

### 3. Eigene Untersuchungen

#### 3.1. Material und Methoden

##### 3.1.1. Untersuchungsmaterial

Das Untersuchungsmaterial wurde bei Sektionen von weiblichen und männlichen Cynomolgen in der Pathologie der Firma Schering AG, Berlin, gewonnen. Die Sektionen wurden im Rahmen regulatorisch veranlaßter toxikologischer Versuchsreihen der Firma Schering AG, Berlin, durchgeführt, wobei das in dieser Arbeit verwendete Untersuchungsmaterial von den Tieren stammt, die während der Studien Placebo erhielten.

Dabei wurden Gewebeproben von folgenden Organen entnommen (die Organauswahl war aus arbeitstechnischen Gründen von Seiten der Pathologie her eingeschränkt):

- Bauchspeicheldrüse
- Darm: - Zwölffingerdarm
  - Krummdarm
  - Wurmfortsatz des Blinddarmes
- Gehirn
- Haut
- Herz
- Leber
- Luftröhre
- Lymphknoten (Ln. axillaris)
- Magen
- Milz
- Niere (Rinde)
- Schilddrüse
- Thymus

##### 3.1.2. Verarbeitung der Gewebeproben

Um eine optimale Konservierung zu gewährleisten, wurde das Gewebe in Form kleiner Würfel (ca. 0,5 x 0,5 x 0,5 cm) schockgefroren, wodurch die Bildung größerer Eiskristalle vermieden werden konnte. Dazu wurden die Gewebeproben auf Korkstückchen aufgebracht, mit Tissue Tek (Miles Inc., USA) eingebettet und dann für ca. 5 sec. in flüssigen Stickstoff (-196°C) gehalten. Anschließend wurden die Proben in Alufolie eingewickelt und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

### *3.1.2.1. Anfertigung von Gewebeschnittpräparaten*

Von den schockgefrorenen Gewebestücken wurden Kryostatschnitte angefertigt. Das Schneiden erfolgte auf einem Rotationsmikrotom in einem Kryostaten (Fa. Leica, Nussloch) bei Arbeitstemperaturen von -21 bis -28°C. Die 10 µm dicken Schnitte wurden an der Mikrotomklinge mit Super Frost Plus Objektträgern (Fa. Menzel-Gläser) abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung in Objektträgerkästen (Fa. neoLab, Heidelberg) bei -80°C aufbewahrt.

### 3.1.3. Immunhistochemische Methoden

#### *3.1.3.1. Prinzip der Enzym-Immunkomplex-Methoden*

In der vorliegenden Arbeit wird ausschließlich eine immunenzymatische Färbemethode zum spezifischen Nachweis von Antigenen in Gewebeschnitten eingesetzt. Andere denkbare Untersuchungsmethoden, wie z.B. die Immunofluoreszenz unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Ak und der Immunoassay unter Verwendung mit radioaktiven Isotopen markierter Ak kommen hier nicht zur Anwendung.

#### *3.1.3.2. Zwei-Schritt-indirekte Methode*

Bei dieser Technik bindet der spezifische, unkonjugierte Primärantikörper (monoklonaler Ak oder polyklonales Antiserum) an das Gewebeantigen. Anschließend wird ein zweiter enzymmarkierter Ak, der gegen die leichten und schweren Ketten des Primärantikörpers (jetzt als Antigen zu betrachten) gerichtet ist, aufgetragen. Der zweite Ak muß gegen Immunglobuline der Spezies gerichtet sein, aus der der Primärantikörper gewonnen wurde (NAISH, 1989).

Danach erfolgt der Enzymnachweis mittels histochemischer Methode. Als Enzym fungiert die alkalische Phosphatase (Molekulargewicht 100 kD). Sie hydrolysiert das Substrat Naphtholphosphatester zu Phenolkomponenten und Phosphaten. Die enzymatische Reaktion kann durch den Einsatz von Chromogenen sichtbar gemacht werden. Die Phenole kuppeln mit dem farblosen Diazoniumsalz Fast Red TR (Chromogen) und bilden so einen unlöslichen Azofarbstoff. Das rote Reaktionsprodukt kann dann lichtmikroskopisch identifiziert werden. Hintergrundfärbung durch mögliche alkalische Phosphatase im Gewebe (endogene AP) wird durch den Zusatz von Levamisol unterdrückt (NAISH, 1989).

### 3.1.3.3. Primärantikörper

Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler Ak verwendet.

Der verwendete monoklonale Ak 2-10-1 wurde von Menrad et al. (1997) hergestellt. Mab 2-10-1 besitzt eine hohe Spezifität für KDR in Geweben vom Menschen und Primaten. Der Ak bindet an ein Epitop innerhalb der extrazellulären Domänen 6 und 7 des KDR, so daß er alle Rezeptoren erkennt, unabhängig davon, ob sie VEGF gebunden haben oder nicht.

### 3.1.3.4. Versuchsdurchführung

a) Durchführung der 2-Schritt-Methode mit Formalinfixierung der Gewebeschnitte

Während den Inkubationen liegen die Objektträger auf einem feuchten Tuch.

Die Gewebeschnitte werden wie folgt behandelt (MENRAD et al., 1997):

1. Fixation: 4%iges Formaldehyd (Fa. Merck, Darmstadt) in PBS (s. Anhang, S.89 ff) + 0,4 g alpha-D-Glucose (Fa. Serva, Heidelberg)/ 100ml ; 10 min. bei RT
2. Waschen: 3 x 5 min. in PBS
3. Überschichten mit dem spezifischen Primärantikörper: 20 µl/ ml in PBS, Zusatz von 10 % FCS; 60 min. bei 37°C
4. Waschen: 3 x 5 min. in PBS
5. Überschichten mit dem Sekundärantikörper (Alkaline Phosphatase-conjugated AffiniPure Goat Anti- Mouse IgG + IgM (H+L) Fa. dianova, Hamburg): 1:100 verdünnt in PBS, Zusatz von 10 % FCS; 60 min. bei 37°C
6. Waschen: 3 x 5 min. in PBS
7. Nachweis der Enzymreaktion mit Sigma *Fast Fast Red TR/ Naphthol AS-MX* Tabet-Set - 1 ml (Fa. Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, USA) 30 min.
8. Abstoppen der Farbreaktion in PBS
9. Wässern in Aq. dest., mit Hämalaun (Chroma- Gesellschaft, Köngen/N.) gegenfärben, 20 min. unter fließendem Aq. dest. bläuen, danach in Aq. dest. stellen
10. Eindecken mit Aquatex (Fa. Merck, Darmstadt)

b) Durchführung der 2-Schritt-Methode mit modifizierter Bouinfixierung der Gewebeschnitte

Während den Inkubationen liegen die Objektträger auf einem feuchten Tuch.

Die Gewebeschnitte werden wie folgt behandelt:

1. Fixation: modifizierten Bouinlösung (s. Anhang, S.89 ff), 10 min.
2. Waschen: Ethanol (Fa. Merck, Darmstadt), 85 %ig 4 min.; anschließend 3 x 5 min in Leitungswasser

Die folgenden Schritte entsprechen denen in der Durchführung unter a) 3.-10. (s.S.34).

### *3.1.3.5. Spezifitätskontrolle*

Bei allen immunologischen Reaktionen ist die Durchführung geeigneter Kontrollreaktionen zum Nachweis der Spezifität der angewendeten Methode wichtig.

Für positive Kontrollen wurde Gewebe verwendet, von dem bekannt ist, daß es das Antigen, gegen das der spezifische Primärantikörper gerichtet ist, enthält. In Anlehnung an SIMON et al. (1995) wurde für den Antikörper gegen KDR die Niere von Cynomolgen gewählt.

Durch die Anfertigung von Negativkontrollen können vorhandene unspezifische Farbreaktionen beurteilt und die eigentliche spezifische Anfärbung besser interpretiert werden. Bei den Negativkontrollen wurde anstelle des spezifischen Primärantikörpers PBS aufgetragen.

Um die Endothelspezifität von KDR zu überprüfen, wurde ein weiterer immunhistochemischer Nachweis geführt. Hierbei wurde der Rezeptor CD31, welcher auf EC vorkommt, mittels eines spezifischen Ak angefärbt. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach 3.1.3.4. (Konzentration des Primärantikörpers purified anti human CD31, PharMingen: 2µg/ml in PBS mit Zusatz von 2% FCS; Konzentration des Sekundärantikörpers Alkaline Phosphatase-conjugated AffiniPure Goat Anti- Mouse IgG + IgM (H+L), Fa. dianova, Hamburg: 1:200 verdünnt in PBS mit Zusatz von 2% FCS, s.S.34).

### *3.1.3.6. Auswertung und Dokumentation*

Die Gewebeschnitte wurden mittels eines Photomikroskopes (Axiphot, Fa. Zeiss, Oberkochen) beurteilt und die Ergebnisse unter Verwendung eines Farbfilmes 100 ASA (Fa. Kodak) dokumentiert.

## 3.2. Ergebnisse

### 3.2.1. Vorversuche zur Methodenetablierung für den Antikörper gegen den VEGF-Rezeptor KDR

Alle Vorversuche wurden an normalen Nierengewebe von Cynomolgen durchgeführt.

#### 3.2.1.1. Auswahl des Fixativs

Sowohl mit modifizierter Bouinlösung als auch mit Formalin wird eine gute Morphologie erzielt, da beide Fixative das Gewebe stabilisieren, ohne eine zu starke Schädigung hervorzurufen.

Bei beiden Fixationsmethoden läßt der getestete Antikörper eine immunhistochemische Reaktion erkennen, wobei die Intensität bei bouinfixierten Schnitten stärker ausgeprägt ist.

### 3.2.2. Immunhistochemischer Nachweis des KDR in Normalgewebe von Affen

Die Ergebnisse der durchgeführten Reaktionen zum Nachweis des VEGF-Rezeptors *KDR* in verschiedenen ausgewählten Normalgeweben von Affen ist in Tabelle 3 (s.S.37) dargestellt.

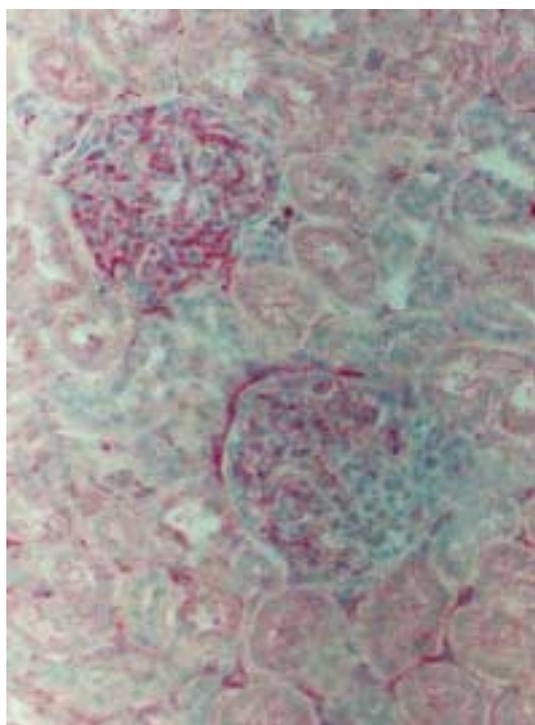
**Tab.3:** Lokalisation der Reaktionsprodukte immunhistochemischer Färbungen gegen den VEGF-Rezeptor *KDR* in Normalgeweben von Affen

Gewebetyp	angefärbte Strukturen	Intensität der Färbung
<i>a) Endothelien</i>	Endothelien der Gefäße (einschließlich geschlossener, gefensteter und offener Kapillaren) sind in allen untersuchten Organen angefärbt	+++
<i>b) epitheliales Gewebe</i>		
Bauchspeicheldrüse, endokrin	Langerhans'sche Inselzellen	+
Bauchspeicheldrüse, exokrin	Drüsenepithelien	+
	Tubuli der Ausführungsgänge	+
Luftröhre	Epithelzellen	+
Lymphknoten	Sinusendothel	+
	Retikulumzellen	+
Magen-Darm-Trakt	Mesothel	+
	Drüsenepithel	+
Milz	Mesothel	+
Niere	Tubuli der Hauptstücke	+ / ++
Thymus	Retikulumzellen	++
<i>c) nicht-epitheliales Gewebe</i>		
Binde- u. Stützgewebe	Lymphozyten	++
	Fibroblasten/Fibrozyten	+
	Chondroblasten	++
Muskelgewebe	Herzmuskelzellen	++
	glatte Muskelzellen in MDT	++

+ schwache Intensität der Färbung  
 ++ mittlere Intensität der Färbung  
 +++ starke Intensität der Färbung

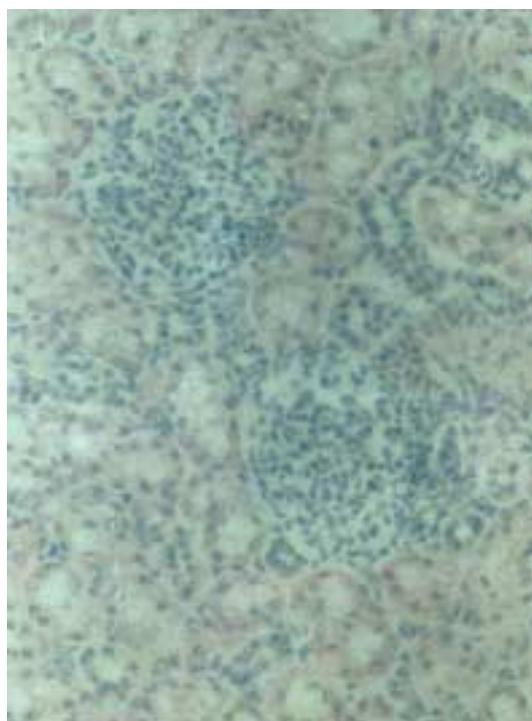
## Beschreibung der einzelnen Organe:

Die immunhistochemische Darstellung des KDR in der **Niere** zeigt eine starke rote Anfärbung der EC des Kapillarnetzes in den Nierenkörperchen (s. Abb. 4, 6). Im peritubulären Interstitium liegende Kapillaren erscheinen ebenfalls rot gefärbt (s. Abb. 4, 8). Auch die Tubuluszellen der Hauptstücke weisen eine schwache Färbung auf (s. Abb. 8). Im Vergleich zu dem immunhistochemischen Nierenpräparat des Endothelmarkers antiCD31 (s. Abb. 7, 9) weist die KDR-Färbung eine vielfältigere Verbreitung in dem Nierengewebe auf (Abb. s.S.38 u. 39).



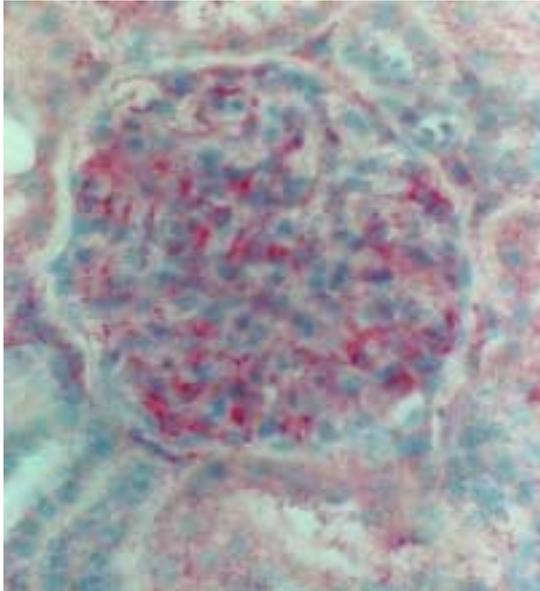
**Abb. 4: Niere, Darstellung des KDR**

Bouinfixierung, 200-fache Vergrößerung  
Aufsicht auf zwei Glomerula mit starker KDR-Positivität (= rot). In den Tubuli und in dem peritubulären Raum schwächere Anfärbungen.

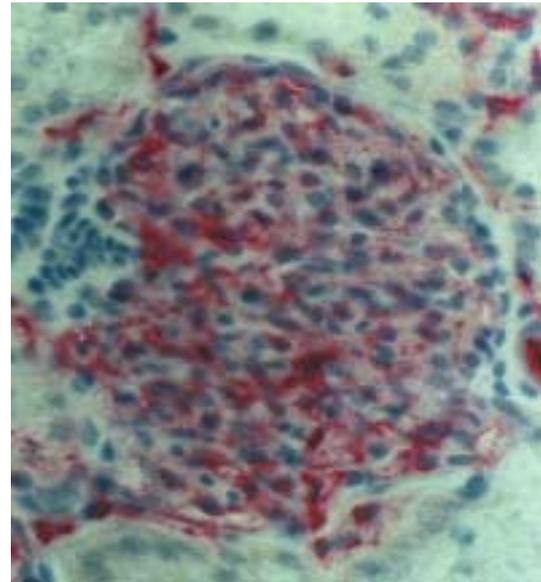


**Abb. 5: Niere, Negativkontrolle**

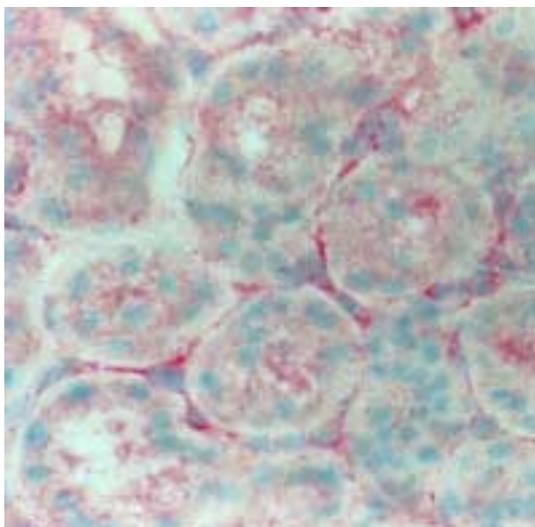
Bouinfixierung, 200-fache Vergrößerung  
Immunhistochemische Reaktion mit PBS-Puffer anstelle des Primärantikörpers 2-10-1. Die übrigen Arbeitsschritte der Färbemethode führen zu keiner gravierenden unspezifischen Anfärbung der histologischen Strukturen.



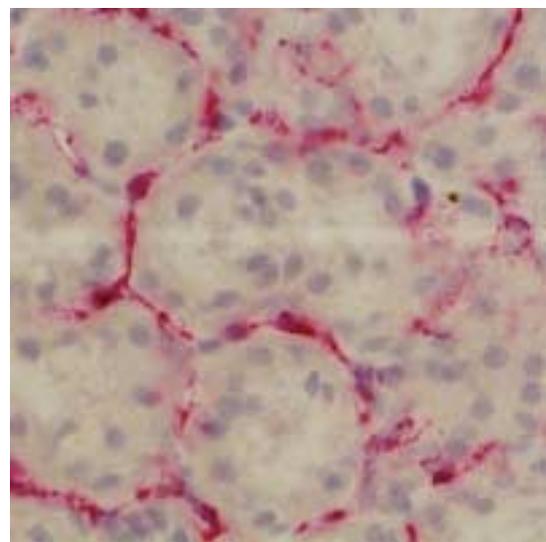
**Abb. 6: Niere, Darstellung des KDR**  
 Bouinfixierung, 400-fache Vergrößerung  
 In dem Glomerulum zeigt sich eine starke Anfärbung der EC.



**Abb. 7: Niere, Spezifitätskontrolle**  
 Bouinfixierung, 400-fache Vergrößerung  
 Darstellung der Endothelien (rot) mittels immunohistochemischer Reaktion mit dem Endothelmarker antiCD31 anstelle des Ak 2-10-1.

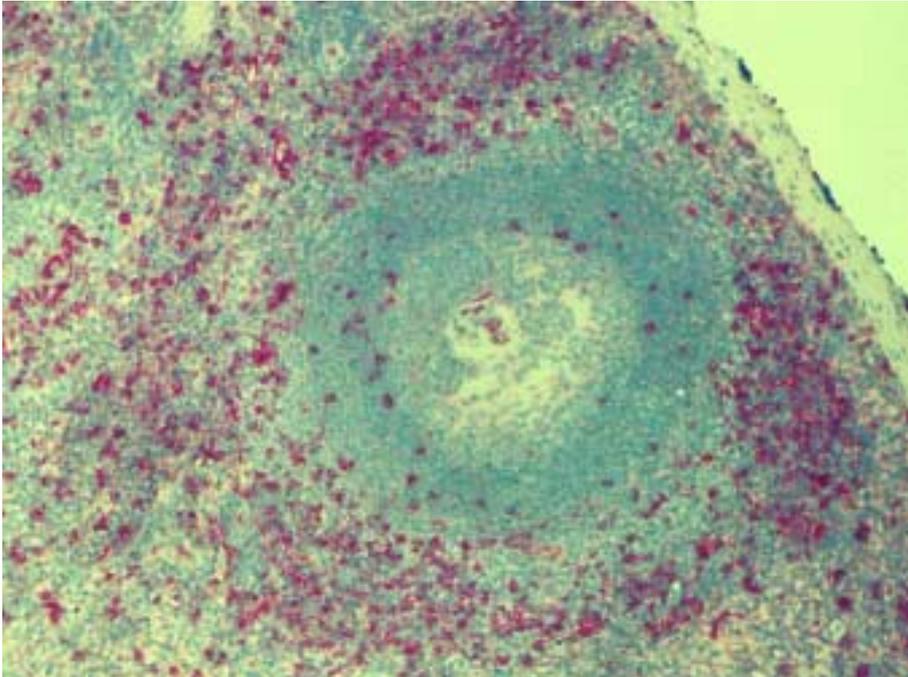


**Abb. 8: Niere, Darstellung des KDR**  
 Bouinfixierung, 400-fache Vergrößerung  
 Darstellung der KDR-positiven peritubulären Kapillaren sowie der Tubuli der Hauptstücke.

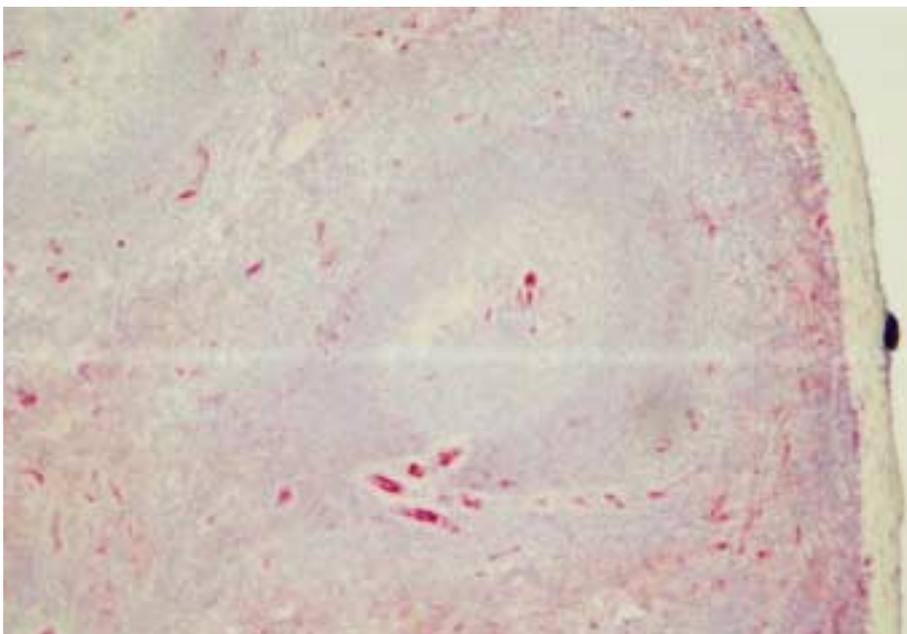


**Abb. 9: Niere, Spezifitätskontrolle**  
 Bouinfixierung, 400-fache Vergrößerung  
 Darstellung der peritubulären Kapillaren mit dem Marker antiCD31.

In der **Milz** stellt sich v.a. die rote Pulpa auf Grund ihrer hohen Gefäßdichte KDR positiv dar. Dabei erscheint das Färbeergebnis in der roten Milzpulpa, welches mit dem Antikörper 2-10-1 erzielt wurde, stärker, als das, welches mit dem Endothelmarker antiCD31 erreicht wurde. Aber auch im Zytoplasma von Lymphozyten in der weißen und roten Milzpulpa sowie von Mesothelzellen der Kapsel findet sich eine schwache granuläre Färbung (s. Abb. 10, 11).

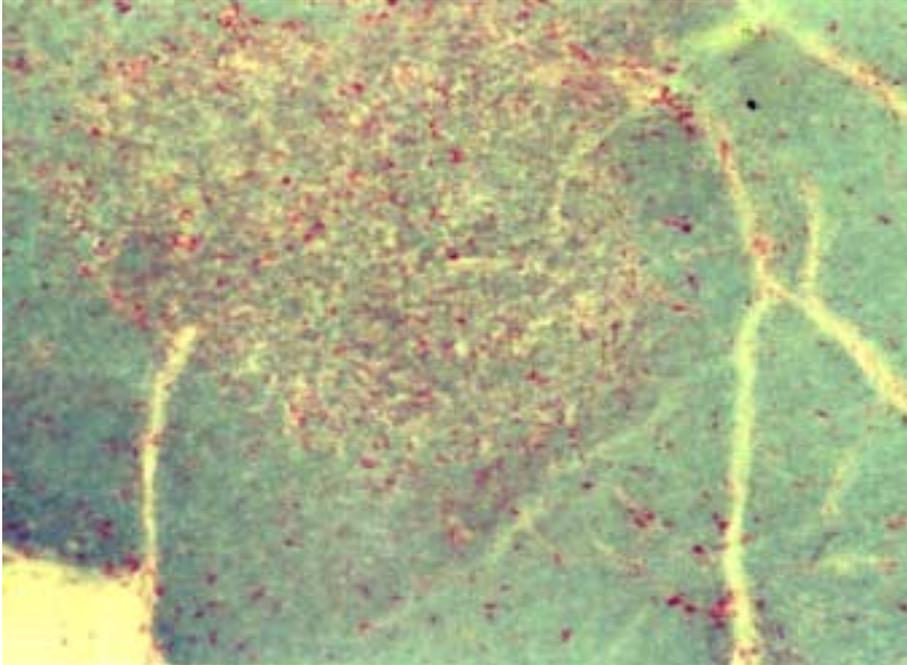


**Abb.10: Milz, Darstellung des KDR** Bouinfixierung, 100-fache Vergrößerung  
Aufsicht auf ein Milzfollikel in Nähe der Organkapsel. Im Vergleich zu der Endothelfärbung (s.Abb. 11) zeigt sich eine stärkere KDR-Positivität v.a. in der roten Milzpulpa.



**Abb.11: Milz, Spezifitätskontrolle** Bouinfixierung, 100-fache Vergrößerung  
Darstellung der Endothelien mit Hilfe des EC-Markers antiCD31. Die Abbildung zeigt weniger Strukturen, die eine Anfärbung aufweisen.

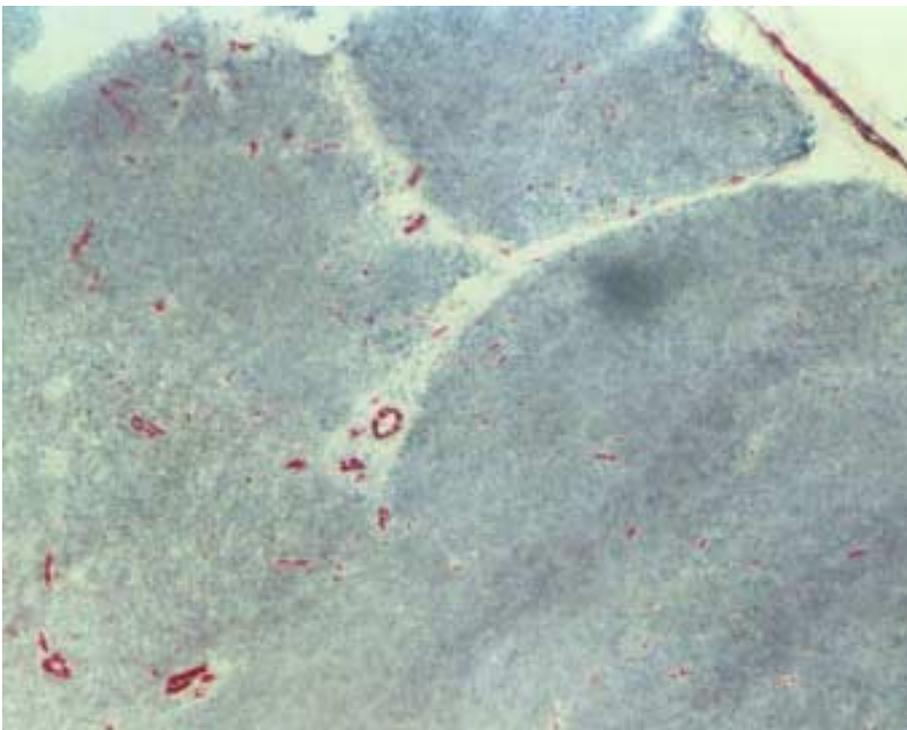
In der Übersicht stellt sich v.a. der Markbereich des **Thymus** mit seinen epithelialen Retikulumzellen positiv dar. Auch hier zeigt sich, wie bei der Milz, eine schwache Anfärbung des Lymphozytenplasmas. Im Interstitium findet sich eine starke Rotfärbung der EC der Kapillaren sowie eine nur schwache Färbung von Fibroblasten (s. Abb. 12, 13).



**Abb.12: Thymus, Darstellung des KDR**

Bouinfixierung,  
100-fache Vergrößerung

Aufsicht auf den stärker angefärbten Markbereich der Thymusläppchen. Es zeigen sich sowohl Kapillaren, aber auch Lymphozyten KDR positiv.

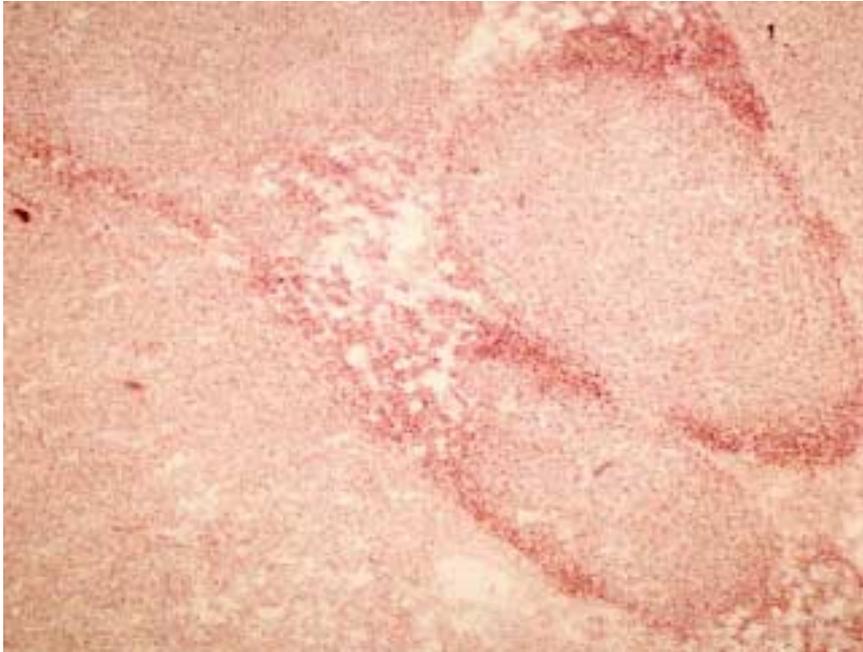


**Abb.13: Thymus, Spezifitätskontrolle**

Bouinfixierung,  
100-fache Vergrößerung

Darstellung der EC mit dem Ak antiCD31. Der Markbereich des Thymus zeigt neben den Kapillaren keine weiteren gefärbten Strukturen.

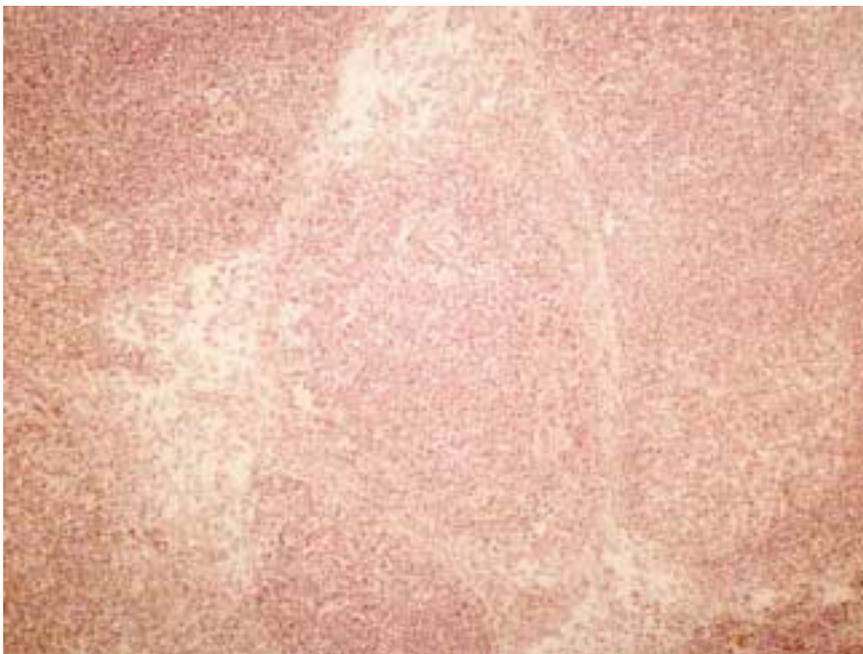
Auch in dem **Lymphknoten**, ein weiteres lymphatisches Organ, weisen, wie auch schon in der Milz und in dem Thymus, Lymphozyten eine KDR-Positivität auf. Desweiteren erscheinen Zellen im Sinusbereich rot gefärbt (s. Abb. 14, 15).



**Abb.14: Ln. axillaris, Darstellung des KDR**

Formalinfixierung,  
100-fache Vergrößerung

Die Lymphozytenkappen der Follikel sowie der Sinusbereich weisen eine Rotfärbung auf. Im Sinusbereich sind neben dem Sinusendothel auch Retikulumzellen und freie Lymphozyten angefärbt.



**Abb.15: Ln. axillaris, Negativkontrolle**

Formalinfixierung,  
100-fache Vergrößerung

Die Negativkontrolle mit PBS-Puffer anstelle des AK 2-10-1 zeigt in einigen Bereichen unspezifische Gewebefärbungen.

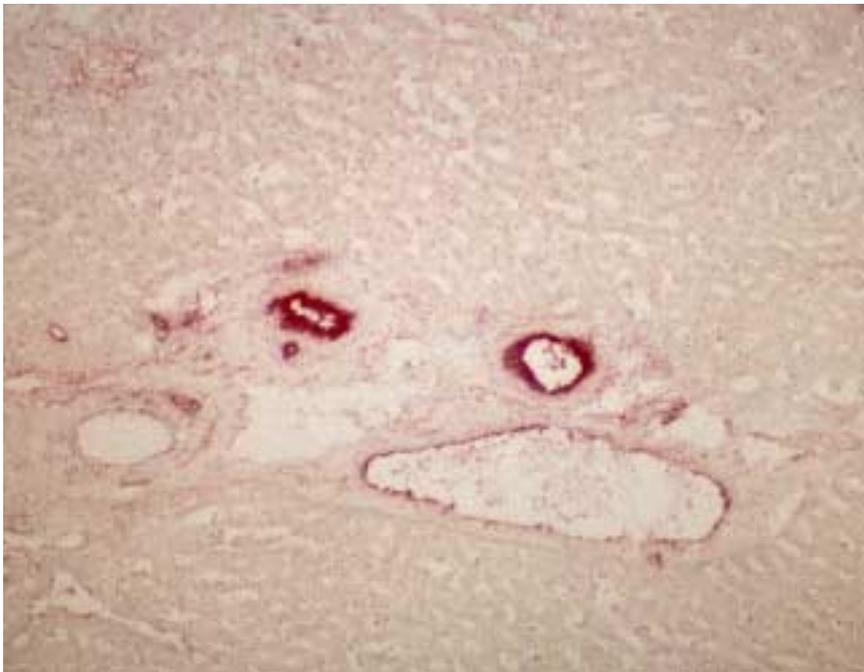
Bei der immunhistochemischen Färbung der **Leber** mit dem Ak 2-10-1 weist das diskontinuierliche Endothel der sinusoiden Kapillaren eine Rotfärbung auf (s. Abb. 16). Auffällig erscheint dabei der Vergleich mit dem Endothelmarker antiCD31. Die EC der Lebersinusoide bleiben hier ungefärbt (s. Abb. 17).



**Abb.16: Leber, Darstellung des KDR**

Formalinfixierung, keine Gegenfärbung mit Hämalan, 200-fache Vergrößerung

Zu erkennen sind die rot gefärbten Sinusendothelien der Leber. Die EC der größeren Gefäße im Trias bleiben ohne Anfärbung.

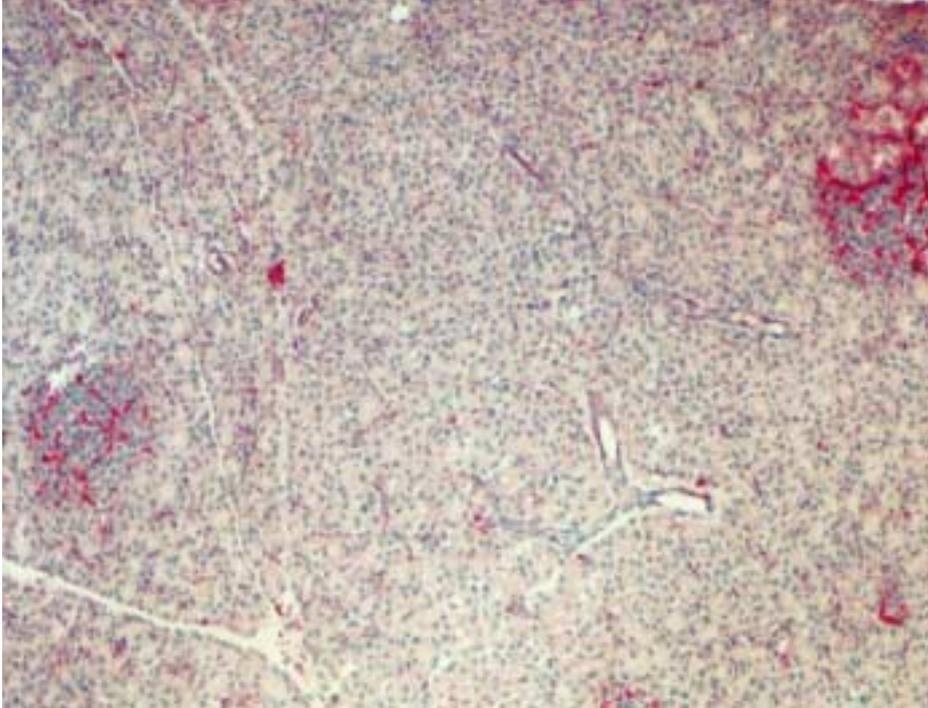


**Abb.17: Leber, Spezifitätskontrolle**

Formalinfixierung, 100-fache Vergrößerung

Bei der immunhistochemischen Färbung mit dem Marker antiCD31 zeigen die EC der Trias-Gefäße eine Rotfärbung. Die Sinusendothelien dagegen bleiben ungefärbt.

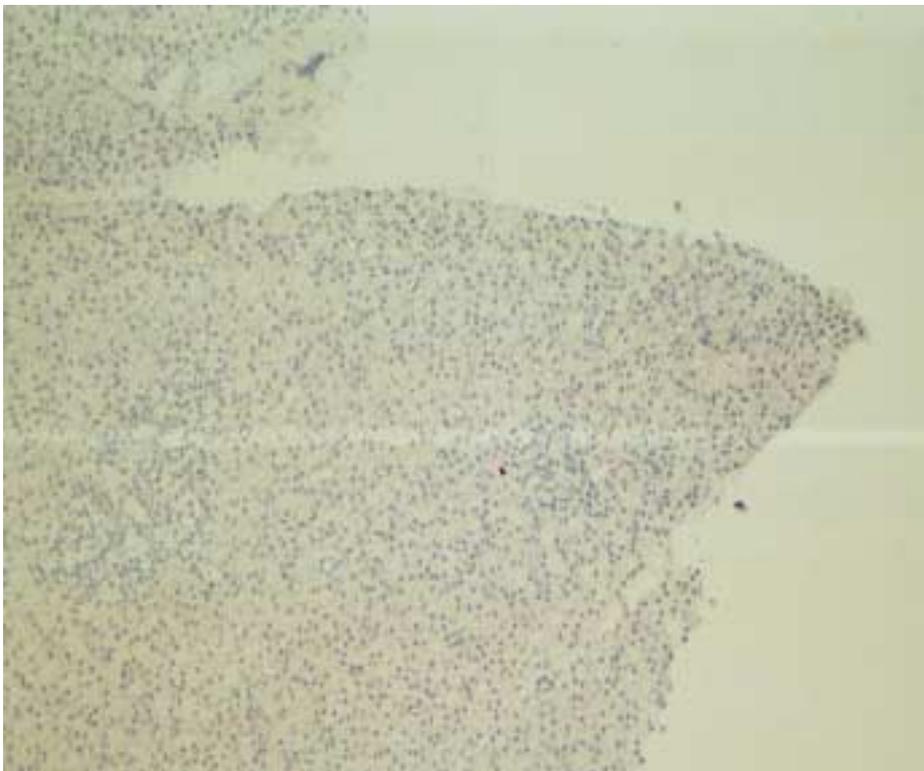
In der **Bauchspeicheldrüse** zeigen sich v.a. die endokrinen Anteile, die Langerhans'schen Inseln, KDR positiv. Die EC der Kapillaren sind auch hier wieder stark gefärbt. Aber auch der exokrine Anteil weist VEGF-Rezeptoren auf. So sind die Tubulusepithelien der Ausführungsgänge schwach bis mäßig rot gefärbt (s.Abb.18-21,s.S.44 u. 45).



**Abb.18:Pankreas  
Darstellung des  
KDR**

Bouinfixierung,  
100-fache Ver-  
größerung

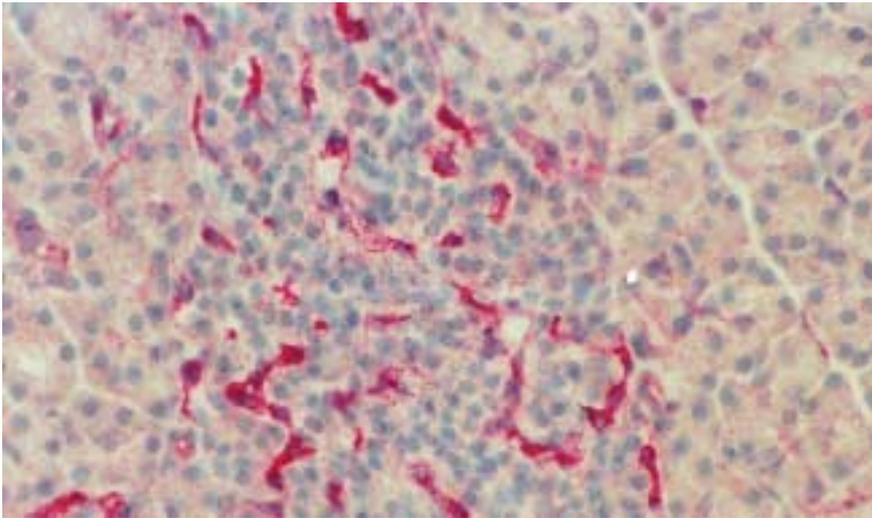
Die Kapillaren sind  
v.a. in den endo-  
krinen Arealen  
intensiv gefärbt.  
Die Tubu-  
lusepithelien wei-  
sen eine schwä-  
chere Rotfärbung  
auf.



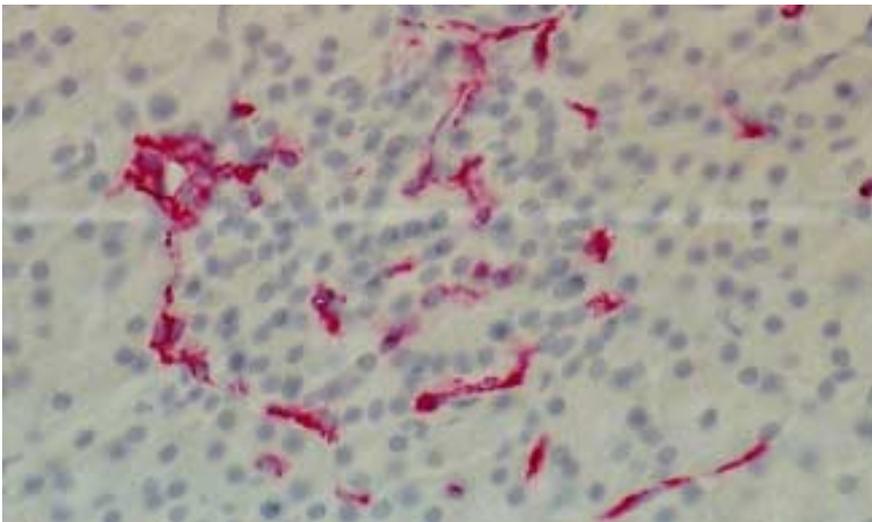
**Abb.19:Pankreas  
Negativkontrolle**

Bouinfixierung,  
100-fache Vergrö-  
ßerung

Immunhistochem.  
Reaktion mit PBS-  
Puffer anstelle des  
Primär-Ak 2-10-1.  
Es zeigen sich  
keine unspezifi-  
schen Anfärbun-  
gen der Gewebe-  
strukturen.



**Abb.20: Pankreas, Darstellung des KDR, Bouinfixierung, 400-fache Vergrößerung**  
Darstellung einer Langerhans'schen Insel: EC mit kräftiger KDR-Positivität und der Großteil der Inselzellen mit schwacher Rotfärbung.

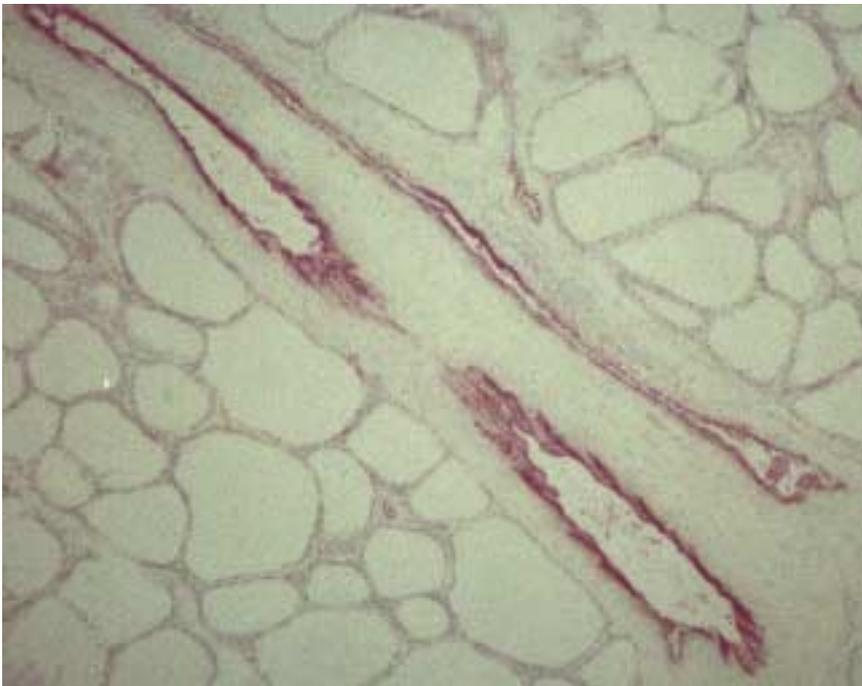


**Abb.21: Pankreas, Spezifitätskontrolle Bouinfixierung, 400-fache Vergrößerung**  
Darstellung der Kapillaren in einer Langerhans'schen Insel mit Hilfe des Endothelmarkers anti-CD31.

In der **Schilddrüse** zeigt sich ein weit verzweigtes rotes Netz. Es handelt sich dabei um die EC der gefensterten Kapillaren, die sich um die Schilddrüsenfollikel darstellen lassen (s. Abb. 22, 23).

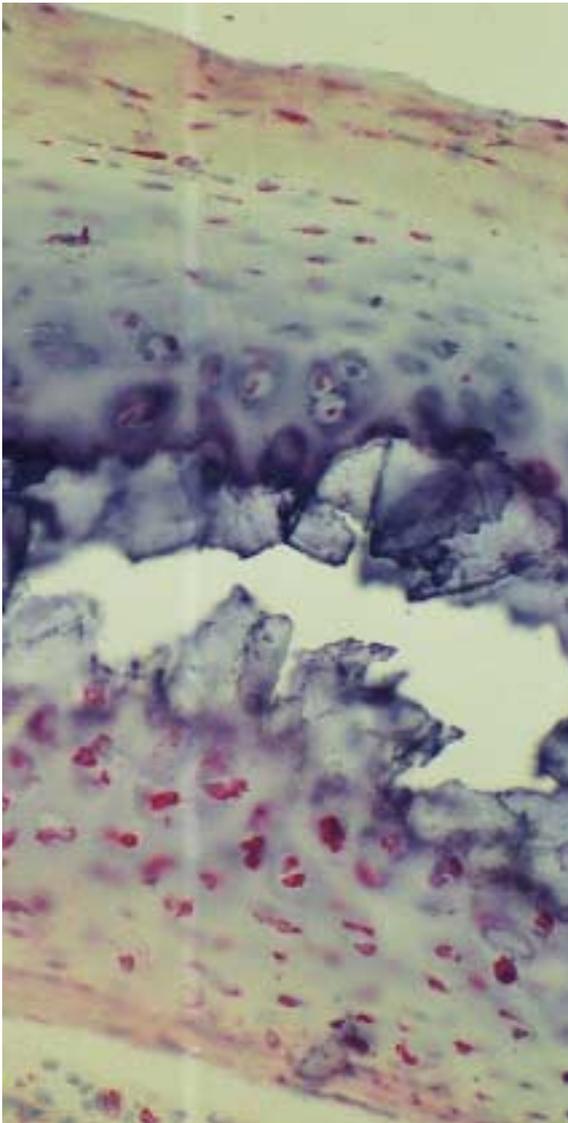


**Abb.22: Schilddrüse, Darstellung des KDR**  
Formalinfixierung,  
100-fache Vergrößerung  
Eine deutliche Rotfärbung weisen die EC der gefensterten Kapillaren im Schilddrüsenparenchym auf.

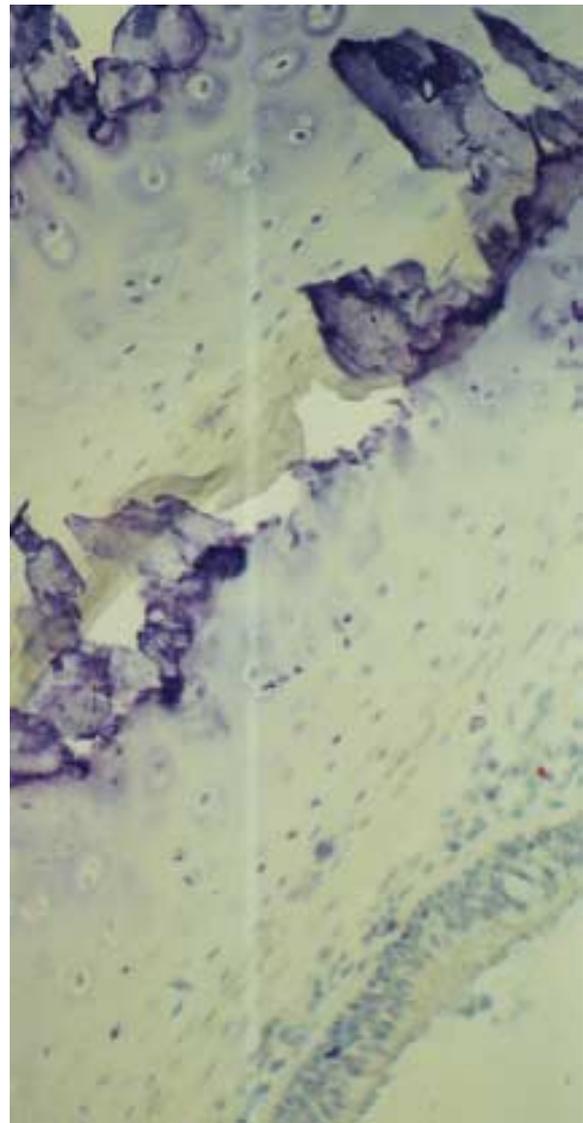


**Abb.23: Schilddrüse, Spezifitätskontrolle**  
Formalinfixierung,  
100-fache Vergrößerung  
Darstellung größerer Gefäße mit dem Marker antiCD31.

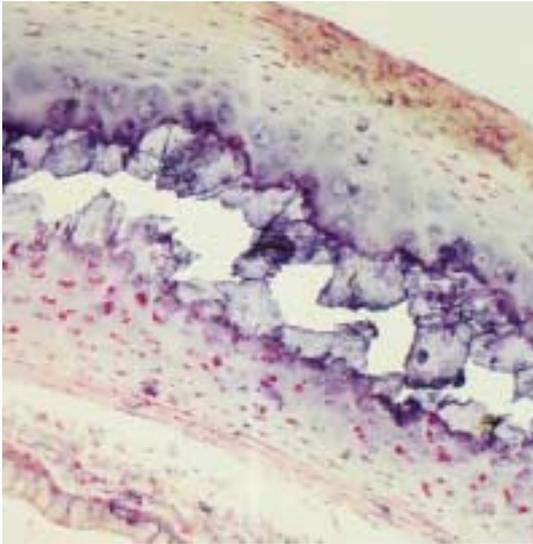
Eine Rotfärbung der Chondroblasten ist im Querschnitt der **Luftröhre** am auffälligsten. Hierbei weisen einige Chondroblasten eine starke, andere nur eine geringe bis keine Färbung auf. Eine weitere deutliche Anfärbung findet sich in den Fibroblasten und in den EC der Kapillaren. Das Luftröhrenepithel weist nur eine geringe Rotfärbung auf (s. Abb. 24-29, s.S.47 u. 48).



**Abb.24: Luftröhre, Darstellung des KDR**  
Bouinfixierung, 200-fache Vergrößerung  
Im Querschnitt der Luftröhre zeigt sich eine deutliche Rotfärbung der Chondrone.

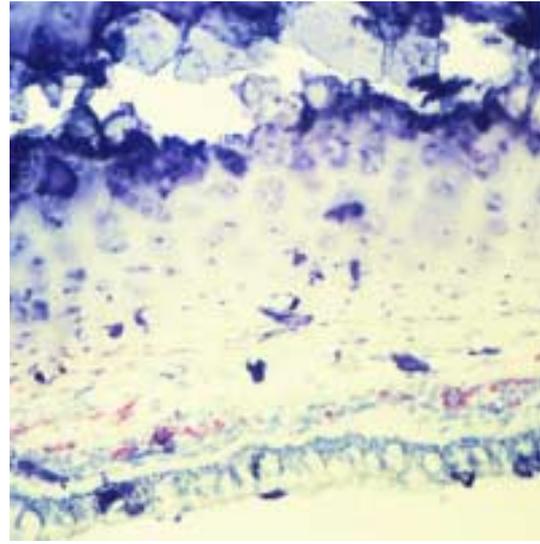


**Abb.25: Luftröhre, Negativdarstellung**  
Bouinfixierung, 200-fache Vergrößerung  
Im Querschnitt der Luftröhre ist keine un-spezifische Färbung sichtbar.



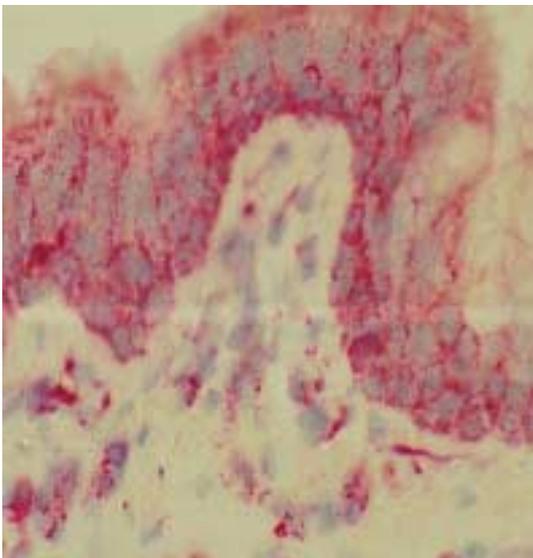
**Abb.26: Luftröhre, Darstellung des KDR**

Bouinfixierung, 100-fache Vergrößerung  
In der Übersicht zeigen sich die Chondrone sowie Kapillaren und das Epithel der Luftröhre rot gefärbt.



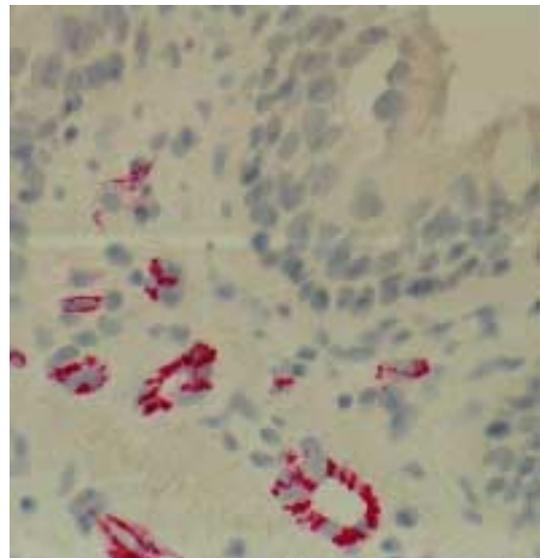
**Abb.27: Luftröhre, Spezifitätskontrolle**

Bouinfixierung, 100-fache Vergrößerung  
Mit Hilfe des EC-Markers antiCD31 sind nur die Kapillaren rot dargestellt.



**Abb.28: Luftröhre, Darstellung des KDR**

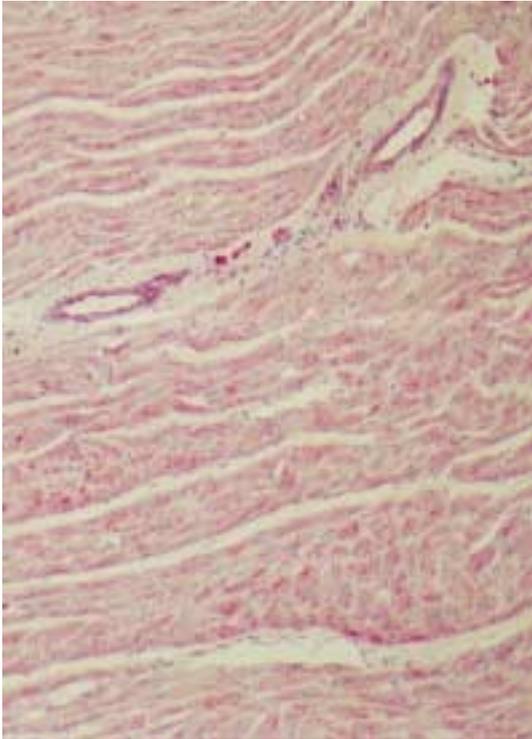
Bouinfixierung, 400-fache Vergrößerung  
Aufsicht auf das rot gefärbte Luftröhren-epithel.



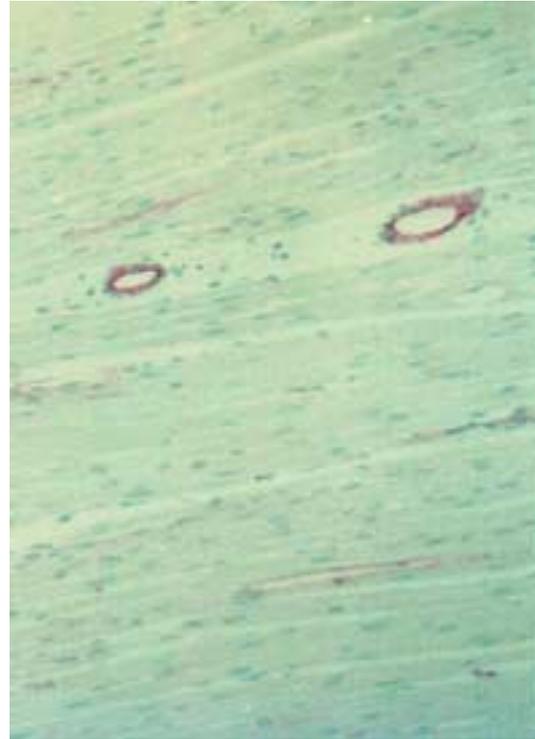
**Abb.29: Luftröhre, Spezifitätskontrolle**

Bouinfixierung, 400-fache Vergrößerung  
Mit Hilfe des EC-Markers antiCD31 werden nur die Kapillaren dargestellt.

Das **Herz** weist neben den rot gefärbten Kapillaren auch rot gefärbte Herzmuskelzellen auf. Dabei schwankt die Intensität der Färbung in den Muskelzellen stark. Vor allem in Kernnähe ist die Färbung deutlicher. Auch im Herzen finden sich zwischen den Muskelfasern rot gefärbte Fibrozyten wie auch schon in anderen Organen (s. Abb. 30, 31).

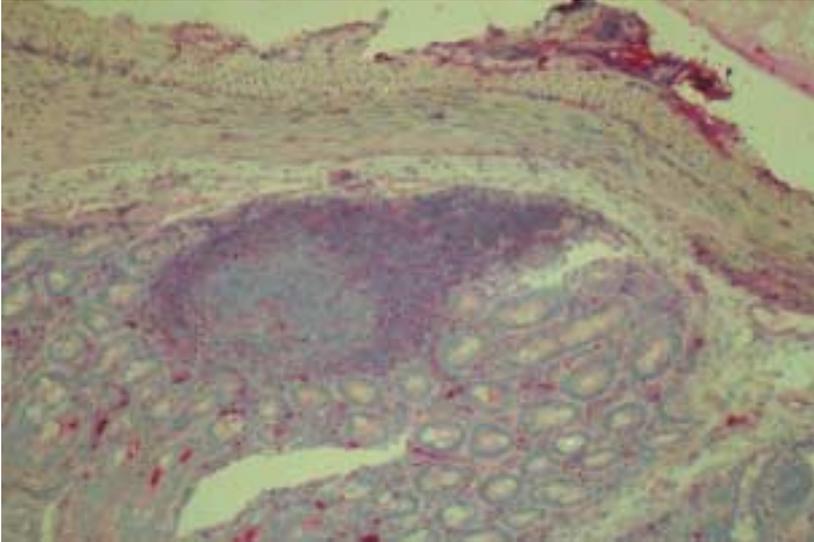


**Abb.30: Herz, Darstellung des KDR**  
 Bouinfixierung, 100-fache Vergrößerung  
 Im Längsschnitt durch die Herzmuskulatur zeigen, neben den angefärbten Gefäßen, auch die Muskelzellen eine deutliche Rotfärbung.

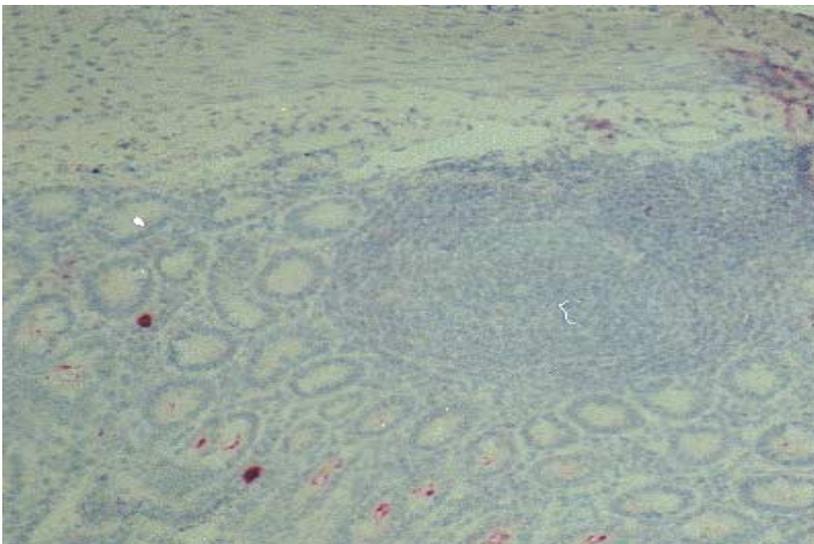


**Abb.31: Herz, Spezifitätskontrolle**  
 Bouinfixierung, 100-fache Vergrößerung  
 Bei der Kontrollreaktion mit dem EC-Marker antiCD31 weisen nur die Gefäße eine deutliche Rotfärbung auf.

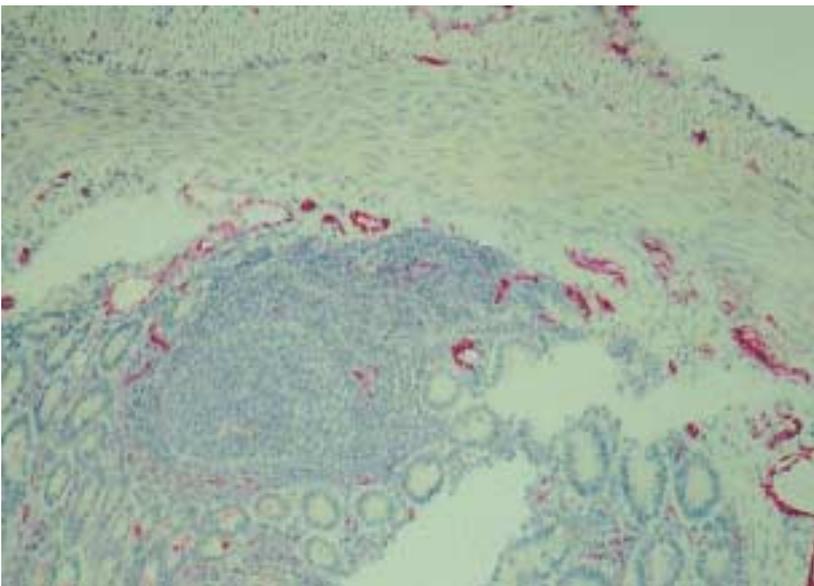
Vom Gastrointestinaltrakt wurden der **Magen, der Zwölffingerdarm, der Krummdarm und der Wurmfortsatz des Blinddarmes** auf das Vorhandensein von KDR untersucht (s. Abb. 32-36; s.S. 50 u. 51). In den genannten Organen zeigen sich KDR-positive Strukturen. So sind Muskelzellen und Drüsenepithelien rot angefärbt, desweiteren die EC von Kapillaren, Mesothelzellen, Fibrozyten und Lymphozyten in den Lymphknoten der Tela submucosa.



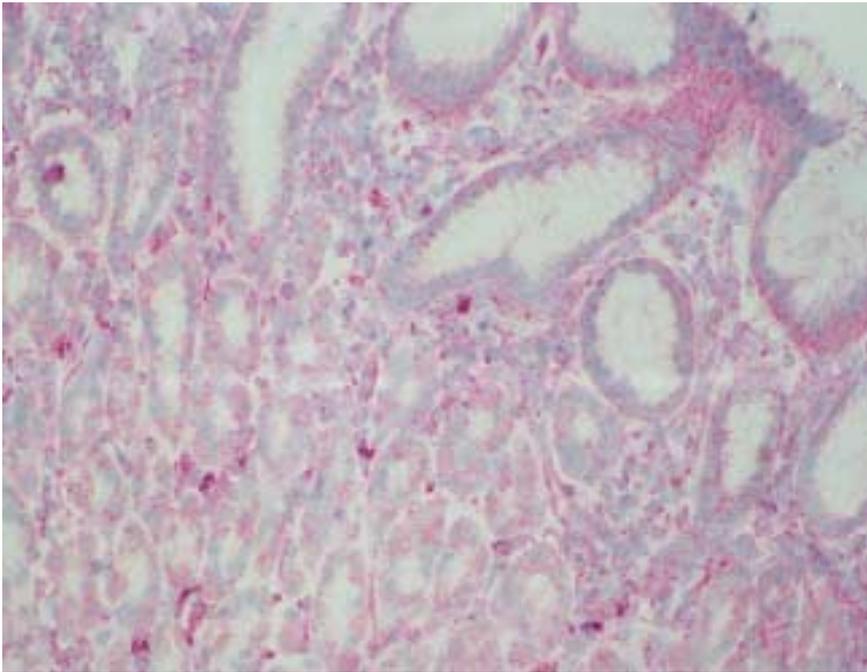
**Abb.32: Zwölffingerdarm, Darstellung des KDR,** Bouinfixierung, 100-fache Vergrößerung Querschnitt durch den Zwölffingerdarm: Eine deutliche Rotfärbung zeigen die Kapillaren u. die Zellen des Lymphfollikels. Die Drüsenzellen sind nur schwach positiv gefärbt.



**Abb.33: Zwölffingerdarm, Negativkontrolle** Bouinfixierung, 100-fache Vergrößerung Querschnitt durch den Zwölffingerdarm: Kleinere Farbartefakte sind vorhanden, welche allerdings nicht die Auswertung behindern.

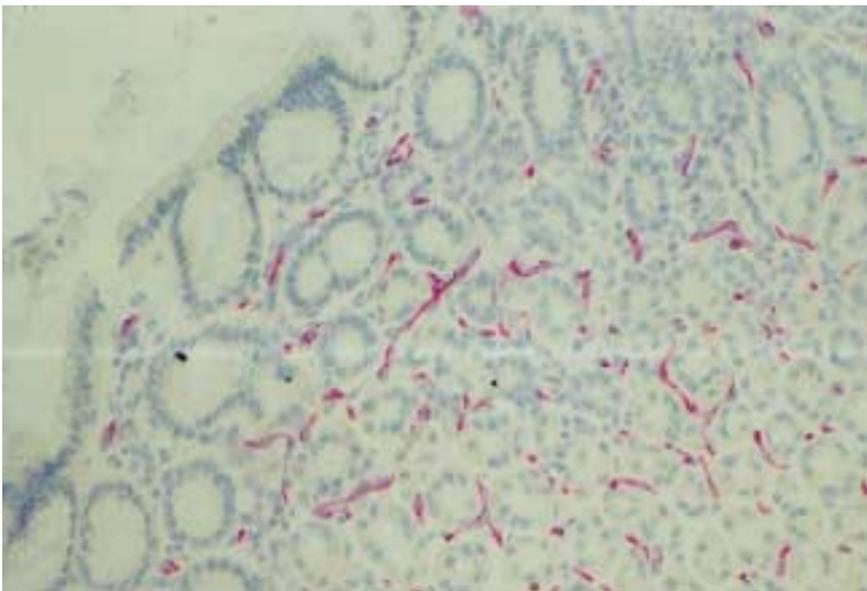


**Abb.34: Zwölffingerdarm, Spezifitätskontrolle** Bouinfixierung, 100-fache Vergrößerung Querschnitt durch den Zwölffingerdarm: Darstellung der Kapillaren mit dem Marker anti CD31.



**Abb.35: Magen, Darstellung des KDR, Bouinfixierung, 200-fache Vergrößerung**

Im Vergleich zu dem EC-marker (s.Abb. 36) ist bei der immunhistochem. Reaktion mit 2-10-1 v.a. die Rotfärbung der Magendrüsen auffällig. Die kapillären Strukturen weisen jedoch noch eine stärkere Färbung auf.



**Abb.36: Magen, Spezifitätskontrolle Bouinfixierung, 200-fache Vergrößerung**

Es sind nur die Endothelien rot dargestellt.

Im **Großhirn** lassen sich die Gefäße rot darstellen und erweisen sich somit als KDR-positive Strukturen. Dabei ist die Färbung schwächer als bei den Gefäßen in anderen Organen.

In der **Haut** zeigen die EC der Kapillaren eine deutliche Rotfärbung.

Die hier erzielten Ergebnisse des immunhistochemischen Nachweises des VEGF-Rezeptors *KDR* lassen sich, zur besseren Übersicht, in drei Gruppen einteilen:

1. Histologische Strukturen (EC), die sich in Übereinstimmung mit dem CD31-Nachweis angefärbt haben.
2. Zellen, die den CD31-Rezeptoren exprimieren, aber *KDR* negativ sind.
  - EC des Trias in der Leber
3. Zellen, welche eine *KDR*-Positivität zeigen, die aber keine CD31-Rezeptoren besitzen. Zu dieser Gruppe von Zellen gehören:
  - Zellen des diskontinuierlichen Endothels sinusoider Kapillaren in der Milz und Leber
  - Sinusendothelien des Lymphknotens
  - Epithelzellen, wie die der Luftröhre, Mesothelien, Drüsenepithelien im MDT, Tubuluszellen in Nieren und Bauchspeicheldrüse sowie epitheliale Retikulumzellen des Thymus und Lymphknotens
  - Zellen des Binde und Stützgewebes, wie Lymphozyten, Fibroblasten/-zyten, Chondroblasten
  - Zellen des Muskelgewebes, wie Herzmuskelzellen und glatte Muskelzellen im MDT
  - Zellen des exokrinen und endokrinen Anteils der Bauchspeicheldrüse

Die hier erzielten Ergebnisse über das Vorkommen des *KDR* in den verschiedenen Geweben stellen seine Endothelspezifität in Frage. Neben den EC exprimierten auch eine Reihe anderer Zelltypen den VEGF-Rezeptor *KDR* (s. Tabelle 3; S.37).