

2 Literaturübersicht

2.1 Blutgefäße

Das Gefäßsystem besteht aus dem arteriellen und dem venösen System, die über ein weit verzweigtes Kapillarnetz miteinander in Verbindung stehen.

Die Gefäße des arteriellen und venösen Systems sind aus der Tunica interna, der Tunica media und der Tunica adventitia zusammengesetzt.

Die das gesamte Gefäßsystem auskleidenden Endothelzellen repräsentieren mit dem subendothelialen Bindegewebe die Tunica interna.

Die Kapillaren der Endstrombahn bestehen nur aus den Endothelzellen und einer Basalmembran sowie, jedoch nicht in allen Organen, aus anliegenden Perizyten.

2.1.1 Endothel

Die Endothelzellen kleiden das gesamte Blutgefäßsystem aus und liegen somit zwischen dem Blut und dem umliegenden Gewebe. Die meisten Abschnitte der Blutgefäße werden von einem kontinuierlichen Endothel bedeckt. In bestimmten Kapillaren, beispielsweise jenen des Magen-Darm-Kanals und der endokrinen Drüsen, weisen die Endothelzellen intrazelluläre Poren mit einem Durchmesser von 70 – 80 nm auf. Das Endothel der Leber- und Milzsinusoide ist mit interzellulären Lücken mit einer Weite von 0,1 – 0,5 µm versehen [HEES, 2000].

Endothelzellen weisen Membranrezeptoren für verschiedene Moleküle, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, Koagulantien und Antikoagulantien, „Low Density Lipoprotein“ (LDL), Metaboliten (z.B. NO und Serotonin) und Hormone (z.B. Endothelin-1) auf [RIBATTI et al., 2002a]. Im Blut zirkulierende Zellen wie Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten gelangen per Adhäsion an Endothelzellen und Migration in die verschiedenen Gewebe. Insbesondere die Fernmetastasierung von Tumoren und die Verteilung von Viren, Bakterien und Parasiten erfolgt über das Gefäßsystem. Zahlreiche Zellen und Mikroorganismen werden aus dem Gefäßsystem via Endothel nur in bestimmte Gewebe aufgenommen und damit selektiv im Organismus verteilt [ZETTER, 1989].

Im Rahmen der Angiogenese kommt es zur Aktivierung der Endothelzellen. Diese ist mit einer Veränderung des Phänotyps verbunden. Die Expression von Adhäsionsmolekülen wie beispielsweise E- und P-Selektin durch Endothelzellen erfolgt, durch Zytokine stimuliert, während einer Entzündungsreaktion [SPRINGER, 1994]. Wachstumsfaktoren wie der „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) und „Fibroblast Growth Factor-2“ (FGF-2) induzieren in Endothelzellen z.B. die Expression des Integrin $_{\alpha V\beta 3}$. Über Integrin $_{\alpha V\beta 3}$ erfolgt die Bindung der Endothelzellen an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix (z.B. Vitronektin) und die Migration der Endothelzellen im Rahmen der Angiogenese [SENGER et al., 1996].

Endothelzellen stellen eine sehr heterogene Population dar. Unterschiede bestehen zwischen Endothelzellen verschiedener Spezies, verschiedenen Alters und Geschlechts, verschiedener Gewebe sowie großer und kleiner Gefäße [AIRD et al., 1997]. Eine Heterogenität des Endothels ist auch innerhalb der Kapillaren eines Organs zu beobachten. So weisen die peritubulären Kapillaren der Niere ein fenestriertes Endothel auf, während die Kapillaren der Glomeruli mit einem diskontinuierlichen und die Kapillaren der übrigen Regionen der Niere mit einem kontinuierlichen Endothel ausgekleidet sind [RISAU, 1995]. Diese Heterogenität ist einerseits genetisch bedingt, andererseits auf die Einflüsse des umliegenden Gewebes zurückzuführen [AIRD et al., 1997]. 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 [RIBATTI et al., 2002a].

Der Phänotyp der Endothelzellen ist nicht stabil und verändert sich, wenn diese aus dem umgebenden Milieu entfernt werden. So ist es möglich, dass isolierte Endothelzellen in Kultur ihre gewebespezifischen Charakteristika verlieren [BORSUM et al., 1982]. ZHU et al. [1991] kultivierten murine Endothelzellen aus der Aorta auf der extrazellulären Matrix aus der Lunge, wodurch die Endothelzellen zur Expression von für die Lunge spezifischen Adhäsionsmolekülen induziert wurden.

2.1.2 Perizyten

Größere Kapillaren sowie prä- und postkapilläre Arteriolen und Venolen sind häufig von Perizyten umgeben. Diese meist abgeflachten Zellen liegen entweder der Basalmembran von außen an oder sind in diese eingebettet [RIBATTI et al., 2002a]. Die Kontaktaufnahme mit den Endothelzellen erfolgt über feine Fortsätze, die sie durch die Basalmembran hindurch

senden [LITTLE et al., 1995]. Es wird angenommen, dass die Perizyten aus perivaskulär gelagerten mesenchymalen Zellen hervorgehen [ALLT und LAWRENSON, 2001]. Sie weisen morphologische Ähnlichkeiten mit glatten Muskelzellen in Form kontraktile Proteine auf. Sie produzieren und reagieren auf vasoaktive Substanzen. Daher wird den Perizyten auch eine Fähigkeit zur vasomotorischen Regulation zugeschrieben [HIRSCHI und D'AMORE, 1996]. Sie bilden verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Kollagen Typ I, III und IV und Fibronectin [SHEPRO und MOREL, 1993]. Perizyten wirken durch die Sekretion des „Transforming Growth Factor- β “ (TGF- β) hemmend auf die Proliferation der Endothelzellen in vitro [FOLKMAN und D'AMORE, 1996] und werden somit für die Maturation der Kapillaren verantwortlich gemacht [RIBATTI et al., 2002a]. Bei Hypoxie-induzierter Expansion der Gefäße können sich Perizyten zu glatten Muskelzellen differenzieren, wodurch sich die von diesen Perizyten umgebenen Kapillaren zu Arteriolen entwickeln [CROCKER et al., 1970]. Ebenso ist eine Differenzierung von Perizyten zu Adipozyten, Osteoblasten und Phagozyten möglich [HIRSCHI und D'AMORE, 1996].

2.1.3 Basalmembran

Die Basalmembran ist eine spezialisierte Form der extrazellulären Matrix. Endothel- und Epithelzellen sitzen einer Basalmembran auf [TILLING et al., 2002].

Die Hauptbestandteile der Basalmembran sind Kollagen Typ IV, Glykoproteine, wie Laminin, Entactin und Fibronectin und Glykosaminoglykane (z.B. Chondroitinsulfatglykan) [GRANT und KLEINMAN, 1997].

Im Blutgefäßsystem erfolgt die Synthese und Sekretion dieser Komponenten der Basalmembran vor allem durch die Endothelzellen. Ferner sind Perizyten und Fibroblasten an der Synthese der Bestandteile der Basalmembran beteiligt [HIRSCHI und D'AMORE, 1996; RIBATTI et al., 2002a].

Kollagen Typ IV, das aus drei Polypeptidketten besteht, weist drei Hauptdomänen auf. Zwischen der 7S-Domäne am N-Terminus und der NCI-Domäne am C-Terminus befindet sich ein flexibles Triplehelix-Segment [SADO et al., 1998]. Das Triplehelix-Segment enthält Bindungsstellen für das von Endothelzellen exprimierte Integrin $_{\alpha 1\beta 1}$ und Integrin $_{\alpha 2\beta 1}$ [VANDENBERG et al., 1991].

Laminin setzt sich aus drei verschiedenen Polypeptidketten zusammen. Es sind vierzehn Isoformen des Laminins (1 – 14) bekannt [TUNGGAL et al., 2000]. Verschiedene Isoformen des Laminins, z.B. die Isoformen 8 und 9, werden von Endothelzellen produziert [AUMAILLEY und SMYTH, 1998]. Die Bindung der Endothelzellen an Laminin erfolgt über verschiedene Integrine, vor allem die Integrine $_{\alpha 3\beta 1}$ und $_{\alpha 6\beta 1}$ [FUJIWARA et al., 2001].

Fibronectin ist ein Dimer aus sehr ähnlichen, aber nicht identischen Untereinheiten mit verschiedenen adhäsiven Funktionen. Es stabilisiert Zell-Zell-Verbindungen und die Anhaftung der Endothelzellen an die Basalmembran. Außerdem beeinflusst es die Struktur des Zytoskeletts und stimuliert die Migration der Endothelzellen [MIYAMOTO et al., 1998].

Abgesehen von der für die Endothelzellen adhäsiven Funktion der Basalmembran, dient sie als selektiv permeabler Ultrafilter, welcher beispielsweise hochmolekulare Blutproteine nicht oder nur in geringem Umfang durchlässt. Außerdem verleiht sie aufgrund ihrer Elastizität den Kapillaren eine gewisse Dehnbarkeit [BUCHER und WARTENBERG, 1989].

2.2 Angiogenese und Antiangiogenese

2.2.1 Mechanismen der Blutgefäßbildung

2.2.1.1 Vaskulogenese

Die Entstehung primärer Blutgefäße aus sich in situ differenzierenden hämatopoetischen Stammzellen wird als Vaskulogenese bezeichnet [RISAU, 1997].

Die embryonale Entwicklung des Gefäßsystems beginnt mit der Ausbildung sogenannter Blutinseln, die unter dem Einfluß von Faktoren der „Fibroblast Growth Factor“ (FGF)-Familie aus mesodermalen Zellen des Dottersacks gebildet werden. Diese Zellen werden als Hämangioblasten bezeichnet. Sie bilden den Ursprung für die hämatopoetischen Stammzellen und die endothelialen Vorläuferzellen, die Angioblasten [RISAU und FLAMME, 1995]. Verschiedene Membranproteine, wie beispielsweise der VEGF-Rezeptor-2 (KDR/flk-1) oder der Angiopoietin-Rezeptor Tie-2 und CD34, werden sowohl von hämatopoetischen Stammzellen als auch von Angioblasten exprimiert [CHOI et al., 1998]. Die Differenzierung der Hämangioblasten zu Angioblasten wird durch VEGF, welcher bei Erscheinen der ersten Blutinseln im extraembryonalen Endoderm und Mesoderm exprimiert wird, über den VEGF-Rezeptor-2 vermittelt [PATAN, 2000]. Die Wirkung des VEGF über den VEGF-Rezeptor-1 (Flt-1) spielt erst im weiteren Ablauf der Vaskulogenese eine Rolle. So kommt es bei Mäusen, denen der VEGF-Rezeptor-1 fehlt, zur Differenzierung der Hämangioblasten zu Angioblasten, aber nicht zur Ausbildung eines funktionierenden Gefäßsystems [RISAU, 1997]. Hierfür ist die Fähigkeit zur Bildung eines Lumens notwendig, welche die Angioblasten im Gegensatz zu differenzierten Endothelzellen nicht aufweisen [COFFIN et al., 1991].

Der Mechanismus der Vaskulogenese ist nicht auf die Embryonalperiode beschränkt. Endotheliale Vorläuferzellen (Endothelial Progenitor Cells, EPC) wurden auch im adulten Organismus im Blut nachgewiesen [ASAHARA et al., 1997; SHI et al., 1998; LIN et al., 2000]. Diese Zellen stellen 0,1 bis 0,5% der zirkulierenden mononukleären Zellen dar und differenzieren in vitro unter selektiven Bedingungen zu Endothelzellen [KALKA et al., 1999]. Die Mobilisierung der knochenmarkständigen EPC wird durch eine Entzündung [LEDNEY et al., 1985], Ischämie und den dabei produzierten Zytokinen, insbesondere dem „Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor“ (GM-CSF), hervorgerufen [TAKAHASHI et al., 1999]. Die in vitro-Kultivierung der EPC zeigte, dass diese Zellen innerhalb von sieben bis zehn Tagen die für Endothelzellen typischen Membranproteine, wie CD31 und VE-Cadherin, exprimierten und die charakteristische Morphologie der Endothelzellen aufwiesen [KALKA et al., 2000a; PLENDL et al., 2002a].

2.2.1.2 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 durch so genannte Sprossung von Endothelzellen erfolgen oder durch Teilung eines vorhandenen Gefäßlumens, welche als Intussuszeption bezeichnet wird [PATAN, 2000].

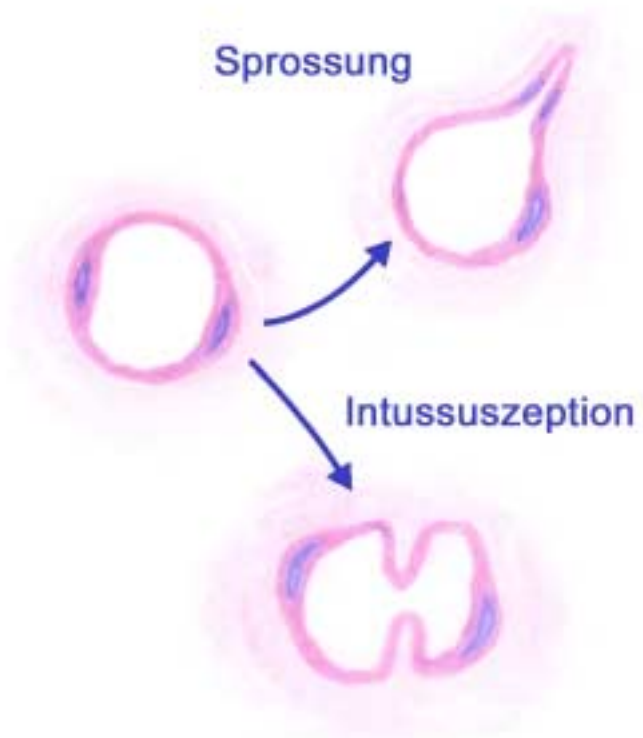


Abb.1 Mechanismen der Angiogenese: Angiogenese durch Sprossung der Endothelzellen und durch Teilung eines vorhandenen Lumens, der sog. Intussuszeption (Zeichnung: Diemut Starke)

2.2.1.2.1 Bildung des Endothelzellsprosses

Angiogenese durch die so genannte Sprossung von Endothelzellen vollzieht sich in einer Kaskade bestimmter Vorgänge. Als Reaktion auf einen oder mehrere angiogene Stimuli kommt es in den Endothelzellen zur Aktivierung, Produktion und Sekretion proteolytischer Enzyme [AUSPRUNK und FOLKMAN, 1977], wie beispielsweise dem Plasminogenaktivator und der Matrixmetalloproteinase [KALKA et al., 2000b], die zur Degradation der Basalmembran in diesem Bereich führen. Im weiteren Verlauf verändert sich die üblicherweise glatte basolaterale Membran der Endothelzellen. Es werden Pseudopodien ausgebildet, die durch die desintegrierte Basalmembran in die Extrazellulärmatrix vordringen. Nachfolgend kommt es durch zur Akkumulation von Endothelzellen im Bereich der fragmentierten Basalmembran [AUSPRUNK und FOLKMAN, 1977].

Durch den weiteren Abbau der Basalmembran lösen sich die Endothelzellen von dieser und migrieren, dem angiogenen Stimulus folgend, in das umliegende Gewebe [FOLKMAN, 1984]. Die Endothelzellen wandern dabei in engem Kontakt miteinander aus dem Gefäß aus, so dass ein Ausströmen des Blutes nicht möglich ist. Die Verlängerung des so entstandenen Endothelzellsprosses erfolgt durch die Proliferation der Endothelzellen an dessen Basis.

Der Kontakt der Endothelzellen zur Extrazellulärmatrix stimuliert in diesen die Synthese und Sekretion der verschiedenen Komponenten der Basalmembran. Dadurch kommt es zur Ausbildung einer Basalmembran entlang des neuen Sprosses [AUSPRUNK und FOLKMAN, 1977].

2.2.1.2.2 Bildung des Lumens

Nur sehr wenige Studien, vor allem in vitro-Untersuchungen, haben sich mit den Grundlagen der Lumenbildung innerhalb des neuen Kapillarsprosses beschäftigt.

FOLKMAN und HAUDENSCHILD [1980] untersuchten die Bildung kapillarähnlicher Strukturen und die Entwicklung eines Lumens bei kultivierten, mikrovaskulären Endothelzellen aus der bovinen Nebennierenrinde und der humanen Vorhaut. Bei der phasenkontrastmikroskopischen Untersuchung der im Monolayer organisierten Endothelzellen beobachteten sie zunächst die Bildung von zylindrischen Vakuolen in vereinzelt Endothelzellen. Im weiteren Verlauf entwickelten sich in angrenzenden Endothelzellen ähnliche Vakuolen. Durch das Zusammenfließen der Vakuolen benachbarter Zellen entwickelte sich eine zunehmend längere, tubuläre Struktur.

Nachdem vier bis fünf Endothelzellen an einer tubulären Struktur beteiligt waren, kam es zur Ausbildung von Verzweigungen. Auf diese Weise war innerhalb von fünf bis zehn Tagen der ursprüngliche, endotheliale Monolayer durch ein Netzwerk aus tubulären Strukturen ersetzt worden.

Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass innerhalb dieser Strukturen ein kontinuierliches, von der endothelialen Membran begrenztes Lumen vorhanden war. Diese Lumina waren in der frühen Phase ihrer Entwicklung mit Membrananteilen, sowie mit nicht genauer definiertem fibrillärem und amorphem Material angefüllt. Ebenso wurde dieses Material in den Vakuolen nachgewiesen. Dieses Material schien sich im weiteren Verlauf aufzulösen, da die tubulären Strukturen letztlich ein echtes Lumen aufwiesen.

Die Bildung von Vakuolen in kultivierten Endothelzellen wurde auch von MEYER et al. [1997] beobachtet. Die auf Kollagengel ausgesäten Endothelzellen aus der humanen Nabelschnur (HUVEC) migrierten nach zwei bis vier Stunden in das Gel und bildeten strangartige Strukturen. Mittels transmissionselektronenmikroskopischer Untersuchungen wurden innerhalb der migrierenden Endothelzellen verschieden große, häufig membrangebundene Vakuolen, die diffuses fibrilläres Material und Membrananteile enthielten, nachgewiesen. Während der Bildung der strangartigen Strukturen waren in den Zellen zunächst zahlreiche kleine (Durchmesser: 0,1 – 0,5 μm) Vakuolen vorhanden. Im weiteren Verlauf nahm die Anzahl der Vakuolen ab, während ihr Durchmesser stetig größer wurde. Diese offenbar miteinander verschmelzenden Vakuolen akkumulierten in den Zellen in dem Bereich, der dem Interzellularraum zugewandt war. Später fusionierten diese Vakuolen mit der Plasmamembran. Dabei wurde der Inhalt der Vakuolen in den Interzellularraum abgegeben, wodurch ein Lumen innerhalb des Endothelzellstranges ausgebildet wurde.

PETERS et al. [2002] säten Endothelzellen (HUVEC) in mit Gelatine beschichteten Kulturschalen aus und überschichteten diese mit einem Kollagengel. Nach drei Tagen hatte sich in den Kulturschalen ein Netzwerk tubulärer, endothelialer Strukturen entwickelt.

Die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung zeigte, dass im Zentrum dieser Strukturen ein Lumen vorhanden war. Diese Lumina waren mit apoptotischen Zellen, Zelltrümmern und amorphem Material angefüllt. Die Autoren vermuteten, dass der programmierte Zelltod durch den Kontaktverlust der im Zentrum der Strukturen gelegenen Endothelzellen zur Extrazellulärmatrix initialisiert wurde. Dieser Prozess wurde von MEREDITH et al. [1993] als Anoikis (*griech.*: Heimatlosigkeit) bezeichnet.

2.2.1.2.3 Intussuszeption

Die Intussuszeption kommt in vielen Geweben und in Tumoren vor. Sie ist zu beobachten, wenn nach umfangreicher Endothelzellproliferation ein relativ weitlumiges Gefäß entstanden ist. Die neuen Blutgefäße entstehen nun dadurch, dass das Lumen durch das Einwachsen von Pfeilern aus Endothelzellen mit extrazellulärer Matrix unterteilt wird [RISAU, 1997].

In einem ersten Schritt ziehen sich die Endothelzellen von einem umschriebenen longitudinalen Abschnitt der Gefäßwand zurück. In diesem nun endothelzellefreien Bereich der Gefäßwand stülpt sich die Basalmembran in das umgebende Gewebe aus. Diese Ausstülpung wird zunächst von Ausläufern benachbarter Endothelzellen provisorisch ausgekleidet. Da im Bereich der Ausstülpung der Abbau der Basalmembran erfolgt, kommt es im Folgenden zur Migration von Endothelzellen in die Ausstülpung. Im weiteren Verlauf schnürt sich der ausgestülpte Teil des Gefäßes durch den Einzug der extrazellulären Matrix von dem Muttergefäß ab, wodurch ein neues, kollaterales Gefäß entsteht [PATAN, 2000].

2.2.2 Regulation der Angiogenese

Die Angiogenese wird durch verschiedene lösliche, stimulierende und inhibierende Faktoren reguliert, die para- oder autokrin auf die Gefäße wirken [PEPPER, 1997; PLENDL et al., 2002b]. Diese Faktoren können direkt auf die Endothelzellen oder indirekt durch die Stimulation anderer Zellen, wie beispielsweise Lymphozyten oder Makrophagen, pro- oder antiangiogen wirken. Als proangiogene Faktoren im engeren Sinne werden Substanzen bezeichnet, die während der Angiogenese nachweisbar sind und deren erhöhte Konzentration eine gesteigerte Angiogenese zur Folge hat. Auch sollte die Neutralisation dieser Stoffe oder ihrer Rezeptoren eine Hemmung der Angiogenese zur Folge haben [RISAU, 1996]. Als antiangiogene Faktoren werden Substanzen bezeichnet, die entweder direkt eine angiogene Antwort der Endothelzellen hemmen oder indirekt durch die Hemmung bestimmter angiogener Substanzen wirken [FOLKMAN und INGBER, 1992].

2.2.2.1 Proangiogene Faktoren

Eine proangiogene Wirkung wurde in der Literatur für zahlreiche lösliche Faktoren beschrieben [RIBATTI et al., 1999; DAMMACCO et al., 2000; SUHARDJA und HOFFMAN, 2003; LI

et al., 2003]. Im Folgenden ist eine Auswahl der wichtigsten endogenen proangiogenen Faktoren zusammengestellt:

<i>Angiogenin</i>	<i>Insulin-like Growth Factor 1, IGF-1</i>
<i>Angiopoietin-1, Ang-1</i>	<i>Interleukine (IL 1,2,6 und 8)</i>
<i>Angiotropin</i>	<i>Placenta Growth Factor, PIGF</i>
<i>Epidermal Growth Factor, EGF</i>	<i>Platelet Derived Growth Factor, PDGF</i>
<i>Erythropoietin</i>	<i>Prostaglandine (E1 und E2)</i>
<i>Fibroblast Growth Factor, FGF (1 und 2)</i>	<i>Substanz P</i>
<i>Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor, GM-CSF</i>	<i>Transforming Growth Factor, TGF (α und β)</i>
<i>Granulocyte Colony Stimulating Factor, G-CSF</i>	<i>Tumor Necrosis Factor α, TNF-α</i>
<i>Hepatocyte Growth Factor, HGF</i>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF</i>

2.2.2.2 Wirkung der wichtigsten endogenen proangiogenen Faktoren

Als wichtigste proangiogene Faktoren gelten derzeit VEGF, FGF-1 und -2, Ang-1 und PDGF. Der *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)* wird von Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen gebildet [JOSKO et al., 2000].

Die VEGF-Genfamilie umfaßt sechs Mitglieder. Diese sind neben dem VEGF, welcher auch als VEGF-A bezeichnet wird, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und der *Placenta Growth Factor (PIGF)* [SUHARDJA und HOFFMAN, 2003].

Bislang sind fünf verschiedene Isoformen des VEGF identifiziert worden. Dabei handelt es sich um VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ [ENOMOTO et al., 2003], wobei VEGF₁₆₅ in den meisten Geweben die vorrangig sezernierte Isoform ist [KALKA et al., 2000b]. Die Sekretion von VEGF wird stimuliert durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise PDGF-BB und TNF- α , aber auch durch Hypoglykämie und Hypoxie [BROGI et al., 1996; STEIN et al., 1995].

Seine Wirkung umfaßt neben der Stimulation der Angiogenese auch eine Steigerung der Gefäßpermeabilität. Über die Bindung an seine endothelialen Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 bewirkt VEGF als Mitogen die Proliferation der Endothelzellen und ist somit direkt angiogen. Die indirekte Wirkung des VEGF besteht in der Aktivierung von Plasminogen-Aktivatoren, wodurch die Migration der Endothelzellen stimuliert wird [KALKA et al., 2000b].

Der *Fibroblast Growth Factor-1 (FGF-1)* und *Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2)* sind die wichtigsten Vertreter der FGF-Familie [NICOSIA und VILLASCHI, 1999], die insgesamt aus 22

verwandten Heparin-bindenden Molekülen besteht [WILKIE et al., 2002]. Die Freisetzung der FGFs erfolgt aus unterschiedlichen Zellen, wie beispielsweise aus Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Perizyten [FERNIG und GALLAGHER, 1994]. Von den verschiedenen Rezeptoren konnte der FGFR-1 auf mikrovaskulären Endothelzellen nachgewiesen werden [PEPPER et al., 1996].

FGF-1 und FGF-2 wirken mitogen auf Endothelzellen und sind damit direkte Angiogenese-Stimulatoren. FGF-2 verfügt auch über eine indirekte Wirkung, indem es die Produktion und Sekretion von Plasminogen-Aktivatoren und Kollagenasen in den Endothelzellen und damit deren Migration stimuliert [FERNIG und GALLAGHER, 1994].

Die *Angiopoietine Ang-1 und Ang-2*, die von periendothelialen Zellen, wie beispielsweise Perizyten und Fibroblasten, sezerniert werden, haben eine antagonistische Wirkung auf die Angiogenese [PATAN, 2000]. Beide binden an ihren Rezeptor Tie-2, der auf der Oberfläche von Endothelzellen nachgewiesen werden konnte [MAISONPIERRE et al., 1997].

Der durch Ang-1 hervorgerufene proangiogene Effekt ist in erster Linie auf die für die Endothelzellen chemotaktische Wirkung zurückzuführen. Eine proliferative Wirkung des Ang-1 ist nur sehr schwach ausgeprägt [WITZENBICHLER et al., 1998].

Auch Ang-2 bindet an den Rezeptor Tie-2, allerdings ohne einen Effekt auszulösen. Somit ist Ang-2 ein kompetitiver Inhibitor des Ang-1.

PATAN [2000] stellte die Hypothese auf, dass das Ang-1 / Tie-2-System vor allem für die intussuszeptive Form der Angiogenese verantwortlich ist. Diese Hypothese basiert auf folgenden Beobachtungen. Bei gleichzeitiger Expression des Ang-1 und VEGF erfolgt die Angiogenese sowohl durch Sprossung der Endothelzellen als auch durch Intussuszeption. Erfolgt zusätzlich eine Expression des Ang-2, welches zur Hemmung der Wirkung des Ang-1 führt, ist vor allem die Angiogenese als Sprossung der Endothelzellen zu beobachten [MAISONPIERRE et al., 1997].

Der *Platelet Derived Growth Factor (PDGF)* ist ein Dimer. Aufgrund von zwei vorkommenden Monomeren entstehen drei Isomere: PDGF-AA, PDGF-AB und PDGF-BB [MOSES et al., 1995]. Die Sekretion von PDGF erfolgt aus Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen. PDGF stimuliert über seinen Rezeptor, der von mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert wird, direkt die Angiogenese durch eine Steigerung der Proliferation der Endothelzellen [NICOSIA und VILLASCHI, 1999]. Seine indirekte Wirkung auf die Angiogenese besteht darin, dass er glatte Muskelzellen zur verstärkten Synthese von VEGF und bFGF stimuliert [MOSES et al., 1995].

2.2.2.3 Antiangiogene Faktoren

Eine antiangiogene Wirkung wurde für zahlreiche lösliche Faktoren in der Literatur beschrieben [GOOD et al., 1990; MAIONE et al., 1990; O'REILLY et al., 1994; ANGIOLILLO et al., 1995; CAO et al., 1995; VOEST et al., 1995; RIBATTI et al., 1996a; MAISONPIERRE et al., 1997; O'REILLY et al., 1997; BROOKS et al., 1998; PIKE et al., 1998; CAO et al., 1999; DAWSON et al., 1999; MOSES et al., 1999; O'REILLY et al., 1999, RAMCHANDRAN et al., 1999; BREW et al., 2000; COLORADO et al., 2000; KAMPHAUS et al., 2000; MAESHIMA et al., 2000; ZHANG et al., 2000]. Im Folgenden ist eine Auswahl der wichtigsten endogenen antiangiogenen Faktoren zusammengestellt:

<i>Angiopoietin-2, Ang-2</i>	<i>Pigment Epithelium-derived Factor, PEDF</i>
<i>Angiostatin</i>	<i>Platelet Factor-4, PF-4</i>
<i>Arresten</i>	<i>Restin</i>
<i>Canstatin</i>	<i>Serpin Antithrombin</i>
<i>Chemokine gro-β</i>	<i>Thrombospondin 1-4, TSP 1-4</i>
<i>Chemokine IP-10</i>	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinase, TIMP</i>
<i>Endostatin</i>	<i>(1,2,3)</i>
<i>Heparin</i>	<i>Troponin-1</i>
<i>Interferone (α und γ)</i>	<i>Tumstatin</i>
<i>Interleukine (4,12 und 18)</i>	<i>Vasostatin</i>
<i>Maspin</i>	

2.2.2.4 Wirkung der wichtigsten endogenen antiangiogenen Faktoren

Die verschiedenen Formen des *Thrombospondin* (*TSP 1 – 4*) werden von Endothelzellen, Fibroblasten und aktivierten Blutplättchen sezerniert [STREIT et al., 1999]. Die Regulation der Synthese des Thrombospondin erfolgt über das p53, ein Zellzyklus-Regulator und Tumor-Suppressor-Gen [DAMERON et al., 1994]. TSP-1 und TSP-2 wirken hemmend auf die Proliferation und Migration von Endothelzellen. Auch für kleine Peptidfragmente des Thrombospondins konnte eine antiangiogene Wirkung nachgewiesen werden [TOLSMA et al., 1993].

Endostatin ist ein Spaltprodukt des Kollagen Typ XVIII α 1. Es wirkt hemmend auf die Proliferation und Migration von Endothelzellen [O'REILLY et al., 1997]. Seine antiangiogene Wirkung beruht auf der Induzierung der Apoptose von Endothelzellen [DHANABAL et al., 1999].

Angiostatin ist ein Spaltprodukt des Plasminogens, das aus den ersten vier Kohlenstoffringen dieses Moleküls besteht [O'REILLY et al., 1994], wobei seine antiangiogene Wirkung von den Ringen 1-3 ausgeht [MACDONALD et al., 1999].

Angiostatin zeigt eine signifikante Homologie in seiner Aminosäure-Sequenz und Struktur mit dem *Hepatocyte Growth Factor (HGF)*, einem proangiogenen Faktor, der als Mitogen auf Endothelzellen und glatte Muskelzellen wirkt. Angiostatin vermag daher an den HGF-Rezeptor zu binden, löst dabei allerdings keinen Effekt aus, so dass es als kompetitiver Inhibitor des HGF wirkt [WALTER und SANE, 1999]. Somit wirkt Angiostatin hemmend auf die HGF-induzierte Proliferation von Endothelzellen [O'REILLY et al., 1994] und glatten Muskelzellen [WALTER und Sane, 1999]. Diese Wirkung beruht auf der Unterbrechung des Zellzyklus zwischen der G2-Phase und der Mitose [GRISCELLI et al., 1998].

MOSER et al. [2001] beschrieben die auf die Angiogenese inhibitorische Wirkung des Angiostatins über die Bindung an die F1-Fo ATP-Synthase, die auf der Oberfläche von Endothelzellen lokalisiert ist. Dabei hemmt Angiostatin sowohl die ATP-Synthase als auch die ATPase-Aktivität dieses Enzymkomplexes.

Die Untersuchungen von CLAEISSON-WELSH et al. [1998] zeigten, dass Angiostatin in Endothelzellen auch die Apoptose induziert.

Des Weiteren wirkt Angiostatin hemmend auf die Migration der Endothelzellen. Diese Wirkung beruht einerseits auf der Bindung des Angiostatins an Integrin $_{\alpha v \beta 3}$, das auf den Endothelzellen lokalisiert und für deren Bindung an die extrazelluläre Matrix verantwortlich ist [TARUI et al., 2001]. Andererseits führt Angiostatin zur Hemmung der Aktivierung des Plasminogens, wodurch der Abbau der Basalmembran als Voraussetzung für die endotheliale Migration blockiert wird [STACK et al., 1999].

2.2.3 Physiologische Angiogenese

Die Ausbildung des Gefäßsystems im Embryo erfolgt zunächst durch die Vaskulogenese, im Rahmen derer sich Endothelzellen aus hämatopoetischen Stammzellen differenzieren, wodurch primäre Blutgefäße entstehen [RISAU et al., 1988]. Neben der Vaskulogenese erfolgt die Vaskularisierung im Embryo und Fetus durch die Angiogenese [FOLKMAN, 1984]. Dabei vollzieht sich die Angiogenese in den meisten Organen durch die Sprossung der Endothelzellen. Insbesondere im Herzen und in der Lunge wurde auch Intussuszeption beobachtet [PATAN et al., 1996].

Im adulten Organismus erfolgt die Angiogenese physiologischerweise vor allem in der Milchdrüse und im weiblichen Genitalapparat [FINDLAY, 1986]. Abgesehen davon ist die

Angiogenese für das Wachstum verschiedener Gewebe, wie beispielsweise des Fett- oder Muskelgewebes, notwendig. So stellten RUPNICK et al. [2002] fest, dass der Einsatz des Angiogenese-Inhibitors TNP-470 bei Mäusen eine Reduktion des Fettgewebes zur Folge hatte. LLOYD et al. [2003] wiesen in einem Ratten-Modell die durch Muskeltraining induzierte verstärkte Syntheserate von VEGF, VEGFR-1 und Tie-2 nach.

Das 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 im Rahmen des Follikelwachstums und der Anbildung des Corpus luteum im Ovar eine entscheidende Rolle [FINDLAY, 1986; PLENDL, 2000; PLENDL et al., 2002c].

Die mit der Bildung des Corpus luteum einsetzende Angiogenese stellt einen der stärksten Angiogeneseprozesse im Organismus dar. So liegt die Proliferationsrate der Endothelzellen im Corpus luteum weit höher als in vielen malignen Tumoren [RODGER et al., 1997]. Die sich im Corpus luteum sehr schnell entwickelnden neuen Blutgefäße scheinen dabei durch eine geringe Maturation in Form fehlender Perizytenkontakte gekennzeichnet zu sein. Dies mag der Grund dafür sein, dass im Gelbkörper als temporärer endokriner Drüse schließlich die Regression der Gefäße erfolgt [GOEDE et al., 1998].

2.2.4 Pathophysiologische und pathologische Angiogenese

Die pathophysiologische Angiogenese erfolgt im Rahmen der Wundheilung und Regeneration und ist, wie die physiologische Angiogenese, durch das Gleichgewicht von proangiogenen und antiangiogenen Faktoren streng reguliert [FOLKMAN, 1995].

Die pathologische Angiogenese tritt im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen, wie beispielsweise bestimmter Formen der Arthritis und Retinopathie, auf [FOLKMAN, 1995]. Dabei wird die Angiogenese im Rahmen der Arthritis durch die Freisetzung von proangiogenen Faktoren aus Makrophagen und anderen Entzündungszellen, die durch die Entzündung verstärkt im betroffenen Gebiet rekrutiert werden, hervorgerufen [PEACOCK et al., 1992].

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, die von den Tumorzellen produziert und sezerniert werden, stimuliert [FOLKMAN et al., 1989].

2.2.5 Therapeutische Einsatzmöglichkeiten der Angiogenese und Antiangiogenese

Der gezielte Einsatz der Angiogenese als auch Antiangiogenese gilt als Erfolg versprechendes Prinzip zur Behandlung verschiedener Erkrankungen. So wäre es durch die Stimulation der Angiogenese möglich, in einem ischämischen Gebiet die Vaskularisierung anzuregen. Andererseits könnte durch die Hemmung der Angiogenese, der Antiangiogenese, das Wachstum von Neoplasien herabgesetzt oder gänzlich verhindert werden [PEPPER, 1997].

Die Stimulation der Angiogenese ist bei ischämischen Erkrankungen des Myokards [ROSENGART et al., 1999] und des peripheren Gefäßsystems, wie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK), von besonderer Bedeutung [BAUMGARTNER et al., 1998]. Ein forciertes Kapillarwachstum und die Bildung neuer Kollateralgefäße im ischämischen Gebiet könnte bestehende Behandlungsstrategien wesentlich verbessern [KALKA, 2000b]. Dies betrifft vor allem Patienten, bei denen durch die anatomische Lage der Gefäßverschlüsse ein gefäßchirurgischer Eingriff nicht möglich ist [ISNER und ROSENFELD, 1993]. Proangiogene Faktoren werden auf verschiedene Weise, v.a. per injectionem appliziert. FUNATSU et al. [2002] demonstrierten den auf die Angiogenese stimulierenden Effekt des *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) im ischämischen Myokard des Hundes, indem sie Plasmide, die für HGF kodierten, direkt in den Herzmuskel injizierten (Transfektion).

Die Induktion der Antiangiogenese stellt eine vielversprechende Alternative zur Behandlung von Tumoren dar. Die Standardbehandlung besteht aus der Entfernung des neoplastischen Gewebes durch Bestrahlung, Chemotherapie oder einen chirurgischen Eingriff. Im Gegensatz dazu wird durch die Antiangiogenese nicht der Tumor zerstört, sondern das Wachstum der ihn mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgenden Blutgefäße und dadurch seine Expansion und Metastasierung blockiert [FOLKMAN, 1995].

Das Konzept der antiangiogenen Therapie wurde 1971 von FOLKMAN vorgestellt. Die aus den Untersuchungen der darauffolgenden Jahre gewonnenen Kenntnisse ließen verschiedene Strategien als möglich erscheinen. Die Inhibierung der Angiogenese kann beispielsweise durch die Hemmung der Freisetzung proangiogener Faktoren aus den Tumorzellen erfolgen. Ebenso wirkt die Neutralisation bereits durch den Tumor sezernierter proangiogener Faktoren oder die direkte Hemmung der angiogenen Antwort der Endothelzellen inhibierend auf das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren [FOLKMAN und INGBER, 1992].

In letzter Zeit sind nicht nur endogene Antiangiogenese-Faktoren identifiziert und deren Wirkung untersucht worden. Es wurde auch für viele synthetische Substanzen, wie beispielsweise Thalidomid, Suramin und verschiedene Fumagillin-Derivate, eine antiangiogene Wirkung nachgewiesen [KIRSCH et al., 2001]. DIMOPOULOS et al. [2001] setzten in einer Phase II-Studie Thalidomid gegen die Waldenström's Macroglobulinämie, ein IgM-produzierendes Lymphom, ein. In weiteren klinischen Studien wurden zur Behandlung von Karzinomen des Übergangsepithels der Harnblase Suramin [UCHIO et al., 2003] bzw. TNP-470, ein Fumagillin-Derivat, [INOUE et al., 2003] verwendet.

In der Veterinärmedizin werden derzeit Angiogenese-Inhibitoren, wie beispielsweise Minocyclin [SORENMO, et al., 2000], Interferone und Thalidomid [CLIFFORD et al., 2000], zur Behandlung von malignen Hämangioendotheliomen beim Hund geprüft.

2.3 Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese

2.3.1 Forderungen für die Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese

Der klinische Einsatz der pro- und antiangiogenen Faktoren ist derzeit noch limitiert. Abgesehen von ihrer genauen Wirkung ist häufig noch nicht bekannt, in welcher Phase der angiogenen Kaskade sie die Angiogenese beeinflussen. Der Einfluss eines die Angiogenese stimulierenden oder hemmenden Faktors kann auf den verschiedenen Ebenen der angiogenen Kaskade, wie beispielsweise dem Abbau der Basalmembran, der Endothelzellmigration bzw. -proliferation oder der dreidimensionalen Organisation der Endothelzellen, erfolgen [AUERBACH et al., 2003]. Ebenso sind auch Kenntnisse über die Konzentrationen der Substanzen, die zur Beeinflussung der Angiogenese notwendig sind, essentiell für den klinischen Einsatz der pro- bzw. antiangiogenen Faktoren [JAIN et al., 1997].

Zahlreiche in vivo- und in vitro-Untersuchungen beschäftigen sich mit der Identifizierung und der Charakterisierung der Wirkung von Substanzen mit stimulierender und inhibitorischer Wirkung auf die Angiogenese [AUERBACH und AUERBACH, 1994].

Eine Aussage über die Wirkung von Angiogenese-Stimulatoren und -Inhibitoren kann aber nur durch die Quantifizierung der Angiogenese getroffen werden [AUERBACH et al., 1991]. Die Quantifizierung der Angiogenese, also die Darstellung der Angiogenese in messbaren Größen, erfolgt in den verschiedenen in vivo- und in vitro-Modellen meist nur fragmentarisch

auf der Basis der Migration und Proliferation, selten aber der dreidimensionalen Organisation der Endothelzellen. Allerdings ist für eine aussagekräftige Angabe der Wirkung eines pro- bzw. antiangiogenen Faktors eine Methode zur Quantifizierung der Angiogenese notwendig, die alle Phasen der angiogenen Kaskade umfasst [AUERBACH et al., 2003].

Welche Kriterien für eine aussagekräftige Quantifizierung der Wirkung von löslichen proangiogenen und antiangiogenen Faktoren erfüllt werden müssen, wurde bislang nur von JAIN et al. [1997] zusammenfassend dargestellt. Dabei erfolgte durch die Autoren keine Differenzierung dieser Kriterien für in vivo- und in vitro-Modelle der Angiogenese.

Die von JAIN et al. [1997] geforderte Quantifizierung funktioneller Charakteristika, wie die Migrationsrate und Proliferationsrate der Endothelzellen, erfolgt vor allem in in vitro-Modellen der Angiogenese [IWAHANA et al., 1996; MUROHARA et al., 1999; LANG et al., 2000; HARVEY et al., 2002; CÉLÉRIER et al., 2002].

Eine für in vivo- und in vitro-Untersuchungen erforderliche Voraussetzung ist die quantitative Erfassung der neu gebildeten Gefäße bzw. gefäßähnlichen Strukturen. Dabei sollte eine Aussage über die Länge der entsprechenden Strukturen, die von den Strukturen eingenommene Fläche, die Anzahl der neuen Gefäße bzw. gefäßähnlichen Strukturen und die Ausdehnung der Basalmembran getroffen werden. Für diese Messungen müssen bei einer in vivo-Untersuchung die neuen Gefäße eindeutig von den zu Beginn der Untersuchung schon vorhandenen Gefäßen zu unterscheiden sein.

Für den klinischen Einsatz eines Angiogenese-Stimulators bzw. -Inhibitors ist es notwendig, dass eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt wird. Dafür muß im Rahmen einer in vivo-Untersuchung die genaue Konzentration des zu untersuchenden Faktors ermittelt werden, die zur Auslösung des pro- bzw. antiangiogenen Effekts notwendig ist.

Letztlich ist für den routinemäßigen Einsatz einer Methode entscheidend, dass die Quantifizierung der Angiogenese schnell und einfach durchzuführen, reproduzierbar und von geringem Kostenaufwand ist [JAIN et al., 1997].

2.3.2 Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese in in vivo-Modellen

Die Angiogenese stellt einen komplexen Mechanismus dar, bei der die Interaktion der Endothelzellen mit dem umliegenden Gewebe u.a. via Adhäsionsmolekülen und Zytokinen eine entscheidende Rolle spielt. Im Hinblick auf diese Komplexität repräsentieren in vivo-

Modelle der Angiogenese eine ideale Quelle für die Untersuchung von Angiogenese-Stimulatoren bzw. -Inhibitoren. Für die Entwicklung therapeutischer Strategien kann derzeit auf die Untersuchung der Wirkung löslicher pro- bzw. antiangiogener Faktoren im in vivo-Modell nicht verzichtet werden [DONOVAN et al., 2001].

Als Vorteile der Untersuchung und Quantifizierung der Angiogenese in vivo gelten die Zuverlässigkeit und die meist einfache Durchführung [RIBATTI et al., 2001].

Neben dem hohen Bedarf an Tieren sind weitere Nachteile, dass sie zeitaufwendig, kostenintensiv und nicht eindeutig zu interpretieren sind [DONOVAN et al. 2001].

Im Folgenden werden die verschiedenen in der Literatur beschriebenen Tiermodelle zur Untersuchung und Quantifizierung der Angiogenese geschildert sowie deren Vor- und Nachteile kurz zusammengefasst.

2.3.2.1 Cornea-Modell

Die Cornea des adulten Individuums ist physiologischerweise nicht vaskularisiert [HENKIND, 1978]. Daher kann durch das Setzen eines angiogenen Stimulus das Wachstum einsprossender Gefäße in die Cornea von Versuchstieren, meist Kaninchen, Mäusen und Ratten, untersucht und quantifiziert werden. Allerdings ist aufgrund des dreidimensionalen Gefäßwachstums die Quantifizierung nur in frühen Phasen der Angiogenese möglich, nämlich wenn die Gefäßlänge und -anzahl noch überwacht werden können [JAIN et al., 1997].

Zur Untersuchung der Angiogenese werden Implantate, die proangiogene lösliche Faktoren enthalten, in das Stroma der Cornea eingebracht [GIMBRONE et al., 1974]. Einer der am häufigsten verwendeten Trägerstoffe für diese Faktoren ist Elvax[®], ein Polymer des Ethylen-Vinyl-Acetats, das eine langsame Freisetzung des proangiogenen Faktors gewährleistet [LANGER und FOLKMAN, 1976]. Zum Einbringen des löslichen Faktors in Elvax[®] ist der Einsatz eines organischen Lösungsmittels notwendig, welches die Veränderung der biologischen Aktivität der proangiogenen Substanz zur Folge haben kann. Dies ist nicht notwendig, wenn statt Elvax[®] 70% hydratisiertes Hydrogel, welches üblicherweise zur Herstellung von Kontaktlinsen verwendet wird, als Trägerstoff eingesetzt wird. Außerdem kann bei Einsatz eines iodinierten löslichen Faktors durch Messung der Radioaktivität die exakte Menge des Faktors pro Implantat angegeben werden.

Zum Einbringen des Implantats werden von der Mitte der Cornea aus in Richtung des Limbus zwei Taschen im Bereich des mittleren Stromas in die Hornhaut geschnitten. Die mit

dem löslichen Faktor bestückten Implantate werden in Quader mit einer Größe von 1 x 2 x 0,2 mm geschnitten und mit einem Abstand von 2 mm zum Limbus in den Taschen positioniert [GAUDRIC et al., 1992].

GAUDRIC et al. [1992] quantifizierten die durch bFGF induzierte Angiogenese in der Cornea von Kaninchen. Es wurde ein mit FGF-2 angereicherter Trägerstoff in die Cornea der Tiere implantiert. Durch ein Operationsmikroskop wurden bei konstanter Vergrößerung am 4., 7., 11. und 14. Tag nach der Implantation Aufnahmen von der Hornhaut erstellt. Die Quantifizierung der Neovaskularisation erfolgte anhand dieser Aufnahmen. Das jeweilige Negativbild wurde bei stets gleicher Vergrößerung auf ein Blatt Papier projiziert und die Umrisse der in die Cornea eingesprossenen Gefäße nachgezeichnet. Die neovaskularisierte Fläche wurde mittels Planimetrie vermessen. Es wurde somit die Zunahme der Fläche, die durch die in die Cornea eingesprossenen Gefäße eingenommen wurde, quantifiziert.

Dieses Modell wurde auch zur Ermittlung der Wirkung von Hemmstoffen der Angiogenese, wie beispielsweise Thalidomid, eingesetzt. Dabei wurde zunächst durch die lokale Applikation von FGF-2 und VEGF die Angiogenese in der Cornea stimuliert. Anschließend erfolgte nach oraler Gabe von Thalidomid die Quantifizierung der Antiangiogenese [JOUSSEN et al., 1999].

ZICHE et al. [1994] quantifizierten die Angiogenese in diesem Modell, in dem sie nach Implantation des die proangiogenen Substanzen enthaltenden Trägerstoffs jeden 3. Tag mit Hilfe eines Operationsmikroskops die Anzahl und Länge der Gefäße in dem betrachteten Abschnitt der Cornea ermittelten. Die Anzahl der Gefäße wurde als Gefäßdichte deklariert.

GONZÁLEZ et al. [2001] erweiterten diese Methode durch die Berechnung des „angiogenic score“ (AS). Dafür teilten sie die vaskuläre Dichte in 5 Gruppen ein (Gruppe 1: 0 – 25 Gefäße; Gruppe 2: 26 – 50 Gefäße; Gruppe 3: 51 – 75 Gefäße; Gruppe 4: 76 – 100 Gefäße; Gruppe 5: > 100 Gefäße). Der AS berechnete sich dann an jedem Untersuchungstag durch die Multiplikation der vaskulären Dichte (Gruppe 1 – 5) und der Gefäßlänge (mm).

CAO et al. [2002] quantifizierten die Angiogenese in der Cornea von Mäusen. Als Trägerstoff für verschiedene proangiogene Faktoren, z.B. FGF-2 und VEGF, verwendeten sie Micropellets aus Sucrose-Aluminiumsulfat. Sie positionierten die Implantate in den präparierten Cornea-Taschen mit einem Abstand von 1,2 – 1,4 mm vom Limbus. Durch ein Spaltlampen-Mikroskop wurde 5 Tage nach der Implantation die Länge der in die Cornea eingesprossenen Gefäße bestimmt.

Der Einsatz von Ratten und Mäusen für das Corneastroma-Taschenmodell ist bei gleicher Anzahl der Tiere mit geringeren Kosten verbunden als die Verwendung von Kaninchen. Allerdings ist aufgrund der kleineren Cornea der chirurgische Eingriff zum Einbringen der Implantate mit größeren Schwierigkeiten verbunden. Als Vorteil gilt, dass durch die dünnere Hornhaut der Ratten und Mäuse das dreidimensionale Wachstum der Gefäße in Grenzen gehalten wird [JAIN et al., 1997].

2.3.2.2 Chorioallantoismembran-Modell

Die Chorioallantoismembran (CAM) des bebrüteten Hühnereis wird in vielen Studien zur Untersuchung und Quantifizierung der Angiogenese verwendet [AUSPRUNK et al., 1975].

Im Rahmen der Genese des Hühnerembryos entwickeln sich vier Fruchthüllen, nämlich Amnion, Dottersack, Allantois und Chorion [RÜSSE, 1998]. Die Allantois des Hühnerembryos erscheint ab dem 3. Bebrütungstag als Ausstülpung des Endoderms. Der schmale proximale Teil liegt dabei dem Dottersack caudal an. Der distale Anteil erweitert sich zwischen dem 4. und 10. Bebrütungstag zur Allantoisblase. Während dieses Prozesses fusioniert die mesodermale Schicht der Allantois mit der mesodermalen Schicht des Chorion zur Chorioallantoismembran. In dieser doppelten Mesodermschicht entwickelt sich ein Netzwerk von Gefäßen, das über die Arterien und Venen der Allantoismembran mit dem Gefäßsystem des Hühnerembryos in Verbindung steht. Das zunächst schnelle Wachstum der Kapillaren nimmt ab dem 11. Bebrütungstag bis zum Zeitpunkt des Schlupfes am 18. Tag deutlich ab [AUSPRUNK et al., 1974].

Die Chorioallantoismembran wird für die Untersuchung löslicher Faktoren mit angiogener bzw. antiangiogener Wirkung meist zwischen dem 7. und 12. Bebrütungstag verwendet [RIBATTI et al., 1996b, 2000; NGUYEN et al., 1994; SHEU et al., 1998; BROOKS et al., 1999; YOKOYAMA et al., 2000; CELERIER et al., 2002].

Die extraembryonalen Blutgefäße (Dottersack und Chorioallantoismembran) sind nicht innerviert. Die Sensitivität des Embryos entwickelt sich aber beginnend um den 7. Bebrütungstag [ROSENBRUCH, 1997].

Das Gefäßwachstum in der Chorioallantoismembran kann durch die Fenestrierung der Kalkschale des Eies beobachtet werden [AUSPRUNK et al., 1975]. Zur Quantifizierung der pro- oder antiangiogenen Wirkung der Faktoren werden diese in unterschiedlichen Trägerstoffen auf die Chorioallantoismembran gebracht.

RIBATTI et al. [1997; 2002b] quantifizierten die Wirkung von Angiogenese-Stimulatoren und -Inhibitoren, indem sie Gelatineschwämmchen, die verschiedene Faktoren enthielten, in die

Chorioallantoismembran implantierten. Dafür wurden befruchtete Hühnereier zunächst drei Tage lang bei 37°C bebrütet. Am dritten Tag wurde in die Kalkschale ein quadratisches Fenster (1 x 1 cm) geschnitten und durch eine Glasplatte verschlossen. Nach weiterer Inkubation bei 37°C wurden am 8. Tag Gelatine-Schwämmchen, die FGF-2 enthielten, auf die Chorioallantoismembran plaziert. Als Negativkontrolle wurden einige Schwämmchen mit polyklonalem Anti-FGF-2 bestückt. Die Chorioallantoismembran wurde täglich in ovo fotografiert. Am 12. Tag wurden die Hühnerembryonen und ihre Membranen in ovo mit Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurde das Gelatine-Schwämmchen mit der anhaftenden Chorioallantoismembran zur weiteren Bearbeitung entnommen. Nach entsprechender Fixierung und Einbettung wurden Semidünnschnitte des Gelatine-Schwämmchens parallel zur Oberfläche der Chorioallantoismembran angefertigt und mit Toluidinblau gefärbt.

Von jeder Chorioallantoismembran wurden 30 Schnitte angefertigt und von diesen jeder dritte Schnitt zur quantitativen Untersuchung herangezogen; dabei wurden pro Schnitt 6 zufällig gewählte Sichtfelder beurteilt. Die Betrachtung der Schnitte erfolgte bei 250-facher Vergrößerung mit einem Mikroskop, das mit einem Okular mit quadratischem Maschennetz bestückt war. Durch dieses Maschennetz wurde das Sichtfeld in 144 Sektionen eingeteilt. Die Quantifizierung bestand aus der Zählung von Punkten. Als Punkt galt jede Sektion, die von einem quer angeschnittenen Gefäß eingenommen wurde. Es wurden nur Gefäße mit einem Durchmesser von 3 – 10 µm als Punkte definiert. Die ermittelte Anzahl der Punkte wurde als die vaskuläre Dichte deklariert.

SHEU et al. [1998] und BROOKS et al. [1999] verwendeten als Trägerstoff für proangiogene Faktoren mikrobiologische Testplättchen. Nachdem die Eier 10 Tage bei 37°C inkubiert wurden, wurde durch ein kleines Loch, das in die Schale gebrochen wurde, mit FGF-2 und VEGF gesättigte Testplättchen auf die Chorioallantoismembran gebracht. Nach weiteren 8 Stunden Inkubation wurde die Chorioallantoismembran abgelöst, mit Paraformaldehyd fixiert und in eine Petrischale überführt. Durch ein Sektionsmikroskop wurden bei 7,5facher Vergrößerung digitale Aufnahmen angefertigt. Diese wurden computergesteuert mit einem Gitter (Maschenweite: 1 x 1 cm) versehen. Die Anzahl von Gefäßen in 5 – 7 Fenstern des Gitters wurde gezählt und der durchschnittliche Wert als Meßwert für die Vaskularisierung angegeben.

Da physiologischerweise die Hauptphase der Angiogenese in der Chorioallantoismembran zwischen dem 4. und 11. Bebrütungstag liegt, kann dieses Modell auch ohne vorhergehende Stimulation zur Untersuchung von Angiogenese-Inhibitoren eingesetzt werden.

Dazu wurde von AUERBACH et al. [1974] eine Modifizierung des Chorioallantoismembran-Tests wie folgt vorgenommen. Drei Tage alte Hühnerembryonen werden aus ihrer Schale

entfernt und in Petrischalen verbracht. Wird der Hühnerembryo mit seinen Fruchthüllen in eine Petrischale überführt, erscheint die Chorioallantoismembran auf der Oberfläche und breitet sich in kurzer Zeit als flache Membran über die gesamte Petrischale aus.

Dieses Modell wurde von YOKOYAMA et al. [2000] zur Ermittlung der antiangiogenen Wirkung von Angiostatin und Endostatin verwendet. Auf dieselbe Weise untersuchten CÉLÉRIER et al. [2002] die antiangiogene Wirkung des Angiotensinogen.

Nach 7 Tagen Inkubation bei 37°C wurde ein Silikonring mit einem Durchmesser von 10 mm auf eine zufällig gewählte Stelle der Chorioallantoismembran in vitro platziert. Nach 24 und 48 Stunden wurde der in Puffer gelöste Hemmstoff, in den Ring gegeben. Es wurden Aufnahmen erstellt direkt vor und 48 Stunden nach der ersten Gabe des Hemmstoffs. Zur Quantifizierung der Antiangiogenese wurde ein Bereich mit einer Größe von ca. 1/3 der behandelten Fläche innerhalb des Ringes zufällig ausgewählt. In diesem Bereich wurden vor der ersten Gabe des Hemmstoffes die Gefäße, die zentripetal zum Ring wuchsen, gezählt. Diese wurden als „Gefäße erster Ordnung“ bezeichnet. Auf den Aufnahmen, die 48 Stunden nach der ersten Gabe des Hemmstoffs erstellt wurden, wurden in demselben Bereich die Gefäße gezählt, die zentripetal zum Ring wuchsen und auf der ersten Aufnahme noch nicht zu sehen waren. Diese wurden als „Gefäße zweiter Ordnung“ bezeichnet. Als Kontrolle wurden ebenso große, nicht behandelte Bereiche zufällig gewählt und dort entsprechend die Gefäße erster und zweiter Ordnung gezählt. Die quantitative Aussage über die antiangiogene Wirkung des Hemmstoffes erfolgte durch den Vergleich der Anzahl der Gefäße erster und zweiter Ordnung in den behandelten und unbehandelten Bereichen eines Embryos.

Ein limitierender Faktor für den Einsatz der Chorioallantoismembran zur quantitativen Untersuchung der Angiogenese ist die häufig auftretende, unspezifische inflammatorische Reaktion, die zur sekundären vasoproliferativen Antwort führt und somit die Quantifizierung der primären Antwort verfälscht [SPANEL-BOROWSKI et al., 1988]. Die inflammatorische Reaktion kann jedoch umgangen werden, wenn die zu testende Substanz in die Chorioallantoismembran eingebracht wird, kurz nachdem sich diese gebildet hat, da zu diesem Zeitpunkt das Immunsystem des Embryos noch nicht vollständig entwickelt ist [LEENE et al., 1973].

Ein weiteres Problem der Quantifizierung der Angiogenese in der Chorioallantoismembran ist, dass die zu testenden Faktoren auf ein Gefäßnetz wirken, welches sich physiologischerweise im Wachstum befindet. Dadurch ist es häufig schwierig, die durch die proangiogene Wirkung der Testsubstanz erfolgte Angiogenese von der sich physiologisch in der Chorioallantoismembran vollziehenden Angiogenese zu unterscheiden [KNIGHTON et al.,

1991]. Außerdem ist auch der Zeitpunkt der Quantifizierung der Angiogenese in der Chorioallantoismembran von Bedeutung. In vielen Studien wird die angiogene Antwort nach 24 Stunden durch die Messung der Fläche, die von den Gefäßen eingenommen wird, quantifiziert. Da zu diesem Zeitpunkt eine Vasodilatation im Vordergrund steht, wird diese oft unzutreffend als Angiogenese interpretiert [RIBATTI et al., 2001].

2.3.2.3 Mesenterialfenster-Modell

Das Mesenterium ist das Gekröse des Darms, welches eine vaskularisierte Struktur repräsentiert, die in zweidimensionaler Weise ein terminales Gefäßbett darstellt [ZWEIFACH, 1973]. Es wird von Blut-, Lymphgefäße und Nerven, die in Fett eingebettet sind, durchzogen. Diese aus den Gefäßen und Fett bestehenden Stränge umgeben klar definierte, spärlich vaskularisierte Fenster [NORRBY et al., 1986], die aus einer 5 – 10 µm dicken Membran bestehen [JAKOBSSON et al., 1994].

Die transparenten, mesenterialen Fenster bieten mit ihrer Mikrozirkulation ein Modell für eine Reihe physiologischer Studien [HANSEN-SMITH, 2000]. Vor allem wird dieses Modell zur Untersuchung der Angiogenese, induziert durch pharmakologische oder pathologische Stimuli, eingesetzt [COSTA et al., 1994; NORRBY, 1994; WILSON und BALDWIN, 1998]. Von Vorteil ist dabei, dass das Mesenterialfenster aufgrund seiner minimalen Dicke direkt unter dem Lichtmikroskop als sogenanntes Häutchenpräparat untersucht werden kann [JAKOBSSON et al., 1994].

Zur Quantifizierung der Angiogenese wurde in diesem Modell von den meisten Untersuchern die pro- bzw. antiangiogene Substanz intraperitoneal appliziert. Nach der Tötung der Tiere wurde dann die Anzahl der Gefäße, die in das untersuchte Mesenterialfenster eingetreten waren, gezählt. Dies ist aufgrund der Zweidimensionalität dieses Modells einfach durchzuführen [NORRBY et al., 1989, 1990; YANAGI und OHSHIMA, 1996]. Der Quotient aus der Anzahl der Gefäße und der betrachteten Fläche wurde dann als Gefäßdichte deklariert [YANAGI und OHSHIMA, 1996].

JAKOBSSON et al. [1994] entwickelten eine morphometrische Methode zur Quantifizierung der Angiogenese im Mesenterialfenster-Modell, in der mehrere, die Angiogenese quantifizierende Parameter gemessen und berechnet wurden.

Zur Stimulation der Angiogenese wurde männlichen erwachsenen Ratten zweimal täglich „Compound 48/80“, eine Substanz, die selektiv die Sekretion der Mastzellen anregt, intraperitonäal injiziert. Dabei wurde die Dosis täglich erhöht. Jeden 10. Tag wurden 5

Ratten zur quantitativen Untersuchung der Angiogenese getötet. Pro Tier wurden 4 bis 6 Mesenterialfenster, d.h. insgesamt 248, beurteilt. Vor der Tötung wurden die Tiere anästhesiert und eine Tinte-Gelatine-Lösung zur Darstellung der Gefäße intravenös verabreicht. Die Untersuchung erfolgte über einen Zeitraum von 100 Tagen.

Zur quantitativen Analyse der Angiogenese wurden folgende Parameter bestimmt:

a.) Anzahl der ins Fenster eintretenden Gefäße / Umfang des Fensters.

Hierfür wurden in jedem Fenster bei 200facher Vergrößerung die Gefäße gezählt, die die Grenze zwischen dem Mesenterialfenster und dem das Fenster umgebenden Strang kreuzten. Diese Anzahl wurde dann ins Verhältnis zum planimetrisch gemessenen Umfang des Fensters gesetzt.

b.) Gefäßdichte pro untersuchter vaskularisierter Fläche.

Innerhalb der vaskularisierten Fläche von 4 bis 6 Fenstern wurden Sichtfelder mit einer einheitlichen Größe von $0,468 \text{ mm}^2$ zufällig ausgesucht und bei 240facher Vergrößerung fotografiert. Die Gefäßdichte in diesen Sichtfeldern wurde auf zwei verschiedene Weisen ausgedrückt, nämlich als Verhältnis der Gefäßlänge zur Gesamtfläche (mm / mm^2) und als Gefäßanteil, definiert als das Verhältnis der durch die Gefäße eingenommenen Fläche zur Gesamtfläche des Sichtfeldes (%).

c.) Relative vaskularisierte Fläche.

In allen 248 (4 bis 6 Fenster pro Tier) untersuchten Fenstern wurde planimetrisch die vaskularisierte Fläche gemessen und anschließend das arithmetische Mittel für diese Fenster berechnet.

d.) Gesamtgefäßdichte.

Diese wurde berechnet durch die Multiplikation der relativen vaskularisierten Fläche (c.) mit der aus allen untersuchten Fenstern gemittelten Gefäßlänge pro Gesamtfläche (b.).

Der Vorteil dieser Methode ist, dass neben der Bestimmung der Gefäßzahl auch die Fläche und Länge der Gefäße gemessen wurde. Damit konnte auch die Vergrößerung eines Gefäßes durch seine Verlängerung als Zeichen der Angiogenese quantifiziert werden.

2.3.2.4 Dauerfenster-Modelle

Die Implantation einer transparenten Beobachtungskammer in das Ohr des Kaninchens wurde schon 1924 von SANDISON vorgenommen. Diese Kammer wurde von ALGIRE [1943] an die Maus adaptiert und in deren Rückenbereich eingesetzt.

Nachteil dieser frühen Kammer-Modelle war, dass das untersuchte Gewebe vor allem aus neu entstandenem Granulationsgewebe bestand. Deshalb wird bei aktuellen Kammer-Modellen angestrebt, Dauerpräparate von Geweben darzustellen, die weder durch die Kammer selbst noch durch das Verfahren der Implantation irritiert werden [MENGER et al., 2002].

In den letzten Jahren wurde als Dauerfensterpräparat vor allem die dorsale Hautfalten-Kammer in Mäusen, Ratten und Hamstern zur quantitativen Untersuchung der Angiogenese eingesetzt [PAPENFUSS et al., 1979; LEHR et al., 1993; TORRES FILHO et al., 1995; ENDRICH et al., 1980]. Die Gewebe, in denen die mikroskopischen Untersuchungen vorgenommen werden, bestehen aus der Haut, der Unterhaut und quergestreifter Muskulatur (*M. cutaneus trunci*).

Die Präparation der dorsalen Hautfalten-Kammer erfolgt am anästhesierten Tier. Nach Entfernung der Haare im Bereich des Rückens wird eine Hautfalte entlang der Wirbelsäule aufgezogen. Auf der einen Seite der Hautfalte wird in einem runden Bereich mit einem Durchmesser von ca. 15 mm die Haut und die Subkutis mit dem *M. cutaneus trunci* entfernt. Anschließend werden die sich in der Hautfalte befindenden zwei Lagen des *M. latissimus dorsi* in diesem Bereich entfernt. Im so entstandenen Fenster verbleiben die Subkutis mit dem *M. cutaneus trunci* und die Haut der anderen Seite der Falte. Diese so präparierte Hautfalte wird zwischen zwei Rahmen, die meist aufgrund des geringen Gewichts und der hohen Gewebeverträglichkeit aus Titanium bestehen, befestigt. In einem Rahmen ist ein kreisförmiges Fenster mit einem Durchmesser von 12 mm enthalten, welches durch ein entfernbare Deckglas abgedeckt ist [MENGER et al., 2002].

TORRES FILHO et al. [1995] quantifizierten die Angiogenese in der dorsalen Hautfalten-Kammer bei Mäusen. Die Untersuchungen erfolgten am 3., 6., 10. und 14. Tag nach der Implantation von Rhodamin-markierten Tumor-Sphäroiden (500 – 900 µm durchmessende Sphäroide aus Lewis Lungenkarzinomzellen, die vorab mit Methylnhodamin markiert wurden). Die nicht anästhesierten Tiere wurden für die mikroskopische Untersuchung in einem Plexiglasrohr fixiert, welches am Mikroskop befestigt war. Die Gefäße wurden durch die intravenöse Gabe von Fluoreszein Isothiocyanat-Dextran (FITC) vor den Untersuchungen dargestellt.

Zur Quantifizierung der Angiogenese wurden an jedem Untersuchungstag mit einer am Mikroskop installierten Kamera von jedem Sphäroid Aufnahmen erstellt. Die Aufnahmen wurden auf einem Monitor dargestellt. Auf einem vor dem Monitor plazierten transparenten Papier wurde mit einem Stift jedes Gefäß durch eine Linie mit stets gleichem Durchmesser dargestellt. Anschließend wurde auf dieselbe Art und Weise auf einem weiteren Papier die Fläche der Gefäße gezeichnet. Zusätzlich wurde bei geringer Vergrößerung die Fläche des Tumors mit dem Stift nachgezogen. Diese Transparente wurden eingescannt und in den so entstandenen digitalen Bildern die schwarzen Pixel, die den auf den Zeichnungen dargestellten Strukturen entsprachen, gezählt. Das erste Transparent diente zur Erfassung der Gefäßlängen. Anhand des zweiten Transparentes wurde die Fläche, die durch die Gefäße eingenommen wurde, ermittelt. Im dritten Transparent wurde die Fläche, die durch den Tumor okkupiert wurde, dargestellt. Die Kalibrierung der Zeichnungen erfolgte, indem mit demselben Stift Linien und Flächen, die vorher gemessen wurden, nachgezogen wurden. Anschließend wurden diese Zeichnungen eingescannt und die Anzahl der schwarzen Pixel, die den gezeichneten Strukturen entsprachen, gezählt. Auf diese Weise konnte die Pixelzahl als Länge bzw. Fläche ausgedrückt werden. Berechnet wurden dann die Gefäßdichte, die Gesamtgefäßlänge (L_v), die Gesamtgefäßfläche (A_v) und das Gesamtgefäßvolumen (V_v). Diese Daten wurden folgendermaßen berechnet:

Gefäßdichte = Länge der Gefäße in einer Aufnahme / Gesamtfläche der Aufnahme

$L_v = \text{Gefäßdichte} \times \text{Tumorfläche}$

$A_v = (\text{Gefäßfläche in einer Aufnahme} / \text{Gesamtfläche der Aufnahme}) \times \text{Tumorfläche}$

$V_v = \pi / 4 \times (A_v)^2 / L_v$

Mittlerer Gefäßdurchmesser = Gefäßfläche in einer Aufnahme / L_v

VAJKOCZY et al. [2000] quantifizierten die Angiogenese in der dorsalen Hautfalten-Kammer nach der Implantation eines Tumors. Die intravitale Fluoreszenzvideomikroskopie wurde am 10. und 18. Tag nach der Tumorzellimplantation vorgenommen. Dabei wurde bestimmt, welche Gefäße innerhalb der Fluoreszenz-markierten Tumormasse und in der Umgebung der Tumormasse neu entstanden waren. Als Kriterium für neu gebildete Gefäße galt deren ungeordnetes Wachstum im Gegensatz zur typischen parallelen Organisation der Kapillaren der quergestreiften Muskulatur. Anschließend wurde planimetrisch die Länge und die Fläche, die von neu gebildeten Gefäßen eingenommen wurde, innerhalb der Aufnahme gemessen. Als Gefäßdichte wurde die reziproke Länge aller neu gebildeten Gefäße in allen erstellten Aufnahmen definiert.

VOLLMAR et al. [2001] verwendeten zur Quantifizierung der Angiogenese die dorsale Hautfalten-Kammer in Hamstern. Zur Stimulation der Angiogenese transplantierten sie aus Hamstern gewonnene Follikel unterschiedlichen Reifegrades in die Rückenfalte. Nach der intravenösen Gabe von FITC-Dextran wurden mittels einer am Fluoreszenzmikroskop installierten Videokamera Aufnahmen erstellt.

Die Quantifizierung der Angiogenese erfolgte per computergestützter Image Analysis. Gemessen wurde in jeder Aufnahme der Durchmesser und die Fläche der Follikel, die Länge der Gefäße und die Fläche, die durch die Gefäße eingenommen wurde. Dabei wurde die Fläche des vaskularisierten Netzwerks als prozentualer Anteil an der Follikelfläche und die Gefäßdichte als Summe der Länge der Gefäße pro Gesamtfläche der Aufnahme angegeben.

Als besonderer Vorteil beim Einsatz des Hamsters für diese Präparation gilt, dass der M. latissimus dorsi dem angrenzenden M. cutaneus trunci nur locker anliegt. Dadurch führt die Entfernung dieses Muskels nicht zu Verletzungen des angrenzenden Gewebes, was für die mikroskopischen Untersuchungen günstig ist [MENGER et al., 2002].

2.3.2.5 Subkutanes Luftsack-Modell

LICHTENBERG et al. [1997] entwickelten das subkutane Luftsack-Modell zur Untersuchung und Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese.

Die Präparation des Luftsackes erfolgte an anästhesierten Ratten. Hierfür wurden die Haare im Rückenbereich entfernt und 10 – 15 ml Luft subkutan injiziert, bis sich 4 – 5 cm hinter dem Kopf ein Luftsack gebildet hatte. Der entstandene Luftsack wurde jeden 4. Tag erneut aufgeblasen. Nach ca. 14 Tagen war der Luftsack mit einer ausreichenden Anzahl Zellen ausgekleidet, die wie eine transparente Membran erschienen. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein Cellulose-Schwämmchen, das einen vasoproliferativen Effekt auslöste, in diese Membran implantiert bzw. Tumorzellen eines Mammakarzinoms der Ratte direkt auf die Membran gegeben [LICHTENBERG et al., 1999]. Dafür wurde ein Schnitt von 1,5 cm Länge in die Haut über dem Luftsack gesetzt und diese vorsichtig stumpf von dem entstandenen Luftsack abpräpariert. Ein rundes Cellulose-Schwämmchen mit einem Durchmesser von 8 mm wurde vorsichtig in den Winkel zwischen Membran und Haut geschoben und die Haut mit 2 bis 3 Knopfheften wieder verschlossen. An den 9 darauffolgenden Tagen wurden die Tiere mit TNP-470, einem Angiogenese-Inhibitor, mit steigender Dosis behandelt. Am 11. Tag nach der Implantation des Schwämmchens wurden den Tieren ¹²⁵I-markierte

Immunglobuline intravenös injiziert. 20 min später wurden die Ratten getötet. Anschließend wurde die Haut vorsichtig von der den Luftsack umgebenden Membran entfernt.

Die Quantifizierung der Angiogenese erfolgte semiquantitativ durch die Schätzung der Ausdehnung der Gefäßproliferation in situ. Die Schätzung erfolgte durch die subjektive Zuordnung folgender durch die Untersucher definierten Größen:

0 = Membranen ohne Implantate

1 = keine Gefäße erreichen das Implantat

2 = einige Gefäße erreichen das Implantat

3 = viele neue Gefäße erreichen und einige Gefäße penetrieren das Implantat

4 = viele Gefäße erreichen und penetrieren das Implantat

Dann wurden die Implantate mit den Membranen aller Tiere in einem Kunststoffröhrchen gesammelt, 10%iges Formalin zugegeben und mit Hilfe eines γ -Counters die ^{125}I -Aktivität gemessen.

BASAKI et al. [2001] adaptierten dieses Modell an die Maus. Zur Stimulation der Angiogenese implantierten sie Millipore-Kammern, die Tumorzellen enthielten, in die Membran des Luftsackes. Die Quantifizierung der Angiogenese erfolgte nach 5 Tagen. Nachdem die Millipore-Kammern entfernt wurden, positionierten sie Ringe, dessen innere Durchmesser den Durchmessern der Kammern entsprachen, an denselben Stellen, wo vorher die Kammern implantiert waren. Mit Hilfe der Ringe wurden anschließend diese Bereiche aufgesucht und fotografiert. Anhand der Aufnahmen wurde innerhalb der Ringe die Anzahl der Gefäße, die eine Mindestlänge von 3 mm aufwiesen, bestimmt. Als quantitatives Maß der Angiogenese wurde die Anzahl der Gefäße mit einem subjektiven Index (0 – 5) versehen.

Dem nicht geringen Zeitaufwand zur Präparation des subkutanen Luftsackes stehen als Vorteile insbesondere die relativ einfache Technik, die Reproduzierbarkeit und der geringe Kostenaufwand gegenüber [LICHTENBERG et al., 1997].

2.3.2.6 Modelle mit Hautpräparationen

Die Untersuchung und Quantifizierung der Angiogenese wurde von vielen Untersuchern an Hautpräparationen in Ratten und Mäusen durchgeführt [PLUNKETT und HAILEY, 1990; RUNKEL et al., 1991; WILD et al., 2000].

Die Quantifizierung der Angiogenese erfolgte in diesen Modellen entweder durch die Untersuchung sich neu entwickelnder Kapillaren [RUNKEL et al., 1991; WILD et al., 2000; GUO et al., 2001] oder durch die Messung des Hämoglobingehaltes des untersuchten Hautbereiches [PLUNKETT und HAILEY, 1990; HOFFMANN et al., 1997].

RUNKEL et al. [1991] injizierten zur Stimulation der Angiogenese verschiedene Tumorzellsuspensionen (Hepatokarzinom und Fibrosarkom aus der Maus) in die Haut von Mäusen. Zur Einbringung der Tumorzellen wurden die Tiere anästhesiert, die Haut im Bereich des Abdomens von Haaren befreit und im rechten Abdominalbereich ein triangelförmiger Hautlappen abpräpariert. Der aufgeschlagene Hautlappen wurde im Sektionsmikroskop bei 20facher Vergrößerung betrachtet und der Bereich mit der geringsten Gefäßzahl ausgewählt. Die Gefäße in diesem Bereich wurden vorsichtig auf dem Hautlappen nachgezeichnet (die Technik wurde von den Autoren nicht beschrieben) und eine Aufnahme erstellt. Anschließend wurden unter mikroskopischer Kontrolle 0,3 ml der verschiedenen Tumorzellsuspensionen (die Konzentration der Zellen wurde von den Autoren nicht benannt) in dem ausgesuchten und fotografierten Bereich in die Haut injiziert, der Hautlappen in die ursprüngliche Lage zurückgebracht und geklammert.

Die Quantifizierung der Angiogenese erfolgte durch das Zählen der neuen Gefäße. Hierfür wurden an jedem 2. Tag die Tiere erneut anästhesiert, der Hautlappen gelöst und mikroskopisch bei 20facher Vergrößerung betrachtet. Durch den Vergleich mit der letzten Aufnahme wurden die Gefäße, die neu gebildet waren, gezählt. Eine genaue Angabe der Gefäßzahl war über einen Zeitraum von 8 bis 16 Tagen möglich.

In einem ähnlichen Modell quantifizierten GUO et al. [2001] die Angiogenese mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie, eine Methode, die auch zur Darstellung von Gefäßen in Tumorbiopsien verwendet wird [LENANDER und HOLMGREN, 1999]. Subkutan eingebrachte Tumoren wurden nach 21 Tagen entfernt. Von den entfernten Tumorgeweben wurden Gefrierschnitte mit einer Dicke von 50 µm hergestellt. Als Negativkontrollen wurden Skelettmuskelschnitte mitgeführt. In den Schnitten wurden mittels Immunhistochemie durch einen Primärantikörper gegen CD31 und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper die Gefäße fluoreszierend dargestellt. Die so markierten Schnitte wurden mit einem computergesteuerten konfokalen Laserscanning Mikroskop gescannt. Das Scannen erfolgte bei 200facher Vergrößerung und einer Wellenlänge von 488 nm. Die Bilder wurden mit Hilfe der zu diesem System gehörenden Software analysiert. Diese ermöglichte nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz die Berechnung der fluoreszierenden Fläche pro Bild. Die

fluoreszierende Fläche galt als numerische Darstellung der Fläche der Gefäße und diente somit der quantitativen Erfassung der Gefäße.

Eine computergesteuerte digitale Bildanalyse wurde von WILD et al. [2000] zur Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese eingesetzt.

Sie injizierten Mäusen eine Suspension von Colonkarzinomzellen in die Flanke. Ab dem 3. Tag wurden die Tiere in 2 Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe erhielt von diesem Tag an täglich intraperitoneal ein VEGF-Diphtherietoxin-Konjugat, den Tieren der anderen Gruppe wurde lediglich eine Kochsalzlösung verabreicht. Die Behandlung erfolgte über einen Zeitraum von 7 Tagen, dann wurden die Tiere getötet und die Tumoren zur immunhistochemischen Untersuchung entnommen.

Vom Tumorgewebe wurden Gefrierschnitte mit einem Durchmesser von 8 – 10 µm angefertigt und mit fluoreszierenden Phycoerythrin(PE)-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen CD31 inkubiert. Die Schnitte wurden fluoreszenzmikroskopisch bei 200facher Vergrößerung untersucht und zufällig ausgewählte Bereiche mit einer am Mikroskop installierten Digitalkamera fotografiert. Die computergesteuerte Analyse der Bilddateien erfolgte durch die Zählung PE-positiver Pixel. Zunächst wurden für jedes Bild Kopien im roten, blauen und grünen Kanal erstellt. Da PE rot fluoresziert, wurden die weiteren Untersuchungen an den Rotkanal-Bildern durchgeführt. Die Bilder wurden in Schwarz-Weiß-Bilder überführt und in Graustufen skaliert. Die Skalierung beinhaltete die Einteilung von 255 Graustufen, wobei 0 den dunkelsten und 255 den hellsten Punkt repräsentierte. Anschließend wurde, um eine Berücksichtigung der Hintergrundfluoreszenz auszuschließen, ein für alle Bilder geltender Schwellenwert definiert. Dann wurden die Bilder binär dargestellt, das heißt, dass alle Pixel oberhalb des Schwellenwertes weiß und alle unterhalb des Schwellenwertes schwarz dargestellt waren. Nachfolgend wurden computergesteuert die weißen Pixel gezählt. Auf diese Weise wurde die Fläche, die durch die Gefäße eingenommen wurde, quantifiziert und als prozentualer Anteil der Gesamtfläche des Bildes angegeben. Um die Länge der Gefäße zu ermitteln, wurde das Schwarz-Weiß-Bild in ein Negativ umgekehrt. Durch eine Software-Funktion wurde nun innerhalb jeder linearen schwarzen Struktur, die jeweils einem Gefäß entsprach, die Breite der Pixel dem Durchmesser dieser Struktur angepaßt, während die Höhe der Pixel konstant blieb. Somit ergab die Anzahl der Pixel einen proportionalen Wert zur Länge der Gefäße. Zusätzlich zur Fläche und Länge der Gefäße wurde die Anzahl der Gefäße angegeben. Diese war definiert als Anzahl der Gefäßenden + Anzahl der Gefäßverzweigungspunkte / 2.

PLUNKETT und HAILEY [1990] und HOFFMANN et al. [1997] quantifizierten die tumorzellinduzierte Angiogenese durch die Bestimmung der Hämoglobinmenge in Geweben.

Zur Herstellung der Tumorimplantate wurden Lewis-Lungenkarzinomzellen in einer Na-Alginat-Lösung suspendiert. Alginat ist ein aus Algen gewonnenes hochmolekulares Polyuronid, das keine angiogene Antwort auslöst [HOFFMANN et al., 1997]. Durch die Zugabe von CaCl_2 erfolgte in der Lösung ein Austausch von Natrium gegen Calcium, was eine Gelbildung zur Folge hatte. Das entstandene Gel wurde mit steriler Luft durch eine Düse gepumpt, wodurch kleinste Alginat-Perlen, die Tumorzellen enthielten, entstanden.

Diese Alginat-Tumorzell-Perlen wurden Mäusen in Portionen à 200 μl entlang der Mittellinie direkt unter das Peritoneum injiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden einige Tiere getötet und sezirt. Die Bereiche um die Alginat-Tumorzell-Perlen wurden fotografiert. Anschließend wurden die Perlen mit dem sie umgebenden Peritoneum und der darüberliegenden Haut entfernt. Die entnommenen Gewebestücke mit den darin enthaltenen Perlen wurden dann gewogen, zerkleinert und in Wasser extrahiert. Nachdem die Röhrchen ca. 12 Stunden geschüttelt wurden, konnte das Hämoglobin als Überstand gewonnen werden. Durch die Zugabe des Drabkin's-Reagenzes, welches CN^- enthält, konnte die Menge des so entstandenen Zyanohämoglobins bei einer Wellenlänge von 540 nm photometrisch bestimmt werden. Alternativ wurden einigen Mäusen mit Natriumchromat markierte Erythrozyten vor der Tötung injiziert und in den entnommenen Geweben die Radioaktivität mit einem γ -Counter gemessen.

Ein eindeutiger Nachteil der quantitativen Untersuchungen an extrahierten Geweben ist, dass der zeitliche Verlauf der Ereignisse nicht dargestellt werden und somit im Grunde die Angiogenese nicht wirklich quantifiziert werden kann [JAIN et al., 1997].

2.3.2.7 Sonographie-Modell

DENIS et al. [2002] entwickelten eine in vivo-Methode zur Untersuchung von Tumorgefäßen, bei der die Gefäße mit Hilfe der Power Doppler-Sonographie dargestellt wurden. Dieses Modell sollte in Langzeituntersuchungen zur Quantifizierung der Angiogenese in Ratten dienen.

Für die Untersuchung erhielten 48 Tage alte Ratten eine einmalige subcutane Injektion im Bereich der Mammakomplexe mit N-Methyl-N-Nitroso-Harnstoff in einer Dosis von 25 mg/kg Körpergewicht. Die sich daraufhin entwickelnden Tumoren wurden durch die wöchentliche Palpation untersucht und die Größe des Tumors mit einem Meßschieber gemessen. Die Größe des Tumors wurde durch die Multiplikation der beiden größten gemessenen Durchmesser (cm^2) angegeben.

Sobald der Tumor eine Größe von 1 cm² erreicht hatte, wurden die Tiere nach dem Zufallsprinzip in drei Gruppen geteilt und über einen Zeitraum von sechs Wochen folgendermaßen behandelt: Drei Ratten dienten als Kontrolle, ihnen wurde jede Woche einmal eine NaCl-Lösung intraperitoneal injiziert. Eine Gruppe von sechs Ratten erhielt einmal wöchentlich eine intraperitoneale Injektion mit dem Chemotherapeutikum Epirubicin (2,5 mg/kg). Vier weitere Ratten wurden mit einer einmaligen Dosis von 18 Gy bestrahlt.

In jeder Gruppe erfolgte an drei verschiedenen Tagen eine sonographische Untersuchung des Tumors. Diese wurde in der Kontrollgruppe und der mit dem Chemotherapeutikum behandelten Gruppe zwei Tage vor der Behandlung, direkt nach der 3. Injektion und sieben Tage nach der 6. Injektion durchgeführt. Die Tiere der Gruppe, welche die Bestrahlung erhielten, wurden zwei Tage vor der Bestrahlung und eine und vier Wochen nach der Bestrahlung sonographisch untersucht.

Der Tumor wurde bei jeder Untersuchung mit einer Frequenz von 8- bis 15-MHz mit einem Linearschallkopf abgetastet. Von den Bildern mit dem nach subjektiver Einschätzung höchsten Doppler-Signal wurden digitale Aufnahmen erstellt.

Diese wurden mit Hilfe einer Software (Data-Pro Noesis, Les Ulis, Frankreich) ausgewertet. Diese Software bestimmte die Intensität des Doppler-Signals für jeden Pixel in Übereinstimmung mit der Farbskala des Power Doppler-Signals. In den erstellten digitalen Aufnahmen wurden vom Untersucher sogenannte „Regionen von besonderem Interesse“ (ROI) bestimmt, die der gemessenen Größe des Tumors entsprachen. In diesen ROI wurde einerseits die Gesamtzahl der farbigen Pixel, andererseits die Intensität des Doppler-Signals (Total Power) bestimmt. Aus diesen Meßwerten wurden folgende Parameter berechnet:

- a.) Dichte der Farbpixel (%), $CPD = \text{Anzahl der farbigen Pixel in der ROI} / \text{Gesamtzahl der Pixel in der ROI}$
- b.) Vaskularisations-Index (cm²), $VI = \text{Total Power in der ROI} / \text{Gesamtzahl der Pixel in der ROI}$

Die Angiogenese wurde quantifiziert, indem für jede Gruppe die Differenz der CPD- und VI-Werte, die sich zwischen der zweiten und ersten bzw. der dritten und ersten Untersuchung ergab, berechnet wurde.

Da bisher nur DENIS et al. [2002] diese Methode verwendeten, ist in der Literatur keine Beurteilung zu finden.

2.3.3 Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese in ex vivo-Modellen

Ex vivo-Modelle beruhen auf der Kultivierung von Explantaten aus der Aorta von embryonalen oder adulten Ratten und Mäusen [BLACHER et al., 2001; AKIMOTO et al., 2002] oder aus Gefäßen der Plazenta verschiedener Spezies [BROWN et al., 1996; JUNG et al., 2001] in einer dreidimensionalen Matrix.

NICOSIA und OTTINETTI [1990a] untersuchten verschiedene Matrices, wie Kollagen I, Fibrin und Matrigel[®], für die Kultivierung von Aortenring-Explantaten.

Die am häufigsten verwendete Matrix ist das aus einem Basalmembran-produzierenden Tumor gewonnene Matrigel[®], das zu einer stabilen Gefäßbildung führt [GRANT und KLEINMAN; 1997]. So können die sich entwickelnden Mikrogefäße drei bis fünf Tage lang untersucht, gezählt und mittels Image analysis quantifiziert werden [KRUGER et al., 2001].

Zur Präparation des Ratten-Aorten-Modells („rat aortic ring assay“) wird die Aorta von 8 – 10 Wochen alten Ratten aus dem Thorax extrahiert und vorsichtig von dem umgebenden Gewebe befreit. Die Aorta wird dann in 1 mm lange Ringe geschnitten und in Kulturplatten unterschiedlicher Größe in eine Matrix eingebettet [NICOSIA und OTTINETTI, 1990b; BLACHER et al., 2001; KRUGER und FIGG, 2001]. NICOSIA und OTTINETTI [1990b] kultivierten den Aortenring in einer Fibringelmatrix unter serumfreien Bedingungen. Das Explantat wurde phasenkontrast-mikroskopisch untersucht bis die Bildung von Mikrogefäßen beobachtet werden konnte.

Zur Quantifizierung der Angiogenese wurden von dem Gelblock Schnitte parallel zur Aortenaußengrenze angefertigt. In diesen Schnitten wurde die Anzahl der mikrovaskulären Konturen ausgezählt.

BLACHER et al. [2001] entwickelten eine sehr umfassende Methode zur Quantifizierung der Angiogenese in diesem Modell. Der in Kollagengel kultivierte Aortenring wurde über zwei Wochen jeden 2. Tag phasenkontrastmikroskopisch untersucht und digitale Aufnahmen mit einer Größe von 760 x 540 Pixel mit 256 möglichen Graustufen erstellt. Nach der Festlegung eines Schwellenwertes wurde das Bild binarisiert, wodurch alle Punkte, die heller als der Schwellenwert waren, weiß dargestellt und alle Punkte, die unterhalb des Schwellenwertes lagen, schwarz dargestellt wurden. Zur Darstellung der Gefäße und zur Entfernung der Fibroblasten-ähnlichen Zellen wurden nun alle weißen Pixel, die nicht mit der Fläche des Aortenrings in Verbindung standen, computergesteuert von den digitalen Bildern entfernt.

Die Bilder wurden computergesteuert mit einem Raster aus konzentrischen Ringen versehen, die mit konstantem Abstand parallel zur Oberfläche des Aortenrisses lagen.

Die Quantifizierung der Angiogenese wurde anhand folgender Parameter durchgeführt:

Anzahl der Gefäße (N_v) / Anzahl der Schnittpunkte der Gefäße mit der am nächsten zur Oberfläche des Aortenringes gelegenen Linie.

Maximale Gefäßlänge (L_{max}) / Abstand der am weitesten von der Aortenoberfläche entfernten Linie, die von einem Gefäß geschnitten wird.

Anzahl der Gefäßverzweigungen (N_b) / Summe der zusätzlichen Gefäßschnittpunkte in jeder folgenden Linie, ausgehend von der Aortenoberfläche.

Während BLACHER et al. [2001] mit dem Ratten-Aorten-Modell anhand der binären Methode die Anzahl der Gefäße, die maximale Gefäßlänge und die Anzahl der Gefäßverzweigungen bestimmten, quantifizierten KRUGER und FIGG [2001] in diesem Modell die Fläche, die von den Gefäßen eingenommen wurde, als Gesamtzahl der weißen Pixel. Diese deklarierten sie als die Gefäßdichte.

JUNG et al. [2001] quantifizierten die Angiogenese in einem Explantat-Modell unter Verwendung nicht näher spezifizierter Venen aus der Plazenta des Menschen. Nach der Entnahme der Plazentarvenen wurden diese der Länge nach eröffnet, Scheiben mit einem Durchmesser von 2 mm ausgestanzt und diese in Vertiefungen von 96-Loch-Platten in einer Fibrinmatrix kultiviert. An den Tagen 3, 6, 8, 10, 13 und 15 wurden die Vertiefungen bei 20facher Vergrößerung mit einem Invertmikroskop von einem subjektiven Betrachter untersucht. Durch den Betrachter wurde die angiogene Antwort semiquantitativ bestimmt. Der Bereich um jedes Präparat herum wurde in vier Quadranten eingeteilt, anschließend wurde der Gefäßanzahl und -länge in jedem Quadranten ein Rang 0 – 4 zugeteilt. Die Summe dieser Rangzahlen wurde als Grad der Angiogenese definiert.

Vorteil der ex vivo-Modelle ist, dass die Einflüsse am Gefäß beteiligter nicht-endothelialer Zellen, beispielsweise glatter Muskelzellen, auf die Angiogenese untersucht werden können [AUERBACH et al., 2003]. Dabei spielen die bei in vivo-Untersuchungen häufig auftretenden inflammatorischen Komplikationen keine Rolle [KRUGER et al., 2001].

Von Nachteil ist die limitierte Reproduzierbarkeit dieser Modelle, da die Angiogenese häufig nicht in jedem Explantat stimuliert werden kann, bzw. keine für jedes Explantat einheitliche Konzentration für die verschiedenen proangiogenen Faktoren zur Stimulation der Angiogenese ermittelt werden kann [AUERBACH et al., 2000].

2.3.4 Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese in in vitro-Modellen

Untersuchungen der Angiogenese in vitro erfolgen an kultivierten makro- und mikrovaskulären Endothelzellen [MONTESANO et al., 1986; HOYING und WILLIAMS, 1996; IWAHANA et al., 1996; LANG et al., 2000] oder in Kokulturen von verschiedenen Zellen [BABAEI und STEWART, 2002; RAMSAUER et al., 2002; VELAZQUEZ et al., 2002]. Insbesondere in die zellulären und molekularen Kontrollmechanismen der Angiogenese liefern in vitro-Modelle signifikante Einblicke [JAIN et al., 1997].

Die verschiedenen Stufen der angiogenen Kaskade, die Migration und Proliferation der Endothelzellen und ihre zwei- bzw. dreidimensionale Organisation in strangartige Strukturen, wurden in vitro beobachtet. Jedoch erfolgte in den meisten in vitro-Modellen die Quantifizierung der Angiogenese auf der Basis der Migration und Proliferation der Endothelzellen [JAIN et al., 1997]. Nur in wenigen in vitro-Modellen wurde die zwei- bzw. dreidimensionale Organisation der Endothelzellen in strangartige Strukturen quantifiziert [MEYER et al., 1997; PETERS et al., 2002; CONNOLLY et al., 2002].

2.3.4.1 Quantifizierung der Migration von Endothelzellen

Zur Untersuchung der Migration von Endothelzellen wurde in den meisten Fällen die Boyden-Kammer verwendet [JAIN et al., 1997].

2.3.4.1.1 Die Boyden-Kammer

Die Boyden-Kammer besteht aus zwei übereinander liegenden Kammern, die durch einen Kernporen-Polycarbonat-Filter mit einer Porengröße von 5 – 12 µm, meist 8 µm, voneinander getrennt sind [BOYDEN, 1962]. Grundsätzlich werden die Endothelzellen in die obere der beiden Kammern auf dem Polycarbonat-Filter ausgesät und ihre Migration durch den Filter hindurch auf die untere Seite untersucht.

Die Migration von Endothelzellen, stimuliert durch S180-konditioniertes Medium (S180 murines Fibrosarkom), wurde von IWAHANA et al. [1996] mit der Boyden-Kammer quantifiziert. Hierfür wurde die untere Kammer mit S180-konditioniertem Medium beladen. In die obere Kammer wurden Endothelzellen aus der humanen Nabelschnur (HUVEC) auf die Oberfläche des gelatinisierten Polycarbonat-Filters in einer Konzentration von $1,2 \times 10^4$ im Grundmedium ausgesät. Nach fünfstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen, die

noch auf der Oberfläche des Polycarbonat-Filters hafteten, vorsichtig mit einem Tuch entfernt und die Filter mit Methanol fixiert. Die Zellen, die auf die Unterseite des Filters migriert waren, wurden mit Giemsa-Lösung gefärbt, bei 100facher Vergrößerung mikroskopisch untersucht und mit einer am Mikroskop installierten Farbvideokamera fotografiert. In den erstellten Aufnahmen wurden die gefärbten Zellkerne durch computergesteuerte Bildanalyse quantifiziert.

MUROHARA et al. [1999] beschränkten bei gleicher Durchführung der Untersuchung die Quantifizierung der migrierten Zellen auf 3 zufällig gewählte Bildausschnitte pro Filter.

Die Untersuchung der Migration von Endothelzellen unterschiedlichen Ursprungs (humane mikrovaskuläre Endothelzellen aus der Lunge und humane makrovaskuläre Endothelzellen aus der Aorta) wurde von HARVEY et al. [2002] mit der Boyden-Kammer durchgeführt. Zur Quantifizierung der migrierten Endothelzellen wurden die Filter mit 5%igem Formaldehyd fixiert und mit Hämatoxylin gefärbt. Anschließend wurden die angefärbten Zellen mikroskopisch bei 200facher Vergrößerung in vier zufällig gewählten Gesichtsfeldern von drei zufällig ausgewählten Filtern gezählt.

Verschiedene Forschungsgruppen verwendeten dieses System vor allem zur Untersuchung der inhibitorischen Wirkung unterschiedlicher Substanzen auf die Migration von Endothelzellen. Dabei wurde die antiangiogene Wirkung dieser Substanzen dadurch bestimmt, dass gleichzeitig Endothelzellen als Positivkontrolle mit proangiogenen Faktoren inkubiert und untersucht wurden.

KUZUYA et al. [1998] beschichteten die Oberfläche des Polycarbonat-Filters mit Kollagen Typ I. Sie demonstrierten, dass die auf die Migration von Endothelzellen hemmende Wirkung des Kollagen Typ I vom Kohlenhydratanteil des Moleküls abhängig ist. Dabei verstärkt sich die hemmende Wirkung des Kollagen Typ I mit Zunahme der Glykosilierung des Kollagens. Zu diesem Zweck wurden die Kollagen-beschichteten Filter mit Glykolaldehyd behandelt, bevor Endothelzellen aus der bovinen Aorta auf die Filter ausgesät wurden. Die Quantifizierung migrierter Zellen erfolgte nach Entfernung der Zellen auf der Filteroberfläche durch die mikroskopische Bestimmung der Zellzahl auf der Unterseite der Filter in 8 zufällig gewählten Gesichtsfeldern bei 400facher Vergrößerung.

Eine weitere Möglichkeit, die Wirkung von Angiogenese-Inhibitoren auf die Migration von Endothelzellen zu untersuchen ist, die Zellen vor der Aussaat in der Boydenkammer mit dem Hemmstoff zu inkubieren. Die Zellen werden also mit dem Medium, in dem sich der Hemmstoff befindet, in die obere Kammer ausgesät. Diese Methode wurde von MINISCHETTI et al. [2000] zur Untersuchung der Wirkung von TNP-470 auf die Angiogenese verwendet.

Die auf die Unterseite des Filters migrierten Zellen wurden mit Toluidinblau gefärbt, in 5 – 8 zufällig gewählten Gesichtsfeldern gleicher Größe gezählt und die mittlere Konzentration der Zellen pro Filter berechnet.

Zur Quantifizierung der Antiangiogenese kann der Angiogenese-Inhibitor auch dem Medium der unteren Kammer zugegeben werden. Das bedeutet, dass der Hemmstoff dem Medium hinzugefügt wird, welches auch die proangiogenen Faktoren enthält. Mit dieser Methode wurde die antiangiogene Wirkung von Substanzen, wie beispielsweise Endostatin [ERGÜN et al., 2001] und Angiotensinogen [CÉLÉRIER et al., 2002], quantifiziert.

2.3.4.1.2 „Scratch Wound Assay“

Der „Scratch Wound Assay“ stellt eine einfache Methode zur quantitativen Untersuchung der Migration von Endothelzellen dar. Hierfür werden aus einem Bereich eines konfluenten Monolayers die Endothelzellen mechanisch entfernt und das Einwandern der Zellen aus dem übrigen Monolayer in diesen Bereich beobachtet [MUROHARA et al., 1999; WEIS et al., 2002]. Für diese Untersuchung wurden Endothelzellen in die Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen in einem bestimmten Bereich der Vertiefung mit einem Skalpell abgekratzt und die Grenze des „verletzten“ Monolayers an 10 zufällig gewählten Abschnitten mikroskopisch untersucht und fotografiert. 24 und 48 Stunden später wurden erneut 10 zufällig gewählte Abschnitte der Grenze fotografisch dokumentiert. In diesen erstellten Bildausschnitten wurde die Anzahl der aus dem Monolayer ausgewanderten Endothelzellen gezählt und als Zellen / cm² angegeben [MUROHARA et al., 1999].

2.3.4.1.3 „Radial Invasion of Matrix by Aggregated Cells“ (strahlenförmige Invasion aggregierter Zellen in eine Matrix)

VERNON und SAGE [1999] verwendeten eine Methode zur Quantifizierung der Migration von Endothelzellen, die als „radial invasion of matrix by aggregated cells“ (RIMAC) bezeichnet wird.

Dazu wurden Endothelzellen aus der bovinen Aorta in einem Grundmedium suspendiert und die Konzentration der Zellen in der Suspension bestimmt. Ein Tropfen dieser Suspension (10³ – 10⁴ Endothelzellen) wurde auf ein Plastikplättchen gegeben und das Plättchen anschließend umgedreht auf einem Steg plaziert („hängender Tropfen“).

Nach 4 Tagen hatte sich ein Endothelzellaggregat in dem Tropfen gebildet und das Plättchen wurde wieder umgedreht. Die Flüssigkeit des Tropfens wurde vorsichtig abgesaugt, so dass das Zellaggregat auf dem Plastikplättchen verblieb. Sodann wurde ein Nylonring auf dem Plättchen so plaziert, dass das Zellaggregat in der Mitte des Ringes lag. Das Zellaggregat wurde dann mit einer Kollagen Typ I-Lösung übergossen und 90 min bei 37°C gehärtet. Anschließend wurde der Ring mit dem Gel umgedreht, das Plastikplättchen entfernt, der Ring noch einmal mit der Kollagen Typ I-Lösung übergossen und für 90 min bei 37°C gehärtet.

Die so entstandenen Gelplättchen wurden in 24-Loch-Platten plaziert und mit Medium, dem jeweils VEGF, FGF-2 und TGF- β 1 zugegeben wurde, unterschiedlich lange inkubiert.

Zur Quantifizierung der Endothelzellmigration wurden die Gelplättchen auf einen Objektträger verbracht, auf dem im Hintergrund 64 konzentrische Ringe mit einem Abstand von 10 μ m projiziert waren. Mit Hilfe dieser Ringe wurde mikroskopisch die Entfernung der migrierten Zellen zum Aggregat bestimmt und das arithmetische Mittel als Maß für die Migration angegeben.

2.3.4.2 Quantifizierung der Proliferation von Endothelzellen

Die Untersuchung der Proliferation von Endothelzellen ist bis heute eine der am häufigsten angewendeten Methoden zur Quantifizierung der Angiogenese in vitro [AUERBACH, 2002].

2.3.4.2.1 Kolorimetrische Untersuchungen

Eine von KUENG et al. [1989] verwendete Methode zur Quantifizierung der Proliferation unterschiedlicher Zellen in 96-Loch-Platten wurde von mehreren Untersuchern an Endothelzellen adaptiert.

LANG et al. [2000] quantifizierten mit dieser Methode die stimulierende Wirkung von VEGF, PlGF und FGF-2 auf die Proliferation mikro- und makrovaskulärer Endothelzellen. Die Zellen wurden in einer konstanten Konzentration von 3×10^3 und 6×10^3 in gelatinierten Vertiefungen einer 96-Loch-Platte ausgesät und mit den Angiogenese-Stimulatoren, die in unterschiedlichen Konzentrationen dem Grundmedium zugegeben wurden, für 24, 48 und 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen in Vertiefungen, die das Grundmedium ohne Stimulatoren erhielten. Anschließend wurde zur Quantifizierung der Proliferation Tetrazoliumsalz dem Medium zugegeben. Tetrazoliumsalz wird durch Succinat, katalysiert durch das mitochondriale Enzym Succinat-Dehydrogenase, zum violett gefärbten

Formazan reduziert. Da bei Zunahme der Zellzahl auch die Anzahl der Mitochondrien steigt, ist bei verstärkter Proliferation der Zellen eine gesteigerte Bildung von Formazan die Folge. Die optische Dichte der Formazan-Färbung, die proportional zur Zellzahl ist, wurde mit einem Multiwell Spectrophotometer bei 450 nm gemessen.

Ebenso wurde mit Hilfe dieser Quantifizierungsmethode von verschiedenen Untersuchern die Hemmung der Endothelzellproliferation durch Angiogenese-Inhibitoren untersucht. So konnte mit dieser Methode die hemmende Wirkung des Endostatins [YOON et al., 1999] und Angiostatins [YOKOYAMA et al., 2000; WEIS et al., 2002] auf die Proliferation von makrovaskulären Endothelzellen (HUVEC) quantifiziert werden.

MINISCHETTI et al. [2000] untersuchten die antiangiogene und synergistische Wirkung des TNP-470, eines synthetischen Fumagillin-Derivates, und des Interferon- α 2a, indem sie makrovaskuläre Endothelzellen (HUVEC) über einen Zeitraum von 6 Tagen kultivierten. Durch den Einsatz von Positivkontrollen, in Form von Zellen, die ein Wachstumsmedium erhielten, untersuchten sie die auf die Angiogenese hemmende Wirkung von TNP-470 und Interferon- α 2a durch den Vergleich mit den Positivkontrollen.

SHICHIRI und HIRATA [2001] und HUANG et al. [2002] quantifizierten die Proliferation von Endothelzellen durch die Messung der Fluoreszenz von inkorporiertem Propidium-Iodid. Sie untersuchten die hemmende Wirkung des Endostatins auf die Proliferation von Endothelzellen aus der Aorta und aus Pulmonalarterien, indem sie die Zellen 14 Tage lang mit und ohne Endostatin kultivierten. Anschließend wurden die Zellen durch Trypsinierung aus den Kulturschalen gewonnen und mit dem rot fluoreszierenden Propidium-Iodid angefärbt. Die zellulären Fluoreszenzsignale wurden dann mit einem Durchflußzytometer bestimmt.

HUANG et al. [2002] verwendeten diese Methode zur Quantifizierung der hemmenden Wirkung des ZD1839, eines selektiven Epidermal Growth Factor Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitors, auf die Proliferation von makrovaskulären Endothelzellen (HUVEC).

2.3.4.2.2 Aufnahme von [3 H]Thymidin

Die Aufnahme von [3 H]Thymidin in die DNA der Zellen wird bestimmt durch die Rate der DNA-Synthese. Sie stellt somit eine Methode zur Quantifizierung der Proliferation von Endothelzellen dar. MUROHARA et al. [1999] quantifizierten die Proliferation von

Endothelzellen aus der bovinen Aorta (BAEC), indem sie diese 16 Stunden mit [³H]Thymidin inkubierten und anschließend die von der DNA inkorporierte Radioaktivität ermittelten. Auch der antiproliferative Effekt von Angiotensinogen und seinen Derivaten konnte anhand dieser Methode quantifiziert werden [CÉLÉRIER et al., 2002].

2.3.4.2.3 Coulter Counter

Eine einfache Methode zur Quantifizierung der Proliferation von Endothelzellen stellt die Zählung von Zellen mit einem elektronischen Partikelzählgerät, dem Coulter Counter, dar. Dazu werden die Endothelzellen mit pro- bzw. antiangiogenen Faktoren über einen bestimmten Zeitraum inkubiert und in Suspension in dem Gerät automatisch gezählt [SCHOR et al., 1983; SANKAR et al., 1996; VASSE et al., 1999].

2.3.4.3 Quantifizierung der durch Endothelzellen in vitro gebildeten Strukturen

Die spontane zwei- bzw. dreidimensionale Organisation in vitro kultivierter mikrovaskulärer Endothelzellen in strangartige Strukturen wurde erstmals 1980 von FOLKMAN und HAUDENSCHILD beobachtet. Sie konnten phasenkontrast- und transmissions-elektronenmikroskopisch ein Lumen innerhalb dieser Stränge nachweisen. Diese in vitro gebildeten endothelialen Stränge wurden als „kapillarähnliche Strukturen“ definiert. Seitdem wurden nur wenige Studien zur Untersuchung und Quantifizierung strangartig organisierter Endothelzellen veröffentlicht [z.B.: MONTESANO et al., 1983; HOYING und WILLIAMS, 1996; NEHLS und DRENCKHAHN, 1995; MEYER et al., 1997; PETERS et al., 2002]. Dabei wurde von den Autoren der Begriff „kapillarähnliche Strukturen“ verwendet, unabhängig davon, ob ein Lumen innerhalb der untersuchten Strukturen vorhanden war. Nur in sehr wenigen Untersuchungen wurde ein Lumen innerhalb der endothelialen Strukturen nachgewiesen [z.B.: MONTESANO et al., 1983; MEYER et al., 1997].

Die Modelle zur Quantifizierung sogenannter „kapillarähnlicher Strukturen“ können in zwei Kategorien eingeteilt werden, nämlich zweidimensionale und dreidimensionale Modelle [VAILHÉ et al., 2001].

2.3.4.3.1 Zweidimensionale Modelle der in vitro-Angiogenese

In diesen Modellen werden die Endothelzellen in Kulturschalen ausgesät, die meist vorab mit adhäsiven Proteinen beschichtet wurden. Alternativ werden die Zellen auf die Oberfläche von Kollagen- oder Fibringelen oder Matrigel[®] ausgesät bzw. mit diesen überschichtet [VAILHÉ et al., 2001]. Die zweidimensionalen Modelle der in vitro-Angiogenese wurden von VAILHÉ et al. [2001] in zwei Gruppen unterteilt. Bei den sogenannten Kurzzeitmodellen erfolgt die Bildung der strangartigen Strukturen innerhalb von ein bis drei Tagen. Erfordert die Entwicklung dieser Strukturen einen längeren Zeitraum, so werden diese als Langzeitmodelle bezeichnet.

PETERS et al. [2002] verwendeten aus der humanen Haut isolierte, mikrovaskuläre Endothelzellen. Die Endothelzellen wurden in gelatinierte Kulturschalen ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit einem Kollagen Typ I-Gel überschichtet. Das Gel wurde 20 min bei 37°C gehärtet. Dann wurde das Kulturmedium, das FGF-2 zur Stimulation der Angiogenese enthielt, vorsichtig zugegeben. Die Quantifizierung der Angiogenese mittels Software-gestützter Bildanalyse erfolgte nach 20 Stunden. Zur Darstellung der Zellen wurde eine Vitalfärbung durch Zugabe von Calcein-Acetoxy-methylester zum Kulturmedium durchgeführt. Calcein-Acetoxy-methylester wird von den Zellen enzymatisch in einen fluoreszierenden Farbstoff überführt. Mit einer Digitalkamera wurden Farbbilder erstellt, in denen die Quantifizierung mittels Bildanalyse erfolgte. Es wurden computergesteuert die Pixel der angefärbten Fläche, repräsentativ für die von Endothelzellen bewachsene Fläche, gezählt. Die per Bildanalyse ermittelte Pixelzahl von nicht zur Angiogenese stimulierten Endothelzellmonolayern, die aufgrund des lückenlosen Wachstums entsprechend hoch war, wurde als 0% Angiogenese in vitro definiert. Das arithmetische Mittel der ermittelten Pixelzahl 24 analysierter Bilder von zur Angiogenese stimulierten Endothelzellen wurde entsprechend als 100% Angiogenese in vitro definiert. Diese lag aufgrund der Organisation der Endothelzellen zu strangartigen Strukturen, wodurch die Kontinuität des Zellrasens reduziert wurde, entsprechend unter der Pixelzahl der nicht zur Angiogenese stimulierten Monolayer. In diesem Modell quantifizierten PETERS et al. [2002] die inhibierende Wirkung von Co^{2+} auf die Angiogenese.

CONNOLLY et al. [2002] säten Endothelzellen aus der humanen Nabelschnur (HUVEC) auf Glasplättchen in 4-Loch-Platten aus und überschichteten diese mit Matrigel[®]. Nach 20 – 24 Stunden hatten sich strangartige Strukturen gebildet, die mikroskopisch untersucht wurden. Mit einer am Mikroskop installierten Kamera wurden drei zufällig gewählte Bildausschnitte

pro Glasplättchen fotografiert. Die Angiogenese wurde quantifiziert, indem in den erstellten Bildern computergesteuert die Länge kontinuierlicher Endothelzellstränge, an denen mindestens drei Zellen beteiligt waren, ermittelt wurde. Zusätzlich wurde anhand phasenkontrastmikroskopischer Aufnahmen von 6 zufällig gewählten Bildausschnitten pro Glasplättchen die Lumenbildung quantifiziert. Als Lumen wurden Vakuolen definiert, die mindestens einen Zellkörper vollständig durchzogen.

Die Quantifizierung strangartiger Strukturen mikrovaskulärer Endothelzellen in mit Matrigel[®] beschichteten Kulturschalen wurde von HARVEY et al. [2002] beschrieben. Die probeweise Aussaat der Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen zeigte, dass eine Mindestkonzentration von 5×10^4 Endothelzellen in einer Vertiefung einer 24-Loch-Platte zur Bildung strangartiger Strukturen notwendig war. Nach 16 bis 20 Tagen wurden diese Strukturen mikroskopisch bei 40facher Vergrößerung untersucht und fotografiert. Die Quantifizierung der Angiogenese erfolgte durch das Auszählen von sogenannten Knotenpunkten in den erstellten Aufnahmen. Als Knotenpunkte galten die Schnittpunkte, an denen mindestens drei multizelluläre Strukturen beteiligt waren.

2.3.4.3.2 Dreidimensionale Modelle der in vitro-Angiogenese

Alle bislang beschriebenen dreidimensionalen Modelle basieren auf der Kapazität aktivierter Endothelzellen, in eine dreidimensionale Matrix einzuwandern. Als Matrix dienen auch hier vor allem Kollagen- oder Fibringele oder das Matrigel[®]. Das Kulturmedium kann vor der Polymerisation zu dem Gel oder nach der Polymerisation auf die Geloberfläche gegeben werden [VAILHÉ et al., 2001].

NEHLS und DRENCKHAHN [1995] entwickelten eine auf Microcarrier basierende, elegante Methode zur Quantifizierung der dreidimensionalen Migration von Endothelzellen und Bildung strangartiger Strukturen. Für die Untersuchungen verwendeten sie Endothelzellen aus Pulmonalarterien von Kälbern.

Runde Microcarrier aus Kunststoff mit einem Durchmesser von 150 μm wurden autoklaviert, mit Gelatine beschichtet und mit ca. 30 Endothelzellen pro Microcarrier in Kulturmedium suspendiert. Nach einer Inkubation von 2 – 4 Tagen bei 37°C war die Oberfläche der Microcarrier mit den Endothelzellen bewachsen. Während dieser Zeit wurde die Suspension auf einem Schüttler bewegt, um eine Aneinanderhaftung der Microcarrier zu vermeiden. Die mit den Zellen bewachsenen Microcarrier wurden anschließend in eine Fibrinmatrix eingebettet.

Einerseits wurde die Migration der Endothelzellen quantifiziert, indem an den folgenden sieben Tagen nach der Einbettung mikroskopisch täglich die Anzahl der Microcarrier bestimmt wurde, von denen zelluläre Fortsätze oder ganze Zellen in die umgebende Fibrinmatrix eingedrungen waren. Den Untersuchern war dabei die Anzahl der Microcarrier nicht bekannt. Ebenso wurden sie nicht darüber informiert, welche und wie viele Microcarrier mit den eingesetzten Angiogenese-Stimulatoren VEGF oder FGF-2 inkubiert worden waren. Die ermittelte Anzahl der Microcarrier wurde prozentual zur Gesamtzahl der Microcarrier deklariert. Andererseits wurde die Anzahl „kapillarähnlicher Strukturen“ bestimmt. Als „kapillarähnliche Struktur“ definierten diese Autoren jeden Endothelzellsproß, der eine Mindestlänge von 150 µm (geschätzt anhand der Microcarrier, die einen Durchmesser von 150 µm hatten) aufwies und an dem mindestens drei Endothelzellen beteiligt waren. Pro Experiment wurden jeweils 50 zufällig gewählte Microcarrier in fünf Fibringelen untersucht.

Die Invasion von Endothelzellen in eine Fibrinmatrix und die Bildung tubulärer Strukturen durch die Endothelzellen wurde von COLLEN et al. [1998] quantifiziert. Hierfür wurden mikrovaskuläre Endothelzellen aus der humanen Vorhaut in konfluenter Dichte auf einer Fibrinmatrix ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium entfernt und durch ein Medium, das proangiogene Faktoren enthielt, ersetzt. Die Zellen wurden sechs Tage lang mit diesem Medium inkubiert, anschließend erfolgte die Quantifizierung der Angiogenese durch die Bestimmung der Länge der tubulären Strukturen. Pro Fibringel wurden mit einer am Mikroskop installierten Digitalkamera drei Aufnahmen bei geringer Vergrößerung (die genaue Vergrößerung wurde von den Autoren nicht benannt) erstellt. Aufgrund der Trübung durch das undurchsichtige Fibringel wurden die auf den Bildern dargestellten tubulären Strukturen auf ein Transparentpapier übertragen und eine computergesteuerte Bildanalyse anhand dieser Zeichnungen durchgeführt.

Die Quantifizierung der Angiogenese erfolgte durch die Bestimmung der Länge der tubulären Strukturen.

HOYING und WILLIAMS [1996] bestimmten zur Quantifizierung der Angiogenese die Länge strangartiger Strukturen, die durch mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem Fettgewebe des Nebenhodens der Ratte gebildet wurden. Eine Suspension dieser Zellen mit einem Kollagengel wurde in Vertiefungen von 24-Loch-Platten ausgesät. Nach 15 min und bis zur Aggregation des Gels wurde Kulturmedium mit löslichen Angiogenese-Stimulatoren dazu gegeben bzw. dieses an jedem 5. Tag gewechselt. Auf der Unterseite der Kulturplatten wurden mit Tinte Kreise mit einem Durchmesser von 5 mm gezeichnet und diese Bereiche täglich mikroskopisch untersucht. Zur Quantifizierung der im Gel entwickelten strangartigen

Strukturen wurden die Gele mit Paraformaldehyd fixiert und die von der Unterseite der Vertiefungen durchscheinenden Ringe auf dem Gel nachgezeichnet. Anschließend wurde jedes Gel aus den Vertiefungen entnommen und zwischen 2 Objektträger auf eine Dicke von 1 mm gequetscht. In den gekennzeichneten Bereichen wurde mikroskopisch die Länge der strangartigen Strukturen mit einem kalibrierten Okularmikrometer bestimmt.

Eine Methode zur Quantifizierung eines vorhandenen Lumens innerhalb endothelialer Zellstränge, die sich in einer dreidimensionalen Matrix gebildet hatten, wurde nur von MEYER et al. [1997] beschrieben. Die Endothelzellen aus der humanen Nabelschnur wurden auf ein Kollagen Typ I-Gel in Vertiefungen einer 96-Loch-Platte ausgesät und mit einem Medium mit Angiogenese-Stimulatoren inkubiert. Nach 12, 18 und 24 Stunden wurden jeweils drei Gele mit Paraformaldehyd und Glutaraldehyd fixiert. Die fixierten Gelkegel wurden aus den Vertiefungen entnommen und durch zwei senkrecht zur Oberfläche laufende Schnitte in drei Teile geteilt. Für die weiteren Untersuchungen wurde nur der mittlere Block verwendet. Dieser wurde durch vier parallel zur Oberfläche laufende Schnitte in fünf gleich große Stücke geteilt. Von jedem dieser Stücke wurden Serienschnitte mit einer Dicke von 2 μm hergestellt. Die Serienschnitte wurden mit Toluidinblau gefärbt und der Reihe nach mikroskopisch untersucht. Es wurde die Anzahl der aufeinanderfolgenden Serienschnitte bestimmt, durch die sich eine tubuläre Struktur mit einem Lumen hindurchzog. Anhand der bekannten Dicke der Schnitte wurde die Länge dieser Struktur berechnet. Zusätzlich wurde die Anzahl aufeinanderfolgender Serienschnitte bestimmt, in denen ein Lumen innerhalb der strangartigen Strukturen zu erkennen war. So konnte die Länge der Strukturen berechnet werden, die von einem kontinuierlichen Lumen durchzogen waren.

Diese Methode stellt das einzige beschriebene Verfahren dar, in dem das Vorhandensein eines Lumens als repräsentatives Merkmal für die in vitro-Angiogenese untersucht und quantifiziert wurde.