Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Etablierung eines *in vitro* Modells des caninen malignen Hämangioendothelioms

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Detlef Kühn
Tierarzt aus Köthen (Anhalt)

Berlin 2009

Journal-Nr.: 3306

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. J. Plendl
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. B. Kohn
Dritter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
dogs, dog diseases, neoplasms, haemangiosarcoma, endothelium, in vitro culture

Tag der Promotion: 03.07.2009

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-670-4
Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009
Dissertation, Freie Universität Berlin
D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.
Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.
No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved
© **m**ensch und **b**uch **v**erlag 2009
choriner str. 85 - 10119 berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

I. Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Ziel 1

2 Literaturübersicht 3
2.1 Aufbau und Entstehung der Blutgefäße 3
2.1.1 Das Blutgefäßsystem 3
2.1.2 Endothelzellen 3
2.1.3 Vaskulogenese 4
2.1.4 Angiogenese 4
2.1.5 Intussuszeption 4
2.1.6 Physiologische Blutgefäßbildung 5
2.1.7 Pathophysiologische und pathologische Angiogenese 5
2.2 Die *ex vivo* Kultivierung von Endothelzellen 6
2.2.1 Explantat-Kulturen von Endothelzellen 6
2.2.2 *In vitro* Kultur von Endothelzellen 6
2.2.3 Die *in vitro* Angiogenese 7
2.2.4 Zweidimensionale Modelle der *in vitro* Angiogenese 8
2.2.5 Dreidimensionale Modelle der *in vitro* Angiogenese 9
2.3 Das maligne Hämangioendotheliom 10
2.3.1 Betroffene Tierarten 10
2.3.2 Rassedisposition beim Hund 10
2.3.3 Altersverteilung der erkrankten Tiere 11
2.3.4 Geschlechterverteilung der Patienten 11
2.3.5 Größe und Gewicht der Patienten 11
2.3.6 Lokalisation des Tumors 12
2.3.7 Symptome der Patienten 14
2.3.8 Klinische Stadieneinteilung 17
2.4 Therapie 18
2.4.1 Chirurgische Resektion des Tumors 18
2.4.2 Chemotherapie und Immuntherapie 19

3	**Material**	20
3.1	Zellen	20
3.2	Verbrauchsmaterialien	20
3.3	Geräte	21
3.4	Lösungen für die Zellkultur	22
3.5	Verwendete Kulturmedien	23
3.5.1	Zusammensetzung des Erhaltungsmediums (DMEM+)	23
3.5.2	Zusammensetzung des Selektivmediums (P_0)	23
3.6	Einfriermedium	23
3.7	Materialien für die Zellisolierung	24
3.7.1	Enzymlösung für die Zellisolierung	24
3.7.2	Edelstahlsiebe	24
3.8	Nachweis der Bindung FITC-konjugierter-Lektine	24
3.9	Antikörper, Immunreagenzien und Reaktions-Kit	25
3.10	Transmissionselektronenmikroskopie	26
3.10.1	Verbrauchsmaterialien	26
3.10.2	Chemikalien und Reagenzien	26
4	**Methoden**	27
4.1	Herkunft der Zellen	27
4.1.1	Entnahme und Transport der Organe für die Zellisolierung	27
4.2	Zellkultur	28
4.2.1	Aufbereitung der Proben und Isolierung der Zellen	28
4.2.2	Kultivierung der Zellen	29
4.2.3	Subkultivierung	29
4.2.4	Kryokonservierung	29
4.2.5	Auftauen der Zellen	30
4.3	Zellzählung nach Ablösung der *in vitro* kultivierten Zellen	30
4.4	Zellzählung *in vitro* ohne Ablösung der Zellen	30
4.5	Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen *in vitro* kultivierter Zellen	31
4.6	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen *in vitro* kultivierter Zellen	31
4.7	Immunzytochemische Untersuchungen an caninen Zellen	32
4.7.1	Immunzytochemische Untersuchungsmethode der Zellen mit Biotin-konjugiertem Sekundärantikörper	33
4.7.2	Immunzytochemische Untersuchungsmethode der Zellen mit dem EnVision+TM-Kit	34
4.7.3	Kontrollen der immunzytochemischen Untersuchungen	35
4.8	Nachweis der Bindung FITC-konjugierter-Lektine	35

5 Ergebnisse 36
5.1 *In vitro* Kultivierung caniner Zellen 36
5.1.1 Morphologie und Proliferation der Zellen nach der Isolierung 36
5.1.1.1 Zellen aus malignen Hämangioendotheliomen 36
5.1.1.2 Zellen aus einer unveränderten Milz 39
5.1.2 Ausbildung angiogener Stukturen 41
5.1.2.1 Zellen des malignen Hämangioendothelioms 41
5.1.2.2 Zellen aus der gesunden Milz eines Hundes 44
5.1.3 *In vitro* Proliferationsverhalten 46
5.1.4 Maximale Kultivierungsdauer 47
5.2 Immunzytochemische Untersuchungen 48
5.2.1 Immunzytochemische Markierung mit anti-vWF (von Willebrand Faktor) 48
5.2.1.1 Kontrollen 50
5.2.2 Immunzytochemische Markierung mit anti-CD31 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule, PECAM-1) 51
5.2.2.1 Kontrollen 53
5.2.3 Immunzytochemische Markierung mit anti-Tie-2 (H-176) 54
5.2.3.1 Kontrollen 56
5.2.4 Immunzytochemische Markierung mit anti-CD51/61 (Integrin αvβ3, Vitronectin-Rezeptor) 57
5.2.4.1 Kontrollen 59
5.2.5 Tabellarische Übersicht der immunzytochemischen Untersuchungen 60
5.3 Lektinzytochemische Untersuchungen 61
5.3.1 Bindung des Dolichos biflorus Agglutinin (DBA) 61
5.3.2 Bindung des Ulex europaeus Agglutinin (UEA I) 63
5.3.3 Bindung des Concanavalin A (Con A) 65
5.3.4 Bindung des Wheat Germ Agglutinin (WGA) 67
5.4 Elektronenmikroskopie 69
5.4.1 Semidünnschnitte 69
5.4.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen 71

6 Diskussion 75
6.1 Isolierung der caninen Zellen 75
6.2 Identifizierung und Charakterisierung der isolierten Zellen 76
6.2.1 Immunzytochemische Identifizierung und Charakterisierung der isolierten Zellen 76
6.2.2 Lektinzytochemische Charakterisierung der isolierten Zellen 79
6.2.3 Elektronenmikroskopische Charakterisierung endothelzelltypischer morphologischer Merkmale 81
6.3 *In vitro* Kultivierung der caninen Endothelzellen 82
6.3.1 Morphologie und Proliferation der *in vitro* kultivierten Endothelzellen 82
6.3.2 *In vitro* Gefäßentwicklung 84
6.3.3 Wichtigste Unterschiede der Zellkulturmodelle der tumorös entarteten Endothelzellen und der Endothelzellen aus einer gesunden Milz 88
6.3.4 Anwendbarkeit des Zellkulturmodells 89

7 Zusammenfassung 90

8 Summary 93

9 Abkürzungsverzeichnis 95

10 Abbildungsverzeichnis 97

11 Literaturverzeichnis 98

12 Danksagung 110

1 Einleitung und Ziel

Das maligne Hämangioendotheliom (Hämangiosarkom) ist ein hochmaligner Tumor. Aufgrund seiner Neigung zur Metastasierung und Ruptur gehört es zu den bösartigsten Tumoren des Hundes. Der Tumor tritt insbesondere ab dem mittleren Lebensabschnitt mit einer Prävalenz für bestimmte Rassen auf. Besonders betroffen sind große Hunde. Die Milz ist mit über 60% am häufigsten betroffen (Clifford et al., 2000; Sanladerer, 1994; Smith, 2003).

Betroffene Hunde sind im Frühstadium der Erkrankung oft symptomfrei oder zeigen unspezifische Erscheinungen wie Leistungsinsuffizienz oder Abdominalschmerz, Inappetenz und Erbrechen. Zum Zeitpunkt der Diagnose ist bei bis zu 70% der Patienten mit makroskopisch sichtbaren Metastasen zu rechnen. Über die Hälfte der Patienten werden wegen plötzlicher Ruptur des Tumors vorgestellt (Brown et al., 1985; Kessler et al., 1997a; Schultheiss, 2004; Smith, 2003).
Aufgrund des aggressiven Verhaltens des Tumors ist eine kurative Therapie in der Regel nicht möglich, Ziel ist eine Lebensverlängerung bei guter Lebensqualität. Momentane Therapie der Wahl bei Milzbefall ohne makroskopisch sichtbare Metastasierung ist eine Splenektomie in Kombination mit Chemotherapie. Generell ist die Prognose schlecht, nur wenige der Tiere leben länger als ein Jahr (Kessler et al., 1997a; Smith, 2003; Sorenmo et al., 2000; Wood et al., 1998).

Das maligne Hämangioendotheliom ist ein bösartiger Tumor der Blutgefäße, der von deren Endothelzellen abstammt. Diese Zellen kleiden alle Gefäße aus und bilden die Wand der Kapillaren. Durch Proliferation, Migration, Differenzierung und dreidimensionale Organisation der Endothelzellen entstehen neue Gefäße. Dieser Prozess wird als Angiogenese bezeichnet. Im Gegensatz zu diesem physiologischen Prozess verfügen die transformierten Endothelzellen über das Potential zur unkontrollierten Angiogenese (Lamerato-Kozicki et al., 2006; Papetti und Herman, 2002).

Angiogenese spielt physiologischerweise bei der Entwicklung im Embryo und Fetus eine entscheidende Rolle und wird beim gesunden Adulten bis auf wenige Ausnahmen herunterreguliert. Diese Ausnahmen betreffen, vor allem die Ovulation, die Implantation, die postnatale Entwicklung der Milchdrüse und die Wundheilung (Folkman, 2002; Plendl, 2000). Pathologische Formen der Angiogenese sind entscheidend bei vielen Krankheiten, insbesondere aber beim Wachstum solider Tumoren. Erst durch die neuen Gefäße erhält der Tumor Sauerstoff und Nährstoffe und kann über eine bestimmte Größe wachsen und metastasieren (Folkman, 2003). Die Besonderheit des malignen Hämangiendothelioms ist, dass die Tumorzellen selbst transformierte Endothelzellen sind. Sie bilden mehr oder minder differenzierte Kapillaren oder kapillarähnliche, sinusoide Strukturen mit einem naturgemäß hohen Risiko der Metastasierung (Folkman, 2002; Smith, 2003).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein *in vitro* Modell des malignen Hämangioendothelioms zu etablieren. Dies sollte als Grundlage dienen, um neue Erkenntnisse zur Entstehung dieses hochmalignen Tumors zu gewinnen, ihn zu charakterisieren sowie die Prüfung neuer Chemotherapeutika mit einem Minimum an Tierversuchen zu ermöglichen.

2 Literaturübersicht

2.1 Aufbau und Entstehung der Blutgefäße

2.1.1 Das Blutgefäßsystem

Blutgefäße sind trotz ihrer anatomischen Variabilität nach einem einheitlichen Prinzip aufgebaut. Sie besitzen in der Regel eine Tunica externa, eine Tunica media und die innere Tunica interna. Die Tunica interna besteht aus der Basalmembran, einer Lamina subendothelialis und den dieser aufliegenden Endothelzellen. Als kleinste Einheit im Blutgefäßsystem zeigen die Kapillaren einen deutlich einfacheren Aufbau. Sie bestehen aus den Endothelzellen und der Basalmembran sowie Perizyten, wobei letztere nicht in allen Organen zu finden sind (Liebich, 2003).

2.1.2 Endothelzellen

Die Endothelzellen bilden die innerste Auskleidung der Blutgefäße. Diese zentrale Stellung macht die Endothelzellen zu Vermittlern zwischen dem Blutgefäßsystem und den Geweben bzw. Organen. Das Endothel bildet eine selektive Barriere zwischen dem umliegenden Gewebe und den im Blut zirkulierenden Zellen, Makromolekülen und löslichen Faktoren. Insbesondere bestimmen die endothelialen Zellkontakte die Permeabilität der Blutgefäße (Liebich, 2003).

Auffällig ist die Variabilität der Endothelzellen. Die spezifischen Charakteristika hängen dabei von Spezies, Geschlecht, Entwicklungsphase und Organ ab (Aird, 2003). Endothelzellen unterscheiden sich sogar innerhalb eines Organs oder Gefäßbettes (Plendl, 1997; Plendl et al., 1993; Plendl et al., 1992a; Plendl et al., 1992b). Beispielsweise besitzen die peritubulären Kapillaren der Niere ein fenestriertes Endothel, während die Kapillaren der Glomeruli mit einem diskontinuierlichen und die Kapillaren der übrigen Regionen der Niere mit einem kontinuierlichen Endothel ausgekleidet sind (Dejana, 1996; Risau, 1995). Es wird davon ausgegangen, dass die Heterogenität der Endothelzellen vom embryonalen Ursprung, dem genetischen Profil und den Einflüssen des umliegenden Gewebes bestimmt wird. Letztere erfolgen dabei z.B. über Kontakte der Endothelzellen mit den Zellen und/oder der extrazellulären Matrix des jeweiligen Gewebes oder durch die Wirkung löslicher Faktoren, die von diesen Zellen sezerniert werden (Aird, 2003; Ribatti et al., 2002).

2.1.3 Vaskulogenese

Die de novo Entstehung primärer Blutgefäße aus hämatopoetischen Stammzellen wird als Vaskulogenese bezeichnet (Risau, 1997). Mit der Ausbildung mesenchymaler Blutinseln beginnt die embryonale Entwicklung des Gefäßsystems. Die mesenchymalen Blutinseln bestehen aus Hämangioblasten, die sich zu hämatopoetischen Stammzellen und Angioblasten differenzieren . Im weiteren Verlauf verschmelzen die benachbarten Blutinseln unter dem Einfluss verschiedener löslicher Wachstumsfaktoren miteinander und verzweigen sich zu einem primären Kapillarnetz (Käßmeyer et al., 2009; Rüsse und Sinowatz, 1998). Stellvertretend für die beteiligten Wachstumsfaktoren seien hier die Mitglieder der Fibroblast-Growth-Factor–Familie (FGF) und der Vascular-Endothelial-Growth-Factor-Familie (VEGF) genannt (Risau und Flamme, 1995).

2.1.4 Angiogenese

Als Angiogenese wird der Prozess bezeichnet, der zur Bildung neuer Gefäße aus bereits bestehenden Gefäßen führt (Risau, 1997). Die neuen Gefäße können durch zwei verschiedene Mechanismen entstehen. So kann Angiogenese einerseits durch so genannte Sprossung von Endothelzellen erfolgen oder andererseits durch Teilung eines vorhandenen Gefäßlumens, wobei letztere als Intussuszeption bezeichnet wird (Patan, 2000).

2.1.5 Intussuszeption

Die Intussuszeption ist keine de novo Bildung von Blutgefäßen im eigentlichen Sinne. Relativ weitlumige Gefäße entstehen durch umfangreiche Endothelzellproliferation. Dann erfolgt eine Einstülpung der Basalmembran in das Lumen solcher Gefäße und die anschließende Auskleidung der entstandenen Pfeiler mit Endothelzellen. Zur Unterteilung des Lumens kommt es, wenn sich gegenüberliegende Einstülpungen im Gefäßlumen vereinigen. Durch Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix im Inneren dieser Pfeiler entsteht ein neues kollaterales Gefäß (Patan, 2000; Risau, 1997).

2.1.6 Physiologische Blutgefäßbildung

Das kardiovaskuläre System stellt ontogenetisch das erste funktionale Organsystem dar. Das Gefäßsystem wird zunächst durch Vaskulogenese gebildet. In deren Verlauf differenzieren sich aus Stammzellen die Endothelzellen, welche die primären Blutgefäße bilden (Risau, 1997). Neben der Vaskulogenese erfolgt die Vaskularisierung im Embryo und Fetus auch durch Angiogenese (Folkman, 1984). Insbesondere im Herzen und in der Lunge wurde die Intussuszeption als Form der Gefäßbildung beobachtet (Patan et al., 1997).
Im adulten Organismus erfolgt die Angiogenese physiologischerweise vor allem in der Milchdrüse und im weiblichen Genitalapparat. Auch für das Wachstum von Fett- und Muskelgewebe und im Rahmen des Haarfollikelwachstums ist die Angiogenese notwendig. Das enorme Gewebewachstum in der Plazenta während der Gravidität erfordert eine ausreichende Blutversorgung, die durch die Angiogenese gewährleistet wird (Findlay, 1986; Matsumoto et al., 1992). Ebenso spielt die Angiogenese bei der Anbildung des Corpus luteum im Ovar eine entscheidende Rolle (Plendl, 2000; Plendl et al., 2002b). Die mit der Bildung des Corpus luteum zusammenhängende Angiogenese stellt einen der stärksten Angiogeneseprozesse im Organismus dar (Käßmeyer und Plendl 2009). So liegt die Proliferationsrate der Endothelzellen im Corpus luteum weit höher als in vielen malignen Tumoren (Rodger et al., 1997).

2.1.7 Pathophysiologische und pathologische Angiogenese

Die pathophysiologische Angiogenese erfolgt im Verlauf der Wundheilung und Regeneration und ist, wie die physiologische Angiogenese, durch das Gleichgewicht von proangiogenen und antiangiogenen Faktoren streng reguliert (Folkman, 1995; Plendl und Sinowatz, 1999; Tamanini und De Ambrogi, 2004).

Die pathologische Angiogenese tritt im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen, wie beispielsweise Schuppenflechte, Arthritiden, Retinopathien, Adipositas, Asthma und Autoimmunopathie auf (Carmeliet, 2000; Folkman, 1995). Insbesondere aber stellt die pathologische Angiogenese die Voraussetzung für das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren dar. Die Versorgung eines Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff per Diffusion ist nur bis zu einem Durchmesser von wenigen Millimetern möglich. Ein Wachstum der Neoplasie darüber hinaus ist nur durch neue Gefäße möglich. Die Vaskularisierung des Tumors wird durch proangiogene Faktoren stimuliert, die von den Tumorzellen produziert und sezerniert werden (Folkman et al., 1989).

2.2 Die *ex vivo* Kultivierung von Endothelzellen

2.2.1 Explantat-Kulturen von Endothelzellen

Ein den *in vivo* Verhältnissen sehr nahe kommendes *in vitro* Modell stellt die Explantat-Kultur dar. Für derartige Kulturen werden vaskuläre Explantate in mit verschiedenen Matrices beschichtete Kulturschalen eingebettet und kultiviert. In diesen Modellen können die Einflüsse am Gefäß beteiligter nicht-endothelialer Zellen, beispielsweise glatter Muskelzellen, auf die Angiogenese untersucht werden (Auerbach et al., 2003).

Die am häufigsten verwendete Matrix ist das aus einem Basalmembran-produzierenden Tumor gewonnene Matrigel®, des weiteren werden Kollagen I und Fibrin zur Beschichtung der Kulturschalen eingesetzt (Nicosia und Ottinetti, 1990a). Beispielsweise werden Aortenring-Explantate (Nicosia und Ottinetti, 1990a, b; Nicosia et al., 1982; Zhu et al., 2000) oder Explantate der Nabelschnur (Brown et al., 1996) hergestellt. Diese können dann über einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen kultiviert und zur Beobachtung aussprossender Gefäße genutzt werden. Nachteilig ist jedoch, dass die individuellen Rollen der einzelnen Zelltypen (z.B. Endothelzellen, Perizyten, glatte Muskelzellen, Fibroblasten) in den verschiedenen Stadien der angiogenen Kaskade nicht differenzierbar sind (Vailhe et al., 2001). Die limitierte Reproduzierbarkeit dieser Modelle stellt einen weiteren Nachteil dar, da die Angiogenese nicht immer stimuliert werden kann und keine einheitlichen Konzentrationsangaben für die verschiedenen proangiogenen Faktoren zur Stimulation der Angiogenese vorliegen (Auerbach et al., 2003).

2.2.2 *In vitro* Kultur von Endothelzellen

Bereits 1980 wurde von Folkman und Haudenschild die erste Studie zur *in vitro* Angiogenese veröffentlicht. Die Autoren konnten nach einer Langzeitkultivierung von mikrovaskulären Endothelzellen deren Organisation in kapillarähnliche Strukturen mit Ausbildung eines zentralen Lumens beobachten. Inzwischen wurden viele *in vitro* Modelle mit Endothelzellen aus unterschiedlichen Spezies, Geweben, Organen und Gefäßen entwickelt, die zu einem besseren Verständnis der Angiogenese beigetragen haben (Auerbach et al., 2003; Fuchs-Schönleber, 1999; Plendl et al., 1996; Thamm et al., 2006; Vailhe et al., 2001). Die *in vitro* Kultivierung transformierter Endothelzellen unterschiedlicher Spezies wird bereits zur Entwicklung und Prüfung von Therapeutika genutzt (Masuzawa et al., 1999; Thamm et al., 2006; U'Ren et al., 2007).

Die Möglichkeiten zur Gewinnung non-humaner Endothelzellen für die *in vitro* Kultivierung sind vielfältig. So ist zum Beispiel im Rahmen von Tierversuchen die Gewinnung von Endothelzellen unterschiedlicher Spezies in verschiedenen Entwicklungsstadien und Lokalisationen möglich (Asahara et al., 1997; Hannum et al., 2001; Plendl et al., 1996). Eine aus Sicht des Tierschutzes unbedenkliche Gewinnung von Geweben für die Endothelzellisolierung stellt die Nutzung von Schlachtabfällen dar (Budde, 1999; Plendl, 1997; Schuster, 2002). Beim Hund wurde bereits intra operationem oder post mortem entnommenes Tumorgewebe zur Gewinnung von transformierten Endothelzellen genutzt (Fosmire et al., 2004).

2.2.3 Die *in vitro* Angiogenese

Das Durchlaufen der angiogenen Kaskade ist für die Bildung neuer Gefäße entscheidend. Endothelzellen müssen ihre stabile Lokalisation verlassen, wozu die Basalmembran abgebaut wird. Ist dies erreicht, migrieren die Zellen in Richtung eines angiogenen Stimulus (Migration). Um die notwendige Anzahl von Zellen sicherzustellen, die zur Ausbildung kapillärer Strukturen notwendig ist, proliferieren die Endothelzellen, die sich hinter den migrierenden Zellen befinden (Proliferation). Für ein funktionsfähiges dreidimensionales Netzwerk tubulärer Strukturen bedarf es einer Neuorganisation der Endothelzellen (Remodelling). Alle Stadien der angiogenen Kaskade bieten die Möglichkeit einer Intervention und können im *in vitro* Modell detailliert untersucht werden (Auerbach et al., 2003).

Gut etablierte *in vitro* Assays bieten die Möglichkeit im Stadium der Proliferation die Vermehrungsrate der Zellen zu messen. Die Zellproliferation kann durch mikroskopische Auszählung der Endothelzellen mit Zählkammern, mittels Zählgeräten oder am Thymidin-Inkorporations-Modell erfolgen. Eine Quantifizierung ist ferner durch immunzytochemische Markierung mitotischer Zellen möglich (Ahmad et al., 2001; Amann et al., 2001; Pedram et al., 1997).

In Zell-Migrations-Assays wird die Motilität mikrovaskulärer Endothelzellen in Richtung chemotaktischer Stimuli (z.B. Wachstumsfaktoren) analysiert. Ein häufig verwendeter Versuchsaufbau zur Untersuchung der Migration ist die Boyden-Kammer. Diese besteht aus zwei Untereinheiten, die durch einen Filter mit definierter Porengröße getrennt sind. Das obere Kompartiment wird mit Endothelzellen besät und in den unteren Teil wird die chemotaktische Testsubstanz eingebracht. Während der Inkubation wandern die Zellen durch den Filter in den unteren Bereich der Kammer und können dort quantitativ erfasst werden (Lamszus, 2004; Malinda et al., 1999).

Die Ermittlung der Fähigkeit dreidimensionale tubuläre Strukturen mit einem Lumen auszubilden, stellt den aussagekräftigsten Beweis für die Angiogenese der Endothelzellen dar. Nach zellspezifischer Inkubationszeit formen die Endothelzellen erst zweidimensionale und dann dreidimensionale tubuläre Strukturen (Folkman und Haudenschild, 1980; Plendl, 1997). Die Endothelzellen synthetisieren *in vitro* Komponenten der extrazellulären Matrix und bilden dadurch ihr eigenes, dreidimensionales Substrat (Auerbach et al., 2003; Lienau et al., 2005). In diesen Modellen können der Abbau der extrazellulären Matrix, die Migration, Differenzierung zu kapillarähnlichen Strukturen, deren Lumenisierung und ein anschließendes Remodeling untersucht werden (Lienau, 2003; Lienau et al., 2005). Derartige *in vitro* Modelle bieten eine Möglichkeit, in Annäherung an die *in vivo* Situation, sowohl die Ausbildung vaskulärer Strukturen als auch deren Inhibierung qualitativ und quantitativ zu untersuchen (Nicosia et al., 1994).

Zellkultur-Modelle können nicht die komplexen Verhältnisse im lebenden Organismus vollständig wiedergeben. *In vivo* wird die Angiogenese auch vom umliegenden Gewebe, von Perizyten, glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix beeinflusst. *In vitro* Versuche der Angiogenese sowie deren Vor- und Nachteile wurden ausführlich von Bahramsoltani und Plendl (2004b) und Bahramsoltani et al. (2009) beschrieben.

2.2.4 Zweidimensionale Modelle der *in vitro* Angiogenese

In zweidimensionalen Modellen werden Endothelzellen in Kulturschalen inkubiert, welche mit adhäsiven Proteinen (Feder et al., 1983; Folkman et al., 1989; Pelletier et al., 2000) oder auch Gelen aus Kollagen, Fibrin oder Matrigel (Lawley und Kubota, 1989; Vailhe et al., 2001) beschichtet wurden. In den zweidimensionalen Modellen bilden sich kapillarähnliche Strukturen ausschließlich in einer Ebene planar zur Kulturschalenoberfläche. Diese Modelle wurden zur Untersuchung der Rolle der extrazellulären Matrix bei der endothelialen Differenzierung eingesetzt. Madri und Williams (1983) beobachteten einen Einfluss des Kollagentyps der Matrix auf die Entwicklung der Endothelzellen. Wurden Endothelzellen auf Kollagen Typ I oder III ausgesät, konnte ausschließlich eine Proliferation beobachtet werden, während Endothelzellen auf Kollagen Typ IV oder V kapillarähnliche Strukturen mit Lumen ausbildeten. Die Beschichtung mit Matrigel führt zur Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen innerhalb von 4-12 Stunden (Lawley und Kubota, 1989). Die zweidimensionalen Modelle der *in vitro* Angiogenese können in Kurzzeit- (Folkman et al., 1989; Lawley und Kubota, 1989; Madri und Williams, 1983) und Langzeitmodelle (Feder et al., 1983; Folkman und Haudenschild, 1980; Pelletier et al., 2000; Vailhe et al., 2001) eingeteilt werden.

2.2.5 Dreidimensionale Modelle der *in vitro* Angiogenese

Dreidimensionale Modelle basieren auf der Migration von Endothelzellen in ein dreidimensionales Substrat extrazellulärer Matrixkomponenten z.B. Kollagen oder Fibrin. Die Endothelzellen werden hierfür mit einem Gel überschichtet (Peters et al., 2002), auf einem Gel (Montesano, 1986; Montesano und Orci, 1985) oder zwischen zwei Gelschichten („Sandwich“) kultiviert (Chalupowicz et al., 1995; Montesano et al., 1983). Entscheidend bei der Verwendung von Polymeren ist die genaue Bestimmung der Konzentration und biochemischen Parameter der Matrix, da diese die Dichte und mechanischen Eigenschaften des Substrates beeinflussen (Ferrenq et al., 1997) und zu unterschiedlichen endothelialen Phänotypen führen können (Nehls und Herrmann, 1996). Darüber hinaus ist auch die Proteolyse der Matrix ein kritischer Faktor (Montesano et al., 1987), der unter Umständen den Einsatz exogener Antiproteasen erforderlich macht (Zhu et al., 2000).

Den angiogenen Prozessen *in vivo* kommen die in bestimmten Angiogenesemodellen zu beobachtenden, lumenhaltigen Strukturen sehr nah (Korff und Augustin, 1998; Pepper et al., 1991). Die Angiogenese wird dabei von dreidimensionalen sphäroidalen Zellagregaten ausgehend simuliert (Korff und Augustin, 1998, 1999). Hierzu werden in zweidimensionalen Zellkulturen die Endothelzellen durch Veränderung der Kultivierungsbedingungen zur Bildung dreidimensionaler zellulärer Sphäroide stimuliert. Diese reagieren dann mit hoher Sensitivität auf angiogene Stimuli und bilden in einer Kollagenmatrix lumenhaltige kapilläre Strukturen aus (Korff und Augustin, 1999; Korff et al., 2001).

Dreidimensionale Modelle der *in vitro* Angiogenese berücksichtigen die räumliche Ausdehnung und stellen damit eine deutliche Annäherung an *in vivo* Verhältnisse dar. Sie werden unter anderem zur Untersuchung der Wirkung von angiogenen (Koblizek et al., 1998; Papapetropoulos et al., 1997) und anti-angiogenen Substanzen (Clapp et al., 1993) genutzt.

2.3 Das maligne Hämangioendotheliom

2.3.1 Betroffene Tierarten

Das maligne Hämangioendotheliom ist mit zwei bis sieben Prozent aller viszeralen malignen Neoplasien eine häufige Tumorform des Hundes. Die nicht-viszeralen Formen des malignen Hämangioendothelioms sind beim Hund seltener (Brown et al., 1985; Ng und Mills, 1985; Prymak et al., 1988; Schultheiss, 2004; Srebernik und Appleby, 1991). Bei anderen Tierarten ist das Vorkommen maligner Hämangioendotheliome deutlich geringer, auch treten bei Katze, Pferd und Rind die nicht-viszeralen Formen des malignen Hämangioendothelioms häufiger als die viszerale Form auf (Aupperle et al., 2007; Schultheiss, 2004; Smith, 2003; Warren und Summers, 2007).

2.3.2 Rassedisposition beim Hund

Bei allen Hunderassen können maligne Hämangioendotheliome auftreten. In vielen Studien ist der Deutsche Schäferhund die signifikant am häufigsten vertretene Rasse, wobei z. T. mehr als 40 % der untersuchten Hunde ein malignes Hämangioendotheliom aufweisen (Brown et al., 1985; Kessler et al., 1997a; Prymak et al., 1988). Es folgen in abfallender Rate Golden Retriever und Labrador Retriever, dann Boxer, Sibirischer Husky und Border Collie (Brown et al., 1985; Day et al., 1995; Smith, 2003; Srebernik und Appleby, 1991). In der Untersuchung von Schultheiss (2004) wird der Golden Retriever mit 18 % vor dem Deutschen Schäferhund (10%) als die am häufigsten betroffene Rasse beschrieben. Nach Ward et al. (1994) scheint eher der Pitbull als der Boxer und der Deutsche Schäferhund am kutanen Hämangiosarkom zu erkranken. Ein erhöhtes Risiko sowohl für die Ausbildung von Hämangiomen als auch von Hämangiosarkomen der Milz besteht nach Prymak et al. (1988) für den Deutschen Schäferhund.

Abbildung 1: Der Deutsche Schäferhund zeigt eine Disposition für das maligne Hämangioendotheliom.

2.3.3 Altersverteilung der erkrankten Tiere

Die Tumorrate bei Mensch und Tier steigt mit zunehmendem Alter an. Prinzipiell können Hämangiosarkome in jedem Alter auftreten. Gabor und Vanderstichel (2006) berichten von einem am malignen Hämangiosarkom erkrankten sechs Wochen alten Welpen. Ein Durchschnittsalter von neun bis zehn Jahren zeigt aber, dass auch dieser Tumor vorwiegend eine Erkrankung des alten Hundes ist (Brown et al., 1985; Kessler, 2005b; Sanladerer, 1994; Schultheiss, 2004).

2.3.4 Geschlechterverteilung der Patienten

Viele Autoren (Kessler et al., 1997a; Schultheiss, 2004; Srebernik und Appleby, 1991) zeigten, dass Rüden häufiger als Hündinnen an malignen Hämangioendotheliomen leiden. Kessler et al. (1997a) fanden ein Geschlechterverhältnis zwischen männlichen und weiblichen Tieren von 2:1. Im Vergleich zur Klinikpopulation entsprach dies einem überproportionalen Anteil männlicher Tiere.

Erstmals differenzierten Prymak et al. (1988) zwischen weiblichen, weiblich kastrierten, männlichen und männlich kastrierten Hunden. Berechnungen ergaben für weiblich kastrierte Tiere ein signifikant höheres Risiko, maligne Blutgefäßtumore zu bilden. Für die Ausbildung von Hämangiomen besteht dagegen keine Geschlechtsprädisposition.

Auch Aronsohn (1985) ermittelte in einer Studie über Hämangiosarkome im Herzen eine Geschlechterverteilung von 55 % weiblichen gegenüber 45 % männlichen Hunden. Ebenso zählten Ward et al. (1994) in ihrer Untersuchung über kutane Hämangiosarkome mehr Hündinnen als Rüden.

2.3.5 Größe und Gewicht der Patienten

Nur in wenigen Untersuchungen wurden die Parameter Größe und Gewicht berücksichtigt, jedoch geben die am häufigsten betroffenen Rassen schon indirekt Auskunft darüber, dass kleine Hunde entscheidend seltener maligne Hämangioendotheliome ausbilden als mittelgroße bis große Hunde.

In den vorliegenden Studien waren meist Hunde großer Rassen vertreten, 89,5 % der Tiere in der Studie von Aronsohn (1985) wogen über 20 kg, in der Studie von Prymak et al. (1988) hatten fast 75% der Hunde mit malignem Hämangioendotheliom der Milz ein Gewicht von über 16 kg. In der Studie von Johnson et al. (1989) wogen 76,7% der Hunde mehr als 21 kg, jedoch nur 11,6 % unter 10 kg. Durchschnittlich lag das Gewicht der Hunde in der Untersuchung von Prymak et al. (1988) bei 27,1 kg, in der Patientenpopulation der Studie von Hammer et al. (1991a) sogar bei 32 kg.

2.3.6 Lokalisation des Tumors

In fast allen Organen und Geweben können sich entsprechend der Ubiquität des Blutgefäßsystems maligne Hämangioendotheliome bilden. Die Milz, der rechte Herzvorhof, die Haut und die Leber sind bevorzugte und häufigste Entstehungslokalisationen (Maxie und Robinson, 2007).

Die Milz ist mit über 40 % das am häufigsten betroffene Organ. Herz (rechter Vorhof), Haut und Leber sind weitere häufig befallene Organe. Daneben können Tumoren und Metastasen auch in Lunge, Nieren, Muskulatur und Knochen auftreten. Beim kutanen Hämangiosarkom können Dermis, Subkutis aber auch Muskulatur betroffen sein (Clifford et al., 2000; Maxie und Robinson, 2007; Sanladerer, 1994). Deutlich seltenere Primärlokalisationen sind Niere, Harnblase, Gekröse, Darm, Mittelfell, Aorta, Skelettmuskulatur, Prostata, Nasenhöhle und das Zentrale Nervensystem.

Für das maligne Hämangiosarkom gibt es keine klaren Merkmale zur Differenzierung von Geschwulst und Tochtergeschwulst. Beim Vorliegen mehrerer Geschwulste an unterschiedlichen Lokalisationen bleibt die Bestimmung des Primärtumors somit eine mehr oder weniger subjektive Entscheidung des Untersuchenden (Aupperle et al., 2007; Kessler et al., 1997b).

Metastasen fanden sich in der Untersuchungspopulation von Brown et al. (1985) bei 67 % der sezierten Hunde mit abnehmender Häufigkeit in folgenden Organen: Lunge, Leber, Herz, Niere, Mittelfell, Nebennieren, Bauchnetz und Bauchfell.
Bei 72 % der untersuchten Hundepopulation beobachteten Ng und Mills (1985) Lungenmetastasen, bei 64 % streute der Tumor auch in andere Organe, davon bei fast 50 % der Hunde in die Leber.

Im Herzen sind Hämangiosarkome überwiegend im rechten Herzvorhof nahe der Crista terminalis oder im rechten Herzohr zu finden, diese sollen mit hoher Wahrscheinlichkeit Primärtumore sein (Aupperle et al., 2007; Ware und Hopper, 1999). Hämangiosarkome im Perikard bzw. im linken Herzventrikel stellen Metastasen dar (Fruchter et al., 1992). Fast immer treten Tochtergeschwülste in der Lunge auf, in weit mehr als 50 % der Fälle dann auch in Milz, Leber und Nieren. Ein gemeinsames Vorkommen von Hämangiosarkomen in Herz und Lunge beobachteten Holt et al. (1992) häufig. Bei 60 % der Hunde dieser Studie fanden sie Hämangiosarkome in der Lunge und bei 67 % im Herzen.

Vom Herzen ausgehend können Hämangiosarkome über den großen Blutkreislauf auch in Gehirn (Dennler et al., 2007), Knochen, linken Ventrikel und in alle anderen schon genannten Organe metastasieren (Aronsohn, 1985).

Die Haut ist die dritthäufigste Lokalisation für Hämangiosarkome beim Hund. Beobachtet werden können die Tumore weit verteilt von Kopf über Rumpf und Gliedmaßen bis zum Schwanz, sie sollen jedoch meist an den Beckengliedmaßen, am Präputium und am ventralen, insbesondere unbehaarten und spärlich pigmentierten Abdomen auftreten (Hargis et al., 1992). Die unbehaarte Haut soll sechsmal häufiger betroffen sein als die behaarte Haut. Ätiologisch wird hier ein Einfluß der Sonneneinstrahlung diskutiert. Dabei bleibt der größere Anteil der Tumore auf die Dermis beschränkt, während die geringere Zahl die Subcutis und/oder die Muskulatur involviert. Die subkutane Form der Hämangiosarkome soll selten sein und in der Regel eine Tochtergeschwulst repräsentieren, da sie in mehr als der Hälfte der Fälle mit einem Tumor in einem anderen Organ vergesellschaftet ist (Hargis et al., 1992).

Die Untersuchungsergebnisse von Waters et al. (1989) zeigten bei 14,2 % der betroffenen Hunde vorwiegend multiple Metastasen im Gehirn, weitaus am häufigsten im Cerebrum, seltener im Hirnstamm, im Cerebellum oder in der Leptomeninx. Bei einem Hund mit primärem Gehirntumor (Hirnstamm), war fast ausschließlich die graue Substanz betroffen. In dieser Studie wiesen zwei Hunde, bei denen überwiegend die weiße Substanz tumorös verändert war, als einzige auch Metastasen im Rückenmark auf. 90 % der Hunde mit Lungenmetastasen wiesen auch Gehirnmetastasen auf. Für Tiere mit Lungenmetastasen errechneten die Autoren eine achtmal höhere Wahrscheinlichkeit von Gehirnmetastasen als für Tiere mit tumorfreier Lunge. Mit einem erhöhten Risiko für Gehirnmetastasen sollen ebenso gastrointestinale Metastasen verbunden sein (Waters et al., 1989).

2.3.7 Symptome der Patienten

Betroffene Hunde sind im Frühstadium der Erkrankung oft symptomfrei oder zeigen unspezifische Erscheinungen wie Leistungsinsuffizienz oder Abdominalschmerz, Inappetenz und Erbrechen aufgrund der durch die Größe des Tumors verursachten Verdrängung benachbarter Organe.

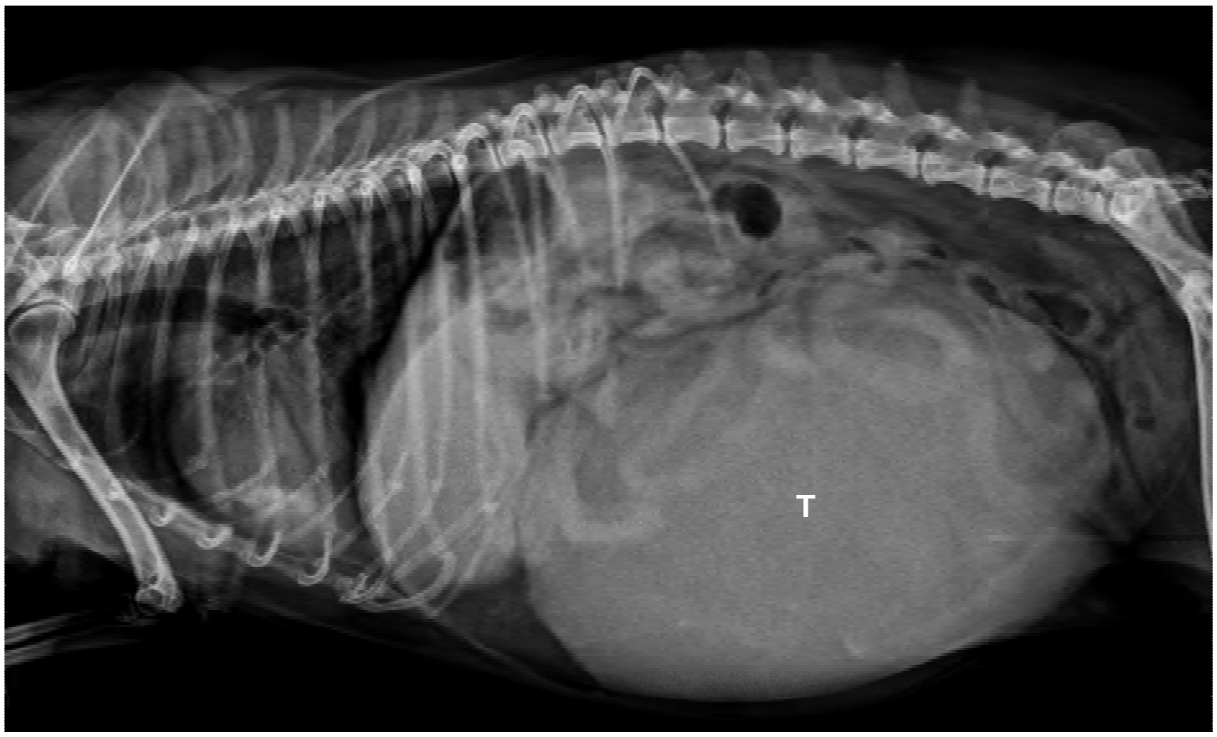

Abbildung 2: Röntgenbild eines Hundes (Schäferhundmischling, 12 Jahre, weiblich) mit malignem Hämangioendotheliom der Milz (T). Ohne Bauchhöhlenerguss stellt sich der Tumor als weichteildichte Struktur dar. Dieser Patient wurde wegen Inappetenz mit „paradoxer“ Gewichtszunahme vorgestellt.

Verdachtsdiagnosen werden anhand von Signalement, klinischen und labordiagnostischen Veränderungen in Kombination mit Röntgen- und Ultraschallbefunden sowie Körperhöhlenpunktaten gestellt. Zum Zeitpunkt der Diagnose ist bei bis zu 70% der Patienten mit makroskopisch sichtbaren Metastasen zu rechnen (Brown, 1985; Kessler et al., 1997b). Am dramatischsten geht die Erkrankung mit plötzlichem Tod nach Ruptur des Tumors und akutem Blutverlust ohne vorhergehende klinische Symptomatik einher. Über die Hälfte der Patienten werden wegen plötzlicher Ruptur des Tumors vorgestellt, was je nach Lokalisation zu einem Hämoabdomen oder zu Perikarderguss führen kann (Aupperle et al., 2007; Brown et al., 1985; Kessler et al., 1997a; Pintar et al., 2003; Smith, 2003).

Lebensbedrohliche Folgen sind akuter hypovolämischer Schock oder Perikardtamponade mit entsprechenden hämodynamischen Folgen (Brown et al., 1985). Anamnestisch wiederholte Anfälle von Unwohlsein und Schwäche mit schneller scheinbarer Genesung über zwei bis drei Tage sind in diesen Fällen relativ charakteristisch. Schwere Anämien und akute Blutungen in die Bauchhöhle sind für Schwäche und Blässe der Tiere verantwortlich (Brown et al., 1985; Smith, 2003). Nach Angaben der meisten Autoren gibt es keine hämangiosarkom-typischen Symptome. Symptome eines hypovolämischen Schocks (Kollaps, weiße Schleimhäute, Tachykardie, schwacher Puls und Tachypnoe) zeigen sich nach einem größeren Blutverlust (Kessler et al., 1997a; Prymak et al., 1988; Smith, 2003). Häufig tritt eine disseminierte intravasale Gerinnung (engl: disseminated intravascular coagulation, DIC) auf (Hammer et al., 1991b; Kessler et al., 1997a; Pintar et al., 2003). Apathie, Depression, Schwanken, Inkoordination, Seitenlage, Kollaps, Schock, Anämie, Inappetenz, Erbrechen, Durchfall, Meläna, aufgetriebenes gespanntes Abdomen, Milzvergrößerung, palpierbare Umfangsvermehrung im Abdomen, Fieber, erhöhte Puls- und Atemfrequenz, Herzinsuffizienz, Arrhythmien, Tachykardie, Herzgeräusche, verlängerte kapillare Füllungszeit, Zyanose, pathologische Atemgeräusche, Husten, Hämoptysis, Lungenödem, Polydipsie, Ikterus, Hämothorax, Hämoperitonaeum und Hämoperikard (Kessler et al., 1997a; Ware und Hopper, 1999) sind weitere Symptome, die plötzlich, langsam progressiv oder episodenhaft intermittierend und abhängig von der Lokalisation des Tumors in Erscheinung treten können.

Hinweise auf die Lokalisation des Tumors können bestimmte klinische Bilder geben. Sind Organe der Bauchhöhle betroffen, kann man den Tumor eventuell palpieren. Der Bauch ist infolge eines Hämoperitonaeums nach Ruptur und Blutung oft gespannt und aufgetrieben (Pintar et al., 2003). Mit Hämangiosarkomen der Milz sind am häufigsten die Symptome Lethargie, Schwäche, Anorexie, Depression, Blässe, aufgetriebenes und schmerzhaftes Abdomen, Splenomegalie, Kollaps, Erbrechen, Durchfall und Hämoperitonaeum verbunden. Signifikant häufiger sollen nach Hammer et al. (1991a) das Symptombild Anorexie, Kollaps und Hämoperitoneum beim Hämangiosarkom als beim Hämangiom auftreten. Diese Erscheinungen zeigten 76,4 % der untersuchten Hunde. Sitzt der Tumor dagegen im Herzen, kann man Arrythmien, Rechtsherzinsuffizienz, systolische Herzgeräusche, Hämothorax, Hämoperikard und Herztamponade, Ataxie, Blässe, Zyanose und Ikterus beobachten (Fruchter et al., 1992; Gidlewski und Petrie, 2005).

Beim Befall des Zentralen Nervensystems können die Hunde Epilepsien, Dementia, Orientierungslosigkeit, Torticollis, Paresen und Paralysen zeigen. Gehirnmetastasen sollen jedoch in 50 % der Fälle klinisch symptomlos bleiben (Waters et al., 1989).

Meist zufällig werden vom Besitzer bei der Fellpflege oder beim Streicheln des Hundes kutane Hämangiosarkome gefunden. Ein oder mehrere Knoten lassen sich in der Haut palpieren. Sie können auch ulzerieren und bluten. Daneben treten vereinzelt Petechien und Ekchymosen auf (Hammer et al., 1991a; Hargis et al., 1992).

Maligne Hämangioendotheliome rufen also primär Symptome hervor, die durch Funktionsstörungen des jeweiligen neoplastisch veränderten Organs bedingt sind. Die Verdachtsdiagnose Hämangiosarkom kann immer nur aufgrund bestimmter klinischer Erscheinungen gestellt werden, sie muss mit weiteren, diagnostischen Methoden, chirurgischen Eingriffen und histopathologischen Untersuchungen bestätigt werden. In der Regel ist die Symptomdauer bis zur ersten Vorstellung beim Tierarzt nur kurz, kann aber auch relativ lang sein. Brown et al. (1985) beschrieben Verläufe mit akutem Auftreten, häufig gefolgt von plötzlichem Tod, aber auch solche mit langsam progressiver Erkrankung über die Dauer von drei Monaten. In der Studie von Prymak et al. (1988) zeigten 68,6 % der Hunde mit Hämangiosarkomen in der Milz seit zwei Tagen bis zu vier Wochen klinische Symptome.

Methoden zur labordiagnostischen Früherkennung einer Erkrankung am malignen Hämangioendotheliom gibt es derzeit nicht. Einen Ansatz hierfür sollen Untersuchungen zum Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF) bieten. VEGF ist ein wichtiger angiogener Faktor, der am Wachstum und der Metastasierung von Tumoren beteiligt ist (siehe Kapitel 2.1.3 bis 2.1.7).
Clifford et al. (2001) untersuchten in ihren Studie die Plasmakonzentration des VEGF. Im Plasma von am malignen Hämangioendotheliom erkrankten Hunden konnte, im Gegensatz zu der gesunden Kontrollgruppe, signifikant häufiger der VEGF nachgewiesen werden. Die VEGF-Konzentrationen korrelierten in dieser Untersuchung nicht mit der klinischen Stadieneinteilung.
Eine deutlich höhere VEGF- Konzentration wurde in Körperhöhlenergüssen gesunder und erkrankter Hunde gefunden. Hier zeigte sich aber kein signifikanter Unterschied in den VEGF-Konzentrationen (Clifford et al. 2002).

2.3.8 Klinische Stadieneinteilung

Eine Einteilung der Patienten in verschiedene Stadien der Erkrankung ist für die Vergleichbarkeit klinischer Untersuchungen entscheidend und für prognostische Aussagen hilfreich. Hierfür hat sich die in Tabelle 1 dargestellte TNM-Klassifikation durchgesetzt (Kessler et al., 1997a; Smith, 2003; U'Ren et al., 2007).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation zur klinischen Stadieneinteilung

TNM- Klassifikation	
Primärtumor (T)	
T0	makroskopisch kein Tumor
T1	Tumor auf Milz beschränkt
T2	Tumor rupturiert
T3	Tumor betrifft umliegendes Gewebe
Lymphknoten (N)	
N0	keine Metastasen in den N nachweisbar
N1	Metastase im regionalen N
N2	Metastase(n) in weiter entfernten N
Organmetastasen (M)	
M0	keine M nachweisbar
M1	M nachweisbar
Stadieneinteilung	
Stadium I	T0 oder T1 und N0 und M0
Stadium II	T1 und N1 und M0
	T2 und N0 oder N1 und M0
Stadium III	T2 oder T3, jedes N und M1

2.4 Therapie

Aufgrund des aggressiven Verhaltens des Tumors ist eine kurative Therapie in der Regel nicht möglich. Ziel ist eine Lebensverlängerung bei guter Lebensqualität. Momentane Therapie der Wahl bei Milzbefall ohne makroskopisch sichtbare Metastasierung ist eine Splenektomie in Kombination mit einer Chemotherapie. Generell ist die Prognose schlecht, nur wenige der Tiere leben länger als ein Jahr (Kessler et al., 1997a; Smith, 2003; Sorenmo et al., 2000; Wood et al., 1998).

2.4.1 Chirurgische Resektion des Tumors

Die chirurgische Resektion des Tumors ist in Anbetracht der hohen Metastasierungsrate meist nur für den Primärtumor möglich. Bei einer Lokalisation im rechten Vorhof oder Herzohr ordnet Smeak (2005) das maligne Hämangioendotheliom als den am besten chirurgisch therapierbaren Tumor des Herzens ein. Eine chirurgische Resektion von malignen Hämangioendotheliomen des Herzens wird in der Tiermedizin jedoch sehr selten durchgeführt (Aronsohn, 1985). Bei Hautlokalisation stellt die chirurgische Therapie die Behandlung der Wahl dar. Hier ist eine radikale Resektion in allen Ebenen im benachbarten gesunden Gewebe von entscheidender Bedeutung, die anatomischen Gegebenheiten der häufig betroffenen Gliedmaßen stellen oft ein Problem für die vollständige chirurgische Entfernung dar (Kessler, 2005a).

Sind abdominale Organe betroffen, ist die chirurgische (Teil-) Resektion gut durchführbar. Insbesondere beim rupturierten Milztumor ist die komplette Entfernung des Organs als lebensrettende Sofortmaßnahme indiziert. Hier ist jedoch mit Implantationsmetastasen, die durch das Hämoabdomen in der gesamten Bauchhöhle auftreten können, zu rechnen (Kessler, 2005b). Um eine iatrogene Ausbreitung der Metastasen zu minimieren, sollten operative Manipulationen der Milz auf ein Minimum reduziert werden. Dies kann nur durch eine ausreichend große Eröffnung des Abdomen gewährleistet werden. Nach erfolgter Milzexstirpation wird eine gründliche Lavage der Bauchhöhle empfohlen, um oben erwähnte Implatationsmethastasen zu vermeiden (Kessler, 2005b).

2.4.2 Chemotherapie und Immuntherapie

Therapie der Wahl ist die chirurgische Resektion des Tumors in Kombination mit einer adjuvanten Chemotherapie. Deutliche Erfolge in Bezug auf die mittlere Überlebenszeit werden bei der Verwendung von Doxorubicin allein oder in Kombination mit anderen Präparaten erreicht (Hammer et al., 1991a; Ogilvie et al., 1996; Sorenmo et al., 2004). Die Kombination von Vincristin mit Doxorubicin und Cyclophosphamid (VDC) ist die zur Zeit am häufigsten empfohlene Kombination von Chemotherapeutika für die Behandlung von Sarkomen einschließlich des malignen Hämangioendothelioms (Hammer et al., 1991a; Kessler, 2005b; Ogilvie et al., 1996; Sorenmo et al., 2004). Es existieren verschiedene Protokolle, die sich insbesondere in Hinblick auf die Applikationsintervalle unterscheiden. Beispielhaft ist in Tabelle 2 das von Kessler (2005b) empfohlene VDC-Protokoll aufgeführt.

Tabelle 2: Vincristin-Doxorubicin-Cyclophosphamid (VDC) Chemotherapie-Protokoll

Behandlungstag	Präparat	Empfohlene Dosis
1	Doxorubicin	30mg/m² Körperoberfläche i.v.
3 - 6	Cyclophosphamid	50mg/m² Körperoberfläche per os
8 und 15	Vincristin	0,7mg/m² Körperoberfläche i.v.
Dieser Zyklus ist alle 3 Wochen zu wiederholen, eine Begrenzung der Behandlungsdauer wird durch den Autor nicht angegeben (Kessler, 2005b).		

Aktuelle Forschungen auf dem Gebiet der Immuntherapie bieten neue Ansätze in der Behandlung dieses hochmalignen Tumors (U'Ren et al., 2007). Hierfür wurden Lysate zweier Hämangiosarkom- Zelllinien zur Herstellung eines adjuvanten Impfstoffes verwendet. Die Behandlung der Patienten erfolgte mit einer Doxorubicin basierten Chemotherapie in Kombination mit der oben beschriebenen Immunotherapie über eine Dauer von 22 Wochen. Kontrollgruppe waren Patienten, die ausschließlich mit der Doxorubicin basierten Chemotherapie behandelt wurden. Die mittlere Überlebenszeit der Patienten, die mit Immun- und Chemotherapie behandelt wurden, war mit 182 Tagen gegenüber der Kontrollgruppe mit 132 Tagen mittlerer Überlebenszeit, signifikant höher (U'Ren et al., 2007).

3 Material

3.1 Zellen

Alle verwendeten Zellen wurden am Institut für Veterinär-Anatomie der Freien Universität Berlin isoliert. Die Isolierung der caninen Endothelzellen wird im Kapitel Methoden (4.2.1) beschrieben.

Es kamen zusätzlich canine Fibroblasten zum Einsatz. Diese wurden durch Anna Parotat, Tierärztin, im Rahmen ihrer Dissertation (Dissertation in Arbeit) am Institut für Veterinär-Anatomie der Freien Universität Berlin isoliert und zur Verfügung gestellt.

3.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	**Lieferant**
Deckgläser, rund (∅ 12 mm)	Carl Roth (Karlsruhe)
Einwegskalpell	Lehnecke (Schortens)
Kanülen	
Kryoröhrchen	Dunn Labortechnik (Asbach)
Membranfilter easypet (steril 0,45 µm)	Eppendorf (Hamburg)
Objektträger (76x26 mm)	Carl Roth (Karlsruhe)
Pasteurpipetten	Th. Geyer Berlin (Berlin)
Pipettenspitzen	Carl Roth (Karlsruhe)
Serologische Einwegpipetten	
Spritzen (10 ml)	Lehnecke (Schortens)
Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schuell (Dassel)
Zellkulturschalen 24-Lochplatten (∅ 15,5 mm, je Vertiefung)	Iwaki (Tokio, Japan)
6-Lochplatten (∅ 34,6 mm, je Vertiefung)	
P35	
Zentrifugenröhrchen 15ml	Carl Roth (Karlsruhe)
Zentrifugenröhrchen 50ml	

3.3 Geräte

Gerät	Lieferant
Autoklav H+P Varioclav Typ 250T	Schembera (München)
Begasungsbrutschrank Memmert INCO 2	Memmert (Schwabach)
Dampfsterilisator H+P Varioklav 25T H+P	Labortechnik (München)
Fluoreszenzlichtmikroskop (Diaplan)	Leitz (Wetzlar)
Invert-Mikroskop Axiovert 25	Zeiss (Jena)
Neubauer Zählkammer	GLW (Würzburg)
Pipette (Eppendorf reference, variabel)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe Eppendorf easypet	
Reinraumwerkbank (BDK-S100)	BDK Luft- und Reinraumtechnik (Sonnenbühl Genkingen)
Stickstofftank (GT 38)	Air Liquide Kryotechnik (Düsseldorf)
Transmissionselektronenmikroskop (EM 10CR)	Zeiss (Jena)
Ultramikrotom (Ultracut S)	Fa. Reichert-Jung (Wien, Österreich)
Vakuumpumpe Laboport	KNF Neuberger (Freiburg)
Videokamera Inteq 000610 (für Invert-Mikroskop Axiovert 25)	Inteq (Berlin)
Digitalkamera (DXM 1200)	Nikon GmbH (Düsseldorf)
Wasserbad (1083)	Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)
Zentrifuge Variofuge RF	Heraeus Sepatech (Osterode)

3.4 Lösungen für die Zellkultur

Lösungen	Hersteller
Bacto Gelatine	Difco Laboratories (Detroit, USA)
BME-Vitamine	Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	ICN Biomedicals (Eschwege)
Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen)
Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)	Schubert & Weiss GmbH (München)
Fetales Bovines Serum (FBS)	Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen)
Heparin-Lösung (0,25%)	
L-Glutamin	Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen)
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen)
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochhrom KG (Berlin)
S180-konditioniertes Medium	s.u.
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen)

Zur Herstellung des S180-konditionierten Mediums wurden murine Sarkomzellen (zur Verfügung gestellt von Prof. R. Auerbach, University of Wisconsin, Madison/USA) in DMEM+ kultiviert. Das Medium wurde nach erfolgtem Farbumschlag abgesaugt, 5 Minuten bei 1050 U/ min. zentrifugiert, der Überstand mit 0,2 µm Filtern steril filtriert und bis zur Herstellung des Selektivmediums (3.5.2) bei -20℃ tiefgefroren.

3.5 Verwendete Kulturmedien

3.5.1 Zusammensetzung des Erhaltungsmediums (DMEM+)

Komponente	Menge
L-Glutamin	0,5 ml
Penicillin/Streptomycin	0,5 ml
Fetales Bovines Serum (FBS)	5,0 ml
Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM)	ad 50 ml

3.5.2 Zusammensetzung des Selektivmediums (P_0)

Komponente	Menge
BME-Vitamine	0,5 ml
Heparin-Lösung (0,25%)	0,5 ml
Fetales Bovines Serum (FBS)	5,0 ml
Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS; 2,5 mg/ml)	1,0 ml
S 180-konditioniertes Medium	10,0 ml
DMEM+	ad 50 ml

3.6 Einfriermedium

Das Einfriermedium dient dem Schutz der Zellen beim Einfrieren und Auftauen, gleichzeitig deckt es den Erhaltungsbedarf der kryokonservierten Zellen. Es wurde aus dem jeweiligen Kulturmedium unter Zusatz von 10 % Dimethylsulfoxid (ICN Biomedicals) hergestellt.

3.7 Materialien für die Zellisolierung

3.7.1 Enzymlösung für die Zellisolierung

Für den enzymatischen Aufschluß der Zellen aus den Gewebeproben kam eine steril filtrierte Suspension aus je 25 mg Kollagenase II und IV (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) ad 10 ml DMEM zum Einsatz.

3.7.2 Edelstahlsiebe

Zur Zerkleinerung und Homogenisierung der Gewebeproben wurden Edelstahlgitter mit einer Maschenweite von 0,5 mm genutzt (Rotilabo® A625.1, Carl Roth, Karlsruhe). Um eine ausreichende Stabilität zu erreichen, wurden die Dreiecksform mit einer Kantenlänge von 1,5 cm gewählt und die Ränder zweifach nach innen gefaltet.

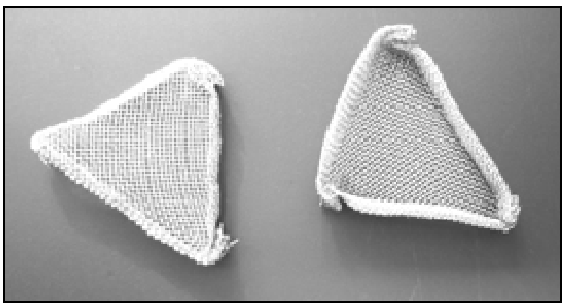

Abbildung 3: Für die Zellisolierung gefertigte dreieckige Edelstahlsiebe.

3.8 Nachweis der Bindung FITC-konjugierter-Lektine

Reagenzien	**Hersteller**
Fluorescein- Dolichos biflorus Agglutinin (DBA)	Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, USA)
Fluorescein- Wheat germ Agglutinin (WGA)	
Fluorescein- Ulex europaeus Agglutinin (UEAI)	
Fluorescein- Concanavalin A (ConA)	
Fluorostab	ICN Biomedicals (Eschwege)

3.9 Antikörper, Immunreagenzien und Reaktions- Kit

Immunreagenzien	Bezugsfirma
Monoklonaler Antikörper Maus anti-Schaf-CD31	Acris, DPC Biermann (Bad Nauheim)
Monoklonaler Antikörper Maus anti-αvβ3-Integrin (CD 51/61)	
Polyklonaler Antikörper Kaninchen anti-human- vWF	DAKO Diagnostika (Hamburg)
Polyklonaler Antikörper Kaninchen anti-human-Tie-2	Santa-Cruz-Biotechnology (Heidelberg)
Sekundärantikörper Ziege anti-Maus, Biotin konjugiert	BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg)
Sekundärantikörper Ziege anti-Kaninchen, Biotin konjugiert	BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg)
EnVision+TM, Peroxidase, Ziege anti-Maus, Kaninchen Peroxidase-Kit	DAKO Diagnostika (Hamburg)
3,3`-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid Tabletten (DAB)	Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen)
SteptABComplex/HRP	DAKO Diagnostika (Hamburg)
Proteinblockierungsreagenz, serumfrei	
Mausserum (normal), IgG1	
Kaninchenserum (normal), IgG1	

3.10 Transmissionselektronenmikroskopie

3.10.1 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsfirma
Beemkapseln	Plano (Marburg)
Kodak Electron Mikroscope Film (4489)	Kodak (Stuttgart)
Kupfergrids	Plano (Marburg)

3.10.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Bezugsfirma
Agar	Merk Eurolab (Darmstadt)
Azur II	
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	
DDSA (Dodecenylsucchinic-Acid Anhydride)	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Di-Natriumtetraborat	Merk Eurolab (Darmstadt)
DMP-30 (2,4,6-Tri (dimethylaminomethyl) Phenol)	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Epon-Glycidether Methanol	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Glutaraldehyd	
Kaliumferrocyanid	Merk Eurolab (Darmstadt)
May-Grünwald-Lösung	Fluka Chemie (Buchs/Schweiz)
Methylenblau	Merk Eurolab (Darmstadt)
MNA (Methyl Nadic Anhydride)	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Osmiumtetroxid	Merk Eurolab (Darmstadt)
Paraformaldehyd	
Propylenoxid	Serva Electrophoresis (Heidelberg)

4 Methoden

4.1 Herkunft der Zellen

Die Organe (Milz) zur Isolierung der Endothelzellen stammten von Tieren aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere, Freie Universität Berlin.

Die tumorös entartete Milz eines Hundes (Riesenschnauzer, weiblich, 9 Jahre) wurde während einer geplanten Milzextirpation entnommen. Neoplastisches Gewebe der Milz zweier weiterer Hunde (Deutscher Schäferhund, männlich, 10 Jahre und Weißer Schweizer Schäferhund, weiblich, 10 Jahre) wurde nach Euthanasie der Tiere zur Zellisolierung genutzt. Die unveränderte Milz eines Hundes (Mischling, weiblich, 2 Jahre) diente zur Isolierung von Zellen aus der gesunden Milz (Kontrolle).

Tabelle 3: Tiere, deren Milz zur Isolierung der Zellen genutzt wurde und die Bezeichnung der entsprechenden Zellkulturen. CSC: canine spleen cells, CH: canines Hämangioendotheliom, RS: Riesenschnautzer, DS: Deutscher Schäferhund, WS: Weißer Schäferhund.

Herkunft der Zellen		Bezeichnung der Zellkultur
Tier	Organ	
Mischling, weiblich, 2 Jahre	unveränderte Milz	CSC
Riesenschnauzer, weiblich, 9 Jahre	malignes Hämangioendotheliom der Milz	CH/RS
Deutscher Schäferhund, männlich, 10 Jahre		CH/DS
Weißer Schweizer Schäferhund, weiblich, 10 Jahre		CH/WS

4.1.1 Entnahme und Transport der Organe für die Zellisolierung

Die Organe wurden direkt nach der Euthanasie beziehungsweise intra operationem unter sterilen Bedingungen entnommen und sofort in Pufferlösung (PBS, Biochrom) überführt. Nach mehrmaligem Spülen kamen die Organe in die gekühlte Transportlösung (PBS, 1% Pen./Strep.). Der sofortige Transport ins Zellkulturlabor erfolgte auf Eis in Isolierboxen.

4.2 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Reinraumwerkbank durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 37℃, 5% CO_2 und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90%. Vor dem Einsatz der benötigten Materialien und Geräte wurden diese gereinigt, desinfiziert und sterilisiert. Während der Ruhezeiten erfolgte eine Bestrahlung des Zellkulturlabors mittels UV-Licht.

Wachstum und Morphologie der Zellen wurden, nach der Aussaat täglich und nach später alle 2-3 Tage, mit einem Phasenkontrastmikroskop (Axiovert 25, Zeiss Jena) untersucht. Die Dokumentation erfolgte mit einer PC-gesteuerten Digitalkamera (Inteq 000610, Berlin) unter Einsatz einer Bildarchivierungs- und Bildbearbeitungssoftware (Axiovision, Version 3,0, Zeiss, Jena).

4.2.1 Aufbereitung der Proben und Isolierung der Zellen

Im Zellkulturlabor erfolgte die Entnahme mehrerer Gewebeproben für histochemische Untersuchungen und deren sofortige Formalinfixierung. Für die Zellisolierung wurden jeweils zwei Gewebeproben entnommen. Eine dieser Gewebeproben stammte aus dem Randbereich des Tumors, die zweite aus einer zentralen Region, nekrotische Bereiche wurden gemieden. Nach mehrmaligem Spülen in PBS und Trimmen der Gewebsstücke auf ca. 1x1x1 cm große Stücke folgten die mechanische Zerkleinerung mittels Schere und Passage durch feinmaschige Edelstahlsiebe (siehe Material 3.7.2). Die entstandene Zellsuspension wurde unter Zusatz von 10 ml Erhaltungsmedium (DMEM+) in Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten bei 1050 U/min. zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in Erhaltungsmedium (DMEM+) resuspendiert. Nach nochmaligem Zentrifugieren wurde das Pellet in 5 ml Enzymlösung (siehe Material 3.7.1) gelöst und bei 37℃ unter regelmäßigem Schütteln inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde nach 20 Minuten durch Zugabe von Erhaltungsmedium gestoppt. Die Röhrchen wurden nun 5 Minuten bei 1050 U/ min. zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in Erhaltungsmedium (DMEM+) resuspendiert.

Danach erfolgte die Aussaat der Zellsuspension in 3 Vertiefungen zuvor gelatinierter 6-Lochplatten (Bacto Gelatine, 1,5% in PBS). Die Platten kamen sofort in den Brutschrank. Nach 20 Minuten wurde eine Begutachtung der Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop durchgeführt. Hier erfolgten erste fotografische Dokumentationen der isolierten Zellen. Bei Vorhandensein bereits adhärenter Zellen wurde der Überstand in 3 neue Vertiefungen der 6-Lochplatte überführt und die zuerst erwähnten Vertiefungen wieder mit 1,5 ml Selektivmedium (P_0) aufgefüllt. Eine Erneuerung des Selektivmediums erfolgte nach 24 und 48 Stunden.

4.2.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden auf gelatinierte Zellkulturschalen verschiedener Größe ausgesät. Hierfür wurden die Zellkulturschalen mit Gelatine bodendeckend befüllt und für maximal 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte vorsichtiges Spülen mit PBS und Überschichten mit einigen Tropfen Erhaltungsmedium.

Als Nährstoffquelle diente das unter 3.5.2 beschriebene Selektivmedium (P_0) oder das Erhaltungsmedium (DMEM+; 3.5.1), das im Abstand von zwei bzw. drei Tagen gewechselt wurde. Nach dem Auftauen wurden die Zellen zunächst in 6-Lochplatten vermehrt. Zur Untersuchung wurden die Zellen dann in 24-Lochplatten subkultiviert.

4.2.3 Subkultivierung

Nachdem die Zellen einer 6-Lochplatte Konfluenz erreicht hatten, konnten sie subkultiviert werden. Hierfür wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen kurz mit PBS gespült und schließlich mit 0,7 ml Trypsin-EDTA beschichtet. Nach maximal fünf Minuten Einwirkzeit im Brutschrank lösten sich die Zellen vom Untergrund und die Kultur lag als Zellsuspension vor. Dieser Vorgang wurde mikroskopisch mehrfach kontrolliert. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde mit einer serologischen Pipette die Zellsuspension wiederholt aufgenommen und abgelassen. Je nach Verwendungszweck wurden die Endothelzellen (zwischen 10^5 und 10^6 Zellen/ Vertiefung) auf gelatinierten Zellkulturschalen (6- oder 24-Lochplatten) mit bzw. ohne Glasplättchen gleichmäßig ausgesät.

4.2.4 Kryokonservierung

Bei Subkultivierungen wurde regelmäßig ein Teil der Zellen kryokonserviert. Entsprechend Punkt 4.2.3 wurde eine Zellsuspension hergestellt und in ein Reagenzröhrchen, das mit 10 ml DMEM+ gefüllt war, einpipettiert. Die Lösung wurde bei 1050 U/min. fünf Minuten lang zentrifugiert und der Überstand danach abgesaugt. Mit 1-1,5 ml Einfriermedium (siehe 3.6) wurde das Zellpellet resuspendiert und in ein Kryoröhrchen (1-2x 10^6 Zellen je Kryoröhrchen) gefüllt. Die Röhrchen wurden zunächst zwei bis drei Tage bei –80 °C in Isolierboxen langsam eingefroren und danach in Stickstofftanks dauerkonserviert.

4.2.5 Auftauen der Zellen

Der erste Arbeitsschritt, das zügige Auftauen der kryokonservierten Zellen aus dem Stickstofftank, wurde in einem Wasserbad (37℃) unter Schwenken durchgeführt. War die Zellsuspension aufgetaut, wurde sie mit einer serologischen Pipette aufgenommen und vorsichtig in ein mit 10ml DMEM+ gefülltes Zentrifugenröhrchen geträufelt. Diese Lösung wurde bei 1050 U/min. fünf Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde danach abgesaugt, das Pellet mit einer serologischen Pipette in Selektivmedium (3.5.2) aufgenommen und in ein bis zwei gelatinierte Vertiefungen einer 6-Lochplatte gleichmäßig verteilt. 24 Stunden später erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums.

4.3 Zellzählung nach Ablösung der *in vitro* kultivierten Zellen

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einem Hämozytometer (Neubauer-Zählkammer). Entsprechend Punkt 4.2.3 wurde eine Zellsuspension hergestellt. Diese wurde in Reagenzröhrchen, welche zuvor mit 10ml DMEM+ gefüllt wurden, einpipettiert. Die Lösung wurde bei 1050 U/min. für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das entstandene Pellet wurde mit 1 ml Kulturmedium resuspendiert und ein Tropfen dieser Zellsuspension in die Zählkammer gefüllt. Es folgte die Zählung und Addition der Zellen von 16 kleinen Eckquadraten (16 kleine Eckquadrate entsprechen einem Großquadrat) im Phasenkontrastmikroskop. Aus der errechneten Summe wurde der Mittelwert (MW) bestimmt. Die Zellzahl in der Suspension konnte dann anhand folgender Formel ermittelt werden:

Zellzahl/ml = MW der Zellzahl aus 2 Großquadranten x Kammerkonstante

4.4 Zellzählung *in vitro* ohne Ablösung der Zellen

Zur kontinuierlichen Beurteilung des Proliferationsverhaltens einer Kultur wurden Zellen in zuvor mittels oben beschriebener Methode ermittelter Zellzahl in die Vertiefungen von 24-Lochplatten ausgesät.

Das Proliferationsverhalten, der in definierten Zellzahlen (10^5 Zellen/Vertiefung der Zellkulturschale) ausgesäten Zellen, wurde in den ersten Tagen nach der Aussaat untersucht. Nach 24 Stunden wurden in 4 Vertiefungen jeweils 10 zufällig ausgewählte Sichtfelder am Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. Die Untersuchungen erfolgten im Abstand von 24 Stunden über einen Zeitraum von 4-6 Tagen.

4.5 Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen *in vitro* kultivierter Zellen

Die Entwicklung und Morphologie der verschiedenen Zellkulturen wurde über einen Zeitraum von bis zu 120 Tagen in regelmäßigen Abständen dokumentiert. Hierzu wurden die Zellen jeweils auf 4 gelatinierte Vertiefungen von 24-Lochplatten ausgesät und unter identischen Bedingungen kultiviert. Nach Mediumwechsel im Abstand von 3 bis 4 Tagen wurde die morphologische Entwicklung mittels Phasenkontrastmikroskop untersucht. Hierzu wurden nach der Aussaat pro Vertiefung 3 bestimmte Punkte willkürlich ausgewählt. Diese wurden bei jeder Untersuchung mit Hilfe einer auf dem Objekttisch aufgebrachten Skalierung aufgesucht und dokumentiert. Zusätzlich wurden auch weitere, nicht festgelegte markante Stellen in den Vertiefungen dokumentiert. Die Untersuchungen erfolgten an einem Invert-Mikroskop mit 50-, 100-, 200- und 320-facher Vergrößerung und die Fotodokumentation mit einer PC-gesteuerten Digitalkamera (Inteq, Berlin) und dem Softwareprogramm Axiovision Version 3.0 (Zeiss, Jena). Bei schrägem Lichteinfall konnten insbesondere tubuläre Strukturen besonders plastisch dargestellt werden; auch dies wurde fotografisch dokumentiert.

4.6 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen *in vitro* kultivierter Zellen

Um die Zellmorphologie der verschiedenen Zellkulturen auf ultrastruktureller Ebene zu analysieren, wurden die Zellen bis zur Konfluenz oder bis zur Ausbildung tubulärer Strukturen kultiviert. Hierzu wurden die Zellen (10^6 Zellen je Vertiefung) jeweils auf gelatinierte Vertiefungen von 6-Lochplatten ausgesät und unter identischen Bedingungen angezüchtet.

Am Tag der Untersuchung wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS (0,01 M, pH 7.4) und anschließend vorsichtig mit Cacodylat-Puffer (Cacodylsäure-Natriumsalz-Aqua bidest. 0,1 M, pH 7.2) gespült. Die Fixierung erfolgte bei 4°C in Karnovsky-Lösung (2% Paraformaldehyd und 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer). Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit 0,1 M Cacodylat-Puffer gewaschen. Es folgte die Kontrastierung für zwei Stunden im Kühlschrank mit 1% Osmiumtetroxid und 1,5% Kaliumferrocyanid (in 0,1 M Cacodylat-Puffer) und dreimaliges Spülen der Zellen für 10 Minuten in 0,1 M Cacodylat- Puffer.

Da der Zellrasen sowie makroskopisch sichtbare tubuläre Strukturen zusammenhängend untersucht werden sollten, mussten im nächsten Schritt die Zellen vom Boden in der Vertiefung abgelöst werden. Dazu wurde im Labor eine eigene Methode entwickelt (Hirschberg und Plendl, 2005). Die Vertiefungen wurden mit 1,5%igem Agar für 30 Minuten bei 4℃ beschichtet. Anschließend wurde der Agar mit anhaftendem Zellrasen in toto vorsichtig mittels Glasspatel aus der Vertiefung herausgelöst. Die Zellen wurden dann in 0,1 M Cacodylat-Puffer gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 50%, 70%, 80% und 90% (je 15 Minuten) entwässert. Als Zwischenmedium diente reines Propylenoxid (100%, zweimal 15 Minuten). Es folgte die Einbettung in Epon. Hierfür wurden die Proben in einem Propylen-Epon-Gemisch (1:1) für mindestens zwei Stunden sowie schließlich in reinem Epon für vier Stunden inkubiert. In Beemkapseln eingebettet, polymerisierten dann die Proben bei 60℃ für 24-48 Stunden. Von den auspolymerisierten Epon-Blöckchen wurden mit einem Ultramikrotom (Ultracut S, Fa. Reichert-Jung, Wien, Österreich) 1 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt. Diese wurden gefärbt und lichtmikroskopisch beurteilt sowie zur Vororientierung für das Anfertigen von Ultradünnschnitten genutzt.
Von geeigneten Proben wurden zuletzt Ultradünnschnitte (60 nm) angefertigt und auf Kupfergrids aufgelegt. Die Auswertung erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop (EM10CR, Zeiss, Jena). Zur Fotodokumentation wurden Kodak Electron Microscope Filme (Kodak, Stuttgart) verwendet.

4.7 Immunzytochemische Untersuchungen an caninen Zellen

Für immunzytochemische Untersuchungen wurden die Zellen der vier Kulturen jeweils auf separate, gelatinierte, mit Glasplättchen bestückte Vertiefungen von 24-Lochplatten ausgesät und unter identischen Bedingungen angezüchtet. Es wurden zwei indirekte Detektionssysteme angewandt (Biotin-konjugierter Sekundärantikörper und EnVision+TM-Kit).
Die folgenden Mengenangaben bei den immunzytochemischen Untersuchungsmethoden beziehen sich jeweils auf eine Vertiefung der 24-Lochplatte.

4.7.1 Immunzytochemische Untersuchungsmethode der Zellen mit Biotin-konjugiertem Sekundärantikörper

Nach dem festgelegten Kultivierungszeitraum wurden die Zellen in den Versuch einbezogen. Zunächst wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gespült. Es folgte eine 5 Minuten dauernde Fixierung mit gekühltem Methanol-Aceton (1:1). Nach Absaugen des Fixierungsreagenzes erfolgten zwei Waschungen mit PBS. Um endogene Enzymreaktionen zu eliminieren, wurden die Zellen mit Methanol-H_2O_2 (140:1) 5 Minuten lang behandelt und danach mit PBS zweimal gewaschen. Die anschließende Inkubation mit einem Proteinblocker sollte weitere unspezifische Proteinbindungen einschränken. Der Proteinblocker wurde nach 20 Minuten abgesaugt. Alle bisher beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur, die Zellen wurden mit den Lösungen jeweils so überschichtet, dass sie bedeckt waren (ca. 150 µl). Nach Verdünnung der Stammlösung des entsprechenden Primärantikörpers mit PBS wurden 150 µl dieses Ansatzes auf die Zellen pipettiert. Der Antikörper wirkte 24 Stunden in einer feuchten Kammer bei 4 °C auf die Zellen ein. Dann wurden die Zellen zur Entfernung von nicht gebundenem Antikörper dreimal mit PBS gewaschen und 150 µl des mit PBS verdünnten Biotin-gebundenen Sekundärantikörpers aufgetragen. Nach 30 Minuten Inkubation (Raumtemperatur) wurde mit PBS zweimal gespült und für weitere 30 Minuten mit 150 µl Streptavidin-Biotin-Komplex inkubiert. Es folgten zwei weitere PBS-Spülungen. Zur sichtbaren Darstellung der Reaktion kam Diaminobenzidin (DAB) zum Einsatz. Hierfür wurden 10 mg DAB mit 50 ml TRIS-Puffer (pH 7,6) und 25 µl H_2O_2 (30%) zu einem Ansatz vermischt. 100 µl dieses Ansatzes wurden auf die Zellen aufgetragen. Das Ende der Reaktion wurde unter lichtmikroskopischer Kontrolle festgestellt (Dauer ca. 5 Minuten). Mit einem Hämalaun-Reagenz konnten im Anschluss die Zellkerne farblich kontrastiert werden (ca. 3 Minuten Einwirkzeit unter lichtmikroskopischer Kontrolle). Nach einer letzten Spülung der Zellen mit Aqua dest. wurden die Glasplättchen mit einer Pinzette aus der Kulturschale sehr vorsichtig abgehoben und mit der bewachsenen Seite auf einen Objektträger gelegt. Als Einbettmedium für die bewachsenen Glasplättchen diente Glycerin-Gelatine.

Die Ermittlung des Testergebnisses erfolgte an einem Phasenkontrastmikroskop (Diaplan, Leitz, Wetzlar). Eine Digitalkamera (DXM 1200, Nikon, Düsseldorf) mit angeschlossener Bildbearbeitungssoftware (ACT-1 Version 2,20) diente der Dokumentation.

4.7.2 Immunzytochemische Untersuchungsmethode der Zellen mit dem EnVision+TM-Kit

Die Anzucht und Vorbehandlung der Zellen mit Primärantikörper entsprach dem unter 4.7.1 beschriebenen Vorgehen. Zur Entfernung von nicht gebundenem Primär-Antikörper wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden 150 µl des EnVision+TM-Kits aufgetragen. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde mit PBS zweimal gespült. Zur sichtbaren Darstellung der Reaktion kam (entsprechend Punkt 4.5.2) Diaminobenzidin (DAB) zum Einsatz. Hierfür wurden 10 mg DAB mit 50 ml TRIS-Puffer (pH 7,6) und 25 µl H_2O_2 (30%) zu einem Ansatz vermischt. 100 µl dieses Ansatzes wurden auf die Zellen aufgetragen. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurde das Ende der Reaktion festgestellt (Dauer der Reaktion ca. 5 Minuten). Mit dem Hämalaun-Reagenz konnten im Anschluss die Zellkerne farblich kontrastiert werden (Einwirkzeit, unter lichtmikroskopischer Kontrolle, ca. 3 Minuten). Nach einer letzten Spülung der Zellen mit Aqua dest. wurden die Glasplättchen mit einer Pinzette aus der Kulturschale vorsichtig abgehoben und mit der bewachsenen Seite auf einen Objektträger gelegt. Als Einbettmedium für die bewachsenen Glasplättchen diente Glycerin-Gelatine.

Tabelle 4: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper, sowie die jeweiligen Verdünnungen

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Monoklonaler Antikörper Maus anti-Schaf-CD31	1:100	EnVision+TM, Ziege anti-Maus, Kaninchen Peroxidase-Kit	1:200
Monoklonaler Antikörper Maus anti-αvβ3-Integrin (CD 51/61)	1:50	EnVision+TM, Ziege anti-Maus, Kaninchen Peroxidase-Kit	1:200
Polyklonaler Antikörper Kaninchen anti- human-vWF	1:200	Ziege anti-Kaninchen, Biotin konjugiert	1:200
Polyklonaler Antikörper Kaninchen anti-human-Tie-2	1:100	Ziege anti-Kaninchen, Biotin konjugiert	1:200

4.7.3 Kontrollen der immunzytochemischen Untersuchungen

Der Primärantikörper wurde zum einen durch PBS, zum anderen durch Maus- bzw. Kaninchenserum (normal, IgG1) ersetzt. Als Negativkontrolle dienten canine Fibroblasten. Als weitere Kontrolle wurden aus einer unveränderten caninen Milz isolierte Zellen genutzt, siehe Abschnitt 4.1.

4.8 Nachweis der Bindung FITC-konjugierter-Lektine

Die Anzucht und Fixierung der Zellen entsprach dem unter 4.7.1 beschrieben Vorgehen. Alle folgenden Arbeiten erfolgten unter Lichtausschluss. Die Stammlösungen der FITC-konjugierten Lektine wurden zu Versuchsbeginn in den Verdünnungen 1:50 bis 1:400 bereitgestellt (Lektin:PBS). Nach dem Absaugen des Spülpuffers wurden 150 µl der vorbereiteten Ansätze in die jeweiligen Vertiefungen pipettiert. Es folgte die zweistündige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen zur Entfernung ungebundener Lektine dreimal vorsichtig mit PBS gespült. Um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern, wurden diese sofort mit Fluorostab Eindeckmedium auf Objektträger verbracht und bis zur weiteren Untersuchung in einer lichtundurchlässigen feuchten Kammer bei 4℃ gelagert. Die Auswertung und Dokumentierung erfolgte am Fluoreszenzlichtmikroskop (Diaplan, Leitz, Wetzlar) mit angeschlossener Digitalkamera (DXM 1200, Nikon, Düsseldorf).

5 Ergebnisse

5.1 *In vitro* Kultivierung caniner Zellen

Verschiedene Zellpopulationen aus malignen Hämangioendotheliomen der Milz von drei Hunden wurden isoliert und kultiviert. Parallel hierzu wurden Zellen aus der unveränderten Milz eines weiteren Hundes isoliert und kultiviert (Abschnitt 4.1ff).

5.1.1 Morphologie und Proliferation der Zellen nach der Isolierung

5.1.1.1 Zellen aus malignen Hämanigoendotheliomen

Nach Einsaat der Zellen verteilten sich diese auf der Kulturschalenoberfläche, wobei die Zelldichte in den Randbezirken höher als in der Mitte der Schale war. Die Zellen wiesen in diesem Stadium eine kugelige Form und einen Durchmesser von 10-20 µm auf. Sie schwammen teils als Einzelzellen, teils in kleineren Zellverbänden frei im Kulturmedium. Nach 60 Minuten konnte bei ca. 50 % der Zellen eine Adhärenz am Schalenboden festgestellt werden. Diese Zellen wirkten abgeflacht, ihr Zytoplasma breitete sich zu den Seiten hin aus und wies einen unregelmäßigen Rand auf (Abbildung 4).

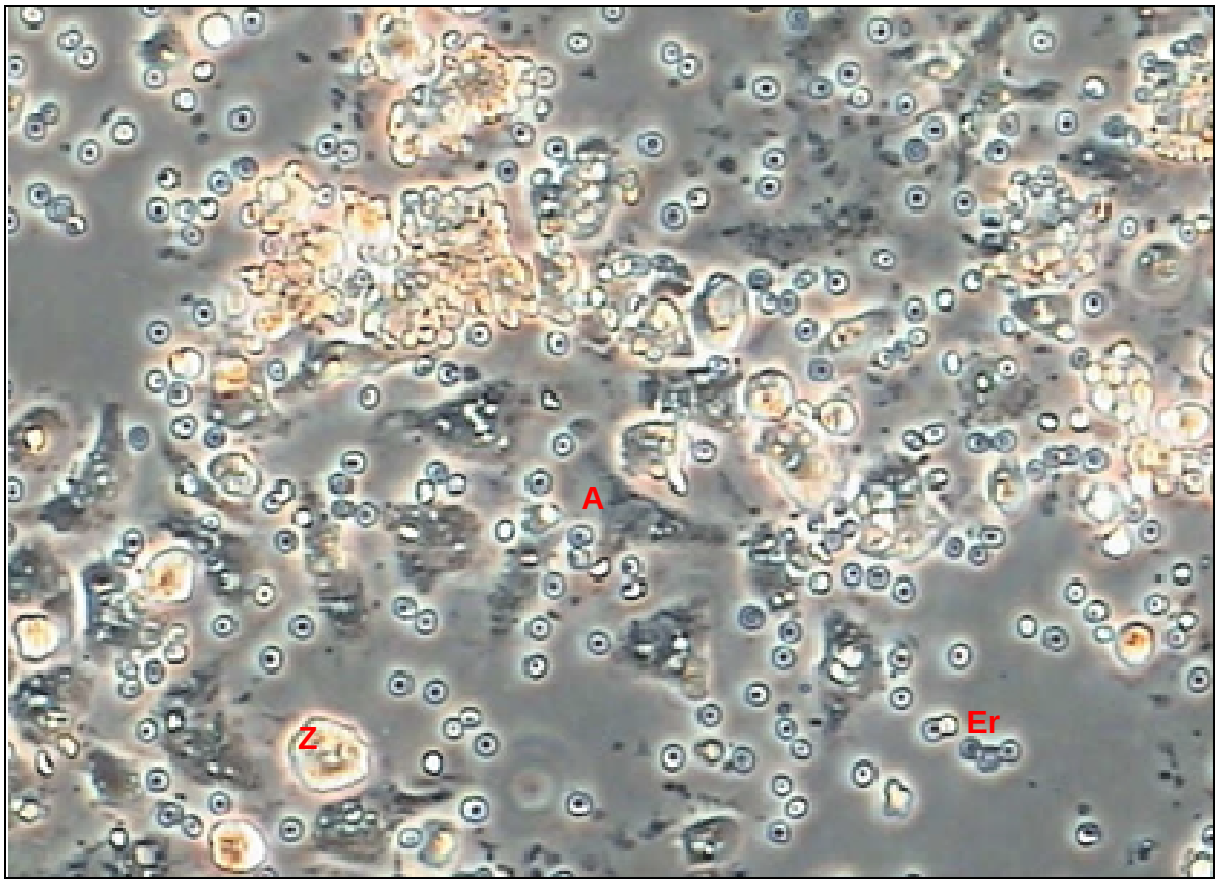

Abbildung 4: Eine Stunde nach Isolierung waren bereits einige adhärente Zellen (A) auf dem Kulturschalenboden zu sehen. Im Medium befanden sich noch viele nicht anhaftende Zellen (Z) und Erythrozyten (Er), Phasenkontrastmikroskop x200.

24 Stunden nach der Aussaat waren fast alle Zellen adhärent. Nur noch wenige schwammen frei im Medium. Eine große Anzahl an Erythrozyten war zwischen den Zellen und frei im Medium zu beobachten. In den äußeren Bereichen der Kulturschalen lagen die Zellen oftmals dichter als in den inneren. Die Zellen hatten 24 Stunden nach der Aussaat schon mit der Teilung begonnen und Mitosen waren gut sichtbar. Nach weiteren zwei Tagen war fast der komplette Kulturschalenboden mit Zellen bedeckt und es konnten, wie in Abbildung 5 dokumentiert, zwei verschiedene Zellformen beobachtet werden.

Polygonaler Zelltyp (Typ a): Einerseits zeigten sich Zellen, die einen dreieckigen bis polygonalen Zellkörper mit meist nur einem ausgeprägten Ausläufer aufwiesen. Seine Länge betrug bis zum zweifachen des Durchmessers des Zellleibes und war am Ende plattenförmig verbreitert. Diese Zellen hatten im Bereich des Zellleibes einen Durchmesser von 30-50 µm und erreichten mit ihren Fortsätzen eine Länge von bis zu 150 µm.
Spindelförmiger Zelltyp (Typ b): Andere Zellen nahmen eine spindelförmige, teilweise stark in die Länge gezogene Form an. Die Enden dieser langen Zellfortsätze waren, wie bei den oben beschrieben Zellen, leicht verbreitert. Diese Zellen erreichten mit ihren Fortsätzen Längen von bis zu 200 µm.

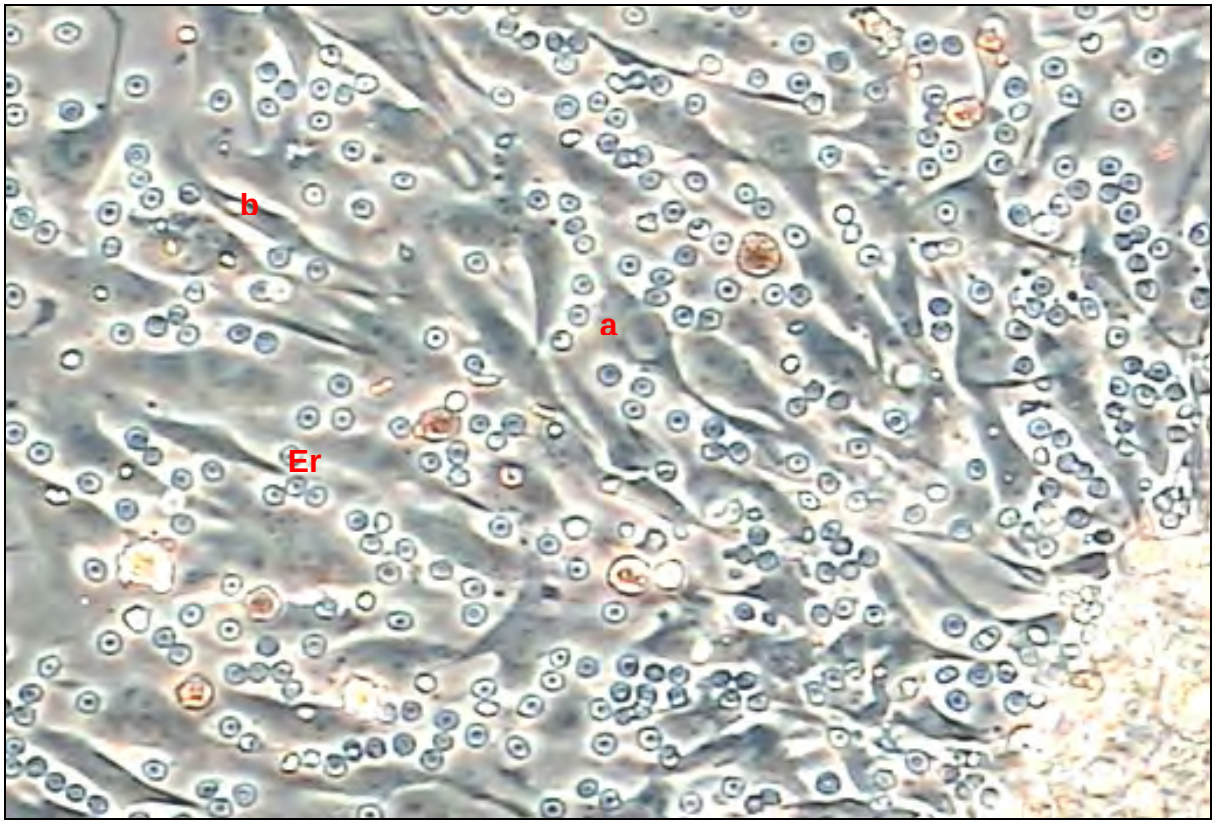

Abbildung 5: Drei Tage nach Isolierung hatte sich die Anzahl der adhärenten Zellen stark vermehrt. a) polygonaler Zelltyp; b) spindelförmige Zelle; Er) Erythrozyten, Phasenkontrastmikroskop x200.

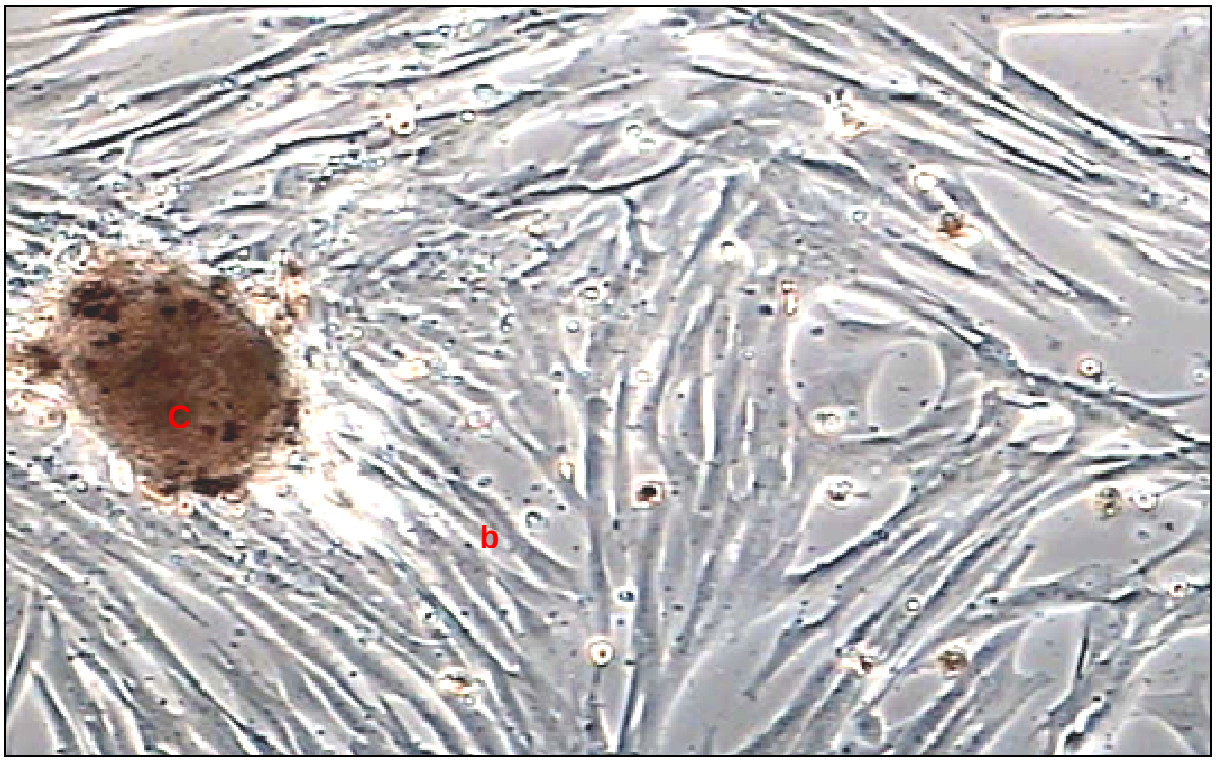

Abbildung 6: Nach 14 Tagen in Kultur lagen die Zellen in mehreren Schichten auf dem Kulturschalenboden, es herrschte der spindelförmige Zelltyp vor (b) und es kam zur Ausbildung zellulärer Cluster (C), Phasenkontrastmikroskop x100.

Die Zellen aus den malignen Hämangioendotheliomen zeigten ein sehr schnelles Wachstum. Bereits nach 6 Tagen war der Zellkulturschalenboden so dicht bewachsen, dass die Zellen subkultiviert werden konnten. Zellen die über einen längeren Zeitraum kultiviert wurden, lagerten sich dicht aneinander und es trat ausschließlich der spindelförmige Zelltyp (Typ b) auf. Nach einer Kultivierungsdauer von über 10 Tagen waren die Zellen in mehreren Schichten übereinander gelagert. In Bereichen sehr hoher Zelldichte kam es zur Ausbildung zellulärer Cluster, welche aus einer äußeren Schicht vitaler Zellen und Zellfragmenten im Inneren (siehe 5.4) bestanden. Der Durchmesser dieser Cluster betrug 150 µm bis 500 µm. Während die Cluster zu Beginn fest mit den darunter liegenden Zellen verbunden waren, lösten sich rund 50% der Cluster bei weiterer Kultivierung von den am Boden haftenden Zellen. Diese frei im Medium vorliegenden Cluster lagerten sich lose den am Kulturschalenboden haftenden Zellen an. Während der regelmäßigen Wechsel des Kulturmediums wurden diese dann mit dem verbrauchten Medium entfernt.

Cluster, die den Kontakt zum Untergrund aufrecht hielten, bildeten im Laufe der Kultivierung tubuläre Strukturen aus. Diese nahmen untereinander Kontakt auf und bildeten zu Beginn Brücken zwischen einzelnen Clustern. Derartige Brücken bestanden Anfangs aus einzelnen Zellausläufern, bis sich dann tubuläre Strukturen aus vielen parallel und linear angeordneten Zellen bildeten. Nach dem 28. Kultivierungstag kam es dann zur Ausbildung komplexer Netze (siehe 5.1.2).

5.1.1.2 Zellen aus einer unveränderten Milz

Die Zellen aus einer unveränderten Milz konnten nicht in so hoher Zellzahl isoliert werden. Auch diese Zellen (Kultur CSC) sammelten sich direkt nach der Einsaat vor allem am Rand der Kulturschalen, wobei in der Mitte der Zellkulturschale teilweise völlig zellfreie Bereiche auftraten. Auffällig war, dass im Gegensatz zu den Zellen aus malignen Hämangio-endotheliomen (Kultur CH/WS und CH/DS) schon zu Beginn deutlich weniger Erythrozyten vorhanden waren (Abbildung 7).

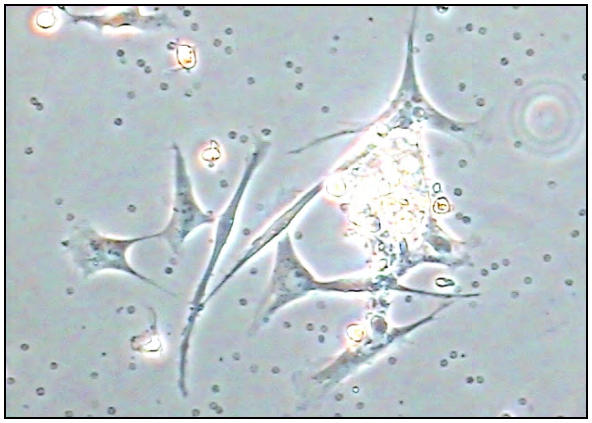

Abbildung 7: Zellen (Kultur CSC), eine Stunde nach Isolierung aus einer gesunden Milz, Phasenkontrastmikroskop x320.

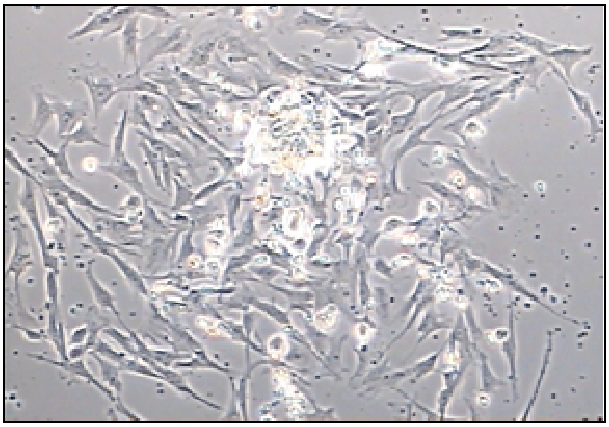

Abbildung 8: Kultur CSC am dritten Tag, deutliche Proliferation der kultivierten Zellen, Phasenkontrastmikroskop x200.

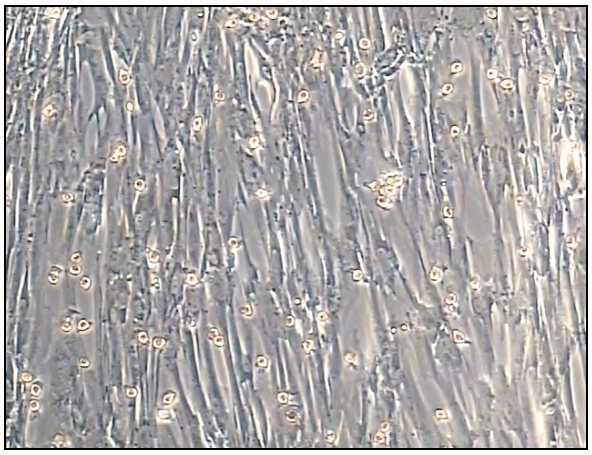

Abbildung 9: CSC 14. Tag in Kultur, der gesamte Kulturschalenboden ist vollständig mit adhärenten Zellen bewachsen.

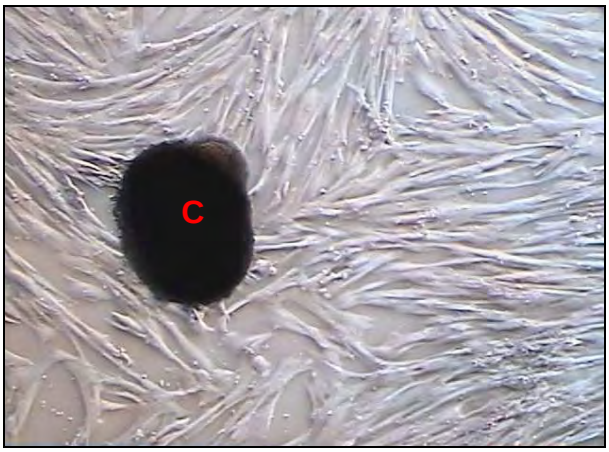

Abbildung 10: Nach 21 Tagen Kultivierungsdauer kommt es auch bei Zellen aus einer gesunden Milz zur Ausbildung zellulärer Cluster (C).

(Abbildungen 9 und 10: Phasenkontrastmikroskop x100)

Zellen der inneren Bereiche der Zellkulturschalen, in denen diese nicht so dicht lagen, bildeten lange Ausläufer (bis zu 250 µm), die an den Enden verbreitert waren. Insgesamt konnten solche Zellen über 300 µm lang werden. Die beschriebenen Ausläufer traten meist mit anderen Zellen in Verbindung, wobei sie allerdings oft näher gelegene Zellen nicht berührten, sondern sich in Richtung weiter entfernt gelegener Zellen streckten. In den Zellen waren die Zellkerne mit mehreren Nukleoli deutlich zu erkennen.

Zellen, die aus der gesunden Milz isoliert wurden, bedeckten den Zellkulturschalenboden nach einer Kultivierungsdauer von 8 bis 10 Tagen.

Zur Ausbildung der bei den Zellen aus malignen Hämangioendotheliomen unter 5.1.1.1 beschriebenen zellulären Cluster kam es bei den Zellen aus der gesunden Milz nach 21 Tagen.

5.1.2 Ausbildung angiogener Stukturen

5.1.2.1 Zellen des malignen Hämangioendothelioms

Wurden diese Zellen über den Zeitraum von 10 Tagen hinaus kultiviert, traten zunächst zelluläre Cluster auf (Abbildung 11). Zu diesem Zeitpunkt wurden an mehreren Stellen der Kultur zellfreie Areale sichtbar. Diese waren meist von einem zellreichen, den Zellrasen überragenden Rand umgeben (Abbildung 12).

Abbildung 11: 10 Tage in Kultur, Bildung zellulärer Cluster (C).

Abbildung 12: 10 Tage in Kultur, erstes Auftreten zellfreier Areale.

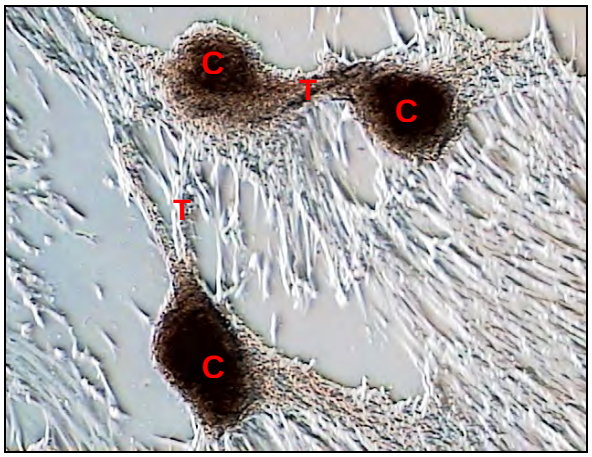

Abbildung 13: 21 Tage Kultivierungsdauer, über tubuläre Strukturen (T) sind die zellulären Cluster (C) verbunden.

Abbildung 14: 21 Tage in Kultur, tubuläre Strukturen (T) ausgehend von einem zellulären Cluster (C).

(Abbildungen 11 bis 14: Zellen aus einem malignen Hämangioendotheliom, Phasenkontrast-mikroskop x100)

Die zellfreien Areale wurden zunehmend größer, während sich meist von zellulären Clustern ausgehende tubuläre Strukturen ausbildeten, bis schließlich ab dem 28. Tag nur noch wenige Zellen unter dem kommunizierenden System strangartiger Zellverbände auszumachen waren (Abbildungen 15 bis 17). Die phasenkontrastmikroskopische Untersuchung erlaubte keine eindeutige Beurteilung des Verbleibs der Zellen des Monolayers. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich die Zellen zum großen Teil in das Netz eingliederten, da nur wenige abgelöste Zellen beim Mediumwechsel entfernt wurden.

Abbildung 15: Zellen aus einem malignem Hämangioendotheliom, 28 Tage in Kultur, Ausbildung verzweigter, tubulärer Strukturen (T) die oft von zellulären Clustern (C) ausgehen. Nur wenige nicht an den tubulären Strukturen beteiligte Zellen (Z) haften am Kulturschalenboden, Phasenkontrastmikroskop x100.

Wurden die Zellen über dieses Stadium hinaus weiter kultiviert kam es innerhalb von 10 Tagen zu einer fast vollständigen Rückbildung der tubulären Strukturen. Beim Mediumwechsel wurden viele abgelöste Zellen entfernt und es bildete sich wieder ein dichter Zellrasen in mehren Schichten auf dem Kulturschalenboden aus. 14 Tage nach Beginn dieses Rückbaus (42. Kultivierungstag) waren nur noch zelluläre Cluster und ein dichter Zellrasen vorhanden.

Wenige Tage später setzte die bereits schon am 28. Kultivierungstag beobachtete Entwicklung tubulärer Strukturen ein. Diese auch schon makroskopisch gut erkennbaren Strukturen konnten am 60. Tag mit Hilfe eines Lupenmikroskops eindrucksvoll dokumentiert werden konnte (Abbildung 16).

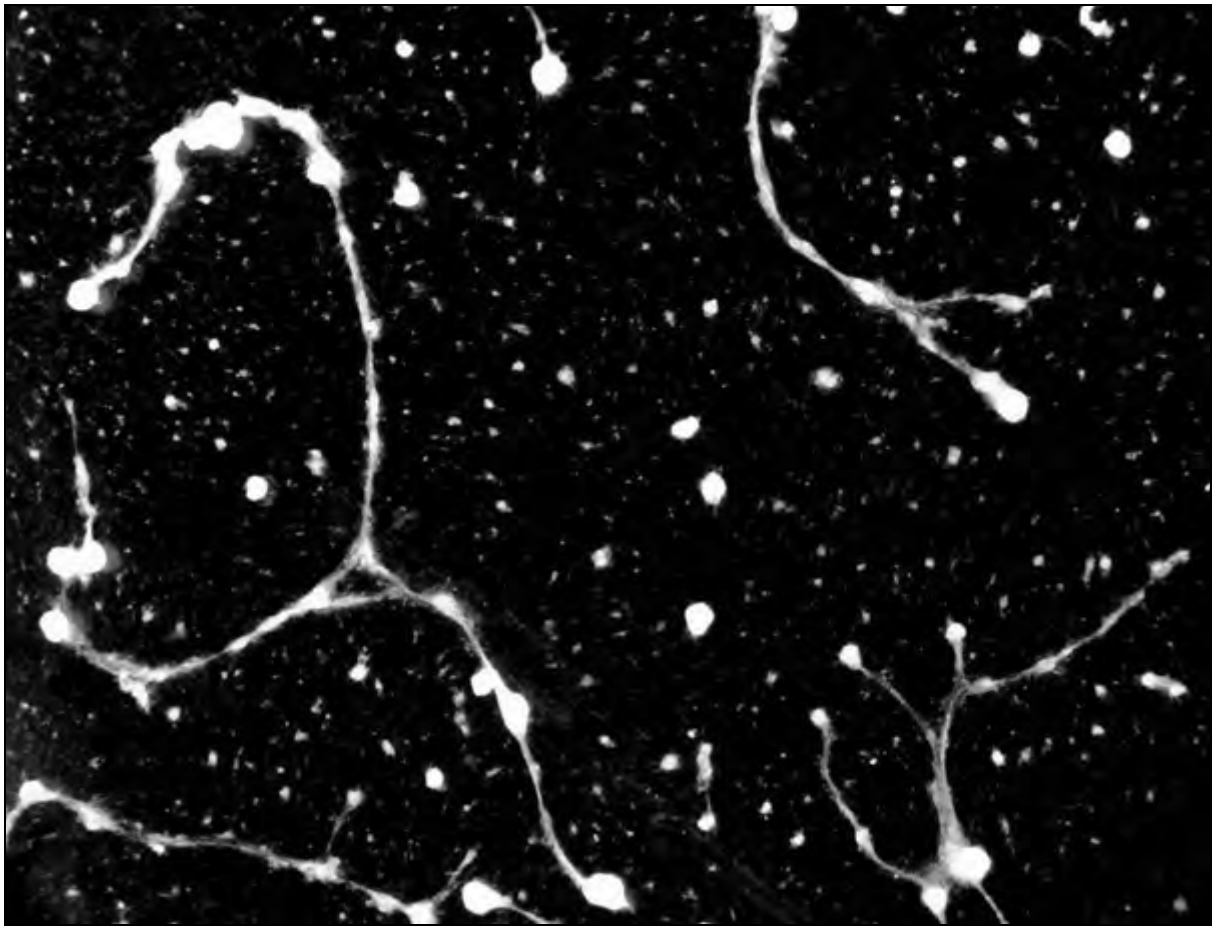

Abbildung 16: Zellen aus einem malignem Hämangioendotheliom, 60 Tage in Kultur, Lupenmikroskop, schräger Lichteinfall x10.

Wurden die aus malignen Hämangioendotheliomen isolierten Zellen auch über den 60. Tag hinaus weiter kultiviert, wiederholten sich die oben beschriebenen Ab- und Umbauvorgänge.

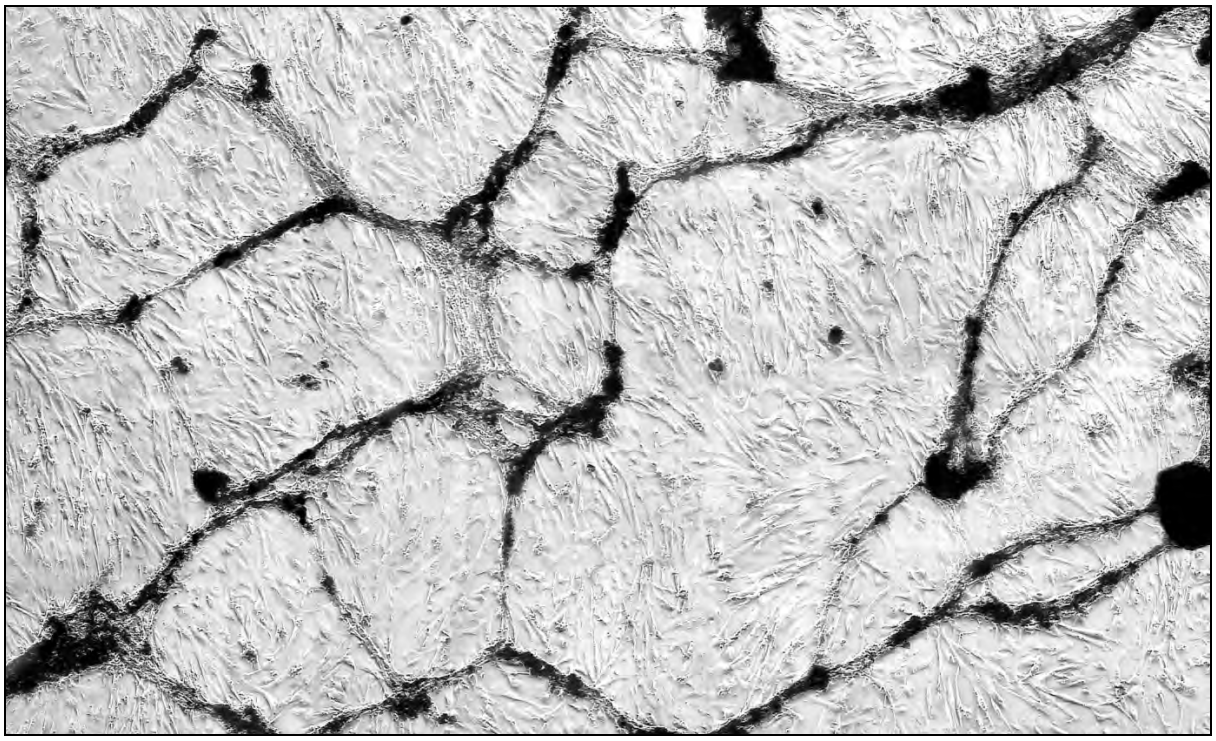

Abbildung 17: Zellen aus einem malignem Hämangioendotheliom, 120 Tage in Kultur, Phasenkontrastmikroskop x50, Darstellung aus Einzelbildern zusammengesetzt.

Die Zellen aus malignen Hämangioendotheliomen konnten 130 (CH/DS) und 145 (CH/WS) Tage kultiviert werden. Die Kultur CH/RS stand wegen einer Kontamination nicht für die Langzeitkultivierung zur Verfügung. Nach der maximalen Kultivierung über 145 Tage stellten die Kulturen CH/DS und CH/WS ihr Wachstum ein, die tubulären Strukturen wurden abgebaut und der Zellrasen wurde nicht wiederhergestellt. Eine Subkultivierung der Zellen war nach dieser Kultivierungsdauer nicht mehr möglich.

5.1.2.2 Zellen aus der gesunden Milz eines Hundes

Die verschieden Stadien, die zur Ausbildung tubulärer Strukturen führen, konnten auch bei den Zellen beobachtet werden, die aus einer gesunden Milz isoliert wurden. Die Zellen erreichten nach 8 bis 10 Tagen Konfluenz. Nach 14 Tagen Kultivierung kam es zur Ausbildung von zellulären Clustern und dem Auftreten zellfreier Areale in der Kultur (Abbildung 19). Nach 25 bis 28 Tagen konnte die Ausbildung tubulärer Strukturen beobachtet werden (Abbildung 20 und 21). Diese Strukturen verbanden die zellulären Cluster, es kam aber nie zur Ausbildung derartig komplexer Netze wie sie bei den Zellen aus malignen Hämangioendotheliomen beobachtet werden konnten (siehe 5.1.2).
Die Zellen aus der gesunden Milz stellten ab einer Kultivierungsdauer von über 60 Tagen ihr Wachstum ein, es kam zur Rückbildung der tubulären Strukturen und der Zellrasen wurde nicht wiederhergestellt. Versuche, die Zellen durch Trypsinieren (siehe Methoden 4.2.3) in neue Kulturschalen zu überführen, waren erfolglos.

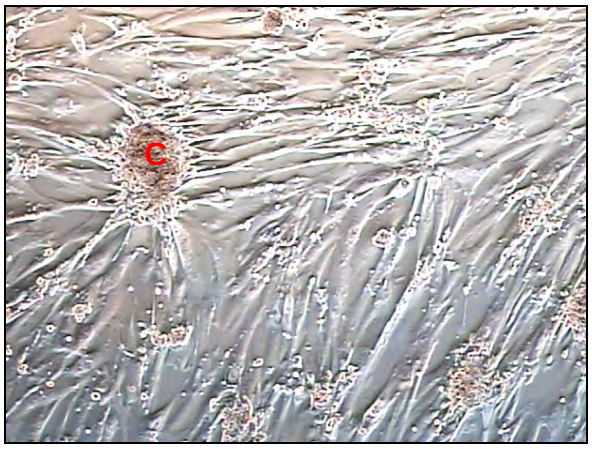

Abbildung 18: 14 Tage in Kultur, Bildung zellulärer Cluster (C).

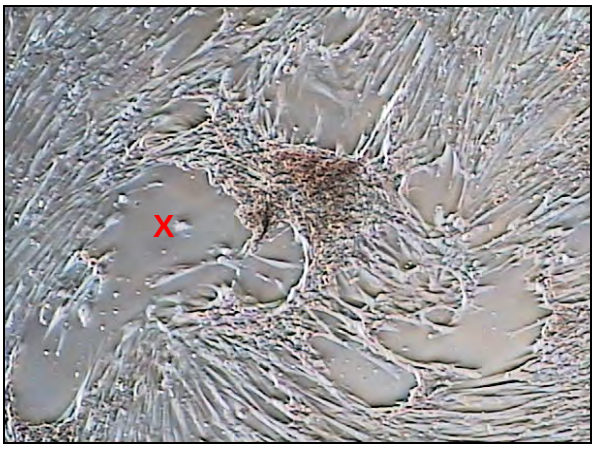

Abbildung 19: 14 Tage in Kultur, Auftreten zellfreier Areale (X).

(Abbildungen 18 und 19: Zellen einer unveränderten Milz, Phasenkontrastmikroskop x100)

Abbildung 20: Nach 28 Tagen Kultivierung treten zahlreiche Cluster (C), tubuläre Strukturen (T) und zellfreie Areale auf (X).

Abbildung 21: 30 Tage in Kultur, tubuläre Strukturen (T) ausgehend von einem zellulären Cluster (C)

(Abbildungen 20 und 21: Zellen aus einer unveränderten Milz, Phasenkontrastmikroskop x50)

5.1.4 *In vitro* Proliferationsverhalten

Nach der unter 4.4 beschriebenen Methode wurde das Proliferationsverhalten der drei isolierten und langzeitkultivierten Zellpopulationen *in vitro* untersucht. Hierfür wurden die Zellen in gleicher Zellzahl ausgesät und unter identischen Bedingungen kultiviert. Die Zellen aus malignen Hämangioendotheliomen (CH/DS und CH/WS) zeigten ab dem zweiten bzw. dritten Kultivierungstag ein annähernd exponentielles Wachstum. Im Gegensatz hierzu konnte bei den Zellen aus einer gesunden Milz (CSC) während des Beobachtungszeitraums ein fast lineares Wachstum beobachtet werden.

Zur Vereinfachung wurde im Diagramm 1 die Zellzahl je 10 Sichtfelder angegeben.

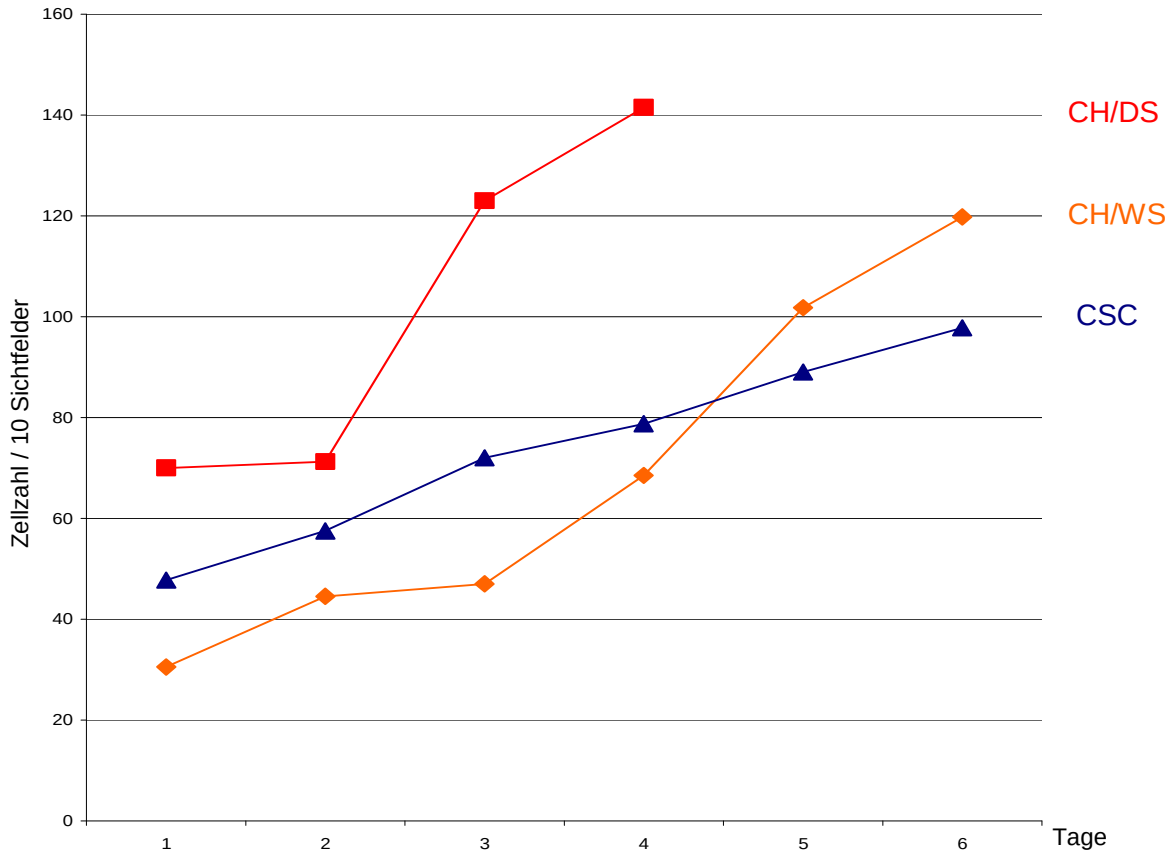

Diagramm 1: CH/DS und CH/WS, canine Zellen aus malignen Hämangioendotheliomen; CSC, Zellen aus einer gesunden Milz.

5.1.4 Maximale Kultivierungsdauer

Die maximale Kultivierungsdauer wurde für die drei Zellkulturen unter identischen Bedingungen ermittelt. Die Kultivierung erfolgte in Selektivmedium, welches in zwei- bis dreitägigem Abstand gewechselt wurde (s. Methoden). Nach mehreren Auf- und Umbauzyklen innerhalb der jeweiligen Kulturen kam es nach unterschiedlichen Zeiträumen zum Erliegen des Zellwachstums. Dieser Zeitpunkt wurde als maximale Kultivierungsdauer angegeben, nach diesem Zeitpunkt war auch eine erneute Passage der Zellen nicht mehr möglich.
Erreichten die Zellen Konfluenz und sollten nicht zur Langzeitkultivierung genutzt werden, wurden sie subkultiviert (s. Methoden). Jede Subkultivierung bedeutete eine um eins erhöhte Passagezahl. Tabelle 4 zeigt die maximal mögliche Anzahl der aufeinander folgenden Subkultivierungen (Passagen) bei den verschiedenen Zellkulturen. Nach diesem Zeitraum stellten die Zellen die Proliferation ein und ließen sich nicht mehr subkultivieren.

Tabelle 5: Vergleich der Zellen aus einer unveränderten Milz (CSC) mit den Zellen isoliert aus zwei malignen Hämangioendotheliomen der Milz (CH/DS und CH/WS).

	CSC	CH/DS	CH/WS
Populationsverdoppelungszeit	6 Tage	4 Tage	4 Tage
Maximale Kultivierungsdauer	80 Tage	130 Tage	145 Tage
Passagen	6	11	10

5.2 Immunzytochemische Untersuchungen

Die isolierten Zellen wurden mittels immunzytochemischer Untersuchungen identifiziert. Untersucht wurden Zellen aus einer gesunden Milz (CSC), Zellen aus zwei malignen Hämangioendotheliomen (CH/DS und CH/WS) sowie canine Fibroblasten als Negativkontrolle (siehe Abschnitt 4.7).

5.2.1 Immunzytochemische Markierung mit anti-vWF (von Willebrand Faktor)

Die Präsenz des endothelzellspezifischen von-Willebrand-Faktor–Proteins wurde mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers anti-vWF nachgewiesen. Nahezu 100% der Zellen der Kultur CSC reagierten immunopositiv (Abbildung 22). Rund 60% der Zellen aus der Kultur CH/DS (Abbildung 23) und nur ca. 30% der Zellen aus Kultur CH/WS (Abbildung 24) reagierten positiv. Eine Übersicht der Ergebnisse aller immunzytochemischen Untersuchungen ist unter Punkt 5.2.5 zusammengestellt. Das Antigen konnte in den immunopositiven Zellen im gesamten Zytoplasma nachgewiesen werden, wobei die höchsten Konzentrationen in Zellkernnähe aufgefunden wurden. Schmale Zellausläufer waren regelmäßig intensiv gefärbt, im Gegensatz zu den breiten Ausläufen, die meist nur schwach gefärbt waren.

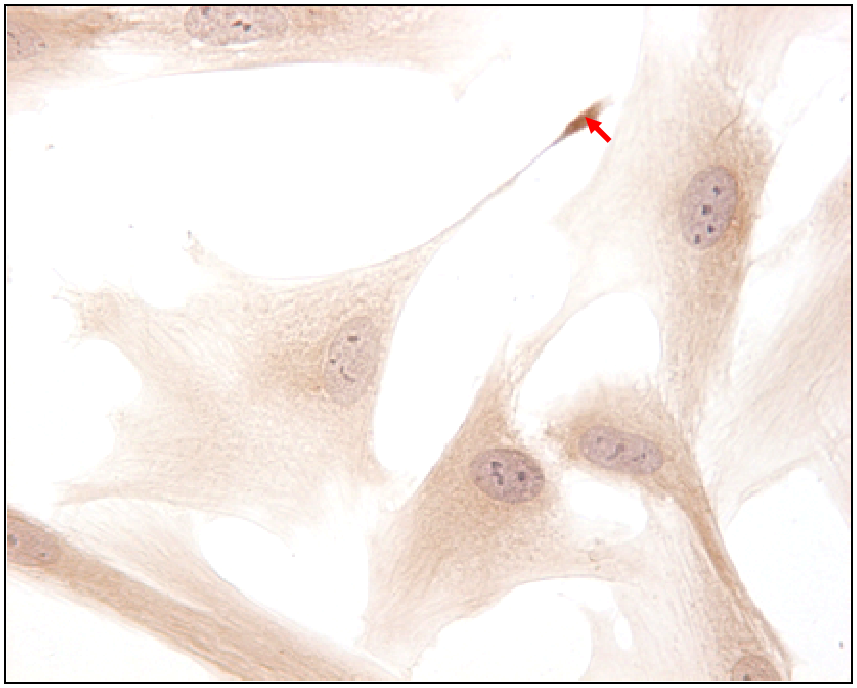

Abbildung 22: Zellen aus der gesunden Milz (CSC), deutlich positive Reaktion mit dem Antikörper gegen vWF, nahezu aller Zellen der Kultur. Der Pfeil zeigt einen intensiv gefärbten schmalen Zellausläufer, Lichtmikroskop x400.

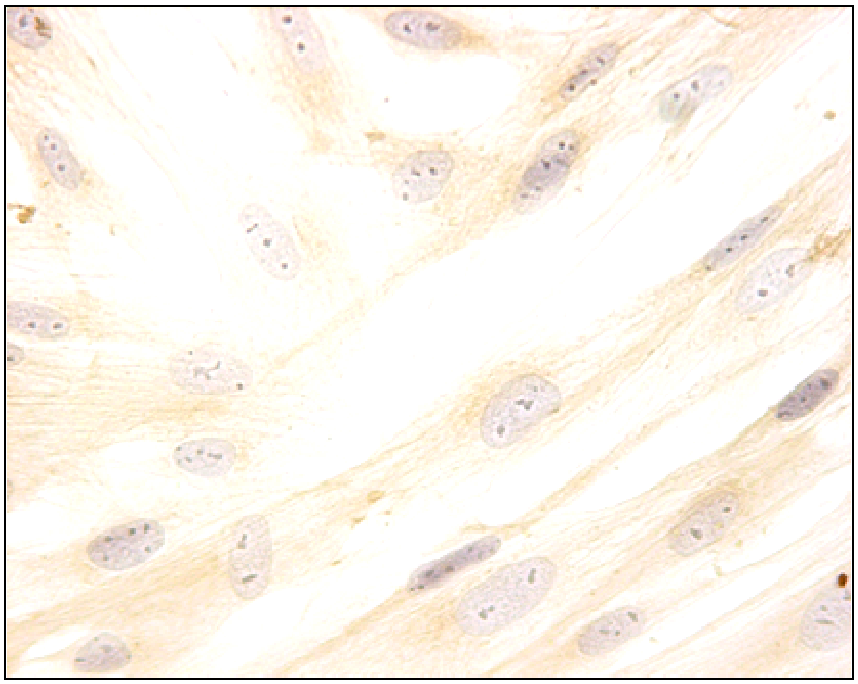

Abbildung 23: Rund 60% Zellen aus der Kultur CH/DS reagierten mit anti-vWF, Lichtmikroskop x400.

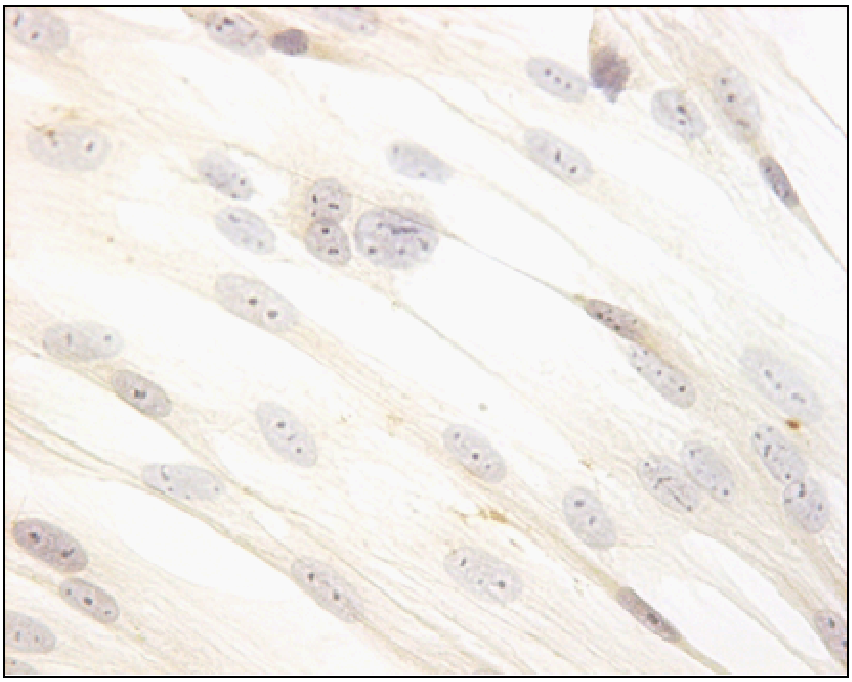

Abbildung 24: Nur ca. 30% der Zellen aus Kultur CH/WS reagieren mit anti-vWF, Lichtmikroskop x400.

5.2.1.1 Kontrollen

Parallel zu den immunzytochemischen Untersuchungen wurden stets Kontrollen des Detektionsystems durchgeführt. Anstelle eines Sekundärantikörpers wurden die Zellen hierfür mit PBS-Puffer inkubiert. Die Kontrollen der untersuchten Zellen zeigten keine unspezifischen Bindungen (Abbildungen 25 bis 27). Gleichzeitig wurden canine Fibroblasten mit dem Antikörper inkubiert, hier waren einige sehr geringfügige zytoplasmatische Reaktionen zu finden (Abbildung 28). Diese wiesen aber eine deutlich geringere Intensität im Vergleich mit den Versuchen der anderen Zellkulturen auf. Alle immunzytochemischen Untersuchungen wurden dreifach wiederholt.

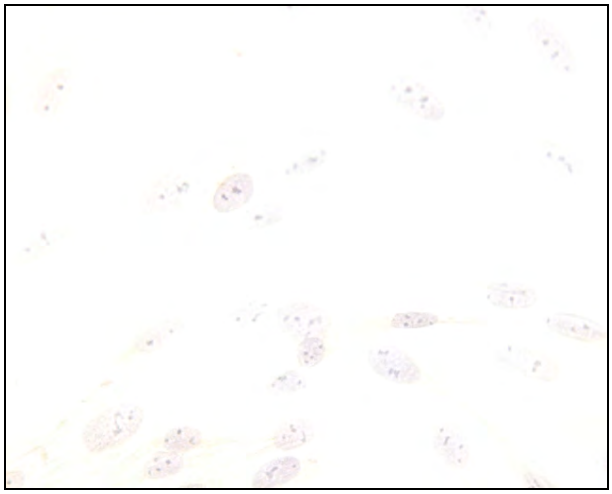

Abbildung 25: Kultur CH/DS; Kontrolle, keine unspezifischen Reaktionen nachweisbar.

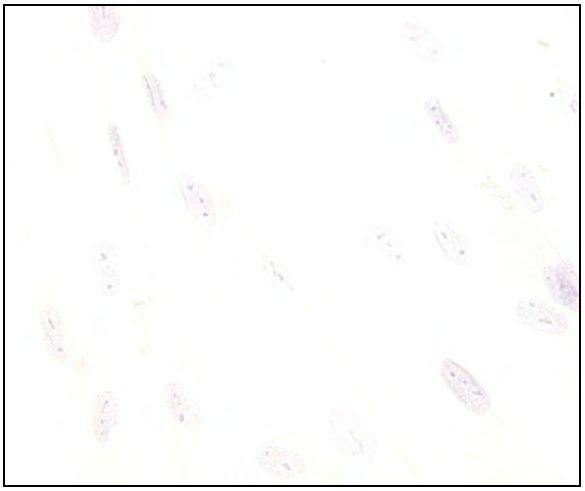

Abbildung 26: Kontrolle der Kultur CH/WS, ohne unspezifische Reaktionen.

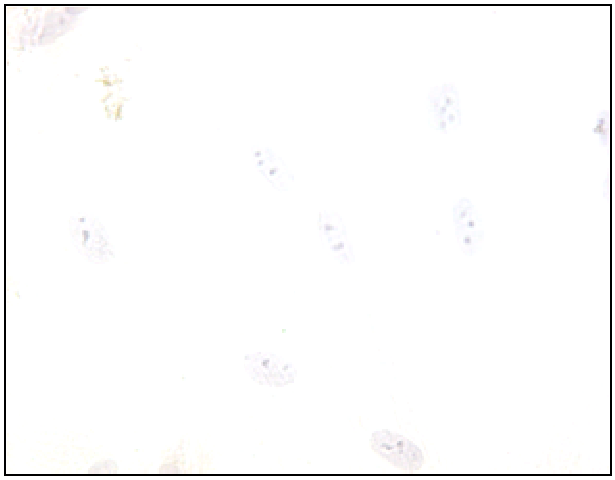

Abbildung 27: Keine Bindung des Sekundärantikörpers in den Kontrolluntersuchungen der Kultur CSC.

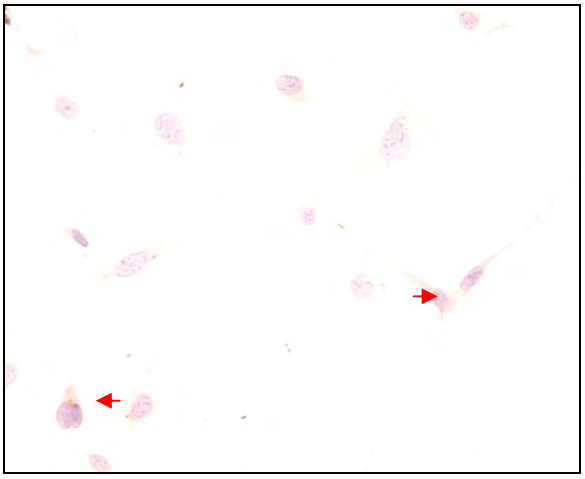

Abbildung 28: Einige schwach markierte Fibroblasten (Pfeile).

(Abbildungen 25 bis 28: Lichtmikroskop x400)

5.2.2 Immunzytochemische Markierung mit anti-CD31 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule, PECAM-1)

In allen drei untersuchten Zellkulturen wurde die Präsenz des endothelialen transmembran-Immunglobulins CD31 beobachtet (Abbildungen 29 bis 31). Die diffuse Verteilung des Antigens konnte sowohl an der gesamten Zytoplasmamembran der Zellen als auch intrazellulär nachgewiesen werden. Die höchste Konzentration des Antigens war regelmäßig in Zellkernnähe aufzufinden, wobei die Kernregion selbst keine Markierung aufwies. Die bei fast allen Zellen auftretenden Zellausläufer zeigten eine deutliche Markierung. Die aus einer gesunden Milz isolierten Zellen (CSC) reagierten annähernd 100% positiv. Im Gegensatz hierzu reagierten die Zellen aus den malignen Hämangioendotheliomen nur zu ca. 80% (CH/DS) und ca. 60% (CH/WS) immunopositiv (vgl. Punkt 5.2.5). Ein spezifisches Verteilungsmuster positiver Zellen konnte in keiner der Kulturen beobachtet werden.

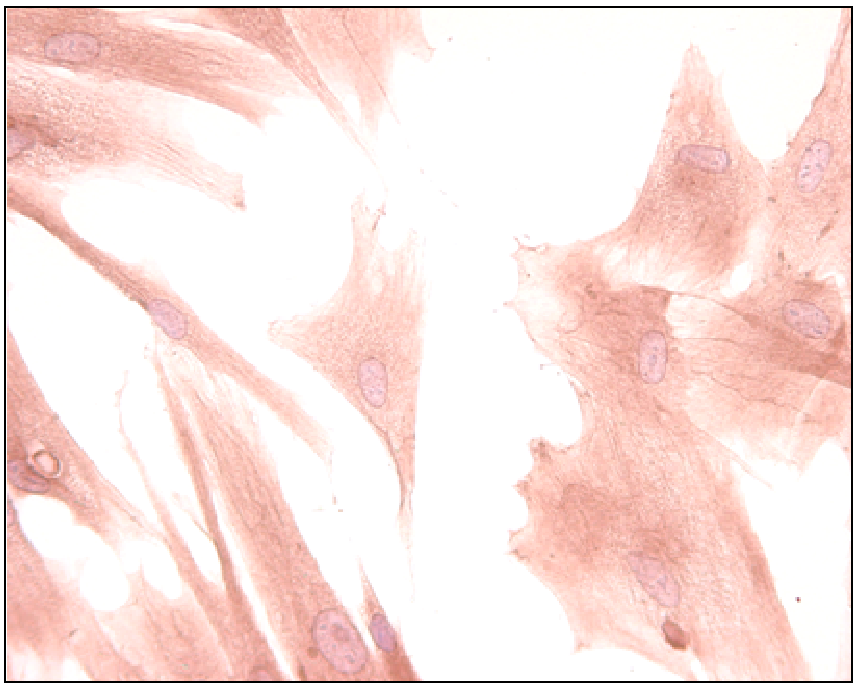

Abbildung 29: Annähernd alle Zellen der Kultur CSC reagieren mit anti-CD31 immunopositiv, Lichtmikroskop x400.

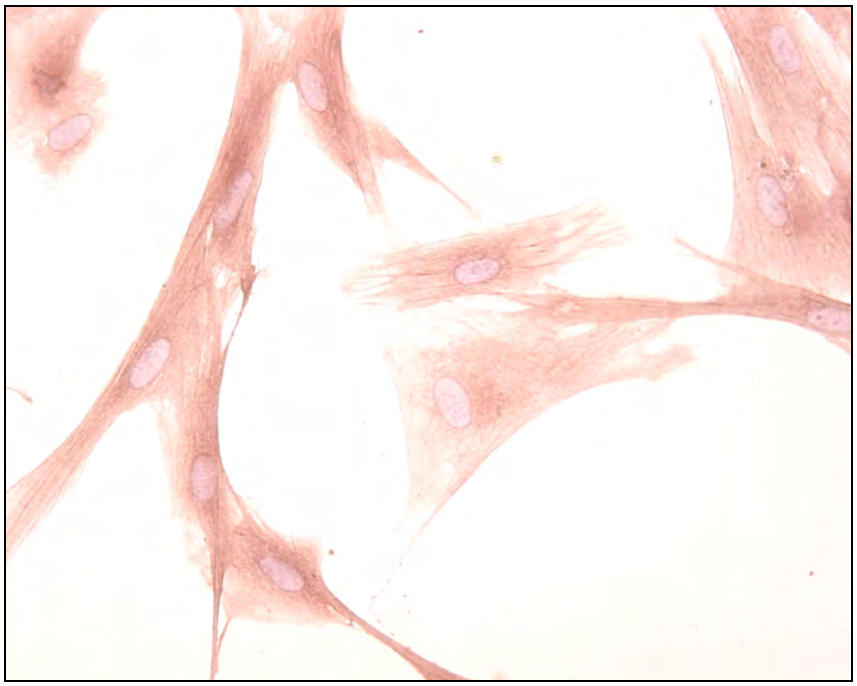

Abbildung 30: Zellen der Kultur CH/DS, in rund 80% der Zellen konnte CD31 nachgewiesen werden, Lichtmikroskop x400.

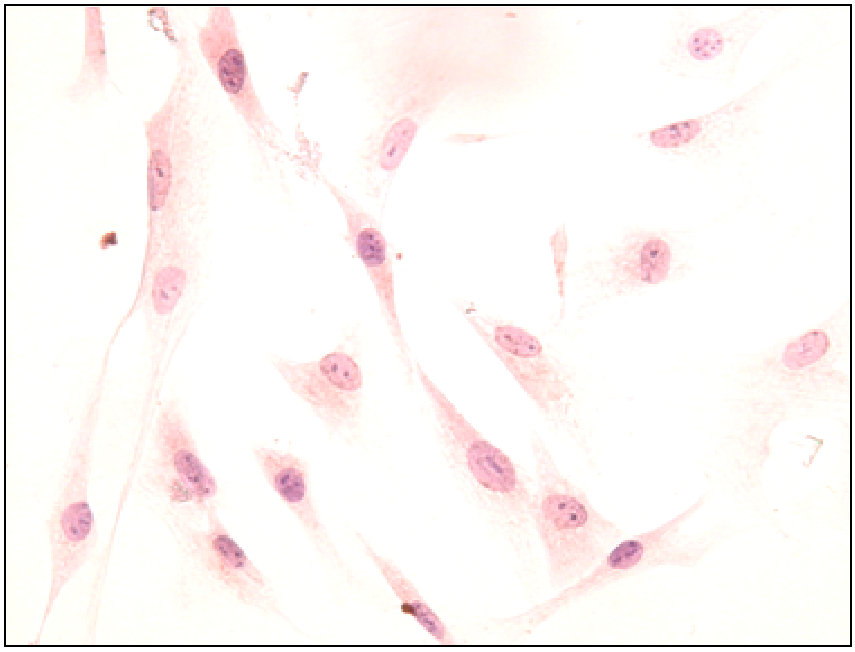

Abbildung 31: Kultur CH/WS, nur ca. 60% der Zellen aus Kultur CH/WS reagieren mit anti-CD31 schwach immunopositiv, Lichtmikroskop x400.

5.2.2.1 Kontrollen

Zum Ausschluss unspezifischer Ergebnisse wurden parallel zu den Testreihen Kontrollansätze durchgeführt. Hierfür wurde der Primärantikörper durch PBS-Puffer bzw. Serum ersetzt. Die Kulturen CH/DS und CH/WS zeigten keine unspezifischen Bindungen (Abbildungen 32 und 33). Die Kontrollen der Kultur CSC zeigten sehr geringe unspezifische Niederschläge des biotinylierten Sekundärantikörpers im Zytoplasma der Zellen (Abbildung 34). Eine deutliche Differenzierung zu den spezifischen Bindungen war gut möglich. Sehr geringfügige zytoplasmatische Reaktionen waren in den mit dem Primärantikörper inkubierten Fibroblasten zu finden (Abbildung 35). Diese wiesen aber in allen Verdünnungsstufen eine deutlich geringere Intensität im Vergleich mit den Versuchen der anderen Zellkulturen auf.

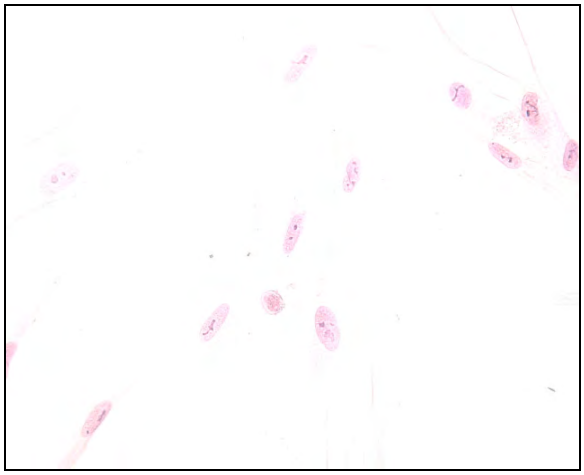

Abbildung 32: Kultur CH/DS, in den Kontrollen sind keine unspezifischen Reaktionen nachweisbar.

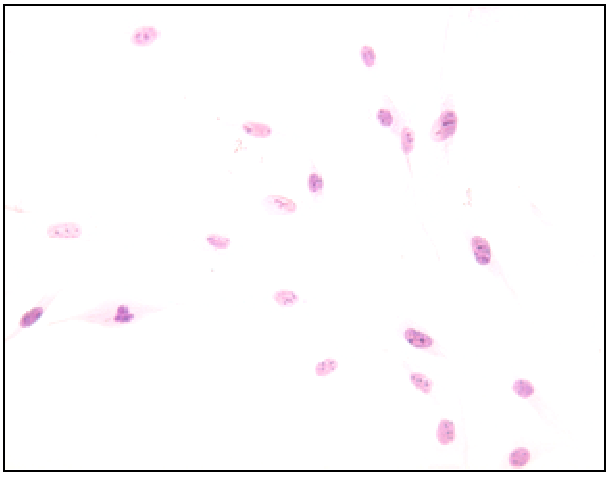

Abbildung 33: Serumkontrolle der Kultur CH/WS ohne unspezifische Bindungen.

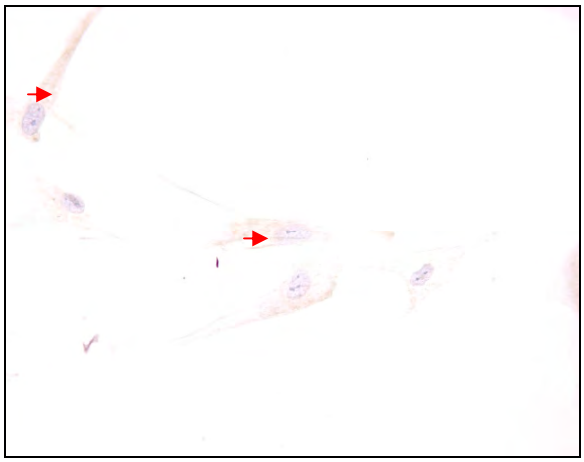

Abbildung 34: CSC; Serumkontrolle, geringfügige Niederschläge des biotinylierten Sekundärantikörpers (Pfeile).

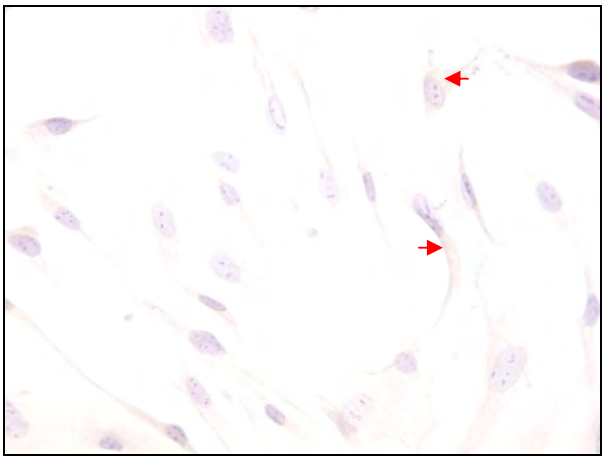

Abbildung 35: Fibroblasten; geringfügige zytoplasmatische Reaktionen (Pfeile).

(Abbildungen 32 bis 35: Lichtmikroskop x400)

5.2.3 Immunzytochemische Markierung mit anti-Tie-2 (H-176)

Untersucht wurde die Bindung des polyklonalen Antikörpers anti-Tie-2 (H176). Der Transmembran-Tyrosin-Kinase-Rezeptor Tie-2 wird auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert. Die Bindung des Antigens konnte in allen untersuchten Kulturen nachgewiesen werden. Nahezu alle Zellen banden an ihrer Oberfläche den Antikörper, wobei die Markierung diffus verteilt war (vgl. Punkt 5.2.5). In Kernnähe war meist eine deutlichere Färbung zu beobachten. Die bei den Zellen aus malignen Hämangioendotheliomen (Kultur CH/DS und CH/WS) meist deutlich längeren Zellausläufer waren stets intensiv gefärbt (Abbildungen 37 und 38). Die kürzeren und häufig breiten Zellausläufer der Zellen aus Kultur CSC zeigten eine schwächere Anfärbung (Abbildung 36).

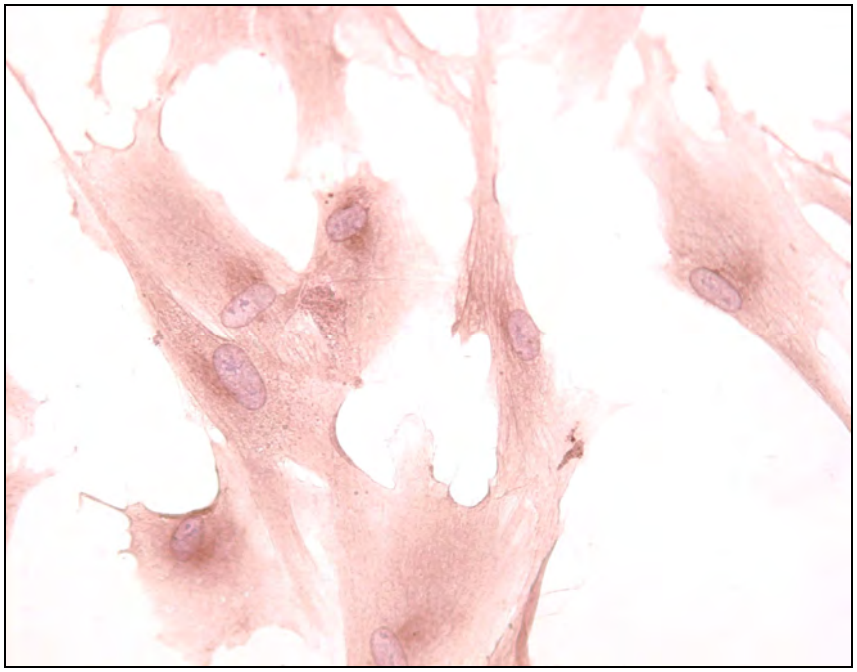

Abbildung 36: Kultur CSC, intensive Markierung in Kernnähe und eine schwächere Anfärbung flacher Zellausläufer, anti-Tie-2, Lichtmikroskop x400.

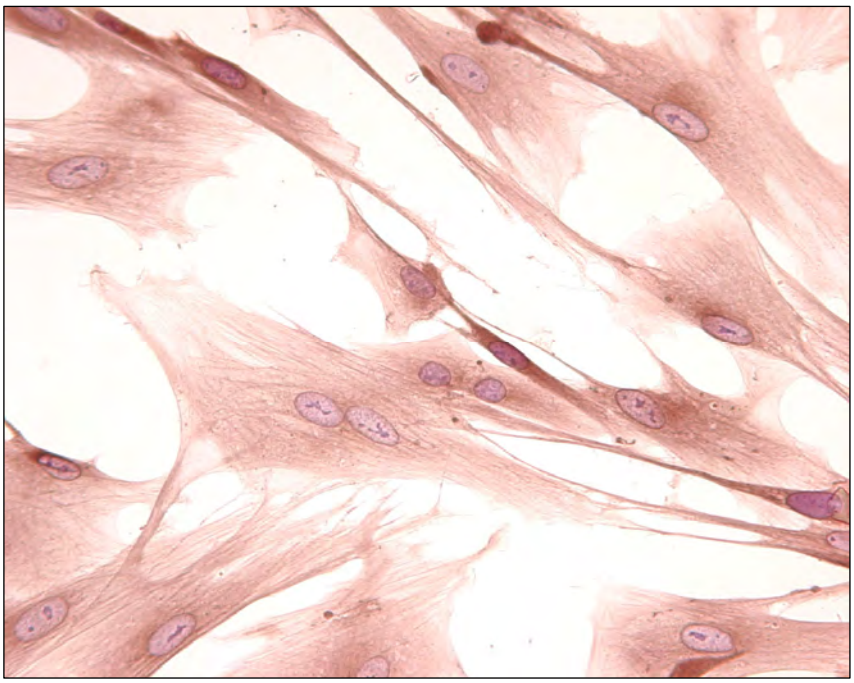

Abbildung 37: Intensive Markierung nahezu aller Zellen der Kultur CH/DS, anti-Tie-2, Lichtmikroskop x400.

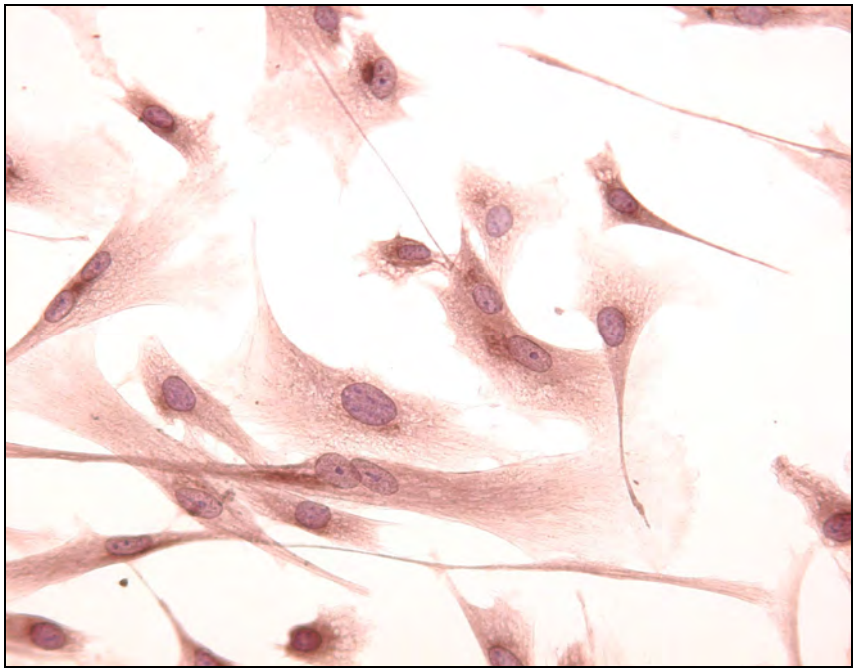

Abbildung 38: Kultur CH/WS, die Zellen insbesondere in Kernnähe und die langen Zellausläufer sind intensiv markiert, anti-Tie-2, Lichtmikroskop x400.

5.2.3.1 Kontrollen

Parallel zu den Testreihen wurden wiederholt Kontrollansätze durchgeführt. Der Primärantikörper wurde hierfür durch PBS-Puffer bzw. Serum ersetzt. Bei den Zellen der Kulturen CSC, CH/DS und CH/WS konnten keine unspezifischen Bindungen nachgewiesen werden (Abbildungen 39 bis 41).

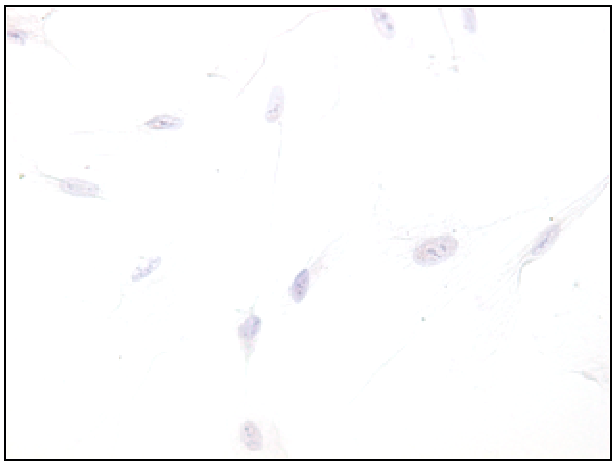

Abbildung 39: Kultur CH/DS

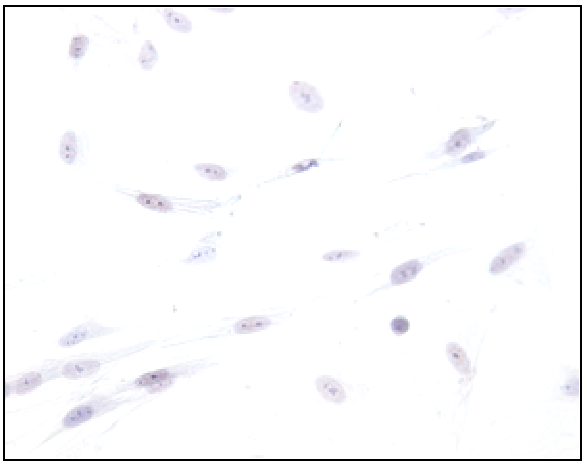

Abbildung 40: Kultur CH/WS

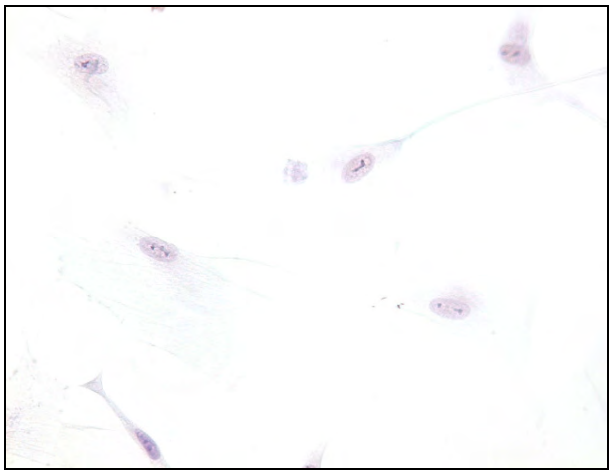

Abbildung 41: Kultur CSC

Abbildungen 39 bis 41: Bei den Kontroll-untersuchungen der drei Zellkulturen wurden keine unspezifischen Bindungen nachgewiesen, Lichtmikroskop x400.

5.2.4 Immunzytochemische Markierung mit anti-CD51/61 (Integrin $\alpha_v\beta_3$, Vitronectin-Rezeptor)

Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ (CD51/61) wird von Endothelzellen und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert sowie als Tumormarker diskutiert. Eine deutliche Bindung des Antikörpers gegen CD 51/61 war auf nahezu allen Zellen aus malignen Hämangioendotheliomen (Kultur CH/DS und CH/WS) zu beobachten. Die Markierung war diffus über die gesamte Zelloberfläche verteilt (Abbildung 43 und 44). Einige Zellen wiesen eine stärkere Markierung in Zellkernnähe auf, ein spezifisches Verteilungsmuster intensiv gefärbter Zellen war jedoch nicht zu erkennen. Im Gegensatz hierzu war nur eine schwache Markierung von ca. 50% der Zellen aus der Kultur CSC zu beobachten (Abbildung 42). Eine detaillierte Übersicht der Ergebnisse aus den immunzytochemischen Untersuchungen ist unter Punkt 5.2.5 aufgelistet.

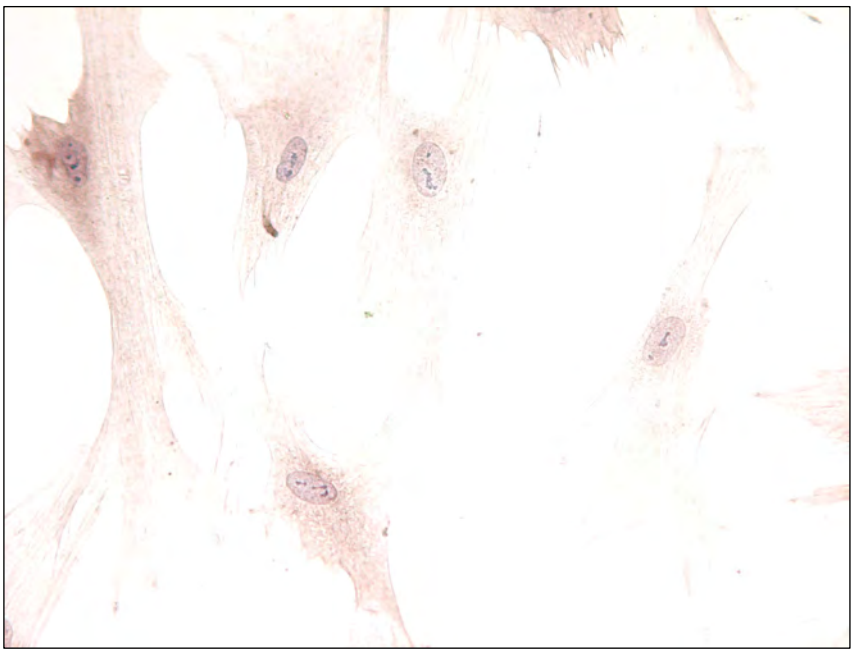

Abbildung 42: Schwache Markierung mit anti-CD51/61 bei ca. 50% der Zellen aus Kultur CSC Lichtmikroskop x400.

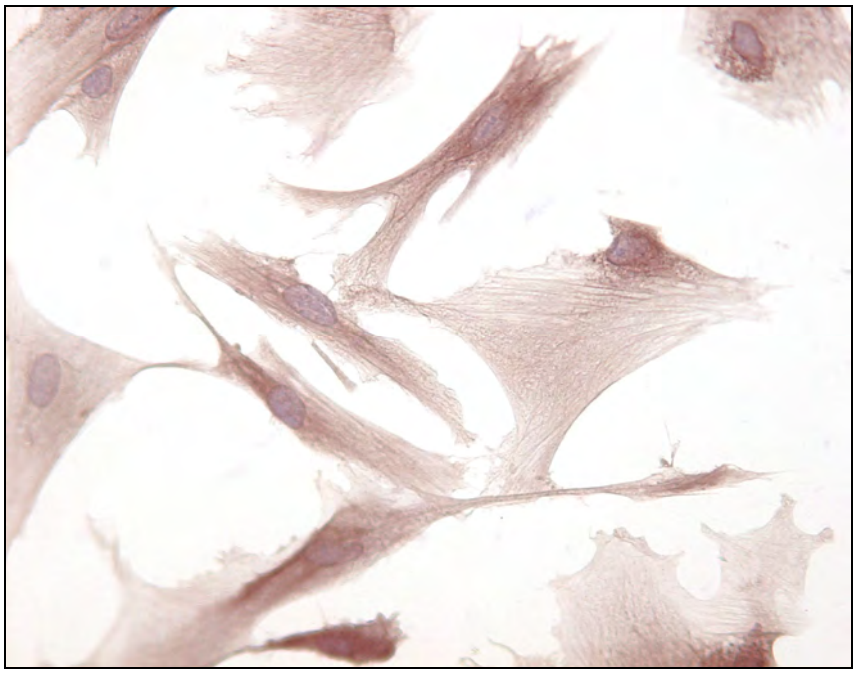

Abbildung 43: Intensive Färbung fast aller Zellen aus einem malignen Hämangioendotheliom (Kultur CH/DS), anti-CD51/61, Lichtmikroskop x400.

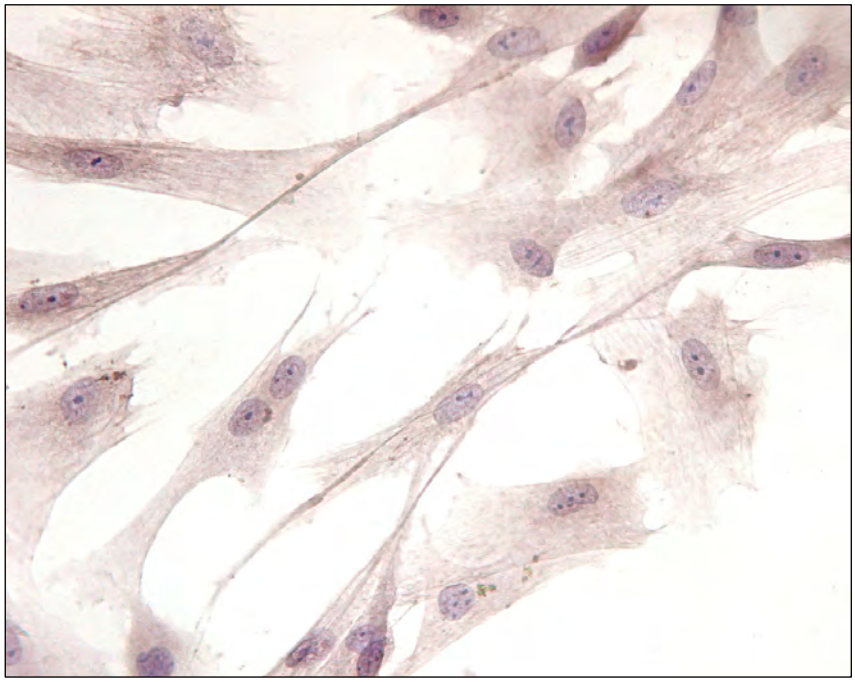

Abbildung 44: Die Zellen der Kultur CH/WS reagieren immunopositiv, anti-CD51/61, Lichtmikroskop x400.

5.2.4.1 Kontrollen

Parallel zu allen Versuchen wurden regelmäßig Kontrollansätze zum Ausschluss unspezifischer Bindungen durchgeführt. An Stelle des Primärantikörpers wurden hierfür PBS-Puffer bzw. Serum benutzt. Bei allen untersuchten Kulturen wurden keine unspezifischen Bindungen nachgewiesen (Abbildungen 45 bis 47).

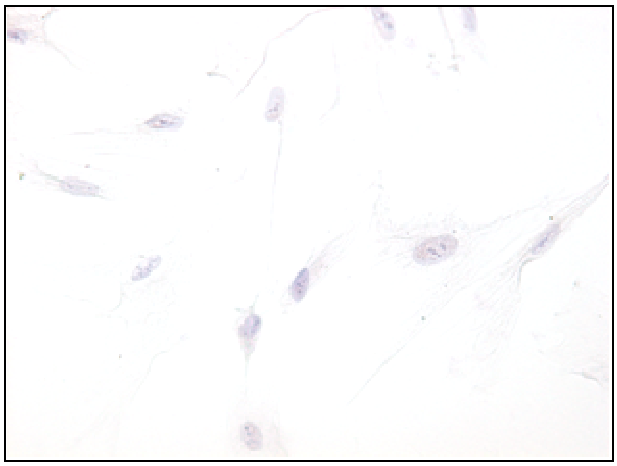

Abbildung 45: Kultur CH/DS

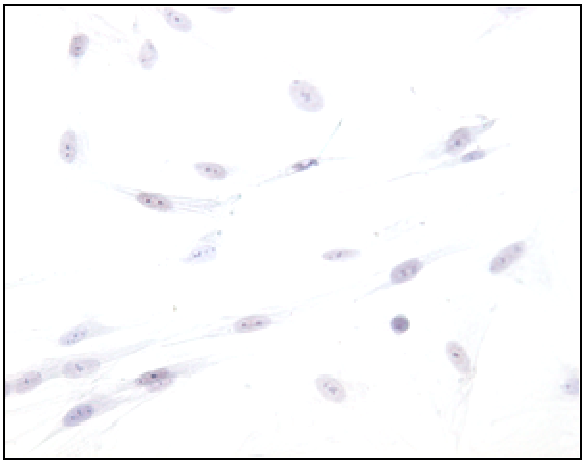

Abbildung 46: Kultur CH/WS

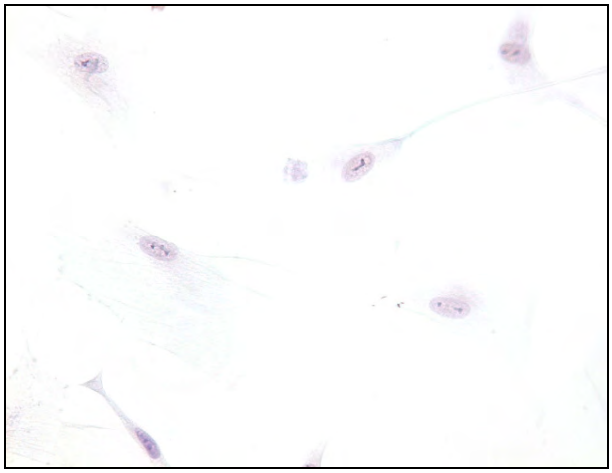

Abbildung 47: Kultur CSC

Abbildungen 45 bis 47: Bei den Kontroll-untersuchungen der drei Zellkulturen traten keine unspezifischen Bindungen auf, Lichtmikroskop x400.

5.2.5 Tabellarische Übersicht der immunzytochemischen Untersuchungen

Für die Erfassung immunpositiver Zellen wurden aus jeder Versuchsreihe zwei Vertiefungen zufällig ausgewählt. Die immunpositiven und immunnegativen Zellen in jeweils 10 Gesichtsfeldern wurden dokumentiert und der Mittelwert mit den wiederholten Untersuchungen gebildet.

Tabelle 6: Vergleichende Übersicht über den prozentualen Anteil immunopositiver Zellen in den untersuchten Kulturen.

	Zellen aus einer gesunden Milz	Zellen aus malignen Hämangioendotheliomen		Kontrollen
	CSC	**CH/DS**	**CH/WS**	**Fibroblasten**
vWF	98%	62%	28%	0%
CD 31	100%	78%	64%	0%
Tie-2	85%	90%	92%	nicht getestet
CD 51/61	48%	95%	97%	nicht getestet

5.3 Lektinzytochemische Untersuchungen

Zusätzlich zur immunzytochemischen Identifizierung der Zellen mit Endothelzellmarkern, wurden diese mittels Lektinen charakterisiert. Untersucht wurde die Bindung der FITC konjugierten Lektine Dolichos biflorus Agglutinin (DBA), Ulex europaeus Agglutinin (UEA I), Concanavalin A (ConA) und Wheat Germ Agglutinin (WGA) an ihre spezifischen Kohlenhydratstrukturen (Tabelle 7). Die Beurteilung erfolgte am Fluoreszenzlichtmikroskop (Diaplan, Leitz, Wetzlar) und wurde mittels Digitalkamera (DXM 1200, Nikon, Düsseldorf) dokumentiert.

Tabelle 7: Verwendete Lektine, ihr Vorkommen und ihre Affinität.

Lektin	Vorkommen	Affinität
Ulex europaeus Agglutinin **(UEA I)**	Samen des Ulex europaeus (Stechginster)	L-Fruktose
Concanavalin A **(Con A)**	Jackbohne (Canavalia ensiformis)	α-D-Glucose
Dolichos biflorus Agglutinin **(DBA)**	Samen der Dolichos biflorus (Zwillingsblume)	N-Acetylgalactosamin
Wheat Germ Agglutinin **(WGA)**	Triticum vulgare (Weizen)	N-Acetyl-beta-(1,4)-D-Glucosamin

5.3.1 Bindung des Dolichos biflorus Agglutinin (DBA)

Nach Inkubation mit dem FITC konjugierten Lektin Dolichos biflorus Agglutinin (DBA) konnte bei den Zellen aus malignen Hämangioendotheliomen (CH/DS und CH/WS) eine über die gesamte Zelloberfläche verteilte feingranuläre Fluoreszenz beobachtet werden. Regelmäßig war diese in Kernnähe deutlich intensiver (Abbildung 48).

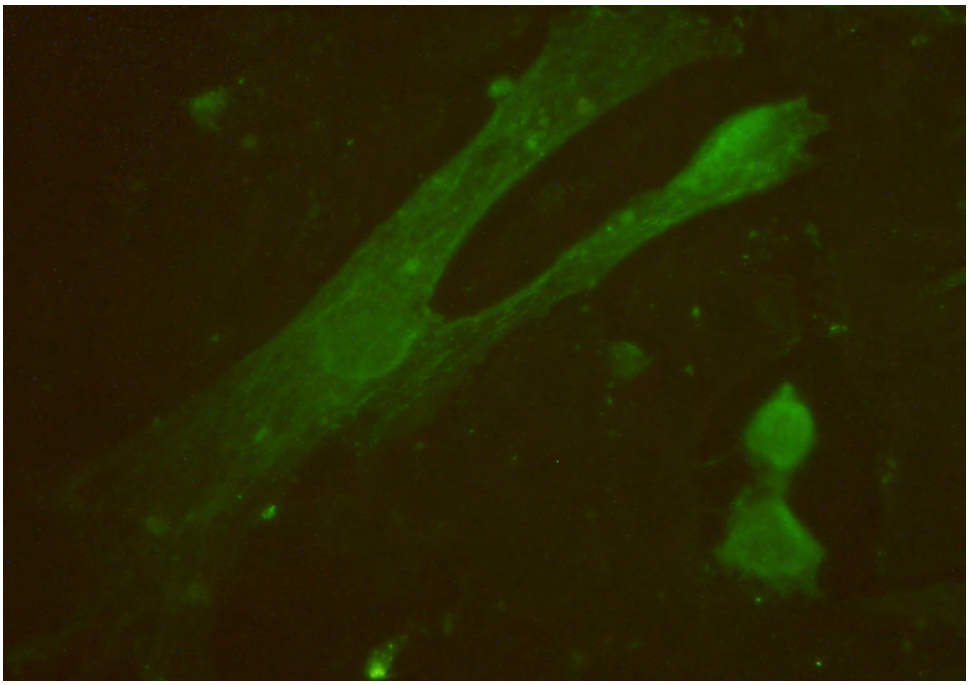

Abbildung 48: Kultur CH/DS, Nachweis von FITC- konjugiertem DBA. Die Zellen aus einem malignen Hämangioendotheliom zeigten eine feingranuläre Fluoreszenz auf der gesamten Zelloberfläche, Fluoreszenzmikroskop x400.

Die Zellen aus einer gesunden Milz (Kultur CSC) zeigten eine granuläre Fluoreszenz, die in Kernnähe meist deutlich dichter war, wobei die Kernregion kaum Fluoreszenz aufwies (Abbildung 49).

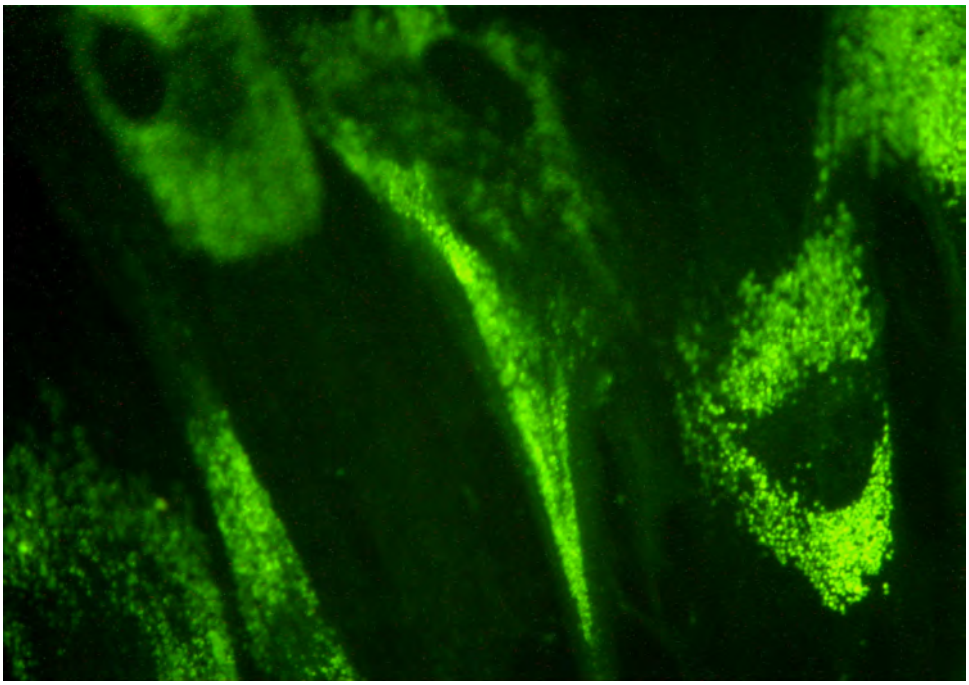

Abbildung 49: Kultur CSC, DBA, FITC- konjugiert. Die Zellen aus der gesunden caninen Milz zeigten eine intensive granuläre Fluoreszenz insbesondere in Kernnähe, Fluoreszenzmikroskop x400.

5.3.2 Bindung des Ulex europaeus Agglutinin (UEA I)

Die Zellen der Kulturen CH/DS und CH/WS zeigten nach Inkubation mit FITC konjugiertem UEA I eine granuläre Fluoreszenz mit hoher Intensität in Kernnähe. Die Intensität der Fluoreszenz war in der Kernregion selbst regelmäßig deutlich geringer (Abbildung 50).

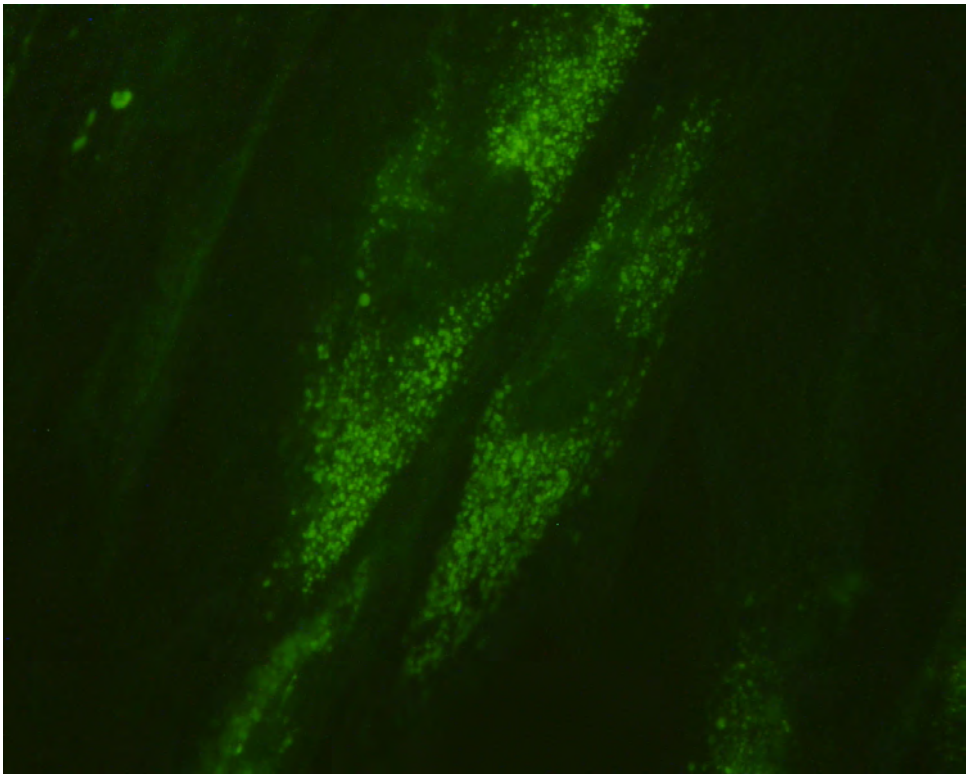

Abbildung 50: Nachweis von FITC- konjugiertem UEA-I, Zellen der Kultur CH/WS (malignes Hämangioendotheliom) mit intensiver granulärer Fluoreszenz in Kernnähe und geringer Fluoreszenz in der direkten Kernregion, Fluoreszenzmikroskop x400.

Die Zellen aus der Kultur CSC (gesunde Milz) zeigten eine in Kernnähe intensive granuläre Fluoreszenz, wobei die Kernregion selbst kaum Fluoreszenz aufwies (Abbildung 51).

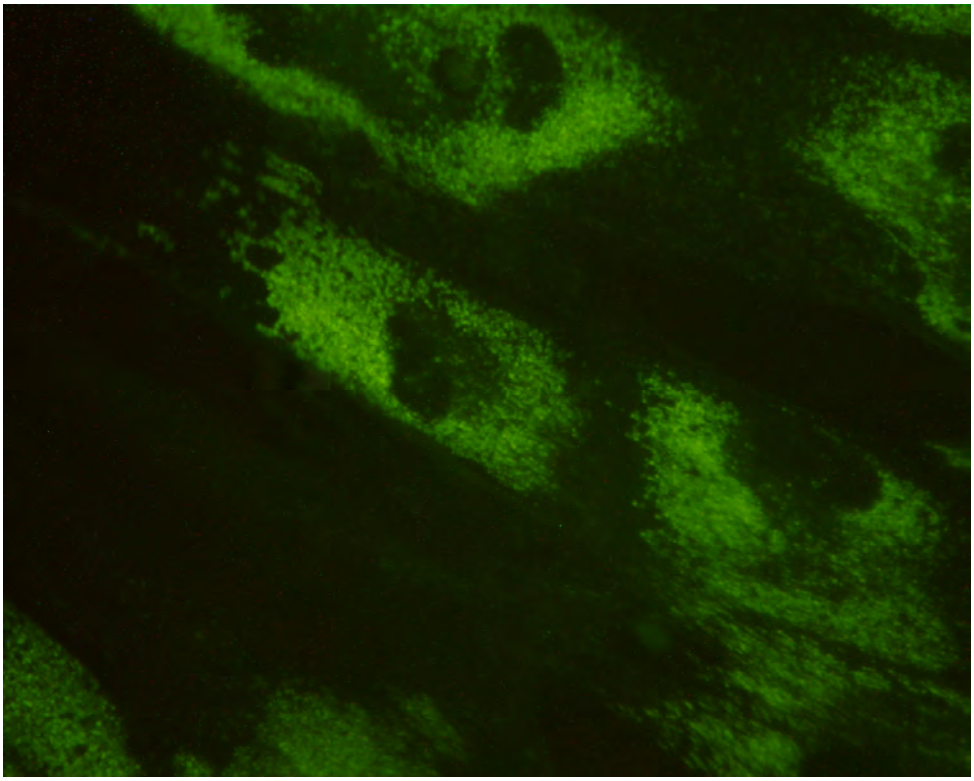

Abbildung 51: UEA-I, Zellen aus der Kultur CSC mit intensiver granulärer Fluoreszenz, Fluoreszenzmikroskop x400.

5.3.3 Bindung des Concanavalin A (Con A)

Zellen des malignen Hämangioendothelioms (CH/DS und CH/WS), die mit dem FITC konjugierten Lektin ConA inkubiert wurden, zeigten eine feingranuläre Fluoreszenz. Eine intensive Fluoreszenz war regelmäßig in Kernnähe und in den langen Zellausläufern zu beobachten, die Kernregion wies kaum Fluoreszenz auf (Abbildung 52).

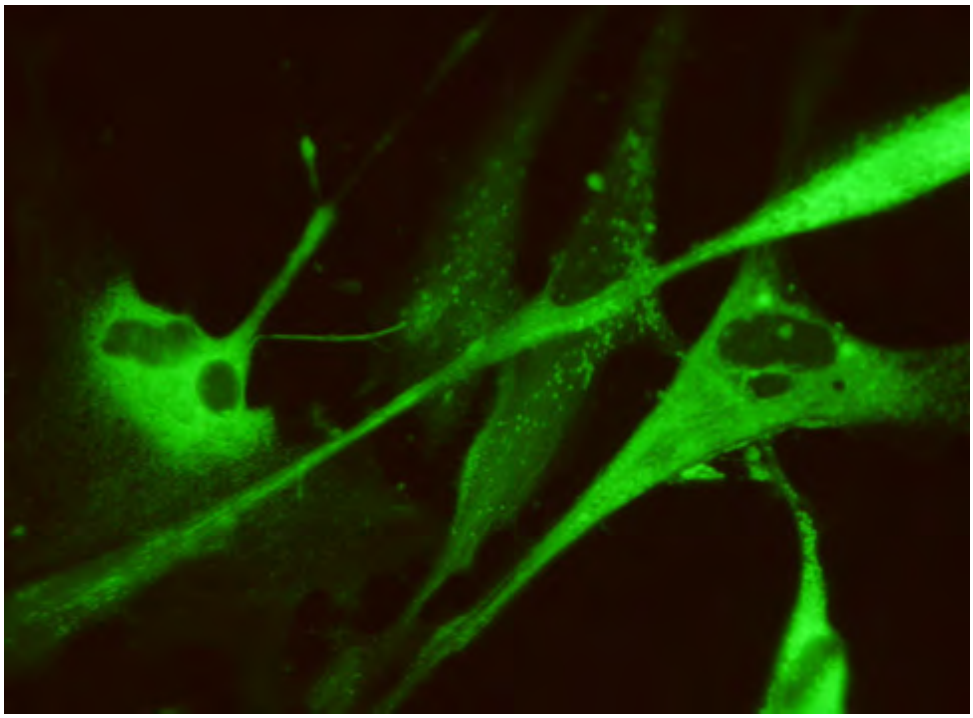

Abbildung 52: Intensive, meist feingranuläre Fluoreszenz bei Zellen der Kultur CH/DS nach Inkubation mit Con A, Fluoreszenzmikroskop x400.

Die Zellen aus einer gesunden Milz (CSC) zeigten eine feingranuläre Fluoreszenz, die meist in Kernnähe intensiver war, wobei die Kernregion kaum Fluoreszenz zeigte. Lange Zellausläufer wiesen eine granuläre intensive Fluoreszenz auf (Abbildung 53).

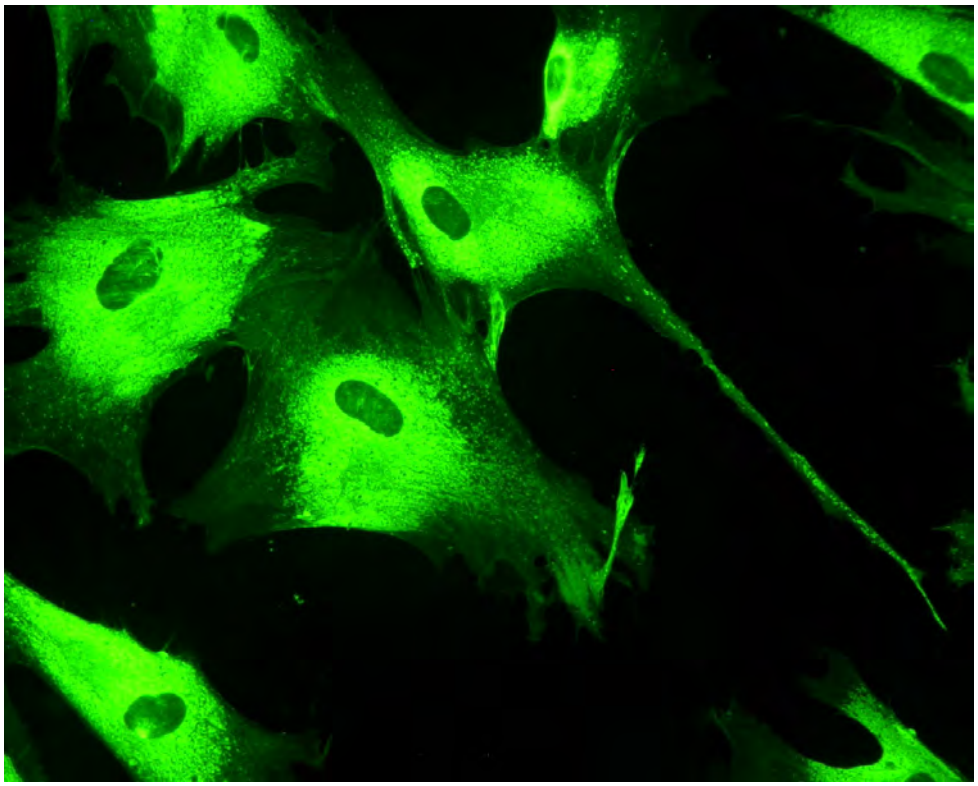

Abbildung 53: Zellen der Kultur CSC mit intensiver Fluoreszenz, nach Inkubation mit Con A, Fluoreszenzmikroskop x400.

Zum Ausschluß unspezifischer Bindungen wurden canine Fibroblasten wurden mit dem FITC konjugiertem Lektin Con A inkubiert. Es konnten keine spezifischen Bindungen nachgewiesen werden (Abbildung 54).

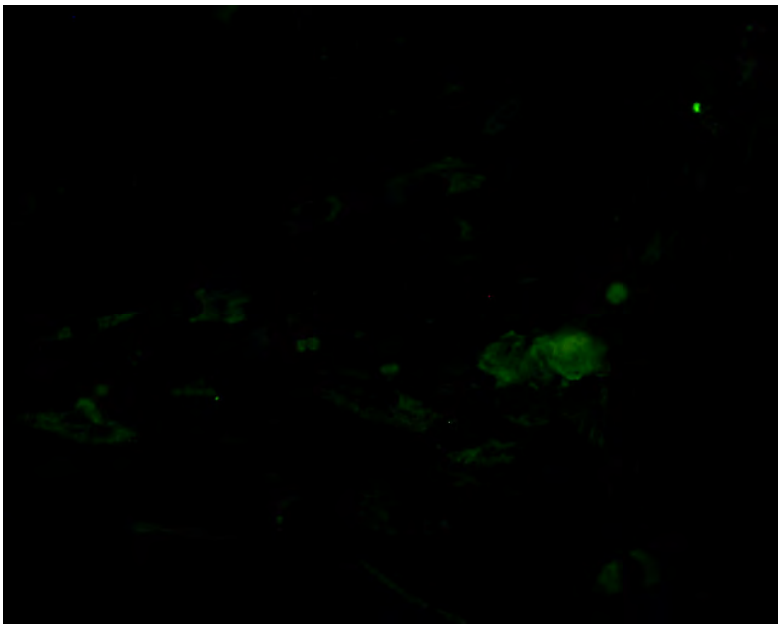

Abbildung 54: Canine Fibroblasten nach Inkubation mit FITC konjugiertem Con A. Keine spezifischen Bindungen nachweisbar, Fluoreszenzmikroskop x400.

5.3.4 Bindung des Wheat Germ Agglutinin (WGA)

Die Zellen der Kulturen CH/DS und CH/WS zeigten nach Inkubation mit dem FITC-konjugierten Wheat Germ Agglutinin eine intensive granuläre Fluoreszenz. In der Kernregion und den Zellausläufern war die Intensität der Fluoreszenz deutlich geringer (Abbildung 55).

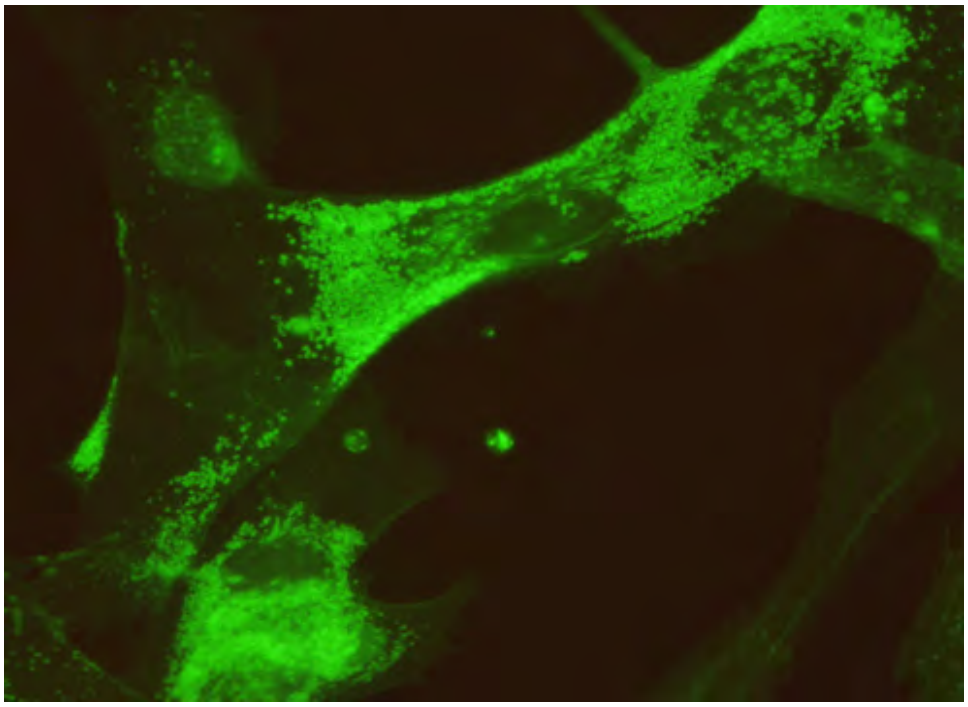

Abbildung 55: WGA, granuläre Fluoreszenz der Zellen aus Kultur CH/DS, Fluoreszenzmikroskop x400.

Nach Inkubation der Zellen aus Kultur CSC mit dem FITC konjugierten Lektin zeigte sich eine intensive granuläre Fluoreszenz. Diese war über die gesamte Zelle verteilt und regelmäßig auch in den Zellausläufern von hoher Intensität (Abbildung 56).

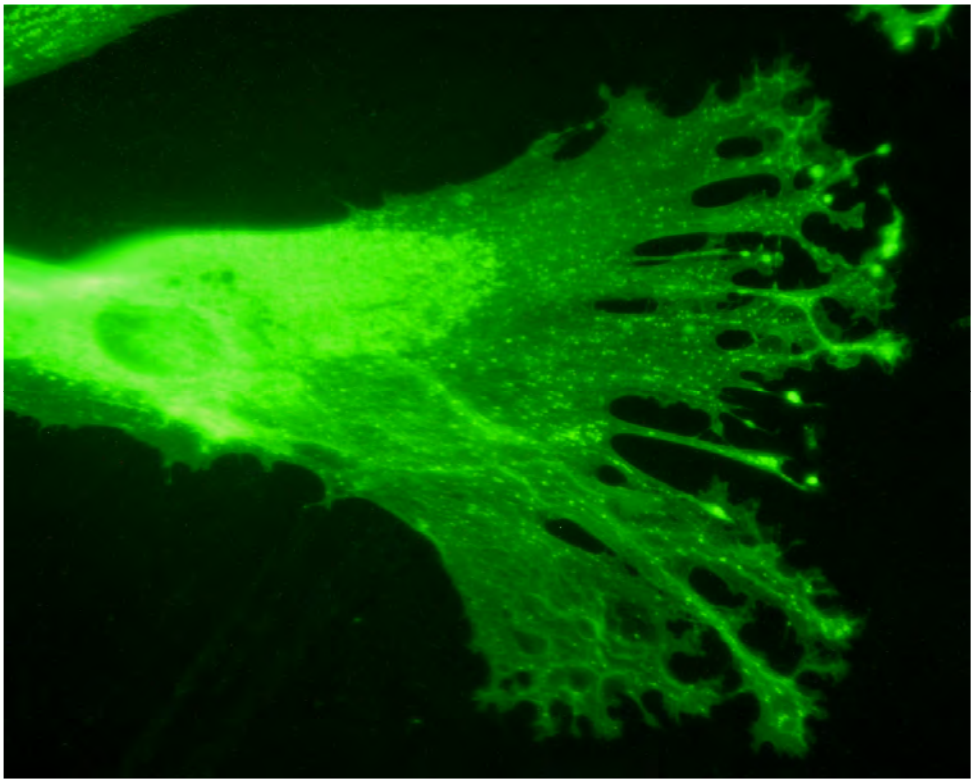

Abbildung 56: WGA, die Zellen der Kultur CSC (gesunde Milz) zeigten bis in die verzweigten Zellausläufer eine intensive Fluoreszenz, Fluoreszenzmikroskop x400.

5.4 Elektronenmikroskopie

Zur ultrastrukturellen Analyse der Zellen aus malignen Hämangioendotheliomen (Kultur CH/SH und CH/WS) wurden transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen in P_0- Selektivmedium für 14 und 28 Tage auf gelatinierten Glasplättchen oder in 6-well Kulturschalen inkubiert. Zuerst wurden Semidünnschnitte zur lichtmikroskopischen Untersuchung der *in vitro* gebildeten zellulären Cluster und tubulären Strukturen angefertigt. Die Semidünnschnitte dienten der Auswahl bestimmter Regionen für die Anfertigung der Ultradünnschnitte und konnten später zur Orientierung in den elektronenmikroskopischen Präparaten herangezogen werden.

Somit waren die Semidünnschnitte Grundlage für die Anfertigung und Auswertung der Ultradünnschnitte zur Transmissionselektronenmikroskopie. Abbildungen und Ergebnisse von den Untersuchungen an Semidünnschnitten werden daher mit den Ergebnissen der elektronenmikroskopischen Untersuchungen gemeinsam in diesem Kapitel beschrieben.

5.4.1 Semidünnschnitte

Die untersuchten Zellen aus malignen Hämangioendotheliomen (Kultur CH/SH und CH/WS) bildeten *in vitro* regelmäßig zelluläre Cluster und tubuläre Strukturen aus. Diese standen im Fokus der ultrastrukturellen Untersuchungen.

Der Durchmesser der Cluster betrug 150 µm bis 500 µm. Diese zeigten einen immer wieder zu beobachtenden Grundaufbau aus einer äußeren ein- bis maximal dreilagigen Schicht von Zellen die eine Kugel aus Zelldetritus und fibrillärem Material umgaben.
Lagen zwei derartige Cluster dicht beieinander, kam es zur Verschmelzung der äußeren Schichten. Die ursprünglichen Zellen dieser Bereiche waren lichtmikroskopisch in den Berührungsflächen der Cluster nicht mehr nachweisbar. Auch dieser Bereich war nun vollständig mit Zelldetritus und fibrillärem Material ausgefüllt (Abb. 57).

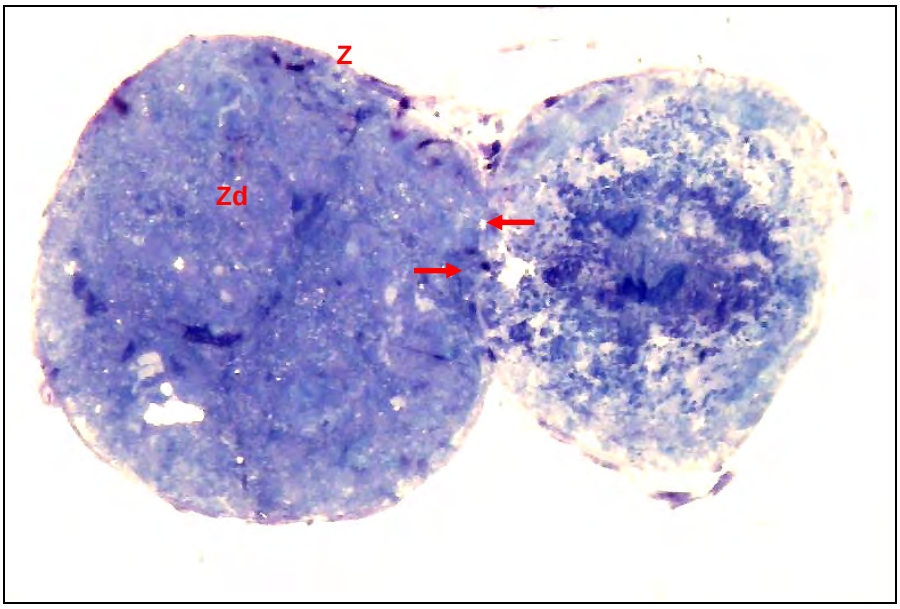

Abbildung 57: Zwei zelluläre Cluster aus der Kultur CH/WS. Bereits lichtmikroskopisch erkennbar sind der Grundaufbau und das Fehlen vitaler Zellen im Verschmelzungsgebiet (Pfeile) Z: Zellen; Zd: Zelldetritus und fibrilläres Material, Semidünnschnitt, Methylenblaufärbung, Lichtmikroskopie x50.

Im Laufe der Kultivierung bildeten sich tubuläre Strukturen aus, die meist von zellulären Clustern ausgingen. Zu Beginn bildeten sich Brücken zwischen einzelnen Clustern, bis es zur Ausbildung komplexer Netze kam (siehe 5.1.2). Ähnlich wie bei den Clustern war auch bei den Zellsträngen ein einheitlicher Grundaufbau zu beobachten:
Langgestreckte Zellen reihten sich ein- bis dreischichtig aneinander und bildeten Stränge mit einem Durchmesser von 50-150 µm. Innerhalb dieser tubulären Gebilde befand sich ein Raum, der mit fibrillärem Material und Zelldetritus gefüllt war (Abbildung 58).

Abbildung 58: Zelluläre Cluster (C), aus Kultur CH/SH, verbunden durch eine tubuläre Struktur (Pfeil), Semidünnschnitt, Methylenblaufärbung, Lichtmikroskopie x50.

5.4.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Der lichtmikroskopisch beobachtete Grundaufbau der zellulären Cluster sowie der soliden Stränge aus caninen Zellen konnte auch in den transmissions-elektronenmikroskopischen Untersuchungen gezeigt werden. Zur Orientierung in den Präparaten wird im Folgenden die dem Medium zugewandte Seite als Außenseite bezeichnet. Die dem fibrillären Material und Zelldetritus anliegende Seite der Zellen wird entsprechend als Innenseite bezeichnet (Abbildungen 59 bis 61).

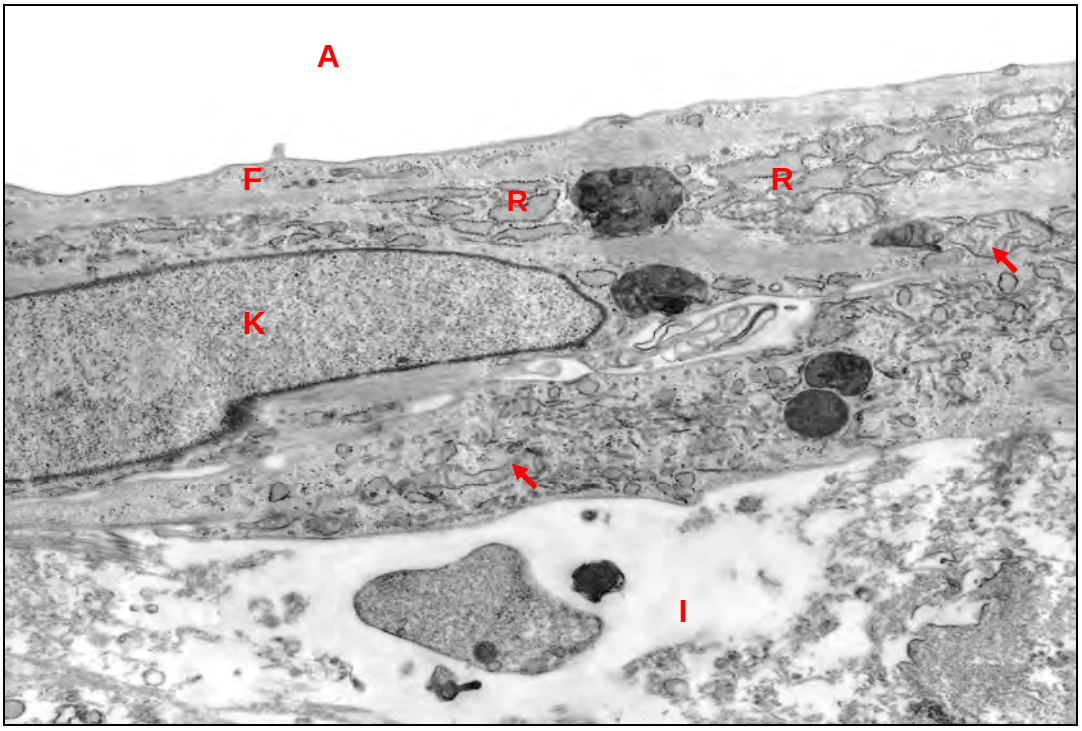

Abbildung 59: Die angiogenen Strukturen der Kultur CH/SH sind ein bis dreischichtig von vitalen Zellen umgeben, im Inneren sind abgestorbene Zellen und Zelldetritus zu finden (A: Außenseite; I: Innenseite). Ein länglicher Zellkern (K) Mitochondrien (Pfeile), raues endoplasmatisches Retikulum (R) und intrazelluläres fibrilläres Material (F), TEM x7500.

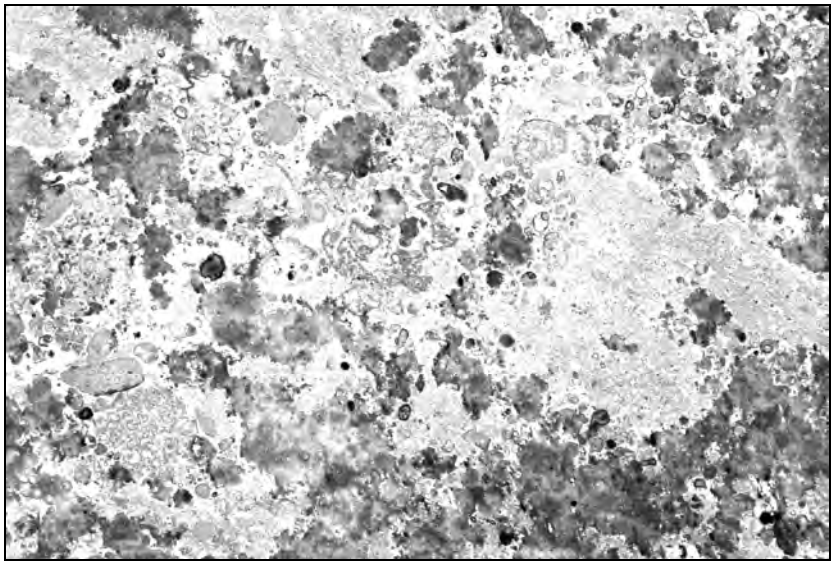

Abbildung 60: Zelldetritus im Inneren eines zellulären Clusters aus Kultur CH/SH, TEM x5000.

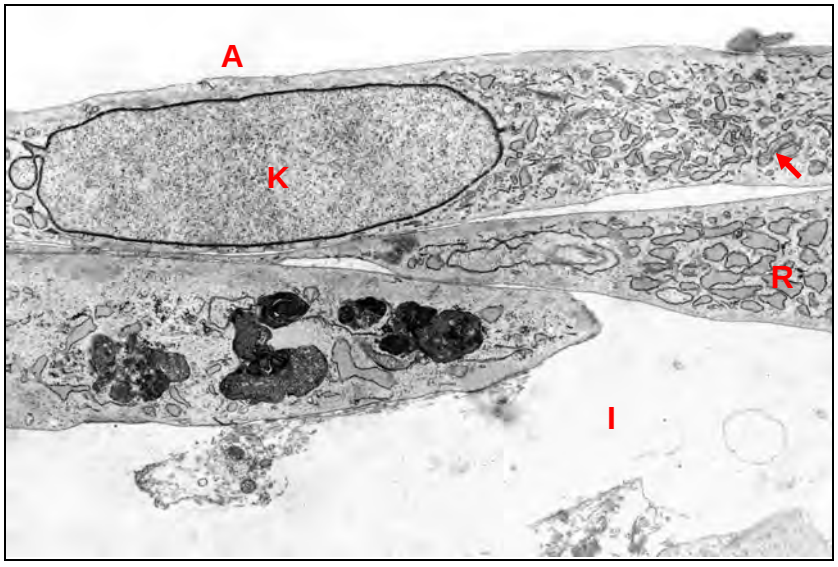

Abbildung 61: Vitale Zellen am Rand eines zellulären Clusters. Raues endoplasmatisches Retikulum (R) und Mitochondrien vom Crista Typ (Pfeil), (A: Außenseite; I: Innenseite, K: Zellkern) TEM x5000.

Die Form der Zellkerne der beiden Kulturen CH/SH und CH/WS differierte von oval bis länglich. Das bereits in den lichtmikroskopischen Untersuchungen vereinzelte Vorkommen von zwei Zellkernen in den *in vitro* kultivierten Zellen, konnte auch in den transmissions-elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigt werden.

Regelmäßig konnten in den Kulturen aus malignen Hämangioentotheliomen längliche, stark gegliederte Kerne beobachtet werden (Abbildung 62 und 63).

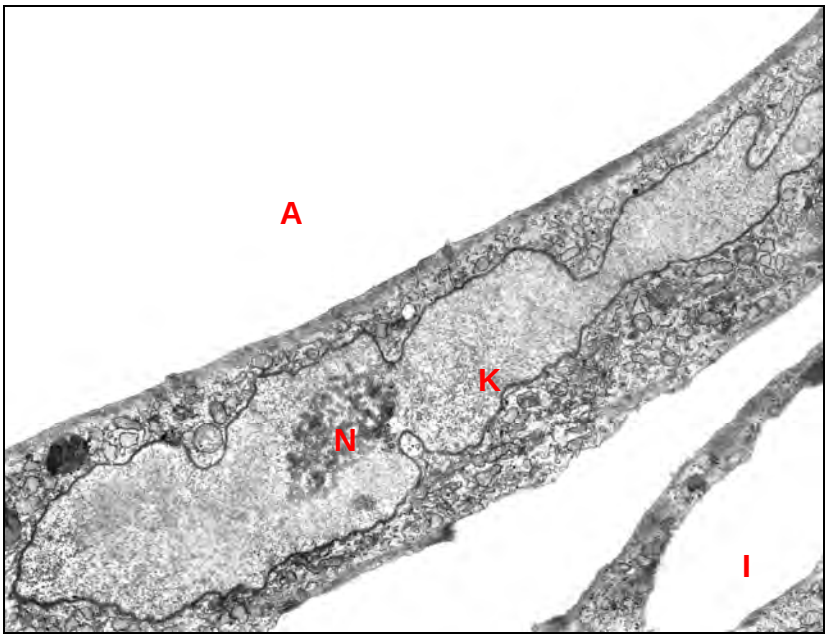

Abbildung 62: Deutlich erkennbar die starke Gliederung des Zellkernes (K) von Zellen der Kultur CH/SH (A: Außenseite; I: Innenseite; N: Nukleolus) TEM x 7500.

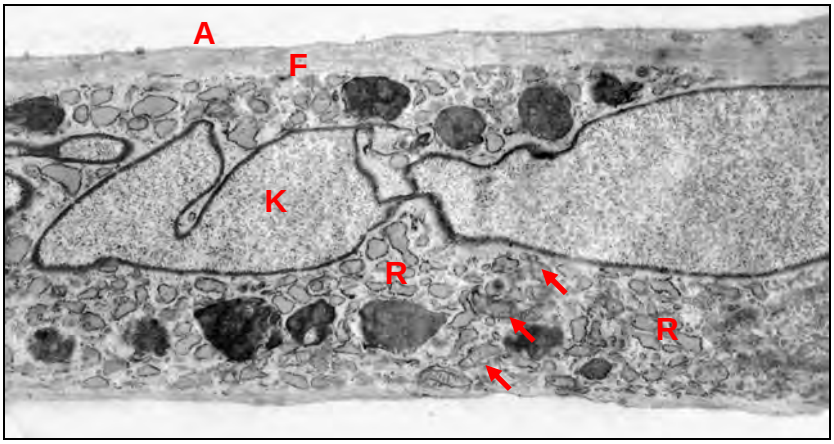

Abbildung 63: Kultur CH/SH, ein stark gegliederter Zellkern (K), Mitochondrien (Pfeile), raues endoplasmatisches Retikulum (R) und fibrilläres Material (F), TEM x7500.

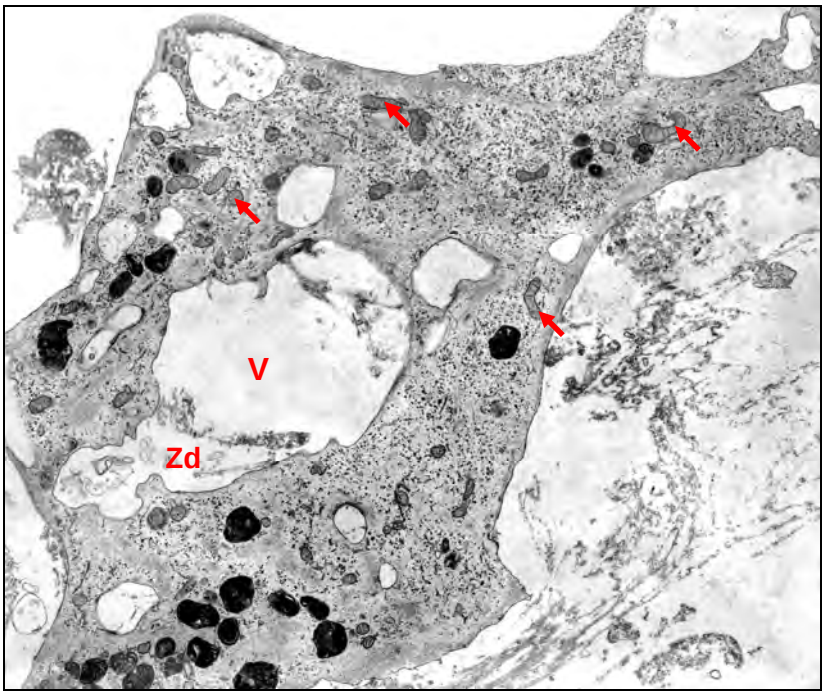

Abbildung 64: Eine Zelle aus Kultur CH/WS mit einer großen intrazellulären Vakuole (V) gefüllt mit Zelldetritus (Zd), zahlreiche Mitochondrien (Pfeile) TEM x5000.

In den Zellen der untersuchten Kulturen wurden regelmäßig intrazelluläre Vakuolen unterschiedlicher Größe beobachtet. Häufig kam, neben mehreren kleinen, eine große intrazelluläre Vakuole in den Endothelzellen aus malignen Hämangioendotheliomen vor. Diese intrazellulären Vakuolen erschienen teilweise optisch leer oder enthielten Zelldetritus.

Endothelzell-spezifische Zellorganellen, die Weibel-Palade-Körperchen, dienen u. a. der Speicherung des von Willebrand Faktors (vWF). Trotz intensiver Suche konnte der Nachweis von Weibel-Palade-Körperchen in den Kulturen aus Zellen des caninen malignen Hämangioendothelioms nicht erbracht werden.

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, ein *in vitro* Modell des malignen Hämangioendothelioms zu etablieren. Die Zellen des Tumors sind transformierte Endothelzellen und in der Lage mehr oder minder differenzierte Kapillaren oder kapillarähnliche, sinusoide Strukturen zu bilden. Durch den direkten Anschluss an das Blutgefäßsystem ist dem Tumor ungehindert die Möglichkeit zur Metastasierung gegeben (Folkman, 2002; Smith, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen aus einer unveränderten Milz und Zellen neoplastisch entarteter Organe (Milzen) dreier Hunde isoliert, *in vitro* kultiviert und charakterisiert. Hiermit wurde ein Zellkulturmodell geschaffen, das dazu dienen soll, neue Erkenntnisse zur Entstehung dieses hochmalignen Tumors zu gewinnen, sowie die Prüfung neuer Chemotherapeutika mit einem Minimum an Tierversuchen zu ermöglichen.

6.1 Isolierung der caninen Zellen

Die Zellisolierung wurde nach bereits etablierten Methoden (siehe 4.2.1) im Labor des Instituts für Veterinär-Anatomie durchgeführt (Plendl, 1997; Plendl et al., 1996). Fosmire et. al. (2004) gingen bei der Organentnahme und dem Transport für die Isolierung caniner Hämangioendotheliomzellen mit der gleichen Methodik vor. Das Prozedere der Isolierung beider Gruppen unterschied sich lediglich in der Verwendung der Lösungen zum enzymatischen Aufschluss der Zellen. Während in der vorliegenden Arbeit mit 25 mg Kollagenase II und IV (siehe Punkt 3.7.1) vorgegangen wurde, benutzte die Gruppe um Fosmire 0,25 prozentiges Trypsin/ EDTA.

Aus den zur Verfügung gestellten caninen Organen von vier Hunden konnten erfolgreich Zellen isoliert und kultiviert werden. Die Zellen einer Kultur (CH/RS) wurden wegen bakterieller Kontamination von der weiteren Charakterisierung und Identifizierung ausgeschlossen.

In der Studie von Fosmire et. al. (2004) wurden Zellen aus tumorösen Organen von 12 Hunden isoliert und 8 Kulturen etabliert. Im Gegensatz zu der o.g. Arbeitsgruppe wurde für die vorliegende Arbeit zusätzlich eine Kultur aus Zellen einer unveränderten caninen Milz etabliert.

Die Zellen aus der unveränderten caninen Milz wurden als Kultur CSC (canine Milzzellen einer Mischlingshündin), Zellen aus tumorös entarteten Organen wurden als Kultur CH/DS (canines Hämangioendotheliom eines Deutschen Schäferhundes) und Kultur CH/WS (canines Hämangioendotheliom einer Weißen Schweizer Schäferhündin) bezeichnet. Die erfolgreiche Isolierung und anschließende Langzeitkultivierung der Zellkulturen stellten die Basis für das in dieser Arbeit etablierte *in vitro* Modell des caninen malignen Hämangiendothelioms dar.

6.2 Identifizierung und Charakterisierung der isolierten Zellen

Nach Rafii (2000) und Kalka et al. (2000) zeichnet sich die endotheliale Determination *in vivo* sowie *in vitro* durch die Expression endothelzellspezifischer Oberflächenantigene (vWF, PECAM-1, Vascular Endothelial Cadherin/VE-Cadherin), die Aufnahme von acetyliertem Low-Density Lipoprotein (acLDL), die Bindung für bestimmte Lektine und die Ausbildung endothelzelltypischer morphologischer Merkmale (tubuläre Strukturen) aus.

6.2.1 Immunzytochemische Identifizierung und Charakterisierung der isolierten Zellen

Zur Identifizierung der Zellen kamen spezifische Antikörper zum Einsatz, die für das canine System etabliert waren. Standen diese nicht zur Verfügung, wurden Marker benutzt, deren Epitope laut NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology Information of the Institute of Health, USA) eine hohe Homologie mit den caninen mRNA Sequenzen zeigten.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper gegen humanen von-Willebrand-Faktor (vWF) zeigt Kreuzreaktivität im caninen System (Ferrer et al., 1995; Smith, 1990; Thamm et al., 2006). Endothelzellen exprimieren den vWF vorwiegend im Zytoplasma oder in den Weibel-Palade-Körperchen. Der Nachweis des vWF in den Zellen aus der unveränderten Milz (Kultur CSC) stellte den Beweis für die Präsenz von Endothelzellen dar. In weniger differenzierten Endothelzellen sowie Tumoren wird der vWF nicht regelmäßig bis kaum exprimiert (Smith, 1990), wodurch sich der geringere Anteil immunopositiver Tumorzellen in Kultur CH/DS (62%) und CH/WS (28%) erklären lässt.

Der Rezeptor CD31 (PECAM-1) wird in erster Linie an der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert. Der verwendete Antikörper Anti-Ratte-CD31 wurde bisher im caninen System nicht getestet. Der Vergleich der mRNA Sequenzen für CD31 der Ratte mit den mRNA Sequenzen des Hundes ergab eine Homologie von 72% (NCBI-Datenbank, National Center for Biotechnology Information of the Institute of Health, USA). Der Vergleich von caninen und humanen mRNA Sequenzen für CD31 zeigte ebenfalls eine Homologie von 72%, wobei humane Antikörper bereits erfolgreich an caninen Zellen angewendet wurden (Fosmire et al., 2004; Thamm et al., 2006).

Alle untersuchten Zellen der Kultur CSC reagierten CD31-immunopositiv. Der Anteil positiver Zellen in den Kulturen CH/DS (78%) und CH/WS (64%) war deutlich geringer. Auch dies könnte - wie beim Nachweis des vWF - durch den Verlust bestimmter Antigene in den transformierten Zellen erklärt werden.

Tie-2 ist ein Angiopoietin-Rezeptor, der ausschließlich von Endothelzellen exprimiert wird. Dieser Rezeptor ist in entscheidendem Maß durch die Bindung der Angiopoietine an der Stimulierung und Inhibierung der Angiogenese beteiligt (Maisonpierre et al., 1997; Nowak et al., 2004; Young, 2004).
Daher sollten die Zellen auf die Präsenz des Tie-2 Rezeptors untersucht werden. Die Homologie des humanen und caninen Angiopoietin/Tie-2-Systems wurde von Kato et al. (2006) nachgewiesen, so dass der am Hund noch nicht getestete Antikörper gegen humanes Tie-2 zum Einsatz kommen konnte. Tie-2 konnte sowohl in den Zellen aus Kultur CSC (85% immunopositiv) als auch in den Zellen der Kulturen CH/DS (90%) und CH/WS (92%) nachgewiesen werden.

Der Nachweis der drei spezifischen Endothelzellmarker (vWF, CD31 und Tie-2) sowie weitere morphologische Charakteristika (Gefäßbildung, Kapitel 5.1.2) sind als Beweis der endothelialen Identität der Zellen zu werten. Im Folgenden werden daher die Zellen der Kultur CSC als unveränderte (gesunde) Endothelzellen und die Zellen der Kulturen CH/DS und CH/WS als tumorös entartete (neoplastische) Endothelzellen bezeichnet.

Weiterhin wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen Integrin CD51/61 untersucht (Stahlmann et al., 2000). Integrin CD51/61 nimmt bei der Aktivierung des VEGF-R2 eine wichtige Rolle ein und übt somit indirekt mitogene Effekte im Rahmen der Bildung neuer Gefäße aus (Masson-Gadais et al., 2003; Soldi et al., 1999). Dieses Integrin reguliert auch die gezielte Degradation der extrazellulären Matrix sowie die Invasion und Adhäsion der migrierenden, angiogenen Endothelzellen (Clark et al., 1996). Ausschlaggebend für die Anwendung dieses Integrins in der vorliegenden Arbeit war, dass CD51/61 bei der Entstehung sowie dem Wachstum von Tumoren meist deutlich stärker in transformierten Endothelzellen exprimiert wird als in unveränderten Endothelzellen (Masson-Gadais et al., 2003; Soldi et al., 1999). Nur 48% der Zellen aus Kultur CSC (gesunde Milz) waren immunopositiv für CD51/61, im Gegensatz dazu betrug der Anteil CD51/61-positiver Zellen in den aus den Hämangioendotheliomen isolierten Kulturen CH/DS und CH/WS zwischen 95-97%. Diese Ergebnisse verweisen eindrucksvoll auf die molekulare Veränderung der in der vorliegenden Arbeit isolierten transformierten Endothelzellen.

Zusammenfassend ist also festzustellen, dass einerseits mit spezifischen Endothelzellmarkern (vWF, CD31 und Tie-2) die Identität der in dieser Arbeit charakterisierten Zellen als Endothelzellen bewiesen und andererseits mit dem Integrin CD51/61 die Transformation und Malignität der Zellen der Kulturen CH/DS und CH/WS gezeigt wurde.

6.2.2 Lektinzytochemische Charakterisierung der isolierten Zellen

Zur Charakterisierung der isolierten Endothelzellen kamen vier Lektine zum Einsatz. Die in Tabelle 6 aufgeführten Lektine werden seit über 30 Jahren zur Charakterisierung verschiedener Zelltypen aus unterschiedlichen Geweben und Organen, Neoplasien und bei verschiedenen Spezies angewandt (Alles und Bosslet, 1988; Alroy et al., 1987; Holthofer, 1983). In aktuellen Studien liegt bei den glykozytochemischen Untersuchungen der Fokus auf der Heterogenität von Tumorzellen (Masuzawa et al., 1999; Taraszewska und Matyja, 2007) und Stammzellen (Kaufman et al., 2004; Kopper und Hajdu, 2004; Kritzenberger und Wrobel, 2004; Rao et al., 2007; Tao et al., 2008).

Mit dem Lektin UEA I werden Endothelzellen verschiedener Spezies charakterisiert (Arber et al., 1997; Augustin-Voss et al., 1990; Holthofer et al., 1982; Plendl et al., 2002a). Miettinen et al. (1983) und Alles und Bosslet, (1988) diskutierten UEA I als Tumormarker für neoplastische humane Endothelzellen. Augustin-Voss et al. (1990) nutzten das Lektin erstmals zur Charakterisierung caniner Endothelzellen im Gewebeschnitt und fanden eine stärkere Affinität des UEA I für neoplastische canine Endothelzellen als für normale. Dieser Unterschied konnte für die Endothelzellen *in vitro* der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden – es wurden sowohl die unveränderten als auch die neoplastisch transformierten Endothelzellen *in vitro* gleichermaßen markiert. Ein möglicher Grund dafür könnte in der *in vitro* Kultivierung und der damit verbundenen starken zellulären Stimulation durch endotheliale Wachstumsfaktoren des Kulturmediums liegen.

Auch das Lektin Con A wurde bereits an Endothelzellen und neoplastischen Geweben verschiedener Spezies in situ getestet. Augustin-Voss und Pauli (1992) fanden Con A-positive Endothelzellen beim Rind, Tao et al. (2008) beschrieben eine variierende Affinität des Lektins für Endothelzellen unterschiedlicher Spezies und Fischer und Kissel (2001) bestätigten dieses Ergebnis und demonstrierten, dass Endothelzellen aus dem Schwein Con A nicht binden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erwiesen sowohl eine deutliche Affinität des Con A zu den unveränderten caninen Endothelzellen als auch zu den neoplastischen Endothelzellen.

Mit den Lektinen WGA (Augustin-Voss und Pauli, 1992; Fischer und Kissel, 2001) und DBA (Okada et al., 1990; Plendl et al., 2002a; Ponder und Wilkinson, 1983) wurden Endothelzellen und Tumorzellen aus verschiedenen Geweben markiert. Es zeigte sich bei den verschiedenen Untersuchungen eine deutliche Heterogenität in der Bindung dieser Lektine. Alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten caninen Zellen banden diese Lektine ohne signifikante Unterschiede.

Zusammenfassend konnte eine deutliche Affinität der verwendeten Lektine UEA I, Con A, WGA und DBA zu den *in vitro* kultivierten Zellen dieser Arbeit nachgewiesen werden. Eine Differenzierung der *in vitro* kultivierten unveränderten und neoplastischen caninen Endothelzellen durch die Lektinmarkierung war jedoch nicht möglich.

6.2.3 Elektronenmikroskopische Charakterisierung endothelzelltypischer morphologischer Merkmale

In der vorliegenden Arbeit wurden Endothelzellen isoliert, die ein komplexes, kapillarähnliches Netz mit kontinuierlichem Lumen *in vitro* bildeten. Der Nachweis tubulärer Strukturen kann als ein endotheliales Identifizierungsmerkmal gewertet werden (Risau, 1995). Insbesondere betont das Vorhandensein eines Lumens, wie es bei Kapillaren *in vivo* der Fall ist, die endotheliale Identität der Zellen.

Verschiedene zelluläre Mechanismen, die zur Lumenisierung von Gefäßen führen, ließen sich durch die elektronenmikroskopische Untersuchung bei den Endothelzellen der Kulturen beobachten. Es konnten große intrazelluläre Vakuolen in den Endothelzellen aus malignen Hämangioendotheliomen nachgewiesen werden. Lumenbildung durch Vakuolisierung als Form der Entstehung mikrovaskulärer Gefäße wurde erstmals durch Folkman und Haudenschild (1980) und später von anderen Autoren (Bayless und Davis, 2002; Meyer et al., 1997; Yang et al., 1999) beschrieben. Demnach erscheinen im Zuge der Lumenisierung intrazelluläre Vakuolen, deren Durchmesser zunimmt. Schließlich verschmelzen sie zu einer großen Vakuole. Nach Folkman und Haudenschild (1980) entsteht das Lumen durch Vereinigung der Vakuolen benachbarter Endothelzellen. Diese Form der Lumenbildung konnte auch bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kulturen beobachtet werden.
Eine weitere Form der Lumenisierung wird von Meyer et. al. (1997) beschrieben. Danach erfolgt nach der Fusion intrazellulärer Vakuolen mit interzellulären Spalträumen die weitere Ausdehnung des Lumens im Zentrum des Sprosses. Außerdem erfolgt ein Einschieben weiterer Endothelzellen zwischen diejenigen, die das Lumen bereits auskleiden. Auch diese Form der Lumenbildung deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit: zahlreiche tubuläre Strukturen wurden beobachtet, die ein- bis dreischichtig von vitalen Zellen umgeben und im Inneren mit Zelldetritus gefüllt waren.

In den Endothelzellen zahlreicher Spezies wurden spezifische Zellorganellen, die Weibel-Palade-Körperchen, gefunden. In diesen Strukturen wird u. a. der für die Adhäsion von Blutplättchen an Gefäßwandverletzungen notwendige von Willebrand Faktor (vWF) nach seiner Synthese gespeichert (Junqueira et al., 2002; Wagner, 1993). In *in vitro* aus mesenchymalen Stammzellen differenzierten caninen Endothelzellen fanden Li et al. (2007) Weibel-Palade-Körperchen. Nach Maxie und Robinson (2007) sollen auch in den Zellen des caninen malignen Hämangioendothelioms Weibel-Palade-Körperchen nachweisbar sein. Dieser Nachweis ist in den analysierten Zellen der vorliegenden Arbeit trotz intensiver Suche nicht gelungen.

6.3 *In vitro* Kultivierung der caninen Endothelzellen

6.3.1 Morphologie und Proliferation der *in vitro* kultivierten Endothelzellen

Die Zellen der Kulturen aus malignen Hämangioendotheliomen und der gesunden Milz zeigten eine ähnliche Morphologie, wobei in allen Zellkulturen (CSC, CH/DS und CH/WS) regelmäßig zwei verschiedene Zelltypen beobachtet wurden. Einerseits zeigten sich Zellen, die einen dreieckigen bis polygonalen Zellkörper (Durchmesser: 30-50 µm) mit meist nur einen ausgeprägten Ausläufer aufwiesen. Seine Länge betrug bis zum zweifachen des Durchmessers des Zellleibes (bis zu 150 µm). Die Zellen des zweiten Typs nahmen eine spindelförmige, teilweise stark in die Länge gezogene Form an (insgesamt bis zu 200 µm Länge). Die Enden der Zellfortsätze beider Typen waren plattenförmig verbreitert.

Variationen der Zellform sind innerhalb des Endothels keine Seltenheit. Morphologische Heterogenität zeigen beispielsweise makro- und mikrovaskuläre Endothelzellen. Während die der mikrovaskulären Gefäße flach, langgestreckt und in Blutflussrichtung angeordnet sind, zeigen sich die der großen Gefäße eher polygonal (Kumar et al., 1987). Auch bei der Zellgröße wurden bereits frühzeitig erhebliche Unterschiede entdeckt. Erstaunlicherweise sind Endothelzellen großer Gefäße oftmals geringeren Ausmaßes als die kleinerer Gefäße. Beispielsweise sind Endothelzellen der Koronararterien des Schweines um 30% größer als die in der Aorta (Ohbayashi et al., 1994). Endothelzellen der Gehirnarterien des Menschen sind größer als Endothelzellen von Gefäßen ähnlichen Kalibers anderer Organe (Thorin et al., 1997). Endothelzellen der Pulmonalarterie der Ratte sind länger als die der Aorta (Kibria et al., 1980).

Möglicherweise stammen die in der vorliegenden Arbeit isolierten Endothel-Zelltypen mit morphologischer Heterogenität aus verschiedenen Gefäßkalibern, welche vor der Isolierung nur mikroskopisch feststellbar gewesen wären.

Eine Verdopplung der Zellzahl in den neoplastischen Kulturen CH/DS und CH/WS war bereits nach 4 Tagen erreicht, die Zellzahl der Kulturen aus der gesunden Milz verdoppelte sich erst nach 6 Kultivierungstagen. Sowohl die neoplastisch entarteten Endothelzellen als auch die Endothelzellen aus der gesunden caninen Milz wurden mit identischen Konzentrationen endothelialer Wachstumsfaktoren inkubiert (P_0-Selektivmedium, 3.5.2).

Die Endothelzellproliferation steht am Beginn der physiologischen angiogenen Kaskade (Bahramsoltani und Plendl, 2004a; Lienau, 2003). Die Umsatzrate des Gefäßendothels ist, abgesehen von wenigen Ausnahmen, im gesunden adulten Organismus eher gering und vaskuläres Wachstum unterliegt im Rahmen physiologischer Bedingungen strikter Kontrolle. Dysreguliertes, überschießendes Gefäßwachstum geht insbesondere mit dem Wachstum von Tumoren einher (Carmeliet, 2003).

Die deutlich höhere Proliferationsrate sowie das exponentielle Wachstum in den ersten Kultivierungstagen und das hohe angiogene Potential der neoplastischen Endothelzellen der vorliegenden Studie kann als Malignitätsmerkmal dieser Zellen gewertet werden. Ebenso könnte evtl. eine spontane Immortalisierung, wie sie bei Tumorzellen beobachtet wird (Cheung und Deng, 2008; Harvey et al., 2002; Londono-Vallejo, 2008), ein weiterer Grund für die hohe Proliferationsrate der neoplastischen Endothelzellen sein.
Die hohe maximale Kultivierungsdauer (130 bzw. 145 Tage) sowie die hohe Passagierungsfähigkeit (11 bzw. 10 Passagen) zeigen zumindest eine deutlich höhere Überlebenszeit der entarteten Zellen. Im Gegensatz dazu war bei den Zellen aus der gesunden Milz (CSC) während des ganzen Beobachtungszeitraums ein fast lineares Wachstum zu beobachten. Die Kultivierungsdauer der Zellen aus Kultur CSC lag bei lediglich 80 Tagen und nur 6 möglichen Passagen.

6.3.2 *In vitro* Gefäßentwicklung

Bei allen hier vorgestellten Endothelzellkulturen wurden im Laufe der Beobachtungszeit morphologische Veränderungen verzeichnet, die zu dreidimensionalen, tubulären Netzwerken führten. Solche gefäßähnlichen Strukturen sind das Ergebnis der angiogenen Kaskade. Per definitionem basiert die *in vivo* Angiogenese auf der Migration, Proliferation und Bildung tubulärer Strukturen (Bartel und Lametschwandtner, 2000; Djonov et al., 2000; Patan, 2000, 2004). Sie impliziert das Entstehen neuer Kapillaren aus bereits existierenden Blutgefäßen. Die de novo Organisation zu einem primitiven vaskulären Gefäßgeflecht wird Vaskulogenese genannt, welche aus der Determination und Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen besteht (Flamme et al., 1997). Demnach tritt zuerst die Vaskulogenese auf. Die weiteren Entwicklungsschritte, wie Expansion und Verzweigung der primären Gefäßgeflechte, werden als Angiogenese bezeichnet (Carmeliet, 2000; Patan, 2000).

Das Dogma, dass nach der Geburt neue Blutgefäße nur in Form von Angiogenese entstehen, ist nicht mehr gültig. Neuere Untersuchungen führten zu der Erkenntnis, dass adulte Neovaskularisation eine Kombination aus Vaskulogenese und Angiogenese darstellt (Drake, 2003; Schatteman und Awad, 2004). Endotheliale Vorläuferzellen existieren nachweislich im adulten Organismus. In aktivierter Form migrieren und proliferieren sie, um am Ort ihrer Bestimmung zu Endothelzellen zu differenzieren. Endotheliale Vorläuferzellen sind an der Neovaskularisation z.B. ischämischer Gewebe oder der verletzten Kornea, im Zuge der Wundheilung und beim Tumorwachstum beteiligt. Der Prozess, durch den adulte Stammzellen oder Progenitorzellen differenzieren und de novo Gefäße generieren, wird postnatale Vaskulogenese genannt (Asahara und Kawamoto, 2004; Luttun et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass nach der Einsaat und dem Anhaften der Zellen am Kulturschalenboden eine intensive Proliferation der caninen Endothelzellen begann. Innerhalb von 6 (neoplastische Kulturen CH/DS und CH/WS) bzw. 14 Tagen (Kultur CSC) nach Einsaat bildeten diese einen konfluenten Monolayer aus spindelförmigen und polygonalen Zellen. Nach 10 Tagen traten in den Kulturen neoplastisch entarteter Endothelzellen (Kulturen CH/DS und CH/WS) zelluläre Ansammlungen (Cluster) auf. Auch in den Endothelzellkulturen aus der gesunden caninen Milz wurden – jedoch erst nach 21 Kultivierungstagen - sowie in deutlich geringerer Anzahl, zelluläre Cluster beobachtet. Insbesondere in den neoplastischen Kulturen gingen von den Clustern tubuläre Strukturen aus.

Diese morphologischen Veränderungen weisen charakteristische Parallelen zur oben beschriebenen de novo Organisation immaturer Endothelzellen bei der Vaskulogenese auf (Quirici et al., 2001; Young und Black, 2004). Entsprechend den in der vorliegenden Studie beschriebenen Typ-b Zellen hat die immature Endothelzelle eine längliche bis spindelige Form, nach *in vitro* Aussaat proliferiert sie stark, wird adhärent und bildet Zellcluster aus. Ingram et al. (2004) definierten in ihrer Studie „Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood" die Differenzierungsschritte primitiver endothelialer Progenitorzellen zu maturen Endothelzellen basierend auf ihrem Potential zu proliferieren und klonogene Zellcluster zu formen.

Die Cluster stellten sich zu Beginn als lockere Zellhaufen aus phasenkontrastmikroskopisch differenzierbaren Endothelzellen dar. Im Laufe ihrer Größenzunahme bildeten sich kugelförmige Strukturen, in denen sich keine Einzelzellen mehr darstellen ließen. Der Aufbau dieser Strukturen konnte mit Hilfe von Semidünnschnitten und elektronenmikroskopischen Untersuchungen geklärt werden. Der Durchmesser der Cluster betrug 150 µm bis 500 µm. Sie zeigten einen immer wieder zu beobachtenden Grundaufbau, nämlich aus einer äußeren ein- bis maximal dreilagigen Schicht intakter Zellen, die im Inneren mit Zelldetritus und fibrillärem Material gefüllt war. Damit ähneln sie so genannten Sphäroiden, welche für moderne Angiogenesemodelle hergestellt werden, indem aus zweidimensionalen Zellkulturen durch Veränderung der Kulturbedingungen dreidimensionale zelluläre Sphäroide geformt werden. Solche Angiogenesemodelle, in denen radial von den endothelialen Foci lumenhaltige Strukturen aussprossen, kommen den wirklichen angiogenen Prozessen *in vivo* sehr nah (Korff et al., 2004; Stahl et al., 2005). Die Neoangiogenese wird dabei ausgehend von den dreidimensionalen sphäroidalen Zellagregaten in einer Kollagenmatrix simuliert (Korff et al., 2004; Stahl et al., 2005).

Die Cluster bzw. Sphäroide, die in der vorliegenden Arbeit auftraten, wurden jedoch nicht künstlich hergestellt. Vielmehr entstanden sie in Folge fokaler Proliferation der Typ-b Zellen. In der Literatur wird dieses morphologische Phänomen „colony-forming unit" bezeichnet. Colony-forming units sind clonogene Zellaggregate aus determinierten Vorläuferzellen. Sie werden zur Quantifizierung endothelialer Progenitorzellen im zirkulierenden Blut oder in anderen Organen genutzt (Necas et al., 1995; Shantsila et al., 2007) und zum anderen mit dem Auftreten pathologischer Prozesse des Endothels, wie z.B. rheumatische Arthritis (Egan et al., 2008) oder Tumoren (Ho et al., 2006) in Verbindung gebracht.

Es ist denkbar, dass die ersten Schritte der Gefäßbildung in dem in dieser Arbeit beschriebenen Modell von immaturen Endothelzellen der Cluster initiiert wurden. Bislang gibt es nur einzelne Untersuchungen, welche sich der Charakterisierung der Zellen des caninen malignen Hämangioendothelioms widmen (Akhtar et al., 2004; Fosmire et al., 2004; Thamm et al., 2006), wobei die Zellen als „primitive angiogene Endothelzellen“ bezeichnet wurden. Primitive und immature Zellen zeigen - wie die Zellen der Kulturen CH/DS und CH/WS - eine rege mitotische Aktivität und Ansprechbarkeit auf Wachstumsfaktoren (Young und Black, 2004; Young et al., 2004).

Die Zellen wurden aus der Milz isoliert. Milz (und Leber) stellen sowohl bei Mensch als auch beim Tier die wichtigsten Zentren der nach ihnen benannten „hepatolienalen Phase“ der embryonalen Blut- und Gefäßbildung dar (Drews, 2006). Das gehäufte Auftreten des malignen Hämangioendothelioms in diesen Organen und die typische fokale Proliferation der Tumorgefäße könnte ein bedeutender Hinweis auf die Abstammung des Tumors von endothelialen Progenitorzellen sein, da die Milz (und Leber) nicht nur pränatal sondern sehr wahrscheinlich auch postnatal endotheliale Progenitoren bzw. im Stroma residierende Stammzellen (Yoon et al., 2007; Young und Black, 2004; Young et al., 2004) beherbergen dürften.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen morphologischen Entwicklungsschritte der Kulturen, folgten den Gesetzen der angiogenen Kaskade. Aus den Zellclustern sprossten fokal und radial Stränge von Endothelzellen. Es entstanden straßenartige Strukturen aus parallel angeordneten Zellen, welche Brücken zwischen den einzelnen Clustern bildeten. Diese linearen Strukturen traten in den Kulturen an mehreren Lokalisationen gleichzeitig auf und nahmen im Laufe der weiteren Kultivierung an Länge und Dicke zu. Sie bestanden Anfangs aus einzelnen Zellausläufern, bis sich dann lumenhaltige kapillarartige Strukturen aus vielen parallel und linear angeordneten Zellen bildeten. Die Lumenisierung der tubulären Strukturen wurde mittels der elektronenmikroskopischen Untersuchungen bewiesen. In Anlehnung an die von Auerbach et al. (2003) beschriebene angiogene Kaskade in vivo durchliefen die hier beschriebenen Zellkulturen alle elementaren Teilschritte der Angiogenese:

Endothelzellen müssen ihre stabile Lokalisation verlassen, wobei sie durch die Basalmembran dringen (Auerbach et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit kann die „stabile Lokalisation“ mit dem zellulären Cluster verglichen werden. Im Cluster bzw. Sphäroid erlangen Endothelzellen eine Differenzierung, die in vielen Punkten dem physiologischen Typus der Endothelzelle in der Gefäßwand entspricht (Korff und Augustin, 1998).

Wenn dies erreicht ist, migrieren die Zellen in Richtung eines angiogenen Stimulus (Auerbach et al., 2003). Da kein Gradient proangiogener Faktoren im Kulturmedium vorhanden war, konnte die Migration im engeren Sinne nicht zielgerichtet, sondern radiär um die zellulären Cluster beobachtet werden. Unter angiogener Stimulation sind Endothelzellen in der Lage, aus dem ruhenden Zellverband in die umgebende Matrix auszuwandern, vergleichbar einem ruhenden Endothel *in vivo* (Pepper et al., 1989).

Hinter der Front migrierender Zellen proliferieren Endothelzellen, um die notwendige Anzahl von Zellen sicherzustellen, die zur Ausbildung kapillärer Strukturen notwendig ist (Auerbach et al., 2003). Die von den Clustern ausgehenden Aussprossungen der hier untersuchten Zellkulturen bestanden anfangs aus einzelnen Zellausläufern, bis sich dann lumenhaltige kapillarartige Strukturen aus vielen parallel und linear angeordneten Zellen bildeten.

Schließlich bedarf es einer Neuorganisation der Endothelzellen in ein funktionsfähiges dreidimensionales Netzwerk tubulärer Strukturen (Auerbach et al., 2003). Zur Ausbildung dreidimensionaler Netze aus kapillarähnlichen Strukturen kam es bei den neoplastisch entarteten Endothelzellen (Kulturen CH2 und CH3) nach ca. einem Monat Kultivierungsdauer. Die Zellen strukturierten sich zu komplexen dreidimensionalen Netzen um, die sich über den gesamten Kulturschalenboden ausdehnten, bis schließlich ab dem 40. Tag nur noch wenige Zellen unter dem kommunizierenden System strangartiger Strukturen auszumachen waren. Nach weiteren 10 bis 14 Tagen erfolgte spontan ein rapider Abbau dieser Strukturen und darauf folgend ein weiteres vollständiges Durchlaufen der angiogenen Kaskade. Im Gegensatz hierzu bildeten die Endothelzellen aus der gesunden Milz (CSC) nur in deutlich geringerem Ausmaß dreidimensionale Netze aus, diese traten auch erst nach einer Kultivierungsdauer von über 50 Tagen auf und waren nur an wenigen Stellen der Kulturschalen zu sehen. Nach dem Abbau dieser Strukturen erfolgte kein wiederholtes Durchlaufen der angiogenen Kaskade. Es konnte kaum Zellproliferation beobachtet werden, schließlich lösten sich die nur mehr im Monolayer vorliegenden Zellen und gingen letztendlich zugrunde. Ähnliche Ergebnisse konnten auch Lienau et al. (2005) an normalen murinen und humanen Endothelzellen beobachten.

6.3.3 Wichtigste Unterschiede der Zellkulturmodelle der tumorös entarteten Endothelzellen und der Endothelzellen aus einer gesunden Milz

Die Kulturen der tumorös entarteten Zellen (CH/DS und CH/WS) und die aus der gesunden Milz (CSC) zeigten bei der Entwicklung zu kapillarähnlichen Strukturen ähnliche morphologische Phänotypen, jedoch mit unterschiedlicher Proliferations- und Populations-verdopplungszeit. Zelluläre Cluster traten in den Kulturen tumorös entarteter Zellen früher und in höherer Anzahl auf. Diese Charakteristika weisen intensiv auf eine de novo Organisation via Vaskulogenese (Ingram et al., 2005; Ingram et al., 2004) hin und es wird davon ausgegangen, dass in beiden Zellkulturmodellen, den neoplastisch entarteten und den gesunden, endotheliale Vorläuferzellen eine initiierende Rolle spielten. Entsprechend dem derzeitigen Stand der Wissenschaft wird Progenitorzellen eine initiierende Rolle bei der Entstehung von Tumoren per se bzw. deren nutritiven Neovaskularisation zugeschrieben (Ganss, 2006; Libbrecht, 2006; Ribatti, 2004; Xie und Chin, 2008). In weiteren nachfolgenden Untersuchungen sollen die Zellen der Cluster mit spezifischen Progenitorzellmarkern untersucht werden.

Ein weiterer gravierender Unterschied zwischen den neoplastischen und den gesunden Zellen zeigte sich in der Tatsache, dass die Kulturen CH/DS und CH/WS bereits nach 30 Tagen dreidimensionale Netze aus kapillarähnlichen Strukturen bildeten, während dies bei der Kultur CSC erst nach 50 Tagen der Fall war. Vaskuläres Remodelling konnte in den Kulturen CH/DS und CH/WS, gemäß der maximalen Kultivierungszeit, annähernd 4 mal beobachtet werden, während die Endothelzellen aus der gesunden Milz kein wiederholtes Durchlaufen der angiogenen Kaskade demonstrierten.

Die hohe Proliferationsfähigkeit neoplastisch entarteter Endothelzellen ist ein Effekt, der bei der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren beobachtet wird (Cheung und Deng, 2008; Kang und Park, 2001; Londono-Vallejo, 2008). Mit diesem „tumortypischen“ Verhalten können die deutlichen Unterschiede im Proliferationsverhalten und dem wiederholten Remodelling zwischen den Kulturen gesunder caniner Endothelzellen auf der einen sowie neoplastisch entarteter Endothelzellen auf der anderen Seite erklärt werden.

Dreidimensionale *in vitro* Angiogenese ist üblicherweise an die Bereitstellung eines dreidimensionalen Substrats aus extrazellulären Matrixkomponenten (Chalupowicz et al., 1995; Montesano, 1986; Peters et al., 2002) gebunden. Die Fähigkeit der neoplastisch entarteten caninen Endothelzellen auf die gesamte Kulturschale übergreifende dreidimensionale angiogene Strukturen auszubilden, zeigt, dass eine Bereitstellung extrazellulärer Matrix nicht erforderlich ist. Da die caninen Endothelzellen aus der gesunden

Milz diese Fähigkeit nur in deutlich geringerem Maß besaßen, könnte die Aufklärung dieser Mechanismen neue Ansätze für die Entwicklung von Therapeutika zur Hemmung des Tumorwachstums bieten.

6.3.4 Anwendbarkeit des Zellkulturmodells

Insbesondere im Stadium der Proliferation verschafft das in der vorliegenden Arbeit etablierte *in vitro* Assay die Möglichkeit, die Vermehrungsrate der Zellen zu messen. Die Zellproliferation kann am Thymidin-Inkorporations-Modell, durch mikroskopische Auszählung der Endothelzellen mit Zählkammern oder mittels Zählgeräten erfolgen. Eine Quantifizierung ist ferner durch immunzytochemische Markierung mitotischer Zellen möglich (Ahmad et al., 2001; Amann et al., 2001; Pedram et al., 1997).

In Zell-Migrations-Assays könnte die richtungsorientierte Motilität der Endothelzellen aus den zellulären Sphäroiden in Richtung chemotaktischer Stimuli (z.B. Wachstumsfaktoren) analysiert werden. In neueren Angiogenesemodellen wird die Neoangiogenese ausgehend von dreidimensionalen sphäroidalen Zellagregaten in einer Kollagenmatrix simuliert. Die sphäroidalen Aussprossungen können quantitativ hinsichtlich der mittleren Sprosslänge digital vermessen werden (Stahl et al., 2005).

Der aussagekräftigste Test für die Angiogenese der Endothelzellen ist die Ermittlung ihrer Fähigkeit dreidimensionale tubuläre Strukturen mit einem Lumen auszubilden (Folkman und Haudenschild, 1980; Plendl, 1997). In die Kulturschalen eingesät, formten die in dieser Arbeit isolierten Endothelzellen nach gegebener Inkubationszeit spontan Tubuli. Endothelzellen synthetisieren *in vitro* entsprechende Komponenten der extrazellulären Matrix und bilden sich dadurch ihr eigenes, dreidimensionales Substrat (Auerbach et al., 2003; Lienau et al., 2005). Da eine exogene Bereitstellung extrazellulärer Matrixkomponenten im vorliegenden Modell nicht notwendig war um dreidimensionale Strukturen zu bilden, kann vermutet werden, dass die isolierten Zellen selbst ein entsprechendes Substrat synthetisierten. In diesem Modell konnte die Migration, Differenzierung zu kapillarähnlichen Strukturen, deren Lumenisierung und ein anschließendes Remodeling beobachtet werden. Elektronenmikroskopisch wurden Zellkontakte und Lumenbildung überprüft. Somit bietet das in der vorliegenden Arbeit etablierte *in vitro* Modell eine Möglichkeit, in Annäherung an die *in vivo* Situation, die Ausbildung vaskulärer Strukturen des Hämangioendothelioms und deren Inhibierung qualitativ und quantitativ zu studieren (Nicosia et al., 1994).

7 Zusammenfassung

Das maligne Hämangioendotheliom ist eine häufige viszerale Tumorform des Hundes. Es ist ein hochmaligner Tumor der Blutgefäße, der von deren Endothelzellen abstammt. Aufgrund des aggressiven Verhaltens des Tumors ist eine kurative Therapie in der Regel nicht möglich, generell ist die Prognose schlecht. Nach Diagnose der Erkrankung leben nur wenige der Patienten länger als ein Jahr. Methoden zur Früherkennung gibt es derzeit nicht.

Ziel dieser Arbeit war es ein *in vitro* Modell des malignen Hämangioendothelioms zu etablieren. Hierfür sollten Zellen des Tumors isoliert, identifiziert und charakterisiert werden. Das Modell soll einerseits dazu dienen neue Erkenntnisse zur zellulären Entstehung dieses hochmalignen Tumors zu gewinnen und andererseits künftig die Prüfung neuer Chemotherapeutika mit einem Minimum an Tierversuchen zu ermöglichen.

Da die Milz bevorzugte und häufigste Entstehungslokalisation des Tumors ist, wurde neoplastisch entartetes Milzgewebe mehrerer Hunde *in vitro* kultiviert. Zum Vergleich wurden auch Endothelzellen aus einer gesunden Milz isoliert.

Es wurde eine Strategie zur Identifizierung der Zellen erarbeitet. Diese setzte sich aus folgenden Arbeitsschritten zusammen: 1. dem immunzytochemischen Nachweis der endothelzellspezifischen Marker vWF, CD31, Tie-2 und CD51/61; 2. dem Nachweis bestimmter Lektine; 3. der Analyse des Wachstumsmusters der Zellen.

Isoliert und *in vitro* kultiviert wurden Endothelzellen aus neoplastisch entartetem Gewebe der Milz von drei Hunden und der unveränderter Milz eines vierten Hundes.
Die Zellen aus den tumorös entarteten caninen Milzen konnten bis zu 145 Tagen reproduzierbar kultiviert werden. Die Zellen, die aus einer unveränderten caninen Milz isoliert waren, konnten nur 80 Tage lang *in vitro* kultiviert werden.

Im Laufe der *in vitro* Kultivierung wurden deutliche Unterschiede der Kulturen aus den malignen Hämangioendotheliomen und der Kultur aus einer unveränderten Milz beobachtet.
Die neoplastisch entarteten Zellen zeichneten sich *in vitro* durch eine hohe Proliferationsrate bei annähernd exponentiellem Wachstum aus. Im Gegensatz hierzu zeigten die Zellen aus der gesunden Milz eine deutlich niedrigere Proliferationsrate bei fast linearem Wachstum.

Ein weiterer Unterschied zwischen den neoplastischen und den gesunden Zellen zeigte sich in der Tatsache, dass erstere bereits deutlich früher dreidimensionale Netze aus kapillarähnlichen Strukturen bildeten. Der Ab- bzw. Aufbau neuer gefäßähnlicher Strukturen (vaskuläres Remodelling) konnte in den Kulturen aus den entarteten Milzen mehrfach beobachtet werden, während dies bei den Endothelzellen aus der gesunden Milz nicht beobachtet werden konnte. Die Zellkulturen aus den entarteten Geweben waren außerdem ohne exogene Bereitstellung extrazellulärer Matrixkomponenten in der Lage dreidimensionale Netze auszubilden. Diese Fähigkeit besaßen die Zellen der Kultur CSC nur in eingeschränktem Maß.

Die endotheliale Identität der in dieser Arbeit charakterisierten Zellen wurde mit dem Nachweis der spezifischen Endothelzellmarker vWF, CD31 und Tie-2 bewiesen. Die Mehrzahl der Zellen aus den Kulturen der gesunden Milz reagierte mit den verwendeten Endothelzellmakern intensiv immunopositiv. Auch von den Zellen der tumorös entarteten Milzen wurden diese Endothelzellmarker exprimiert. Während Tie-2 mit gleicher Intensität von den malignen Zellen exprimiert wurde, zeigten sie eine deutlich schwächere Markierung mit vWF und CD31. Die letztgenannten Ergebnisse wurden als Hinweis für die Entdifferenzierung dieser Zellen gewertet. Im Gegensatz dazu war das Integrin CD51/61 in den tumorös entarteten Zellen stärker exprimiert als in den Zellen aus dem normalen Milzgewebe. Da CD51/61 auch als Tumormarker eingesetzt wird, indizierte dieses Ergebnis die Transformation und Malignität der Zellen.

Lektinzytochemische Untersuchen wurden mit vier verschiedenen Lektinen (UEA I, Con A, DBA und WGA) durchgeführt. Die verwendeten Lektine zeigten eine deutliche Affinität zu den isolierten Zellen der drei untersuchten Kulturen, es konnten aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Endothelzellpopulationen herausgearbeitet werden.

Transmissionselektronenmikroskopisch konnte der endotheliale Charakter der untersuchten Zellen anhand der Lumenbildung nachgewiesen werden. Ein elektronenmikroskopischer Nachweis endothelzelltypischer Zellorganellen (Weibel-Palade-Körperchen) konnte nicht erstellt werden.

Dieses *in vitro* Modell stellt ein kostengünstiges System dar, mit dem weiterführende Untersuchungen zur Entstehung und speziellen Charakterisierung des caninen malignen Hämangioendothelioms durchgeführt werden können. In Zukunft soll dieses Modell zur Identifizierung spezifischer und therapeutisch nutzbarer Inhibitoren eingesetzt werden. Im Hinblick auf eine Reduktion von Tierversuchen durch Ersatz- und Ergänzungsmethoden kommt dem in der vorliegenden Arbeit etablierten *in vitro* Modell des malignen Hämangioendothelioms damit eine besondere Bedeutung zu.

8 Summary

Establishment of an *in vitro* model of canine malignant hemangioendothelioma

The malignant hemangioendothelioma (hemangiosarcoma) is a frequent visceral tumour seen in dogs. It is a highly malignant neoplasm of vascular endothelial origin. Because of the aggressive behaviour of the tumour curative therapy is not possible and in general prognosis is poor. After diagnosis only a few of the patients live longer than one year. There are currently no methods of early diagnosis.

The purpose of this study was to establish an *in vitro* model of the malignant hemangioendothelioma. Cells of the tumour should be isolated, identified and characterised. The resulting model should increase knowledge on the cellular origin of this highly malignant tumour and allow the testing of chemotherapeutics with a minimum of animal experiments in the future.

Because the spleen is a preferred and the most frequent origin of tumour localisation, transformed splenic tissue of several dogs was cultivated *in vitro*. Endothelial cells from a healthy spleen were isolated as well.

A strategy was set up to identify the cells. This consisted of the following steps:
1. immunocytochemical labelling with specific markers for endothelial cells: vWF, CD31, Tie-2 and CD51/61; 2. the labelling with certain lectins; 3. the analysis of the growth pattern of the cells.

Endothelial cells were isolated and cultivated *in vitro* from transformed splenic tissue of three dogs and the healthy spleen of one dog. Cells taken from neoplastic canine spleens could be cultivated reproducibly up to 145 days. Cells from the healthy canine spleen could be cultivated 80 days *in vitro* only.

During *in vitro* cultivation differences were observed between the cultures from the malignant hemangioendothelioma and the culture from the healthy spleen. The neoplastic cells *in vitro* showed a high proliferation rate with exponential growth. In contrast, the cells from the healthy spleen showed a clearly lower proliferation rate with almost linear growth.

Neoplastic cells earlier three-dimensional net-working and formation of capillary-like structure. Vascular remodelling was observed in the cultures from neoplastic spleens, whereas this phenomenon could not be observed in endothelial cells from the healthy spleen. Moreover, the neoplastic cell cultures developed three dimensional networks without any supply of extra-cellular matrix components. In the cells of the CSC culture this phenomenon was observed only in limited dimension.

The endothelial identity of the cells was shown by labelling with the specific endothelial cell markers vWF, CD31 and Tie-2. The majority of healthy spleen cells reacted intensely immunopositively with the endothelial cell markers. Endothelial markers were also expressed by neoplastic cells. While Tie-2 showed the same intensity in the malignant cells, a clearly lower labelling was found for vWF and CD31. These results were interpreted as an indication for dedifferentiation of these cells. In contrast Integrin CD51/61 was stronger immuno-localized in neoplastic cells than in cells of normal spleen tissue. Because CD51/61 is also used as a tumour marker, this result indicated the transformation and malignancy of the cells.

Lectincytochemical labelling was carried out with four different lectins (UEA I, Con A, DBA and WGA). These lectins showed a clear affinity to the isolated cells of investigated cultures, however, no significant difference was presented between the endothelial cell populations.

The endothelial character of the investigated cells was demonstrated also by electronmicroscopical analysis. Typical endothelial organelles (Weibel-Palade-bodies) were not seen.

This *in vitro* model constitutes a reasonable system for continuing investigations and characterisation of the canine malignant hemangioendothelioma. In the future this model might be used to identify inhibitors of endothelial growth. With regard to a reduction of animal experiments the present study might be useful.

9 Abkürzungsverzeichnis

Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BME-Vitamine	Basal Eagle Vitamin Solution
CD 31 (PECAM-1)	Cluster of Differentiation 31 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1)
CD 51/61	Cluster of Differentiation 51/61, Integrin
CH/DS	Endothelzellen, isoliert aus einem malignen Hämangioendotheliom der Milz eines männlichen Deutschen Schäferhundes
CH/RS	Endothelzellen, isoliert aus einem malignen Hämangioendotheliom der Milz eines weiblichen Riesenschnauzers
CH/WS	Endothelzellen, isoliert aus einem malignen Hämangioendotheliom der Milz eines weiblichen Weißen Schweizer Schäferhundes
ConA	Concanavalin A
CSC	Endothelzellen, isoliert aus der unveränderten Milz einer Mischlingshündin
DAB	Diaminobenzidin
DBA	Dolichos biflorus Agglutinin
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSH	Deutscher Schäferhund
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
FITC	Flureszeinisothiocyanat
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HSA	malignes Hämangioendotheliom
i.v.	intravenös
M	molar
o.g.	oben genannt
PBS	Phosphate buffered saline solution
pH	Säuregrad
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Tie-2	endothelialer Tyrosin Kinase Rezeptor

TRIS-Puffer	Trishydroxymethylamin-Puffer
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UEA 1	Ulex europaeus Agglutinin 1
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor, Synonym: VEGF-A
VEGF-R2	Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor 2
vWF	von Willebrand Factor
WGA	Wheat Germ Agglutinin
WPB	Weibel-Palade-Body
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
µ	Mikro ($1x10^{-3}$)

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Deutscher Schäferhund (Sony DSC P72, Sony Corporation, Tokio, Japan)
Abbildung 2	Röntgenbild eines Mischlingshundes mit Umfangsvermehrung der Milz (digitales Röntgengerät Gierth HF 400, Riesa; easyVet Praxisverwaltungssoftware, Hannover)
Abbildung 3	Edelstahlsiebe (Sony DSC P72, Sony Corporation, Tokio, Japan)
Abbildungen 4 bis 21	Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der untersuchten Zellen (Invert-Mikroskop Axiovert 25, Zeiss, Jena; Videokamera Inteq 000610, Inteq, Berlin)
Abbildungen 22 bis 47	Lichtmikroskopische Aufnahmen zu den immunhistochemischen Untersuchungen (Fluoreszenzlichtmikroskop Diaplan, Leitz, Wetzlar; Digitalkamera (DXM 1200), Nikon GmbH, Düsseldorf)
Abbildungen 48 bis 56	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zu den lektinzytochemischen Untersuchungen (Fluoreszenzlichtmikroskop Diaplan, Leitz, Wetzlar; Digitalkamera DXM 1200, Nikon GmbH, Düsseldorf)
Abbildungen 57 und 58	Lichtmikroskopische Aufnahmen von Semidünnschnitten (Fluoreszenzlichtmikroskop Diaplan, Leitz, Wetzlar; Digitalkamera DXM 1200, Nikon GmbH, Düsseldorf)
Abbildungen 59 bis 64	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der untersuchten Zellen (Transmissionselektronenmikroskop EM 10CR Zeiss, Jena)

11 Literaturverzeichnis

Ahmad, S.A., Liu, W., Jung, Y.D., Fan, F., Wilson, M., Reinmuth, N., Shaheen, R.M., Bucana, C.D., Ellis, L.M., 2001, The effects of angiopoietin-1 and -2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer. Cancer Res 61, 1255-1259.

Aird, W.C., 2003, Endothelial cell heterogeneity. Crit Care Med 31, S221-230.

Akhtar, N., Padilla, M.L., Dickerson, E.B., Steinberg, H., Breen, M., Auerbach, R., Helfand, S.C., 2004, Interleukin-12 inhibits tumor growth in a novel angiogenesis canine hemangiosarcoma xenograft model. Neoplasia 6, 106-116.

Alles, J.U., Bosslet, K., 1988, Immunocytochemistry of angiosarcomas. A study of 19 cases with special emphasis on the applicability of endothelial cell specific markers to routinely prepared tissues. Am J Clin Pathol 89, 463-471.

Alroy, J., Goyal, V., Skutelsky, E., 1987, Lectin histochemistry of mammalian endothelium. Histochemistry 86, 603-607.

Amann, A., Rieder, J., Fleischer, M., Niedermuller, P., Hoffmann, G., Amberger, A., Marth, C., Nigrovic, V., Puhringer, F., 2001, The influence of atracurium, cisatracurium, and mivacurium on the proliferation of two human cell lines in vitro. Anesth Analg 93, 690-696.

Arber, D.A., Strickler, J.G., Chen, Y.Y., Weiss, L.M., 1997, Splenic vascular tumors: a histologic, immunophenotypic, and virologic study. Am J Surg Pathol 21, 827-835.

Aronsohn, M., 1985, Cardiac hemangiosarcoma in the dog: a review of 38 cases. J Am Vet Med Assoc 187, 922-926.

Asahara, T., Kawamoto, A., 2004, Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. Am J Physiol Cell Physiol 287, C572-579.

Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., Isner, J.M., 1997, Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 275, 964-967.

Auerbach, R., Lewis, R., Shinners, B., Kubai, L., Akhtar, N., 2003, Angiogenesis assays: a critical overview. Clin Chem 49, 32-40.

Augustin-Voss, H.G., Pauli, B.U., 1992, Migrating endothelial cells are distinctly hyperglycosylated and express specific migration-associated cell surface glycoproteins. J Cell Biol 119, 483-491.

Augustin-Voss, H.G., Smith, C.A., Lewis, R.M., 1990, Phenotypic characterization of normal and neoplastic canine endothelial cells by lectin histochemistry. Vet Pathol 27, 103-109.

Aupperle, H., Marz, I., Ellenberger, C., Buschatz, S., Reischauer, A., Schoon, H.A., 2007, Primary and secondary heart tumours in dogs and cats. J Comp Pathol 136, 18-26.

Bahramsoltani, M., Plendl, J., 2004a, Ein neues in vitro Modell zur Quantifizierung der Angiogenese. Altex 21, 227-244.

Bahramsoltani, M., Plendl, J., 2004b, [A new in vitro model to quantify angiogenesis]. Altex 21, 227-244.

Bahramsoltani, M., Plendl, J., Janczyk, P., Custodis, P., Kaessmeyer, S., 2009, Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in vivo, ex vivo and in vitro - an overview. Altex 26, 95-107.

Bartel, H., Lametschwandtner, A., 2000, Intussusceptive microvascular growth in the lung of larval Xenopus laevis Daudin: a light microscope, transmission electron microscope and SEM study of microvascular corrosion casts. Anat Embryol (Berl) 202, 55-65.

Bayless, K.J., Davis, G.E., 2002, The Cdc42 and Rac1 GTPases are required for capillary lumen formation in three-dimensional extracellular matrices. J Cell Sci 115, 1123-1136.

Brown, K.J., Maynes, S.F., Bezos, A., Maguire, D.J., Ford, M.D., Parish, C.R., 1996, A novel in vitro assay for human angiogenesis. Lab Invest 75, 539-555.

Brown, N.O., 1985, Hemangiosarcomas. Vet Clin North Am Small Anim Pract 15, 569-575.

Brown, N.O., Patnaik, A.K., MacEwen, E.G., 1985, Canine hemangiosarcoma: retrospective analysis of 104 cases. J Am Vet Med Assoc 186, 56-58.

Budde, A., 1999. Immunhistochemischer Nachweis der Rezeptoren für Wachstumshormon und Oxytocin im bovinen Ovar. Dissertation. Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Carmeliet, P., 2000, Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat Med 6, 389-395.

Carmeliet, P., 2003, Angiogenesis in health and disease. Nat Med 9, 653-660.

Chalupowicz, D.G., Chowdhury, Z.A., Bach, T.L., Barsigian, C., Martinez, J., 1995, Fibrin II induces endothelial cell capillary tube formation. J Cell Biol 130, 207-215.

Cheung, A.L., Deng, W., 2008, Telomere dysfunction, genome instability and cancer. Front Biosci 13, 2075-2090.

Clark, R.A., Tonnesen, M.G., Gailit, J., Cheresh, D.A., 1996, Transient functional expression of alphaVbeta 3 on vascular cells during wound repair. Am J Pathol 148, 1407-1421.

Clifford, C.A., Hughes, D., Beal, M.W., Henry, C.J., Drobatz, K.J., Sorenmo, K.U., 2002, Vascular endothelial growth factor concentrations in body cavity effusions in dogs. J Vet Intern Med 16, 164-168.

Clifford, C.A., Hughes, D., Beal, M.W., Mackin, A.J., Henry, C.J., Shofer, F.S., Sorenmo, K.U., 2001, Plasma vascular endothelial growth factor concentrations in healthy dogs and dogs with hemangiosarcoma. J Vet Intern Med 15, 131-135.

Clifford, C.A., Mackin, A.J., Henry, C.J., 2000, Treatment of canine hemangiosarcoma: 2000 and beyond. J Vet Intern Med 14, 479-485.

Day, M.J., Lucke, V.M., Pearson, H., 1995, A review of pathological diagnoses made from 87 canine splenic biopsies. J Small Anim Pract 36, 426-433.

Dejana, E., 1996, Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. J Clin Invest 98, 1949-1953.

Dennler, M., Lange, E.M., Schmied, O., Kaser-Hotz, B., 2007, Imaging diagnosis--metastatic hemangiosarcoma causing cerebral hemorrhage in a dog. Vet Radiol Ultrasound 48, 138-140.

Djonov, V.G., Galli, A.B., Burri, P.H., 2000, Intussusceptive arborization contributes to vascular tree formation in the chick chorio-allantoic membrane. Anat Embryol (Berl) 202, 347-357.

Drake, C.J., 2003, Embryonic and adult vasculogenesis. Birth Defects Res C Embryo Today 69, 73-82.

Drews, U., 2006, Taschenatlas der Embryologie, Vol 2. Thieme, Stuttgart.

Egan, C.G., Caporali, F., Garcia-Gonzalez, E., Galeazzi, M., Sorrentino, V., 2008, Endothelial progenitor cells and colony-forming units in rheumatoid arthritis: association with clinical characteristics. Rheumatology (Oxford) 47, 1484-1488.

Feder, J., Marasa, J.C., Olander, J.V., 1983, The formation of capillary-like tubes by calf aortic endothelial cells grown in vitro. J Cell Physiol 116, 1-6.

Ferrenq, I., Tranqui, L., Vailhe, B., Gumery, P.Y., Tracqui, P., 1997, Modelling biological gel contraction by cells: mechanocellular formulation and cell traction force quantification. Acta Biotheor 45, 267-293.

Ferrer, L., Fondevila, D., Rabanal, R.M., Vilafranca, M., 1995, Immunohistochemical detection of CD31 antigen in normal and neoplastic canine endothelial cells. J Comp Pathol 112, 319-326.

Findlay, J.K., 1986, Angiogenesis in reproductive tissues. J Endocrinol 111, 357-366.

Fischer, D., Kissel, T., 2001, Histochemical characterization of primary capillary endothelial cells from porcine brains using monoclonal antibodies and fluorescein isothiocyanate-labelled lectins: implications for drug delivery. Eur J Pharm Biopharm 52, 1-11.

Flamme, I., Frolich, T., Risau, W., 1997, Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. J Cell Physiol 173, 206-210.

Folkman, J., 1984, What is the role of endothelial cells in angiogenesis? Lab Invest 51, 601-604.

Folkman, J., 1995, Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med 1, 27-31.

Folkman, J., 2002, Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Semin Oncol 29, 15-18.

Folkman, J., 2003, Fundamental concepts of the angiogenic process. Curr Mol Med 3, 643-651.

Folkman, J., Haudenschild, C., 1980, Angiogenesis in vitro. Nature 288, 551-556.

Folkman, J., Watson, K., Ingber, D., Hanahan, D., 1989, Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. Nature 339, 58-61.

Fosmire, S.P., Dickerson, E.B., Scott, A.M., Bianco, S.R., Pettengill, M.J., Meylemans, H., Padilla, M., Frazer-Abel, A.A., Akhtar, N., Getzy, D.M., Wojcieszyn, J., Breen, M., Helfand, S.C., Modiano, J.F., 2004, Canine malignant hemangiosarcoma as a model of primitive angiogenic endothelium. Lab Invest 84, 562-572.

Fruchter, A.M., Miller, C.W., O'Grady M, R., 1992, Echocardiographic results and clinical considerations in dogs with right atrial/auricular masses. Can Vet J 33, 171-174.

Fuchs-Schönleber, T., 1999. Etablierung eines in vitro-Modells des bovinen Corpus luteum. Dissertation. Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Gabor, L.J., Vanderstichel, R.V., 2006, Primary cerebral hemangiosarcoma in a 6-week-old dog. Vet Pathol 43, 782-784.

Ganss, R., 2006, Tumor stroma fosters neovascularization by recruitment of progenitor cells into the tumor bed. J Cell Mol Med 10, 857-865.

Gidlewski, J., Petrie, J.P., 2005, Therapeutic pericardiocentesis in the dog and cat. Clin Tech Small Anim Pract 20, 151-155.

Hammer, A.S., Couto, C.G., Filppi, J., Getzy, D., Shank, K., 1991a, Efficacy and toxicity of VAC chemotherapy (vincristine, doxorubicin, and cyclophosphamide) in dogs with hemangiosarcoma. J Vet Intern Med 5, 160-166.

Hammer, A.S., Couto, C.G., Swardson, C., Getzy, D., 1991b, Hemostatic abnormalities in dogs with hemangiosarcoma. J Vet Intern Med 5, 11-14.

Hannum, R.S., Ojeifo, J.O., Zwiebel, J.A., McLeskey, S.W., 2001, Isolation of tumor-derived endothelial cells. Microvasc Res 61, 287-290.

Hargis, A.M., Ihrke, P.J., Spangler, W.L., Stannard, A.A., 1992, A retrospective clinicopathologic study of 212 dogs with cutaneous hemangiomas and hemangiosarcomas. Vet Pathol 29, 316-328.

Harvey, K., Welch, Z., Kovala, A.T., Garcia, J.G., English, D., 2002, Comparative analysis of in vitro angiogenic activities of endothelial cells of heterogeneous origin. Microvasc Res 63, 316-326.

Ho, J.W., Pang, R.W., Lau, C., Sun, C.K., Yu, W.C., Fan, S.T., Poon, R.T., 2006, Significance of circulating endothelial progenitor cells in hepatocellular carcinoma. Hepatology 44, 836-843.

Holt, D., Van Winkle, T., Schelling, C., Prymak, C., 1992, Correlation between thoracic radiographs and postmortem findings in dogs with hemangiosarcoma: 77 cases (1984-1989). J Am Vet Med Assoc 200, 1535-1539.

Holthofer, H., 1983, Lectin binding sites in kidney. A comparative study of 14 animal species. J Histochem Cytochem 31, 531-537.

Holthofer, H., Virtanen, I., Kariniemi, A.L., Hormia, M., Linder, E., Miettinen, A., 1982, Ulex europaeus I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. Lab Invest 47, 60-66.

Ingram, D.A., Mead, L.E., Moore, D.B., Woodard, W., Fenoglio, A., Yoder, M.C., 2005, Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. Blood 105, 2783-2786.

Ingram, D.A., Mead, L.E., Tanaka, H., Meade, V., Fenoglio, A., Mortell, K., Pollok, K., Ferkowicz, M.J., Gilley, D., Yoder, M.C., 2004, Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. Blood 104, 2752-2760. Epub 2004 Jun 2729.

Johnson, K.A., Powers, B.E., Withrow, S.J., Sheetz, M.J., Curtis, C.R., Wrigley, R.H., 1989, Splenomegaly in dogs. Predictors of neoplasia and survival after splenectomy. J Vet Intern Med 3, 160-166.

Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O., 2002, Kreislaufsystem, In: Gratzl, M. (Ed.) Histologie. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, pp. 163-187.

Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka-Moll, W.M., Silver, M., Kearney, M., Li, T., Isner, J.M., Asahara, T., 2000, Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 3422-3427.

Kang, M.K., Park, N.H., 2001, Conversion of normal to malignant phenotype: telomere shortening, telomerase activation, and genomic instability during immortalization of human oral keratinocytes. Crit Rev Oral Biol Med 12, 38-54.

Käßmeyer, S., Plendl, J., 2009, Angiogenesis and vasculogenesis in the corpus luteum in vitro. Clin Hemorheol Microcirc 41, 83-101.

Käßmeyer, S., Plendl, J., Custodis, P., Bahramsoltani, M., 2009, New insights in vascular development: vasculogenesis and endothelial progenitor cells. Anat Histol Embryol 38, 1-11.

Kato, Y., Asano, K., Mizutani, I., Konno, T., Sasaki, Y., Kutara, K., Teshima, K., Edamura, K., Kano, R., Suzuki, K., Shibuya, H., Sato, T., Hasegawa, A., Tanaka, S., 2006, Gene expressions of canine angiopoietin-1 and -2 in normal tissues and spontaneous tumours. Res Vet Sci 81, 280-286.

Kaufman, D.S., Lewis, R.L., Hanson, E.T., Auerbach, R., Plendl, J., Thomson, J.A., 2004, Functional endothelial cells derived from rhesus monkey embryonic stem cells. Blood 103, 1325-1332.

Kessler, M., 2005a, Tumoren der Haut, In: Kessler, M. (Ed.) Kleintieronkologie Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen. Parey Buchverlag, Berlin, pp. 196-236.

Kessler, M., 2005b, Tumoren der Milz, In: Kessler, M. (Ed.) Kleintieronkologie Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen. Parey Buchverlag, Berlin, pp. 326-334.

Kessler, M., Maurus, Y., Kostlin, R., 1997a, Das Hämangiosarkom der Milz: klinische Befunde bei 52 Hunden. Tierärztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 25, 651-656.

Kessler, M., Tassani-Prell, M., Maurus, Y., 1997b, Tumoren der Bauch- und Beckenhöhle beim Hund: Klinische, röntgenologische und labordiagnostische Befunde bei 145 Patienten. Tierärztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 25, 472-479.

Kibria, G., Heath, D., Smith, P., Biggar, R., 1980, Pulmonary endothelial pavement patterns. Thorax 35, 186-191.

Koblizek, T.I., Weiss, C., Yancopoulos, G.D., Deutsch, U., Risau, W., 1998, Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. Curr Biol 8, 529-532.

Kopper, L., Hajdu, M., 2004, Tumor stem cells. Pathol Oncol Res 10, 69-73.

Korff, T., Augustin, H.G., 1998, Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. J Cell Biol 143, 1341-1352.

Korff, T., Augustin, H.G., 1999, Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting. J Cell Sci 112 (Pt 19), 3249-3258.

Korff, T., Kimmina, S., Martiny-Baron, G., Augustin, H.G., 2001, Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. Faseb J 15, 447-457.

Korff, T., Krauss, T., Augustin, H.G., 2004, Three-dimensional spheroidal culture of cytotrophoblast cells mimics the phenotype and differentiation of cytotrophoblasts from normal and preeclamptic pregnancies. Exp Cell Res 297, 415-423.

Kritzenberger, M., Wrobel, K.H., 2004, Histochemical in situ identification of bovine embryonic blood cells reveals differences to the adult haematopoietic system and suggests a close relationship between haematopoietic stem cells and primordial germ cells. Histochem Cell Biol 121, 273-289.

Kumar, S., West, D.C., Ager, A., 1987, Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels. Differentiation 36, 57-70.

Lamerato-Kozicki, A.R., Helm, K.M., Jubala, C.M., Cutter, G.C., Modiano, J.F., 2006, Canine hemangiosarcoma originates from hematopoietic precursors with potential for endothelial differentiation. Exp Hematol 34, 870-878.

Lamszus, K., 2004, Methods to study Angiogenesis in vitro, In: Black, M.K.a.P.M. (Ed.) Angiogenesis in Brain tumors. Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London, pp. 141-146.

Lawley, T.J., Kubota, Y., 1989, Induction of morphologic differentiation of endothelial cells in culture. J Invest Dermatol 93, 59S-61S.

Li, Q., Xu, X., Wang, Z., Liu, W., Li, Z., 2007, [Investigation of canine mesenchymal stem cells differentiation to vascular endothelial cell in vitro]. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi 24, 1348-1351.

Libbrecht, L., 2006, Hepatic progenitor cells in human liver tumor development. World J Gastroenterol 12, 6261-6265.

Liebich, H.-G., 2003, Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas der mikroskopischen Aatomie der Haussäugetiere., 4 Edition. Schattauer, Stuttgard/ New York.

Lienau, J., 2003. Etablierung von in vitro-Modellen der Angiogenese muriner und humaner Endothelzellen sowie deren Transfektion mit verschiedenen Plasmidkonstrukten. Dissertation. Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin.

Lienau, J., Kaletta, C., Teifel, M., Naujoks, K., Bhoola, K., Plendl, J., 2005, Morphology and transfection study of human microvascular endothelial cell angiogenesis: an in vitro three-dimensional model. Biol Chem 386, 167-175.

Londono-Vallejo, J.A., 2008, Telomere instability and cancer. Biochimie 90, 73-82.

Luttun, A., Carmeliet, G., Carmeliet, P., 2002, Vascular progenitors: from biology to treatment. Trends Cardiovasc Med 12, 88-96.

Madri, J.A., Williams, S.K., 1983, Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components. J Cell Biol 97, 153-165.

Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.F., Bartunkova, S., Wiegand, S.J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T.H., Papadopoulos, N., Daly, T.J., Davis, S., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D., 1997, Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. Science 277, 55-60.

Malinda, K.M., Ponce, L., Kleinman, H.K., Shackelton, L.M., Millis, A.J., 1999, Gp38k, a protein synthesized by vascular smooth muscle cells, stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. Exp Cell Res 250, 168-173.

Masson-Gadais, B., Houle, F., Laferriere, J., Huot, J., 2003, Integrin alphavbeta3, requirement for VEGFR2-mediated activation of SAPK2/p38 and for Hsp90-dependent phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells activated by VEGF. Cell Stress Chaperones 8, 37-52.

Masuzawa, M., Fujimura, T., Hamada, Y., Fujita, Y., Hara, H., Nishiyama, S., Katsuoka, K., Tamauchi, H., Sakurai, Y., 1999, Establishment of a human hemangiosarcoma cell line (ISO-HAS). Int J Cancer 81, 305-308.

Matsumoto, M., Nishinakagawa, H., Kurohmaru, M., Hayashi, Y., Otsuka, J., 1992, Pregnancy and lactation affect the microvasculature of the mammary gland in mice. J Vet Med Sci 54, 937-943.

Maxie, M.G., Robinson, F.W., 2007, Cardiovascular system, In: Maxie, M.G., Jubb, K.V.F. (Eds.) Pathology of domestic animals. Elsevier Saunders, Edinburgh; New York, pp. 102-103.

Meyer, G.T., Matthias, L.J., Noack, L., Vadas, M.A., Gamble, J.R., 1997, Lumen formation during angiogenesis in vitro involves phagocytic activity, formation and secretion of vacuoles, cell death, and capillary tube remodelling by different populations of endothelial cells. Anat Rec 249, 327-340.

Miettinen, M., Holthofer, H., Lehto, V.P., Miettinen, A., Virtanen, I., 1983, Ulex europaeus I lectin as a marker for tumors derived from endothelial cells. Am J Clin Pathol 79, 32-36.

Montesano, R., 1986, Cell-extracellular matrix interactions in morphogenesis: an in vitro approach. Experientia 42, 977-985.

Montesano, R., Orci, L., 1985, Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis in vitro. Cell 42, 469-477.

Montesano, R., Orci, L., Vassalli, P., 1983, In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. J Cell Biol 97, 1648-1652.

Montesano, R., Pepper, M.S., Vassalli, J.D., Orci, L., 1987, Phorbol ester induces cultured endothelial cells to invade a fibrin matrix in the presence of fibrinolytic inhibitors. J Cell Physiol 132, 509-516.

Necas, E., Sefc, L., Brecher, G., Bookstein, N., 1995, Hematopoietic reserve provided by spleen colony-forming units (CFU-S). Exp Hematol 23, 1242-1246.

Nehls, V., Herrmann, R., 1996, The configuration of fibrin clots determines capillary morphogenesis and endothelial cell migration. Microvasc Res 51, 347-364.

Ng, C.Y., Mills, J.N., 1985, Clinical and haematological features of haemangiosarcoma in dogs. Aust Vet J 62, 1-4.

Nicosia, R.F., Nicosia, S.V., Smith, M., 1994, Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. Am J Pathol 145, 1023-1029.

Nicosia, R.F., Ottinetti, A., 1990a, Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro. Lab Invest 63, 115-122.

Nicosia, R.F., Ottinetti, A., 1990b, Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study of angiogenesis in matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot. In Vitro Cell Dev Biol 26, 119-128.

Nicosia, R.F., Tchao, R., Leighton, J., 1982, Histotypic angiogenesis in vitro: light microscopic, ultrastructural, and radioautographic studies. In Vitro 18, 538-549.

Nowak, G., Karrar, A., Holmen, C., Nava, S., Uzunel, M., Hultenby, K., Sumitran-Holgersson, S., 2004, Expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 or Tie-2 on peripheral blood cells defines functionally competent cell populations capable of reendothelialization. Circulation 110, 3699-3707.

Ogilvie, G.K., Powers, B.E., Mallinckrodt, C.H., Withrow, S.J., 1996, Surgery and doxorubicin in dogs with hemangiosarcoma. J Vet Intern Med 10, 379-384.

Ohbayashi, A., Hiraga, T., Okubo, M., Murase, T., Matsushita, H., Hara, M., 1994, Characteristics of porcine coronary artery endothelial cells in culture: comparison with aortic endothelium. Biochem Biophys Res Commun 202, 504-511.

Okada, T., Higuchi, M., Takano, M., Maruyama, T., Imai, Y., Osawa, T., 1990, Anti-tumour efficacy of mouse spleen cells separated with Dolichos biflorus lectin (DBA) in experimental pulmonary metastasis of B16 melanoma cells. Br J Cancer 61, 241-249.

Papapetropoulos, A., Desai, K.M., Rudic, R.D., Mayer, B., Zhang, R., Ruiz-Torres, M.P., Garcia-Cardena, G., Madri, J.A., Sessa, W.C., 1997, Nitric oxide synthase inhibitors attenuate transforming-growth-factor-beta 1-stimulated capillary organization in vitro. Am J Pathol 150, 1835-1844.

Papetti, M., Herman, I.M., 2002, Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. Am J Physiol Cell Physiol 282, C947-970.

Patan, S., 2000, Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. J Neurooncol 50, 1-15.

Patan, S., 2004, Vasculogenesis and angiogenesis. Cancer Treat Res 117, 3-32.

Patan, S., Haenni, B., Burri, P.H., 1997, Implementation of intussusceptive microvascular growth in the chicken chorioallantoic membrane (CAM). Microvasc Res 53, 33-52.

Pedram, A., Razandi, M., Hu, R.M., Levin, E.R., 1997, Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. J Biol Chem 272, 17097-17103.

Pelletier, L., Regnard, J., Fellmann, D., Charbord, P., 2000, An in vitro model for the study of human bone marrow angiogenesis: role of hematopoietic cytokines. Lab Invest 80, 501-511.

Pepper, M.S., Montesano, R., Vassalli, J.D., Orci, L., 1991, Chondrocytes inhibit endothelial sprout formation in vitro: evidence for involvement of a transforming growth factor-beta. J Cell Physiol 146, 170-179.

Pepper, M.S., Spray, D.C., Chanson, M., Montesano, R., Orci, L., Meda, P., 1989, Junctional communication is induced in migrating capillary endothelial cells. J Cell Biol 109, 3027-3038.

Peters, K., Troyer, D., Kummer, S., Kirkpatrick, C.J., Rauterberg, J., 2002, Apoptosis causes lumen formation during angiogenesis in vitro. Microvasc Res 64, 334-338.

Pintar, J., Breitschwerdt, E.B., Hardie, E.M., Spaulding, K.A., 2003, Acute nontraumatic hemoabdomen in the dog: a retrospective analysis of 39 cases (1987-2001). J Am Anim Hosp Assoc 39, 518-522.

Plendl, J., 1997. Das gefäßendothel: Organ- und entwicklungsspezifische Heterogenität im in vitro Modell. Habilitationsschrift. Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Plendl, J., 2000, Angiogenesis and vascular regression in the ovary. Anat Histol Embryol 29, 257-266.

Plendl, J., Gilligan, B.J., Wang, S.J., Lewis, R., Shinners, B., Vandenbroeck, K., Auerbach, R., 2002a, Primitive endothelial cell lines from the porcine embryonic yolk sac. In Vitro Cell Dev Biol Anim 38, 334-342.

Plendl, J., Hartwell, L., Auerbach, R., 1993, Organ-specific change in Dolichos biflorus lectin binding by myocardial endothelial cells during in vitro cultivation. In Vitro Cell Dev Biol 29A, 25-31.

Plendl, J., Hirschberg, R., Hünigen, H., 2002b, Mechanismen der vaskulären Entwicklung und Regression. Tierärztl. Praxis 30, 243-253.

Plendl, J., Neumuller, C., Vollmar, A., Auerbach, R., Sinowatz, F., 1996, Isolation and characterization of endothelial cells from different organs of fetal pigs. Anat Embryol (Berl) 194, 445-456.

Plendl, J., Schoenleber, B., Schmahl, W., Murray, A.B., Sinowatz, F., 1992a, Sexual dimorphism of the kidney in the NMRI mouse as shown by Dolichos biflorus agglutinin labelling. Anat Histol Embryol 21, 118-126.

Plendl, J., Sinowatz, F., 1999, Angiogenese und Antiangiogenese: neue therapeutische Strategien. Tierärztliche Praxis Kleintiere 6.

Plendl, J., Sinowatz, F., Auerbach, R., 1992b, Die Heterogenität des vaskulären Endothels. Anat Histol Embryol 21, 256-262.

Ponder, B.A., Wilkinson, M.M., 1983, Organ-related differences in binding of Dolichos biflorus agglutinin to vascular endothelium. Dev Biol 96, 535-541.

Prymak, C., McKee, L.J., Goldschmidt, M.H., Glickman, L.T., 1988, Epidemiologic, clinical, pathologic, and prognostic characteristics of splenic hemangiosarcoma and splenic hematoma in dogs: 217 cases (1985). J Am Vet Med Assoc 193, 706-712.

Quirici, N., Soligo, D., Caneva, L., Servida, F., Bossolasco, P., Deliliers, G.L., 2001, Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. Br J Haematol 115, 186-194.

Rafii, S., 2000, Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. J Clin Invest 105, 17-19.

Rao, R.R., Johnson, A.V., Stice, S.L., 2007, Cell surface markers in human embryonic stem cells. Methods Mol Biol 407, 51-61.

Ribatti, D., 2004, The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. J Cell Mol Med 8, 294-300.

Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Roncali, L., Dammacco, F., 2002, Endothelial cell heterogeneity and organ specificity. J Hematother Stem Cell Res 11, 81-90.

Risau, W., 1995, Differentiation of endothelium. Faseb J 9, 926-933.

Risau, W., 1997, Mechanisms of angiogenesis. Nature 386, 671-674.

Risau, W., Flamme, I., 1995, Vasculogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol 11, 73-91.

Rodger, F.E., Young, F.M., Fraser, H.M., Illingworth, P.J., 1997, Endothelial cell proliferation follows the mid-cycle luteinizing hormone surge, but not human chorionic gonadotrophin rescue, in the human corpus luteum. Hum Reprod 12, 1723-1729.

Rüsse, I., Sinowatz, F., 1998, Lehrbuch der Embryologie der Haustiere, 2 Edition. Paul Parey, Berlin/Hamburg.

Sanladerer, B., 1994. Maligne Hämangioendotheliome beim Hund : eine retrospektive Untersuchung klinischer Fälle aus dem Ontario Veterinary College in Guelph, Kanada, 1983 - 1992. Dissertation. Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Schatteman, G.C., Awad, O., 2004, Hemangioblasts, angioblasts, and adult endothelial cell progenitors. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 276, 13-21.

Schultheiss, P.C., 2004, A retrospective study of visceral and nonvisceral hemangiosarcoma and hemangiomas in domestic animals. J Vet Diagn Invest 16, 522-526.

Schuster, S., 2002. Zelluläre und molekulare Mechanismen der in vitro-Angiogenese: Lichtmikroskopische, elektronenmikroskopische, immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen. Dissertation. Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin.

Shantsila, E., Watson, T., Tse, H.F., Lip, G.Y., 2007, Endothelial colony forming units: are they a reliable marker of endothelial progenitor cell numbers? Ann Med 39, 474-479.

Smeak, D., 2005, Kardiale und mesenterale Tumoren, In: Kessler, M. (Ed.) Kleintieronkologie Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen. Parey Buchverlag, Berlin, pp. 377-383.

Smith, A.N., 2003, Hemangiosarcoma in dogs and cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract 33, 533-552, vi.

Smith, R.A., 1990, Evaluation of cross-species reactivity of antibodies to human antigens in animal models using immunoperoxidase techniques. J. Histotechnol. 13, 255 –269.

Soldi, R., Mitola, S., Strasly, M., Defilippi, P., Tarone, G., Bussolino, F., 1999, Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. Embo J 18, 882-892.

Sorenmo, K.U., Baez, J.L., Clifford, C.A., Mauldin, E., Overley, B., Skorupski, K., Bachman, R., Samluk, M., Shofer, F., 2004, Efficacy and toxicity of a dose-intensified doxorubicin protocol in canine hemangiosarcoma. J Vet Intern Med 18, 209-213.

Sorenmo, K.U., Duda, L., Barber, L., Cronin, K., Sammarco, C., Usborne, A., Goldschmidt, M., Shofer, F., 2000, Canine hemangiosarcoma treated with standard chemotherapy and minocycline. J Vet Intern Med 14, 395-398.

Srebernik, N., Appleby, E.C., 1991, Breed prevalence and sites of haemangioma and haemangiosarcoma in dogs. Vet Rec 129, 408-409.

Stahl, A., Wu, X., Wenger, A., Klagsbrun, M., Kurschat, P., 2005, Endothelial progenitor cell sprouting in spheroid cultures is resistant to inhibition by osteoblasts: a model for bone replacement grafts. FEBS Lett 579, 5338-5342.

Stahlmann, R., Kuhner, S., Shakibaei, M., Schwabe, R., Flores, J., Evander, S.A., van Sickle, D.C., 2000, Chondrotoxicity of ciprofloxacin in immature beagle dogs: immunohistochemistry, electron microscopy and drug plasma concentrations. Arch Toxicol 73, 564-572.

Tamanini, C., De Ambrogi, M., 2004, Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. Reprod Domest Anim 39, 206-216.

Tao, S.C., Li, Y., Zhou, J., Qian, J., Schnaar, R.L., Zhang, Y., Goldstein, I.J., Zhu, H., Schneck, J.P., 2008, Lectin microarrays identify cell-specific and functionally significant cell surface glycan markers. Glycobiology 10, 761-769.

Taraszewska, A., Matyja, E., 2007, Lectin binding pattern in meningiomas of various histological subtypes. Folia Neuropathol 45, 9-18.

Thamm, D.H., Dickerson, E.B., Akhtar, N., Lewis, R., Auerbach, R., Helfand, S.C., MacEwen, E.G., 2006, Biological and molecular characterization of a canine hemangiosarcoma-derived cell line. Res Vet Sci 81, 76-86.

Thorin, E., Shatos, M.A., Shreeve, S.M., Walters, C.L., Bevan, J.A., 1997, Human vascular endothelium heterogeneity. A comparative study of cerebral and peripheral cultured vascular endothelial cells. Stroke 28, 375-381.

U'Ren, L.W., Biller, B.J., Elmslie, R.E., Thamm, D.H., Dow, S.W., 2007, Evaluation of a novel tumor vaccine in dogs with hemangiosarcoma. J Vet Intern Med 21, 113-120.

Vailhe, B., Vittet, D., Feige, J.J., 2001, In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. Lab Invest 81, 439-452.

Wagner, D.D., 1993, The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-selectin. Thromb Haemost 70, 105-110.

Ward, H., Fox, L.E., Calderwood-Mays, M.B., Hammer, A.S., Couto, C.G., 1994, Cutaneous hemangiosarcoma in 25 dogs: a retrospective study. J Vet Intern Med 8, 345-348.

Ware, W.A., Hopper, D.L., 1999, Cardiac tumors in dogs: 1982-1995. J Vet Intern Med 13, 95-103.

Warren, A.L., Summers, B.A., 2007, Epithelioid variant of hemangioma and hemangiosarcoma in the dog, horse, and cow. Vet Pathol 44, 15-24.

Waters, D.J., Hayden, D.W., Walter, P.A., 1989, Intracranial lesions in dogs with hemangiosarcoma. J Vet Intern Med 3, 222-230.

Wood, C.A., Moore, A.S., Gliatto, J.M., Ablin, L.A., Berg, R.J., Rand, W.M., 1998, Prognosis for dogs with stage I or II splenic hemangiosarcoma treated by splenectomy alone: 32 cases (1991-1993). J Am Anim Hosp Assoc 34, 417-421.

Xie, Z., Chin, L.S., 2008, Molecular and cell biology of brain tumor stem cells: lessons from neural progenitor/stem cells. Neurosurg Focus 24, E25.

Yang, S., Graham, J., Kahn, J.W., Schwartz, E.A., Gerritsen, M.E., 1999, Functional roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels. Am J Pathol 155, 887-895.

Yoon, J., Choi, S.C., Park, C.Y., Shim, W.J., Lim, D.S., 2007, Cardiac side population cells exhibit endothelial differentiation potential. Exp Mol Med 39, 653-662.

Young, H.E., Black, A.C., Jr., 2004, Adult stem cells. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 276, 75-102.

Young, H.E., Duplaa, C., Romero-Ramos, M., Chesselet, M.F., Vourc'h, P., Yost, M.J., Ericson, K., Terracio, L., Asahara, T., Masuda, H., Tamura-Ninomiya, S., Detmer, K., Bray, R.A., Steele, T.A., Hixson, D., el-Kalay, M., Tobin, B.W., Russ, R.D., Horst, M.N., Floyd, J.A., Henson, N.L., Hawkins, K.C., Groom, J., Parikh, A., Blake, L., Bland, L.J., Thompson, A.J., Kirincich, A., Moreau, C., Hudson, J., Bowyer, F.P., 3rd, Lin, T.J., Black, A.C., Jr., 2004, Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering. Cell Biochem Biophys 40, 1-80.

Young, M.R., 2004, Tumor skewing of CD34+ progenitor cell differentiation into endothelial cells. Int J Cancer 109, 516-524.

Zhu, W.H., Guo, X., Villaschi, S., Francesco Nicosia, R., 2000, Regulation of vascular growth and regression by matrix metalloproteinases in the rat aorta model of angiogenesis. Lab Invest 80, 545-555.

12 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Frau Prof Dr. Johanna Plendl für die Überlassung des interessanten Themas, die professionelle Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.
Vor allem möchte ich mich für die unendliche Geduld und Motivation in allen Phasen dieser Arbeit bedanken. Auch die freundliche Unterstützung über den Rahmen dieser Arbeit hinaus wird mir immer in Erinnerung bleiben.

Frau Dr. Hana Hünigen danke ich für die erfahrene Hilfe bei der Planung, Durchführung und Auswertung der zytologischen Untersuchungen. Die vielen Gespräche und Anregungen waren wertvolle Impulse für die Erstellung dieser Arbeit.

Für die zügige und perfekte Einarbeitung in die Routinen der Zellkultur danke ich Frau Dr. Sabine Käßmeyer. Ganz besonders möchte ich mich bei ihr für die umfassende Unterstützung in der Abschlussphase dieser Arbeit bedanken.

Für die bei allen Arbeiten in der Zellkultur erhaltene professionelle Unterstützung gilt mein Dank Frau Edith Gröninger.

Frau Ilona Küster-Krehahn möchte ich für unermüdliche und professionelle Einführung in sämtliche immunzytochemische Arbeiten und ihre konstruktiven Ideen danken.

Bei Frau Karin Schütz will ich mich für ihre jederzeit tatkräftige Unterstützung in der Immunhistochemie und ihr ganz besonders herzliches Entgegenkommen bedanken.

Frau Monika Sachtleben danke ich für die ausgezeichnete und umfassende Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Mein besonderer Dank geht auch an die Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere, Freie Universität Berlin, unter der Leitung von Prof. Dr. Leo Brunnberg und Prof. Dr. Barbara Kohn für die hervorragende Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Organe.

Nicht zuletzt möchte ich die Unterstützung meiner Familie nicht unerwähnt lassen ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe.
Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, 30.03.2009

Detlef Kühn