sein.

Mit der vorliegenden Studie wollten wir herausfinden, ob VEGF im Rahmen der Ischämiephase in den Transplantaten perioperativ hochreguliert wird, und sich dies am Serumspiegel des VEGF nachvollziehen läßt. Es sollte geklärt werden, ob sich hieraus ein Rückschluß auf eine Mitverursachung des Reperfusionsschadens ergibt.

Zusätzlich wurde eine Vergleichsgruppe untersucht, um den Verlauf des perioperativen Serumspiegels bei einem nichttransplantierten Kollektiv zu überprüfen.

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Universität zur Lübeck genehmigt.

II. Material und Methoden

II.A. Durchführung der Blutentnahmen

II.A.1 Zeitlicher Ablauf der Blutentnahmen

II.A.1.a Nierentransplantation

Die Nierentransplantation ist in zwei Abschnitte aufgeteilt: Explantation und Implantation. Bei der Explantation erfolgt die sterile Entnahme der Spenderniere unter möglichst guten Kreislaufbedingungen als Blockpräparat mit Aorta, V. cava und Ureter. Die Niere wird daraufhin in kalter Organpräservations-Lösung konserviert und anschließend zum Empfänger transportiert. Hierbei wird das Organ kühl gelagert, wodurch eine Transportdauer bis zu maximal 40 Stunden möglich ist (Müller et al. 2002/03). Die Implantation erfolgt heterotop, extraperitoneal in die Fossa iliaca. Die A. renalis wird auf die A. iliaca externa, die V. renalis auf die V. iliaca externa und der Ureter mit Antireflux-Technik (submuköse Tunnelung) am Blasendach anastomosiert.

Untersucht wurden 33 Patienten im Alter von 21 bis 73 Jahren (Mittelwert 49,6 Jahre, Median 49 Jahre), die sich einer Nierentransplantation unterzogen. Davon waren 27 Empfänger eines Organs eines Leichenspenders, 6 Patienten erhielten das Organ eines Lebendspenders.

Um zu ermitteln, inwieweit es während einer Nierentransplantation zu einer Änderung der Serumkonzentration von VEGF kommt, wurde den Patienten Blut nach folgendem Schema abgenommen:

1. Meßzeitpunkt: präoperativ
2. Meßzeitpunkt: intraoperativ direkt aus der V. renalis nach Eröffnung der Anastomose
3. Meßzeitpunkt: intraoperativ 10 Minuten nach Eröffnung der V. renalis systemisch
4. Meßzeitpunkt: 2-3 Stunden postoperativ
5. Meßzeitpunkt: 2. postoperativer Tag
6. Meßzeitpunkt: 3. postoperativer Tag
7. Meßzeitpunkt: 7. postoperativer Tag

II.A.1.b Carotis- Thrombendarteriektomie

Als Referenz und Überprüfung der ermittelten Ergebnisse bei der Nierentransplantation wurde die gefäßchirurgische Carotis-Thrombendarteriektomie gewählt. Hierbei wird die A. carotis eröffnet, mit Hilfe eines Dissektionsspatels das atherosklerotische Material entfernt und ggf. anschließend die Arterie durch Einnähen eines Patches erweitert.

Wir untersuchten 21 Personen im Alter von 51 bis 77 Jahren (Mittelwert 68,7 Jahre, Median 69 Jahre), die sich dieser Operation unterzogen. Um den Einfluß der künstlichen Beatmung während der Operation zu erfassen, wurde den Patienten zu folgenden Zeitpunkten Blut abgenommen:

1. Meßzeitpunkt: präoperativ
2. Meßzeitpunkt: intraoperativ vor der Extubation
3. Meßzeitpunkt: 1. bis 2. postoperativer Tag
4. Meßzeitpunkt: Entlassungstag

Dieser Eingriff wurde gewählt, da es sich hierbei um einen standardisierten Eingriff mit standardisiertem Narkoseverfahren handelt.

II.A.2 Bearbeitung der Blutproben

Bei den Patienten mit einer Nierentransplantation wurden die präoperative Blutentnahme und die postoperativen Blutentnahmen mit Routineblutuntersuchungen von der Station koordiniert. Das Blut wurde durch Punktion einer Cubitalvene oder über einen zentralen Venenkatheter gewonnen.

Intraoperativ wurde die V. renalis direkt bei Freigabe der Nierenperfusion punktiert. Die Blutentnahme 10 min nach Eröffnung der V. renalis erfolgte aus dem zentralen Venenkatheter.

Die Blutproben der Patienten mit der Carotis-Operation wurden durch Punktion einer Cubitalvene gewonnen, wobei die prä – und postoperativen Blutentnahmen soweit wie möglich mit dem Routineblutuntersuchungen der Station koordiniert wurden.

Alle Blutproben wurden in Serummonovetten der Firma Sarstedt asserviert. Sämtliche Proben wurden nach Abnahme zunächst bei 4°C kühl gelagert, um eine vollständige

Gerinnung zu gewährleisten. Anschließend wurden die Röhren in einer Kühlzentrifuge der Firma Hettich (Rotanta S6R) bei 4°C für 10 min bei g-Zahl 693 (2000 Umdrehungen) und anschließend noch einmal für 10 min bei g-Zahl 2772 (4000 Umdrehungen) zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, in vier Eppendorfgefäße portioniert und sofort, gemäß den Empfehlungen des Herstellers des VEGF-Elisas, bei -20°C tiefgefroren.

Für die Bestimmung der VEGF-Konzentration mit einem ELISA wurde jeweils eines der Eppendorfgefäße wieder aufgetaut. Die restlichen drei Gefäße dienten als Sicherheitskontrolle für eventuell notwendige Nachbestimmungen.

II.B. Der VEGF-ELISA

Die VEGF-Serumkonzentrationen wurden mittels des VEGF-ELISAs Quantikine® der Firma R&D Systems bestimmt. Der Versuchsablauf erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers.

II.C. Statistik

Es wurde eine Varianzanalyse mit Meßwiederholungen durchgeführt, diese ergab einen p-Wert <0,0001. Daraufhin führten wir Anschlußtests durch (c-T-Test für verbundene Stichproben). Diese ergaben eine Signifikanz auf dem α -Niveau.

Die statistische Auswertung dieser Arbeit erfolgte mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck.

III. Resultate

III.A. Verlauf der VEGF-Konzentrationen im Serum bei Patienten mit Nierentransplantation

Untersucht wurden 33 Patienten im Alter von 21 bis 73 Jahren, 12 davon waren weiblichen (W) und 21 männlichen (M) Geschlechts. 6 (*) dieser Patienten erhielten ihr Organ durch Spende eines Angehörigen, die übrigen Patienten waren Empfänger eines Organs eines Leichenspenders (Tbl. 1).

Tbl. 1: Fall-Nr., Patienten Kürzel, * für Lebendspende, Geschlecht, VEGF-Konzentration in pg/ml zu den verschiedenen Meßzeitpunkten und kalte Ischämiezeit (KIZ) in Stunden. Bei den Feldern mit der Abkürzung n.d. konnte kein VEGF detektiert werden (< 9 pg/ml).

Fall-Nr.	Patient	Geschlecht	VEGF in pg/ml								KIZ (in Std.)
			prä-OP	1.intra-OP (V. renalis)	2.intra-OP systemisch	2-3h postoperativ	2.Tag post-OP	3.Tag post-OP	7.Tag post-OP		
1	MC1	W	83,256	12,305	10,691	7,51	43,39	88,876	163,193		
2	RH2	W	245,864	7,588	9,353	217,088	172,832	164,219	112,007		
3	EP3	M	348,993	407,897	283,983	292,009	262,788	149,821	346,124	25h16	
4	JJ5*	M	294,371	113,055	129,427	216,067	158,514	155,678	248,646	0h40	
5	NF6	M	789,931	298,823	373,719	220,573	543,59	576,422	867,127	10h54	
6	WE7	M	143,418	6,254	5,679	101,617	40,002	88,981	192,349		
7	WS8	M	157,906	24,571	35,633	100,976	130,099	123,266	119,825	22h	
8	RPR9	W	141,759	32,507	198,197	173,056	65,596	79,824	202,159		
9	WK10	M	635,366	435,529	590,762	665,536	468,461	533,03	1301,516	25h44	
10	BR12	W	18,826	16,7	23,202	8,895	n.d.	n.d.	3,38	7h34	
11	MB13	M	385,583	12,822	26,538	157,548	120,731	224,533	339,844	16h23	
12	TC14*	M	316,64	17,665	22,329	255,788	135,208	122,542	253,116	0h56	
13	HO15	W	210,781	n.d.	4,348	88,845	310,209	121,297	316,948	11h25	
14	ID16	W	618,224	n.d.	n.d.	149,821	157,740	114,312	848,375	14h50	
15	HWL17	M	436,614	73,060	21,3	133,437	338,683	234,804	840,982	29h07	
16	WK18	M	37,724	5,587	7,49	20,452	21,254	29,65	33,621	9h14	
17	BZ19	M	84,365	10,125	n.d.	111,556	61,17	190,797	115,541	12h47	
18	DT20*	W	125,107	28,099	21,182	206,445	47,564	208,641	493,539	0h48	
19	HB21	M	80,745	48,829	34,68	67,894	121,297	175,152	208,15	15h36	
20	LH22	W	364,258	20,422	4,911	11,896	134,397	187,311	176,762	30h17	
21	DT23	M	142,254	24,791	23,031	41,002	65,1	77,109	76,203	14h37	
22	IK24	W	507,628	17,493	46,746	337,893	180,966	89,592	69,158	16h05	
23	KHW25	M	88,774	60,455	55,875	67,82	16,817	8,687	105,312		
24	GN26	M	930,827	111,024	64,28	714,674	322,574	326,278	35,861	12h34	
25	MP27	M	738,389	34,695	30,123	474,697	516,274	640,567	418,83	17h55	
26	CH28*	W	516,317	228,309	176,404	361,515	282,313	173,231	289,994	0h54	
27	GS29	M	101,266	22,185	12,222	185,005	84,371	175,371	309,808	12h45	
28	KW30	W	32,365	11,491	7,703	26,699	42,269	96,148	260,645	23h59	
29	MF31*	M	87,32	24,836	n.d.	43,205	20,708	33,139	79,841	1h05	
30	LS32	W	264,052	30,765	21,651	90,016	110,167	177,881	236,474	16h23	
31	HF33	M	204,151	18,711	30,769	186,217	130,251	94,658	368,7		
32	MW34	M	355,954	202,642	62,073	254,393	11,75	245,386	537,36		
33	EC35*	M	130,716	51,733	40,322	115,017	88,336	80,054	252,261	1h05	

Aus den Resultaten von allen Patienten ergaben sich die folgenden statistischen Meßgrößen (Tbl. 2):

Tbl. 2: Mittelwert, Standardfehler und Standardabweichung des Kollektivs der nierentransplantierten Patienten

Meßzeitpunkt	Mittelwert VEGF in pg/ml	Standardfehler	Standardabweichung
prä-OP	291,507	41,663	239,334
Intra-OP Vene	73,060	19,71	113,224
Intra-OP syst.	71,958	21,955	126,122
2-3h post-OP	185,005	29,759	170,952
2.Tag post-OP	157,740	25,459	146,25
3.Tag post-OP	175,371	26,050	149,643
7.Tag post-OP	309,808	49,888	286,585

Die graphische Darstellung der Mittelwerte demonstrierte deutlich den Abfall von präoperativ zu intraoperativ bestimmter VEGF-Konzentration (Abb. 3):

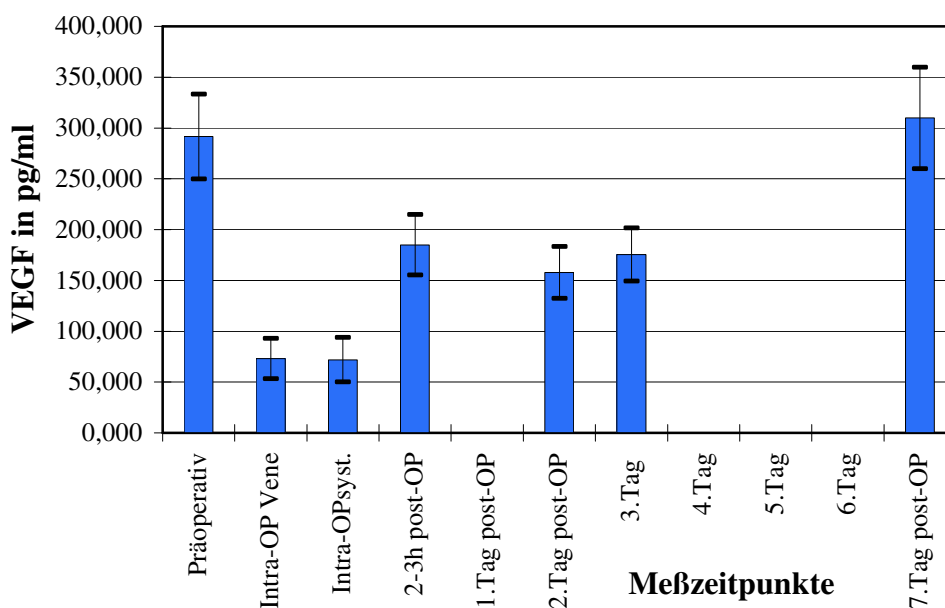


Abb 3: Mittelwerte und Standardfehler der VEGF Serum-Konzentration im Verlauf bei Patienten mit Nierentransplantation

Der Abfall von präoperativ zu beiden intraoperativ ermittelten Werten und auch der Anstieg von intraoperativ zu den postoperativ bestimmten Werten stellte sich als jeweils hoch signifikant ($p < 0,0001$) heraus.

Alter, Geschlecht des Patienten und Dauer der kalten Ischämiezeit hatten dabei keinen Einfluß auf die Höhe der VEGF-Konzentrationen.

III.B. Verlauf der VEGF-Konzentrationen im Serum bei Patienten mit Carotis-Thrombendarteriektomie

Bei den Patienten dieses Kollektives wurden ebenfalls mittels des Enzym-Immunoassays zu vier verschiedenen Zeitpunkten des Krankenhausaufenthaltes die VEGF-Konzentrationen ermittelt (Tbl. 3). Das Alter dieser Gruppe variierte zwischen 51 und 77 Jahren, 13 der Probanden waren männlichen, 8 weiblichen Geschlechts.

Tbl. 3: Patientenkürzel, Alter (in Jahren), Geschlecht (m = männlich, w = weiblich) und VEGF-Konzentrationen (in pg/ml) zu den verschiedenen Meßzeitpunkten der Patientengruppe mit Carotis-TEA, bei 2 Patienten konnte keine postOP2 Messung erfolgen (hier fehlende Werte). Bei den Feldern mit der Abkürzung n.d. konnte kein VEGF detektiert werden (< 9 pg/ml).

Patient	Alter	Geschlecht	VEGF in pg/ml			
			prä-OP	intra-OP	postOP1	postOP2
A	68	m	182,643	2,699	44,720	222,858
B	60	w	282,797	178,412	141,926	322,282
C	55	m	1172,019	445,405	640,490	1173,720
D	76	m	143,708	0,278	111,077	199,201
E	73	m	46,479	28,756	66,203	91,137
G	66	m	260,159	58,616	220,919	242,842
H	68	m	792,547	141,037	211,090	1176,739
I	77	m	53,782	0,278	52,694	34,171
J	68	w	481,499	302,822	456,762	586,533
K	65	m	635,561	293,608	451,778	624,472
L	74	m	45,943	n.d.	66,837	41,108
M	71	m	28,612	n.d.	41,109	30,907
N	62	m	365,497	n.d.	262,110	237,215
O	77	w	527,659	n.d.	389,553	388,941
P	74	w	35,958	n.d.	42,323	112,230
Q	62	w	112,230	18,233	179,657	
R	75	w	174,140	n.d.	308,741	1339,436
S	77	w	270,356	n.d.	313,262	396,520
T	51	m	125,935	n.d.	145,256	153,096
U	74	m	52,127	n.d.	173,634	160,547
V	69	w	133,641	n.d.	112,675	

Aus den gemessenen Konzentrationen zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten ergaben sich die folgenden statistischen Meßgrößen (Tbl. 4):

Tbl. 4: Mittelwert (VEGF in pg/ml), Standardfehler und Standardabweichung im Patientenkollektiv der Carotis-Thrombendarteriektomien

Meßzeitpunkte	Mittelwert (VEGF in pg/ml)	Standardfehler	Standardabweichung
Präoperativ	298,812	70,213	306,050
Intraoperativ	76,416	30,653	133,611
Post-OP 1	217,920	39,321	171,395
Post-OP 2	396,524	93,563	407,833

Es stellte sich erneut ein signifikanter Abfall ($p < 0,0001$) der VEGF-Konzentration im Vergleich von präoperativ zu intraoperativ dar und ebenso ein Anstieg von intraoperativ zu postoperativ (Abb. 4). Geschlechts- und/oder altersspezifische Unterschiede konnten nicht nachgewiesen werden.

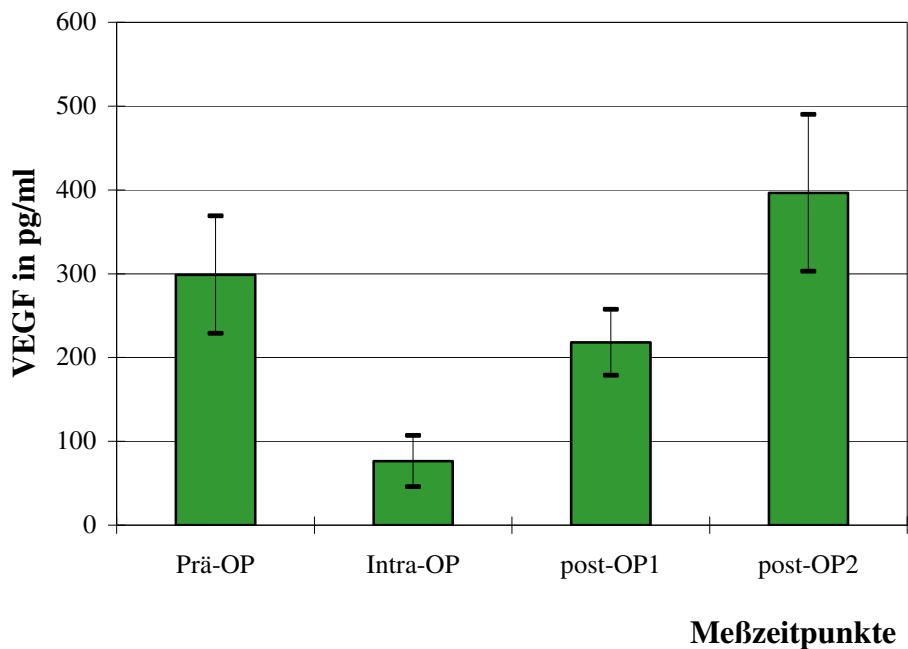


Abb. 4: Mittelwerte und Standardfehler der VEGF-Konzentration im Verlauf bei Patienten mit Carotis-TEA

IV. Diskussion

Nieren für eine Nierentransplantation stehen entweder als Organ eines Leichenspenders oder eines Lebendspenders zur Verfügung. Dabei ist das Organ verschiedenen Phasen der Ischämie ausgesetzt: Bei der Explantation kommt es mit Abklemmen der Aorta, bis zum Einsetzen der Organperfusion mit kalter Konservierungslösung, zur sogenannten 1. warmen Ischämiezeit. Mit Beginn der Perfusion mit kalter Konservierungslösung beginnt die kalte Ischämiezeit. Das Organ wird zum Empfänger transportiert und sobald das Organ nach Präparieren der Gefäße und des Ureters zur Anastomosierung der Gefäße in den Empfänger gelegt wird, beginnt die 2. warme Ischämiezeit. Sie endet mit der Wiederfreigabe des Blutflusses durch das transplantierte Organ.

Während dieser Ischämiezeiten können Schäden im Nierengewebe entstehen, die zu einer verminderten Überlebenszeit des Transplantats führen können (Koo et al. 1998, Kouwenhoven et al. 1999). Diese ischämiebedingten Schädigungen werden in der anschließenden Phase der Reperfusion weiter verstärkt. Alle toxischen Ereignisse für eine Zelle während einer Ischämie und einer anschließenden Reoxygenierung werden unter dem Begriff Ischämie-Reperfusionsschaden subsummiert (Toledo-Pereyra 1987, Brömme et al. 2002).

Die Mechanismen des Reperfusionsschadens sind derzeit noch nicht vollständig geklärt. Es kommt zu Apoptose und Nekrose von Nierenzellen, begleitet von einer akuten Entzündungsreaktion (Daemen et al. 2002). Im Mäuseversuch wurde gezeigt, daß diese akute Entzündungsreaktion durch die Aktivierung einer proinflammatorischen Zytokinkaskade (Herskowitz et al. 1995, Halloran et al. 1997), Exprimierung von Adhäsionsmolekülen (Rabb et al. 1995) und zelluläre Infiltration (Linas et al. 1995) charakterisiert ist. Das Ausmaß der Apoptose nach Reperfusion ist bei Nieren von Leichenspendern, die einer langen kalten Aufbewahrungszeit ausgesetzt sind, erhöht (Burns et al. 1998).

Der Zellschaden tritt bereits am 1. Tag nach Reperfusion deutlich in Erscheinung. Unter anderem sind eine Dilatation aller Tubuli des proximalen Tubuluskonvolutes, intraluminale Zelltrümmer, ein Verlust der Integrität des tubulären Bürstensaumes, fleckförmige Nekrosen und eine Ablösung tubulärer Zellen von umgebenden Basalmembranen zu finden. Zudem kommt es zu einer massiven Einwanderung neutrophiler Granulozyten in kortikale Areale.

In diesen veränderten Geweben kann immunhistologisch TNF- α nachgewiesen werden. Versuchstiere, die mit Antikörpern gegen TNF- α behandelt werden, zeigen einen weniger ausgeprägten Zellschaden. Daher ist anzunehmen, daß TNF- α eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Reperfusionsschäden einnimmt (Daemen et al. 1999). Auch freien Sauerstoffradikalen, wie Superoxid und Hydrogenperoxid, scheint eine entscheidende Rolle bei dem Reperfusionsschaden zuzukommen (Koo et al. 1998, Fishbein 1990, Brömme et al. 2002).

Im Rahmen des Reperfusionsschadens ist das Anschwellen des Transplantats durch ein Gewebsödem nach Reperfusion ein wesentliches Phänomen (Weight et al. 1996, Brömme et al. 2002). Dieses Phänomen ist auch bei anderen postischämischen Zuständen, z.B. nach einer Extremitätenischämie, bekannt. Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zielten auf die Klärung dessen Ätiologie.

Die Bildung des Hormons VEGF wird durch hypoxische und ischämische Bedingungen stimuliert, und auch in der Niere wird eine Hochregulierung der VEGF-mRNA nach Hypoxygenierung gefunden (Tufro-McReddie et al. 1997). Eine der Hauptwirkungen von VEGF besteht in einer Permeabilitätssteigerung von Endothelzellen mit einer 50.000fach stärkeren Potenz als Histamin. Einige Daten sprechen dabei für eine Beteiligung von VEGF am Gewebeödem, das durch die Reperfusion entsteht. In der Retina findet sich, nach Initiierung einer Hypoxie mit nachfolgender Reperfusion, eine Hochregulation des VEGF-Spiegels mit einem Maximum 40 Minuten nach Reperfusion (Kuroki et al. 1996). Untersuchungen an Mäusen nach Reperfusion bei einem Insult zeigen, daß die Gabe von Antikörpern gegen den VEGF-Rezeptor flt-1 zu einer Reduktion des Ausmaßes von Gehirnödem und Gewebeschaden führt (van Bruggen et al. 1999).

Experimentell während der Reperfusionszeit verabreichte Antikörper gegen VEGF vermindern das Ausmaß des Zellschadens nach Lebertransplantation bei Ratten (Boros et al. 2001). Im Fall der Lungentransplantation können erhöhte Konzentrationen der VEGF-Formen VEGF-A und VEGF-C in den aufbewahrten unventilierten Transplantaten nachgewiesen werden. Im Vergleich zu nicht ventilierten Lungen bei Thoraxoperationen ist in den unventilierten Lungentransplantaten neben der Erhöhung der Protein-Level von VEGF-A und -C auch eine gesteigerte Bildung von Gewebsflüssigkeit feststellbar (Abraham et al. 2002). Eine experimentell verursachte Überexpression von VEGF in

Lungen führt ebenfalls zu einer erhöhten Permeabilität und daraus resultierendem Lungenödem. Dieses läßt sich als erhöhter Quotient von Naß- zu Trockengewicht quantifizieren und histologisch in Form von interstitiellem und alveolärem Ödem nachweisen (Kaner et al. 2000).

Eine weitere Studie an Mäusen zeigt, daß es nach Okklusion der linken Arteria pulmonalis zu einer gesteigerten Expression von VEGF-mRNA und der mRNA des VEGF-Rezeptors KDR kommt. Die erhöhten mRNA-Spiegel werden hierbei über eine 24 Stunden lange Ischämiedauer aufrechterhalten. Bei dieser Studie wird ebenfalls eine, der Hochregulation des VEGF folgende, Erhöhung des Quotienten von Naß- zu Trockengewicht nachgewiesen (Kazi et al. 2000). Auch Becker und Mitarbeiter konstatieren, daß ein erhöhter VEGF-Spiegel in ischämischen Lungen mit einer erhöhten Gefäßpermeabilität verbunden ist (Becker et al. 2000). Zu der gleichen Feststellung kommen Taghavi und Mitarbeiter: Sie finden eine erhöhte Expression von VEGF und Endothelin-1 (welches die Produktion von VEGF-A stimuliert [Pedram et al. 1997]) während der Ischämiezeit eines Lungentransplantates (Taghavi et al. 2002). Die erhöhte Expression beider Faktoren ist mit einer erhöhten Permeabilität und einem erhöhtem Wassergehalt im transplantierten Organ verbunden.

Bei Nierentransplantationen wird nachgewiesen, daß Polymorphismen des VEGF-Gens an Position -1154*G/A und 2578*C/C mit einem erhöhten Risiko einer akuten Abstoßungsreaktion des Nierentransplantats assoziiert sind (Shabazi et al. 2002).

Immunhistochemische Analysen detektieren eine erhöhte VEGF-Bildung im Rahmen der chronischen Abstoßung von Nierentransplantaten: Bei Probanden mit normaler Nierenfunktion ist VEGF in den glomerulären Podozyten vorhanden. Hingegen findet sich bei Probanden mit chronischer Transplantatabstoßung eine erhöhte VEGF-Bildung. VEGF ist in dieser Gruppe zusätzlich in proximalen und distalen Tubuluszellen, in der Media von betroffenen Gefäßen, in einigen Gefäßendothelzellen sowie in den Infiltrationsbereichen von Makrophagen färberisch nachweisbar (Pilmore et al. 1999, Otto et al. 2002).

Bei Nierentransplantationen zeigen unmittelbar nach Reperfusion entnommene Nierenbiopsien eine Nekrose von proximalen Tubuli, eine Vakuolisierung sowie ein interstitielles Ödem, das mit länger werdender Dauer der kalten Ischämiezeit an Ausprägung zunimmt (Hoffmann et al. 2002). Weiterhin kommt es beim

Reperfusionsschaden zur Bildung freier Sauerstoffradikale. Von diesen weiß man, daß sie zu einem Anstieg der VEGF-Expression in vitro und in vivo führen (Kuroki et al. 1996).

Diese und andere Studien liefern also ebenfalls Hinweise dafür, daß VEGF an der Entstehung des Reperfusionsschadens beteiligt ist.

Auch Gunsilius und Mitarbeiter äußern den Verdacht, daß Endothelzellen eines Transplantats als Reaktion auf die Ischämie VEGF sezernieren (Gunsilius et al. 2001). Ein Nachweis dieser Behauptung erfolgte bisher jedoch nicht.

Wir gingen von der Vermutung aus, daß, durch die Ischämie als stärkstem Regulator des VEGF, im Rahmen einer Nierentransplantation eine gesteigerte VEGF-Expression im Transplantat stattfindet. Diese führt unseren Überlegungen zu Folge - nach Implantation des Transplantats und Wiederfreigabe des Blutflusses - zu einer Abgabe des VEGFs in den systemischen Blutkreislauf, gleichzeitig im Transplantat auf parakrinem Weg zu einer Permeabilitätssteigerung mit nachfolgendem Gewebeödem. Die vermehrt freigesetzte Menge an VEGF sollte in unserer Studie somit ein Indikator für die Permeabilitätssteigerung im Transplantat sein. Daher haben wir in dieser Arbeit zunächst die Serum-VEGF-Konzentrationen im Verlauf einer Nierentransplantation bestimmt.

Um den Verlauf des Spiegels möglichst optimal zu erfassen, wurde diesen Patienten vor der Operation Blut abgenommen, um den Ausgangswert zu ermitteln. Wir erwarteten die größten Veränderungen des Spiegels direkt nach Implantation des Organs und Wiederfreigabe der Blutzirkulation. Daher wurde den Patienten intraoperativ direkt aus der V. renalis, nach deren Eröffnung, und 10 Minuten danach systemisch Blut abgenommen, um eventuelle Auswirkungen auf den Gesamtserumspiegel von VEGF verfolgen zu können. Postoperativ erfolgten in regelmäßigen Abständen Kontrollen, die der Beobachtung des weiteren Verlaufes des systemischen Blut-VEGF-Spiegels dienen sollten.

Daneben war es aber auch erforderlich, die ermittelten Werte mit Normalwerten gesunder Personen zu vergleichen. Für die Höhe der VEGF-Konzentration gibt es bisher noch keinen definierten Normbereich. Wir zogen deshalb hierfür eine Studie an einem Normalkollektiv heran. Die Untersuchung von 60 gesunden Erwachsenen (Alter von 21 bis 49 Jahren) ergab einen Mittelwert von 247 pg/ml mit einer Standardabweichung von 135 pg/ml

(Standardfehler 21 pg/ml). Geschlechtsspezifische Unterschiede lagen nicht vor (Heits 1997).

Im Vergleich mit den von uns untersuchten Patientengruppen lag der Ausgangswert unserer Patientengruppe mit 291 pg/ml in der Nähe des Mittelwertes der Normalpersonen. Die Bedeutung dieser Differenz ist bisher noch unklar.

Unseren Überlegungen zufolge erwarteten wir intraoperativ einen Anstieg des VEGF-Spiegels, zumindest bei Abnahme des Blutes aus der Nierenvene, direkt nach deren Eröffnung. Wider unseren Erwartungen kam es aber im überwiegenden Teil der Fälle zu der genau gegensinnigen Reaktion. Die Mittelwertkurve (Abb. 3) zeigte einen hochsignifikanten ($p < 0,0001$) Abfall von der präoperativ bestimmten VEGF-Konzentration zu den intraoperativ ermittelten Werten. Innerhalb der 1. postoperativen Woche erholte sich der Wert wieder auf Ausgangsniveau und überschritt dieses in einigen Fällen sogar.

Da dieser Befund für uns zunächst nicht erklärlich war, entschlossen wir uns, den perioperativen Verlauf des VEGF-Serumspiegels in einer homogenen Vergleichsgruppe zu untersuchen. Es wurden Patienten zur Carotis-Thrombendarterektomie (TEA) ausgewählt, da es sich dabei um eine streng standardisierte Operation handelt, bei der der Ablauf von Narkose und Operation nur wenige Variationen aufweist. Hinzu kommt, daß in anderen Studien nachgewiesen wurde, daß arteriosklerotische Gefäße vermehrt VEGF bilden (Couffinhal et al. 1997, Bobryshev et al. 2001) und daß dieses die Rate und den Grad der arteriosklerotischen Plaquebildung steigert (Celletti et al. 2001). Bei Patienten mit vermehrter Arteriosklerose der Halsschlagader sind hohe Konzentrationen an Serum-VEGF-Spiegeln detektierbar, diese korrelieren zudem noch mit dem Schweregrad der Carotis-Stenose: Je hochprozentiger die Stenose, desto höher der VEGF-Spiegel (Lee et al. 2001).

Wir nahmen daher an, daß sich bei dieser Patientengruppe ein hoher Ausgangsspiegel zeigen würde und dadurch eine, durch die Operation bedingte, Änderung der VEGF-Konzentration gut darzustellen ist.

Im Gegensatz zu den Daten der Literatur zeigte der von uns bestimmte Mittelwert des VEGF-Serumspiegels vor der Operation mit 298 pg/ml keine signifikant erhöhte Konzentration im Vergleich zum Kollektiv der Nierenkranken und Normalpersonen. Somit

konnten wir die von Lee 2001 beobachtete Erhöhung der VEGF-Spiegel bei Patienten mit Carotisstenose nicht bestätigen.

Andererseits stellte sich, wie auch bei der Gruppe der nierentransplantierten Patienten, intraoperativ ein hochsignifikanter Abfall der VEGF-Konzentration dar (Abb. 4). Und auch in dieser Gruppe stieg der Wert in gleicher Weise im postoperativen Verlauf rasch wieder auf sein Ausgangsniveau an.

Zugrundliegende Überlegung zu dieser Studie war unsere Vermutung, daß VEGF durch die Ischämiezeit nach Organentnahme hochreguliert wird und anschließend am Reperfusionsschaden beteiligt ist. Daher hatten wir erwartet, daß es intraoperativ während der Nierentransplantation - zumindest im Blut aus der Vene des reperfundierten Organs - zu einem Anstieg des VEGF-Spiegels kommen würde.

Die Mittelwertanalyse der nierentransplantierten Patienten zeigte aber einen intraoperativen Abfall der VEGF-Konzentration, sowohl in der V. renalis als auch systemisch. Auch bei den Patienten, die eine Carotis-TEA erhielten, fiel die VEGF-Konzentration von den präoperativ ermittelten Ausgangswerten signifikant ab. Der intraoperative Abfall der VEGF Konzentration ist also kein spezifisches Phänomen der Nierentransplantation.

Unsere Hypothese, durch einen gesteigerten VEGF-Serumspiegel auf eine Beteiligung von VEGF am Reperfusionsschaden rückschließen zu können, konnte somit nicht bestätigt werden. Eine abschließende Beantwortung der Frage der Beteiligung von VEGF ist mit dem, dieser Studie zugrunde liegenden Ansatz (der Bestimmung der VEGF-Serumkonzentration) allerdings auch nicht möglich, war aber auch nicht geplant. Ein anderer Versuchsansatz, wie die Untersuchung der Spülflüssigkeit der Transplantate auf VEGF ist denkbar und mögliche Grundlage weiterer Studien.

Es gibt Versuchsansätze, in denen die Verteilung des VEGF-Proteins im Transplantat während der Nierentransplantation durch andere Methoden untersucht wurde.

Eine Studie an Schweinen, deren Nieren unterschiedlich langen warmen Ischämiezeiten ausgesetzt werden, kann in PCR-Analysen keine erhöhte VEGF-Produktionsrate in den ischämischen Organen nachweisen. Allerdings wird bei dieser Studie ein Abfall der VEGF-Konzentration am 5. postoperativen Tag gefunden. Dieser Abfall ist den Autoren

unklar. Sie stellen die Vermutung auf, daß die vor Transplantation gegebene Steroiddosis die VEGF-Expression inhibiert haben könnte (Lario et al. 2003).

Ein Versuchsansatz an Ratten hat inzwischen durch Western Blot Analysen eine vermehrte Bildung von VEGF-Protein nach renaler Ischämie nachgewiesen (Vannay et al 2004₁). Nieren, die einer warmen Ischämiezeit von 55 Stunden ausgesetzt werden, zeigen nach 2 bzw. 24 Stunden Reperfusion einen um das zwei- bis dreifach erhöhten VEGF-Spiegel. Die VEGF-mRNA-Expression bleibt unverändert (Vannay et al 2004₂).

Eine weitere Studien weist durch immunhistochemische Anfärbung nach, daß die Expression von VEGF und VEGF-Rezeptor-1 während der renalen Ischämie und im ischämischen Reperfusionsschaden nicht erhöht ist, allerdings eine erhöhte Expression von VEGF-Rezeptor-2 vorliegt. Diese Forschergruppe findet weiterhin heraus, daß es, als Reaktion auf den ischämischen Reperfusionsschaden, zu einer Umverteilung von zytoplasmatischem VEGF in den tubulären Endothelzellen in Richtung der basolateralen Membran kommt. Das angefärbte VEGF scheint während der hypoxischen Periode innerhalb von globulären oder vesikel-ähnlichen Strukturen lokalisiert zu sein (Kanellis et al. 2000, Kanellis et al. 2002). Es wäre somit möglich, daß die Wirkung des VEGF durch eine Umverteilung des präexistenten VEGF ausgelöst wird.

Diese Hypothese ist zwar eine mögliche Erklärung, warum wir keinen Anstieg des VEGF-Spiegels nach Reperfusion feststellen konnten, jedoch nicht für den intraoperativen Abfall. Da er bei beiden Patientengruppen auftritt, ist eine spezifischen Reaktion auf die Ischämie bei Nierentransplantation oder beispielsweise Medikamentennebenwirkung bei den Transplantatempfängern unwahrscheinlich. Es ist davon auszugehen, daß der VEGF-Abfall auf die allgemeinen Narkosebedingungen bei den Operationen zurückzuführen ist.

Eine Beeinflussung unserer Werte durch perioperative Volumengabe ist möglich. Es ist allerdings davon auszugehen, daß die Patienten, die zu den durchgeführten Operationen vorbereitet wurden, einen weitestgehend ausgeglichenen Volumenhaushalt hatten. Ein Verdünnungseffekt wird häufig bei Patienten beobachtet, die exsikiert aufgenommen werden und bei denen z.B. das Hämoglobin durch die Volumengabe absinkt. Eine Exsikkose hat bei beiden unserer Patientenkollektive nicht vorgelegen. Die Patienten bei der Nierentransplantation erhielten perioperativ durchschnittlich 1430 ml Flüssigkeit (Tbl. 5). An den postoperativen Tagen max. 500 ml Infusionen pro Tag.

Tbl 5: Patienten, Alter in Jahren, Geschlecht und perioperative Volumengabe (in ml) bei dem Patientenkollektiv der Nierentransplantation:

Fall-Nr.	Patient	Alter	Geschlecht	Einzelne Infusionen perioperativ (in ml)						
				NaCl 0,9%	Erythrozytenkonzentrat	HES	Gelafundin	Glucose 5%	Ringer	Gesamt-Infusionsmenge
1	MC1	33	W	1500		300				1800
2	RH2	49	W	1000						1000
3	EP3	62	M	400	500					900
4	JJ5*	36	M	1500						1500
5	NF6	59	M	500			500			1000
6	WE7	65	M	3000		500				3500
7	WS8	43	M	2000						2000
8	RPR9	55	W	1000						1000
9	WK10	49	M	1500						1500
10	BR12	31	W	1000						1000
11	MB13	49	M	2000						2000
12	TC14*	36	M	1000						1000
13	HO15	25	W	1000						1000
14	ID16	43	W	500						500
15	HWL17	45	M	1000	250		500			1750
16	WK18	73	M	1100			500			1600
17	BZ19	48	M	100			300			400
18	DT20*	52	W	1000						1000
19	HB21	57	M	1500						1500
20	LH22	70	W	1500						1500
21	DT23	61	M	1000						1000
22	IK24	67	W	1000						1000
23	KHW25	65	M	1400						1400
24	GN26	66	M	1500						1500
25	MP27	35	M	2500						2500
26	CH28*	28	W	1000						1000
27	GS29	48	M	1500						1500
28	KW30	61	W	1500			500			2000
29	MF31*	26	M	1000			1500		500	3000
30	LS32	71	W	1300						1300
31	HF33	52	M	1000						1000
32	MW34	56	M	1500			300			1800
33	EC35*	21	M	500				500	500	1500

Wie aus Tabelle 5 zu ersehen ist, handelte sich es bei der Flüssigkeitsgabe hauptsächlich um 0,9%ige, also plasmaitone Kochsalzlösung. Nach intravasaler Zufuhr dieser Infusionslösung erfolgt innerhalb von 20-30 Minuten eine Äquilibration mit dem Extrazellulärraum, nach einer Stunde befindet sich im beim Gesunden noch 25% des Intravasates im Intravasalraum, beim kritisch Kranken nur noch 20% oder weniger.

9 der 33 Patienten erhielten intraoperativ HES oder Gelafundin als Infusion. Von diesen Medikamenten ist bekannt, daß sie über eine volumenexpandierende Wirkung verfügen. Wenn bei diesen Patienten ein abnormer Abfall zu sehen gewesen wäre, hätte man einen Verdünnungseffekt postulieren können. Diese Patienten reagierten jedoch wie die anderen Patienten in ihrer Gruppe, es ist keine überschießende Reaktion in Vergleich zu den anderen sichtbar.

Insgesamt halten wir es für daher für wenig wahrscheinlich, daß die perioperative Flüssigkeitsgabe so zu einem anhaltendem Verdünnungseffekt geführt hat, der allein den Abfall der VEGF-Konzentration erklären kann. Bei beiden Patientenkollektiven wurde 3 Tage nach Operation der Ausgangsspiegel des VEGF noch nicht wieder erreicht, die Flüssigkeitsgabe wurde jedoch bei beiden Kollektiven durchschnittlich am 1., spätestens am 2. postoperativen Tag wieder sistiert.

Daß die Bestimmung des VEGF-Spiegels im Serum eine geeignete Methode ist, um Schwankungen zu erfassen, belegt eine Studie aus dem Jahr 2004: te Loo und Mitarbeiter untersuchten Kinder mit hämolytisch urämischem Syndrom auf die VEGF-Konzentration in Serum und Plasma im Krankheitsverlauf und die Expression der VEGF-Rezeptoren. Sie stellten fest, daß in der zweiten bis dritten Woche nach Krankheitsbeginn eine Hochregulation des VEGF-Serumspiegels eintritt (Loo te et al. 2004).

Der Serumspiegel wurde wie bei uns mittels ELISA bestimmt. Bei allen Kindern begann die Erkrankung mit einer blutigen Diarrhoe, es ist daher anzunehmen, daß die Kinder zumindest initial eine Volumensubstitution erhielten. Ein Abfall der VEGF-Serumkonzentration trat hierunter aber nicht ein. Dieses ist ein weiteres Indiz, daß der von uns beobachtete Abfall kein Verdünnungseffekt ist.

Da Hypoxie der stärkste Regulator des VEGF ist, ist ein naheliegender Grund für den Abfall der Konzentration von präoperativ zu intraoperativ die kontrollierte Beatmung mit - im Vergleich zur umgebenden Luft – höherer inspiratorischer Sauerstoffkonzentration. Der Patient wird bei Narkoseeinleitung maximal mit Sauerstoff aufgesättigt und hat auch während der Operation, bei komplikationslosem Verlauf, eine höhere Sauerstoffsättigung als unter Spontanatmung. Es wird unter der kontrollierten Beatmung im Verlauf einer Operation eine optimale Sauerstoffsättigung (> 95%) angestrebt. Durch die gute Sauerstoffversorgung nimmt auch die Menge an physikalisch gelöstem Sauerstoff im Blut zu.

Viele Studien haben sich bisher damit beschäftigt, daß die VEGF-Konzentration im Serum unter Hypoxie steigt. Nun stellt sich zusätzlich die Frage, ob die VEGF-Konzentration bei optimaler Oxygenierung sinkt.

Frühere Studien haben gezeigt, daß eine Hyperoxygenierung in den Lungen von Ratten zu einem Abfall der Expression von VEGF und seinen Rezeptoren führt (Klekamp et al. 1999). Patienten, die eine Lungentransplantation erhalten, weisen zu frühen Zeitpunkten nach Transplantation einen signifikant verminderten VEGF-Spiegel auf, der erst im Verlauf von Wochen wieder ansteigt (Meyer et al. 2001).

Diese Veränderung könnte auf die verbesserte Sauerstoffzufuhr nach einer Lungentransplantation zurückzuführen sein. Außerdem würde sie erklären, warum auch bei unseren Kollektiven der VEGF-Spiegel nur langsam wieder ansteigt.

Bei den in unserer Studie untersuchten Patientengruppen haben wir intraoperativen einen signifikanten Abfall des VEGF-Serumspiegels gefunden. Diese Beobachtung und die oben diskutierten Überlegungen zugrunde legend, stellen wir die Hypothese auf, daß eine Verbesserung des Sauerstoffangebots im Körper – in unserer Studie durch kontrollierte Beatmung – zu einer Herunterregulation des VEGFs führt.

V. Zusammenfassung

Die Funktionsfähigkeit des Transplantats bei einer Nierentransplantation kann durch die typischen Perioden kompletter Ischämie stark geschädigt werden. Die Ausprägung der renalen Dysfunktion und deren Reversibilität hängen dabei stark von der Zeit der Anoxie ab. Die klinischen Symptome der renalen Dysfunktion nach Ischämie resultieren aus dem Ausmaß der Zellschädigung in den betroffenen Arealen. Diese kann als direkte Folge der hypoxischen Bedingungen auftreten, aber auch als Folge eines Reperfusionsschadens, der mit einem massiven Zellödem einhergeht.

Das Hormon VEGF wird unter hypoxischen und ischämischen Bedingungen vermehrt gebildet, eine seiner Hauptwirkungen besteht in der Permeabilitätssteigerung von Gefäßen. Wir glauben, daß es im ischämischen Transplantat zu einer Konzentrationserhöhung an VEGF kommt, das nach Reperfusion Mitverursacher des Gewebeödems ist. Daher wollten wir mit dieser Studie untersuchen, ob VEGF eine Rolle in der Entstehung des Reperfusionsschadens spielt. Hierzu wurde mittels eines ELISA der VEGF-Serumspiegel im perioperativen Verlauf einer Nierentransplantation gemessen.

Unseren Erwartungen zufolge, sollte es intraoperativ zu einem Anstieg der Serumkonzentration nach Implantation und Reperfusion des Transplantats kommen. Gegen diese Erwartungen zeigte sich aber nicht ein intraoperativer VEGF-Anstieg, sondern ein signifikanter Abfall. Dieser wurde auch in einer Kontrollgruppe von Patienten, die eine Carotis-TEA erhielten, nachgewiesen.

Eine Aussage über die Rolle von VEGF beim Reperfusionsschaden ist somit anhand des Verlaufs des perioperativen VEGF-Serumspiegels nicht möglich.

Allerdings zeigte sich, daß offensichtlich die systemische Oxygenierung einen größeren Einfluß auf den VEGF-Spiegel besitzt, als bisher angenommen. Bekannt ist, daß VEGF auf Hypoxie mit einer verstärkten VEGF-Expression reagiert. Während einer Vollnarkose mit künstlicher Beatmung bekommt der Patient ein höheres Sauerstoffangebot als unter Spontanatmung. Unsere Studie zeigt, daß VEGF im menschlichen Körper auf ein erhöhtes Sauerstoffangebot offensichtlich rasch mit einem verminderten VEGF-Angebot reagiert.

VI. Literaturverzeichnis

1. Abraham D, Taghavi S, Riml P, Paulus P, Hofmann M, Baumann C, Kocher A, Klepetko W and Aharinejad S: VEGF-A and -C but not -B mediate increased vascular permeability in preserved lung grafts. *Transplantation* 73(11): 1703-1706, 2002
2. Abraham JA, Mergia A, Whang JL, Tumolo A, Friedman J, Hjerrild KA, Gospodarowicz D and Fiddes JC: Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* 233: 545-48, 1986
3. Ambalavanan N, Bulger A and Phillips III JB: Hypoxia-induced Release of Peptide Growth Factors from Neonatal Porcine Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Biol Neonate* 76: 311-19, 1999
4. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A and Marmé D: Migration of Human Monocytes in Response to Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Is Mediated via the VEGF Receptor flt-1. *Blood*, 87(8): 3336-43, 1996
5. Battey J, Moulding C, Taub R, Murphy W, Stewart T, Potter H, Lenoir G and Leder P: The human c-myc oncogene: structural consequences of translocation into the IgH locus of Burkitt lymphoma. *Cell* 34(3): 779-87, 1983
6. Becker PM, Alcasabas A, Yu AY, Semenza G and Bunton TE: Oxygen-independent upregulation of vascular endothelial growth factor and vascular barrier dysfunction during ventilated pulmonary ischemia in isolated ferret lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22: 272-79, 2000
7. Ben-Av P, Crofford LJ, Wider RL and Hla T: 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: 83-87, 1995
8. Betsholtz C, Johnsson A, Heldin CH, Westermarck B, Lind P, Urdea MS; Eddy R, Shows TB, Philpott K and Mellor AL: cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumor cell lines. *Nature* 320: 695-99, 1986
9. Bikfalvi A, Sauzeau C, Moukadiri H, Maclouf J, Busso N, Bryckaert M, Plouet J and Tobelem G: Interaction of Vasculotropin/Vascular Endothelial Cell Growth Factor With Human Umbilical Vein Endothelial Cells: Binding, Internalization, Degradation, and Biological Effects. *J Cell Physiol* 149: 50-59, 1991
10. Bobryshev YV, Farnsworth AE and Lord RS: Expression of vascular endothelial growth factor in aortocoronary saphenous vein bypass grafts. *Cardiovasc Surg* 9: 492-8, 2001
11. Boros P, Tarcsfalvi A, Wang L, Megyesi L, Liu J and Miller CM: Intrahepatic expression and release of vascular endothelial growth factor following orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 72: 805-11, 2001
12. Breier G, Clauss M and Risau W: Coordinate Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 (flt-1) and Its Ligand Suggests a Paracrine Regulation of Murine Vascular Development. *Developmental Dynamics* 204: 228-39, 1995
13. Breier G, Albrecht U, Sterrer S und Risau W: Expression of Vascular Endothelial Growth Factor during embryogenic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 114: 521-32, 1992

14. Brock TA, Dvorak HF and Senger DR: Tumor-secreted Vascular Permeability Factor Increases Cytosolic Ca²⁺ and von Willebrand Factor Release in Human Endothelial Cells. *Am J Pathol* 138(1): 213-221, 1991
15. Brömme HJ, Loertzer H and Akcetin Z: Der postischämische Reperfusionsschaden. *Biochemische und methodische Grundlagen. Urologe A* 41: 159-63, 2002
16. Brogi E, Schatteman G, Wu T, Kim EA, Vartikovski L, Keyt B and Isner JM: Hypoxia- induced Paracrine Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Expression. *J Clin Invest* 97: 469-476, 1996
17. Brown LF, Berse B, Tognazzi K, Manseau EJ, van de Water L, Senger DR, Dvorak HF and Rosen S: Vascular permeability factor mRNA and protein expression in human kidney. *Kidney Int* 42: 1457-61, 1992₁
18. Brown L, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF and van de Water L: Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 176: 1375-79, 1992₂
19. Bruggen N van, Thibodeaux H, Palmer JT, Lee WP, Fu L, Cairns B, Tumas D, Gerlai R, Williams SP, van Lookeren Champagne M and Ferrara N: VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *J Clin Invest* 104(11): 1613-20, 1999
20. Burns AT, Davies DR, McLaren AJ, Cerundolo L, Morris PJ and Fuggle SV: Apoptosis in ischemia/reperfusion injury of human renal allografts. *Transplantation* 66(7): 872-76, 1998
21. Buschbeck M, Ghomashchi F, Gelb MH, Watson SP and Borsch-Haubold AG: Stress stimuli increase calcium-induced arachidonic acid release through phosphorylation of cytosolic phospholipase A₂. *Biochem J* 344(2): 359-66, 1999
22. Celletti FL, Hilifiker PR, Ghafouri P and Dake MD: Effect of human recombinant vascular endothelial growth factor 165 on progression of atherosclerotic plaque. *J Am Coll Cardiol* 37(8): 2126-30, 2001
23. Chen CH and Chen SC: Evidence of the Presence of a Specific Vascular Endothelial Growth Factor in Fetal Bovine Retina. *Exp Cell Res* 169: 287-95, 1987
24. Claffey KP, Wilkinson WO and Spiegelman BM: Vascular Endothelial Growth Factor – Regulation by Cell Differentiation and Activated Second Messenger Pathways. *J Biol Chem*, 267(23): 16317-22, 1992
25. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pan YCE, Olander JV, Connolly DT and Stern D: Vascular Permeability Factor: A Tumor-derived Polypeptide that Induces Endothelial Cell and Monocyte Proagulant Activity, and Promotes Monocyte Migration. *J Exp Med* 172: 1535-45, 1990
26. Collins T, Ginsburg D, Boss JM, Orkin SH and Pober JS: Cultured human endothelial cells express platelet-derived growth factor B-Chain: cDNA cloning and structural analysis. *Nature* 316: 748-50, 1985
27. Conn G, Soderman DD, Schaeffer MT, Wile M, Hatcher VB and Thomas KA: Purification of a glycoprotein vascular endothelial cell mitogen from a rat glioma-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1323-27, 1990
28. Connolly DT: Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *J Cell Biochem* 47: 219-23, 1991

29. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley B, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM and Feder J: Tumor Vascular Permeability Factor Stimulates Endothelial Cell Growth and Angiogenesis. *J Clin Invest* 84: 1470-78, 1989₁
30. Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, Haymore BL, Leimgruber R and Feder J: Human Vascular Permeability Factor – Isolation from U937 Cells. *J Biol Chem* 264(33): 20017-24, 1989₂
31. Cooke SP, Boxer GM, Lawrence L, Pedley RB, Spencer DI, Begent RH and Chester KA: A strategy for antitumor vascular therapy by targeting the vascular endothelial growth factor receptor complex. *Cancer Res* 61(9): 3653-59, 2001
32. Corral CJ, Siddiqui A, Wu L, Farrell CL, Lyons D and Mustoe TA: Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing. *Arch Surg* 134: 200-205, 1999
33. Couffignal T, Kearney M, Witzendichler B, Chen D, Murohara T, Losordo DW, Symes J and Isner JM: Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries. *Am J Pathol* 150(5): 1673-85, 1997
34. Daemen MARC, Vries B de and Buurman WA: Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury. *Transplantation* 73(11): 1693-700, 2002
35. Daemen MARC, Ven MWCM van de, Heineman E and Buurman WA: Involvement of endogenous interleukin-10 and tumor necrosis factor- α in renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 67(6): 792-800, 1999
36. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB and Goeddel DV: Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 316: 701-5, 1985
37. DiSalvo J, Bayne ML, Conn G, Kwok PW, Trivedi PG, Soderman DD, Palisi TM, Sullivan KA and Thomas KA: Purification and Characterization of a Naturally Occurring Vascular Endothelial Growth Factor – Placenta Growth Factor Heterodimer. *J Biol Chem* 270(13): 7717-23, 1995
38. Dolecki GJ and Connolly DT: Effects of a variety of cytokines and inducing agents on Vascular Permeability Factor mRNA levels in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 180(2): 572-578, 1991
39. Donnahoo KK, Schames BD, Harken AH and Meldrum DR: Review Article: The Role of Tumor Necrosis Factor In Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *J Urol* 162: 196-203, 1999
40. Dull TJ, Gray A, Hayflick JS and Ullrich A: Insulin-like growth factor II precursor gene organization in relation to insulin gene family. *Nature* 310: 777-81, 1984
41. Dvorak AM and Feng D: The Vesiculo-Vacuolar Organelle (VVO): A New Endothelial Cell Permeability Organelle. *J Histochem Cytochem* 49(4): 419-31, 2001
42. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M and Dvorak AM: Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor, Microvascular Hyperpermeability, and Angiogenesis. *Am J Pathol* 146(5): 1029-39, 1995₁
43. Dvorak HF, Detmar M, Claffey KP, Nagy JA, van de Water L and Senger DR: Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor: An Important Mediator of Angiogenesis in Malignancy and Inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 107: 233-35, 1995₂

44. Feng D, Nagy JA, Hipp J, Dvorak HF and Dvorak AM: Vesiculo-Vacuolar Organelles and the Regulation of Venule Permeability to Macromolecules By Vascular Permeability Factor, Histamine, and Serotonin. *J Exp Med* 183: 1981-86, 1996
45. Feng Y, Venema VJ, Venema RC, Tsai N and Caldwell RB: VEGF induces nuclear translocation of Flk-1/KDR, endothelial nitric oxide synthase, and caveolin-1 in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 192-7, 1999
46. Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, and Leung DW: The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem* 47: 211-18, 1991₁
47. Ferrara N, Leung DW, Cachianes G, Winer J and Henzel WJ: Purification and Cloning of Vascular Endothelial Growth Factor Secreted by Pituitary Folliculostellate Cells. *Methods in Enzymology* 198: 391-405, 1991₂
48. Ferrara N and Henzel WJ: Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161(2): 851-858, 1989
49. Fishbein MC: Reperfusion Injury. *Clin Cardiol* 13: 213-17, 1990
50. Folkman J and Shing Y: Angiogenesis. *J Biol Chem* 267(16): 10931-34, 1992
51. Folkman J and Haudenschild C: Angiogenesis in vitro. *Nature* 288: 551-56, 1980
52. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD and Semenza GL: Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16: 4604-4613, 1996
53. Gengrinovitch S, Greenberg SM, Cohen T, Gitay-Goren H, Rockwell P, Maione TE, Levy BZ and Neufeld G: Platelet Factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF₁₂₁ and VEGF₁₆₅ using several concurrent mechanisms. *J Biol Chem*, 270(25): 15059-65, 1995
54. Ghitescu L, Fixman A, Simionescu M and Simionescu N: Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium: receptor-mediated transcytosis. *J Cell Biol* 102: 1304-1311, 1986
55. Gitay-Goren H, Soker S, Vlodavsky I and Neufeld G: The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules. *J Biol Chem* 267: 6093-98, 1992
56. Gospodarowicz D, Abraham JA and Schilling J: Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7311-15, 1989
57. Gröne H, Simon M and Gröne E: Expression of vascular endothelial growth factor in renal vascular disease and renal allografts. *J Pathol* 177: 259-67, 1995
58. Gunsilius E, Petzer AL, Duba HC, Kahler CM and Gastl G: Circulation endothelial cells after transplantation. *Lancet* 357: 1449-50, 2001
59. Gupta K, Kshirsagar S, Li W, Gui L, Ramakrishnan S, Gupta P, Law PY and Hebbel RP: VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Exp Cell Res* 247: 495-504, 1999

60. Halloran PF, Homik J, Goes N, Lui SL, Urmson J, Ramassar V and Cockfield SM: The „injury response“: a concept linking nonspecific injury, acute rejection, and long term transplant outcomes. *Transplant Proc* 29: 79-81, 1997
61. Harada S, Nagy JA, Sullivan KA, Thomas KA, Endo N, Rodan GA and Rodan SB: Induction of Vascular Endothelial Growth Factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J Clin Invest* 93(6): 2490-96, 1994
62. Hashimoto E, Ogita T, Nakoaka T, Matsuoka R, Takao A and Kira Y: Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *Am J Physiol* 267: H1948-54, 1994
63. Hauser S and Weich HA: A heparin-binding form of placenta growth factor (PlGF-2) is expressed in human umbilical vein endothelial cells and in placenta. *Growth Factors* 9: 259-68, 1993
64. Heits F: Die Konzentration des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) im Serum von Normalpersonen und Tumorpatienten. *Med. Diss. Lübeck*, 1997
65. Herskowitz A, Choi S, Ansari AA and Wesselingh S: Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium. *Am J Pathol* 146: 419-28, 1995
66. Hoffmann SC, Kampen RL, Amur S, Sharaf MA, Kleiner DE, Hunter K, Swanson SJ, Hale DA, Mannon RB, Blair PJ and Kirk AD: Molecular and immunohistochemical characterization of the onset and resolution of human renal allograft ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 74(7): 916-23, 2002
67. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J and Ferrara N: Dual Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Bioavailability by Genetic and Proteolytic Mechanisms. *J Biol Chem* 267(36): 26031-37, 1992
68. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cacchianes G, Li B and Leung DW: The vascular endothelial growth factor family – identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5: 1806-14, 1991
69. Iizuka M, Yamauchi M, Ando K, Hori N, Furusawa Y, Itsukaichi H, Fukutsu K and Mariya H: Quantitative RT-PCR assay detecting the transcriptional induction of Vascular Endothelial Growth Factor under Hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 205(2): 1474-1480, 1994
70. Ikeda E, Achen MG, Breier G and Risau W: Hypoxia induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor (VEGF) in C6 glioma cells. *J Biol Chem* 270: 19761-66, 1995
71. Ishikawa K, Mochida S, Mashiba S, Inao M, Matsui A, Ikeda H, Ohno A, Shibuya M and Fujiwara K: Expressions of Vascular Endothelial Growth Factor in Nonparenchymal as Well as Parenchymal Cells in Rat Liver after Necrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 254: 587-93, 1999
72. Jain S, Bicknell GR and Nicholson ML: Molecular changes in extracellular matrix turnover after renal ischemia-reperfusion injury. *British J of Surgery* 87: 1188-92, 2000
73. Jakeman LB, Armanini M, Phillips HS and Ferrara N: 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(2): 848-59, 1993

74. Joukov V, Pajusola K and Kapainen A: A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt-4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 15: 290-98, 1996
75. Kanellis J, Paizis K, Cox AJ, Stacker SA, Gilbert RE, Cooper ME and Power DA: renal ischemia-reperfusion increases endothelial VEGFR-2 without increasing VEGF or VEGFR-1 expression. *Kidn Int* 61(5): 1696-705, 2002
76. Kanellis J, Mudge SJ, Fraser S, Katerelos M and Power DA: Redistribution of cytoplasmatic VEGF to the basolateral aspect of renal tubular cells in ischemia-reperfusion injury. *Kidney International* 57(6): 2445-56, 2000
77. Kaner RJ, Ladetto JV, Singh R, Fukuda N, Matthay MA and Crystal RG: Lung Overexpression of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene Induces Pulmonary Edema. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22: 657-64, 2000
78. Kang DH, Hughes J, Mazzali M, Schreiner GF and Johnson RJ: Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. *J Am Soc Nephrol* 12: 1448-57, 2001
79. Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A and Satow Y: Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in haematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res* 55: 5687-92, 1995
80. Kazi AA, Lee WS, Wagner E and Becker PM: VEGF, fetal liver kinase-1, and permeability increase during unilateral lung ischemia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L460-67, 2000
81. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J and Connolly T: Vascular Permeability Factor, an Endothelial Cell Mitogen related to PDGF. *Science* 246: 1309-12, 1989
82. Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, Hashimoto K, Ogura T, D'Acquisto F, Addeo R, Makuuchi M and Esumi H: Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 95: 189-97, 2000
83. Kitamoto Y, Matsuo K and Tomita K: Different response of urinary excretion of VEGF in patients with chronic and acute renal failure. *Kidney Int* 59: 386-86, 2001
84. Kitamoto Y, Tokunaga H and Tomita K: Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse kidney development: Glomerulogenesis and Nephrogenesis. *J Clin Invest* 99: 2351-57, 1997
85. Klausner JM, Paterson IS, Goldman G, Kobzik L, Rodzen C, Lawrence R, Valeri CR, Shepro D and Hechtman HB: Postschismic renal injury is mediated by neutrophils and leukotrienes. *Am J Physiol* 256: F794-802, 1989
86. Klekamp JG, Jarzecka K and Perkett EA: Exposure to hyperoxia decreases the expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in adult rat lungs. *Am J Pathol* 154: 823-31, 1999
87. Kohn S, Nagy JA, Dvorak HF and Dvorak AM: Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small veins. Structural basis for the hyperpermeability of tumor blood vessels. *Lab Invest* 67: 596-607, 1992

88. Kondo S, Matsumoto T, Yokoyama Y, Ohmori I and Suzuki H: The shortest isoform of human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF₁₂₁) produced by *Saccharomyces cerevisiae* promotes both angiogenesis and vascular permeability. *Biochim Biophys Acta* 1243: 195-202, 1995
89. Koo DDH, Welsh KI, Roake JA, Morris PJ and Fuggle SV: Ischemia/Reperfusion injury in human kidney transplantation. *Am J Pathol* 153: 557-66, 1998
90. Kouwenhoven EA, de Bruin RWF, Heemann UW, Marquet RL and Ijzermans JNM: Late graft dysfunction after prolonged cold ischemia of the donor kidney. *Transplantation* 68: 1004-10, 1999
91. Kovacs Z, Ikezaki K, Samoto K, Inamura T and Fukui M: VEGF and flt. Expression Time Kinetics in Rat Brain Infarct. *Stroke* 27: 1865-73, 1996
92. Kuroki M, Voest EE, Amano S, Beerepoot LV, Takashima S, Tolentino M, Kim RY, Rohan RM, Colby KA, Yeo KT and Adamis AP: Reactive Oxygen Intermediates Increase Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Vitro and in Vivo. *J Clin Invest* 98(7): 1667-75, 1996
93. Ladoux A and Frelin C: Cobalt stimulates the expression of vascular endothelial growth factor mRNA in rat cardiac cells. *Biochem Biophys Res Commun* 204(2): 794-98, 1994
94. Lagrue G, Branellec A, Blanc C, Xheneumont S, Beaudoux A, Sobel AT and Weil B: A vascular permeability factor in lymphocyte culture supernatants from patients with nephrotic syndrome. II. Pharmacological and physicochemical properties. *Biomedicine* 23: 73-75, 1975
95. Land W: Postischemic Reperfusion Injury to Allografts – A case for ‘Innate Immunity’? *Eur Surg Res* 34: 160-69, 2002
96. Lario S, Mendes D, Bescós M, Inigo P, Campos B, Alvarez R, Alcaraz A, Rivera-Fillat F and Campistol JM: Expression of transforming growth factor- β 1 and hypoxia-inducible factor-1 α in an experimental model of kidney transplantation. *Transplantation* 75(10): 1647-54, 2003
97. Lee SH, Jeong MH, Bae HR, Jeong SJ, Jang JY, Lim YJ, Kim SH, Kim JW and Cha JK: Circulating levels of interleukin-1 and vascular endothelial growth factor in patients with carotid stenosis. *J Korean Med Sci* 16: 198-203, 2001
98. Lenmyr F, Ata KA, Funa K, Olsson Y and Terent A: Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its receptors (flt-1 and flk-1) following permanent and transient occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Neuropathol Exp Neurol* 57: 874-82, 1998
99. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV and Ferrara N: Vascular Endothelial Growth Factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306-1309, 1989
100. Levy NS, Chung S, Furneaux H and Levy AP: Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the mRNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 273: 6417-6423, 1998
101. Levy AP, Levy NS, Wegner S and Goldberg MA: Transcriptional Regulation of the Rat Vascular Endothelial Growth Factor Gene by Hypoxia. *J Biol Chem* 270(22): 13333-40, 1995
102. Li J, Perella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, Endege WO, Zhou F and Lee ME: Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 270(1): 308-12, 1995

103. Li P, Nijhwan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES and Wang X: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91(4): 479-89, 1997
104. Li X and Eriksson U: Novel VEGF family members: VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D. *Int J Biochem Cell Biol* 33(4): 421-26, 2001
105. Linas SL, Whittenburg D, Parsons PE and Repine JE: Ischemia increases neutrophil retention and worsens acute renal failure: role of oxygen metabolites and ICAM 1. *Kidney Int* 48(5): 1584-91, 1995
106. Liu Y, Cox SR, Morita T and Kourembanas S: Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5'Enhancer. *Circulation Research* 77: 638-43, 1995
107. Lobb RR, Key ME, Alderman EM and Fett JW: Partial purification and characterization of a vascular permeability factor secreted by a human colon adenocarcinoma cell line. *Int J Cancer* 36: 473-478, 1985
108. Loo te DM, Bosma N, Hinsbergh van V, Span P, Waal de R, Clarijs R, Sweep C, Monnens L and Heuvel van den L: Elevated levels of vascular endothelial growth factor in serum of patients with D+HUS. *Pediatr Nephrol* 19: 754-60, 2004
109. Lopez-Farre A, Bernabeau F, Gomez-Garre D, Ramon y CS, Braques P and Lopez-Novoa JM: Platelet-activating factor antagonist treatment protects against postischemic acute renal failure in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 253(1): 328-33, 1990
110. Lu D, Jimenez X, Zhang H, Wu Y, Bohlen P, Witte L and Zhu Z: Complete inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) activities with a bifunctional diabody directed against both VEGF kinase receptors, fms-like tyrosine kinase receptor and kinase insert domain-containing receptor. *Cancer Res* 61(19): 7002-8, 2001
111. Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD, Ferrara N, Wasi S, Mazziere R, Mignatti P and Pepper MS: Vascular Endothelial Growth Factor Increases Urokinase Receptor Expression in Vascular Endothelial Cells. *J Biol Chem* 270(17): 9709-16, 1995
112. Marme D: Tumorigenese: Neue Ansätze zur Krebstherapie. *Onkologie* 24: 1-5, 2001
113. Marti HJH, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E and Risau W: Hypoxia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor Expression Precedes Neovascularisation after Cerebral Ischemia. *Am J Pathol* 156(3): 965-76, 2000
114. Marti HJH and Risau W: Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15809-14, 1998
115. Masuda Y, Shimizu A, Mori T, Ishiwata T, Kitamura H, Ohashi R, Ishizaki M, Asano G, Sugisaki Y and Yamanaka N: Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. *Am J Pathol* 159: 599-608, 2001
116. Matsumoto K and Kanmatsuse K: Elevated vascular endothelial growth factor levels in the urine of patients with minimal-change nephrotic syndrome. *Clin Nephrol* 55: 269-74, 2001
117. Meyer KC, Cardoni AL, Xiang Z, Cornwell RD and Love RB: Vascular Endothelial Growth Factor in Human Lung Transplantation. *Chest* 119: 137-43, 2001
118. Milici A, Watrous N, Stukenbrok H and Palade G: Transcytosis of albumin in capillary endothelium. *J Cell Biol* 105: 2603-12, 1987

119. Minchenko A, Bauer T, Salceda S and Caro J: Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* 71: 374-79, 1994
120. Müller M und Mitarbeiter: *Chirurgie für Studium und Praxis. Medizinische Verlags- und Informationsdienste: 263-64, Auflage 2002/2003*
121. Nakagawa M, Emoto A, Hanada T, Nasu N, and Nomura Y: Tubulogenesis by microvascular endothelial cells is mediated by vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal cell carcinoma. *Br J Urol* 79: 681-87, 1997
122. Nakajima M, DeChavigny A, Johnson CE, Hamada J, Stein CA and Nicholson GL: Suramin. A potent inhibitor of melanoma heparanase and invasion. *J Biol Chem* 266(15): 9661-66, 1991
123. Namiki A, Brogi E, Kearney M, Kim EA, Wu T, Couffinhal T, Varticovski L and Isner JM: Hypoxia Induces Vascular Endothelial Growth Factor in Cultured Human Endothelial Cells. *J Biol Chem* 270(52): 31189-95, 1995
124. Nogue S, Miyazaki M, Kobayashi N, Saito T, Abe K, Saito H, Nakane P, Nakanishi Y and Koji T: Induction of apoptosis in ischemia-reperfusion model of mouse kidney: possible involvement of Fas. *J Am Soc Nephrol* 9(4): 620-31, 1998
125. Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Hayashi Y, Yamashita T, Yamashita J and Yamamoto H: Possible Participation of Autocrine and Paracrine Vascular Endothelial Growth Factors in Hypoxia induced Proliferation of Endothelial Cells and Pericytes. *J Biol Chem* 270(47): 28316-24, 1995
126. Olofsson B, Pajusola K, Kapainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana O, Pettersson RF, Alitalo K and Eriksson U: Vascular Endothelial Growth Factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2576-81, 1996
127. Otto K, Duchrow M, Broll R, Bruch HP and Strik MW: Expression of vascular endothelial growth factor mRNA and protein in human chronic renal allograft rejection. *Transplant Proc* 34(8): 3134-37, 2002
128. Parry RG, Gillespie KM and Mathieson PW: Effects of type 2 cytokines on glomerular epithelial cells. *Exp Nephrol* 9: 275-83, 2001
129. Pedram A, Razandi M, Hu RM and Levin ER: Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. *J Biol Chem* 272(27): 17097-103, 1997
130. Pepper MS, Ferrara N, Orci L and Montesano R: Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 181: 902-6, 1991
131. Peters KG, de Vries C and Willims LT: Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8915-19, 1993
132. Pick E, Krejci J, Cech K and Turk JL: Interaction between 'Sensitized Lymphocytes' and Antigen In vitro. I. The release of a skin reactive factor. *Immunology* 17: 741-67, 1969
133. Pilmore HL, Eris JM, Painter DM, Bishop GA and McCaughan GW: Vascular endothelial growth factor in human chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 67(6): 929-33, 1999

134. Plouët J and Moukadiri H: Characterization of the Receptor to Vasculotropin on Bovine Adrenal Cortex-derived Capillary Endothelial Cells. *J Biol Chem* 265(36): 22071-074, 1990
135. Plouët J, Schilling J and Gospodarowicz D: Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *The Embo J* 8(12): 3801-06, 1989
136. Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I, Keshet E and Neufeld G: VEGF₁₄₅, a secreted Vascular Endothelial Growth Factor Isoform That Binds to Extracellular Matrix. *J Biol Chem* 272: 7151-58, 1997
137. Qu-Hong, Nagy JA, Senger DR, Dvorak HF and Dvorak AM: Ultrastructural localization of Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor (VPF/VEGF) to the abluminal plasma membrane and vesiculovacuolar organelles of tumor microvascular endothelium. *J Histochem Cytochem* 43(4): 381-89, 1995
138. Rabb H, Mendiola CC, Saba SR, Dietz JR, Smith CW, Bonventre JV and Ramirez G: Antibodies to ICAM-1 protect kidneys in severe ischemic reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 211(1): 67-73, 1995
139. Ratych RE, Bulkley GB and Williams GM: Ischemia/Reperfusion injury in the kidney. *Prog Clin Biol Res* 224: 263-89, 1986
140. Roberts WG and Palade GE: Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by Vascular Endothelial Growth Factor. *J Cell Science* 108: 2369-79, 1995
141. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR and Anderson RG: Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68: 673-82, 1992
142. Schumer M, Colombel MC, Swaczuk IS, Gobé G, Connor J, O'Toole KM, Olsson CA, Wise GJ and Buttyan R: Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol* 40: 831-39, 1992
143. Schumpelick V, Bleese NM und Mommsen U: *Chirurgie*. Enke Verlag, 4., neu bearbeitete Auflage 1999.
144. Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, Feder J and Dvorak HF: Purification and NH₂-Terminal Amino Acid Sequence of Guinea Pig Tumor-secreted Vascular Permeability Factor. *Cancer Research* 50: 1774-78, 1990
145. Senger DR, Perruzzi CA, Feder J and Dvorak HF: A Highly Conserved Vascular Permeability Factor Secreted by a Variety of Human and Rodent Tumor Cell Lines. *Cancer Research* 46(11): 5629-32, 1986
146. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS and Dvorak HF: Tumor Cells Secrete a Vascular Permeability Factor That Promotes Accumulation of Ascites Fluid. *Science* 219: 983-85, 1983
147. Shabazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV and Harden PN: Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 13: 260-64, 2002
148. Shima DT, Deutsch U and D'Amore PA: Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. *Febs Letters* 370: 203-08, 1995
149. Shweiki D, Itin A, Soffer D and Keshet E: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843-45, 1992

150. Simon M, Gröne HJ, Jöhren O, Kullmer J, Plate KH, Risau W and Fuchs E: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in human renal ontogenesis and in adult kidney. *Am J Physiol* 268: F240-50, 1995
151. Sioussat TM, Dvorak HF, Brock TA and Senger DR: Inhibition of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) with antipeptide antibodies. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 301: 15-20, 1993
152. Sobel A, Heslan JM, Branellec A and Lagrue G: Vascular permeability factor produced by lymphocytes of patients with nephrotic syndrome. *Adv Nephrol Necker Hosp* 10: 315-32, 1981
153. Sobel AT, Branellec AI, Blanc CJ and Lagrue GA: Physicochemical characterization of a Vascular Permeability Factor produced by con a-stimulated human lymphocytes. *J Immun* 119(4): 1230-1234, 1977
154. Soker S, Svahn C.M. and Neufeld G: Vascular endothelial growth factor Ischämie inactivated by binding to α 2-makroglobulin and the binding is inhibited by heparin. *J Biol Chem*, 268(11): 7685-91, 1993
155. Solez K, Axelsen R, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, Croker BP, Droz D, Dunnill MS, Halloran PF, Häyry P, Jennette JC, Keown PA, Marcussen N, Mihatsch MJ, Morozumi K, Myers BD, Nast CC, Olsen S, Racusen LC, Ramos EL, Rosen S, Sachs DH, Salomon DR, Sanfilippo F, Verani R, von Willebrand E and Yamaguchi Y: International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 44: 411-22, 1993
156. Stein I, Itin A, Einat P, Skaliter R, Grossman Z, Keshet E: Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Mol Cell Biol* 18: 3112-19, 1998
157. Stein I, Neeman M, Shweiki D, Itin A and Keshet E: Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol Cell Biol* 15: 5363-68, 1995
158. Summers WK and Jarrison RL: The no-reflow phenomenon in renal ischemia. *Lab Invest* 25: 635-43, 1971
159. Taghavi S, Abraham D, Riml P, Paulus P, Schäfer R, Klepetko W and Aharinejad S: Co-expression of Endothelin-1 and Vascular Endothelial Growth Factor Mediates Increased Vascular Permeability in Lung Grafts Before Reperfusion. *J Heart Lung Transpl* 21(5): 600-03, 2002
160. Takahashi A, Sasaki H, Sun Jim K, Tobisu KI, Kakizoc T, Tsukamoto T, Kumamoto Y, Sugimura T and Terada M: Markedly increased amounts of messenger RNAs for vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in renal cell carcinoma associated with angiogenesis. *Cancer Res* 54: 4233-4237, 1994
161. Takahashi T, Shirasawa T, Miyake K, Yahagi Y, Maruyama N, Kasahara N, Kawamura T, Matsumura O, Mitarai T and Sakai O: Protein Tyrosine Kinases expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: Flt-1 and VEGF expression in renal mesangial cells. *Biocem Biophys Res Commun* 209(1): 218-226, 1995

162. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC and Abraham JA: The Human Gene for Vascular Endothelial Growth Factor – Multiple Protein Forms Are Encoded Through Alternative Exon Splicing. *J Biol Chem* 266(18): 11947-54, 1991
163. Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, Crisp T, Fiddes JC and Abraham JA: Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 165(3): 1198-206, 1989
164. Toledo-Pereyra LH: Definition of reperfusion injury in transplantation. *Transplantation* 43(6): 931-32, 1987
165. Torras J, Bordalba JR, Seron D, Moliner R, Carrera M, Valles J, Martinez-Castelao A, Alsina J and Grino JM: Protective effect of the PAF antagonist BN 52021 in an experimental renal warm ischemia model. *Transpl Int* 6(4): 236-8, 1993
166. Tuder RM, Flook BE and Voelkel NF: Increased Gene Expression for VEGF and the VEGF Receptor KDR/Flk and Flt in Lungs Exposed to Acute or to Chronic Hypoxia. Modulation of Gene Expression by Nitric Oxide. *J Clin Invest* 95: 1798-1807, 1995
167. Tufro-McReddie A, Norwood VF, Aylor KW, Botkin SJ, Carey RM and Gomez RA: Oxygen regulates vascular endothelial growth factor-mediated vasculogenesis and tubulogenesis. *Dev Biol* 183: 139-49, 1997
168. Uchida K, Uchida S, Nitta K, Yumura W, Marumo F and Nihei H: Glomerular endothelial cells in culture express and secrete vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol* 266: F81-88, 1994
169. Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA and Amento EP: Vascular Endothelial Growth Factor Induces Interstitial Collagenase Expression in Human Endothelial Cells. *J Cell Physiol* 153: 557-62, 1992
170. Vaisman N, Gospodarowicz N and Neufeld G: Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 265(32): 19461-66, 1990
171. Vannay Á, Fekete A, Müller V, Strehlau J, Viklicky o, Veres T, Reusz G, Tulassay T and szabó AJ: Effects of histamine and the H2 Receptor Antagonist Ranitidine on Ischemia-Induced Acute Renal Failure: Involvement of IL-6 and Vascular Endothelial Growth Factor. *Kidney Blood Press Res* 27: 105-13, 2004₁
172. Vannay Á, Fekete Andrea, Ádori C, Tóth T, Losonczy G, László L, Vásárhelyi B, Tulassay T and Szabó A: Divergence of renal VEGF mRNA expression and protein level in postischemic rat kidneys. *Exp Physiol*. 89(4): 435-44, 2004₂
173. Vasile E, Qu-Hong, Dvorak HF and Dvorak AM: Caveolae and Vesiculo-Vacuolar Organelles in Bovine Capillary Endothelial Cells Cultured with VPF/VEGF on Floating Matrigel-collagen Gels. *J Histochem Cytochem* 47: 159-67, 1999
174. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M and Persico MG: Assignment of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene to Human Chromosome 6p21.3. *Circulation* 93(8): 1493-95, 1996
175. Wang GL and Semenza GL: Desferrioxamin induces Erythropoietin Gene Expression and Hypoxia-Inducible Factor 1 DNA-Binding Activity: Implications for Models of Hypoxia Signal Transduction. *Blood*, 82(12): 3610-15, 1993
176. Wei MH, Popescu NC, Lerman MI, Merrill MJ and Zimonjic DB: Localization of the human vascular endothelial growth factor gene, VEGF, at Chromosome 6p12. *Hum Genet* 97: 794-97, 1996

177. Weight SC, Bell PRF and Nicholson ML: Renal ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 83: 162-70, 1996
178. Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320: 365-71, 1989
179. Zachary I: Vascular Endothelial Growth Factor: How it transmits its signal. *Exp Nephrol* 6: 480-87, 1998
180. Zhou W, Farrar CA, Abe K, Pratt JR, Marsh JE, Wang Y, Stahl GL and Sacks SH: Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 105(10): 1363-71, 2000

VII. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIF	apoptosis inducing factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary desoxyribonucleid acid
CMK86	Eigenname einer Leukämiezelllinie
cmyc	Eigenbezeichnung eines Onkogens
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
ERK	extrazellulär signalregulierte Kinase
FGF	fibroblast growth factor
Flk	fetal liver kinase
Flt-1	fms-like tyrosine kinase
Fas	Eigenname eines Antigens
GC reich	reich an Guanin und Cytosin
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosin-Triphosphat
HEL	Eigenname einer Leukämiezelllinie
HES	Hydroxyethylstärke
HIF	hypoxia inducible factor
HRE	hypoxia response element
HT 29	Eigenname einer Zelllinie des Colonkarzinoms
HUR	Eigenname eines RNA-bindenden Proteins
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP3	Inositol-Tri-Phosphat
kDa	kilo Dalton
KDR	kinase insert domain-containing receptor
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	mitogen activated protein kinase
Mg ²⁺	zweiwertiges Magnesium
mRNA	messenger ribonucleid acid
NO	Stickstoffmonoxid

O.D.	optische Dichte
PAF	platelet activating factor
PC-12	Eigenname einer Zelllinie des Phäochromozytoms
PDGF	platelet-derived growth factor
pg/ml	Picogramm pro Milliliter
PLC- γ	Phospholipase C- γ
PIGF	placenta growth factor
pM	picoMol
PMA	Phorbolmyristataacetat
SF21	Eigenname einer für die Herstellung des VEGF-Elisa genutzten Zelllinie
SAPK	streß-aktivierte Proteinkinase
Tbl.	Tabelle
TEA	Thrombendarteriektomie
TGF- β	transforming growth factor β
TNF- α	tumor necrosis factor α
VEGF	vascular endothelial growth factor
VPF	vascular permeability factor
VVO	Vesiculo vacuoläre Organelle

VIII. Danksagung

Zum Abschluß dieser Arbeit möchte ich mich bedanken bei:

Herrn Priv. Doz. Dr. med. M. Strik für die Überlassung des Themas, die freundliche Betreuung und Förderung bei der Durchführung, und die Ratschläge und geduldige Unterstützung bei der Verfassung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. H.-P. Bruch für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im chirurgischen Forschungslabor.

Herrn Prof. Dr. med. R. Broll für das Überlassen des Arbeitsmaterials und allen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern im chirurgischen Forschungslabor für die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfe, Tips und Tricks bei der Bearbeitung und Analyse der Blutproben.

Dem Team der Station 19T und 15b für ihre beispiellose Unterstützung und Geduld bei den zu organisierenden Blutentnahmen.

Herrn Priv. Doz. Dr. rer. physiol. H.-J. Friedrich für die freundliche Beratung bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit.

Meiner Familie für ihre Liebe, Geduld und Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit.

IX. Lebenslauf

Persönlich Daten:

Name:	Jacobs
Vorname:	Maren
Geburtsdatum:	15. Februar 1977
Geburtsort:	Detmold
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung:

1984-88	Grundschule Bachschule in Detmold
1988-96	Christian-Dietrich-Grabbe-Gymnasium Detmold
1996	Abitur

Medizinstudium:

Oktober 1996	Beginn des medizinischen Studiums an der Medizinischen Universität zu Lübeck
August/Sept. 1998	Physikum
August 1999	1. Staatsexamen
August/Sept. 2001	2. Staatsexamen
Dezember 2002	3. Staatsexamen
01.01.-30.09.2003	Ärztin im Praktikum in der Medizinischen Klinik I des Klinikums Osnabrück
seit 01.10.2003	Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik des Regionalspitals Surselva in Ilanz - Schweiz

Dissertation:

April 1999 – Februar 2005

Inhalte dieser Dissertation wurden vorgestellt:

1. Auf der **166. Tagung nordwestdeutscher Chirurgen** am 08.12.2000 in Hamburg

Vortrag: Hat der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) einen Einfluß auf den Reperfusionsschaden nach Nierentransplantation?

(H. Braasch, M. Jacobs, Dr. med. M. Strik, Prof. Dr. med. H.-P. Bruch)

2. Auf den **5. Chirurgischen Forschungstagen** vom 08.11.-10.11.01 in Halle

Poster (P34): Beeinflußt der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) den Reperfusionsschaden bei Nierentransplantation?

(H. Braasch, M. Jacobs, Dr. med. M. Strik, Prof. Dr. med. H.-P. Bruch)