

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(komm. Direktor: Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Hollemann)

**Das Chorionallantoismembran-Modell in der Tumorforschung-
Untersuchungen zur Kombination von Bestrahlung und
Antiangiogenese bei der Tumorthherapie**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von **Susanne Rode**
geboren am 10.01.1981 in Merseburg

Betreuer: PD Dr. U. Rothe

Gutachter:

1. PD Dr. Gabriele Hänsgen, MLU Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. Dr. Clemens-F. Hess, Georg-August-Universität Göttingen

Eröffnungsdatum: 25.06.2007

Verteidigungsdatum: 16.11.2007

urn:nbn:de:gbv:3-000012794

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000012794>]

Referat und bibliografische Beschreibung

Angiogeneseinhibitoren spielen in der modernen Tumorthherapie in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika eine wesentliche Rolle. Ihre Wirkung stützt sich auf die These, dass der wachsende Tumor ab einer bestimmten Größe über Diffusion nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden kann. Für ein weiteres Wachstum ist eine eigene, durch das entartete Gewebe induzierte Neoangiogenese erforderlich. Angiogeneseinhibitoren sollen diesen Prozess stoppen und damit zur Tumorregression führen. Bisher ungeklärt ist die Frage, ob eine Kombination von Angiogenesehemmung und Bestrahlung synergistische Effekte erbringt.

Zur Untersuchung der Fragestellung wurde ein Tumormodell auf der Chorionallantoismembran des bebrüteten Hühnereies entwickelt. Dazu wurden Zelllinien in einer Matrigeltechnik auf die Chorionallantoismembran übertragen, die einen soliden vaskularisierten Tumor bilden. Als Angiogeneseinhibitor wurde der bereits in der klinischen Anwendung zugelassene VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin®) genutzt. Weiterhin konnte ein Bestrahlungsarbeitsplatz zur Durchführung der Versuche am tumortragenden Ei etabliert werden. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach histologischer Aufarbeitung mit verschiedenen Färbemethoden.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das Chorionallantoismembran-Modell zur Untersuchung tumorbiologischer Fragestellungen im besonderen eignet. Für die Kombination von Bestrahlung und Angiogenesehemmung konnten synergistische Effekte in Form von Tumorregression, Verringerung der Gefäßanzahl sowie des VEGF-Rezeptor 2-Besatzes beim Rhabdomyosarkom nachgewiesen werden.

Die beobachteten Effekte lassen eine Kombination von Angiogenesehemmung und Bestrahlung als viel versprechenden Therapieansatz erscheinen.

Rode, Susanne: Das Chorionallantoismembran-Modell in der Tumorforschung – Untersuchungen zur Kombination von Bestrahlung und Antiangiogenese bei der Tumorthherapie. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 78 Seiten, 2007

Inhaltsverzeichnis

Referat und bibliografische Beschreibung.....I

Abkürzungsverzeichnis.....IV

1	Einleitung	1
1.1	Gefäßentwicklung	1
1.1.1	Vaskulogenese und Angiogenese.....	1
1.2	Aufbau einer physiologischen Gefäßwand	9
1.3	Aufbau einer pathologischen Gefäßwand (Tumorgefäß).....	10
1.4	Endothelzellen und wichtige Oberflächenmoleküle als immunhistochemische Marker	11
1.5	Die Chorionallantoismembran (CAM).....	12
1.5.1	Entwicklung der CAM	13
1.5.2	Physiologische Bedeutung der CAM	14
1.5.3	Gefäßentwicklung der CAM	14
1.5.4	Die CAM als in vivo-Modell	15
1.6	Tumoren	22
1.6.1	Tumorentwicklung	22
1.6.2	Versorgung des wachsenden Tumors.....	23
1.6.3	Prozesse der tumorinduzierten Neoangiogenese.....	24
1.6.4	Angiogeneseinhibitoren und ihre Rolle beim Tumorwachstum	26
1.7	Therapieansätze in der Tumorbehandlung	29
1.7.1	Zytostatika und ihre Wirkprinzipien	29
1.7.2	Hemmung der Hormonproduktion bei hormonabhängigen Tumoren.....	29
1.7.3	Radiatio	30
1.7.4	Angiogeneseinhibitoren	31
1.8	Zielstellung der Arbeit	32
2	Materialien und Methoden	33
2.1	Gebrauchsmaterialien.....	33
2.2	Puffer und Kulturmedien.....	33
2.3	Kultivierung der Eier.....	34
2.3.1	In-ovo Methode	34

2.3.2	Umsetzung der Eier	35
2.3.3	Spiegeleikultur	35
2.4	Zellkultivierung	35
2.5	Auftragung von Avastin®	36
2.6	Bestrahlung der Eier	36
2.7	Histologie	38
2.7.1	Einbetten und Schneiden	38
2.7.2	Färbungen	39
2.8	Auswertung, Statistik	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Kultivierung der Eier	42
3.2	Entwicklung des Tumormodells	43
3.3	Bestrahlungsversuche	46
3.4	Angiogenesehemmung	47
3.5	Histologie	49
3.5.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	49
3.5.2	SNA-1-Lectin-Färbung	50
3.5.3	Immunhistochemie	51
4	Diskussion	53
4.1	Kultivierung der Eier	53
4.2	Entwicklung eines CAM-Tumormodells	54
4.3	Eignung des CAM-Modells für tumorbiologische Untersuchungen	55
4.4	Bestrahlung der Eier	56
4.5	Angiogenesehemmung	57
4.6	Kombination von Angiogenesehemmung und Bestrahlung	58
5	Zusammenfassung	63
6	Literaturverzeichnis	66
7	Anhang (Bildatlas Histologie)	73
8	Thesen	77

Abkürzungsverzeichnis

Ang-1/-2	Angiopoetin-1/-2
APN	Aminopeptidase N
BPD-MA	benzoporphyrine derivative monoacid ring A
bzw.	beziehungsweise
CAM	Chorionallantoismembran
CD	cluster of differentiation
d	Tag
EC	Endothelzelle
ECM	extrazelluläre Matrix
EGF	epidermal growth factor
EPC	endothelial progenitor cell
FGF	fibroblast growth factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FTC	follicular thyroid cancer
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HET-CAM-Assay	hen's egg test-chorio-allantoic-membrane-Assay
HIF-1 α	hypoxia inducible factor-1 α
HSPG	Heparansulfatproteoglycan
IL	Interleukin
INF	Interferon
MMP	Matrix-Metalloprotease
MVD	microvessel density
NP-1	Neuropilin-1
PAI	Plasminogenaktivator-Inhibitoren
PancTu 1	Pankreaskerzinomzelllinie
paVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PC	Perizyten
PDGF	platelet derived growth factor
PIGF	placenta growth factor
RD	Rhabdomyosarkomzelllinie
SCID	severe combined immunodeficiency
SMA	smooth muscle antigen

SMC	glatte Muskelzelle
SNA-1	Sambucus nigra lectin-1
TAF	Tumor-Angiogenese-Faktor
TGF	transforming growth factor
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TSP-1	Thrombospondin-1
uPA	Urokinase-Plasminogenaktivator
uPA-R	Urokinase-Plasminogenaktivator-Rezeptor
u.s.w.	und so weiter
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Gefäßentwicklung

Die Bildung neuer Blutgefäße spielt bei einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Vorgängen im menschlichen Organismus eine wesentliche Rolle. Hierzu zählen vor allem die Embryogenese, der weibliche Reproduktionszyklus, die Wundheilung, die Neovaskularisation ischämischer Gewebe, sowie das Tumorwachstum.

Bei der Gefäßneubildung unterscheidet man prinzipiell 2 verschiedene Mechanismen: die Vaskulogenese und die Angiogenese.

1.1.1 Vaskulogenese und Angiogenese

Die Vaskulogenese beschreibt die Bildung neuer Blutgefäße aus endothelialen Vorläuferzellen. Die Angiogenese hingegen wird definiert als Gefäßneubildung aus bestehenden Kapillaren, sowohl im Embryo, als auch im adulten Organismus.

Embryonale Vaskulogenese

Das Gefäßsystem entwickelt sich ursprünglich aus so genannten Blutinseln, die aus dem splanchnopleuralen Mesoderm des Dottersacks entstehen. Wichtig hierbei sind Wachstumsfaktoren der Fibroblast-Growth-Factor (FGF)-Familie [97]. Im Verlauf dieser Entwicklung differenzieren sich die Zellen im Zentrum der Blutinseln zu hämatopoetischen Zellen und periphere Inselzellen in endotheliale Vorläuferzellen, sog. Angioblasten. Hämatopoetische Stammzellen und Angioblasten exprimieren zudem eine Anzahl gleichartiger Oberflächenantigene, wie der VEGF-Rezeptor KDR/flk-1, der Angiopoetinrezeptor tie-2 und das Glycoprotein CD34 [25,45]. Sowohl dieser Aspekt, als auch die enge räumliche Beziehung während der embryonalen Gefäßentwicklung lassen die Existenz einer gemeinsamen Vorläuferzelle für Blut- und Blutgefäßzellen, den Hämangioblasten, vermuten. Die Fusion von Blutinseln und die Differenzierung von Endothelzellen führen im embryonalen Organismus zur Bildung der großen Blutgefäße [54]. Die sich anschließende Gefäßreifung und weitere Differenzierung erfolgt durch Apoptose von Endothelzellen, bzw. Umorganisation zu neuen Gefäßen. Auch kommt es im Rahmen der Gefäßreifung zu Veränderungen der Gefäßwand. An all diesen Vorgängen sind wiederum Wachstumsfaktoren, allen voran VEGF und bFGF beteiligt [19,34,100].

Postnatale Vaskulogenese

Endotheliale Vorläuferzellen (endothelial progenitor cells, EPC) finden sich auch im Knochenmark und peripheren Blut von Erwachsenen [3,101]. Damit scheint die Vaskulogenese auch im adulten Organismus eine Rolle zu spielen. Im peripheren Blut machen diese Vorläuferzellen 0,1 bis 0,5% der mononukleären Zellen aus und können sich unter bestimmten Bedingungen zu Endothelzellen differenzieren. Im Gegensatz dazu soll ihre Anzahl im Knochenmark das Hundertfache betragen. Ihre Oberflächenmoleküle ähneln denen der hämatopoetischen Stammzellen. Es wird somit angenommen, dass es sich bei den EPC um das Korrelat der Angioblasten im adulten Organismus handelt [54]. Die Funktion dieser Zellen ist zum jetzigen Zeitpunkt noch Gegenstand intensiver Forschung, jedoch scheinen EPC's in ischämische Bezirke zu migrieren und dort an der Neubildung von Gefäßen beteiligt zu sein [112]. Stützen lässt sich diese These durch eine Arbeit von Asahara et al., 1999 wonach bei akuter Ischämie endotheliale Progenitorzellen aus dem Knochenmark ausgeschwemmt werden [4]. Dieser Mechanismus wird vermutlich durch den hypoxieinduzierbaren Transkriptionsfaktor HIF-1 α gesteuert, der wiederum über eine VEGF-Freisetzung zur Migration der EPC's führt [55]. Im Jahre 2002 konnte eine japanische Arbeitsgruppe erstmals Daten einer therapeutischen Angiogenese mittels autologer Stammzelltherapie präsentieren [114]. Hierbei wurde Patienten mit bilateraler peripherer arterieller Verschlusskrankheit Knochenmarkstammzellen bzw. mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut in je eine Extremität intramuskulär injiziert. 4 Wochen später konnte eine signifikante Verbesserung der klinischen Symptomatik der Extremität, die Knochenmarkstammzellen erhalten hatten, gezeigt werden. Die Ergebnisse wurden durch das 100fach höhere Vorkommen der EPC's im Knochenmark erklärt. Jedoch bleibt die gezielte Steuerung der Migration endothelialer Vorläuferzellen in ischämische Areale ein Thema intensiver Forschung [61].

Angiogenese

Angiogenese beschreibt die Neubildung von Gefäßen aus bereits bestehenden Kapillaren. Das neue Blutgefäß wird somit im Gegensatz zur Vaskulogenese aus bereits differenzierten Endothelzellen gebildet [54]. Dabei wird zwischen dem Aussprossen von Gefäßen, dem sog. „Sprouting“ und dem intussuszeptiven Wachstum (Einstülpung) unterschieden (siehe Abbildung 1). Bei der Sprossung bilden sich transendotheliale Zellbrücken, die sich anschließend in einzelne Kapillaren teilen. Beim intussuszeptiven Wachstum teilt sich eine Kapillare durch Bildung transkapillärer Säulen in zwei Tochterkapillaren [18]. Dieser

Mechanismus spielt vor allem bei der VEGF-induzierten Angiogenese auf der Chorionallantoismembran eine wichtige Rolle.

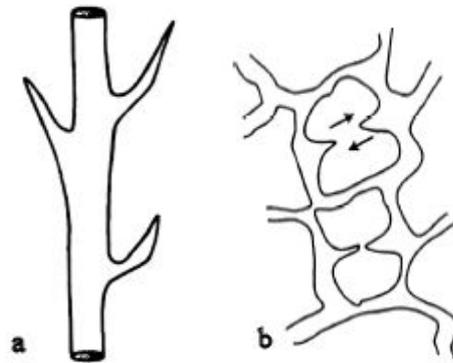


Abbildung 1: Mechanismen der Angiogenese [nach 18]
a. Sprossung; b. intussuszeptives Wachstum

Die Angiogenese geht vor allem von postkapillären Venolen aus und findet sowohl beim Embryo als auch im erwachsenen Organismus (Wundheilung, weiblicher Reproduktionszyklus) statt.

Die Angiogenese ist ein komplexer Prozess, der des Zusammenspiels verschiedenster Faktoren bedarf (siehe Tabelle 1). Im reifen Gewebe sind proangiogene und antiangiogene Faktoren im Gleichgewicht, so dass daraus ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Neubildung von Endothelzellen und Apoptose resultiert.

Initiation	Progression	Reifung-Termination
EC-Formänderung: Integrin $\alpha_v\beta_3$	EC-Proliferation: VEGF-A	EC-Überleben: VEGF-A, Integrin $\alpha_v\beta_3$
EC-Junctions: VE-Cadherin	EC-Migration: VEGF-A	PC-Differenzierung: TGF- β_1 , Angiopoetin-1
EC-Permeabilität: VEGF-A	EC-Lumenbildung: VEGF-A	ECM-Bildung: TGF- β_1
ECM-Abbau: Proteasen	PC-Rekrutierung: PDGF-B, Tie2, Angiopoetin-1	EC-Fusion: Integrin α_4 , VCAM-1, VE-Cadherin
PC-Ablösung: Angiopoetin-2		

Tabelle 1: an Angiogenese beteiligte Faktoren; EC-Endothelzelle, PC-Perizyten, ECM-extrazelluläre Matrix [nach 18]

Kommt es aufgrund unterschiedlicher Ursachen (z.B.: Wundheilung, Entzündungsreaktion, Tumorwachstum) zum Überwiegen stimulierender Modulatoren, beginnt ein mehrstufiger Prozess:

- a) Freisetzung von Proteasen aus aktivierten Endothelzellen
- b) Abbau der Basalmembran, die das bereits existierende Gefäß umgibt
- c) Migration von Endothelzellen ins Interstitium

- d) Proliferation von Endothelzellen
- e) Formation eines neuen Gefäßlumens
- f) Aufbau einer neuen Basalmembran und Rekrutieren von Perizyten
- g) Fusion des neuen Blutgefäßes
- h) Beginn des Blutflusses

Abbau der Basalmembran

Zum Abbau der Basalmembran ist das Zusammenspiel verschiedener Proteasen notwendig. Dazu gehören Matrix-Metalloproteasen (MMP's) und Plasmin.

Plasmin wird durch Spaltung aus Plasminogen durch urokinase-plasminogen-activator (uPA) im Gewebe bereitgestellt. Um eine lokale Begrenzung des Prozesses zu erreichen, wird ein Proenzym (Pro-uPA) sezerniert, das über Bindung an den uPA-Rezeptor (uPA-R) konzentriert wird und mittels Spaltung durch Plasmin, Faktor XIIa oder Kathepsin B aktiviert werden kann. Der uPA-Rezeptor hat außerdem die Funktion die Zellmigration und Invasion zu vermitteln.

Das entstandene Plasmin hat eine breite Substratspezifität und kann verschiedene Komponenten sowohl der Basalmembran als auch der ECM, wie z.B.: Fibrin, Fibronectin, Laminin und den Proteinkern von Proteoglycanen abbauen. Zusätzlich kann Plasmin verschiedene MMP's aktivieren [68].

Um sicherzustellen, dass die Plasminogenaktivierung auch nur an den dafür vorgesehenen Stellen geschieht, sind folgende Kontrollmechanismen eingeschaltet:

Die Expression von uPA und uPA-R wird von angiogenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen hochreguliert.

- Pro-uPA muss proteolytisch aktiviert werden. Über Bindung an uPA-Rezeptoren kann das lokal konzentriert geschehen.
- Die Aktivität von Plasmin und uPA wird durch 2-Antiplasmin und Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI's) reguliert.

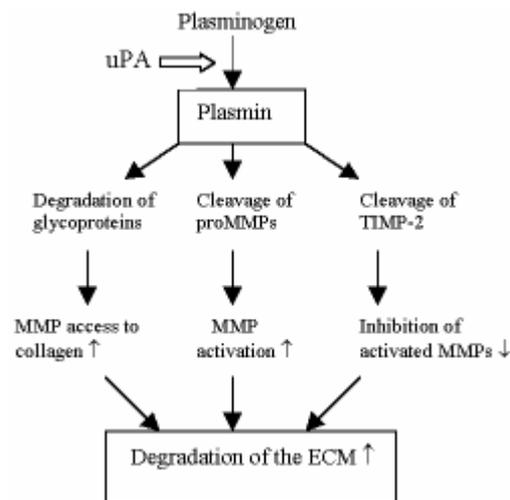


Abbildung 2: am Abbau der Basalmembran beteiligte proteolytische Enzyme [nach 68]

Matrixmetalloproteasen (MMP) stellen eine Gruppe von mindestens 16 Enzymen dar, die ähnliche Domänenstrukturen aufweisen. Die meisten Metalloproteasen sind lösliche sezernierte Enzyme, jedoch kommen auch membranständige Mitglieder der Enzymfamilie vor, die zusätzlich noch ein Transmembrandomäne aufweisen. Allen gemeinsam ist eine Präsequenz, die als Signalpeptid für die Sekretion fungiert. Weiterhin weisen sie eine Pro-Sequenz auf, die bei der Aktivierung proteolytisch entfernt wird. Die katalytische Domäne beinhaltet Zink-Ionen und eine Hämpexindomäne (außer Matrilysin), an der Gewebisinhibitoren binden können und somit zur Inaktivierung der Protease führen [122]. MMP's können verschiedene Substrate spalten. So sind z.B. MMP 1, MMP 8 und MMP 13 für die Spaltung von fibrillärem Kollagen verantwortlich, wohingegen MMP 2 und MMP 9 Typ-IV-Kollagen abbauen. Entsprechend dem Substratvorkommen in Basalmembranen sind für deren Spaltung vor allem die MMP 9 und MMP 2 wichtig [26]. Die Expression der MMP's kann durch Cytokine und angiogene Faktoren wie FGF und VEGF induziert werden. Um eine übermäßige proteolytische Aktivität zu verhindern, werden die Proteasen gemeinsam mit ihren Inhibitoren sezerniert.

Migration und Proliferation der Endothelzellen

Der proteolytische Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) führt zu einem lokalen Anstieg von Wachstumsfaktoren und Peptidfragmenten (z.B. Fibrin, Hyaluronsäure), die die Migration und Proliferation von Endothelzellen unterstützen. Durch Wachstumsfaktoren stimulierte Endothelzellen wandern in die zerstörte ECM ein und beginnen dort zu proliferieren.

Einfluss von Wachstumsfaktoren

Mittlerweile wurde eine nahezu unüberschaubare Menge an Faktoren beschrieben, denen eine Beteiligung an der Angiogenese zugesprochen wird, und die in einem vielschichtigen Netzwerk wirken. Einer der wichtigsten Faktoren für das Gefäßwachstum stellt VEGF (vascular endothelial growth factor) dar. Das Fehlen auch nur eines VEGF-Allels führt bereits zum Absterben während der Embryonalentwicklung [34]. VEGF gehört zu einer Familie aus mindestens 5 Proteinen: VEGF-A (oder VEGF), PlGF (placenta growth factor), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und virale Homologe von VEGF (VEGF-E) [116]. Innerhalb ihrer zentralen Regionen besteht hohe Sequenzhomologie. VEGF (VEGF-A) tritt wiederum in verschiedenen Splicingformen auf, so dass Isoformen mit einer unterschiedlichen Anzahl an Aminosäuren entstehen: 121, 145, 165, 189, 206. Sie unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit Heparin zu binden. Die kurze Form mit 121 Aminosäuren vermag im Gegensatz zu den längeren Formen Heparin und Heparansulfat nicht zu binden. Hauptsächlich kommen VEGF₁₆₅ und VEGF₁₂₁ vor. Die meisten Zelltypen produzieren jedoch verschiedene Splicing-Formen simultan [80]. VEGF wird in verschiedenen Geweben, wie z.B. Leber, Niere, Gehirn und Milz gebildet.

Eine vermehrte VEGF-Freisetzung führt zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität, stimuliert den Abbau der ECM sowie Proliferation und Migration von Endothelzellen. Die Regulation erfolgt sowohl über die Gewebsoxygenierung als auch über eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (z.B.: platelet-derived growth factor, epidermal growth factor, Tumor Nekrose Faktor α) [68].

Hypoxie im Gewebe führt dabei durch Stimulation des Transkriptionsfaktors HIF-1 α zur vermehrten VEGF-Expression. Normoxie hingegen reguliert die VEGF-Expression herab, so dass eine exakte Anpassung der Vaskularisierung an die metabolischen Bedürfnisse erreicht wird.

VEGF wirkt über 2 verschiedene Tyrosinkinase-Rezeptoren an den Zielzellen: VEGF-Rezeptor-1 (VEGFR-1, Flt-1) und VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2, KDR/Flk-1). Beide Rezeptoren werden v. a. auf Endothelzellen exprimiert, besitzen aber unterschiedliche Signaltransduktionswege [33]. VEGFR-2 Stimulation ohne VEGFR-1 Aktivierung führt zur Mitoseaktivierung. VEGFR-1 Stimulation ohne VEGFR-2 Aktivierung führt zu keiner Zellproliferation. Die Zellmigration jedoch wird sowohl durch Aktivierung von VEGFR-1 als auch VEGF-2 stimuliert [80].

Der vorzugsweise auf lymphatischem Endothel exprimierte VEGFR-3 bindet VEGF-C und VEGF-D und reguliert die Lymphangiogenese (siehe Abbildung 3).

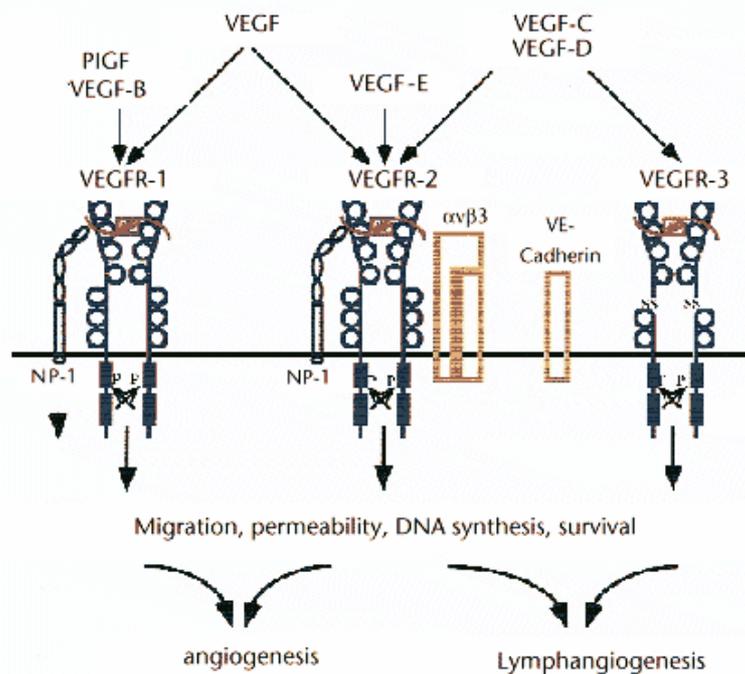


Abbildung 3: VEGF und Rezeptoren [69]

1998 wurde von Soker et al. Neuropilin-1 (NP-1), ein Glykoprotein der Zelloberfläche, das auf Endothelzellen exprimiert wird und Proteine der Familie Collapsine/Semaphorine bindet, (diese fungieren als Mediatoren der neuronalen Übertragung) als VEGF-Rezeptor identifiziert. NP-1 unterstützt im Zusammenwirken mit VEGFR-1 die mitogenen Effekte von VEGF [106].

Neben den Funktionen während der physiologischen Angiogenese, spielt VEGF auch bei pathologischen Prozessen, die mit einer vermehrten Gefäßneubildung einhergehen, eine wichtige Rolle. So führt auch eine Hypoxie im Tumorgewebe über oben beschriebene Prozesse zu einer vermehrten VEGF-Produktion und somit zur Gefäßneubildung im Tumorareal.

Ein möglicher therapeutischer Aspekt lässt sich bei paVK oder Myokardischämie im Hinblick auf eine Revaskularisation ableiten. Eine klinische Studie, bei der nackte Plasmid-DNA mit VEGF₁₆₅ als Transgen paVK-Patienten intramuskulär verabreicht wurde, zeigte einen signifikanten Anstieg des Dopplerdruckindex 4 Wochen nach Therapie. Auch konnte eine vermehrte Kollateralenbildung und signifikante Verminderung des Ruheschmerzes dokumentiert werden [9]. Auch bei myokardialen Ischämien war nach intrakardialem VEGF-Gentransfer eine verbesserte Perfusion sowohl im Belastungs-EKG als auch myokardszintigraphisch zu verzeichnen [70,111].

Einen weiteren wichtigen Faktor während der Angiogenese stellt FGF-2 (fibroblast growth factor-2) dar. Zum jetzigen Zeitpunkt sind mindestens 19 Mitglieder der FGF-Familie bekannt. Alle Proteine dieser Familie haben eine Größe von 18-30 kDa und besitzen eine

hohe Affinität für Heparin [86]. Das Protein wird in unterschiedlichen Geweben und kultivierten Zelltypen, wie Fibroblasten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Gliazellen exprimiert. Das FGF-2-Gen codiert für mehrere FGF-2 Isoformen, die alle in vivo angiogenetisch wirksam sind und Proliferation, Chemotaxis und uPA-Produktion in Endothelzellen induzieren [76].

Zwei weitere endothelspezifische Rezeptoren, Tie-1 und Tie-2, konnten schon vor Jahren gefunden werden. Die Liganden für diese Rezeptoren wurden jedoch erst später bekannt. Sie gehören zur Familie der Angiopoetine. Angiopoetin-1 (Ang-1) und Angiopoetin-2 (Ang-2) binden beide mit ähnlicher Affinität an den Tie-2 Rezeptor. Jedoch nur die Bindung von Ang-1 führt zur intrazellulären Signaltransduktion mit nachfolgender Regulation der Blutgefäßreifung [110]. Ang-2 fungiert als endogener Antagonist von Ang-1. Die Interaktion von Ang-2 mit dem Tie-2-Rezeptor zeigt keinerlei Effekt auf die Blutgefäßentwicklung und wird somit als natürlicher Inhibitionsmechanismus angesehen [72]. Im reifen Blutgefäß ist Ang-1 am Tie-2-Rezeptor gebunden, um das Gefäß zu stabilisieren. Eine vermehrte Expression von Ang-2, induziert durch Hypoxie oder VEGF, unterbricht die Interaktion zwischen Ang-1 und Tie-2. Daraus resultiert eine Destabilisierung des Gefäßes. Endothelzellen werden dadurch für Angiogenesesignale sensibilisiert und bei Vorhandensein von VEGF wird die Angiogenese angeregt. Fehlen in diesem Stadium angiogene Signale, so kommt es zur Gefäßregression [47].

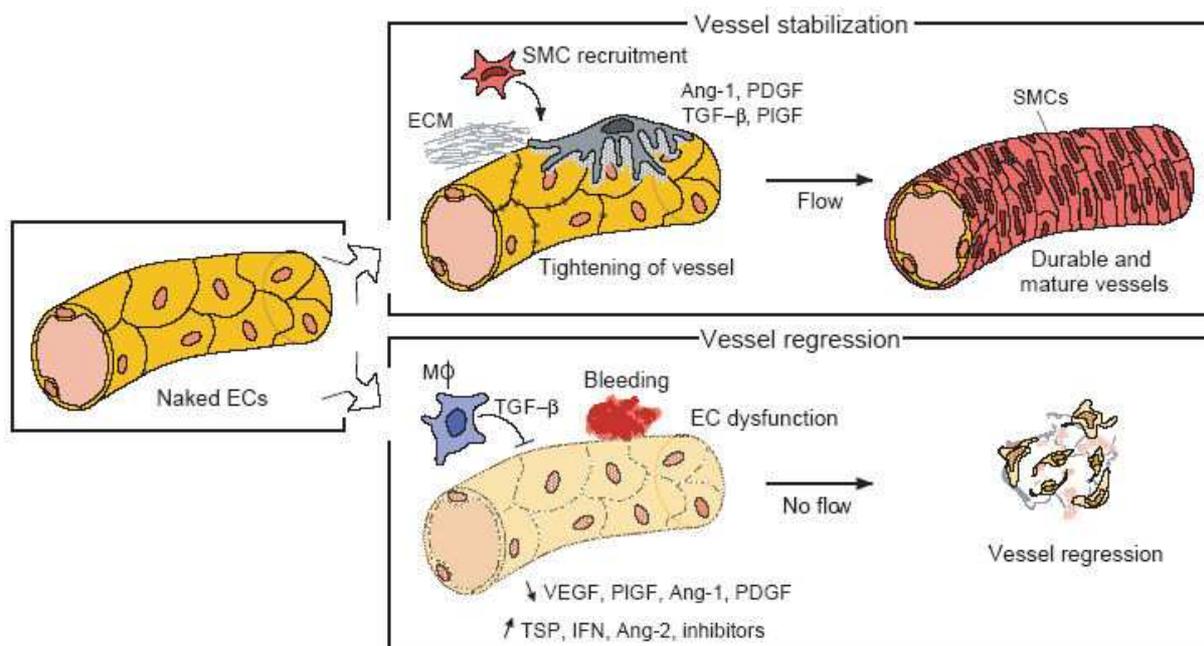


Abbildung 4: Schicksal neu gebildeter Gefäße in Abhängigkeit der Stimulatoren [17]

Ein erst in letzter Zeit in den Focus der Angiogeneseforschung gelangter Wachstumsfaktor ist Sphingosin-1-Phosphat (S1P). Ursprünglich wurden S1P Einflüsse auf die embryonale Vaskulogenese zugesprochen. Später konnte seine Beteiligung an Wundheilungsprozessen nachgewiesen werden [48]. S1P wird von Thrombozyten ins Blut sezerniert und ist als angiogener Faktor hauptverantwortlich für die chemokinetische Aktivität im Blut [32], verstärkt die Integrität der Endothelzellbarriere [100] und stabilisiert neu gebildete Blutgefäße[83]. Auch in der Tumorangiogenese läßt sich eine Wirkung von S1P nachweisen. So führt ein Knockout des primären Rezeptors zur Hemmung Tumorgefäßneubildung [82].

1.2 Aufbau einer physiologischen Gefäßwand

Die Wand von Blutgefäßen besteht aus mehreren Schichten. Man unterscheidet bei größeren Gefäßen 3 Schichten, die sich von innen nach außen wie folgt gliedern: Intima, Tunica media, Adventitia. Die Intima unterteilt sich nochmals in

1. Endothel, zur Auskleidung der inneren Oberfläche
2. Basalmembran
3. Stratum subendotheliale, bestehend aus subendotheliale Bindegewebe
4. Membrana elastica interna

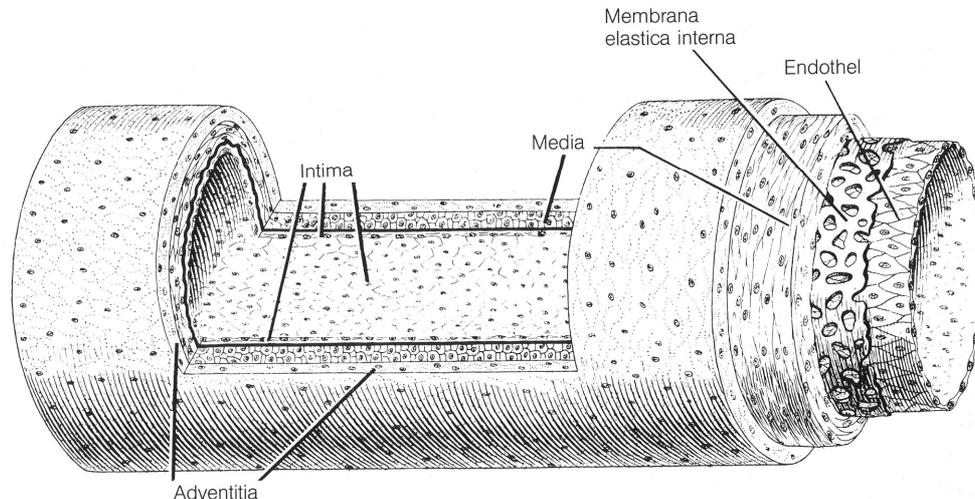


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Gefäßwand einer mittelgroßen Arterie [aus 53]

Die Tunica media besteht aus ringförmig angeordneten glatten Muskelzellen sowie Bindegewebe und elastischen Fasern. Bei manchen Gefäßen schließt sich eine Membrana elastica externa an. Die Adventitia wird durch Bindegewebe mit elastischen Fasern gebildet und bettet das Gefäß ins umliegende Gewebe ein.

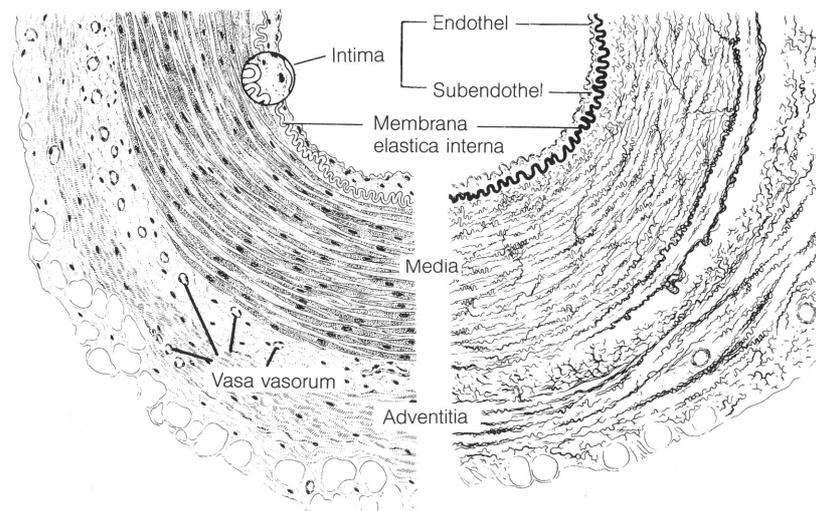


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Gefäßanschnittes, links H.E.-Färbung, rechts Elastikafärbung nach Weigert [53]

Bei kleinen Gefäßen und Kapillaren reduzieren sich die Schichten auf Endothel, Basalmembran und Perizyten. Bei diesen Zellen handelt es sich um kontraktile Zellen, die eine Zwischenstufe zwischen Bindegewebszelle (Fibroblast) und Muskelzelle (Myozyt) darstellen [53].

1.3 Aufbau einer pathologischen Gefäßwand (Tumorgefäß)

Die Gefäße im Tumorgewebe unterscheiden sich von normalen Blutgefäßen in verschiedener Hinsicht. Im Tumorgewebe herrscht wegen der schnellen Größenzunahme des Gewebes Sauerstoffmangel. Diese Hypoxie führt zum sog. angiogenen Switch des Tumors. Das Gleichgewicht zwischen angiogenen und antiangiogenen Faktoren wird zugunsten der angiogenen Substanzen verschoben und es resultiert eine Gefäßneubildung im Tumor. Da diese Gefäße aber sehr schnell wachsen und nicht ausreifen können, weisen Tumorgefäße eine höhere Permeabilität auf, sie sind stark gewunden und verzweigt. In der Endothelzellschicht befinden sich Zwischenräume oder Fenestrierungen [44]. Interendotheliale Verbindungen sind aufgelockert oder fehlen gänzlich. Auch können Endothelzellen ins Lumen der Gefäße ragen oder übereinander wachsen [73]. Es kommt zu großen Kaliberschwankungen im Gefäß, der Blutfluß kann mangels glatter Muskelzellen in der Gefäßwand nicht reguliert werden [20]. Somit können im Tumorgewebe sowohl hypoxische als auch hyperperfundierte Areale gleichzeitig auftreten, die zu Blutungen und Nekrosen führen.

Chang et al. beschreiben in einer Arbeit, dass auch Tumorzellen an der Bildung des Gefäßlumens beteiligt sein können. Mittels Immunhistochemie wurde nachgewiesen, dass

zumindest in Kolonkarzinomen ca. 4% der gesamten Tumorgefäßoberfläche mit Tumorzellen und nicht mit Endothelzellen ausgekleidet ist [21].

Einen weiteren Aspekt stellt möglicherweise die genetische Instabilität der Tumorendothelzellen dar. Erste Hinweise darauf ergeben sich durch eine 2004 von Steubel et al. veröffentlichte Arbeit, in der mittels FISH-Analyse chromosomale Veränderungen auf Endothelzellen beschrieben werden, die denen der Tumorzellen entsprechen. Es konnte gezeigt werden, dass sich sowohl numerische Abberationen als auch Translokationen, die in B-Zell-Lymphomen vorkommen, auf 15-85% der tumoreigenen Endothelzellen wieder finden lassen [109].

Es lässt sich daraus schließen, dass sich Endothelzellen im Tumorgewebe von denen im normalen Gewebe unterscheiden. Dies hat auch Auswirkungen auf einen möglichen therapeutischen Ansatz.

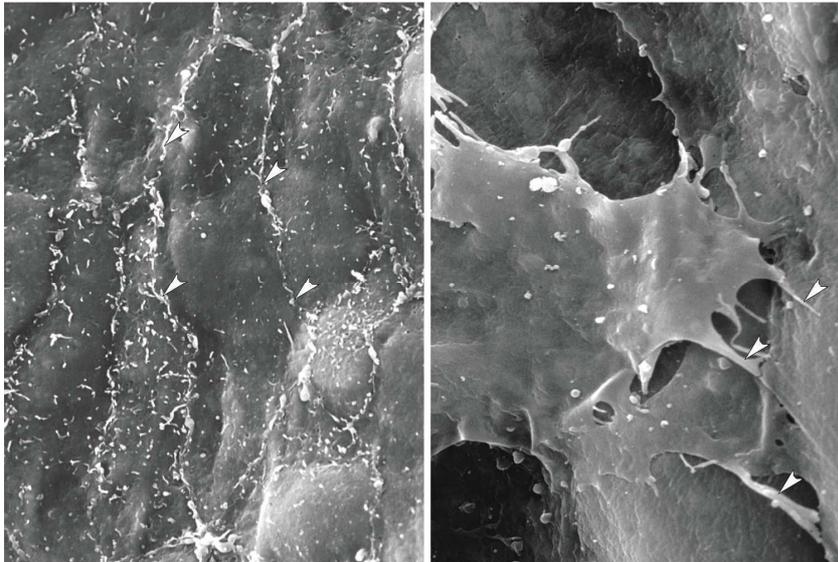


Abbildung 7: Endothel eines normalen (links) und pathologischen (rechts) Gefäßes im elektronenmikroskopischen Bild, Pfeile verweisen auf interendotheliale Verbindungen; im Tumorgefäß erweiterte Zellzwischenräume und einander überragende Endothelzellen [nach 73]

1.4 Endothelzellen und wichtige Oberflächenmoleküle als immunhistochemische Marker

Als wichtigste Effektorzelle bei der Angiogenese spielen Endothelzellen auch während des Tumorwachstums eine entscheidende Rolle. Sowohl durch Angiogenese aktivierte als auch ruhende Endothelzellen exprimieren verschiedene Oberflächenmoleküle, mit deren Hilfe sie mit ihrer Umgebung in Kontakt treten. Viele dieser zum Teil sehr spezifischen Proteine können als Marker zur Detektion der Zellen genutzt werden.

Die wichtigsten Proteine, die auf Endothelzellen exprimiert und immunhistochemisch nachgewiesen werden können sind: CD31, CD34, von-Willebrandt-Faktor (vWF), VEGF-Rezeptor-1 (VEGFR-1) und VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2).

Tabelle 2 gibt die wichtigsten Funktionen der Moleküle wieder.

Für die Detektion von Gefäßen in histologischen Schnitten eignen sich nicht nur Moleküle, die direkt auf Endothelzellen nachgewiesen werden können, sondern auch solche, die von umliegenden Zellen wie Perizyten oder glatte Muskelzellen exprimiert werden. Dazu zählen Desmin (Perizyten) und α -smooth-muscle-antigen (α -SMA, glatte Muskelzellen). Auch lassen sich bestimmte Zuckermoleküle, die relativ spezifisch auf Endothelzellen vorkommen, mit markierten Lectinen (zuckerbindende Proteine) sichtbar machen. So bindet das im Holunder vorkommende Sambucus nigra lectin-1 (SNA-1) spezifisch an sialyl- α (2,6)-Galactose/N-acetyl-Galactosamin auf Endothelzellen und einigen Darmepithelien der Ratte [7].

Oberflächenmolekül	Funktion	Referenz
CD-31 (PECAM-1 platelet endothelial cell adhesion molecule-1)	<ul style="list-style-type: none"> • Adhäsion zwischen Endothelzellen • Rollen, Adhäsion und Extravasation von Leukozyten • Liganden sind CD31, Integrin$\alpha_v\beta_3$ 	Righi et al., Am. J Pathol (2003)[96]
CD-34	<ul style="list-style-type: none"> • Spezifischer Marker für Endothel und hämatopoetische Vorläuferzellen • Rollen von Leukozyten • Ligand: L-Selektin 	Hamid et al., Microvasc Res (2003)[43]
von Willebrandt-Faktor	<ul style="list-style-type: none"> • Binden von Thrombozyten während der Gerinnungskaskade 	Hamid et al., Microvasc Res (2003)[43]
VEGFR-1	<ul style="list-style-type: none"> • VEGF-Rezeptor • Regulation der Angiogenese 	Brieger et al.; Int J Mol Med (2005)[15]
VEGFR-2	<ul style="list-style-type: none"> • VEGF-Rezeptor • Regulation der Angiogenese 	Brieger et al.; Int J Mol Med (2005)[15]

Tabelle 2: immunhistochemische Marker für Endothelzellen

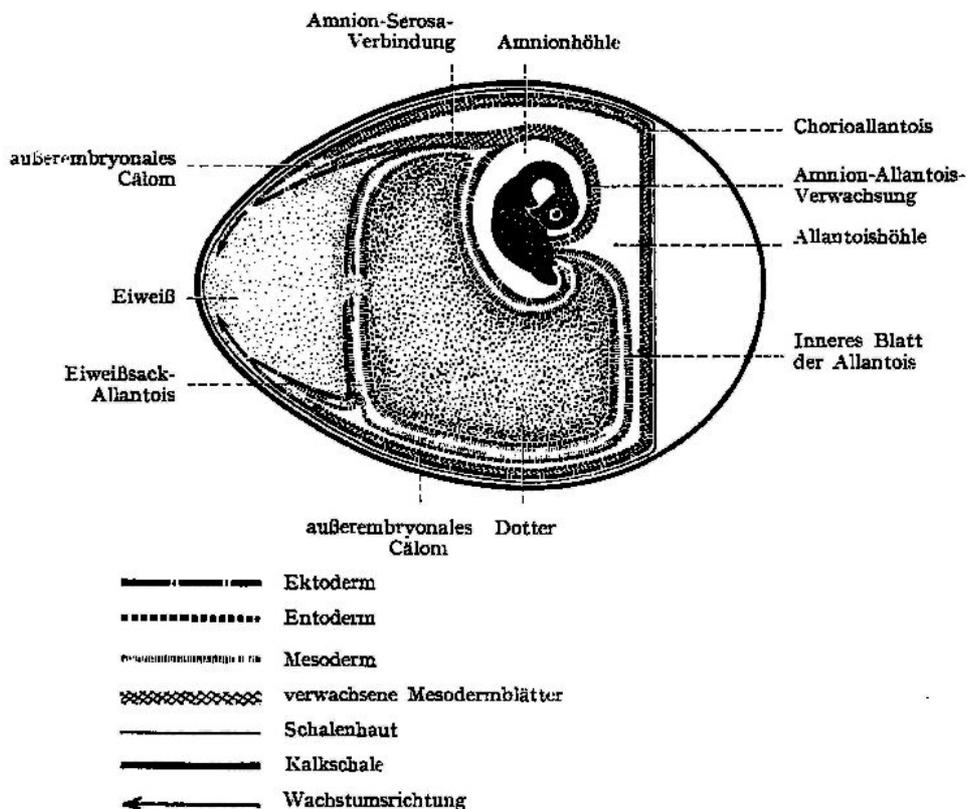
1.5 Die Chorionallantoismembran (CAM)

Die Chorionallantoismembran (CAM) von Hühnerembryonen eignet sich hervorragend als einfaches in vivo-Modell zur Untersuchung von Angiogenese und Antiangiogenese, sowie als

Tumormodell. Ihr reich entwickeltes Gefäßsystem lässt sich bei geeigneter Präparation selbst in ovo sehr gut mikroskopisch auch am lebenden Organismus untersuchen.

1.5.1 Entwicklung der CAM

Die Chorionallantoismembran ist eine extraembryonale Membran, die sich am 5.-6. Entwicklungstag des Hühnerembryos bildet und bis zum Schlupf am 21. Entwicklungstag das gesamte Ei von innen auskleidet. Sie liegt in ovo direkt der Eierschale an und verwächst im Laufe der Entwicklung mit dieser. Das Allantois erscheint am 3,5. Entwicklungstag als Ausstülpung der ventralen Wand des endodermalen Hinterdarms. Die Allantoishöhle wächst im Laufe der nächsten Entwicklungstage ins extraembryonale Coelom vor [95]. Das Chorion



Hühnerembryo, 12 Tage alt (nach MAYR, aus HALLMANN).

Abbildung 8: Entstehung der CAM als Verschmelzungsprodukt aus Chorion und Allantois

umgibt als Eihaut Embryo und Eidotter und umschließt somit das extraembryonale Coelom. Durch die Größenzunahme der Allantoishöhle fusionieren am 5.-6. Tag Allantois und mesodermaler Anteil des Chorions zur Chorionallantoismembran. Somit entsteht eine mesodermale Doppelschicht (siehe Abbildung 8). Der Anteil des Allantois entspricht dem visceralen Mesoderm, der des Chorions dem somatischen Mesoderm. In dieser mesodermalen Schicht entwickelt sich nun ein reiches Gefäßnetzwerk, dass über Arterien und Venen des Allantois mit dem Embryo verbunden ist. Beide werden außen und innen von einer Epithelschicht begrenzt. Es ergibt sich im histologischen Schnitt ein 3-schichtiger Aufbau

(siehe Abbildung 9). Die äußere Schicht besteht aus Epithelzellen und stammt vom Chorionektoderm. Die mittlere Schicht entsteht als Verschmelzungsprodukt der beiden mesodermalen Anteile von Chorion und Allantois. Die innere Schicht schließt mit einem Endothel die Allantoishöhle ab. Sie stammt vom Allantoisendoderm.

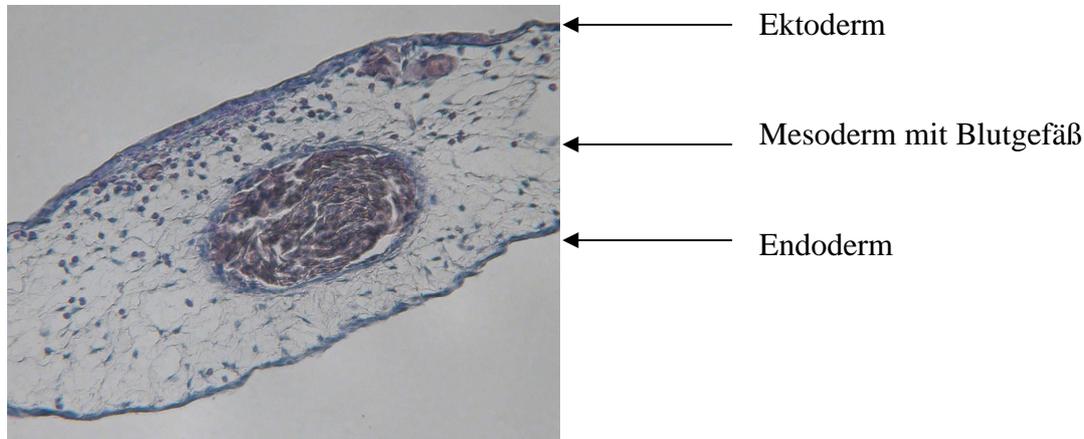


Abbildung 9: dreischichtiger Aufbau der CAM, von oben nach unten: Ektoderm, Mesoderm mit Gefäß, Endoderm

1.5.2 Physiologische Bedeutung der CAM

Die CAM dient dem Embryo bis zum Schlupf am 21. Entwicklungstag als Gasaustauschfläche über das Chorionepithel. Die enge Verbindung zur Eierschale und die gute Vaskularisation garantieren eine ungestörte Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxidabgabe. Außerdem ist die CAM für die Kalziumaufnahme des Embryos zuständig. Bis zum Tag 10 wird das Kalzium vom Dotter zur Verfügung gestellt. Bald steigt aber der Kalziumbedarf des Embryos an, da die Knochen zu ossifizieren beginnen. Das Kalzium kann nun aus der Eierschale über die CAM aufgenommen werden. Die Schale verliert auf diese Weise bis zum Schlupf ca. 50% ihres Gewichtes. Das Allantois dient auch als Reservoir für Stoffwechselendprodukte des Embryos.

1.5.3 Gefäßentwicklung der CAM

Bis zum 11. Entwicklungstag findet in der CAM ein rasches Kapillarwachstum mit hoher Mitoserate der Endothelzellen statt. Danach nimmt die Mitoserate rapide ab und das Gefäßsystem erhält bis zum Tag 18 seine endgültige Ausreifung [6].

Morphologie entsprechend des Entwicklungstages

Am Tag 4 bestehen die CAM-Gefäße als undifferenzierte Kapillaren aus einem einschichtigen Endothel noch ohne vollständige Basalmembran. Bis zum 8. Entwicklungstag ist das

Endothel von einer Basalmembran und mesodermalen Zellen umgeben. Ab Tag 10-12 lassen sich Arteriolen und Venolen unterscheiden, die sich jetzt näher an der Oberfläche befinden. Die Arteriolen sind von 2 Schichten mesenchymaler Zellen und Bindegewebe umgeben. Die Venolen sind nur inkomplett mit mesenchymalen Zellen umhüllt und ihr Bindegewebsanteil ist wesentlich geringer. Die mesenchymalen Zellen differenzieren sich nun zu glatten Muskelzellen und Fibroblasten. Zwischen dem 9.-13. Entwicklungstag bilden die Arteriolen im Endothel multiple interzelluläre Verbindungen aus, die in den Venolen nur punktuell auftreten. Die Arteriolen und Venolen werden von großlumigen Lymphgefäßen begleitet, die von einem Endothel ausgekleidet sind, jedoch keine Basalmembran besitzen [6].

Endogene Wachstumsfaktoren der CAM

Einen wichtigen endogenen Faktor während der CAM Entwicklung scheint FGF-2 darzustellen [90]. Die Konzentration von FGF-2 verändert sich während der Entwicklung, wobei das Maximum zwischen dem 10.-14. Entwicklungstag erreicht wird [92]. Entwicklungsabhängig wird FGF-2 auch von verschiedenen Zellen exprimiert. So wurde bereits am 5. Entwicklungstag mRNA von FGF-2 in Chorionepithelzellen nachgewiesen. Am 10. Tag wird sowohl im Chorionepithel als auch in den Endothelzellen des Kapillarplexus FGF-2 produziert. Ab Tag 15 übernehmen die Endothelzellen eine vermehrte FGF-2-Produktion, das Chorionepithel hingegen bildet weniger des Wachstumsfaktors [90]. Anti-FGF-2 Antikörper verhindern eine Neovaskularisation, wenn sie am Tag 8 auf die CAM appliziert werden. In der ersten Sekretionsphase durch das Chorionepithel scheint FGF-2 die Angiogenese in den undifferenzierten CAM-Gefäßen zu stimulieren [75]. Zu einem späteren Zeitpunkt scheint FGF-2 autokrin auf die Entwicklung der Endothelzellen zu wirken.

1.5.4 Die CAM als in vivo-Modell

Die Chorionallantoismembran des Hühnerembryos eignet sich aufgrund ihrer einfachen Handhabung sowie vielseitigen Anwendbarkeit für unterschiedliche Tests im medizinischen Forschungsbereich. Befruchtete Hühnereier sind billig und problemlos zu beschaffen. Zudem ist für die Experimente die Beantragung von Tierversuchen nicht erforderlich. Effekte auf der CAM sind schnell und direkt sichtbar. Manipulationen lassen sich am offenen Hühnerei problemlos vornehmen und sind sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch gut zu beurteilen. Aus diesen Gründen wird die CAM schon seit längerer Zeit als in vivo-Modell für verschiedenste Untersuchungen verwendet.

Zytotoxizitätstests

Historisch gesehen wurde die CAM zuerst zur Testung von Substanzen hinsichtlich ihrer Zelltoxizität und Membranirritation verwendet. Für solche Zytotoxizitätsuntersuchungen ist der Name HET-CAM-Assay (hen's egg test-chorio-allantoic-membrane-Assay) gebräuchlich. Schon 1967 wurden von D'Arcy et al. erste Untersuchungen zur Entzündungshemmung mit steroidal und nichtsteroidal Antiphlogistika durchgeführt. Sie verwendeten Filterpapierscheiben, die auf der CAM appliziert eine chronische Entzündungsreaktion mit Granulombildung auslösten. Durch Tränken der Plättchen mit verschiedenen antiphlogistischen Substanzen konnte eine Reduktion der Entzündungsreaktion in Abhängigkeit von der Testsubstanz gezeigt werden. Die Daten waren mit denen aus klinischen Untersuchungen vergleichbar [30]. Der HET-CAM-Assay eignet sich zum Screening auf akute und chronische Toxizität. Auch können Aussagen zur Entwicklungstoxikologie getroffen werden. Damit reduziert sich die Zahl der für solche Untersuchungen benötigten Versuchstiere erheblich [71]. Seit 1992 werden in Deutschland HET-CAM Ergebnisse zur Klassifizierung schwer augenreizender Chemikalien akzeptiert, die sonst am offenen Kaninchenaugen durchgeführt werden [107]. Vorteilhaft erweisen sich der geringe Substanzbedarf und der hohe Probendurchsatz, sowie die Beurteilbarkeit behandelter und unbehandelter Areale am gleichen Organismus.

Studien zur Angiogenese/Antiangiogenese

Im Laufe der Zeit wurde eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren sowie Angiogenese induzierenden und hemmenden Substanzen auf der CAM getestet [93,94]. Eine schematische Darstellung zur Wirkung von FGF-2 als Angiogeneseinduktor sowie TNP-450 als Angiogeneseinhibitor gibt Abbildung 10.

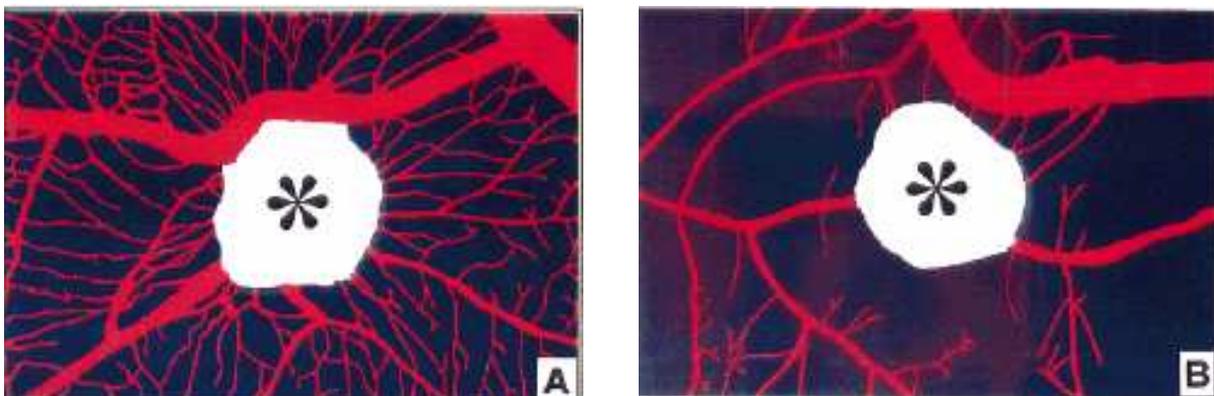


Abbildung 10: A. Wirkung von FGF-2 B. Wirkung von TNP-450 beides nach Applikation auf 12 Tage alte CAM [nach 95]

Die angiogene Antwort erscheint als Gefäßreaktion auf der CAM nach 72-96 Stunden in Form eines radiären Gefäßwachstums auf den Stimulus zu. Dies führt zum sog.

speichenradförmigen Wachstum. Gefäßreaktionen, die schon nach 24 Stunden auftreten, werden eher einer Vasodilatation zugerechnet und nicht der Angiogenese, die als komplexer Prozess mehr als 24 Stunden Zeit benötigt [95]. Bei antiangiogenen Substanzen zeigt sich eine radiäre Gefäßreduktion um den Stimulus herum.

Verschiedene Arbeitsgruppen favorisieren die unterschiedlichsten Applikationsformen zur Auftragung der Substanzen auf die CAM. Langner und Folkman haben schon 1976 Testsubstanzen in biologisch inerte synthetische Polymere (Elvax 40, Hydron) eingebettet, um eine kontinuierliche Freisetzung zu gewährleisten. Jedoch mussten die Substanzen dazu entweder in Ethanol oder Methylenchlorid gelöst werden [64]. Nguyen et al. haben vorgeschlagen, die Testsubstanz als eine Art Sandwich in ein Kollagengel zwischen 2 Kunststoffnetze einzubetten, in die die Kapillaren einwandern können [81].

Weitere Applikationsformen ergeben sich aus der Auftragung befeuchteter Filterpapierplättchen [11], Methylcelluloseplättchen [52], getränkter Gelatineschwämmchen [89] oder einfach als Tropfen einer Suspensionslösung. Die Effekte sind dann lokal begrenzt. Um die gesamten CAM-Gefäße zu erreichen, kann mit einer feinen Kanüle auch unter die CAM in die Allantoishöhle injiziert werden [91].

Sonst vorwiegend bei Mäusen eingesetzt wird eine Methode, bei der Suspensionen oder Zellen in einer Matrigel-Matrix unter die Haut implantiert werden. In dieser Arbeit wurde dieses Verfahren adaptiert und auf die CAM übertragen.

Einen Überblick über bereits auf der CAM getestete Substanzen geben die Tabellen 3 und 4.

Tabelle 3: Auf der CAM getestete angiogene Substanzen [nach 93]

Autor	Substanz
Esch et al. (1985) Wilting et al. (1991) Olivo et al. (1992) Ribatti et al. (1995) Fett et al. (1985)	Basic fibroblast growth factor (bFGF) or Fibroblast growth factor-2 (FGF-2)
Fett et al. (1985) Wilting et al. (1991) Olivo et al. (1992)	Angiogenin
Leibovich et al. (1987) Olivo et al. (1992)	Tumor necrosis factor alpha (TNF-a)
Yang and Moses (1990)	Transforming growth factor beta (TGF-b)
Wilting et al. (1992)	Platelet derived growth factor (PDGF)
Wilting et al. (1992, 1993)	Vascular endothelial growth factor (VEGF)
Ziche et al. (1997)	Placenta growth factor-1 (PIGF-1)
Bouloumie et al. (1998) Ribatti et al. (2001)	Leptin
Ribatti et al. (1999b)	Erythropoietin (EPO)
Ramoshebi and Ripamonti (2000)	Osteogenic protein-1 (OP-1)

Bernardini et al. (2000)	CC chemokine I-309
Fraser et al. (1979)	Adenosindiphosphat (ADP)
Form und Auerbach (1983)	Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)
Thompson et al. (1982,1985)	Fibrin-Abbauprodukte
Mc Auslan et al. (1983)	Heparin
Ribatti et al. (1987)	
West et al. (1985)	Abbauprodukte von Hyaluronsäure
Morris et al. (1988)	Phorbol ester

Tabelle 4: Auf CAM getestete antiangiogene Substanzen [nach 94]

Autor	Substanz
Ribatti et al. 1995	Anti-FGF-2 Antikörper
Shapiro et al. 1987	Anti-Angiogenin Antikörper
Shapiro et al. 1989	
Rybak et al. 1989	
Fett et al. 1994	
Gho et al. 1997	
Ziche et al. 1997	Anti-PlGF-1 Antikörper
Cozzolino et al. 1991	Interleukin-2
O'Reilly et al. 1994	Angiostatin
O'Reilly et al. 1997	Endostatin
Taylor et al. 1982	Protaminsulfat
Tanaka et al. 1986	
Maione et al. 1990	Plättchenfaktor-4
Lapierre et al. 1996	Heparanaseinhibitoren
Nguyen et al. 1993	Pentosanpolysulfat
Tressler et al. 1996	GM1474
Hahnenberger et al. 1993	nicht-oder gering-sulfatierte Saccharide
Chen et al. 1988	Arylsulfataseinhibitor
Nakamura et al. 1992	sulfatiertes Polysaccharid-Peptidoglycan
Folkman et al. 1989	Alpha, beta, gamma-Cyclodextrin
Gagliardi et al. 1992	Suramin
Danesi et al. 1993	
Takano et al. 1994	
Morris et al. 1997	
Gagliardi et al. 1998	
Woltering et al. 1991	Somatostatin
Barrie et al. 1993	
Patel et al. 1994	
Danesi et al. 1997	
Wernert et al. 1999	Fumagillin
Ashino et al. 1992	Tyrosinkinaseinhibitoren
Oikawa et al. 1993	
Takano et al. 1994	
Eliceiri et al. 1998	

Studien zu Genvektoren

Zur Untersuchung, ob sich die CAM für Transfektionsuntersuchungen eignet, wurden von Pfeifer et al. Lentiviren mit der Hämopexindomäne der MMP 2 transfiziert. An dieser Domäne können Inhibitoren binden, die zur Inaktivierung der Protease führen (siehe auch Matrixmetalloproteasen). Auf der CAM wurde durch bFGF die Angiogenese induziert und dann die transfizierten Viren zupipettiert. Nach 64 Stunden wurde die CAM präpariert, das Hämopexin konnte mittels Western-Blot in der CAM nachgewiesen und die bFGF- induzierte Angiogenese um 1/4-1/8 reduziert werden [85].

Auch Antisense-Oligodesoxynukleotide konnten zur Transfektion von CAM-Gewebe verwendet werden. In einer Arbeit von Wernert et al. wird über die Hemmung der Angiogenese durch ets-1 Antisense-Oligodesoxynukleotide berichtet. Ets-1 wird als Transkriptionsfaktor eine Beteiligung an der Angiogenese zugesprochen. Seine Hemmung führt auf der CAM zu einer deutlichen Gefäßreduktion innerhalb von 2 Tagen. Die Verwendung von Sense-Oligodesoxynukleotiden bzw. Transfektionslösung allein als Negativkontrolle führten zu keiner Veränderung [121].

Photosensitizer/Photodynamische Therapie

Mittels photodynamischer Therapie wird versucht, Erkrankungen, die mit einer Neubildung von Blutgefäßen einhergehen (wie z.B. altersabhängige Maculadegeneration, Hämangiome, einige Tumoren) zu therapieren. Es werden dazu Photosensitizer intravenös appliziert, die sich möglichst in den pathologischen Gefäßen anreichern. Nach Bestrahlung des Areals mit Licht einer bestimmten Wellenlänge kommt es zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen, die zu einer Zerstörung des umliegenden Gewebes führen [28].

Die Chorionallantoismembran wurde dabei zur Testung verschiedener Photosensitizer eingesetzt. Lange et al. haben in einer Arbeit von 2001 ein Benzoporphyrinderivat (BPD-MA benzoporphyrine derivative monoacid ring A) intravenös in die CAM appliziert und mit Licht mit einer Wellenlänge von 440nm bestrahlt. Die Ergebnisse der zerstörten CAM-Gefäße wurden nach 24 Stunden durch eine Fluoreszenzangiographie verifiziert (siehe Abbildung 11). Bei höheren BPD-MA Konzentrationen und höheren Lichtdosen konnte sogar ein Sistieren des Blutflusses innerhalb von 60min festgestellt werden. Diese Resultate korrelieren gut mit bereits durchgeführten klinischen Studien [63].

Weitere Untersuchungen mit Tumorgeweben zeigten ähnliche Erfolg versprechende Resultate auf der CAM [51,24].

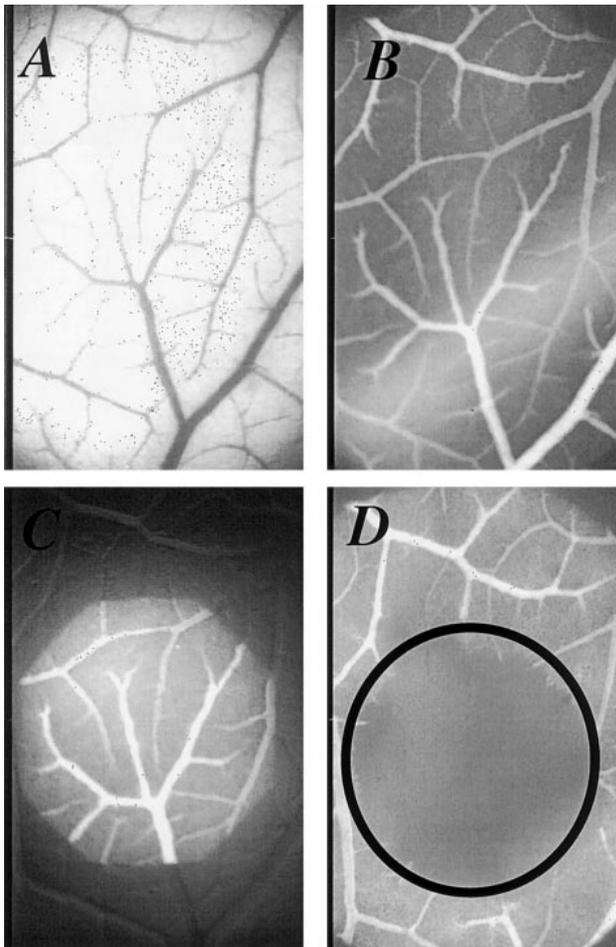


Abbildung 11: Photodynamische Therapie mit BPD-MA auf CAM A: Autofluoreszenz der CAM, B: Fluoreszenzangiographie mit BPD-MA nach intravenöser Injektion, C: Demarkierung des Bestrahlungsareals, D: Fluoreszenzangiographie 24 h nach Bestrahlung (40 J/cm^2 , $\lambda=440 \text{ nm}$) [63]

Drug-Targeting

Drug-Targeting bezeichnet einen Mechanismus, bei dem versucht wird, Arzneistoffe so zu verändern, dass sie an bestimmten Zielstrukturen akkumulieren. So wäre es für bestimmte Erkrankungen von Vorteil, wenn Arzneistoffe, systemisch verabreicht, nur bestimmte Zielgebiete, wie beispielsweise Entzündungsareale oder Tumorgewebe ansprechen würden und damit, bei gleichzeitiger Wirkungsverstärkung im Zielgebiet, die systemischen Nebenwirkungen reduziert werden könnten. In den letzten Jahren wurden viele Versuche unternommen Strukturen zu finden, die sich vermehrt im Erkrankungsgebiet befinden und targetieren lassen.

Selektine

Für Erkrankungen des entzündlichen Formenkreises konnten als mögliche Zielstrukturen die Selektine gefunden werden. Dabei handelt es sich um kohlenhydrat-bindende Adhäsionsmoleküle, die die Interaktionen von Leukozyten mit dem Gefäßendothel vermitteln.

In einer frühen Phase der Adhäsionskaskade initiieren Selektine eine rollende Verlangsamung der im Blutstrom fließenden Leukozyten entlang des Gefäßendothels. Somit wird die Voraussetzung zur Bindung weitere Adhäsionsmoleküle, wie Integrine und Immunglobuline, geschaffen, die eine feste Bindung der Leukozyten am Endothel und schließlich deren Emigration ins Gewebe bewirken [12].

Bei vielen chronisch entzündlichen Erkrankungen kommt es zu einer vermehrten und damit pathologischen Ansammlung von Leukozyten im Gewebe. So infiltrieren beispielsweise bei der rheumatoiden Arthritis Leukozyten die Synovialis und setzen durch Ausschüttung von Entzündungsmediatoren einen Prozess in Gang, der letztlich zur völligen Destruktion des entsprechenden Gelenkes führen kann. E-Selektine scheinen hier eine wesentliche Rolle zu spielen, da ihre Anreicherung im rheumatoiden Gewebe nachgewiesen werden konnte [29].

Außerdem vermitteln Selektine die Bindung verschiedener Krebszellen aus dem Blutstrom an das Gefäßendothel und ermöglichen damit die anschließende Gewebeinvasion und Metastasenbildung [14]. E-Selektin wird beispielsweise im Prostata-Karzinom überexprimiert und eignet sich, wie in Versuchen an SCID-Mäusen gezeigt werden konnte, als Zielstruktur für eine Tumorthherapie [13].

Selektine stellen somit einen viel versprechenden Ansatzpunkt sowohl für ein antiinflammatorisches Drug-Targeting als auch für eine Tumorthherapie dar. Da die komplexen Vorgänge in-vitro nur unzureichend dargestellt werden können, wurde in einer Arbeit von Schüller (2005) ein in-vivo Modell zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Selektin und Endothel an der Chorionallantoismembran des Hühnchens entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass sich das CAM-Modell zur Untersuchung der Selektin-Liganden-Wechselwirkungen eignet und Selektine auch im Hühnerembryo zu einer Verlangsamung des Rollverhaltens der Modell-Zellen führen [99].

Amino-peptidase N (APN)

Auch das spezifische Erkennen angiogenetisch aktiver Endothelzellen ist speziell für die Tumorthherapie von herausragender Bedeutung. In diesem Zusammenhang konnte in den letzten Jahren Amino-peptidase N (CD13) als Marker für Tumorangio-genese identifiziert werden. Endothelzellen von Tumorgefäßen tragen z. T. andere Oberflächenmoleküle als normale Endothelzellen bzw. in höheren Konzentrationen. So findet sich auf Tumorendothelzellen eine vermehrte Expression von Integrinen, Selektinen, Wachstumsfaktorrezeptoren und Amino-peptidase N (APN).

Hinweise darauf, dass sich auch die CAM als Modell für Untersuchungen an APN eignet, gibt eine Arbeit von Pasqualini et al. (2000). Es ist möglich, mittels APN-anti-Maus-Antikörper

CAM Gefäße zu detektieren und antiangiogene Wirkungen des APN-Antikörpers aufzuzeigen. Auch wird auf die antiangiogenetische Wirkung von APN Inhibitoren, wie Bestatin oder Actinonin hingewiesen [85].

1.6 Tumoren

Tumorerkrankungen stellen einige der häufigsten Todesursachen in Deutschland dar. Da ein flächendeckendes Krebsregister bisher fehlt, sind genaue Aussagen zu Krebshäufigkeiten in Deutschland nicht möglich. Für epidemiologische Daten wird häufig das Krebsregister des Saarlandes oder das gemeinsame Krebsregister der 5 neuen Bundesländer und Berlin herangezogen. In der Todesursachenstatistik des statistischen Bundesamtes stehen das Bronchialkarzinom bei Männern und das Mamma-Karzinom bei Frauen an erster Stelle der auf Tumorerkrankungen zurückzuführenden Todesursachen. Sowohl bei Männern, als auch bei Frauen findet sich unter den 3 häufigsten Todesursachen infolge Tumorerkrankung das kolorektale Karzinom mit zunehmender Inzidenz [109].

Bei der Behandlung von Tumoren stellen die Invasivität und das Metastasierungsverhalten die größten Probleme dar. Viele Patienten haben bei Diagnosestellung bereits Fernmetastasen oder lebenswichtige Organe sind derart infiltriert, dass eine chirurgische Therapie nur unzureichend durchgeführt werden kann. Selbst bei metastasenfremen Patienten, bei denen eine vollständige Tumoresektion vorgenommen wurde, entwickeln sich in Abhängigkeit des Primärtumors noch Fernmetastasen. Mögliche Therapieoptionen sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung.

1.6.1 Tumorentwicklung

Tumorzellen entstehen durch eine Fehlregulation der normalen Proliferations- und Differenzierungsvorgänge der Zelle. Eine große Zahl der inzwischen identifizierten krebsauslösenden Oncogene beruht auf Mutationen von Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren und Proteinen, die für die weitere Signaltransduktion ins Zellinnere verantwortlich sind. Solche Veränderungen des Genoms können durch unterschiedliche exogene und endogene Einflüsse verursacht werden. Eine Vielzahl chemischer und physikalischer Noxen führen zu direkten Schäden an der DNA. So löst ultraviolettes Licht eine Thymindimerisierung der DNA aus. Jedoch auch Infektionen mit Viren oder Bakterien können zu einer erhöhten Tumorentstehung führen. Bei Helicobacter pylori-Infektionen der Magenschleimhaut treten gehäuft Magenkarzinome auf. Unumstritten ist auch das mehrfach erhöhte Risiko nach Papillomavireninfektion ein Zervixkarzinom zu entwickeln.

Liegen Veränderungen von bestimmten Genen aber bereits in der Keimbahn vor, entsteht eine Krebserkrankung leichter und in früherem Lebensalter. Es sind u.a. Keimbahnmutationen bekannt, die bestimmte DNA-Reparaturenzyme betreffen und im Zusammenspiel mit exogenen Faktoren zu einer Häufung von Tumorerkrankungen führen.

Solche entarteten Zellen proliferieren weitaus schneller als normale Zellen. Ist eine Größe von 2-3 mm³ erreicht, kann der Tumor sich nicht mehr ausschließlich per diffusionem aus dem umliegenden Gewebe versorgen. Das Tumorstadium stoppt und kann in diesem Stadium Monate bis Jahre verbleiben. Für ein weiteres Wachstum ist eine Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen über das Blutgefäßsystem nötig.

1.6.2 Versorgung des wachsenden Tumors

Diffusion

In Geweben kann eine Sauerstoffversorgung durch Diffusion bis ca. 100µm zwischen Kapillaren und Zellen gewährleistet werden. Das entspricht ungefähr 3-5 Zellreihen, die um eine Kapillare angeordnet sind. Entfernen sich die Zellen durch starkes Wachstum weiter von der Kapillare, entsteht ein Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen. Die Zellen sterben ab und es entwickelt sich ein Gleichgewicht zwischen Neubildung und Zelltod. In diesem Stadium kann der Tumor maximal eine Größe von 2-3mm³ erreichen [35]. Diese prävasculäre Phase des Tumors kann Monate bis Jahre als Carcinoma in situ bestehen bleiben.

Neoangiogenese/ angiogener Switch

Verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen proangiogenen und antiangiogenen Faktoren im Tumor zugunsten der Angiogenese, kommt es zu sog. angiogenen Switch. Dieser Prozess wird durch unterschiedliche Faktoren getriggert. Dazu zählen niedriger Sauerstoffpartialdruck, Hypoglycämie, mechanischer Stress (Druckerhöhung durch proliferierende Zellen), Entzündungsreaktionen oder genetische Mutationen [59]. Tumorzellen können über verschieden Wege zur Angiogeneseinduktion führen. Sie können proangiogene Moleküle überexprimieren, antiangiogene unterdrücken oder angiogene Proteine aus der extrazellulären Matrix (ECM) herauslösen oder z.B. Makrophagen anlocken, die wiederum ihre eigenen angiogenen Proteine produzieren. Dabei wird ein komplexer Prozess in Gang gesetzt, der dem normalen Angiogenesevorgang ähnlich ist (siehe Angiogenese unter 1.1.1).

1.6.3 Prozesse der tumorinduzierten Neoangiogenese

Bereits vor 30 Jahren postulierte Judah Folkman die Hypothese, dass für die Versorgung von Tumoren einer bestimmten Größe und deren Metastasierung ein Gefäßnetzwerk induziert werden muss. Es wurde damals angenommen, dass der Übergang in die angiogene Phase durch einen „Tumor-Angiogenese-Faktor“ (TAF) getriggert würde. Solch ein eigener „Tumor-Angiogenese-Faktor“ konnte zwar nicht identifiziert werden, aber dafür eine Vielzahl angiogener Faktoren, die auch in physiologischen Angiogeneseprozessen eine Rolle spielen. Tumorangiogenese ist eng an die Möglichkeit der Metastasierung geknüpft. Über die einwachsenden Blutgefäße können Tumorzellen mit dem Blutstrom in entfernte Organe gelangen und dort neue Metastasen ausbilden. Reich vaskularisierte Tumoren bilden häufiger Metastasen als schlecht vaskularisierte. Weidner et al. prägten in diesem Zusammenhang den Begriff der microvessel density (MVD). Histologische Untersuchungen an invasiven Mamma-Karzinomen zeigten eine Korrelation zwischen Anzahl und Dichte der Mikrogefäße im Primärtumor und der Metastasierungshäufigkeit [121]. Weitere Untersuchungen ergaben, dass MVD auch als unabhängiger prognostischer Faktor der Tumorerkrankung angesehen werden kann [37]. Dieser Zusammenhang konnte auch für andere Tumoren nachgewiesen werden.

VEGF

VEGF ist in nahezu allen humanen Tumoren in erhöhten Konzentrationen nachweisbar [67]. Einen entscheidenden Faktor zur Transkription von VEGF stellt der Sauerstoffmangel dar. Am VEGF-Promotor befindet sich eine Bindungsstelle für hypoxia-inducible-factor 1 α (HIF-1 α), durch dessen Bindung die Transkription angeregt wird.

VEGF kann die Permeabilität der Endothelzellen sowohl durch Erleichterung des Transports von Metaboliten durch die Zelle als auch durch Lockerung von interzellulären Verbindungen erhöhen. Eine erhöhte Permeabilität erlaubt die Extravasation von Plasmaproteinen, die sich wiederum günstig für eine Zellmigration erweist. Der Flüssigkeitsaustritt aus den Gefäßen führt im umliegenden Gewebe zu einem erhöhten interstitiellen Druck. Daraus resultiert ein verminderter Druckgradient vom Intravasalraum zum Interstitium, der eine verminderte Filtration nach sich zieht [79]. Der erhöhte interstitielle Druck wiederum führt zu einer Gefäßkompression und Minderversorgung des Tumors [74], aus der eine vermehrte VEGF-Produktion resultiert. Über diesen Mechanismus lässt sich das gleichzeitige Vorkommen hyperperfundierter und hypoxischer Areale im Tumor erklären. Verschiedene Studien belegen einen Zusammenhang zwischen der Höhe der VEGF-Produktion, Vaskularisationsgrad des Tumors und Prognoseverschlechterung im Krankheitsverlauf [124,87].

Durch diese zentrale Stellung von VEGF im Angiogeneseprozess war ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt zur Hemmung des Tumorwachstums wahrscheinlich. Eine Hemmung der Angiogenese kann zwar nicht als kurative Therapie gelten, da sich kleine Tumoren trotzdem entwickeln können, jedoch könnte die Erkrankung in ein chronisch, nicht fortschreitendes Stadium überführt werden.

FGF

Die FGF-Wachstumsfaktoren bilden eine weitere wichtige Gruppe angiogener Faktoren im Rahmen der Tumorentwicklung. bFGF induziert die Expression antiapoptotischer Proteine, wie bcl-XL oder bcl-2, und verhindert somit die Endothelzellapoptose. Auch führt eine Überexpression zur Erhöhung der VEGF Produktion und umgekehrt wird eine durch bFGF induzierte Tumorentwicklung durch Antikörper gegen VEGF-Rezeptoren gehemmt. aFGF und bFGF stimulieren die Endothelzellproliferation und -migration, sowie die Produktion von plasminogen activator (PA) und Kollagenasen. Somit können auch diese Wachstumsfaktoren zur Umgestaltung der extrazellulären Matrix beitragen. Erhöhte bFGF-Spiegel im Primärtumor von Nierenkarzinompatienten gehen mit einer schlechteren Überlebensrate einher [78].

Angiopoetin

Angiopoetine spielen auch in der Tumorangiogenese eine entscheidende Rolle. Ang-2, das antagonistisch zu Ang-1 wirkt, trägt auch in Tumorgefäßen zu einer Gefäßdestabilisierung bei, die aber mit einer erhöhten Modulierbarkeit und einem verbesserten Ansprechen des Gefäßendothels auf VEGF verbunden ist [72]. Tumoren sind in der Lage, bereits bestehende Gefäße für sich einzunehmen und dann in tumoreigene Gefäße umzubauen. Bei diesem Prozess kommt es zu einer Gefäßdestabilisierung und erst in einem zweiten Schritt zur Ausschüttung angiogener Faktoren. An diesem Gefäßumbauprozess ist Ang-2 in wesentlichem Maße beteiligt.

Transforming-growth-factor β

Transforming-growth-factor β (TGF- β) reguliert Zellwachstum und Differenzierung, Bildung extrazellulärer Matrixproteine sowie zelluläre Adhäsionsprozesse. TGF- β wird von der Zelle als biologisch inaktive Form sezerniert und extrazellulär durch Proteasen, wie Plasmin, zur aktiven Form gespalten [65].

TGF- β greift über die Hemmung von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (cyclin-dependent kinase CDK) direkt in den Zellzyklus ein. Dies führt zum Arretieren des Zellzyklus

in der späten G1-Phase. Eine DNA-Replikation und nachfolgende Zellteilung wird damit gestoppt.

Bindung von TGF- β an den TGF- β -Rezeptor führt über eine Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen zum Abbau der ECM sowie über uPA zur EC-Proliferation und Migration. TGF- β_1 ist assoziiert mit Tumorprogression durch eine Erhöhung der VEGF Expression beim Magenkarzinom und Hemmung der Angiostatinbildung, einem antiangiogenen Molekül, bei Pankreaskarzinomzellen. In einigen Tumorzelllinien konnte eine Aktivitätserhöhung von Matrixmetalloprotease-2 und des uPA-Systems nach TGF- β Behandlung nachgewiesen werden [31].

Interleukin-8 und Matrix-Metalloproteasen (MMP)

Interleukin-8 (IL-8) ist in neoplastischen Geweben wie z.B. dem nicht kleinzelligen Lungenkarzinom hochreguliert und verbunden mit Neovaskularisation und Tumorprogression. IL-8 transfizierte Zellen exprimieren ein höheres Maß an MMP-2 als unbehandelte, nicht aber vermehrt VEGF oder bFGF. IL-8 kann in Tumoren durch Hypoxie hochreguliert werden. MMP's unterstützen die Tumorangio-genese durch einen Abbau der ECM und Freisetzung von angiogenen Faktoren.

Oncogene und Tumorsuppressorgene

In Tumoren sind bestimmte Oncogene dauerhaft aktiviert und Tumorsuppressorgene inaktiviert. So können Wachstumsfaktoren, wie VEGF, TNF- α , TGF- β überexprimiert werden. Im Gegensatz dazu sind Tumorsuppressorgene inaktiviert. Eines der wichtigsten Proteine in der Regulation des Zellzyklus ist p53. Dieses Protein, das einerseits Angiogeneseinhibitoren wie Thrombospondin-1 induziert und über eine Downregulation von VEGF zur Hemmung Hypoxie-induzierter Angiogenese führt, andererseits auch die Apoptose und Bildung antiangiogener Substanzen fördert, ist im Tumorgewebe häufig verändert, so dass diese Regulationsvorgänge nicht mehr ausgeführt werden können [23]. Mutationen im p53-Gen können als unabhängiger prognostischer Faktor im Rahmen der Tumorerkrankung angesehen werden [37].

1.6.4 Angiogeneseinhibitoren und ihre Rolle beim Tumorwachstum

Die Idee Tumorerkrankungen durch Hemmung der Angiogenese zu behandeln, wurde erstmalig vor ca. 30 Jahren von Judah Folkman geäußert. Denn, wenn die Angiogenese so eng an das Tumorwachstum geknüpft ist, müsste sich das Wachstum durch eine Hemmung der Blutgefäßneubildung eindämmen lassen. Es konnten bereits viele endogene und auch künstlich hergestellte Angiogeneseinhibitoren gefunden werden.

Grundsätzlich kann eine Hemmung der Angiogenese über verschiedene Zielstrukturen erfolgen:

- Hemmung von Wachstumsfaktoren, die die Endothelzellproliferation unterstützen
- Hemmung von Proteasen, die für den Abbau der Basalmembran und Bildung neuer Blutgefäße notwendig sind
- Unterbrechung spezifischer intrazellulärer Transduktionswege
- Induktion von Endothelzellapoptose
- Proliferationshemmung der endothelialen Vorläuferzellen im Knochenmark

Bisher wurden mehr als 40 endogene Angiogeneseinhibitoren identifiziert, darunter Interferone (INF), Interleukine (IL) und Metalloproteinasehemmer (MMP-Inhibitoren).

Interferone

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Interferon- α/β die Expression proangiogener Faktoren wie MMP-9 und bFGF, die Endothelzellmigration, sowie Interferon- γ die bFGF und VEGF-Expression zumindest in einzelnen Tumoren herabsetzen kann. Die antiangiogenen Effekte von Interferonen sollen über Regulation von verschiedenen angiogenen Faktoren erfolgen [104]. Weiterhin besitzen Interferone direkte zytotoxische Eigenschaften auf Tumorzellen und unterstützen das wirtseigene Immunsystem bei der Tumorbekämpfung, indem MHC-Moleküle und tumorassoziierte Antigene hochreguliert werden. Dadurch kommt es zur effektiveren Aktivierung von Makrophagen, T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen mit deren Hilfe Tumorzellen zerstört werden können [27].

Interleukine

Bei Interleukinen handelt es sich um Proteine, die von Leukozyten sezerniert werden und verschiedene Regulationsvorgänge im Körper beeinflussen. Interleukine mit Glu-Leu-Arg am Aminoende, wie z.B.:IL-8, unterstützen die Angiogenese. Im Gegensatz dazu können Interleukine, die diese Sequenz nicht besitzen die Angiogenese hemmen. So hemmt z.B.: IL-4 die durch bFGF induzierte Neovaskularisation in der Rattencornea und blockiert die Migration von Endothelzellen in vitro [118]. IL-12 vermindert die Expression von VEGF mRNA, bFGF und MMP-9 mRNA. Zusätzlich kann es die Bildung von INF- γ stimulieren und damit die Hemmung der Angiogenese verstärken.

MMP-Inhibitoren

Metalloproteinasen sind Enzyme, die zum Abbau der ECM beitragen und somit einen wichtigen Schritt der Angiogenese unterstützen. Stoffe, die zur Hemmung dieser Enzyme

beitragen, verhindern gleichermaßen auch die Bildung neuer Blutgefäße. TIMP's (tissue inhibitors of metalloproteinase) hemmen sowohl MMP-1, MMP-2 als auch MMP-9.

Außerdem haben sie auch eine direkte Wirkung auf Endothelzellen. So hemmt TIMP-2 beispielsweise eine bFGF induzierte Endothelzellproliferation in vitro [77]. Überexpression von TIMP-3 induziert Apoptose in einigen Tumorzelllinien und glatten Muskelzellen in Blutgefäßen von Ratten [105,8].

Angiostatin

Einen weiteren Angiogeneseinhibitor stellt Angiostatin dar. Angiostatin ist ein 38-kDa großes Fragment von Plasminogen und vermag die VEGF-Expression im Tumorgewebe herabzuregulieren [42]. Intraperitoneale Instillation von Angiostatin hemmt bei Mäusen Gefäßneubildung und Metastasierung nach Entfernung des Primärtumors. Andere Studien haben gezeigt, dass Angiostatin die Apoptose von Endothel- und Tumorzellen erhöht und die Gefäßdichte im Tumor abnimmt [40].

Endostatin

Endostatin hemmt die Endothelzellproliferation, Angiogenese und Tumorwachstum. Endostatin, ein 20-kDa großes Fragment von Kollagen-Typ XVIII, greift in den Signaltransduktionweg von VEGF ein. Es behindert einerseits die VEGF-Bindung an ihrem Rezeptor KDR/Flk-1 und hemmt andererseits die intrazelluläre Signaltransduktion. Rehn et al. haben gezeigt, dass Endostatin die Endothelzellmigration durch Beeinflussung von Integrinen hemmt [89]. Ein anderer angiogener Effekt ergibt sich aus der Konkurrenz um Bindungsstellen an Heparansulfatproteoglycanen, die sich auf Zelloberflächen befinden und bFGF zur Signaltransduktion benötigt. Endostatin besitzt auch proapoptotische Wirkung, die über Tyrosinkinasen und Reduktion des antiapoptotischen Proteins bcl-2 vermittelt wird [89].

Thrombospondin-1

Thrombospondin-1 (TSP-1) ist ein natürlich vorkommender Angiogeneseinhibitor, der die Gefäßdichte in normalem Gewebe begrenzt und das Tumorwachstum einschränkt.

TSP-1 bindet am CD 36-Rezeptor und setzt auf diese Weise einen apoptotischen Signaltransduktionsweg in Gang. Interessanterweise funktioniert der Apoptosemechanismus nur bei aktivierten, d. h. an Gefäßneubildung beteiligten Endothelzellen. Ruhende Endothelzellen bleiben verschont [40].

1.7 Therapieansätze in der Tumorbehandlung

Neben der chirurgischen Intervention stehen in der Tumorbehandlung folgende Optionen zur Verfügung: Zytostatikatherapie, Hormontherapie, Radiatio und neuerdings auch Angiogenesehemmung. Häufig werden diese Verfahren in Kombination eingesetzt. Die chirurgische Intervention erfolgt meist mit kurativer Zielsetzung bei lokal oder lokoregionär begrenzten soliden Tumoren mit entsprechender Radikalität zur Resektion im Gesunden. Palliative Operationen kommen zur Beseitigung von Komplikationen in Betracht.

1.7.1 Zytostatika und ihre Wirkprinzipien

Die antineoplastische Chemotherapie verwendet Substanzen mit antiproliferativen Eigenschaften zur Vernichtung maligner Zellen. Intensiv proliferierende Zellen sind besonders sensibel für Chemotherapeutika. Insbesondere in der S-Phase des Zellzyklus lassen sich leicht Schäden an der DNA setzen, die zelluläre Apoptosemechanismen einleiten. Die meisten Pharmaka greifen in spezifische Phasen des Zellzyklus ein.

Antimetabolite, wie 5-Fluorouracil oder 6-Mercaptopurin, werden anstatt der Pyrimidin- bzw. Purinbasen in die DNA eingebaut und hemmen dadurch die Synthesephase. Methotrexat hemmt die zur Synthese der Nukleotide notwendige Dihydrofolsäure-Reduktase und führt darüber zu einem Mangel dieser DNA-Bausteine.

Alkylierende Substanzen sind reaktive Verbindungen, die Alkyl-Reste auf die DNA übertragen. Das korrekte Ablesen der genetischen Information wird damit unmöglich. Zu diesen Substanzen zählen unter anderem Azathioprin und Cyclophosphamid.

Vinca-Alkaloide, wie Vincristin und Vinblastin, hemmen kontraktile Proteine der Mitosespindel, durch Depolymerisation der Tubulinuntereinheiten. In der Kernteilungsphase wird das Auseinanderziehen der verdoppelten Chromosomen verhindert, die Mitose stoppt in der Metaphase.

Zytostatische Antibiotika lagern sich in den DNA-Doppelstrang ein und führen zu Strangbrüchen.

Entsprechend ihrer Wirkungsmechanismen werden bei der Zytostatikatherapie auch Gewebe mit physiologisch hoher Mitoserate in Mitleidenschaft gezogen. Um Nebenwirkungen möglichst gering zu halten und Tumorresistenzen zu umgehen, wird in der Regel eine Kombinationstherapie verschiedener Substanzen angewandt.

1.7.2 Hemmung der Hormonproduktion bei hormonabhängigen Tumoren

Das Wachstumsverhalten verschiedener Tumore ist vom hormonellen Milieu des Patienten abhängig. Antihormonelle Therapien werden beim Mamma-, Prostata- und Endometriumkarzinom angewandt. Bei der Behandlung des Mammakarzinom kommen

Antiöstrogene, Gestagene, Aromatasehemmer und Gonadotropin-Releasing-Hormone (GnRH) zum Einsatz. GnRH vermindert die GnRH-Rezeptoren der Hypophyse und reduziert damit die Hormonproduktion der Gonaden. Über eine Hemmung der Östrogenbiosynthese im peripheren Gewebe wirken Aromatasehemmer.

GnRH wird auch in der Therapie des Prostatakarzinoms eingesetzt.

1.7.3 Radiatio

Energiereiche elektromagnetische und korpuskuläre Strahlung kann beim Eindringen ins Gewebe ionisierend wirken. In der S-Phase des Zellzyklus befindliche Zellen tragen besonders leicht Schäden an der DNA davon, die mit zellulären Apoptosemechanismen einhergehen. Für die Tumorthherapie werden Gammastrahlung, Röntgenstrahlung, Elektronen, Neutronen- und Protonenstrahlung eingesetzt. Tumorgewebe ist aufgrund seiner hohen Zellteilungsrate in der Regel strahlenempfindlicher als das umliegende gesunde Gewebe. Reparaturmechanismen führen im normalen Gewebe zu einer schnelleren Regeneration der Zellen als im Tumorgewebe. Diese Erfahrungen werden in der Tumorthherapie durch eine Fraktionierung der Gesamtdosis umgesetzt. Durch die Aufteilung in Einzeldosen und Bestrahlungsabstände von mindestens 6 Stunden kann im Gegensatz zum Tumorgewebe eine Regeneration des umliegenden Gewebes erfolgen und unerwünschte Bestrahlungswirkungen werden verringert.

Untersuchungen zur Wirkung von Röntgenstrahlen auf die ECM wurden von Giannopoulou et al. an der CAM des Hühnerembryos durchgeführt. Nach 1-2 Stunden war eine vermehrte Apoptose im bestrahlten Areal zu verzeichnen. Ein antiangiogener Effekt der Bestrahlung konnte durch die temporäre Reduktion verschiedener Proteine, darunter auch die an der Angiogenese beteiligte MMP-2 und Integrin $\alpha_v\beta_3$, nachgewiesen werden [39]. Auch verschiedene andere Arbeiten zeigen auf der CAM einen antiangiogenen Effekt der Röntgenstrahlen [56,57]. Kardamakis et al. haben erst kürzlich über die Auswirkungen der Kombination von Paclitaxel, einem in der Tumorthherapie eingesetzten Zytostatikum, und Bestrahlung auf die Angiogenesehemmung berichtet. Sie bestätigten, dass das CAM-Modell zweckmäßig für radiobiologische Untersuchungen eingesetzt werden kann. Ihre Ergebnisse zeigten jedoch keinen angiainhibitorischen Effekt für die Kombination von Paclitaxel und Bestrahlung [56].

Viel versprechende Ergebnisse in in-vitro Studien konnten jedoch für Kombinationen von Angiogeneseinhibitor und Bestrahlung erbracht werden. Für verschiedene Tumoren konnte gezeigt werden, dass sie nach Bestrahlung vermehrt VEGF freisetzen [80] und Tumorendothelzellen mehr VEGF-Rezeptoren exprimieren [1]. Abdollahi et al. haben

gezeigt, dass VEGF-Inhibitoren den strahleninduzierten Endothelzellschaden verstärken können.

1.7.4 Angiogeneseinhibitoren

Erst im Jahr 2004 ist der erste Angiogeneseinhibitor für die Therapie des metastasierten Kolorektal-Karzinoms in Deutschland zugelassen worden. Es handelt sich dabei um einen humanisierten monoklonalen Antikörper gegen VEGF, Bevacizumab (Avastin®). Die Angiogenesehemmung wird durch die Bindung an den Wachstumsfaktor VEGF herbeigeführt. VEGF kann an den Zielzellen nicht mehr wirken, es kommt zur Gefäßregression in den noch unreifen VEGF-abhängigen Gefäßen. Das Ziel der antiangiogenen Therapie ist es, Tumoren auf ein relativ kleines, avaskuläres Stadium zu reduzieren, das Metastasierungspotential klein zu halten und höhere Ansprechraten auf Chemotherapie und Bestrahlung zu erzielen. Obwohl rasch proliferierende Zellen besser auf Chemotherapeutika bzw. Bestrahlung ansprechen und eine Angiogenesehemmung über eine Reduktion der Oxygenierung auch die Proliferationsrate einschränkt, ließen sich doch synergistische Effekte für die Kombination der Therapieprinzipien aufzeigen. Tierexperimente zeigten, dass durch eine antiangiogene Therapie die Oxygenierung und Durchblutung des Tumors verbessert wurde, wodurch sich die Strahlensensitivität und der Zytostatikatransport erhöhten. Dieses Phänomen könnte mit der partiellen Normalisierung des pathologischen Gefäßsystems im Tumor erklärt werden (die genauen zellulären und molekularen Mechanismen sind allerdings noch strittig).

In klinischen Studien konnte Bevacizumab (Avastin®) in Kombination mit der etablierten Chemotherapie (5-Fluorouracil/ Folinsäure/ Irinotecan) das mediane Überleben der Tumorpatienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom um 5 Monate (entspricht 30%) verlängern. Auch das progressionsfreie Überleben konnte um 71% auf 10,6 Monate verlängert werden [50]. Im Rahmen von Studien wird Bevacizumab auch in der Therapie von Nierenzellkarzinomen, Pancreaskarzinomen und nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen eingesetzt.

Weitere Angiogeneseinhibitoren, wie der APN-Inhibitor Bestatin oder EGF-Inhibitoren, werden derzeit noch nicht in der Therapie eingesetzt. Die enorme Anzahl der klinischen Studien lassen jedoch den rasanten Fortschritt und das wissenschaftliche Interesse an dieser Tumorthera­pieoption erahnen.

1.8 Zielstellung der Arbeit

Seit wenigen Jahren werden in der Therapie maligner Erkrankungen Angiogeneseinhibitoren in Verbindung mit Chemotherapeutika eingesetzt. Klinische Studien zeigen viel versprechende Ergebnisse im Hinblick auf das Gesamtüberleben sowie das progressionsfreie Überleben. Bisher widersprüchlich waren jedoch Aussagen zur Kombination von Angiogeneseinhibitoren und Bestrahlung. Die Erkenntnisse, dass hypoxische Zellen schlechter auf eine Strahlentherapie ansprechen, Angiogeneseinhibitoren aber eine Reduktion des Sauerstoffgehaltes im Gewebe nach sich ziehen, ließen bei einer Kombination dieser Therapieformen keine synergistischen Effekte erwarten. Tierversuche konnten jedoch eine erhöhte Strahlensensitivität antiangiogen behandelter Tumoren nachweisen.

Der Hemmung des Vascular endothelial growth factor (VEGF) als Schlüsselmolekül der Angiogenese kommt dabei besondere Bedeutung zu. Ein kürzlich in Deutschland zur Therapie des kolorektalen Karzinoms beim Menschen zugelassener monoklonaler VEGF-Antikörper ist Bevacizumab.

In der vorliegenden Arbeit sollte nach eingehendem Literaturstudium und Zusammenfassung der Grundlagen ein Tumormodell auf der Chorionallantoismembran (CAM) des Hühnerembryos etabliert werden, das sich sowohl für Untersuchungen zur Angiogenesehemmung als auch für eine Bestrahlung eignet. Besonderer Wert wurde darauf gelegt, ein einfaches, leicht handhabbares Modell zu entwickeln, welches auch für Screening-Untersuchungen geeignet ist. Auf dieser Basis sollten Untersuchungen zur Auswirkung der Angiogenesehemmung mit Bevacizumab in Kombination mit Bestrahlung auf das Gefäßsystem des Tumors geführt werden.

Dazu wurden aus schnell proliferierenden Tumorzelllinien in einer Matrigeltechnik solide Spheroide hergestellt, die auf der CAM vaskularisierte Tumoren bildeten. Nach entsprechender Wachstumsphase konnten die Tumoren einer Kombinationstherapie aus Angiogenesehemmung mit Bevacizumab und Bestrahlung ausgesetzt werden. Hierfür war zunächst die Etablierung eines Bestrahlungsarbeitsplatzes notwendig. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte sowohl makroskopisch als auch nach histologischer Aufarbeitung der Präparate. Dazu wurden verschiedene endothelzellspezifische Färbungen verwendet.

2 Materialien und Methoden

2.1 Gebrauchsmaterialien

Eier	White-Leghorn oder New-Hamshire
Kanülen Sterican [®]	Braun
Spritzen 5ml	Braun
Frischhaltefolie	Rossmann
Objektträger	MENZEL
Deckgläser	Roth
Paraffin	Roth
Pipettenspitzen	Greiner
Zentrifugationsröhrchen	Greiner
Zellkulturschalen	Greiner
Hämalaun-Lösung	Roth
Eosin-Lösung	Roth
Mowiol	Kremer-Pigmente
Entellan	Merck

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Roth bezogen.

2.2 Puffer und Kulturmedien

PBS-Puffer:

- 0,2 g KCl
- 8,0 g NaCl
- 0,2 g KH₂PO₄
- 1,15 g Na₂HPO₄
- auf 1l steriles Aqua dest.

Natriumcitrat-Puffer (pH=6):

- 9ml 0,1 M Citronensäure
- 41 ml 0,1 M Natriumcitrat
- einstellen auf pH=6
- auf 500 ml steriles Aqua dest.

Zellkultur-Medium:

pro 500ml RPMI 1640-Medium(Greiner) wurden zugesetzt:

- 1ml Penicillin/Streptomycin (10.000 E Penicillin/ 10mg/ml Streptomycin) c. c. pro
- 1ml Natriumpyruvat (100mM) Gibco
- 10ml fötales Kälberserum (FKS) c. c. pro

2.3 Kultivierung der Eier

Für die Versuche wurden befruchtete Hühnereier (White-Leghorn oder New-Hamshire) vom Biobauern aus Freilandhaltung genutzt. Die Eier sollten möglichst frisch sein und nach dem Legen nicht lange gelagert werden. War dennoch eine Lagerung unumgänglich, so wurden die Eier bei 15-18°C aufbewahrt. Für die Bebrütung wurde ein Inkubator der Firma Heraeus genutzt. Um Infektionen zu vermeiden, wurden alle Eier vor dem Einlegen in den Brutschrank mit einem in 70% Ethanol getränktem Tuch gereinigt und desinfiziert. Die Eier werden waagrecht auf eine Rollvorrichtung gelegt und in den ersten 3 Tagen alle 4 Stunden um eine viertel Umdrehung gewendet. Dies sollte ein Festkleben der CAM an der Innenseite der Eierschale verhindern. Die Inkubationsbedingungen waren mit 37,5°C und 78% relativer Luftfeuchtigkeit bereits aus einer Vorarbeit bekannt [100].

2.3.1 In-ovo Methode

Nach 3 Tagen Inkubation wurden die Eier geöffnet. Dazu wurde an beiden Enden mit einem Rosenbohrer ein kleines Loch in der Eierschale eröffnet. Dabei war darauf zu achten, die unter der Eierschale befindliche Eihaut nicht zu verletzen, um keinen Staub ins Ei zu bringen. Die Eihaut konnte dann vorsichtig mit einer Kanüle zerstoßen werden, ohne die CAM oder den Embryo zu verletzen. Nun wurden 4-5 ml Ovalbumin mit Hilfe einer Spritze entfernt. Das Loch der spitzen Seite wurde mit Tesafilm gut verschlossen und das Ei aufrecht gelagert. Damit wird gewährleistet, dass die CAM nicht an der Innenseite der Eierschale anhaftet und so beim Eröffnen des Eies verletzt werden kann. Das stumpfe Ende der Eierschale wurde mit einem Dentalbohrer mit eingespannter Diamantscheibe vorsichtig aufgeschnitten, so dass die innere Eihaut intakt bleibt, um Verunreinigungen im Inneren zu vermeiden. Die Eihaut konnte dann mit einem Skalpell aufgeschnitten werden und die Oberseite der Eierschale wurde entfernt. Um ein Austrocknen des Embryos zu verhindern, wurde diese Öffnung mit Frischhaltefolie und Eiweiß verschlossen. Die Eier konnten nun weiter inkubiert werden, allerdings wurde jetzt auf eine Drehung der Eier verzichtet.

2.3.2 Umsetzung der Eier

Bei dieser Kultivierungsmethode wird für jedes befruchtete Ei die Eierschale eines größeren Eies als Kulturgefäß benötigt. Dazu wurde die Eierschale ähnlich wie bei der in ovo Kultur mittels Dentalbohrer am stumpfen Ende eröffnet und der Inhalt verworfen. Das 3 Tage vorinkubierte Versuchsei wurde vorsichtig wie ein Spiegelei aufgeschlagen und der Inhalt in ein 10x10 cm großes Stück Frischhaltefolie, die über eine Glasschale gespannt wurde, gegossen. Die Folie konnte nun mit dem Embryo in die neue Eierschale überführt werden. Daraufhin wurde die Folie an einer Seite aus der Eierschale herausgezogen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass der Embryo nicht an der Folie anliegt und so beim Herausziehen beschädigt werden könnte.

2.3.3 Spiegeleikultur

Nach 3 Tagen Inkubation wurden die Eier in mit 70% Ethanol desinfizierte Wägeschälchen aufgeschlagen und mit Alufolie so bedeckt, dass noch etwas Luft in die Schälchen dringen konnte, um der CAM einen Gasaustausch zu ermöglichen. Die Hühnerembryonen kamen unter den vorgenannten Bedingungen wieder zurück in den Brutschrank.

2.4 Zellkultivierung

Für die Versuche wurden folgende Zelllinien verwendet:

- FTC 238 (follikular thyroid cancer)
- Panc Tu 1
- RD

FTC 238 wurden uns freundlicherweise von der Klinik für Allgemein- und Visceralchirurgie, Labor für experimentelle chirurgische Onkologie, und Panc Tu1 sowie RD vom Institut für Pathologie beides Universität Halle-Wittenberg überlassen. Da es sich bei allen Zelllinien um adhärent wachsende Zellen mit gleichem Kulturmedium handelt, wurde die Kultivierung und Zellgewinnung identisch durchgeführt. Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit den oben beschriebenen Zusätzen kultiviert. 3×10^5 Zellen wurden in einer 50 ml Kulturflasche ausgesät und bei $37,5^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert. War ein konfluentes Wachstumsstadium erreicht, wurden die Zellen nach Spülen mit PBS-Puffer durch 3 min. Inkubation mit 2 ml 0,25% Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) von der Kulturflasche gelöst; nach Abstoppen der Reaktion mit 8 ml Kulturmedium in 10 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und 7 min. bei 430g zentrifugiert (Zentrifuge Hettrich Universal 30F). Das Zellpellet wurde in 1 ml Kulturmedium

resuspendiert. Anschließend konnte die Zellzahl in einer Neubauerzählkammer bestimmt werden.

Kultivierung in Matrigel

Zur Generierung eines 3-dimensionalen Zellkonglomerats als Tumormodell auf der CAM wurde ein Matrigelassay verwendet. Bei Matrigel (Growth Factor Reduced Matrigel™ Matrix; BD Biosciences) handelt es sich um einen löslichen Basalmembranextrakt, der bei 4°C flüssig ist und bei 20-37°C geliert. So konnte die Zellsuspension bei 4° C mit der Matrigel Matrix vermischt werden. Für die Versuche wurden die Zellen nach dem Abzentrifugieren in Kulturmedium resuspendiert, so dass 5×10^6 Zellen in 20 µl Kulturmedium vorlagen. Zur Herstellung der Tumoren wurden zu 20µl Matrigel 20µl Zellsuspension hinzupipettiert und vorsichtig gemischt. Pro Tumor ergibt sich somit eine Zellzahl von 5×10^6 Zellen. Nach 30 min. Gelieren im Brutschrank wurde Kulturmedium hinzugefügt und die Zellen weiter inkubiert. Nach 24h Inkubation wurden das Zellüberleben am Stereomikroskop (Motic BA 400) kontrolliert und die Tumoren nach Entfernen des Kulturmediums auf die CAM übertragen. Die oberflächliche Epithelschicht der CAM wurde dabei vorsichtig mit einem Spatel verletzt, um ein besseres Anwachsen der Tumoren zu erreichen. Dabei waren Blutungen möglichst zu vermeiden. Nach der Beimpfung mit den Tumorzellen wurden die Eier für weitere 7 Tage inkubiert, um eine Gefäßreaktion der CAM auf den Tumorstimulus zu ermöglichen.

2.5 Auftragung von Avastin®

Avastin® (Roche) liegt als farblose Flüssigkeit mit einer Konzentration von 25 mg/ml Bevacizumab vor. Für die Applikation auf die CAM wurden 10 µl unverdünnt bzw. in einer Konzentration von 10 mg/ml in PBS verdünnt auf die CAM und Tumor aufpipettiert. Die Auftragsstelle wurde auf der oben aufgeklebten Frischhaltefolie markiert. Die Veränderungen auf der CAM wurden täglich kontrolliert und fotografiert.

2.6 Bestrahlung der Eier

Für die Bestrahlung der Eier wurde eine Philips Röntgenröhre RT 250 in der Klinik für Strahlentherapie der Universität Halle genutzt. Um den Wärmeverlust der Eier möglichst gering zu halten wurde die Bestrahlung in einem Polystyrol-Behälter durchgeführt und die Eier danach sofort wieder in den Brutschrank gebracht. Die Bestrahlung erfolgte mit 125 kV und einem 0,2 mm Cu-Filter. Zur Verabreichung einer definierten Strahlendosis war es

notwendig, einen einheitlichen Abstand von der Strahlungsquelle einzuhalten. Dies konnte mittels Distanzstücken mit einem 2 mm Raster für jedes Ei individuell justiert werden. Um den Embryo vor der Strahlung zu schützen, wurde eine Bleiblende mit Bohrung von 10 mm Durchmesser aufgelegt. Die Bohrung wurde so zentriert, dass der Tumor sich im Strahlengang befand, der Embryo aber möglichst geschützt war. Dosimetrische Messungen wurden freundlicherweise von der Klinik für Strahlentherapie mit Hilfe einer Weichstrahlkammer durchgeführt. Aufgrund des bei diesen Energiedosen vorherrschenden Compton-Effektes wurde zunächst in erheblichem Maße Elektronenstrahlung durch Wechselwirkung der Röntgenstrahlen mit der Bleiblende erzeugt. Durch Zwischenlage einer 1,5 mm starken Piacrylplatte als Elektronenfalle konnte der Anteil an Elektronenstreustrahlung herausgefiltert werden. Es ergab sich für eine Dosis von 3 Gy bei den gegebenen Voraussetzungen eine Bestrahlungsdauer von 2 min 26s. Die Einzeldosen von 3 Gy wurden jeweils 3x täglich im Abstand von 6 Stunden 3 Tage lang verabreicht. Daraus ergibt sich eine kumulative Strahlendosis von maximal 27 Gy pro Ei. Für den Aufbau des Eierbeckers zur Bestrahlung siehe Abbildung 12.

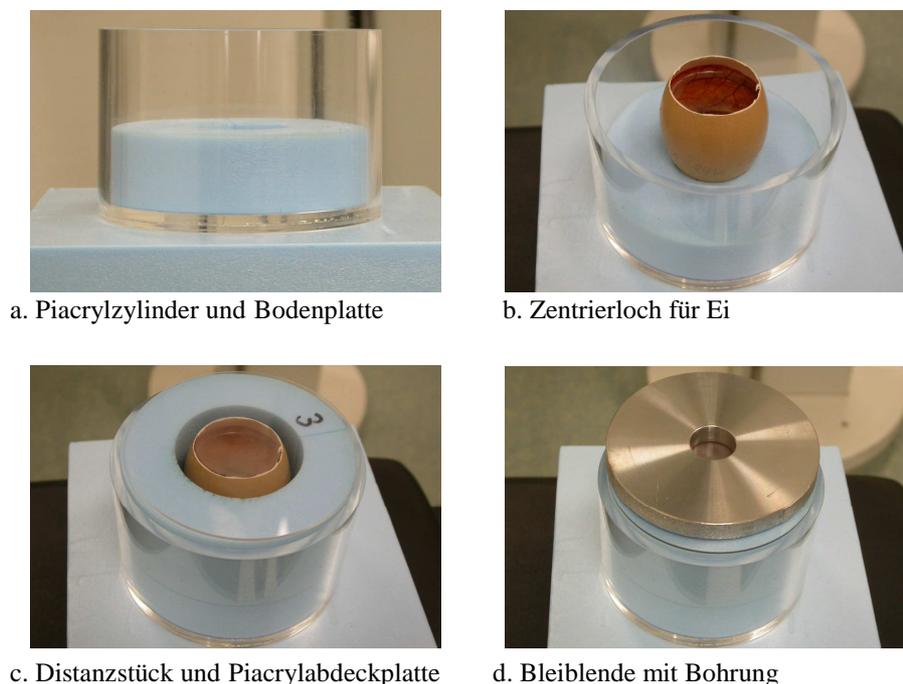


Abbildung 12: a-d Aufbau des "Eierbeckers" zur Bestrahlung

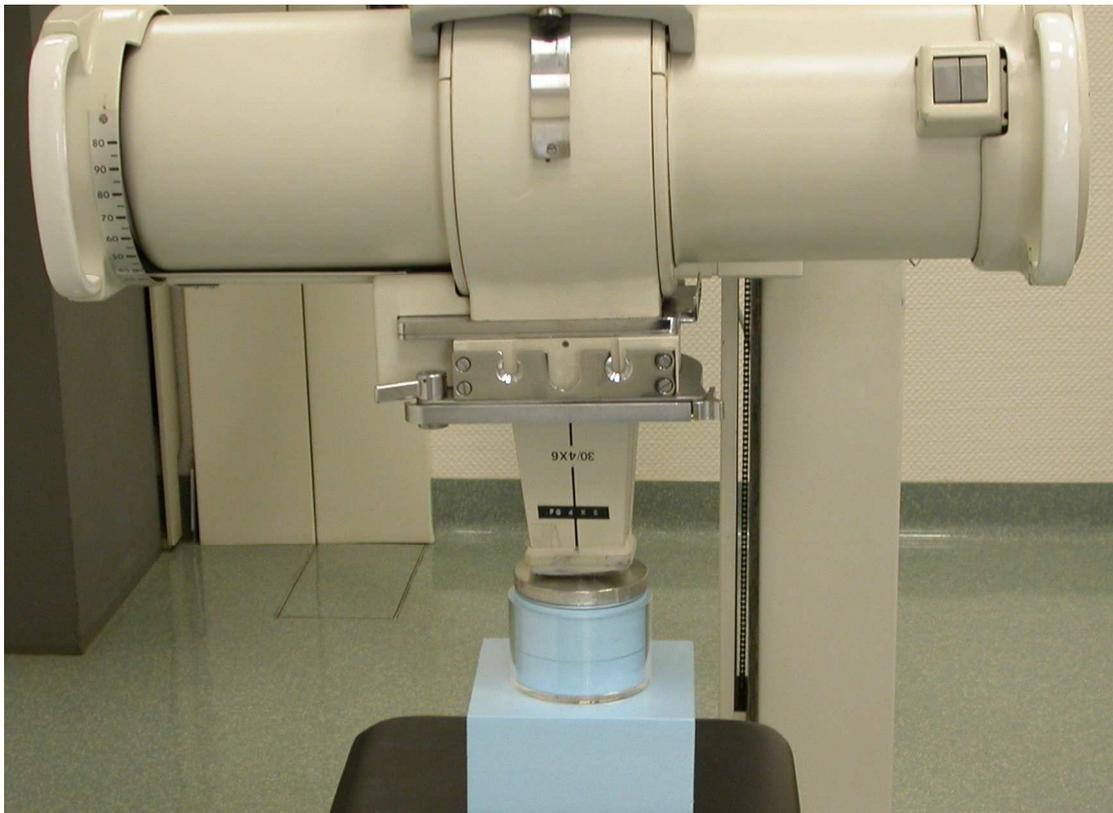
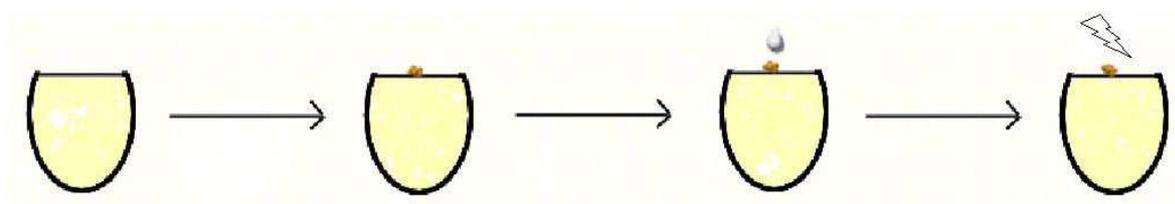


Abbildung 13: Bestrahlungsarbeitsplatz

Zur Übersicht über die Versuchsdurchführung dient folgende Grafik:



3.Tag:

Öffnen der Eier

7.Tag:

Auftragen des Tumors

12.Tag:

Avastin®

14.Tag:

Bestrahlung

2.7 Histologie

2.7.1 Einbetten und Schneiden

Zur histologischen Aufarbeitung der Gewebe wurden die Embryonen durch Unterkühlen getötet und in ovo durch Übergießen mit 4%iger Formalin-Lösung fixiert. Danach erfolgte die Präparation der CAM inklusive Tumor mittel Pinzette und Schere und nochmalige Fixierung mit 4%iger Formalin-Lösung über Nacht. Die Dehydrierung wurde in einer aufsteigenden Alkoholreihe jeweils 1h in 50% Ethanol, 70% Ethanol, 80% Ethanol, 96% Ethanol durchgeführt, anschließend Ethanol durch mehrmaliges Waschen mit Xylol entfernt. Das

Xylol wurde nun durch mehrmalige Waschschrirte durch Paraffin ersetzt. Dazu wurde das Gewebe zunächst in ein 1:1 Gemisch aus Paraffin/Xylol iberfuhrt, dann mindestens 3x in frisches 56°C warmes Paraffin iberfuhrt. Wenn sämtliches Xylol ausgewaschen war, konnte die CAM in Paraffinblöckchen erkalten. Paraffinschnitte mit einer Dicke von 5µm wurden am Rotationsmikrotom RM 2145 (Leica) angefertigt. In einem Wasserbad (45°C) wurden die Schnitte gestreckt und anschließend auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Danach wurden die Schnitte auf einem Heiztisch bei 42°C getrocknet und bis zur Färbung bei Raumtemperatur gelagert.

2.7.2 Färben

Zur Übersichtsfärbung diente eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE). Spezielle Strukturen (VEGF-Rezeptorbesatz, Endothelzellen) wurden mit immunhistochemischen Methoden nachgewiesen.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Bei der HE-Färbung stellen sich basophile Bestandteile wie Zellkerne blau, acidophile Bestandteile wie das Zytoplasma oder Kollagenfasern rot dar. Vor der Färbung müssen die Paraffinschnitte rehydriert werden. Danach erfolgte die Färbung mit Eosin und Hämalaun nach folgendem Protokoll:

Schritt	Dauer
Xylol	2 x 2 min
96 % Ethanol	2 x 2 min
80% Ethanol	1 x 2 min
70% Ethanol	1 x 2 min
H ₂ O	1 x 2 min
Hämalaun	1 x 3 min
Bläuen in fließendem Wasser	1 x 10 min
Eosin	1 x 5-10 min

Die Eosin-Färbung wurde unter Sicht durchgefuhrt, d.h. wenn die Schnitte ausreichend gefärbt erschienen, wurde der Färbevorgang durch iberfuhren in H₂O gestoppt. Es schloss sich eine aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol an. Danach wurden die Schnitte mit Entellan und Deckgläsern eingedeckt.

Immunhistochemie VEGFR-1

Der VEGFR-1 Antikörper wurde von Zytomed Systems, Berlin bezogen. Für den Nachweis der Antikörperbindung wurde der Zytochem Plus HRP Kit von Zytomed Systems, Berlin genutzt.

Die Paraffinschnitte wurden in absteigender Alkoholreihe wie oben beschrieben rehydriert. Zur Antigendemaskierung wurden die Präparate 30 min im Dampfgerät in vorgewärmtem Natriumcitratpuffer (pH=6) bei 100°C behandelt und danach mindestens 20 min in dieser Lösung abgekühlt. Nach Spülen in Aqua dest. wurde die endogene Peroxidase durch 10 min Inkubation in 3% Wasserstoffperoxid blockiert, um unerwünschte Hintergrundfärbungen zu vermeiden, danach die Schnitte mit Aqua dest. gespült und in PBS umgesetzt. Nun waren die Präparate für die eigentliche Färbung vorbereitet, die nach folgendem Protokoll erfolgte:

- 5 min Proteinblock
- 30 min Inkubation bei 37°C mit VEGFR-1 Antikörper 1:50 verdünnt in Antibody Diluent in feuchter Kammer
- Spülen mit PBS
- 15 min Inkubation bei Raumtemperatur mit biotinyliertem Sekundärantikörper gegen Maus, Kaninchen, Ratte, Meerschwein in feuchter Kammer
- Spülen mit PBS
- 15 min Inkubation bei Raumtemperatur mit HRP (horse radish peroxidase) in feuchter Kammer
- Spülen mit PBS
- 10 min Inkubation mit AEC (Aminoethylcarbazol) Substrat in feuchter Kammer
- Spülen in Leitungswasser
- Umsetzen in Aqua dest.
- Gegenfärbung mit 40-60 s Hämalaun nach Meyer
- 10 min Bläuen in fließendem Leitungswasser
- Eindecken in Glyceringelantine

SNA-Lectin 1-Färbung

Lectine sind Proteine mit einer Affinität zu bestimmten Zuckermolekülen. Das im Holunder vorkommende Sambucus-nigra-lectin-1 (SNA-1) bindet spezifisch an sialyl- α (2,6)-Galactose/N-acetyl-Galactosamin auf Endothelzellen und kann so für eine Darstellung der innersten Gefäßschicht genutzt werden. Fluorescein markiertes SNA-1 wurde von VECTOR Laboratories bezogen. Die Paraffinschnitte wurden vor der Färbung wie oben beschrieben in absteigender Alkoholreihe rehydriert und für 5 min in PBS-Puffer umgesetzt. Anschließend

erfolgte die Inkubation mit SNA-Lectin 1 (Konzentration 20 μ g/ml) für 45 min in einer feuchten Kammer unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur. Danach wurde mehrmals mit PBS-Puffer gespült und mit Mowiol eingedeckt.

2.8 Auswertung, Statistik

Für die durchgeführten Versuche wurden jeweils 20 Eier eingesetzt. Je nach Absterberate konnten zur Auswertung zwischen 5 und 12 CAM's verwendet werden.

HE Schnitte und immunhistochemisch gefärbte Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop (Motic BA400) mit unterschiedlichen Objektiven (10x, 20x, 40x) betrachtet und mit einer Digitalkamera (Nikon Coolpix 4500) fotografiert. Der VEGF-Rezeptorbesatz wurde per Computer als prozentualer Anteil der gefärbten Fläche am Gesamtbild ermittelt. Dies erfolgte jeweils 5x pro Schnitt an 3 unterschiedlichen Präparaten.

Die Fluorescein markierten SNA-1 gefärbten Präparate wurden mit Hilfe eines Laser-Scanning-Mikroskop (Leica TCS SP2) ausgewertet. Die Gefäßanzahl wurde für 5 Bildausschnitte an 3 unterschiedlichen Präparaten ermittelt.

Makroskopische Photos wurden mit der Digitalkamera Canon EOS 300D angefertigt. Anhand der Bilder wurde die Gefäßanzahl pro Bild bestimmt. Dazu wurde ein Raster auf das Bild aufgelegt und die Kreuzungsstellen der Gefäße entsprechender Ordnung mit dem Raster bestimmt. Die Kapillaren dienen bei dieser Zählweise als Referenzpunkte und werden als Gefäße 1.Ordnung bezeichnet. Treffen 2 Gefäße 1.Ordnung zusammen, ergibt sich ein Gefäß 2.Ordnung, u.s.w. Somit wurden lange Gefäße durch häufigeres Auszählen mehr gewertet als kurze Gefäße.

Zur Auswertung und Aufbereitung der Daten wurden die Programme SPSS 14.0 und Microsoft Excel genutzt. Die statistische Auswertung und Berechnung der Wahrscheinlichkeiten erfolgte mittels t-Test. Für $p < 0,05$ wurde statistische Signifikanz angenommen, $p < 0,01$ wurde als hochsignifikant angesehen.

Diese Daten lassen begründete Schlüsse auf die gezeigten Ergebnisse zu. Zur weiteren Untermauerung und statistischen Sicherung wären Versuche mit einer höheren Stückzahl in einer sich anschließenden Arbeit notwendig.

3 Ergebnisse

3.1 Kultivierung der Eier

Um bei der Kultivierung der Hühnerembryonen möglichst hohe Überlebensraten zu erzielen, wurde die Spiegeleimethode mit der in ovo Kultivierung verglichen. Dabei zeigte sich, dass nur mit der in ovo Methode unter gleichen Umgebungsbedingungen die Embryonen bis zum Tag 18 überleben konnten. Ein längeres Überleben wurde nicht überprüft, da die Embryonen spätestens am 18. Entwicklungstag durch Hypothermie getötet wurden, um einen Schlupf zu verhindern. Die maximale Überlebenszeit der ohne Eierschale kultivierten Embryonen betrug 14 Tage, wobei ab Tag 10 nur 1% überleben konnte. Die Absterberate war auch in den frühen Entwicklungstagen in ovo geringer als bei der Spiegeleikultur. Außerdem wurde auf diese Weise eine physiologischere Entwicklung der Embryonen und damit auch der CAM gewährleistet. In anderen Arbeiten werden Entwicklungsverzögerungen bei der Spiegeleikultivierung bis zu einem Tag beschrieben [100]. Aus diesen Gründen wurde in den anschließenden Versuchen mit der in ovo Kultivierung weitergearbeitet, obwohl der Aufwand bei der Präparation der Eier mehr Zeit in Anspruch nimmt.

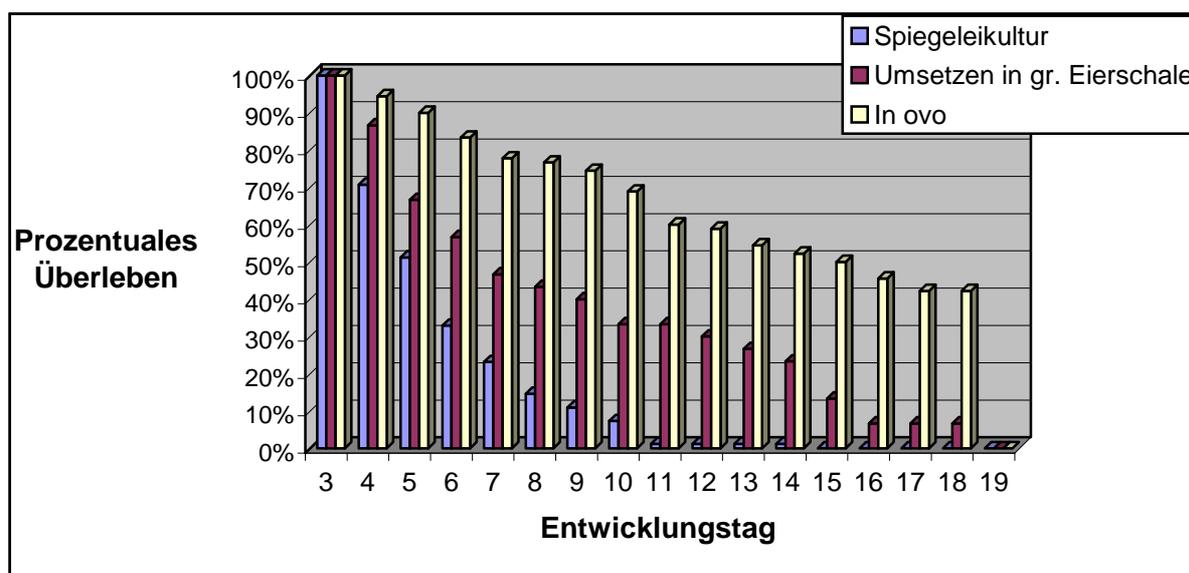


Diagramm 1: Prozentuales Überleben entsprechend der Kultivierungsmethode

Die höchsten Überlebensraten wurden mit der Kultivierung in ovo **ohne** Umsetzen der Eier in eine größere Eierschale erzielt. Hierbei erreichten 42% der befruchteten und lebend eröffneten Embryonen den 18. Entwicklungstag. Im Gegensatz dazu erreichten mit Umsetzung nur 7% der Embryonen den 18. Entwicklungstag. Die mechanische Alteration der Umsetzung sowie ein vermehrtes Auskühlen, das während der langwierigen Präparation unvermeidlich ist, scheint die Vorteile eines vollständigen Erhaltes des Eiweißes aufzuwiegen.

3.2 Entwicklung des Tumormodells

In der relativ kurzen Beobachtungszeit von maximal 10 Tagen sollten sich auf der CAM gut vaskularisierte, solide Tumoren entwickeln. Um dieses Ziel zu erreichen wurden verschiedene Zelllinien und unterschiedliche Applikationsarten getestet. Erste Versuche mit folliculären Schilddrüsenkarzinomzellen konnten nur geringe Anwachsrate und wenig vaskularisierte Tumoren hervorbringen. Bei der dabei eingesetzten Zelllinie FTC (follicular thyroid cancer) 238 handelt es sich um die Lymphknotenmetastase eines folliculären Schilddrüsenkarzinoms eines 42-jährigen Mannes. Für diese Zellen konnte sowohl eine vermehrte VEGF-Expression als auch eine Mutation im p53-Gen nachgewiesen werden [106].

Weiterhin wurden eine Pankreas-Karzinom Zelllinie (Panc-Tu1) und ein embryonales Rhabdomyosarkom (RD) getestet, die freundlicherweise vom Institut für Pathologie der Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt wurden.

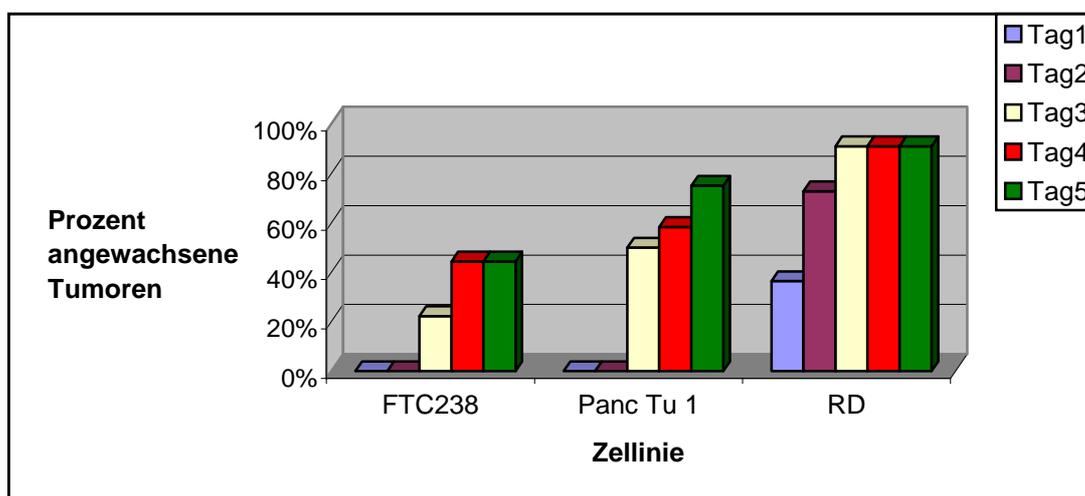


Diagramm 2: Anwachsrate einzelner Tumoren unterschiedlicher Zelllinien, Tage entsprechend nach Auftragung auf CAM, nach Tag 5 keine Zunahme der angewachsenen Tumoren

Dabei zeigte sich, dass die Zellen der embryonalen Rhabdomyosarkomzelllinie (RD) sowohl zeitlich zuerst als auch am häufigsten auf der CAM anwachsen. Im Gegensatz zu FTC 238 mit 44% und Panc Tu 1 mit 75% angewachsenen Tumoren nach 5 Tagen Kultivierung konnte bei RD schon nach 3 Kultivierungstagen eine Anwachsrate von 91% erreicht werden. Eine Zunahme der angewachsenen Tumoren nach dem 5. Kultivierungstag war bei keiner der Zelllinien zu verzeichnen.

Da bei der Auftragung der entsprechenden Zellen als Suspension auf der CAM ein Breitlaufen festgestellt wurde (siehe Abbildung 14) und damit die Bildung solider Tumoren vermindert wurde, war nach einer günstigeren Applikationsform zu suchen.

Hierbei war darauf zu achten, dass allein durch die Applikation keine zu große Reizung der CAM und damit eine Neoangiogenese aufgrund der Irritation auftrat. In der Literatur wurde

die Kultivierung von Zellen in Matrigel beschrieben. Diese Methode konnte für die CAM adaptiert werden. Matrigel ist ein lösliches Basalmembranextrakt, gewonnen aus Engelbreth-Holm-Swarm Tumor, das bei 37°C geliert.

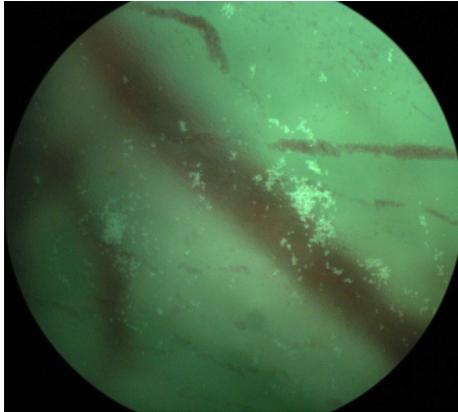


Abbildung 14: Zellsuspension verläuft auf der CAM, so dass die Bildung solider Tumoren vermindert wird, zur besseren Sichtbarkeit sind die Zellen Calcein-AM gefärbt und Photo unter UV-Licht aufgenommen, Vergr.63x

Um Effekte des Matrigel auf das CAM-Gefäßsystem möglichst gering zu halten, wurde speziell wachstumsfaktorreduziertes Matrigel verwendet. Negativkontrollen, bei denen nur Matrigel ohne Zellen aufgetragen wurde, zeigten keine Gefäßreaktion auf der CAM. Durch Vorkultivierung der entsprechenden Zelllinie in Matrigel, konnte ein solides Zellspheroid auf die CAM aufgetragen werden (siehe Abbildung 15). Hierbei zeigte sich eine wesentlich höhere Anzahl gut vaskularisierter, solider Tumoren auf der CAM (siehe Abbildung 16).

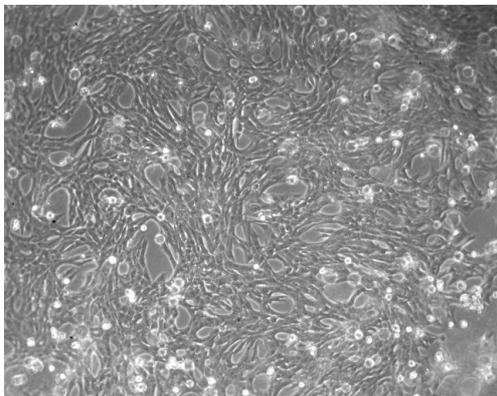


Abbildung 15: RD-Zellen in Matrigel bilden ein 3-dimensionales Netzwerk, Vergr. 100x



Abbildung 16: Blick auf die CAM eines 10 Tage alten Embryos mit Tumor



Abbildung 17: Tumor nach 10 Tagen Wachstum, Beispiel für angewachsenen, gut vaskularisierten Tumor



Abbildung 18: Tumor nach 10 Tagen Wachstum, Beispiel für nicht angewachsenen Tumor

Die Abbildungen 18 und 19 zeigen jeweils Beispiele für angewachsene (Abbildung 17) und nicht angewachsene Tumore (Abbildung 18).

Ein Vergleich der Überlebensraten der Embryonen mit Tumor im Gegensatz zu den tumorfreien CAM's zeigte zwar ein erhöhtes Absterben nach dem 14. Entwicklungstag, jedoch standen ausreichend Embryonen für die weiteren Versuche zur Verfügung (siehe Diagramm 3).

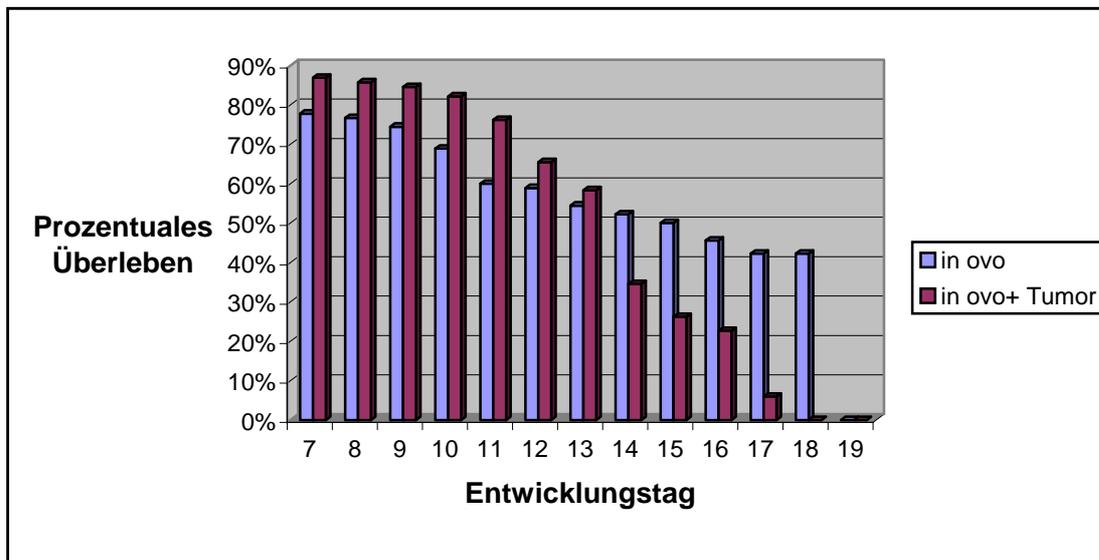


Diagramm 3: Überlebensraten der Embryonen mit Tumor im Vergleich zu Embryonen ohne Tumor, Auftragung der Tumoren am 7. Entwicklungstag

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse wurde im weiteren Verlauf mit den Rhabdomyosarkomzellen in der Matrigeltechnik gearbeitet.

3.3 Bestrahlungsversuche

Um die Wirkung einer Bestrahlung auf den auf der CAM generierten Tumor sowie die Strahlentoleranz des Hühnerembryonen zu testen, war es notwendig einen Arbeitsplatz zu entwickeln, an dem der CAM definierte Strahlendosen zugeführt werden konnten. Dabei war einerseits darauf zu achten, dass der Embryo so gut wie möglich geschont wird, um ein maximales Überleben zu gewährleisten, gleichzeitig sollte aber der Tumor ein Maximum an Strahlendosis erhalten.

Dosistestung

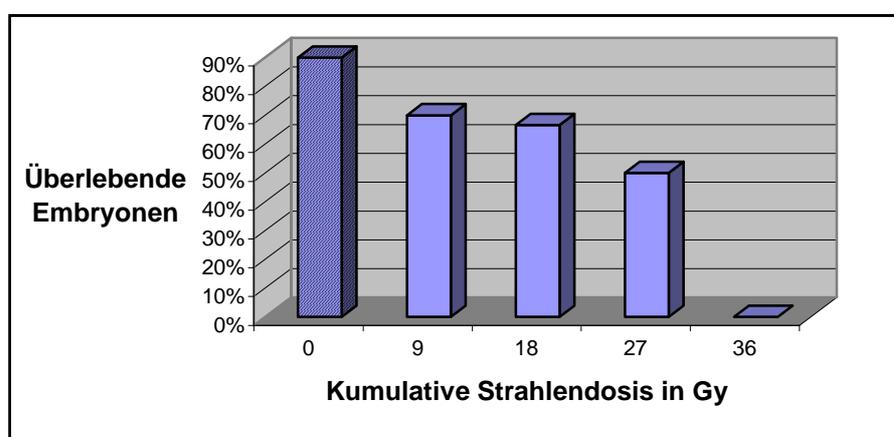


Diagramm 4: Überleben der Embryonen entsprechend der kumulativen Strahlendosis, Kontrollen ohne Bestrahlung sind schraffiert dargestellt

Da sich der Tumor an der Oberfläche befindet, bot sich eine Röntgen-Halbtiefenbestrahlung an, die freundlicherweise am Institut für Strahlentherapie der Universität Halle durchgeführt werden konnte. Da in der Literatur bisher keine ähnlichen Versuche an Hühnerembryonen beschrieben wurden, war zuerst eine Dosistestung unpräparierter, nicht Tumor tragender Embryonen notwendig. Definierte Strahlendosen konnten in einem speziell angefertigten Eierbecher aus Polystyrol und entsprechenden Abstandshaltern, mit deren Hilfe die Entfernung der CAM vom Tubus der Röntgenröhre mit einer maximalen Toleranz von 1mm eingestellt wurde, gewährleistet werden. Die Versuche wurden mit einer Einzeldosis von 3 Gy 3x täglich an 14 Tage alten CAM's durchgeführt. Die fraktionierte Bestrahlung ergibt sich aus der Erkenntnis, dass sich normales Gewebe innerhalb von 6 Stunden regeneriert, Tumorgewebe dagegen nicht. Keiner der Embryonen überlebte eine Bestrahlung mit mehr als 27 Gy kumulativer Strahlendosis (siehe Diagramm 4).

Die jeweils 24 Stunden nach der letzten Bestrahlung aufgenommenen Photos wurden hinsichtlich Veränderungen der Gefäßanzahl bei den unterschiedlichen Strahlendosen ausgewertet. Dabei konnten sowohl in der Gesamtanzahl (siehe Diagramm 5) als auch bei der

Differenzierung verschiedener Gefäßgrößen (siehe Diagramm 6) keine Auswirkungen der Bestrahlung bei normalen Gefäßen gefunden werden.

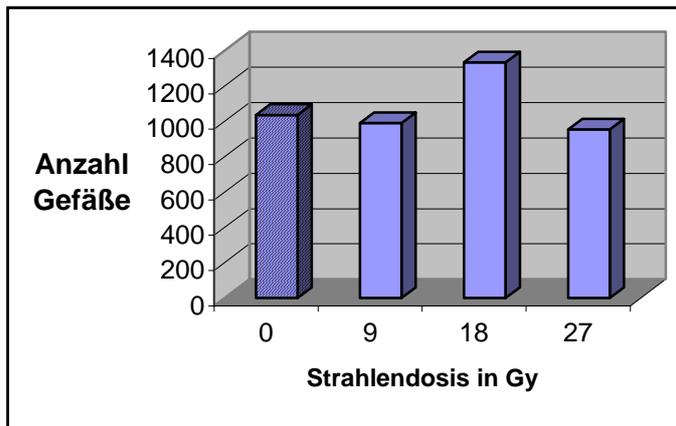


Diagramm 5: Anzahl der CAM-Gefäße (ermittelt pro Bild als Anzahl der Kreuzungsstellen mit Raster) bei jeweiliger kumulativer Strahlendosis, Kontrolle ohne Bestrahlung schraffiert dargestellt

Die Anzahl der CAM-Gefäße änderte sich auch mit zunehmender Strahlenbelastung nicht. Da die CAM-Gefäße bis zum 11. Entwicklungstag einer starken Teilungsrate unterliegen und danach weitgehend nur Reifungsvorgänge stattfinden, scheint eine Bestrahlung ab dem 14. Tag keine Einflüsse auf die Anzahl physiologischer Gefäße zu haben. Die weiteren Versuche mit den tumortragenden Eiern wurden mit einer kumulativen Bestrahlungsdosis von 27 Gy durchgeführt.

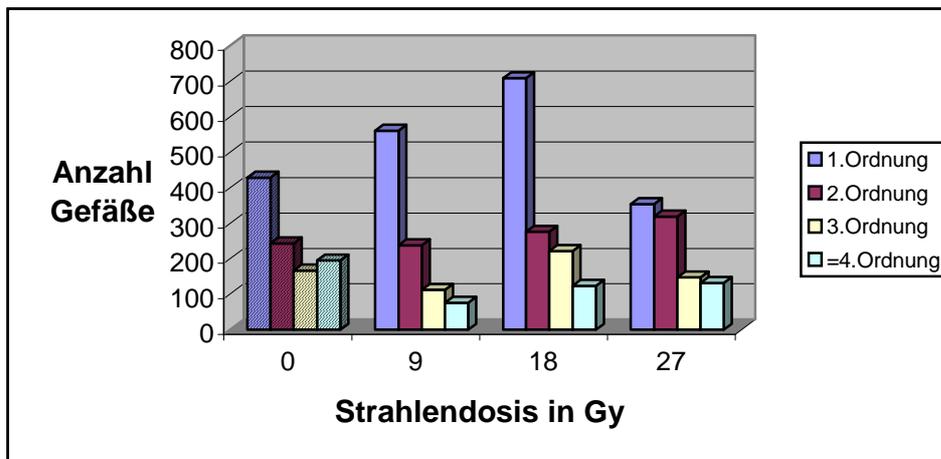


Diagramm 6: Anzahl der CAM-Gefäße (ermittelt pro Bild als Anzahl der Kreuzungsstellen mit Raster) entsprechend der kumulativen Strahlendosis, klassifiziert in 1.-4. Ordnung, wobei 1. Ordnung mit den kleinsten Gefäßen beginnt, Kontrolle ohne Bestrahlung schraffiert dargestellt

3.4 Angiogenesehemmung

Als nächster Schritt sollte die Angiogenesehemmung durch einen VEGF-Antikörper gezeigt werden. Da es sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin®) um einen humanisierten Antikörper handelt, wurde zunächst dessen Wirksamkeit auf der normalen CAM überprüft. Es ließ sich konzentrationsabhängig eine Reduktion von CAM-Gefäßen bereits 2 Tage nach Auftragung zeigen.

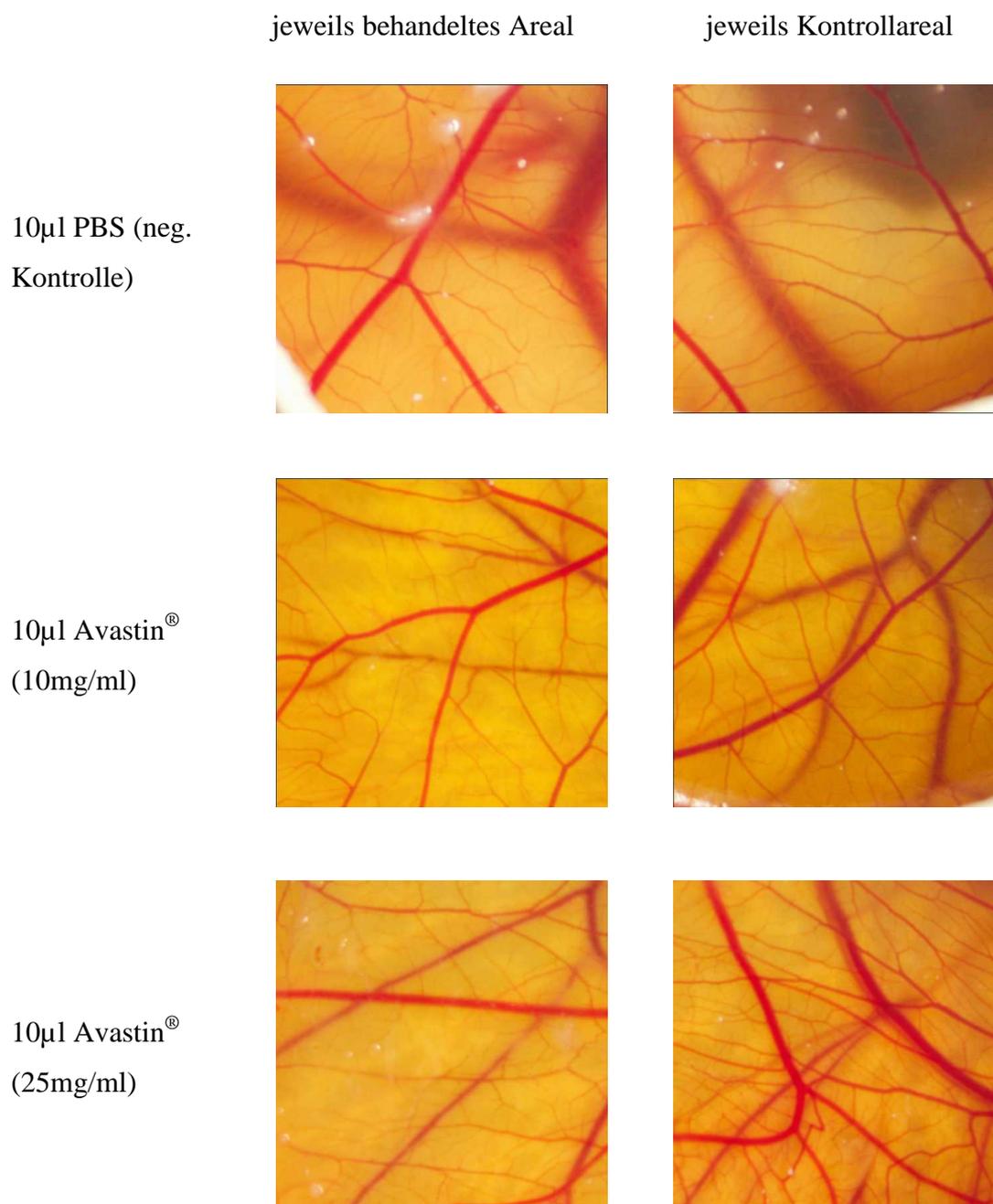


Abbildung 19: CAM-Gefäße 2 Tage nach Avastin-Behandlung (10 μ l) in unterschiedlichen Konzentrationen, oben Negativkontrolle mit 10 μ l PBS, links jeweils behandelte Areale, rechts unbehandelte Areale der gleichen CAM dargestellt

Auch die Behandlung der Tumoren mit Avastin[®] zeigte schon makroskopisch eine deutliche Reduktion der tumorversorgenden Gefäße. Beispiele für makroskopische Beobachtungen zeigen die folgenden Abbildungen. Die Photos entstanden jeweils 2 Tage nach Auftragung von Avastin[®].



Abbildung 20: 7 Tage alter Tumor 2 Tage nach Behandlung mit Avastin®



Abbildung 21: 7 Tage alter Tumor 2 Tage nach Behandlung mit PBS

Nach diesen Vorarbeiten konnten nun die Hauptversuche zur Kombination eines Angiogeneseinhibitors mit Bestrahlung auf der tumortragenden CAM beginnen. Hierzu wurden am 7. Entwicklungstag RD-Zellen im Matrigel auf die CAM aufgetragen. Auf die sich daraus entwickelten vaskularisierten Tumore wurde am 12. Entwicklungstag der CAM 10µl Avastin mit einer Konzentration von 25mg/ml appliziert. Die Bestrahlungen fanden vom 14.-16. Entwicklungstag der CAM statt. Danach wurde die CAM für die Histologie vorbereitet.

3.5 Histologie

Die weitere Auswertung erfolgte nach Fixieren, Einbetten und Schneiden der Tumorpräparate durch unterschiedliche Färbemethoden.

3.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung konnte gezeigt werden, dass sich auf der CAM nach Auftragung einer Rhabdomyosarkomzelllinie invasiv wachsende, gut vaskularisierte Tumoren ausbilden. Sowohl die Bestrahlung als auch die Behandlung mit dem VEGF-Antikörper führten zu einer Reduktion der Zellzahl im Tumorgewebe. (Zur besseren Darstellung der Abbildungen siehe auch den Bildatlas der Histologie im Anhang.)

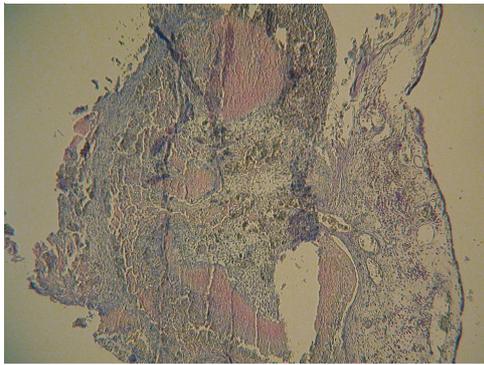


Abbildung 22: Tumor 10d alt ohne Behandlung

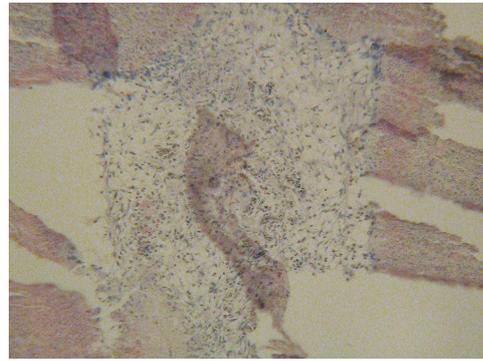


Abbildung 23: Tumor 10d alt nach Bestrahlung mit 27 Gy

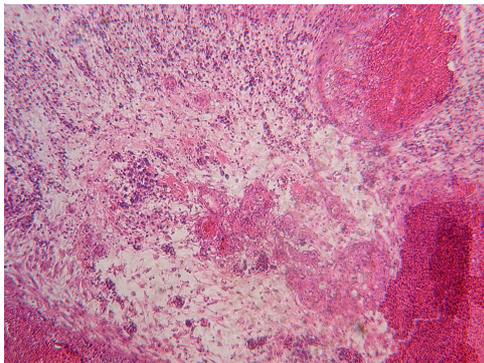


Abbildung 24: Tumor 10d alt nach Behandlung mit 10µl Avastin®

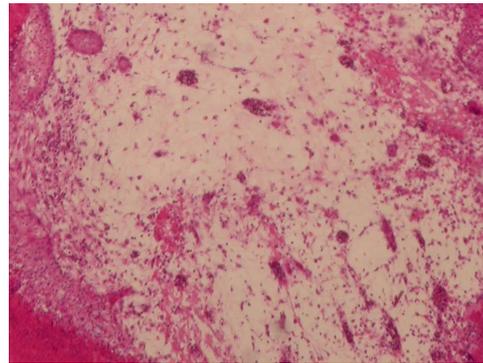


Abbildung 25: Tumor 10d alt nach Kombination von 10µl Avastin® und Bestrahlung mit 27 Gy

3.5.2 SNA-1-Lectin-Färbung

Zur besseren Quantifizierung der Gefäße im Tumor wurden die Endothelzellen im Tumorgewebe mit Fluorescein markiertem SNA-1-Lectin angefärbt. Das im Holunder vorkommende Protein bindet spezifisch an Endothelzellen und kann nach Markierung zu deren Darstellung verwendet werden. Die am Laser Scanning Mikroskop aufgenommenen Bilder zeigen eine Auflockerung der Gewebestruktur, eine Verringerung der Zelldichte sowie eine Abnahme der Gefäße bei Bestrahlung und Avastin-Behandlung. Eine alleinige Bestrahlung führt nur zu einer geringen Gefäßreduktion. Mit der Avastin-Behandlung konnte eine Gefäßreduktion auf 42% erreicht werden; die Kombination beider Therapieformen führte zur einer Verstärkung der Gefäßreduktion auf 26% im Vergleich zum unbehandelten Tumor. Hierbei nahmen vor allem die kleinen Gefäße ab, denen eine verstärkte VEGF-Empfindlichkeit zugesprochen wird [17]. Jeweils repräsentative Beispiele zeigen die Abbildungen 26 und 27 (siehe auch Anhang).

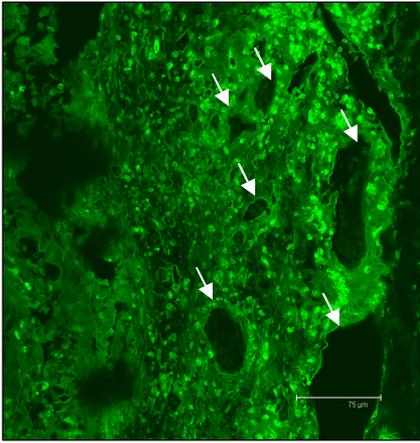


Abbildung 26: unbehandelter Tumor 10d, SNA-1-Lectin-Färbung, Pfeile markieren Gefäßanschnitte, Markierung entspricht 75µm

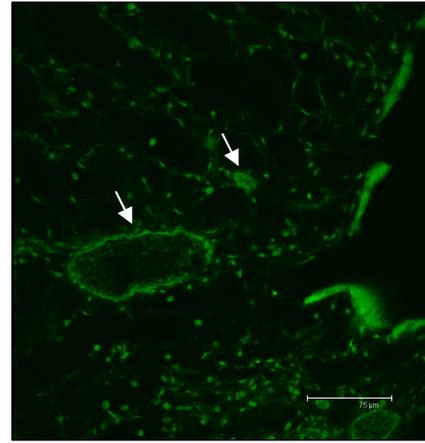


Abbildung 27: Tumor 10d nach Kombination von 10µl Avastin® und Bestrahlung mit 27Gy, SNA-1-Lectin-Färbung, Pfeile markieren Gefäßanschnitte, Markierung entspricht 75µm

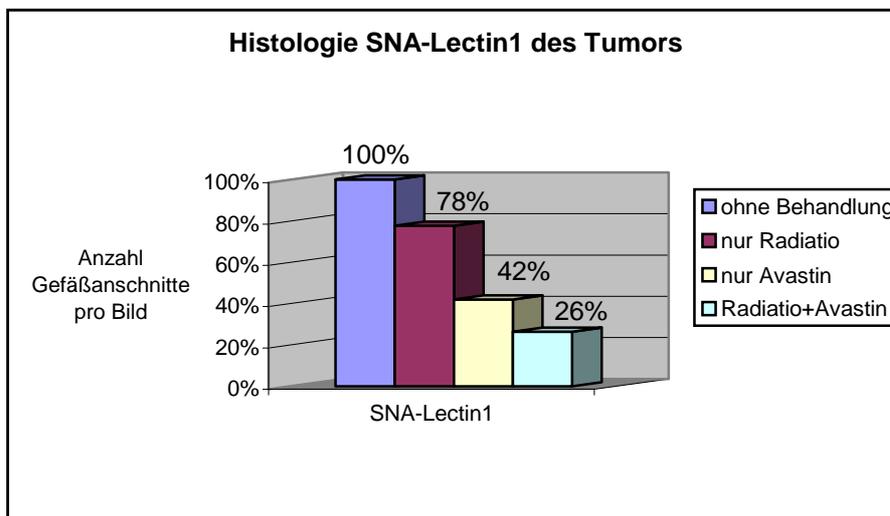


Diagramm 7: Reduktion der Tumorgefäße nach Bestrahlung, Avastin® oder Kombination im Vergleich zum unbehandelten Tumor (entspricht 100%)

3.5.3 Immunhistochemie

Zur Klärung der Frage, wie sich die Therapieformen auf Zellebene auswirken, wurden immunhistochemische Färbungen gegen verschiedene endothelzellspezifische Antigene vorgenommen. Als problematisch erwies sich dabei die mangelnde Kreuzreaktivität humaner oder muriner Antikörper mit dem CAM-Gewebe. Entsprechende Anti-Hühnchen-Antikörper sind kommerziell nicht erhältlich. Alle getesteten Antikörper gegen CD 31, CD 34 und VEGF-Rezeptor-2, die sonst üblicherweise zur Endothelzelldarstellung genutzt werden, zeigten keine Kreuzreaktivität.

Es wurde auf die Darstellung des VEGF-Rezeptor-1 zurückgegriffen, der durch die RD-Zelllinie exprimiert wird [83]. Eine deutliche Reduktion des VEGF-Rezeptor-Besatzes um

66% konnte mit Avastin[®] erreicht werden. Die Kombination aus Bestrahlung und Avastin[®] ergab eine statistisch signifikante Reduktion um 80% im Vergleich zum unbehandelten Tumor ($p < 0,05$). Eine alleinige Bestrahlung zeigte eine diskrete, statistisch jedoch nicht signifikante Erhöhung des Rezeptorbesatzes. Eine Kombination aus Avastin[®] und Bestrahlung zeigt im Vergleich zur Avastinmonotherapie eine weitere Verminderung des VEGF-Rezeptor-1, die jedoch nicht statistisch signifikant belegt werden kann.

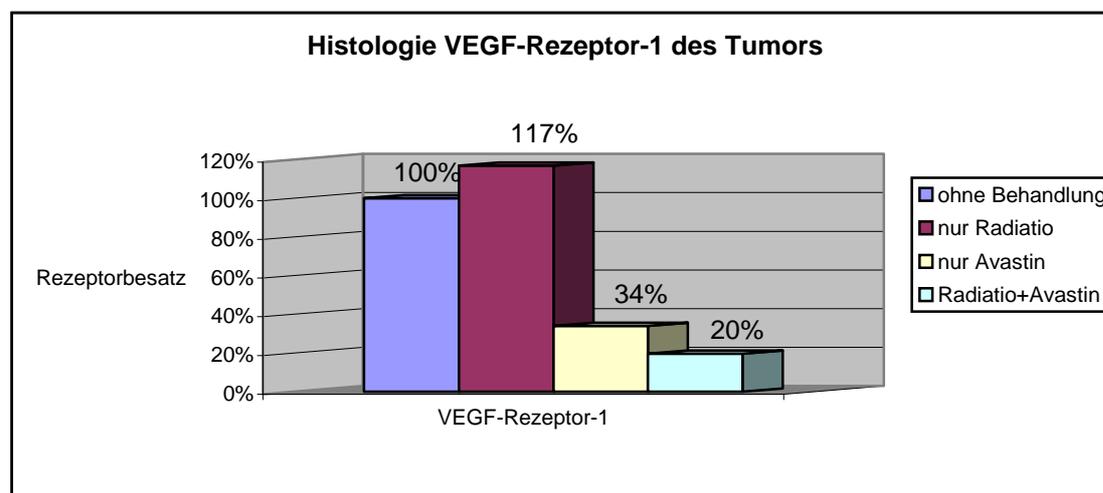


Diagramm 8: Immunhistochemie gegen VEGF-Rezeptor-1, Rezeptorbesatz des unbehandelten Tumors wurde mit 100% angenommen, Avastin[®] und Kombination Radiatio + Avastin[®] reduziert Rezeptorbesatz signifikant im Vergleich zum unbehandelten Tumor und Monotherapie Bestrahlung ($p < 0,05$), eine Kombination von Radiatio + Avastin[®] zeigt im Vergleich zur Avastinmonotherapie eine weitere Verminderung des Rezeptors, die jedoch statistisch nicht signifikant nachgewiesen werden kann

Jeweils repräsentative Beispiele für die immunhistochemische Färbung zeigen die folgenden Abbildungen (siehe auch Anhang):

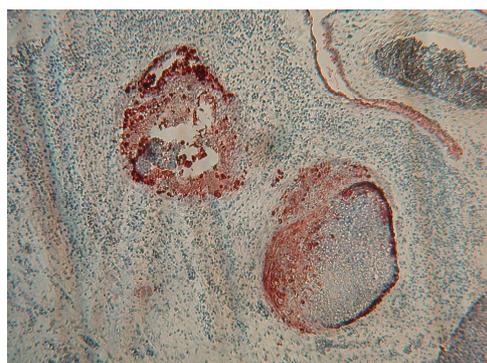


Abbildung 28: unbehandelter Tumor 10d alt, Immunhistochemie gegen VEGF-Rezeptor-1, Vergrößerung 200x

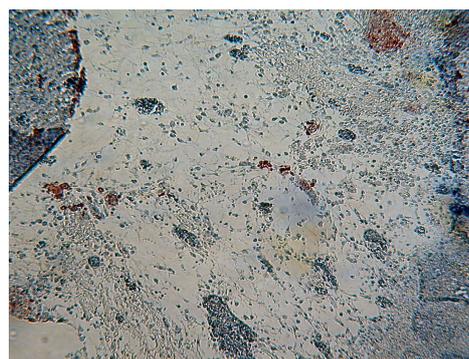


Abbildung 29: Tumor 10d alt nach Kombination von 10µl Avastin[®] und Bestrahlung mit 27Gy, Immunhistochemie gegen VEGF-Rezeptor-1, Vergrößerung 200x

Die beiden Therapieformen Angiogenesehemmung durch Avastin und Bestrahlung wirken im CAM-Tumor Modell synergistisch sowohl im Hinblick auf Tumorzellzahl als auch auf die Reduktion von Gefäßen und den VEGF-Rezeptor-1-Besatz.

4 Diskussion

4.1 Kultivierung der Eier

In der Literatur wird über verschiedenste Methoden der Kultivierung befruchteter Hühnereier berichtet. Um Untersuchungen an der sich entwickelnden Chorionallantoismembran (CAM) durchführen zu können, werden im wesentlichen 2 verschiedene Methoden zur Kultivierung angewandt: die „**shell-less-Methode**“ auch sog. „Spiegeleimethode“, bei der der Embryo am 3-4 Entwicklungstag mit dem Eidotter und Eiweiß in eine künstliche Schale überführt wird, und die **in-ovo-Methode**. Hierbei wird die CAM in situ belassen und kann nach Eröffnen eines Fensters beobachtet werden. Bei beiden kommt es arbeitsgruppenspezifisch zu unterschiedlichen Abwandlungen, je nach untersuchter Fragestellung. Einige Autoren favorisieren Wägeschälchen [100] oder mit Klarsichtfolie ausgelegte Plastikbecher [48] für die Kultivierung ex ovo, sowie für den Calciumbedarf den Zusatz von Eierschalengranulat [116].

Die Vorteile der shell-less-Methode liegen in einer guten Übersicht und Zugänglichkeit zu Embryo und Gefäßsystem, sowie der einfachen Handhabung. Das Hauptproblem dieser Kultivierungsmethode liegt in der geringen Überlebensrate. Nach eigenen Ergebnissen war lediglich ein Überleben von 1% nach dem 10. Entwicklungstag zu verzeichnen, was für die geplanten Versuche ungeeignet erschien. Außerdem führt die unphysiologische Umgebung außerhalb der Eierschale zu Entwicklungsstörungen und Retardierung der Embryonen, die bis zu einem Tag betragen können [100].

In-ovo-Methoden sind zeitaufwändiger beim Präparieren der Eier, Manipulationen an Embryo und CAM lassen sich schlechter durchführen. In der vorliegenden Arbeit wurden 2 Versuchsanordnungen getestet, um für die weitere Bearbeitung einen möglichst langen Beobachtungszeitraum zu gewährleisten. Die Umsetzung der Embryonen mit dem gesamten Inhalt des Eies in eine größere Schale brachte keine Vorteile gegenüber der gebräuchlichsten Methode, bei der ein Teil des Eiweißes entfernt wird und der Embryo in situ verbleibt. Mit der Umsetzungsmethode überlebten nur 7% bis zum 18. Entwicklungstag, während in situ 42% den 18. Entwicklungstag erreichen konnten. Der lang dauernde Präparationsvorgang bei der Umsetzung sowie die mechanische Alteration wirken sich nachteiliger auf das Überleben der Embryonen aus als der Verlust von 5 ml Ovalbumin. Weiterhin war eine physiologische Entwicklung im Hinblick auf die Angiogenese wünschenswert. Aus diesen Gründen wurde mit der in-ovo-Methode ohne Umsetzung weitergearbeitet.

4.2 Entwicklung eines CAM-Tumormodells

Bereits 1975 haben Judah Folkman und Mitarbeiter die CAM als Tumormodell in der Angiogeneseforschung genutzt, nachdem sie humane Tumoren als Xenotransplantate auf die CAM aufgebracht hatten [5]. Diese Methode erwies sich als sehr einfach und erfolgreich, so dass sie allgemein Anerkennung finden konnte. Seit dem wurden vielfach Zellen, Gewebe sowie löslich Faktoren auf die CAM aufgebracht. Armstrong et al. [2] und Kunzi-Rapp et al. [62] beschreiben, dass eine Zerstörung der oberen Epithelschicht der CAM zu einem verbesserten Anwachsen der Transplantate führt. Armstrong et al. geben 99% angewachsene Tumoren (Melanom- und Sarkomzelllinien) nach Verletzung der CAM an. In dieser Arbeit konnte für die Rhabdomyosarkomzelllinie RD ein maximales Anwachsen von 91% gezeigt werden. Die Ergebnisse sind mit denen der Literatur vergleichbar.

Rejektionsreaktionen, wie sie in anderen in-vivo-Systemen erhebliche Probleme bereiten, treten im CAM-Modell wegen des noch unreifen Immunsystems nicht auf [120].

Probleme, die bei der Auftragung der Zellen als Suspension auftraten, konnten durch Etablierung eines CAM-Matrigel-Assays gelöst werden. Matrigel[®] ist ein lösliches Basalmembranextrakt, das Wachstum und Differenzierung vieler normaler und Tumorzelllinien erlaubt [60,41]. Matrigel wird häufig in in-vitro [114,46] und in-vivo [36] Angiogeneseassays bei Mäusen eingesetzt. Modifikationen dieser Methoden erlauben auch den Einsatz auf der CAM. Durch seine Eigenschaft bei 4°C flüssig und bei 37° fest zu sein, eignet es sich hervorragend Zellen zu suspendieren. Dieses Matrigel-Zell-Gemisch geliert bei 37°C zum soliden Spheroid. Da die Zellen dabei als 3-dimensionales Gebilde zur Verfügung stehen, wurde ein Breitlaufen auf der CAM verhindert. Durch eine Vorkultivierung und lichtmikroskopische Überprüfung konnte sichergestellt werden, dass nur vitale Zellspheroide auf die CAM übertragen wurden.

Nach wenigen Tagen, abhängig von der eingesetzten Zelllinie, entwickelten sich auf der CAM vaskularisierte Tumoren. Deren Anwachsen wurde intravital mittels Stereomikroskopie anhand der Neovaskularisation überprüft. Tumoren, die keine Neovaskularisation induzierten, wurden für weitere Versuche nicht verwendet. Neu gebildete Gefäße erschienen radspeichenartig um den Tumor herum. Dieses Phänomen tritt auch bei anderen Angiogenese-induzierenden Substanzen auf [96].

Zur Generierung des Tumors erwies sich die Rhabdomyosarkomzelllinie RD optimal. Die Zelllinie entstammt einem embryonalen Rhabdomyosarkom eines 7-jährigen kaukasischen Mädchens. Rhabdomyosarkome sind die häufigsten Weichteiltumoren im Kindesalter. Trotz

multimodaler Therapieansätze, die Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie beinhalten, ist die Prognose der Patienten ungünstig.

Für RD wurde in einer Arbeit von Onisto et al. eine vermehrte VEGF-Produktion, sowie die Expression des VEGF-Rezeptors-1 nachgewiesen [83]. Auch die Kombinationsbehandlung mit einem monoklonalen Antikörper gegen den VEGF-Rezeptor-2 und Chemotherapie mit Doxorubizin zeigte bei SCID-Mäusen eine Verringerung der Tumoraktivität [125]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte der VEGF-Rezeptor-1-Besatz mittels Immunhistochemie nachgewiesen und eine Reduktion desselben durch eine Kombination von monoklonalem VEGF-Antikörper (Avastin®) und Bestrahlung gezeigt werden.

4.3 Eignung des CAM-Modells für tumorbiologische Untersuchungen

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte ein Tumor-CAM-Modell etabliert werden, dass sich zur Untersuchung tumorinduzierter angiogener Prozesse in Verbindung mit möglichen Therapieformen wie Bestrahlung und Angiogenesehemmung eignet. Die CAM als Grundlage der in vivo Versuche bietet hierfür mehrere Vorteile:

- Billiges und einfach handhabbares Modell eines Blutgefäßsystems
- Ausreichende Überlebensraten werden durch in-ovo Kultivierung gewährleistet
- Effekte sind schnell und direkt sichtbar
- Unreifes Immunsystem des Hühnchens erlaubt Xenografting ohne Rejektionsreaktion
- Mit dem Matrigel-CAM-Assay lassen sich aus verschiedensten Zellkulturen solide 3-dimensionale Tumoren erstellen
- Manipulationen können problemlos durchgeführt werden
- Keine Beantragung von Tierversuchen notwendig

Jedoch müssen auch die Grenzen des Modells aufgezeigt werden:

- Das Hauptproblem stellt die kurze Beobachtungszeit dar, die maximal 18 Tage beträgt. Die zu beurteilenden Effekte müssen sich in dieser Zeit einstellen.
- Durch Manipulationen sind unspezifische Entzündungsreaktionen möglich, die vom eigentlichen Effekt unterschieden werden müssen.

Um diese Fehler zu vermeiden, wurde im Vorfeld der Hauptversuche eine optimale Zelllinie gewählt, die innerhalb der kurzen Zeit gut vaskularisierte Tumoren bildet. Da in dieser Arbeit vornehmlich neu gebildete Gefäße im Tumor untersucht wurden, waren unspezifische

Reaktionen der CAM irrelevant. Zudem sind unspezifische Reaktionen unwahrscheinlich, wenn das Testmaterial frühzeitig auf die CAM aufgebracht wird [66]. Werden diese Voraussetzungen beachtet, eignet sich die CAM sehr gut für Untersuchungen hinsichtlich tumorinduzierter Neovaskularisation auch in Verbindung mit Bestrahlung.

4.4 Bestrahlung der Eier

Die Auswirkungen ionisierender Strahlen auf Angiogenese und Tumorwachstum sind in einer großen Anzahl von Arbeiten bisher beschrieben worden und weiterhin Thema intensiver Forschung. Zur Durchführung von Bestrahlungsversuchen an der CAM war es notwendig einen geeigneten Bestrahlungsarbeitsplatz einzurichten. Hierbei wurde darauf geachtet, den Wärmeverlust der Eier so gering wie möglich zu halten. Die Eier wurden einzeln aus dem Brutschrank entnommen und in dafür konstruiertes Polystyrolgefäß gesetzt. Um den Embryo vor der Strahlenbelastung zu schützen wurde eine Bleiblende mit Bohrung von 1 cm Durchmesser so aufgelegt, dass sich der Tumor im Strahlenfeld befand, die restliche CAM mit Embryo aber abgedeckt war. Auf diese Weise konnten fraktionierte Bestrahlungen bis zu 27 Gy (3x3 Gy für 3 Tage) durchgeführt werden. Eine weitere Erhöhung der Gesamtdosis wurde von den Embryonen nicht toleriert. Die Fraktionierung der Gesamtstrahlendosis bietet den Vorteil der Schonung umliegendes gesundes Gewebes, das sich in den mindestens 6-stündigen Bestrahlungspausen im Gegensatz zum Tumor regenerieren kann. Durch die Zwischenlage einer Piacrylplatte als Elektronenfalle konnten auf der gesamten CAM identische Strahlendosen erzielt werden.

In Übereinstimmung mit der Literatur ergab sich auch bei hohen Strahlendosen keine Veränderung an normalen 14-17 Tage alten CAM-Gefäßen. Interessanterweise reduziert eine Bestrahlung am 9. Entwicklungstag die Gefäßanzahl dosisabhängig [1]. Da ab dem 11. Entwicklungstag die Mitoserate in der CAM stark abnimmt und die Gefäße danach hauptsächlich Reifungsvorgängen unterliegen, scheint eine Bestrahlung in diesem Stadium kaum Auswirkungen auf die Gefäßentwicklung zu haben.

4.5 Angiogenesehemmung

Eine Hemmung der tumorinduzierten Angiogenese wird seit den 70-iger Jahren als mögliche Therapieoption maligner Erkrankungen angesehen und intensiv erforscht. Dabei kommt der Hemmung des Vascular endothelial growth factor (VEGF) als Schlüsselmolekül besondere Bedeutung zu. Seit 2005 wird der monoklonale VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin[®]) in Kombination mit Chemotherapie in der first-line-Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms erfolgreich eingesetzt.

Für die Nutzung der Tumorgefäße als therapeutische Zielstrukturen sprechen mehrere theoretische Überlegungen [119]:

- Angiogenese spielt beim Erwachsenen außer beim Tumor nur bei Wundheilungsvorgängen und dem weiblichen Reproduktionszyklus eine Rolle. Antiangiogene Substanzen sollten somit weitgehend spezifisch nur proliferierende Endothelien targetieren und toxische Wirkungen auf normales Gewebe vermeiden.
- Endothelzellen sind für Angiogeneseinhibitoren über das Blutgefäßsystem leichter zugänglich, als schlecht perfundierte Tumormassen für Chemotherapeutika.
- Resistenzen der Tumorzellen gegen Chemotherapeutika können durch das direkte Angreifen an Endothelzellen vermieden werden.
- Durch den Untergang einer Kapillare werden jeweils mehrere hundert Tumorzellen von der Blutversorgung abgeschnitten. Der Untergang relativ weniger Endothelzellen geht somit theoretisch mit dem Untergang großer Tumorzellmassen einher.
- Besonders langsam wachsende Tumoren, bei denen Zytostatika nur unzureichend wirksam sind, sprechen gut auf Angiogeneseinhibitoren an [58].

In der hier vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung des monoklonalen VEGF-Antikörpers Avastin[®] zunächst auf normaler CAM getestet werden, um die Wirksamkeit des humanisierten Antikörpers im Hühnchensystem zu belegen. Eindrucksvoll konnte konzentrationsabhängig die Gefäßreduktion bereits 2 Tage nach Auftragung gezeigt werden. Auch im Tumormodell zeigte sich schon makroskopisch eine deutliche Reduktion der radiär auf den Tumor zuwachsenden Gefäße.

4.6 Kombination von Angiogenesehemmung und Bestrahlung

Intensiv proliferierende Zellen werden durch Radiatio oder Chemotherapeutika stärker angegriffen. Vor allem bei Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, werden durch Bestrahlung bzw. Chemotherapeutika besonders leicht Schäden an der DNA gesetzt, die verstärkt zur Einleitung zellulärer Apoptoseprozesse führen.

Zellen, die unter normoxischen Bedingungen bestrahlt werden, sind ungefähr drei Mal strahlensensitiver als hypoxische Zellen [22]. Die durch Angiogenesehemmung verursachte Durchblutungsverminderung führt zur Hypoxie, die wiederum eine relative Strahlenresistenz nach sich zieht [10]. Die gegensätzlichen Tendenzen von Bestrahlung und Angiogeneseinhibition lassen es fraglich erscheinen, ob eine Kombination einen synergistischen Effekt erbringt.

Überraschenderweise zeigten jedoch Tierexperimente, dass durch eine antiangiogene Therapie die Oxygenierung und Durchblutung des Tumors verbessert wurde, wodurch sich die Strahlensensitivität erhöhte. Dieses Phänomen könnte mit der partiellen Normalisierung des pathologischen Gefäßsystems im Tumor erklärt werden. Die genauen zellulären und molekularen Mechanismen sind allerdings noch strittig. Unreife Tumorgefäße besitzen eine erhöhte Permeabilität, die die Extravasation verschiedener Substanzen begünstigt und somit zur Erhöhung des interstitiellen Druckes im Tumorgewebe führt. Daraus resultiert ein verminderter Druckgradient vom Intravasalraum zu Interstitium, der eine verminderte Filtration nach sich zieht [79]. Der erhöhte interstitielle Druck wiederum führt zu einer Gefäßkompression und Minderversorgung des Tumors [74].

VEGF spielt bei der Permeabilitätserhöhung der Gefäße eine wesentliche Rolle. Für verschiedene Tumoren konnte gezeigt werden, dass sie nach Bestrahlung vermehrt VEGF freisetzen [80] und Tumorendothelzellen mehr VEGF-Rezeptoren exprimieren. Abdollahi et al. haben gezeigt, dass VEGF-Inhibitoren den strahleninduzierten Endothelzellschaden verstärken können [1].

Einen weiteren Erklärungsansatz zur Wirkungsweise stellt der „Rettungsmechanismus“ für Tumorzellen durch VEGF dar. Es wird diskutiert, dass VEGF antiapoptotische Proteine, wie Bcl-2 oder A1, hochreguliert und damit Zellen vor Apoptosemechanismen schützt [38]. In-vitro Studien mit Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren, die die intrazelluläre Signaltransduktion von VEGF übernehmen, und Bestrahlung von Endothelzellen kommen zu überadditiven Effekten bei Kombination beider Therapien [1].

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde der Effekt einer Kombinationsbehandlung von Avastin[®] und Bestrahlung im CAM-Tumor-Modell untersucht. Die Applikation des Avastin[®] erfolgte 2 Tage vor der ersten Bestrahlung, um den oben beschriebenen Effekt einer vermehrten VEGF-Wirkung zu verhindern. Eine Größenbestimmung des Tumors anhand von 2-dimensionalen Bildern war durch unterschiedliches Wachstum in die CAM hinein zu ungenau. Desgleichen war ein „Ausschneiden“ des Tumors und eine nachfolgende Größen- bzw. Gewichtsbestimmung durch unterschiedliche Anteile mit ausgeschnittener CAM mit einem zu großen Fehler behaftet. Aus diesem Grunde erfolgte die Auswertung nach der histologischen Aufarbeitung der Gewebe. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung diente einer ersten Übersicht. Es wurde eine Auflockerung des Tumorgewebes, sowie eine Verminderung der Tumorzell-dichte sowohl nach Bestrahlung, als auch nach antiangiogener Therapie festgestellt. Eine weitere Quantifizierung der Gefäß-dichte im Tumor konnte durch eine spezifische Endothelzell-darstellung mit SNA-1-Lectin erfolgen (siehe Diagramme 9-14). Dabei waren hochsignifikante Reduktionen der Gefäße sowohl bei Bestrahlung als auch durch Avastin[®] im Gegensatz zum unbehandelten Tumor zu verzeichnen ($p < 0,01$). Normale Gefäße der CAM wurden durch eine Bestrahlung ab dem 14. Entwicklungstag nicht beeinflusst. Im Vergleich der Einzeltherapien erzielte Avastin[®] einen signifikant höheren Effekt ($p < 0,01$). Die Kombination beider Therapieformen zeigte noch einmal eine Verringerung der Tumorgefäße im Vergleich zur Monotherapie (Bestrahlung $p < 0,01$ und Avastin[®] $p < 0,05$).

In der hier vorliegenden Arbeit fiel im besonderen eine Reduktion der kleinen Gefäße durch Avastin[®] auf. Dies lässt sich über eine vermehrte VEGF-Empfindlichkeit dieser Gefäße erklären. Wird bei neu gebildeten Blutgefäßen das Gleichgewicht zwischen proangiogenen und antiangiogenen Mediatoren in Richtung Angiogenesehemmung verschoben, so kommt es zur Gefäßregression [47].

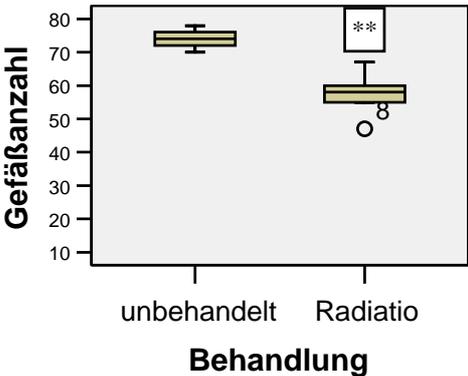


Diagramm 9: Vergleich der mittleren Gefäßanzahl in der SNA-1 Lectinfärbung un behandelter Tumor gegen Bestrahlung, **p<0,01

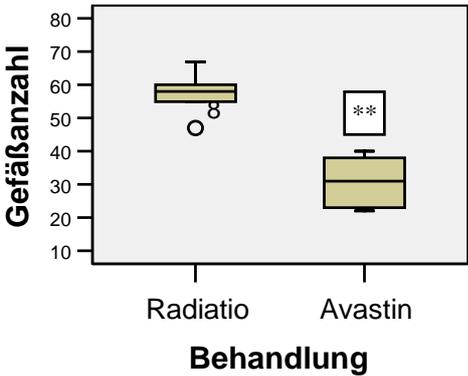


Diagramm 12: Vergleich der mittleren Gefäßanzahl in der SNA-1 Lectinfärbung bestrahlter Tumor gegen Avastin®, **p<0,01

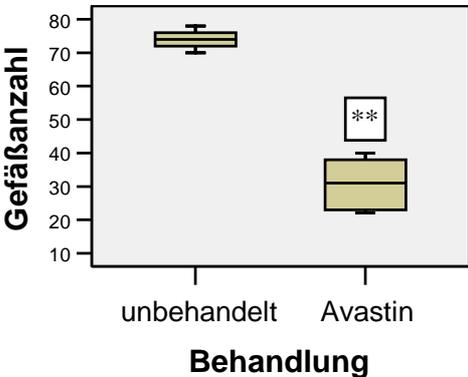


Diagramm 10: Vergleich der mittleren Gefäßanzahl in der SNA-1 Lectinfärbung un behandelter Tumor gegen Avastin®, **p<0,01

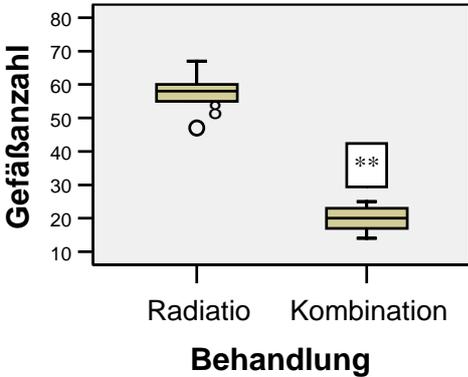


Diagramm 13: Vergleich der mittleren Gefäßanzahl in der SNA-1 Lectinfärbung bestrahlter Tumor gegen Kombination aus Avastin® und Bestrahlung, **p<0,01

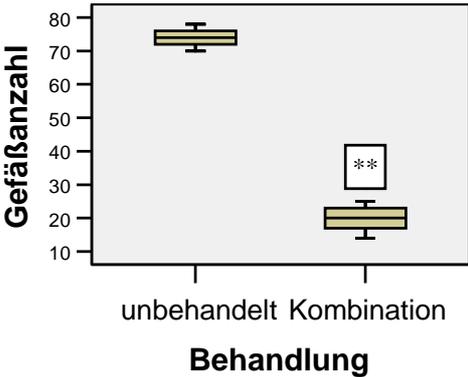


Diagramm 11: Vergleich der mittleren Gefäßanzahl in der SNA-1 Lectinfärbung un behandelter Tumor gegen Kombination aus Avastin® und Bestrahlung, **p<0,01

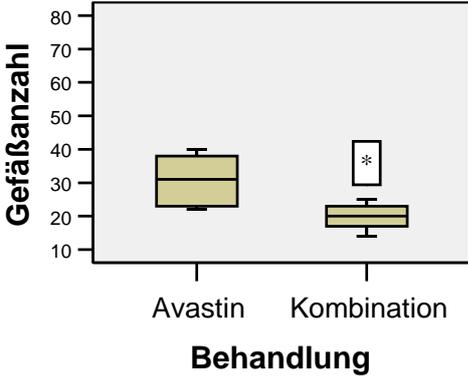


Diagramm 14: Vergleich der mittleren Gefäßanzahl in der SNA-1 Lectinfärbung Tumor nach Avastin-Behandlung gegen Kombination aus Avastin® und Bestrahlung, *p<0,05

Es erfolgte weiterhin die immunhistochemische Darstellung des vom Tumor exprimierten VEGF-Rezeptors-1. Aus der Literatur ist bekannt, dass bestrahlte Endothelzellen nicht nur vermehrt VEGF, sondern auch den neben dem VEGF-Rezeptor-1 vorkommenden VEGF-Rezeptor-2 exprimieren [1]. Uns stellte sich die Frage, ob dies auch für Tumorzellen wie RD und den VEGF-Rezeptor-1 zutrifft, bzw. durch Avastinapplikation zu beeinflussen ist.

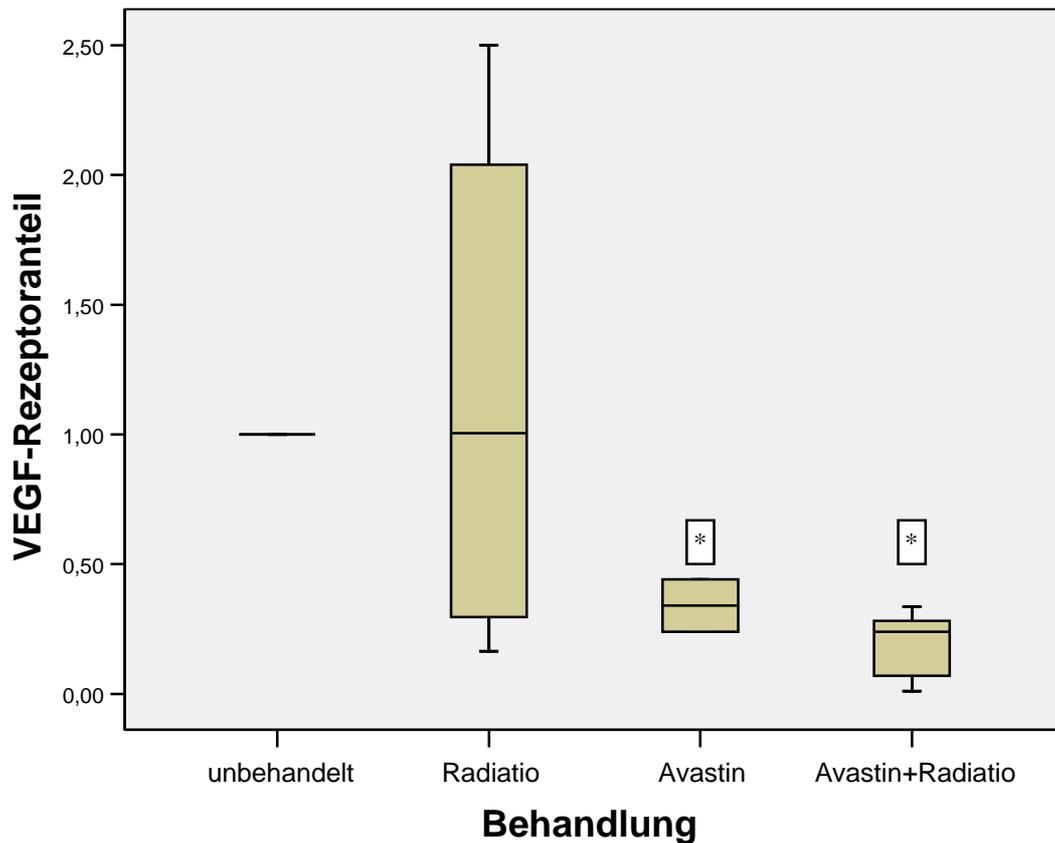


Diagramm 15: Auswertung des VEGF-Rezeptor-1-Besatzes der Tumoren entsprechend ihrer Behandlung, der Rezeptorbesatz des unbehandelten Tumors wurde 1 gesetzt, Avastin® und Kombinationsbehandlung reduzieren den Rezeptor statistisch signifikant in Vergleich zum unbehandelten Tumor, * $p < 0,05$

Die Auswertung ergab eine diskrete, aber nicht statistisch signifikante Erhöhung des VEGF-Rezeptor-Vorkommens nach Bestrahlung. Avastin® konnte erwartungsgemäß den VEGF-Rezeptor im Tumor verringern. Für die Kombination von Avastin® und Bestrahlung konnte keine statistisch signifikante Verminderung im Vergleich zur Monotherapie mit dem Angiogeneseinhibitor gezeigt werden. Durch die große Varianz der einzelnen Tumoren können Aussagen zur Verringerung des VEGF-Rezeptor-1-Besatzes durch eine Kombination von Avastin® und Bestrahlung im Vergleich zur Avastinmonotherapie weder unterstützt noch widerlegt werden. Da sich in einem Tumor sowohl hypoxische als auch hyperperfundierte Areale nebeneinander befinden können, liegt der Schluss nahe, dass auch Angiogenesehemmer im gleichen Tumor an unterschiedlichen Arealen verschieden starke Effekte erzeugen. Es mag sich also um einen diskreten Effekt handeln, der mit

immunhistochemischen Methoden nicht nachweisbar ist. Hier sollten sich weitere Untersuchungen an diese Arbeit anschließen. Interessante weiterführende Fragestellungen ergeben sich hinsichtlich anderer Tumoren, sowie zellulärer Mechanismen.

Die nachfolgende Tabelle soll eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse erbringen. Der eingesetzte Score wurde entsprechend der Auswertung wie folgt festgelegt:

- + Reduktion zum unbehandelten Tumor bis 40%, statistisch signifikant
- ++ Reduktion zum unbehandelten Tumor über 40%, statistisch signifikant

	Radiatio	Avastin	Radiatio und Avastin
Tumorgefäßanzahl	+	+	++
VEGF-1-Rezeptorbesatz	-	++	++

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die Therapieformen Angiogenesehemmung und Bestrahlung trotz initial gesehener gegensätzlicher Tendenzen in ihrer Wirkungsweise unterstützen und somit in Kombination zur Tumorthherapie eingesetzt werden können. Gerade bei strahlenresistenten Tumoren könnte eine höhere Strahlentoxizität erzielt werden. Ein weiterer Vorteil ergibt sich daraus, dass diese Toxizitätserhöhung vornehmlich im Tumorgewebe zu verzeichnen ist, da Neoangiogenese, wie oben bereits ausgeführt, im erwachsenen Organismus nur sehr begrenzt stattfindet. Ein erneutes Anwachsen der Tumorzellzahl, was häufig nach der Bestrahlung zu beobachten ist und auf die vermehrte Produktion angiogener Faktoren zurückgeführt wird, sollte sich durch eine gleichzeitige Angiogenesehemmung vermeiden lassen. Insgesamt sprechen alle diskutierten Aspekte dafür, dass Kombinationstherapien von Angiogeneseinhibitoren und Bestrahlung eine Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten maligner Erkrankungen darstellen.

5 Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Auswirkungen einer Kombinationstherapie von Angiogenesehemmung und Bestrahlung auf Tumorgefäße am Chorionallantoismembran Modell des Hühnerembryos untersucht.

Angiogeneseinhibitoren stellen in der modernen Therapie maligner Erkrankungen einen wesentlichen Fortschritt hinsichtlich Tumorprogression und Gesamtüberleben dar. Im Jahre 2005 wurde Bevacizumab, der erste Antikörper gegen VEGF, eines der Schlüsselmoleküle in der Tumorangiogenese, für die Therapie des kolorektalen Karzinoms beim Menschen in Deutschland zugelassen. Im klinischen Alltag wird Bevacizumab in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika eingesetzt.

Bislang widersprüchlich diskutiert wird eine Kombination von Angiogeneseinhibitor und Bestrahlung. Es ist bekannt, dass hypoxische Zellen weniger strahlensensibel sind. Eine Angiogenesehemmung sollte durch Regression von Blutgefäßen zur Minderversorgung mit Sauerstoff führen. Tierexperimentelle Untersuchungen zeigten jedoch eine erhöhte Strahlensensitivität antiangiogen behandelter Tumoren. Man erklärt sich diese Beobachtungen durch die Reduktion pathologischer Gefäße im Tumor. Darunter soll es zu einer Normalisierung der Perfusionsverhältnisse im malignen Gewebe kommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein einfaches, billiges und leicht handhabbares in-vivo Modell zur Untersuchung der Auswirkungen antiangiogener Substanzen in Verbindung mit einer Bestrahlungstherapie auf Tumorgefäße etabliert. Dazu eignet sich die Chorionallantoismembran (CAM) des Hühnerembryos in besonderer Weise. Die Einleitung gibt einen Überblick der notwendigen Grundlagen. Tumoren lassen sich aufgrund des unreifen Immunsystems problemlos applizieren und induzieren eine Neoangiogenese im Wirtssystem. Mit einem Matrigel-Assay konnten aus verschiedenen Zelllinien solide Spheroide hergestellt werden, die, nach Übertragung auf die CAM, zu vaskularisierten Tumoren heranwachsen. Für die Hauptversuche dieser Arbeit wurde die Rhabdomyosarkomzelllinie RD gewählt, deren Eigenschaften sich als besonders geeignet herausstellten. Einerseits ist bekannt, dass RD VEGF exprimiert; weiterhin von Vorteil erwies sich das schnelle Anwachsverhalten der Zellen. Bereits nach 3 Kultivierungstagen konnte ein Anwachsen von 91% der Tumoren erreicht werden.

Die Bestrahlung der Eier mit definierten Strahlendosen wurde an einem dafür entwickelten Bestrahlungsarbeitsplatz durchgeführt. Um klinischen Belangen Rechnung zu tragen, wurde die Bestrahlung in fraktionierte Einzeldosen aufgeteilt. Es zeigte sich, dass keiner der Embryonen eine kumulative Strahlendosis von mehr als 27 Gy überlebte. Untersuchungen

hinsichtlich der Gefäßanzahl normaler CAM-Gefäße bei verschiedenen Strahlendosen erbrachten keine Veränderungen bei 14 Tage alten CAM's. Da die CAM-Gefäße nur bis zum 11. Entwicklungstag einer hohen Mitoserate unterliegen und danach im wesentlichen nur Reifungsvorgänge stattfinden, scheint eine Bestrahlung in diesem Entwicklungsstadium keine Auswirkungen auf die Anzahl physiologischer Gefäße zu haben.

Bevacizumab als humanisierter monoklonaler VEGF-Antikörper wurde zunächst auf seine Wirksamkeit auf der CAM getestet. Dabei konnte sehr eindrucksvoll eine konzentrationsabhängige Gefäßreduktion belegt werden. Eine deutliche Verminderung zeigte sich auch bei tumorversorgenden Gefäßen.

Auswirkungen der Einzeltherapien sowie der Kombination aus Angiogeneseinhibition und Bestrahlung wurden histologisch untersucht. Dabei diente die Hämatoxylin-Eosin-Färbung einer ersten Übersicht. Es zeigt sich, dass sowohl Bestrahlung als auch Angiogenesehemmung zu einer Reduktion der Zellzahl im Tumorgewebe führte.

Weiterführende Untersuchungen zu Tumorgefäßen wurden mit Hilfe von Spezialfärbungen zur Endothelzelldarstellung durchgeführt. Mit fluoreszenzmarkiertem SNA-1-Lectin lassen sich spezifisch auf Endothelzellen vorkommende Zuckermoleküle sichtbar machen. Die immunhistochemische Färbung des VEGF-Rezeptors-1 diente der Beurteilung des Rezeptorbesatzes im Tumorgewebe nach den unterschiedlichen Behandlungsformen.

In der SNA-1-Lectin-Färbung konnten statistisch signifikante Verminderungen der Gefäßdichte im Tumorgewebe sowohl beim Vergleich der Einzeltherapien zum unbehandelten Tumor, als auch beim Vergleich der Einzeltherapien zur Kombination aus Bestrahlung und Angiogenesehemmung nachgewiesen werden. Eine alleinige Bestrahlung führte zu einer Gefäßreduktion um 22%, die Behandlung mit Bevacizumab um 58%, die Kombinationstherapie sogar um 73% im Vergleich zum unbehandelten Tumor.

Immunhistochemisch ließ sich eine statistisch signifikante Reduktion des VEGF-Rezeptorbesatzes nach Bevacizumab-Behandlung um 66% nachweisen. Die Kombinationstherapie erreichte eine Reduktion um 80% im Vergleich zum unbehandelten Tumor. Eine alleinige Bestrahlung zeigte eine diskrete, statistisch nicht signifikante Erhöhung des VEGF-Rezeptors. Die Kombinationstherapie führte zu einer weiteren diskreten Verminderung des Rezeptorbesatzes, die jedoch statistisch nicht belegt werden konnte.

Somit können im Hinblick auf den VEGF-Rezeptor-1 Besatz über den Vorteil einer Kombinationstherapie gegenüber den Einzeltherapien keine Aussagen gemacht werden. Unbestritten bleibt jedoch die Erkenntnis, dass die Kombination des Angiogenesehemmers Bevacizumab und Bestrahlung synergistische Effekte hinsichtlich einer Gefäßreduktion im Tumorgewebe erbringt.

Es konnte in dieser Arbeit in einem einfachen, auch als Screeningmethode einsetzbarem Modell gezeigt werden, dass sich Angiogeneseinhibitoren und Strahlentherapie in ihrer Wirkungsweise unterstützen und somit in Kombination zur Tumorthherapie eingesetzt werden können.

Das entwickelte Tumor-CAM-Modell kann für weitere tumorbiologische Untersuchungen eingesetzt werden. Interessante Ansatzpunkte ergeben sich hinsichtlich anderer Tumorzelllinien, Angiogeneseinhibitoren sowie zellulärer Mechanismen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 **Abdollahi A**, Lipson KE, Han X, Krempien R, Trinh T, Weber KJ, Hahnfeldt P, Hlatky L, Debus J, Howlett AR, Huber PE: SU5416 and SU6668 attenuate the angiogenic effects of radiation-induced tumor cell growth factor production and amplify the direct anti-endothelial action of radiation in vitro. *Cancer Res* 63 (2003) 3755-3763
- 2 **Armstrong PB**, Quigley JP, Sidebottom E: Transepithelial invasion and intramesenchymal infiltration of the chick embryo chorioallantois by tumor cell lines. *Cancer Res* 42 (1982) 1826-1837
- 3 **Asahara T**, Murohara T, Sullivan A: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 (1997) 964-967.
- 4 **Asahara T**, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM: VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 18 (1999) 3964-3972
- 5 **Ausprunk DH**, Knighton DR, Folkman J: Vascularisation of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois. Role of host and pre-existing graft blood vessels. *Am J Pathol* 79 (1975) 597-628
- 6 **Ausprunk DH**, Knighton DR, Folkman J: Differentiation of the vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. *Dev Biol* 38 (1974) 237-247.
- 7 **Baintner K**, Jakab G, Gyori Z, Kiss P: Binding of FITC-labelled lectins to the gastrointestinal epithelium of the rat. *Pathol Oncol Res* 6 (2000) 179-183
- 8 **Baker AH**, Zaltsman AB, George SJ, Newby AC: Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2 or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. *TIMP-3 promotes apoptosis. J Clin Invest* 101 (1998) 1478-1487
- 9 **Baumgartner I**, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JM: Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 97 (1998) 1114-1123
- 10 **Becker A**, Stadler P, Lavey RS, Hansgen G, Kuhnt T, Lautenschlager C, Feldmann HJ, Molls M, Dunst J: Severe anemia is associated with poor tumor oxygenation in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46 (2000) 459-466
- 11 **Beckers M**, Gladis-Villanueva M, Hamann W, Schmutzler W, Zwadlo-Klarwasser G: The use of the chorio-allantoic membrane of the chick embryo as test for anti-inflammatory activity. *Inflamm Res* 46 (1997) 29-30
- 12 **Bendas G**: Selektive als neue Zielstrukturen für die Pharmaforschung. *Pharm Ztg* 46 (1999) 10-16
- 13 **Bhaskar V**, Law DA, Ibsen E, Breinberg D, Cass KM, DuBridge RB, Evangelista F, Henshall SM, Hevezi P, Miller JC, Pong M, Powers R, Senter P, Stockett D, Sutherland RL, von Freeden-Jeffrey U, Willhite D, Murray R, Afar DEH, Ramakrishnan V: E-selectin up-regulation allows for targeted drug delivery in prostate cancer. *Cancer Res* 63 (2003) 6387-6394
- 14 **Biancone L**, Araki M, Araki K, Vasalli P, Stamencovic I: Redirection of tumor metastasis by expression of E-selectin in vivo. *J Exp Med* 183 (1996) 581-587
- 15 **Brieger J**, Schroeder P, Gosepath J, Mann WJ: VEGF-subtype specific protection of SCC and HUVECs from radiation induced cell death. *Int J Mol Med* 15 (2005) 145-151
- 16 **Bürgermeister J**: Wirkmechanistische Untersuchungen antiangiogener Galactansulfate. Dissertation (2002) Naturwissenschaftliche Fakultät Universität Regensburg
- 17 **Carmeliet P**: Angiogenesis in health and disease. *Nature Med* 9 (2003) 653-660

- 18 **Carmeliet P**, Collen D: Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. In: Claesson-Welsh L (Hrsg): Vascular growth factors and angiogenesis. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1999, S.133-158
- 19 **Carmeliet P**, Ferreira V, Breier G: Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380 (1996) 435–439
- 20 **Carnet P**, Rakesh KJ: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407 (2000) 249-257
- 21 **Chang YS**, Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL: Mosaic blood vessels in tumors: Frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *PNAS* 97 (2000) 14608–14613
- 22 **Chapman JD**, Dugle DL, Reuvers AP, Meeker BE, Borsa J: Studies on the radiosensitizing effect of oxygen in chinese hamster cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 26 (1974) 383-389
- 23 **Chiarugi V**, Magnelli L, Gallo O: Cox-2, iNOS and p53 as playmakers of tumor angiogenesis. *Int J Mol Med* 2 (1998) 715-719
- 24 **Chin W**, Lau W, Lay SL, Wei KK, Olivo M: Photodynamic-induced vascular damage of the chick chorioallantoic membrane model using perylenequinones. *Int J Oncol* 25 (2004) 887-891
- 25 **Choi K**, Kennedy M, Kazarov A: A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125 (1998) 725–732
- 26 **Collier IE**, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He CS, Bauer EA, Goldberg GI: H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 263 (1988) 6579-6587
- 27 **Cooper MA**, Fehniger TA, Caligiuri MA: The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22 (2001) 633-640
- 28 **Cramb D**, Samkoe K: Application of an ex ovo chicken chorioallantoic membrane model for two-photon excitation photodynamic therapy of age-related macular degeneration. *J Biomed Opt* 8 (2003) 410-417
- 29 **Cronstein BN**, Weissmann G: The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis Rheum* 36 (1993) 147-157
- 30 **D’Arcy PF**, Howard EM: A new anti-inflammatory test, utilizing the chorio-allantoic membrane of the chick embryo. *Br J Pharmac Chemother* 29 (1967) 378-387
- 31 **Ellenrieder V**, Hendler SF, Ruhland C, Boeck W, Adler G, Gress TM: TGF-beta-induced invasiveness of pancreatic cancer cells is mediated by matrix metalloproteinase-2 and the urokinase plasminogen activator system. *Int J Cancer* 93 (2001) 204-211
- 32 **English D**, Welch Z, Kovala T, Harvey O, Volpert D, Brindley D, Garcia J: Sphingosine 1-phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link between hemostasis and angiogenesis. *FASEB* 14 (2000) 2255-2265
- 33 **Ferrara N**: Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 237 (1999) 1-30
- 34 **Ferrara N**, Carver-Moore K, Chen H: Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380 (1996) 439–442
- 35 **Folkman, J**: Fighting cancer by attacking its blood supply. *Sci Am* 275 (1996) 150-154
- 36 **Gaetano C**, Catalano A, Illi B, Felici A, Minucci S, Palumbo R, Facchiano F, Mangoni A, Mancarella S, Muhlhauser J, Capogrossi MC: Retinoids induce fibroblast growth factor-2 production in endothelial cells via retinoic acid receptor alpha activation and stimulate angiogenesis in vitro and in vivo. *Circulation Res* 88 (2001) E38-47

- 37 **Gasparini G**, Weidner N, Bevilacqua P, Maluta S, Palma PD, Caffo O, Barbareschi M, Boracchi P, Marubini E, Pozza F: Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 12 (1994) 454-466
- 38 **Gerber HP**, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt B A, Dixit V, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal transduction pathway. *J Biol Chem* 273 (1998) 30336-30343
- 39 **Giannopoulou E**, Katsoris P, Hatziapostolou M, Kardamakis D, Kotsaki E, Polytarchou C, Parthymou A, Papaioannou S, Papadimitriou E: X-Rays modulate extracellular matrix in vivo. *Int J Cancer* 94 (2001) 690-698
- 40 **Gupta MK**, Qin RY: Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis, *World J Gastroenterol* 9 (2003) 1144-1155
- 41 **Hadley MA**, Byers SW, Suarez-Quian CA, Kleinman HK, Dym M: Extracellular matrix regulates Sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development in vitro. *J Cell Biol* 101 (1985) 1511-1522
- 42 **Hajitou A**, Grignet C, Devy L, Berndt S, Blacher S, Deroanne CF, Bajou K, Fong T, Chiang Y, Foidart JM, Noel A: The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells. *FASEB* 16 (2002) 1802-1804
- 43 **Hamid SA**, Daly C, Campbell S: Visualisation of live endothelial cells ex vivo and in vitro. *Microvasc Res* 66 (2003) 159-163
- 44 **Hashizume H**, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM: Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 156 (2000) 1363-1380
- 45 **Hatzopoulos A**, Folkman J, Vasile E: Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos. *Development* 125 (1998) 1457-1468.
- 46 **Hendrix MJ**, Seftor EA, Seftor RE, Fidler IJ: A simple quantitative assay for studying the invasive potential of high and low human metastatic variants. *Cancer lett* 38 (1987) 137-147
- 47 **Holash J**, Wiegand SJ, Yancopoulos GD: New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 18 (1999) 5356-5362
- 48 **Holzmann PMR**: Die Chorionallantoismembran (CAM) des Hühnerembryos: Optimierung und Erweiterung eines in-vivo Angiogenese Modells. Dissertation (2002) Medizinische Fakultät Universität Wien
- 49 **Hsinyu L**, Edward JG, Songzhu A: Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol* 278 (2000) C612-C618
- 50 **Hurwitz H**, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F: Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for metastatic colorectal cancer. *NEJM* 350 (2004) 2335-2352
- 51 **Ismail MS**, Torsten U, Dressler C, Diederichs JE, Hüske S, Weitzel H, Berlien HP: Photodynamic Therapy of Malignant Ovarian Tumours Cultivated on CAM. *Lasers Med Sci* 14 (1999) 91-96
- 52 **Jakobson AM**, Hahnenberger R: Antiangiogenic effect of heparin and other sulphated glycosaminoglycans in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Pharmacol Toxicol* 64 (1991) 193-195
- 53 **Junqueira LC**, Carneiro J: *Histologie*. 4.Aufl. Springer, New York, Berlin, Heidelberg (usw.), 1996, S. 291-293

- 54 **Kalka C**, Asahara T, Krone W, Isner J M: Angiogenese und Vaskulogenese
Therapeutische Strategien zur Stimulation der postnatalen Neovaskularisation. *Herz* 6
(2000) 611-622
- 55 **Kalka C**, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravereaux E, Pieczek A,
Iwaguro H, Hayashi SI, Isner JM, Asahara T: Vascular endothelial growth factor (165)
gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ
Res* 86 (2000) 1198–202
- 56 **Kardamakis D**, Hadjimichael C, Ginopoulos P, Papaioannou S: Effects of Paclitaxel in
combination with ionizing radiation on angiogenesis in the chick embryo chorioallantoic
membrane. *Strahlenther Onkol* 180 (2004) 152–156
- 57 **Karnabatidis D**, Dimopoulos JC, Siablis D, Papazafiroopoulos D, Kalogeropoulou CP,
Nikiforidis G: Quantification of the ionising radiation effect over angiogenesis in the
chick embryo and its chorioallantoic membrane by computerised analysis of
angiographic images. *Acta Radiol* 42 (2001) 333-338
- 58 **Kerbel R**, Folkman J: Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2
(2002) 727-739
- 59 **Kerbel RS**: Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 21
(2000) 505–515
- 60 **Kleinman HK**, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, Martin
GR: Basement Membrane Complexes with Biological Activity. *Biochemistry* 25 (1986)
312-318
- 61 **Kopp CW**, Minar E, Steiner S: Therapeutische Angiogenese bei peripherer arterieller
Verschlusskrankheit. *Journal für Kardiologie* 11 (2004) 79-83
- 62 **Kunzi-Rapp K**, Kaskel P, Steiner R, Peter RU, Krähn G: Increased blood levels of
human S100 in melanoma chick embryo xenografts' circulation. *Pigment Cell Res* 14
(2001) 9-13
- 63 **Lange N**, Ballini JP, Wagnieres G, van den Bergh HA: New drug-screening procedure
for photosensitizing agents used in photodynamic therapy for CNV. *Invest Ophthalmol
Vis Sci* 42 (2001) 38-46
- 64 **Langer R**, Folkman J: Polymers for the sustained release of proteins and other
macromolecules. *Nature* 263 (1976) 797-800
- 65 **Lawrence DA**, Pircher R, Jullien P: Conversion of a high molecular weight latent beta-
TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active beta-TGF
under acidic conditions. *Biochem Biophys Res Commu* 133 (1985) 1026-1034
- 66 **Leene W**, Duyzings MJM, Von Steeg C: Lymphoid stem cell identification in the
developing thymus and bursa of Fabricius of the chick. *Z Zell* 136 (1973) 521-533
- 67 **Leung DW**, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N: Vascular endothelial
growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246 (1989) 1306-1309
- 68 **Liekens S**, De Clercq E, Neyts J: Angiogenesis: regulators and clinical applications.
Biochem Pharmacol 61 (2001) 253–270
- 69 **Liekens S**: Special project angiogenesis. www.med.unibs.it/airc/sandra/introduction.html
- 70 **Losordo DW**, Vale PR, Symes JF: Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial
clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for
myocardial ischemia. *Circulation* 98 (1998) 2800–2804
- 71 **Lüpke N-P**: Tierversuche - Ergänzungs- und Ersatzmethoden. *Pharm Ztg Wiss* 6 (1992)
221-233
- 72 **Maisonpierre PC**, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C,
Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN,
Yancopoulos GD: Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo
angiogenesis. *Science* 277 (1997) 55-60
- 73 **Mc Donald DM**, Choyke PL: Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic.
Nature Med 9 (2003) 713-725

- 74 **McNamara DA**, Harmey JH, Walsh TN, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ: Significance of angiogenesis in cancer therapy. *Brit J Surg* 85 (1998) 1044-1055
- 75 **Montesano R**, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R, Orci L: Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 (1986) 7297-7301
- 76 **Moscatelli D**, Presta M, Rifkin DB: Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, DNA synthesis, and migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 (1986) 2091-2095
- 77 **Murphy AN**, Unsworth EJ, Stetler-Stevenson WG: Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol* 157 (1993) 351-358
- 78 **Nanus DM**, Schmitz-Drager BJ, Motzer RJ, Lee AC, Vlamis V, Cordon-Cardo C, Albino AP, Reuter VE: Expression of basic fibroblast growth factor in primary human renal tumors: correlation with poor survival. *J Natl Cancer Inst* 85 (1993) 1597-1599
- 79 **Netti PA**, Hamberg LM, Babich JW, Kierstead D, Graham W, Hunter GJ, Wolf GL, Fischman A, Boucher Y, Jain RK: Enhancement of fluid filtration across tumor vessels: Implication for delivery of macromolecules. *Proc Natl Acad Sci* 96 (1999) 3137-3142
- 80 **Neufeld G**, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB* 13 (1999) 9-22
- 81 **Nguyen M**, Shing Y, Folkman J: Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Microvasc Res* 47 (1994) 31-40
- 82 **Nofer J**, van der Giet M, Tölle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, Tietge U, Gödecke A, Ishii I, Kleuser B, Schäfers M, Fobker M, Zidek W, Assmann G, Chun J, Levkau B: HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest* 113 (2004) 569-581
- 83 **Onisto M**, Slongo ML, Gregnanin L, Gastaldi T, Carli M, Rosolen A: Expression and activity of vascular endothelial growth factor and metalloproteinases in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma cell lines. *Int J Oncol* 3 (2005) 791-798
- 84 **Paik JH**, Skoura A, Chae SS, Cowan AE, Han DK, Proia RL, Hla T: Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization. *Genes Dev* 18 (2004) 2392-2403
- 85 **Pasqualini R**, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sakamoto M, Stryhn A, Ashmun RA, Shapiro LH, Arap W, Ruoslahti E: Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* 60 (2000) 722-727
- 86 **Pfeifer A**, Kessler T, Silletti S, Cheresch DA, Verma IM: Suppression of angiogenesis by lentiviral delivery of PEX, a noncatalytic fragment of matrix metalloproteinase 2. *PNAS* 97 (2000) 12227-12232
- 87 **Presta LG**, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M, Ferrara N: Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 57 (1997) 4593-4599
- 88 **Presta M**, Moscatelli D, Joseph-Silverstein J, Rifkin DB: Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis, and migration. *Mol Cell Biol* 6 (1986) 4060-4066
- 89 **Rehn M**, Veikkola T, Kukk-Valdre E, Nakamura H, Ilmonen M, Lombardo C, Pihlajaniemi T, Alitalo K, Vuori K: Interactions of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001) 1024-1029
- 90 **Ribatti D**, Gualandris A, Bastaki M, Vacca A, Iurlaro M, Roncali L, Presta M: New model for the study of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane: the gelatin sponge/chorioallantoic membrane assay. *J Vasc Res* 34 (1997) 455-463

- 91 **Ribatti D**, Presta M: The role of fibroblast growth factor-2 in the vascularisation of the chick embryo chorioallantoic membrane. *J Cell Mol Med* 6 (2002) 439-446
- 92 **Ribatti D**, Roncali L, Nico B, Bertossi M: Effects of exogenous heparin on the vasculogenesis of the chorioallantoic membrane. *Acta Anat* 130 (1987) 257-263
- 93 **Ribatti D**, Urbinati C, Nico B, Rusnati M, Roncali L, Presta M: Endogenous basic fibroblast growth factor is implicated in the vascularization of the chick embryo chorioallantoic membrane. *Dev Biol* 170 (1995) 39-49
- 94 **Ribatti D**, Vacca A, Roncali L, Dammacco F: The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. *Int J Dev Biol* 40 (1996) 1189-1197
- 95 **Ribatti D**, Vacca A, Roncali L, Dammacco F: The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on antiangiogenesis. *Curr Pharmacol Biotech* 1 (2000) 73-82
- 96 **Ribatti D**, Nico B, Vacca A, Roncali L, Burri PH, Djonov V: Chorioallantoic Membrane Capillary Bed: A Useful Target for Studying Angiogenesis and Anti-Angiogenesis In Vivo. *The Anatomical Record* 264 (2001) 317-324
- 97 **Righi L**, Deaglio S, Pecchioni C, Gregorini A, Horenstein AL, Bussolati G, Sapino A, Malavasi F: Role of CD31/platelet endothelial cell adhesion molecule-1 expression in in vitro and in vivo growth and differentiation of human breast cancer cells. *Am J Pathol* 162 (2003) 1163-1174
- 98 **Risau W**: Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386 (1997) 671-674
- 99 **Schlessinger J**, Lax I, Lemmon, M: Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell* 83 (1995) 357-360
- 100 **Schüller M**: Entwicklung eines geeigneten Modells zur Untersuchung des selektinvermittelten Zellrollens – Das Chorioallantoismembran (CAM) –Modell. Dissertation (2005) Medizinische Fakultät Universität Halle-Wittenberg
- 101 **Shalaby F**, Ho J, Stanford WL: A requirement for flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89 (1997) 981-990
- 102 **Shi Q**, Rafii S, Wu M-D: Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92 (1998) 362-367
- 103 **Shikata Y**, Birukov KG, Garcia JGN: S1P induces FA remodeling in human pulmonary endothelial cells: role of Rac, GIT1, FAK and Paxillin. *J Appl Physiol* 94 (2003) 1193-1203
- 104 **Singh RK**, Gutman M, Bucana CD, Sanchez R, Llansa N, Fidler IJ: Interferons alpha and beta down-regulate the expression of fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci* 92 (1995) 4562-4566
- 105 **Smith MR**, Kung H, Durum SK, Colburn NH, Sun Y: TIMP-3 induces cell death by stabilizing TNF-alpha receptors on the surface of human colon carcinoma cells. *Cytokine* 9 (1998) 770-780
- 106 **Soh EY**, Duh Q-Y, Sobhi SA, Young DM, Epstein HD, Wong MG, Garcia YK, Min YD, Grossmann RF, Siperstein AE, Clark OH: Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid. *J Clin Endocrin Metabol* 82 (1997) 3741-3747
- 107 **Soker S**, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M: Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92 (1998) 735-745
- 108 **Spielmann H**, Kalweit S, Liebsch M, Wirnsberger T, Gerner I, Bertram-Neis E, Krauser K, Kreiling R, Miltenburger G, Pape W, Steiling W: Validation study of alternatives to the draize eye irritation test in Germany: Cytotoxicity testing and HET- CAM test with 136 industrial chemicals. *Toxicol In Vitro* 7 (1993) 505-510
- 109 **Statistisches Bundesamt** www.destatis.de (2005)

- 110 **Streubel B**, Chott A, Huber D, Exner M, Jäger U, Wagner O, Schwarzingler I: Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *NEJM* 351 (2004) 250-259
- 111 **Suri C**, Jone, PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD: Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87 (1996) 1171-1180
- 112 **Symes JF**, Losordo DW, Vale PR: Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann Thorac Surg* 68 (1999) 830-837
- 113 **Takahashi T**, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T: Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5 (1999) 434-438
- 114 **Taniguchi S**, Tatsuka M, Nakamatsu K, Inoue M, Sadano H, Okazaki H, Iwamoto H, Baba T: High invasiveness associated with augmentation of motility in a fos-transferred highly metastatic rat 3Y1 cell line. *Cancer Res* 49 (1989) 6738-6744
- 115 **Tateishi-Yuyama E**, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360 (2002) 427-435
- 116 **Tuan RS**, Nguyen HQ: Cardiovascular changes in calcium-deficient chick embryos. *J Exp Med* 165 (1987) 1418-1423
- 117 **Veikkola T**, Alitalo K: VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 9 (1999) 211-220
- 118 **Volpert OV**, Fong T, Koch AE, Peterson JD, Waltenbaugh C, Tepper RI, Bouck NP: Inhibition of angiogenesis by interleukin-4. *J Exp Med* 188 (1998) 1039-1046
- 119 **Wachsberger P**, Burd R, Dicker AP: Tumor response to ionizing radiation combined with antiangiogenesis or vascular targeting agents: exploring mechanisms of interaction. *Clinical Cancer Res* 9 (2003) 1957-1971
- 120 **Weber WT**, Mausner R: Migration patterns of avian embryonic bone marrow cells and their differentiation to functional T and B cells, In: Benedict AA (Hrsg) *Avian Immunology*. Plenum, New York, (1977), S. 47-59
- 121 **Weidner N**, Semple JP, Welch WR, Folkman J: Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *NEJM* 324 (1991) 1-8
- 122 **Wernert N**, Stanjek A, Kiriakidis S, Hügel A, Jha HC, Mazitschek R, Giannis A: Inhibition of Angiogenesis In Vivo by ets-1 Antisense Oligonucleotides-Inhibition of Ets-1 Transcription Factor Expression by the Antibiotic Fumagillin. *Angew Chem Int Ed Engl* 38 (1999) 3228-3231
- 123 **Westermarck J**, Kahari VM: Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 13 (1999) 781-792
- 124 **Willet CG**, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV, Mino M, Cohen KS, Scadden DT, Hartford AC, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Chen HX, Shellito PC, Lauwers GY, Jain RK: Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nature Med* 10 (2004) 145-147
- 125 **Zhang L**, Yu D, Hicklin DJ, Hannay JAF, Ellis LM, Pollock RE: Combined anti-fetal liver kinase 1 monoclonal antibody and continuous low-dose doxorubicin inhibits angiogenesis and growth of human soft tissue sarcoma xenografts by induction of endothelial cell apoptosis. *Cancer Res* 62 (2002) 2034-2042

7 Anhang (Bildatlas Histologie)

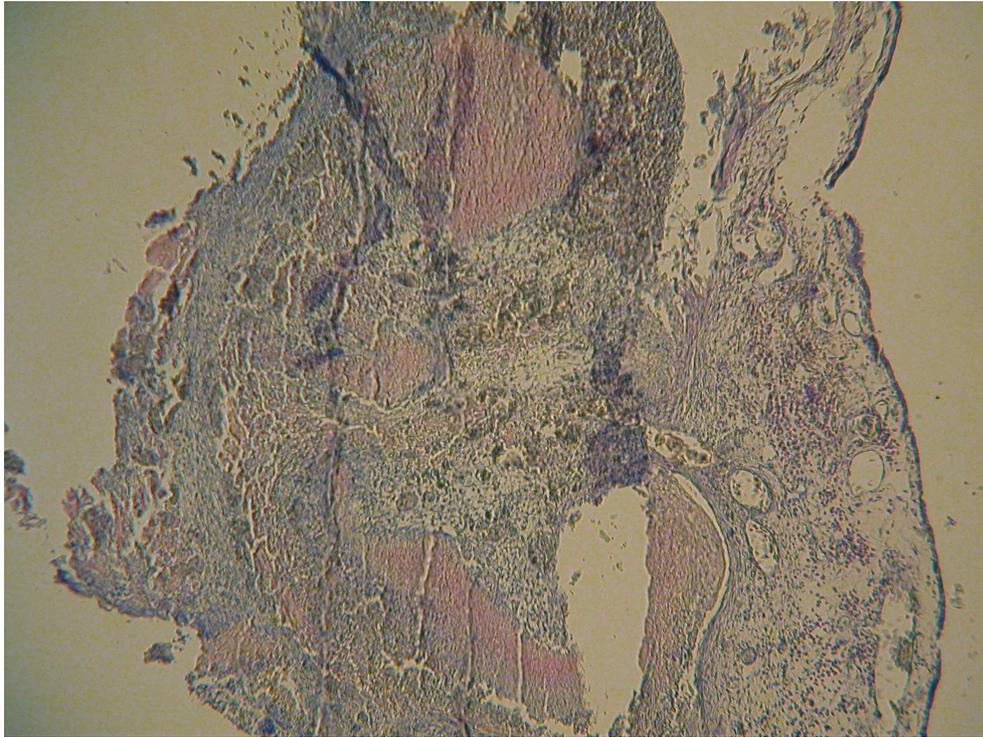


Abbildung 23: Tumor 10 d alt ohne Behandlung, H.E.

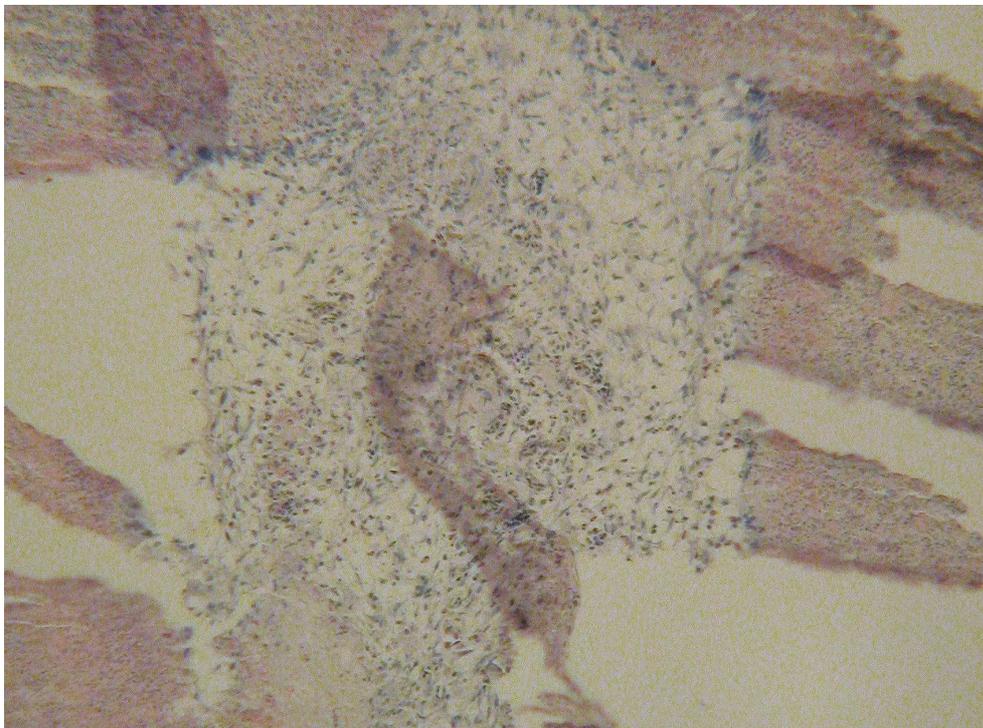


Abbildung 24: Tumor 10 d alt nach Bestrahlung mit 27 Gy, H.E.

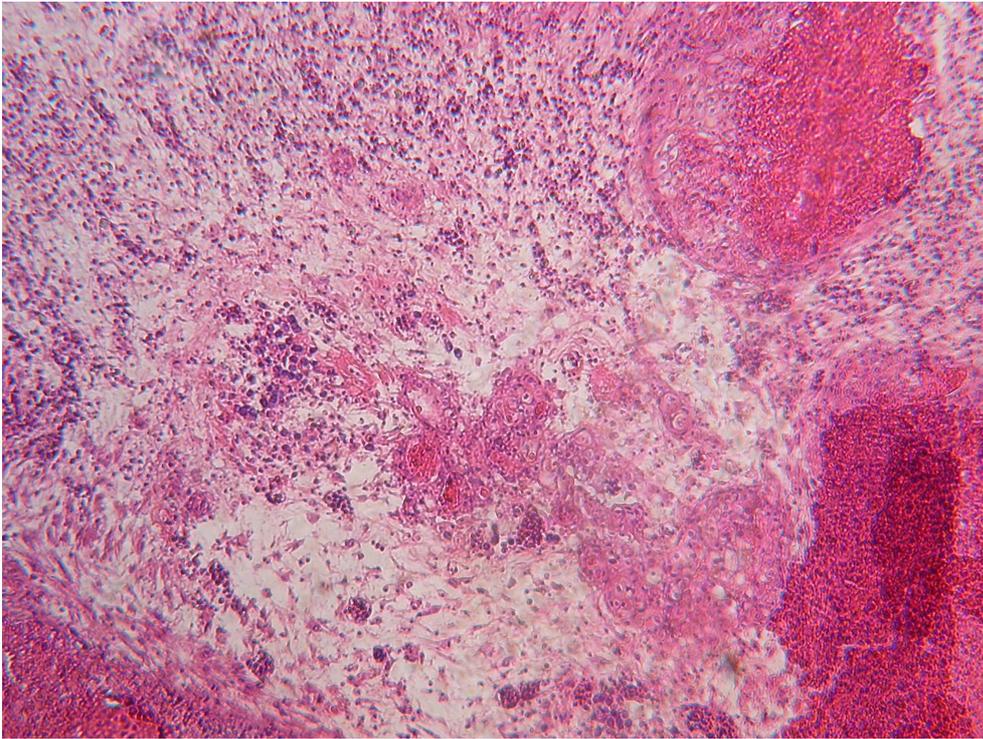


Abbildung 25: Tumor 10d alt nach Behandlung mit 10µl Avastin[®], H.E.

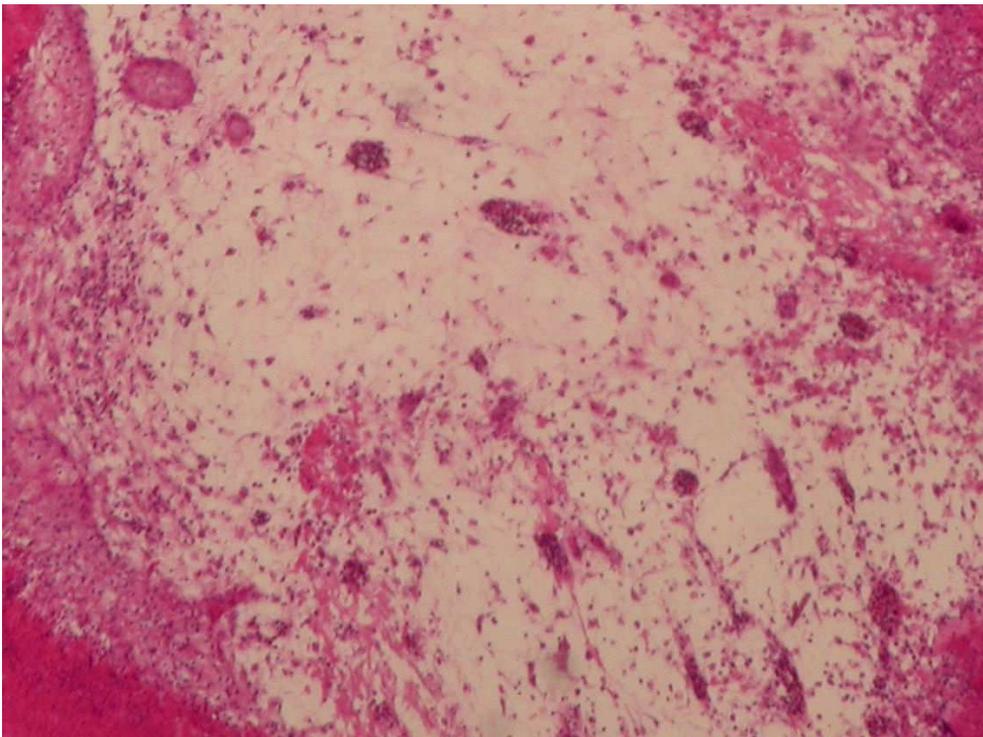


Abbildung 26: Tumor 10d alt nach Kombination von 10µl Avastin[®] und Bestrahlung mit 27 Gy, H.E.

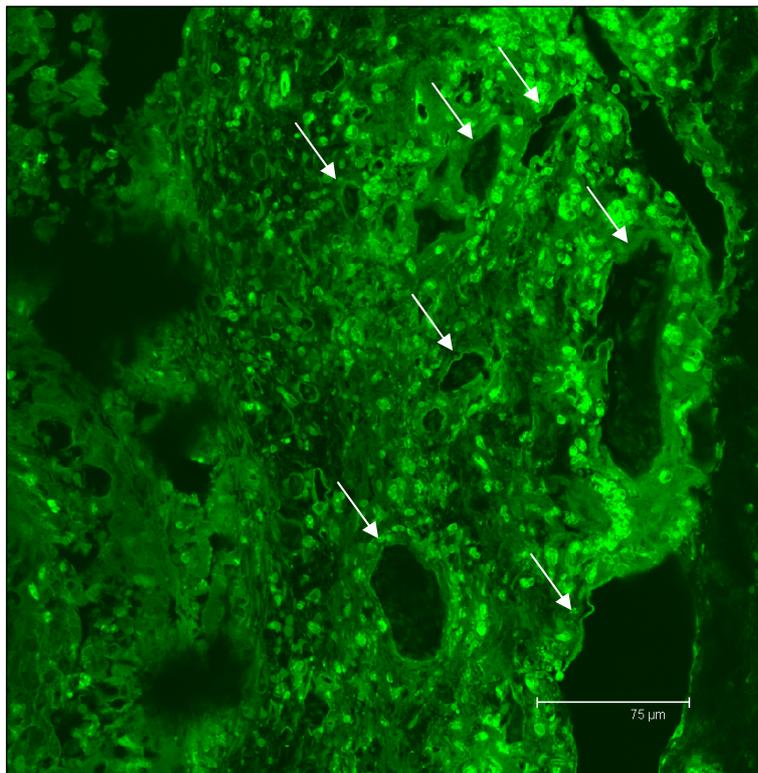


Abbildung 27: unbehandelter Tumor 10d, SNA-1-Lectin-Färbung, Pfeile markieren Gefäßanschnitte, Markierung entspricht 75μm

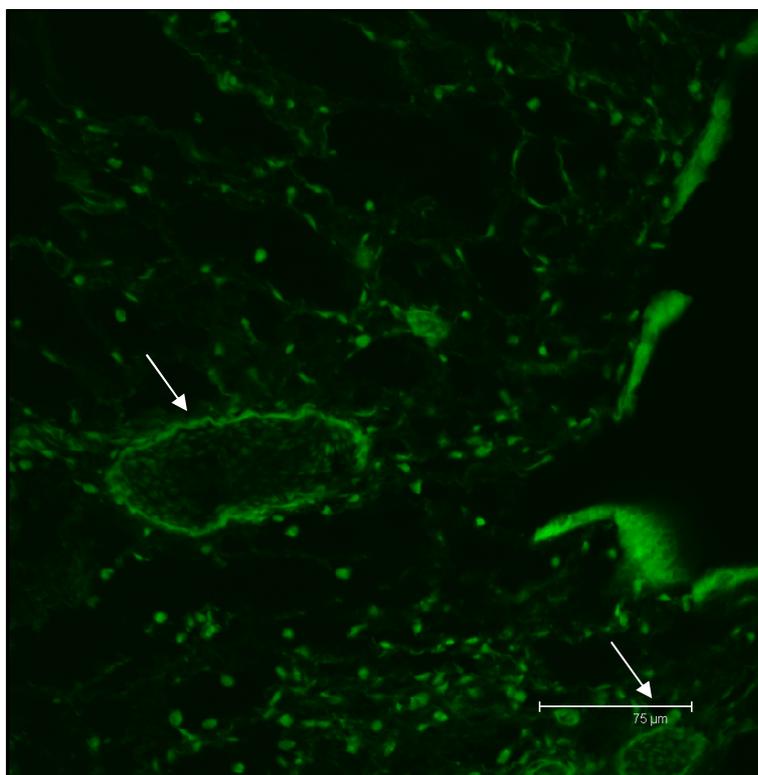


Abbildung 28: Tumor 10d nach Kombination von 10μl Avastin[®] und Bestrahlung mit 27Gy, SNA-1-Lectin-Färbung, Pfeile markieren Gefäßanschnitte, Markierung entspricht 75μm

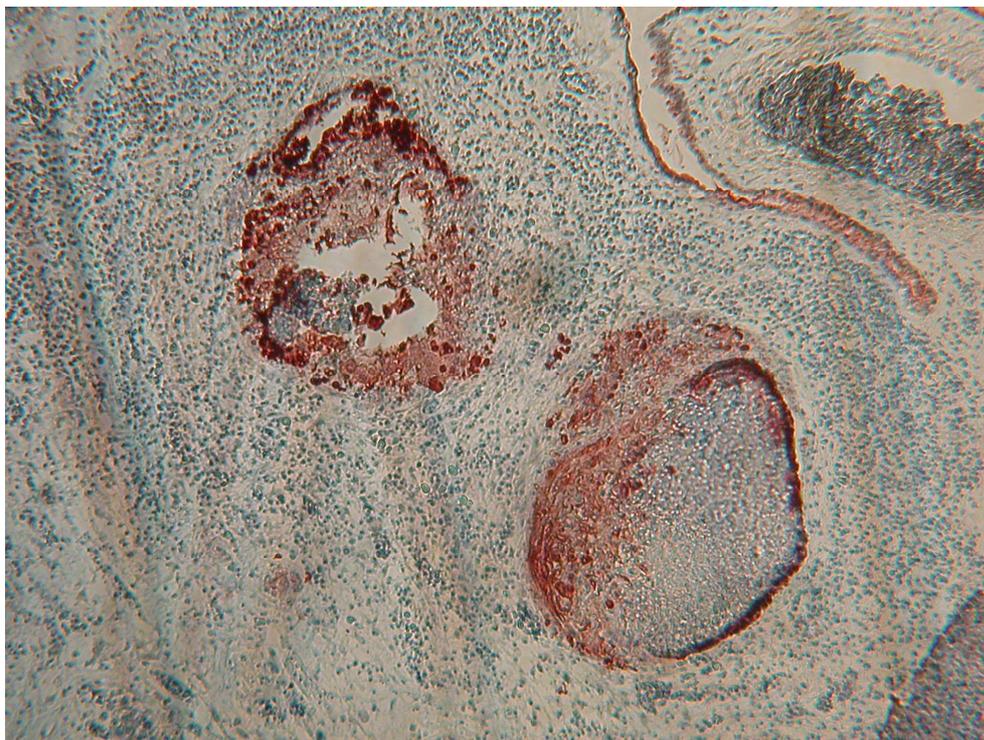


Abbildung 29: un behandelter Tumor 10d alt, Immunhistochemie gegen VEGF-Rezeptor-1, Vergrößerung 200x

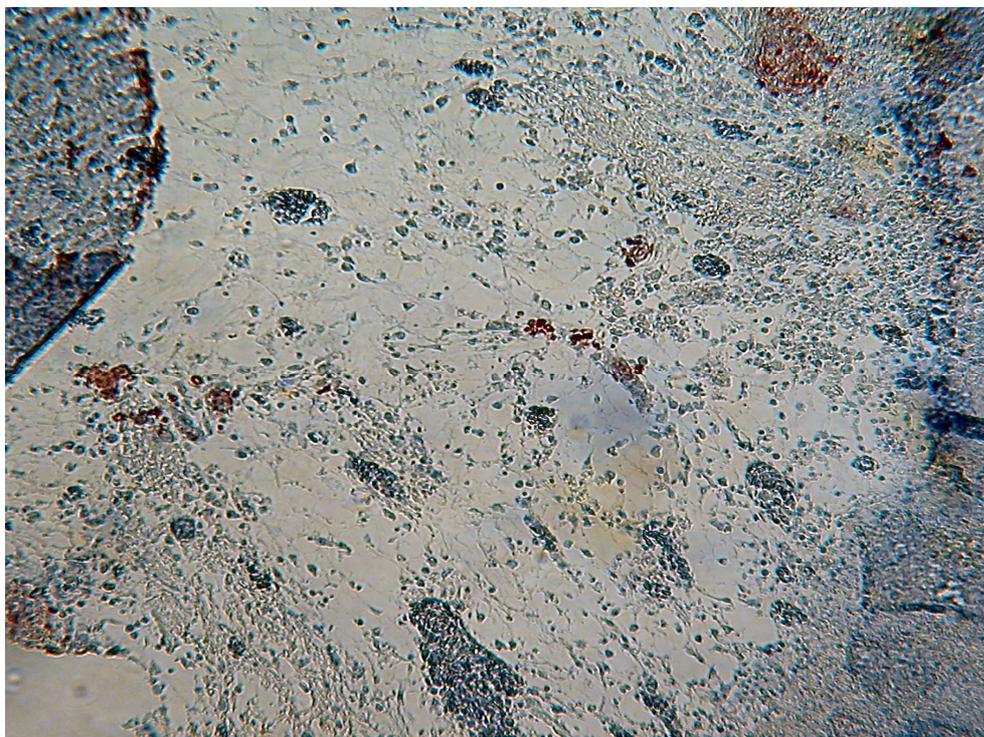


Abbildung 30: Tumor 10d alt nach Kombination von 10µl Avastin® und Bestrahlung mit 27Gy, Immunhistochemie gegen VEGF-Rezeptor-1, Vergrößerung 200x

8 Thesen

1. Ab einer bestimmten Größe müssen Tumoren einen Anschluss an Blutgefäße gewinnen, um sich ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen zu können. Angiogeneseprozesse, die dabei vom Tumor induziert werden, finden sonst im adulten Organismus im wesentlichen nur bei Wundheilungsprozessen und während des weiblichen Reproduktionszyklus statt.
2. Antiangiogene Stoffe können überraschenderweise zu einer Verbesserung der Blutversorgung des Tumors über eine Normalisierung des pathologischen Gefäßsystems beitragen und werden in der Therapie maligner Erkrankungen in Kombination mit Chemotherapeutika eingesetzt.
3. VEGF spielt als Wachstumsfaktor in der Tumorangiogenese eine wesentliche Rolle. Der humanisierte VEGF-Antikörper Bevacizumab wurde bereits 2005 zur Therapie des kolorektalen Karzinoms beim Menschen zugelassen. Er wirkt sowohl auf normale CAM-Gefäße als auch auf Tumorgefäße antiangiogen.
4. Gut mit Sauerstoff versorgte Gewebe sind strahlensensibler als hypoxische Gewebe.
5. Die Chorionallantoismembran (CAM) des Hühnerembryos eignet sich für verschiedene Untersuchungen sowohl antiangiogener als auch proangiogener Prozesse.
6. Beste Ergebnisse hinsichtlich des Überlebens zeigte eine in ovo Kultivierungsmethode der Embryonen.
7. Mit Hilfe einer Matrigeltechnik lassen sich auf der (CAM) des Hühnerembryos gut vaskularisierte Tumoren aus Tumorzelllinien erzeugen. Dabei stellte sich von den getesteten Zelllinien ein embryonales Rhabdomyosarkom (RD) als optimal heraus.

8. Definierte Strahlendosen von 3 Gy an 3 aufeinander folgenden Tagen 3-mal täglich (27 Gy kumulativ) auf eine 14 Tage alte CAM appliziert, haben keine Auswirkungen auf das normale Gefäßsystem.
9. Eine Kombinationstherapie von Bevacizumab (25µg/ml) und Bestrahlung (27 Gy) führt zu einem synergistischen Effekt sowohl hinsichtlich einer Reduktion der Tumorzellzahl und Gefäßanzahl des Tumors als auch des VEGF-Rezeptor-1-Besatzes der Gefäßendothelien.
10. In der SNA-1 Lectin-Färbung konnte bei der Kombinationstherapie eine Reduktion der Tumorgefäße auf 26% des unbehandelten Tumors gezeigt werden.
11. In der immunhistochemischen Darstellung des VEGF-Rezeptors-1 lässt sich bei Kombinationstherapie eine Reduktion um 80% im Vergleich zum unbehandelten Tumor nachweisen.
12. Die gewonnenen Ergebnisse lassen eine Kombination von Angiogenesehemmung und Bestrahlung als viel versprechenden Therapieansatz erscheinen.
13. Das CAM-Modell eignet sich für tumorbiologische Fragestellungen in besonderer Weise als Screeningmethode. Am hier entwickelten Modell können weiterführende Untersuchungen mit anderen Angiogeneseinhibitoren auf einfache Weise durchgeführt werden.

Lebenslauf

persönliche Daten:

Vor- und Zuname: Susanne Rode
Geburtsdatum und -ort: 10.01.1981 in Merseburg
Familienstand: ledig, keine Kinder

Schulbildung:

1987-1991 Otto-Grotewohl-Schule Merseburg
1991-1999 Domgymnasium Merseburg
Juli 1999 Abitur

Studium:

1999-2006 Studium der Medizin an der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg
2001 Ärztliche Vorprüfung
2002 1.Staatsexamen
2004 2.Staatsexamen
2006 3.Staatsexamen
21.11.2006 Approbation

Jetzige Tätigkeit:

Seit 01.01.2007 Assistenzärztin der Klinik für Innere Medizin am Carl-von-
Basedow-Klinikum Merseburg

Halle, den 29.05.2007

Selbständigkeitserklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Susanne Rode

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass diese Promotion an keiner weiteren Fakultät eingereicht bzw. abgelehnt wurde. Ein früherer Promotionsversuch ist nicht erfolgt.

Susanne Rode

Publikation

S. Rode (Halle), U. Rothe (Halle), T. Kuhnt (Halle), R. Scharf (Halle), G. Hänsgen (Halle)

Auswirkung einer Kombination von Bestrahlung und antiangiogener Behandlung auf normale und tumorinduzierte Gefäße am Modell der Chorionallantoismembran (CAM)

Poster auf dem 12. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, Dresden, Mai 2006

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Ulrich Rothe für die Möglichkeit der Erstellung dieser Arbeit, die fachliche Betreuung sowie die ständige Diskussionsbereitschaft. Ich bedanke mich ganz herzlich für die vielfältige Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas.

Frau PD Dr. Hänsgen und Herrn Dr. Scharf aus der Klinik für Strahlentherapie sei gedankt für die Möglichkeit der Durchführung der Bestrahlungsversuche, aufschlussreiche Diskussionen und die dosimetrischen Messungen.

Des Weiteren danke ich Herrn PD Dr. Taubert aus dem Institut für Pathologie für die Bereitstellung der Zellkulturen sowie die wertvolle Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Präparate.

Für die ständige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche bedanke ich mich bei Frau U. Goder und Nancy Funk.

Nicht zuletzt gilt mein Dank den Mitarbeitern der gesamten Arbeitsgruppe, die mir stets hilfreich und unterstützend zur Seite standen.