

6 Diskussion

Ziel dieser Studie war es, eine Methode zur Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese in einem in vitro-Modell zu etablieren, welches als Ersatz- bzw. Ergänzungsmethode zum Tierversuch eingesetzt werden kann. Mit dieser Methode sollten alle Phasen der Angiogenese in vitro, beginnend mit der Bildung von Zellausläufern über die lineare Aneinanderreihung bis hin zur dreidimensionalen Organisation und Entwicklung kapillarähnlicher Strukturen, quantifizierbar sein. Zu berücksichtigen war auch, dass die Quantifizierungsmethode von verschiedenen Untersuchern durchgeführt werden kann, reproduzierbar ist und sich der Zeit- und Kostenaufwand in einem vertretbaren Rahmen bewegt.

Es wurden Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung kultiviert und mit einem Selektivmedium, welches proangiogene Faktoren enthielt (siehe 3.3.2), zur Angiogenese stimuliert. Diese Endothelzellen zeigten nach Stimulation durch proangiogene Faktoren alle Phasen der Angiogenese.

Anhand der phasenkontrastmikroskopisch beobachteten morphologischen Veränderungen wurde der Ablauf der Angiogenese in vitro in acht streng definierte Stadien eingeteilt (siehe 5.1.3). Anschließend wurde überprüft, ob eine gesicherte Zuweisung der definierten Stadien der Angiogenese in vitro durch unterschiedliche Untersucher erfolgen kann.

Die Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese in vitro erfolgte einerseits semiquantitativ durch die zeitliche Erfassung der definierten Stadien im Verlauf der Angiogenese in vitro. Zum Nachweis der Reproduzierbarkeit dieser Methode wurde die Homogenität des Ablaufs der Angiogenese in vitro in verschiedenen Kulturschalen, in denen die Endothelzellen unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden, untersucht.

Zusätzlich wurden die *kapillarähnlichen Strukturen* (siehe 5.1.2), die sich im Rahmen der Angiogenese in vitro gebildet hatten, mittels Morphometrie quantitativ erfasst. Hierbei wurde im Ablauf der Angiogenese in vitro die Fläche, Länge und die Anzahl der Verzweigungspunkte der *kapillarähnlichen Strukturen* gemessen.

Um eine Aussage zur Vergleichbarkeit der Angiogenese in vitro und in vivo treffen zu können, wurden zusätzliche Untersuchungen durchgeführt. So wurden unter anderem mittels Transmissionselektronenmikroskopie ultrastrukturelle Veränderungen der Endothelzellen im Ablauf der Angiogenese und die Bildung eines zellfreien Lumens, welches sich innerhalb der *kapillarähnlichen Strukturen* entwickelte, gezeigt.

Des Weiteren erfolgte in unterschiedlichen Phasen der Angiogenese in vitro der immunzytochemische Nachweis von Kollagen Typ IV, einem charakteristischen Bestandteil der Basalmembran. Damit sollte gezeigt werden, dass die in vitro kultivierten Endothelzellen basalmembranähnliche Strukturen ausbilden.

Das Auftreten des programmierten Zelltods, der Apoptose, wurde in verschiedenen Studien im Ablauf der Angiogenese beobachtet [z.B. PETERS et al., 2002; FIERLBECK et al., 2003]. Daher wurde auch in der vorliegenden Arbeit das Vorkommen apoptotischer Endothelzellen mittels der Bindung von Annexin zu verschiedenen Zeitpunkten der Angiogenese in vitro untersucht.

6.1 Beurteilung der validierten Methode zur Quantifizierung der Angiogenese in vitro

Durch die Unterteilung des Ablaufs der Angiogenese in definierte Stadien und die Erfassung dieser Stadien über einen bestimmten Zeitraum war es mit der hier validierten Methode im Gegensatz zu den bislang aus der Literatur bekannten in vivo- und in vitro-Modellen erstmals möglich, alle Phasen der Angiogenese in vitro, beginnend mit der Bildung von endothelialen Zellausläufern bis hin zur Entwicklung *kapillarähnlicher Strukturen* zu quantifizieren.

Die Untersuchungen zur Validierung dieser Methode zur Quantifizierung der Angiogenese in vitro umfassten die Prüfung der Einschätzung der Stadien der Angiogenese durch verschiedene Untersucher und der Homogenität des Ablaufs der Angiogenese in verschiedenen Kulturschalen.

6.1.1 Prüfung der Einschätzung der Stadien der Angiogenese in vitro durch verschiedene Untersucher

Für diese Untersuchungen wurden phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von in vitro zur Angiogenese stimulierten Endothelzellen, die über einen Zeitraum von 60 Tagen zweimal wöchentlich erstellt wurden (17 Untersuchungstage), durch zwei verschiedene Personen unabhängig voneinander beurteilt. Aufgabe dieser beiden unabhängigen Untersucher war es, dem jeweiligen Zellbild dieser Aufnahmen eines der acht definierten Stadien der Angiogenese in vitro zuzuweisen.

Insgesamt wurden 68 Aufnahmen von den beiden Untersuchern beurteilt. Dabei wiesen die Untersucher in 55 der 68 Aufnahmen dem Zellbild das identische Stadium der Angiogenese in vitro zu (Tabelle 3). In den 13 Aufnahmen (19,12%), in denen das Zellbild durch die Untersucher nicht identisch beurteilt wurde, lag stets eine Abweichung um nur ein Stadium vor. Diese Differenzen betrafen überwiegend Phasen der Angiogenese, in denen der Übergang von einem Stadium in das andere zu beobachten war. So waren die häufigsten Abweichungen (in 3 von 4 Aufnahmen) bei der Beurteilung des Zellbildes beim Übergang von Stadium 2 zu 3 zu beobachten. In dieser Phase sollte von den Untersuchern eingeschätzt werden, ob es sich um mehr oder weniger als 50% der Zellen handelte, die Zellausläufer bildeten. Die Abweichung der durch die beiden Personen zugewiesenen Stadien lässt sich dadurch erklären, dass die Beurteilung des Zellbildes auf der subjektiven Einschätzung der Untersucher beruhte, wodurch insbesondere im Grenzbereich ($\pm 50\%$) Differenzen zu erwarten waren.

Bei wiederholter Einschätzung der Aufnahmen durch dieselben Personen zeigte sich, dass demselben Zellbild stets das identische Stadium der Angiogenese in vitro zugewiesen wurde. Somit war eine zusätzliche Varianz durch dieselbe Person ausgeschlossen.

Insgesamt erfolgte die Zuweisung der Stadien durch jeden der beiden Untersucher in chronologischer Weise, beginnend bei Stadium 1 aufsteigend bis Stadium 8. Durch die teils unterschiedliche Beurteilung des Zellbildes in den Übergangsphasen der Stadien ergaben sich lediglich Abweichungen in den Zeiträumen, in denen die jeweiligen Stadien von den beiden Untersuchern zugewiesen wurden. Das bedeutet, dass der charakteristische Verlauf der Angiogenese in vitro von beiden Personen anhand der definierten Stadien auf gleiche Weise beurteilt wurde.

Durch die Bildung der Summe der Stadien (S_j^U), die an den 17 Untersuchungstagen im jeweiligen Bildausschnitt zugewiesen wurden, erfolgte die Beurteilung der Zuweisung der Stadien durch die beiden Personen über den gesamten Untersuchungszeitraum. Dabei ergab sich, dass die größte Differenz der Summen (ΔS_j^U), die zwischen 60 und 74 schwankten, bei 5 lag. Somit ist auch bei der Beurteilung der Stadien über den gesamten Untersuchungszeitraum nur eine geringgradige Abweichung (6,8 bis 8,3%) durch die beiden Personen vorhanden.

Diese Ergebnisse bestätigen sowohl die Wiederholbarkeit der Beurteilung durch dieselbe Person als auch die geringe Abweichung durch verschiedene Untersucher bei der Einschätzung des Zellbildes in Hinblick auf die definierten Stadien der Angiogenese in vitro. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Einschätzung der Stadien und somit die

Quantifizierung der Angiogenese in vitro durch einen einzigen Untersucher erfolgen kann. Wird die Quantifizierung der Angiogenese in vitro durch verschiedene Untersucher durchgeführt, wie es unter Routinebedingungen in einem Labor vorkommt, so ist nur eine geringgradige Abweichung bei der Zuweisung der Stadien in ihren Übergangsphasen zu erwarten.

6.1.2 Prüfung der Homogenität des Ablaufs der Angiogenese in vitro in unterschiedlichen Kulturschalen

Der Ablauf der Angiogenese in vitro wurde in 12 Vertiefungen von 24-Lochplatten untersucht. In diesen 12 Vertiefungen wurden über einen Zeitraum von 67 Tagen an 19 Untersuchungstagen jeweils sechs stets gleiche Bildausschnitte phasenkontrast-mikroskopisch untersucht und dokumentiert. Somit erfolgte die Untersuchung mit einem Stichprobenumfang von 72 Bildausschnitten pro Untersuchungstag.

In diesen 72 Bildausschnitten wurde dem Zellbild durch einen Untersucher eines der acht definierten Stadien der Angiogenese in vitro zugewiesen.

Um den Ablauf der Angiogenese in den 72 Bildausschnitten über den gesamten Untersuchungszeitraum miteinander zu vergleichen, wurde für jeden Bildausschnitt die Summe der an den 19 Untersuchungstagen zugewiesenen Stadien der Angiogenese in vitro (S_j) gebildet (Tabelle 5). Interessanterweise ergaben sich dabei die kleinste und größte Summe (81 und 102) für zwei Bildausschnitte innerhalb derselben Vertiefung (Vertiefung 12), das heißt, dass sich die gesamte Spannweite der untersuchten Bildausschnitte in dieser Vertiefung zeigte.

Zur Prüfung der Homogenität des Ablaufs der Angiogenese in vitro innerhalb der Vertiefungen wurde die Varianz (s^2_k) und die Standardabweichung (s_k) der Stadien-Summen der jeweils sechs Bildausschnitte einer jeden Vertiefung (S_{ki}) berechnet. Diese ergaben, dass die Standardabweichungen in den 12 Vertiefungen zwischen 3,13 und 8,98 lagen. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Standardabweichung von 8,98 sich für die Vertiefung 12 ergab, in der sowohl das Minimum (81) als auch das Maximum (102) der Stadien-Summen (S_j) lagen. Die Standardabweichung aus der mittleren Varianz lag bei 4,70, wobei auch diese durch die große Spannweite in der Vertiefung 12 deutlich angehoben wurde. Dies wird bei Betrachtung der Varianzen in den Vertiefungen 1 bis 11 deutlich, die zwischen 9,77 und 26,97 lagen. Hierbei ergab sich aus der mittleren Varianz $\overline{s^2_{k-1}} = 16,79$ eine Standardabweichung von 4,09. Verglichen mit dem Median der Varianzen (16,55) und Standardabweichungen (4,07) aller 12 Vertiefungen, wird deutlich, dass die starke

Abweichung der Stadien-Summen (S_{kl}) in der Vertiefung 12 nicht charakteristisch für den Ablauf der Angiogenese in vitro war.

Es sind somit Schwankungen im Ablauf der Angiogenese innerhalb der Bildausschnitte jeder Vertiefung zu beobachten, die in 11 der 12 untersuchten Vertiefungen im vertretbaren Rahmen liegen. Folglich ist es möglich, die Quantifizierung der Angiogenese mit der hier validierten Methode in weniger als sechs Bildausschnitten pro Vertiefung durchzuführen.

Die Bewertung der Schwankungen innerhalb jeder Vertiefung und zwischen den 12 Vertiefungen der Kulturplatte erfolgte mittels einer Varianzkomponentenanalyse [SACHS, 1993]. Dabei ergab sich neben der mittleren Varianz von 22,11 innerhalb der Vertiefungen eine zusätzliche Varianz von 10,31 zwischen den Vertiefungen. Die Varianz zwischen den Vertiefungen ist somit niedriger als die Varianz innerhalb der Vertiefungen. Demzufolge kann die Quantifizierung der Angiogenese in weniger als 12 Vertiefungen durchgeführt werden, wobei die Anzahl der Vertiefungen aufgrund der geringeren Varianz stärker reduziert werden kann als die Anzahl der Bildausschnitte pro Vertiefung. Basierend auf diese Ergebnisse war es möglich, für die weiteren Untersuchungen zur Quantifizierung der Wirkung pro- bzw. antiangiogener Faktoren die Anzahl der Vertiefungen und Bildausschnitte auf vier und damit einen bewältigbaren Stichprobenumfang zu reduzieren.

6.2 Beurteilung der Verwendbarkeit der etablierten Methode zur Quantifizierung der Wirkung proangiogener Faktoren

Zur Beurteilung der Verwendbarkeit der etablierten Methode zur Quantifizierung der Angiogenese in vitro wurden VEGF und FGF-2 eingesetzt, da für diese Faktoren in zahlreichen Studien eine proangiogene Wirkung nachgewiesen wurde [CONNOLLY et al., 1989; PEPPER et al., 1992; NICOSIA et al., 1994; NISHIKAWA et al., 1998].

Den Ergebnissen der Validierung entsprechend wurde der Stichprobenumfang auf vier Vertiefungen, aus denen jeweils vier Bildausschnitte zur Quantifizierung herangezogen wurden, gesenkt. Die Quantifizierung der Wirkung des VEGF und FGF-2 erfolgte also in jeweils 16 Bildausschnitten.

Für diese Untersuchungen wurden die Endothelzellen mit dem Erhaltungsmedium DMEM+, dem die proangiogenen Faktoren VEGF oder FGF-2 bzw. beide Faktoren hinzugefügt wurden, kultiviert. Da Endothelzellen, die nur mit dem Erhaltungsmedium kultiviert wurden, keine Angiogenese zeigten, waren diese Faktoren somit jeweils als einziger proangiogener Stimulus im Medium enthalten.

6.2.1 Quantifizierung der durch VEGF stimulierten Angiogenese im etablierten in vitro-Modell

Die phasenkontrastmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass die Endothelzellen, die mit VEGF kultiviert wurden, alle acht definierten Stadien der Angiogenese in vitro durchliefen. Im Vergleich zu Endothelzellen, die mit dem Selektivmedium P0 kultiviert wurden, zeigten sich dabei allerdings morphologische Unterschiede. Unter dem Einfluss des VEGF bildeten die Endothelzellen deutlich längere Zellausläufer, die im phasenkontrastmikroskopischen Bild eine Länge von bis zu 250 μm erreichten. VEGF führt zur Aktivierung von Plasminogen-Aktivatoren [KALKA et al., 2000b], die unter anderem auch von Endothelzellen gebildet werden, wodurch Zellkontakte und die Anhaftung der Zellen an die Basalmembran aufgelöst werden [HUBER et al., 2002]. In vivo führt dies zur Migration der Endothelzellen, die mit der Bildung längerer Zellausläufer einhergeht [AUSPRUNK und FOLKMAN, 1977]. Eben diese morphologischen Veränderungen der Endothelzellen waren auch im etablierten in vitro-Modell unter Wirkung des VEGF zu beobachten. Dabei ist zu vermuten, dass die Bildung von Pseudopodien und die damit verbundene lang gestreckte Gestalt der Zellen auch in vitro auf der Lösung von Zellkontakten und der verminderten Haftung basierte. In einer eigenen Untersuchung wurde die Synthese und Sekretion von Kollagen Typ IV als charakteristischer Bestandteil der Basalmembran bei den verwendeten Endothelzellen nachgewiesen.

Ein weiteres Charakteristikum der VEGF-induzierten Angiogenese im etablierten in vitro-Modell war die Bildung von Endothelzell-Sphäroiden im Rahmen der dreidimensionalen Organisation der Zellen. Diese Sphäroide könnten in vivo der Bildung von irregulären und großlumigen Gefäßen entsprechen, die in einer Untersuchung zu beobachten waren, im Rahmen derer VEGF in die Muskulatur von Ratten eingebracht wurde [BYZOVA et al., 2002]. Das Phänomen könnte möglicherweise auf der vasodilatatorischen Wirkung des VEGF beruhen [KU et al., 1993]. EPSTEIN et al. [2001] stellten fest, dass diese vor allem bei schneller und hochkonzentrierter Verabreichung des VEGF noch vor der proangiogenen Wirkung auftritt. Auch die durch VEGF stimulierte Steigerung der Gefäßpermeabilität, die vor allem auf der Verminderung der Endothelzelladhäsion beruht [BATES und CURRY, 1996], könnte sowohl in vivo als auch in vitro zur Bildung unregelmäßiger Endothelzellstrukturen führen.

Die Quantifizierung der Angiogenese erfolgte durch die vergleichende Darstellung des Zeitraums, in dem die Phasen der Angiogenese von den mit VEGF und den im Selektivmedium P0 kultivierten Zellen durchlaufen wurden. Hierfür wurde für jeden Bildausschnitt die Summe der Stadien von 15 Untersuchungstagen (S_j^{VEGF} und S_j^{P0}) berechnet.

Der Zeitraum, den Endothelzellen, die mit VEGF kultiviert wurden, brauchten, um die Stadien der Angiogenese zu durchlaufen, war im Gegensatz zu den im P0-Medium inkubierten Endothelzellen deutlich verkürzt. So war das arithmetische Mittel der Stadien-Summen ($\overline{S_j^{VEGF}}$) um 47,47% höher als bei den Zellen, die mit dem Selektivmedium P0 kultiviert wurden.

Aufgrund der Unterteilung des Ablaufs der Angiogenese *in vitro* in die definierten Stadien wurde deutlich, dass sich der schnellere Ablauf der Angiogenese nicht auf alle Phasen gleichermaßen bezog. Während die frühen Stadien unter der Wirkung des VEGF auffällig verkürzt waren, blieb der Zeitraum, in dem die Stadien 6 und 7 der Angiogenese von den Endothelzellen durchlaufen wurden, mit ca. 14 Tagen, unverändert. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die proangiogenen Wirkungen des VEGF insbesondere die Steigerung der Migration und Proliferation der Endothelzellen betreffen, die initial im Ablauf der Angiogenese eine entscheidende Rolle spielen [JOSKO et al., 2000].

6.2.2 Quantifizierung der durch FGF-2 stimulierten Angiogenese im etablierten *in vitro*-Modell

Die Endothelzellen, die mit dem Erhaltungsmedium, dem FGF-2 hinzugefügt wurde, kultiviert wurden, zeigten auch im Verlauf der phasenkontrastmikroskopischen Untersuchungen alle acht definierten Stadien der Angiogenese *in vitro*. Bis zum Stadium 6 entsprachen die morphologischen Veränderungen denen der Endothelzellen, die mit VEGF inkubiert worden waren. So waren auch im Stadium 2 und 3 besonders lang gestreckte Zellen zu sehen, die unter der Wirkung des FGF-2 sogar bis zu 300 µm lang waren. Diese Beobachtungen lassen sich dadurch erklären, dass FGF-2 ebenso wie VEGF neben der proliferativen Wirkung auf Endothelzellen zur Aktivierung von Plasminogen-Aktivatoren und letztendlich zu deren Migration führt [FERNIG und GALLAGHER, 1994]. Die Bildung von Pseudopodien und der lang gestreckten Gestalt der Zellen war bei den mit FGF-2 inkubierten Zellen ausgeprägter als bei jenen, die VEGF erhielten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die stimulierende Wirkung des FGF-2 auf die Migration der Endothelzellen stärker ist als die des VEGF. Dies wurde auch von YOSHIDA et al. [1996] beschrieben und dadurch erklärt, dass FGF-2 die Chemokinese (Menge der in zufällige Richtungen migrierenden Zellen bei der Zellbewegung) stimuliert, während VEGF zu einer gesteigerten Chemotaxis (Richtung der Zellbewegung) führt.

Die Kultivierung der Endothelzellen mit FGF-2 führte ab dem Stadium 7 zur Bildung dreidimensionaler, tubulärer Strukturen. Dies ist vermutlich die Folge der durch FGF-2 gesteigerten Synthese verschiedener differenzierungsspezifischer Proteine, wie

beispielsweise dem Notch-Liganden Jagged 1 [MATSUMOTO et al., 2002]. Da eine gefäßpermeabilitätssteigernde und vasodilatative Wirkung für FGF-2 nicht beschrieben ist, handelte es sich bei diesen um regelmäßige, tubuläre Gebilde, die als *kapillarähnliche Strukturen* bezeichnet werden können.

Zur Quantifizierung der Angiogenese wurde auch für die mit FGF-2 kultivierten Endothelzellen für jeden der 16 Bildausschnitte die Summe der Stadien von 15 Untersuchungstagen (S_j^{FGF-2}) berechnet und mit den Stadien-Summen von Endothelzellen, die mit dem Selektivmedium kultiviert wurden, verglichen. Das arithmetische Mittel der Stadien-Summen ($\overline{S_j^{FGF-2}}$) war um 55,67% höher als bei den mit dem Selektivmedium kultivierten Zellen. Damit war der Ablauf der Angiogenese mit Wirkung des FGF-2 noch stärker verkürzt als bei den mit VEGF inkubierten Endothelzellen. Der schnellere Prozess der Angiogenese bezog sich dabei auf alle Stadien. So waren im Gegensatz zu den mit VEGF inkubierten Endothelzellen auch die Stadien 6 und 7, in denen sich ein Endothelzellnetzwerk und kapillarähnliche Strukturen bildeten, deutlich verkürzt. Wie bei VEGF hatte die stimulierende Wirkung des FGF-2 auf die Proliferation und Migration der Endothelzellen [FERNIG und GALLAGHER, 1994] eine Verkürzung der Stadien 1 bis 5 zur Folge. Die beschleunigte Bildung *kapillarähnlicher Strukturen* kann auf den oben erwähnten, die Differenzierung der Endothelzellen stimulierenden Effekt des FGF-2, zurückgeführt werden [MATSUMOTO et al., 2002].

6.2.3 Quantifizierung der durch die Kombination von VEGF und FGF-2 stimulierten Angiogenese im etablierten in vitro-Modell

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde die Wirkung eines Mediums, welches VEGF und FGF-2 enthielt, auf die Angiogenese in vitro quantifiziert. Die morphologischen Veränderungen, die die Endothelzellen im Ablauf der Angiogenese zeigten, entsprachen denen der Zellen, die nur mit FGF-2 inkubiert wurden. Das arithmetische Mittel der Stadien-Summen ($\overline{S_j^{VEGF+FGF-2}}$) war hier um 80,85% höher als bei den Zellen, die ohne die Faktoren kultiviert worden waren. Das bedeutet, dass der zeitliche Ablauf der Angiogenese unter dem Einfluss von VEGF plus FGF-2 forciert wurde. Diese synergistische Wirkung von VEGF und FGF-2 in vitro wurde auch von PEPPER et al. [1992] beschrieben. Beim Einsatz gleicher Konzentrationen von VEGF oder FGF-2 beschleunigte auch in ihren Untersuchungen FGF-2 die Bildung *kapillarähnlicher Strukturen*. Dieser Prozess wurde bei Zugabe beider Faktoren verkürzt. Der beschleunigte Ablauf der Angiogenese in vitro durch Inkubation boviner

mikrovaskulärer Endothelzellen in beiden Faktoren wurde auch durch die Untersuchungen von CAVALLARO et al. [2001] bestätigt. Sie wiesen nach, dass VEGF die durch FGF-2 stimulierten Veränderungen der Morphologie und des Zytoskeletts der Endothelzellen nicht potenzieren kann und begründeten dies damit, dass VEGF insbesondere die initialen Phasen der Angiogenese, die Proliferation und Migration der Endothelzellen, stimuliert, während FGF-2 in die Morphogenese der Kapillaren involviert ist. Die durch VEGF plus FGF-2 stark beschleunigte Angiogenese beruht darauf, dass VEGF die Wirkung des FGF-2 auf die Bildung von Kapillaren promoviert [MANDRIOTA und PEPPER, 1997]. Dieser synergistische Effekt von VEGF und FGF-2 konnte allerdings im Chorioallantoismembran-Test nicht bestätigt werden [NICO et al., 2001]. In dieser Untersuchung wurde sowohl durch die Kombination der beiden Faktoren als auch durch die Steigerung ihrer Konzentrationen keine verstärkte Wirkung auf die Angiogenese festgestellt. Dies wurde dadurch begründet, dass in der Chorioallantoismembran durch FGF-2 neben endogenen proangiogenen Faktoren auch endogene antiangiogene Faktoren, wie beispielsweise Stickoxid (NO), aktiviert werden, die einer verstärkten Angiogenese entgegen wirken.

6.3 Beurteilung der Verwendbarkeit der etablierten Methode zur Quantifizierung der Wirkung antiangiogener Faktoren

Zur Beurteilung der validierten Methode zur Quantifizierung der Antiangiogenese in vitro wurde im Rahmen einer Voruntersuchung die Wirkung eines endogenen und eines synthetischen Angiogenese-Inhibitors geprüft. Hierbei wurde Angiostatin als endogener und Suramin, ein ursprünglich zur Bekämpfung von Trypanosomen eingesetztes Chemotherapeutikum [HAWKING, 1978], als synthetischer Hemmstoff gewählt, da für diese Substanzen in verschiedenen Untersuchungen eine antiangiogene Wirkung nachgewiesen wurde [O'REILLY et al., 1994; BARENDZ-JANSON et al., 1998; GRISCELLI et al., 1998; LARSEN, 1993; BERNSSEN et al., 1999; BOCCI et al., 1999].

Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Antiangiogenese durch die Zugabe eines Hemmstoffs in vier verschiedenen Phasen der Angiogenese in vitro. Basierend auf den Ergebnissen der Validierung erfolgte die Quantifizierung der Antiangiogenese von diesen vier Phasen ausgehend in jeweils vier Bildausschnitten aus jeweils vier Vertiefungen, also mit einem Stichprobenumfang von je 16 Bildausschnitten.

6.3.1 Wirkung der antiangiogenen Faktoren Angiostatin und Suramin auf die Angiogenese in vitro

Für diese Untersuchungen wurden Endothelzellen in 16 Vertiefungen zunächst mit dem Selektivmedium P0 kultiviert und somit zur Angiogenese stimuliert. Die Zugabe des jeweiligen Hemmstoffs, Angiostatin bzw. Suramin, erfolgte pro Hemmstoff in jeweils zwei Vertiefungen nach 14, 28, 42 und 56 Tagen.

Die Endothelzellen, die ab dem Tag 14 mit Angiostatin inkubiert wurden, zeigten vor Zugabe des Hemmstoffs im phasenkontrastmikroskopischen Bild überwiegend eine lang gestreckte Gestalt (Stadium 3 der Angiogenese in vitro). Diese auf Bildung von Pseudopodien basierende Formveränderung, die bei der Migration der Endothelzellen zu beobachten ist [AUSPRUNK und FOLKMAN, 1977], wurde mit Wirkung des Angiostatins innerhalb von drei Tagen wieder aufgehoben. Dies könnte sich durch die hemmende Wirkung des Angiostatins auf die Aktivierung von Plasminogen-Aktivatoren [STACK et al., 1999] und dessen Bindung an das auf den Endothelzellen lokalisierte Integrin $_{\alpha v\beta 3}$ erklären [TARUI et al., 2001], wodurch die Migration und die damit verbundenen Änderungen der Gestalt der Endothelzellen blockiert werden.

Ebenso hatte die Zugabe des Angiostatins ab dem Tag 28 der Angiogenese (Stadium 4 der Angiogenese in vitro) innerhalb von zehn Tagen die Rückbildung der endothelialen Strukturen zur Folge. Am Tag 42 bildeten über 90% der Endothelzellen ein Netzwerk (Stadium 6 der Angiogenese in vitro) und am Tag 56 waren *kapillarähnliche Strukturen* zu erkennen (Stadium 7 der Angiogenese in vitro). Der Zusatz des Angiostatins an diesen Untersuchungstagen führte zur Hemmung der für die Angiogenese in vitro charakteristischen Veränderungen der Endothelzellen. So bildeten die Zellen am Ende der Untersuchung (Tag 60) in allen Vertiefungen wieder einen geschlossenen Monolayer im "Kopfsteinpflaster-Muster".

Damit wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals im Rahmen einer eigenen Untersuchung gezeigt, dass die Angiogenese in vitro in jeder Phase durch Angiostatin hemmbar ist. Neben den beschriebenen inhibitorischen Wirkungen des Angiostatins auf die Migration der Endothelzellen dürfte dies auch auf die durch die Bindung von Angiostatin hervorgerufene Hemmung der auf den Zellen lokalisierten ATP-Synthase zurückzuführen sein [MOSER et al., 2001]. Die daraus resultierende verminderte Energiebereitstellung hat eine unzureichende Aktivierung der Endothelzellen zur Folge.

Auch Endothelzellen, die ab dem Tag 14 mit dem Angiogenese-Inhibitor Suramin inkubiert wurden, zeigten zu diesem Zeitpunkt überwiegend eine lang gestreckte Gestalt (Stadium 3

der Angiogenese in vitro). Nach Zugabe des Suramin waren aber keine Veränderungen im Zellbild zu erkennen. Bis zum Ende der Untersuchungen (Tag 60) waren polygonale und lang gestreckte Endothelzellen zu sehen.

Am Tag 28 wiesen weit über die Hälfte der Endothelzellen eine lang gestreckte Gestalt auf und ca. 40% der Zellen waren linear aneinander gereiht (Stadium 4 der Angiogenese in vitro). Nach Zugabe des Suramin ab diesem Tag war drei Tage später eine deutliche Zunahme lang gestreckter und linear aneinander gereihter Zellen zu erkennen. Zusätzlich hatte sich auf diesem Monolayer in einer zweiten Ebene ein Netzwerk aus Endothelzellen gebildet, welches in einigen Abschnitten *kapillarähnliche Strukturen* enthielt. Das bedeutet, dass eine starke Stimulation der Angiogenese durch das Suramin bei einem Teil der Endothelzellen erzielt wurde. Bis zum Abschluss der Untersuchung blieb der Monolayer mit den überwiegend lang gestreckten Zellen erhalten, während sich das darüber liegende Netzwerk auflöste und die daran beteiligten Zellen abgerundet auf dem Monolayer liegen blieben.

Auch die zellulären Veränderungen, die nach Zugabe des Suramin ab dem 42. (Stadium 6 der Angiogenese in vitro) und 56. (Stadium 7 der Angiogenese in vitro) Tag der Untersuchung zu sehen waren, beliefen sich auf einen zunächst beschleunigten Ablauf der Angiogenese. Auch hier lösten sich die im Netzwerk und in *kapillarähnliche Strukturen* organisierten Endothelzellen im weiteren Verlauf ab, während der Monolayer weiterhin bestehen blieb. Allerdings handelte es sich dabei aufgrund der fortschreitenden Angiogenese nicht nur um vereinzelte, abgerundete Zellen, sondern um bis zu 500 µm durchmessende Zellansammlungen.

GAGLIARDI et al. [1992] wiesen als erste im CAM-Modell die antiangiogene Wirkung des Suramin nach, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen nicht bekannt waren. Für Suramin sind verschiedene Wirkungsmechanismen beschrieben worden, die u.a. zur Hemmung von Tumorwachstum führen. Einerseits zielen diese Wirkungen direkt auf die Tumorzellen, andererseits sind sie Folge der antiangiogenen Effekte des Suramin [ZOGAKIS und LIBUTTI, 2001]. Suramin bindet verschiedene proangiogene Wachstumsfaktoren, wie PDGF, EGF, FGF, TGF- β , IGF-1 und VEGF, und verhindert somit deren Anlagerung an den Rezeptor. Außerdem wurde für Suramin eine hemmende Wirkung auf verschiedene für die Replikation, Transkription und den Zellstoffwechsel wichtige Enzyme, wie die DNA-Primase, DNA-Polymerase, DNA-Topoisomerase II, RNA-Polymerase und die Proteinkinase C, nachgewiesen [LARSEN, 1993].

Die im etablierten in vitro-Modell beobachteten Veränderungen des Zellbilds nach Zugabe des Suramin stehen im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Wirkungen und lassen sich damit nicht anhand des bekannten Wirkungsspektrums des Suramin erklären. Grundsätzlich war durch Zugabe des Suramin zum Selektivmedium in den verschiedenen

Phasen zunächst eine proangiogene Wirkung im Sinne einer verstärkten Ausbildung von Pseudopodien zu erkennen. Außerdem war die Bildung strangartiger Strukturen deutlich beschleunigt. Diese Strukturen blieben allerdings nicht bestehen, sondern lösten sich innerhalb kurzer Zeit auf. Die Auflösung der Zellkontakte und der Verbindung zur Basalmembran haben die Aktivierung der Endothelzellen, die mit der Ausbildung einer lang gestreckten Gestalt einhergeht, zur Folge [HUBER et al., 2002]. Es ist wahrscheinlich, dass auch im hier vorgestellten in vitro-Modell die zunächst verstärkte Migration der Endothelzellen, die Veränderung ihrer Gestalt und die lineare Aneinanderreihung der Zellen zu strangartigen Strukturen auf diese Kontaktverluste zurückzuführen ist. Der Zerfall dieser zunächst forciert gebildeten strangartigen Strukturen, der im weiteren Verlauf zu beobachten war, beruht vermutlich auf der fortschreitenden Auflösung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten und der gleichzeitigen Hemmung proangiogener Faktoren durch Suramin. Somit lassen die Veränderungen, die im hier vorgestellten in vitro-Modell im Zusammenhang mit der Suramin-Inkubation beobachtet wurden, vermuten, dass die Lösung von Kontakten der Endothelzellen untereinander respektive zur extrazellulären Matrix eine weitere mögliche Wirkung des Suramin darstellt, die letztlich die Auflösung *kapillarähnlicher Strukturen* zur Folge hatte und damit zur Hemmung der Angiogenese führte.

6.3.2 Quantifizierung der durch Angiostatin stimulierten Antiangiogenese im etablierten in vitro-Modell

Aufgrund der Ergebnisse der Voruntersuchung erfolgte die Quantifizierung der Antiangiogenese unter Einsatz des endogenen Angiogenese-Inhibitors Angiostatin.

Hierfür wurden Endothelzellen mit dem Selektivmedium P0 kultiviert und damit zur Angiogenese stimuliert. Zu vier verschiedenen Zeitpunkten erfolgte in jeweils vier Vertiefungen die Zugabe des Angiogenese-Hemmstoffs. Aus jeder Vertiefung wurden jeweils vier identische Bildausschnitte über den gesamten Untersuchungszeitraum (68 Tage) dokumentiert. Die Inkubation mit dem Angiostatin wurde im Stadium 2 (Tag 16), Stadium 4 (Tag 24), Stadium 6 (Tag 44) bzw. Stadium 8 (Tag 60) der Angiogenese durchgeführt (Tab.14). Gleichzeitig wurden als Kontrollen Endothelzellen ohne Zugabe des Hemmstoffs mit dem Selektivmedium P0 kultiviert.

Die Endothelzellen, die im Stadium 2 mit Angiostatin inkubiert wurden, zeigten nach 6 Tagen wieder das Stadium 1 der Angiogenese. Das bedeutet, dass die Zeit, die benötigt wurde um vom Stadium 2 wieder auf das Stadium 1 zurückzufallen (6 Tage) 37,50% der Zeit entsprach, die benötigt wurde, um das Stadium 2 zu erreichen (16 Tage).

Bei Zugabe des Angiostatin ab dem Stadium 4 dauerte es 8 Tage bis in allen Bildausschnitten das Stadium 1 wieder zu erkennen war. Dies entspricht 33,33% von 24 Tagen. Die Inkubation mit dem Hemmstoff ab dem Stadium 6 hatte die Rückentwicklung der Angiogenese innerhalb von 14 Tagen zur Folge (31,82%). Vom Stadium 8 ausgehend erfolgte die vollständige Hemmung der Angiogenese nach 8 Tagen. Dies entspricht 13,33% von 60 Tagen.

Die Zahlen zeigen, dass der Zeitraum, der zur Hemmung der Angiogenese durch Angiostatin benötigt wurde, sich verlängerte, je weiter die Angiogenese fortgeschritten war. Gleichzeitig verhielt sich aber die für die Hemmung notwendige Zeitspanne annähernd proportional zu dem Zeitraum, in dem sich die für das jeweilige Stadium charakteristischen Veränderungen entwickelt hatten. Auffällig war der deutlich kürzere Zeitraum, in dem sich die durch Angiostatin stimulierte Inhibierung der Angiogenese vom Stadium 8 ausgehend vollzog (8 Tage).

Aufgrund der bekannten Wirkungen des Angiostatin, nämlich der Hemmung der Proliferation und Migration der Endothelzellen [O'REILLY et al., 1994; GRISCELLI et al., 1998; WALTER und SANE, 1999; STACK et al., 1999; TARUI et al., 2001], lag die Vermutung nahe, dass insbesondere in den frühen Stadien der Angiogenese die stärkste und damit schnellste Hemmung der Angiogenese zu erwarten wäre. Diese Annahme wurde anhand der hier erfolgten Quantifizierung der Antiangiogenese nicht bestätigt. BARENDZS-JANSON et al. [1998] untersuchten die Hemmung der Proliferation und Migration von bovinen, mikrovaskulären Endothelzellen durch unterschiedliche Konzentrationen des Angiostatin. Es wurden Endothelzellen auf einer Kollagenmatrix ausgesät und zur Bildung kapillarähnlicher Strukturen stimuliert. Bei Inkubation dieser Endothelzellen mit Angiostatin stellten sie fest, dass bestimmte Konzentrationen keine signifikante Hemmung der endothelialen Proliferation hervorriefen aber einen starken inhibitorischen Effekt auf die Bildung kapillarähnlicher Strukturen hatten. BARENDZS-JANSON et al. [1998] stellten daraufhin die Hypothese auf, dass Angiostatin neben der Hemmung der Proliferation und Migration der Endothelzellen auch eine hemmende Wirkung auf die Expression von Rezeptoren verschiedener Wachstums- und Differenzierungsfaktoren haben dürfte. Die schnellere Hemmung der Angiogenese, die in der vorliegenden Studie vom Stadium 8 ausgehend zu beobachten war, könnte auf diese Eigenschaften des Angiostatins zurückzuführen sein.

6.4 Beurteilung der Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese im etablierten in vitro-Modell im Vergleich zu in vivo- und ex vivo-Modellen der Angiogenese

Bislang sind zahlreiche Tiermodelle entwickelt worden, die zur Untersuchung und Quantifizierung der Angiogenese eingesetzt werden. Zur Quantifizierung der Angiogenese ist die kontinuierliche Beobachtung der Blutgefäßbildung vonnöten. Diese im hier vorgestellten in vitro-Modell gegebene Voraussetzung wird nur durch wenige in vivo-Modelle, namentlich das Cornea-Modell, das Chorioallantoismembran-Modell und die Dauerfenster-Modelle, realisiert.

Das Cornea-Modell wird bis heute als das beste in vivo-Modell der Angiogenese angesehen, da die Cornea physiologischerweise keine Blutgefäße aufweist. Daher kann durch das Setzen eines proangiogenen Stimulus die Angiogenese direkt quantifiziert werden, ohne eine vorhandene Vaskularisation zu berücksichtigen [AUERBACH et al., 2003]. Das ursprünglich am Kaninchen entwickelte Modell ist inzwischen an die Maus adaptiert worden. Aufgrund der dünneren Cornea der Mäuse erfolgt die Ausbreitung der Blutgefäße überwiegend zweidimensional, so dass die ständige Überwachung der Blutgefäßbildung mit Hilfe eines einfachen Stereomikroskops erfolgen kann [KENYON et al., 1996]. Allerdings ist die kontinuierliche Beobachtung durch die limitierte Fläche der Cornea auch zeitlich eingegrenzt. Die Quantifizierung der Angiogenese wird nicht selten dadurch erschwert, dass durch die Manipulationen sowie die verwendeten Trägermaterialien eine entzündliche Reaktion ausgelöst und somit die Angiogenese stimuliert wird [AUERBACH et al., 2003]. Weitere Nachteile des Cornea-Modells sind der hohe Zeit- und Kostenaufwand und die durch die erforderlichen chirurgischen Maßnahmen zur Einbringung der Testsubstanzen eingeschränkte Tierzahl [KRUGER et al., 2001]. Nicht zuletzt sind die Experimente von Seiten des Tierschutzes bedenklich, da sie durch die intensive sensible Innervation der Cornea mit starken Schmerzen verbunden sein dürften.

Grundsätzlicher Vorteil von in vitro-Modellen ist, dass die Quantifizierung der Angiogenese mit einem uneingeschränkten Stichprobenumfang erfolgen kann. Außerdem spielt die oben erwähnte Entzündungsreaktion keine Rolle. Das hier etablierte in vitro-Modell bietet zusätzlich den Vorzug der zur Quantifizierung notwendigen kontinuierlichen Beobachtung der Angiogenese, die ohne größeren Aufwand so oft als nötig phasenkontrastmikroskopisch erfolgen kann.

Die Implantation von transparenten Beobachtungskammern ist eine der ältesten Methoden, die bis heute meist in Form der dorsalen Hautfalten-Kammer zur Untersuchung und Quantifizierung der Angiogenese bei Maus, Ratte und Hamster eingesetzt wird [ALGIRE, 1943; GREENBLATT und SHUBIK, 1968; DELLIAN et al., 2000]. Abgesehen davon, dass die zur Untersuchung herangezogenen Gewebe bereits vaskularisiert sind, ist die durch das Einbringen der Beobachtungskammer stimulierte Bildung von Granulationsgewebe und damit neuer Blutgefäße unvermeidbar [AUERBACH et al., 2000]. Wie beim Cornea-Modell sind auch hier die Präparation des Gewebes und die Implantation der Kammer, die schwierig und zeitaufwendig ist, limitierende Faktoren für den Stichprobenumfang. Obwohl transparente Kammern die Möglichkeit zur permanenten Beobachtung der Gefäßbildung bieten, sind die entwickelten Methoden zur Quantifizierung der Angiogenese häufig mit zusätzlichem Aufwand, wie der intravenösen Applikation fluoreszierender Substanzen [VOLLMAR et al., 2001], verbunden und nicht selten ungenau. So stellt die nach Tumorzellimplantation erfolgte Unterscheidung neu gebildeter Blutgefäße von ursprünglich vorhandenen anhand ihres ungeordneten Wachstums eine nicht eindeutige Identifikation dieser Gefäße und damit unpräzise Quantifizierung der Angiogenese dar [VAJKOCZY et al., 2000].

Abgesehen von den bereits erwähnten Vorzügen gestaltet sich die hier vorgestellte Quantifizierung der Angiogenese *in vitro* im Gegensatz zu Dauerfenster-Modellen entsprechend einfacher, da neue Gefäße nicht von bestehenden unterschieden werden müssen. So kann jede Veränderung der Zellmorphologie und des Zellbildes dem Prozess der Angiogenese zugeordnet und damit eindeutig quantifiziert werden.

Im Gegensatz zum Cornea- und Dauerfenster-Modell stellt das Chorioallantoismembran-Modell ein sehr einfaches Verfahren zur Untersuchung und Quantifizierung der Angiogenese dar. Die sich in der Chorioallantoismembran des bebrüteten Hühnereies vollziehende Angiogenese kann durch die Fenestrierung der Schale überwacht werden [AUERBACH et al., 2003]. Damit ist in diesem Modell der Stichprobenumfang kein limitierender Faktor. Dennoch führt jede Irritation und Änderung des Sauerstoffpartialdrucks, welche beispielsweise das Öffnen der Schale zur Folge hat, zu einer angiogenen Antwort [AUERBACH et al., 2000]. Dadurch wird die Quantifizierung der Wirkung proangiogener Faktoren erschwert. Ebenso stellt auch das sich physiologischerweise im Wachstum befindende Gefäßnetz der Chorioallantoismembran ein Problem bei der Quantifizierung der Angiogenese dar [KNIGHTON et al., 1991]. Die bei anderen *in vivo*-Modellen erschwerende inflammatorische angiogene Reaktion kann in diesem Modell dadurch umgangen werden, dass die zu testende Substanz kurz nach der Entstehung der Chorioallantoismembran eingebracht wird [KRUGER et al., 2001], da zu diesem Zeitpunkt das Immunsystem des Embryos noch nicht

vollständig entwickelt ist [LEENE et al., 1973]. Alle beschriebenen Einschränkungen als auch die Tatsache, dass Ergebnisse von Untersuchungen am aviären Gewebe für den Säuger nur limitiert aussagefähig sind [AUERBACH et al., 2003], stellen beim etablierten in vitro-Modell keine begrenzenden Faktoren dar.

Prinzipiell gilt für alle in vivo-Modelle, dass die Quantifizierung der Angiogenese auf der Basis der mengenmäßigen Erfassung der Blutgefäße erfolgt. Als Angiogenese wird jedoch der Prozess der Blutgefäßbildung mit seinen verschiedenen kaskadenartigen Phasen bezeichnet. Daher wird im Gegensatz zum etablierten in vitro-Modell mit den zur Verfügung stehenden in vivo-Methoden weniger die Angiogenese selbst, sondern vielmehr das Produkt der Angiogenese quantifiziert. Ein vom tierschützerischen Aspekt her besonders gravierender Nachteil ist, dass alle in vivo-Untersuchungen zur Quantifizierung der Angiogenese ohne Ausnahmen mit invasiven Eingriffen und dadurch wahrscheinlich mit erheblichen Schmerzen für die Tiere verbunden sind. Deshalb sind einige dieser Versuche auch besonders umstritten.

Eine nicht-invasive Methode zur Untersuchung und Quantifizierung der Angiogenese wird in den sogenannten ex vivo-Modellen realisiert. Dabei werden Explantate aus verschiedenen Gefäßen, meist der Aorta von Ratten, in einer dreidimensionalen Matrix kultiviert. Ähnlich wie bei in vivo-Untersuchungen können mit dieser kostengünstigen Alternative Einflüsse am Gefäß beteiligter nicht-endothelialer Zellen, wie beispielsweise glatter Muskelzellen, auf die Angiogenese zeitweise untersucht werden [AUERBACH et al., 2003]. Gleichzeitig spielen hier die inflammatorischen Komplikationen keine Rolle [KRUGER et al., 2001].

Üblicherweise stellen die mikrovaskulären Gefäße, nämlich Venolen und Kapillaren den Ursprung für die Gefäßneubildung im Rahmen der Angiogenese dar. Daher erfolgte die Untersuchung und Quantifizierung der Angiogenese im etablierten in vitro-Modell an mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Corpus luteum. Obwohl man davon ausgehen kann, dass beim ex vivo-Aorten-Modell die Angiogenese von den die Aorta versorgenden Vasa vasorum ausgeht, repräsentiert dieses Modell nicht das erforderliche mikrovaskuläre Gefäßnetz. Dies führt unter anderem dazu, dass die Angiogenese 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]. Daher ist trotz einer präzisen Quantifizierungsmethode, wie sie beispielsweise von BLACHER et al. [2001] für dieses Modell entwickelt wurde, keine standardisierte Quantifizierung der Angiogenese möglich. Die Reproduzierbarkeit der Quantifizierung, die für das in dieser Arbeit vorgestellte in vitro-Modell der Angiogenese im

Rahmen der Validierung nachgewiesen wurde, stellt jedoch eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung einer Methode dar.

6.5 Beurteilung der Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese im etablierten in vitro-Modell im Vergleich zu anderen in vitro-Modellen der Angiogenese

In vitro-Modelle der Angiogenese basieren auf der Kultivierung von Endothelzellen und repräsentieren daher meist relativ einfach durchzuführende Methoden zur Quantifizierung der Wirkung pro- bzw. antiangiogener Substanzen. Im Gegensatz zu den in vivo-Modellen der Angiogenese lassen sich mit Hilfe von in vitro-Modellen die verschiedenen Phasen der Angiogenese untersuchen und quantifizieren. Damit bieten in vitro-Modelle der Angiogenese die Möglichkeit, Effekte pro- bzw. antiangiogener Faktoren an Endothelzellen auf zellulärer und molekularer Ebene zu analysieren und die Angiogenese somit differenziert zu quantifizieren.

Entsprechend der Phase, in der die Quantifizierung der Angiogenese erfolgt, werden Modelle zur Untersuchung der Migration und Proliferation von Endothelzellen bzw. der Bildung tubulärer Strukturen unterschieden.

Die Untersuchung und Quantifizierung der Migration von Endothelzellen, die in vivo im Anschluss an die Degradation der Basalmembran erfolgt und somit eine frühe Phase der Angiogenese darstellt, wird vor allem in der Boyden-Kammer durchgeführt [JAIN et al., 1997]. Mit diesem einfach zu handhabenden und kostengünstigen System kann die Migration von Endothelzellen durch einen Kernporen-Polycarbonat-Filter stimuliert werden [KRUGER et al., 2001]. Die Quantifizierung der Migration erfolgt üblicherweise durch die Bestimmung der Anzahl der auf die Unterseite des Filters migrierten Zellen. Auf diese Weise lässt sich der Einfluss sowohl pro- als auch antiangiogener Faktoren auf die Migration von Endothelzellen quantifizieren [AUERBACH et al., 2003].

Da sich die Angiogenese im hier etablierten in vitro-Modell von einem geschlossenen Monolayer ausgehend vollzieht, ist keine gerichtete Migration von Endothelzellen zu beobachten. Jedoch sind die für die Migration charakteristischen morphologischen Veränderungen der Endothelzellen, die sich in der lang gestreckten Gestalt der Zellen ausdrücken, phasenkontrastmikroskopisch observierbar. Anhand der definierten Stadien, die auf den morphologischen Veränderungen der Endothelzellen im Ablauf der Angiogenese in vitro beruhen, kann die Wirkung pro- bzw. antiangiogener Faktoren auf die endotheliale

Migration quantifiziert werden. So zeigte sich bei der Untersuchung der proangiogenen Wirkung des VEGF und FGF-2 der auf die Migration der Zellen stimulierende Effekt durch die Ausbildung besonders langer Pseudopodien.

Die Proliferation der Endothelzellen, die im Anschluss an die Migration der Endothelzellen erfolgt, dient der Verlängerung des sich bildenden Gefäßsprosses [AUSPRUNK und FOLKMAN, 1977]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich das Ausmaß der Proliferation danach richtet, welche Distanz von dem neu gebildeten Gefäß überwunden werden muss. Diese Phase existiert so in vitro nicht. Da im in vitro-Modell der proangiogene Stimulus in der gesamten Kulturschale gleichmäßig präsent ist, ist zur Bildung *kapillarähnlicher Strukturen* nicht die Überwindung einer Distanz notwendig und somit eine Proliferation der Endothelzellen nicht als spezifische Phase ausgeprägt. Im hier etablierten in vitro-Modell folgt auf die Migration der Endothelzellen die schrittweise Bildung *kapillarähnlicher Strukturen*. Durch die zeitliche Erfassung der verschiedenen Phasen anhand der definierten Stadien wird die Phase der Proliferation, die in vivo den Zeitraum zwischen der Migration und der dreidimensionalen Organisation der Zellen zum neuen Gefäß einnimmt, in vitro aber indirekt quantifiziert.

In den verschiedenen in vitro-Modellen erfolgt die Quantifizierung der Proliferation von Endothelzellen anhand kolorimetrischer Methoden [LANG et al., 2000; MINISCHETTI et al., 2000], der Inkorporation von [³H]Thymidin [MUROHARA et al., 1999; CÉLÉRIER et al., 2002] oder mit einem elektronischen Partikelzählgerät [SANKAR et al., 1996; VASSE et al., 1999]. Dafür werden Endothelzellen in definierten Konzentrationen ausgesät und mit proangiogenen Faktoren inkubiert. Anschließend wird anhand der verschiedenen Methoden die Zunahme der Zellzahl erfasst. Hier muss beachtet werden, dass in diesen Untersuchungen nicht die Proliferation quantifiziert wird, die sich im Rahmen der Angiogenese vollzieht, sondern die initiale Proliferation der Zellen, die nach der Aussaat von Endothelzellen auch ohne proangiogenen Stimulus zu beobachten ist. Dies erschwert die Quantifizierung des proangiogenen Effektes der zu untersuchenden Substanz, auch wenn von den meisten Untersuchern Endothelzellen, die nicht mit proangiogenen Faktoren inkubiert wurden, als Negativkontrolle eingesetzt wurden.

Ein ideales in vitro-Modell der Angiogenese sollte aus physiologischer Sicht auch die Bildung tubulärer endothelialer Strukturen mit der Präsenz eines Lumens, von FOLKMAN und HAUDENSCHILD [1980] als *kapillarähnliche Strukturen* definiert, beinhalten [VAILHÉ et al., 2001]. Allerdings erfolgte bis heute nur in wenigen Studien die Quantifizierung der Angiogenese in vitro auf der Basis der zwei- oder dreidimensionalen Organisation der

Endothelzellen zu strangartigen Strukturen [z.B.: NEHLS und DRENCKHAHN, 1995; MEYER et al., 1997; PETERS et al., 2002].

In allen anderen Untersuchungen wurde von den Autoren der Begriff *kapillarähnliche Struktur* für jede lineare Aneinanderreihung von Endothelzellen verwendet, ohne dass ein Lumen innerhalb dieser Strukturen nachgewiesen wurde. In diesen Modellen beschränkte sich die Quantifizierung der Angiogenese grundsätzlich auf die mengenmäßige Angabe der Anzahl, Länge und/oder Fläche dieser Strukturen. Das bedeutet, dass den in vivo-Untersuchungen analog nur das Produkt der Angiogenese quantifiziert wurde. Für das hier vorgestellte in vitro-Modell gilt, dass im Rahmen der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen ein zellfreies Lumen nachgewiesen wurde. Das bedeutet, dass der ursprünglichen Forderung gemäß [FOLKMAN und HAUDENSCHILD, 1980], die Bildung *kapillarähnlicher Strukturen* zu beobachten war. Die Quantifizierung der Angiogenese im Sinne der Ausprägung kapillarähnlicher Strukturen wurde einerseits anhand der definierten Stadien semiquantitativ durchgeführt. Andererseits erfolgte die quantitative Erfassung der *kapillarähnlichen Strukturen* durch die morphometrische Bestimmung ihrer Länge, Fläche und Anzahl der Verzweigungspunkte im Ablauf der Angiogenese in vitro.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Gegensatz zu den in vivo-Modellen in den verschiedenen in vitro-Modellen der Angiogenese der kaskadenartige Prozess der Angiogenese quantifiziert werden kann. Dadurch kann für eine zu untersuchende Substanz nicht nur nachgewiesen werden, ob sie stimulierend oder inhibierend auf die Angiogenese wirkt, sondern auch in welchen Phasen dies geschieht. Gleichzeitig lassen sich die Konditionen für die Untersuchung besser bestimmen und überwachen. Die üblicherweise auf Endothelzellkulturen basierenden in vitro-Modelle der Angiogenese eignen sich insbesondere dafür, zu differenzieren, ob die pro- bzw. antiangiogene Wirkung einer Substanz sich direkt oder indirekt auf die Endothelzellen bezieht [KRUGER et al., 2001].

In vitro-Modelle der Angiogenese erlauben die Einschränkung und Ergänzung von Tiermodellen vor allem in der initialen Phase der Untersuchung pro- bzw. antiangiogener Substanzen. Das hier vorgestellte Modell ermöglicht im Gegensatz zu den bislang publizierten in vitro-Methoden eine Quantifizierung des gesamten kaskadenartigen Prozesses der Angiogenese einschließlich der Lumenisation. Die durchgeführten Untersuchungen zur Validierung haben gezeigt, dass die Quantifizierung der Angiogenese reproduzierbar mit Hilfe der Standardausrüstung eines Zellkulturlabor in einem minimalen Stichprobenumfang erfolgen kann. Damit repräsentiert die hier vorgestellte Methode eine einfach durchzuführende und kostengünstige Methode, die als Ersatz- und Ergänzungsmethode zu in vivo-Modellen eingesetzt werden könnte.

6.6 Morphometrie kapillarähnlicher Strukturen im Ablauf der Angiogenese in vitro

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde die Bildung *kapillarähnlicher Strukturen* im Ablauf der Angiogenese in vitro quantitativ erfasst. Dabei wurde die Fläche, Länge und die Anzahl der Verzweigungspunkte der *kapillarähnlichen Strukturen* morphometrisch bestimmt. Die Morphometrie der *kapillarähnlichen Strukturen*, die in Anlehnung an eine Studie von NEHLS und DRENCKHAHN [1995] als strangartige Strukturen mit einem Durchmesser von 28 μm definiert wurden (siehe 5.1.2), erfolgte dabei in phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen über einen Zeitraum von 67 Tagen.

In den 12 Vertiefungen, aus denen jeweils sechs Bildausschnitte dokumentiert wurden, waren die ersten *kapillarähnlichen Strukturen* ab dem 39. Tag zu erkennen. Vom 39. Tag ausgehend stieg bis zum 53. Tag die Anzahl der Bildausschnitte, die *kapillarähnliche Strukturen* enthielten, kontinuierlich an und nahm danach bis zum Ende der Untersuchung wieder ab. Stets die Summe aus allen untersuchten Bildausschnitten betrachtend, lag auch das Maximum der Fläche, Länge und der Anzahl der Verzweigungspunkte am Tag 53 der Untersuchungen. Bei der Auswertung dieser Größen wurde deutlich, dass die Fläche, die von den *kapillarähnlichen Strukturen* eingenommen wurde, in den meisten Kulturen zwei Maxima aufwies. Das ergab sich dadurch, dass das Maximum in den sechs untersuchten Bildausschnitten der Kulturschale in einigen Bildausschnitten nicht am Tag 53 lag. Handelte es sich in diesen Bildausschnitten dann um großflächige Strukturen, führte dies bei der Bildung der Summe zu einem weiteren Maximum. Die selben Beobachtungen ergaben sich auch für die Länge *kapillarähnlicher Strukturen* in den verschiedenen Kulturen.

Zur Darstellung des relativen Durchmessers der *kapillarähnlichen Strukturen* wurde für alle Bildausschnitte der Quotient aus Fläche und Länge der gemessenen Strukturen (D_j) gebildet. Dessen Median unterlag über den gesamten Untersuchungszeitraum nur geringfügigen Schwankungen. Gleichzeitig verhielten sich auch die relative Fläche (RF_j) und die relative Länge (RL_j) einer kapillarähnlichen Struktur, die durch den Quotient der Gesamtlänge bzw. -fläche gemessener Strukturen eines Bildausschnitts und der Anzahl der Verzweigungspunkte (+1) innerhalb desselben gebildet wurde, ebenfalls annähernd konstant, während die Anzahl der Verzweigungspunkte anstieg. Das bedeutet, dass die Vergrößerung der Fläche *kapillarähnlicher Strukturen*, die bis zum 53. Tag der Untersuchung zu beobachten war, auf die Zunahme der Anzahl *kapillarähnlicher Strukturen* zurückzuführen war, deren Durchmesser und Länge nur geringen Schwankungen unterlag. Die Bildung *kapillarähnlicher Strukturen* erfolgte aus einem Netzwerk heraus, welches zu Beginn aus Einzelzellsträngen bestand. Im weiteren Verlauf beteiligten sich immer mehr

Endothelzellen an diesen Strängen, wodurch deren Anzahl und die Länge zunahm. Die gleichzeitig zu beobachtende Abnahme der Zahl der im Monolayer wachsenden Zellen, lässt vermuten, dass die Zunahme der Anzahl in Strängen organisierter Zellen nicht auf deren Proliferation beruhte, sondern auf der steigenden Beteiligung der ursprünglich im Monolayer wachsenden Zellen. In einer Untersuchung von MEYER et al. [1997] wurde diese Beobachtung durch den Nachweis nur geringgradiger Proliferation in Strängen organisierter Zellen überprüft und bestätigt. Da sich der Median des relativen Durchmessers der Stränge währenddessen relativ konstant zwischen ca. 30 und 40 μm bewegte, wird deutlich, dass die Anlagerung von Endothelzellen an die Stränge in der gesamten Kulturschale annähernd gleichmäßig erfolgte.

Bis zum Tag 53 der Untersuchungen war in über 70% der Bildausschnitte das Stadium 8 der Angiogenese in vitro erreicht. Das bedeutet, dass fast alle zu diesem Zeitpunkt bestehenden Endothelzellstränge einen Durchmesser von mindestens 28 μm aufwiesen. Gleichzeitig befanden sich nur noch vereinzelte Zellen des ursprünglichen Monolayer am Kulturschalenboden.

Die Zunahme der Anzahl, Länge und Verzweigungspunkte kapillarähnlicher Strukturen in mit proangiogenen Faktoren inkubierten Kulturen wurde von verschiedenen Untersuchern als Kennzeichen der Angiogenese in vitro beobachtet [u.a. FOLKMAN und HAUDENSCHILD, 1980; MADRI und WILLIAMS, 1983; MONTESANO et al., 1983; VAILHÉ et al., 1998; DAVIS et al., 2002; PETERS et al., 2002; CONNOLLY et al., 2002; HARVEY et al., 2002]. VAILHÉ et al. [1998] stellten dabei fest, dass sich die Erhaltung dieser Strukturen in vitro über einen längeren Zeitraum als schwierig erwies, da sich diese durch die Aktivierung zellulärer Proteasen, die eine Folge der Stimulation mit proangiogenen Faktoren ist, letztlich vom Kulturschalenboden ablösen.

Auch im hier vorgestellten in vitro-Modell war der Rückgang der Anzahl der Bildausschnitte, in denen *kapillarähnliche Strukturen* zu erkennen waren, ab dem 53. Tag häufig die Folge des Kontaktverlustes dieser Strukturen mit dem Kulturschalenboden. Diese flotierten in der Kulturschale und waren daher nicht mehr in den definierten Bildausschnitten zu erkennen. Dieses Phänomen erklärt auch die in dieser Phase eintretende Verkleinerung der gemessenen Fläche, Länge und Anzahl der *Verzweigungen kapillarähnlicher Strukturen*. Zusätzlich war die sinkende Anzahl der Verzweigungen in den verbliebenen Strukturen charakteristisch. Daraus resultierte der leichte Anstieg der relativen Länge (RL_j) und Fläche (RF_j) einer *kapillarähnlichen Struktur* ab dem Tag 53 der Untersuchungen. Die phasenkontrastmikroskopisch erkennbare Unregelmäßigkeit der verbliebenen Strukturen drückte sich in diesem Zeitraum auch in der steigenden Streuung ihres relativen Durchmessers (D_j) aus. Die nur abschnittsweise Vergrößerung des Durchmessers kann möglicherweise auf die Aneinanderlagerung bereits bestehender Endothelzellstränge

zurückgeführt werden. Dafür spricht, dass in dieser Phase keine Verminderung der noch vereinzelt am Kulturschalenboden haftenden Zellen zu erkennen war, gleichzeitig aber eine deutliche Abnahme der Anzahl der Verzweigungspunkte der *kapillarähnlichen Strukturen*.

Die Stabilisierung neu gebildeter Kapillaren erfolgt *in vivo* durch die Bildung einer Basalmembran, deren Bestandteile unter anderem von den Endothelzellen selbst synthetisiert werden. Abhängig vom Gefäßbett wird die Maturation des neuen Gefäßes auch durch die Anlagerung von Perizyten stimuliert [DAVIS et al., 2002].

In der hier vorgestellten Studie wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie die Sekretion fibrillären Materials durch die Endothelzellen nachgewiesen. Zusätzlich wurde immunzytochemisch dargestellt, dass dieses Material Kollagen Typ IV, einen Bestandteil der Basalmembran, enthält. Die in diesem Modell vor allem in das Lumen der *kapillarähnlichen Strukturen* erfolgte Sekretion des Kollagen Typ IV (siehe 5.6.2), führte vermutlich dazu, dass der Zusammenhalt der Endothelzellen untereinander stabiler war als die Haftung am Kulturschalenboden.

Fazit ist, dass die Untersuchung und Quantifizierung *kapillarähnlicher Strukturen* in diesem Modell nur in dem Zeitraum repräsentativ für den Ablauf der Angiogenese ist, in dem sich diese noch nicht vom Kulturschalenboden abgelöst haben, das heißt bis zum 53. Tag.

6.7 Ultrastruktur der Endothelzellen im Ablauf der Angiogenese *in vitro*

Zur Untersuchung der Ultrastruktur wurden Endothelzellen *in vitro* mit dem Selektivmedium zur Angiogenese stimuliert und nach 18, 40 und 60 Tagen transmissionselektronenmikroskopisch untersucht.

Obwohl bei der phasenkontrastmikroskopischen Beurteilung der Endothelzellen nach 18 Tagen die Stadien 2 und 3 der Angiogenese erkennbar waren, zeigte die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung bereits zu diesem Zeitpunkt das Vorhandensein linear aneinander gereihter Zellen. Vermutlich waren diese Zellreihen bei phasenkontrastmikroskopischer Betrachtung deswegen nicht zu erkennen, weil sie zu diesem Zeitpunkt noch in den Monolayer integriert waren. Innerhalb der Zellreihen, die häufiger parallel aneinandergelagert waren, bestanden Zellkontakte in Form von "gap junctions", während zwischen den Zellreihen selbst keine Zellkontakte zu erkennen waren.

Die Zellmembranen der Endothelzellen wiesen zahlreiche fingerförmige Ausstülpungen nach allen Seiten hin auf, die als Mikrovilli gedeutet werden können. Da diese in vivo nur auf der luminalen Seite der Endothelzellen zu beobachten sind [FAWCETT, 1977], deutete deren gleichmäßige Verteilung darauf hin, dass die Endothelzellen in dieser Phase der Angiogenese in vitro noch keine Polarisierung aufwiesen. Auffällig war auch die hohe Konzentration stark elektronendichter Mitochondrien, während andere Zellorganellen wie das endoplasmatische Retikulum und Golgi-Felder nur vereinzelt zu erkennen waren. Die Elektronendichte der Mitochondrien korreliert mit der Konzentration der Cristae [GHADIALLY, 1982]. Dabei unterscheidet man Mitochondrien vom Typ I, die eine hohe Cristae-Konzentration aufweisen und deren Auftreten einen hohen Energieumsatz der Zelle repräsentiert, von Mitochondrien vom Typ II mit einer geringen Cristae-Konzentration [ORD und SMITH, 1982]. Somit deutet das verstärkte Auftreten elektronendichter Mitochondrien vom Typ I auf den hohen Energieumsatz der Endothelzellen hin. Die euchromatinreichen Zellkerne und die geringe Konzentration der übrigen Zellorganellen lassen dabei vermuten, dass der hohe Energieverbrauch der Zellen auf eine gesteigerte Transkription zurückzuführen war.

Die Endothelzellen, die nach 40 Tagen transmissionselektronenmikroskopisch untersucht wurden, zeigten im phasenkontrastmikroskopischen Bild in den verschiedenen Abschnitten der Kulturschale die Stadien 5 und 6 der Angiogenese in vitro. In dieser Phase waren transmissionselektronenmikroskopisch sowohl lang gestreckte als auch abgerundete Zellen zu erkennen, die in über 90% in Strängen organisiert waren. Parallel angeordnete Zellreihen wiesen zwischen sich Spalträume auf, die mit fibrillärem Material angefüllt waren. Dieser Spaltraum war umso breiter, je abgerundeter die an den Strängen beteiligten Zellen waren. Ebenso konzentrierten sich die auch in dieser Phase vorhandenen Mikrovilli der abgerundeten Zellen stärker auf die dem Spaltraum abgewandten Seite.

Die Polarisierung von Endothelzellen während der Angiogenese, die die Bildung einer luminalen und basalen Zellseite beinhaltet, ist kennzeichnend für ihre Differenzierung. Dabei erfolgt die Stimulation zur Bildung einer luminalen und einer basalen Seite durch den Kontakt der Zellen zu den verschiedenen Kompartimenten, dem Blut und der Extrazellulärmatrix [HALLER und KÜBLER, 1999]. Die Sekretion fibrillären Materials durch die Endothelzellen erfolgt in vivo auf der basalen Seite, während das Auftreten von Mikrovilli charakteristisch für die luminalen Zellmembran ist [SCHWARTZ, 2001].

Im hier vorgestellten in vitro-Modell wiesen die Endothelzellen eine Polarisierung auf, wobei die vom Spaltraum abgewandte Seite morphologische Merkmale der luminalen Seite in Form von Mikrovilli aufwies. Auch war zu diesem Zeitpunkt fibrilläres Material, welches in vivo zur basalen Seite hin sekretiert wird, nur in dem zwischen den Zellreihen bestehenden Spaltraum zu erkennen. Diese Beobachtungen deuten auf eine „umgekehrte“ Polarisierung

der Endothelzellen hin, die auch von MONTESANO et al. [1983] bei in vitro kultivierten Endothelzellen beobachtet wurde.

Wie auch die immunzytochemischen Untersuchungen zeigten, erfolgte die Sekretion fibrillären Materials in diesem in vitro-Modell zunächst unspezifisch in die gesamte Umgebung der Endothelzellen. Mit der Bildung strangartiger Strukturen war dieses Material jedoch zunehmend in deren Inneren zu erkennen. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass das fibrilläre Material durch den Kulturmediumwechsel entfernt wurde, während es innerhalb des Lumens erhalten blieb. Dadurch differenzierte sich möglicherweise die dem Lumen zugewandte Seite der Zellen zur basalen Seite, so dass sich im weiteren Verlauf die Sekretion des fibrillären Materials auf diese Seite der Endothelzellen beschränkte. Gleichzeitig könnte sich die mit dem Kulturmedium in Kontakt stehende Seite der Endothelzellen zu der luminalen Seite entwickelt haben.

Im Zytoplasma der Endothelzellen waren zahlreiche Mitochondrien von unterschiedlicher Elektronendichte vorhanden. Zusätzlich war ein deutlicher Konzentrationsanstieg des endoplasmatischen Retikulums, das sehr weite Zisternen aufwies, zu erkennen. Damit könnte der Energieumsatz in dieser Phase vor allem auf die verstärkte Synthese des fibrillären Materials zurückzuführen sein.

Die nach 60 Tagen Kultivierung transmissionselektronenmikroskopisch untersuchten Endothelzellen waren ausschließlich in Strängen, die weite Lumina aufwiesen, organisiert. Die Endothelzellen zeigten dabei überwiegend eine abgerundete Gestalt und die bereits beschriebene „umgekehrte“ Polarität. Das Lumen der meisten Stränge war mit fibrillärem Material gefüllt, wobei auch breite Stränge zu erkennen waren, deren Lumen nur teilweise ausgefüllt war. Gleichzeitig wiesen die Zellen zahlreiche Vakuolen im Zytoplasma auf, die teilweise mit dem beschriebenen Material angefüllt waren. Diese könnten einerseits darauf hindeuten, dass das fibrilläre Material in dieser späten Phase der Angiogenese in vitro von den Endothelzellen wieder phagozytiert wurde. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass es sich dabei um Vesikel handelte, die mit fibrillärem Material, das von der Zelle synthetisiert wurde, gefüllt waren, um ausgeschleust zu werden. Auch FOLKMAN und HAUDENSCHILD [1980] wiesen bei in vitro kultivierten Endothelzellen transmissionselektronenmikroskopisch Vakuolen nach, die fibrilläres Material enthielten. Sie vermuteten, dass die Verschmelzung dieser Vakuolen den Ursprung des Lumens darstellte bzw. durch die Sekretion des Inhalts ein bestehendes Lumen vergrößert wurde.

Neben diesen Vakuolen waren im Zytoplasma der Zellen nur wenige Mitochondrien vorhanden. Auch das endoplasmatische Retikulum und die Golgi-Felder waren in geringer Anzahl vertreten. Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass in dieser Phase der

Angiogenese die Endothelzellen nur eine verminderte Syntheseleistung mit daraus resultierendem geringen Energieumsatz aufwiesen.

Die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass die Endothelzellen im Ablauf der Angiogenese in vitro charakteristischen ultrastrukturellen Veränderungen unterlagen, die Parallelen mit der Angiogenese in vivo aufweisen. Häufig wird die mangelnde Polarität der Endothelzellen in zweidimensionalen in vitro-Modellen der Angiogenese als Nachteil diskutiert [MONTESANO et al., 1983; FEDER et al., 1983]. Anhand der transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde in diesem Modell deutlich, dass die Endothelzellen keine mangelnde, sondern eine konvertierte Polarität aufwiesen, welche ein wichtiges Merkmal der Endothelzellen in vivo ist [HALLER und KÜBLER, 1999] und damit Voraussetzung für ein realitätsnahes in vitro-Modell.

6.8 Immunzytochemischer Nachweis von Kollagen Typ IV im Ablauf der Angiogenese in vitro

Als charakteristischer Bestandteil der Basalmembran wurde Kollagen Typ IV im Ablauf der Angiogenese in vitro immunzytochemisch nachgewiesen und fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Die in vitro mit dem Selektivmedium (siehe 3.3.2) zur Angiogenese stimulierten Endothelzellen wurden nach 14, 26, 44 und 56 Tagen zur Untersuchung herangezogen.

Das phasenkontrastmikroskopische Bild der Endothelzellen entsprach nach 14 Tagen in den verschiedenen Abschnitten der Kulturschale den Stadien 1 und 2 der Angiogenese in vitro. In diesen Stadien wurde Kollagen Typ IV fast ausschließlich intrazellulär nachgewiesen. Dabei zeigte sich insbesondere um den Zellkern herum eine intensive Fluoreszenz. Das bedeutet, dass schon zu einem Zeitpunkt, als weder die phasenkontrastmikroskopischen noch die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen darauf hin wiesen, die Synthese von Kollagen Typ IV durch die Endothelzellen erfolgte. Im Widerspruch zum intensiv fluoreszierenden Saum um den Zellkern steht jedoch, dass bei transmissionselektronenmikroskopischer Betrachtung Zellorganellen wie das endoplasmatische Retikulum und Golgi-Felder vor allem in der Peripherie der Zellen zu erkennen waren. Allerdings zeigten auch bei einer Untersuchung von TILLING et al. [2002] in vitro kultivierte mikrovaskuläre Endothelzellen, die im Monolayer wuchsen, im Bereich um den Zellkern eine besonders intensive Markierung von Kollagen Typ IV.

Bei den Endothelzellen, die sich zum Zeitpunkt der Untersuchung in den Stadien 3 und 4 der Angiogenese in vitro befanden, war auch ein intensiv fluoreszierender Hof um die Zellen herum zu erkennen. Vor allem erstreckten sich immunpositive, gerichtete Fasern entlang linear aneinander gereihter Zellen.

Für Kollagen Typ IV wurden verschiedene Wirkungen auf Endothelzellen nachgewiesen. So wurde von MASIERO et al. [1999] dokumentiert, dass Kollagen Typ IV in Endothelzellen die Umorganisation von Aktinfilamenten bewirkt, wodurch die Ausbildung von Pseudopodien erfolgt. Somit richten sich die Endothelzellen an den selbst produzierten Fasern entlang aus. Auch die Synthese und Sekretion weiterer wichtiger Bestandteile der Basalmembran wie Laminin-8 und Laminin-10 von den Endothelzellen wird durch ihren Kontakt mit Kollagen Typ IV stimuliert [THYBOLL et al., 2002].

Im weiteren Ablauf der Angiogenese in vitro war bei den Endothelzellen, die 44 Tage lang mit dem Selektivmedium kultiviert worden waren (Stadien 5 und 6 der Angiogenese in vitro), ein Rückgang der intrazellulären Fluoreszenz zu beobachten, während gleichzeitig die Konzentration von Kollagenfasern im Extrazellulärraum anstieg. Schließlich war bei den Endothelzellen, die sich in den Stadien 7 und 8 der Angiogenese in vitro befanden, nur noch extrazelluläres Kollagen Typ IV nachzuweisen. Im phasenkontrastmikroskopischen Bild war dabei zu erkennen, dass sich die Endothelzellen entlang der Kollagenfasern orientierten.

Die Synthese und Sekretion von Kollagen Typ IV stellt ein charakteristisches Merkmal differenzierter Endothelzellen dar. Zusätzlich stimuliert die Anlagerung der Endothelzellen an die Kollagenmatrix die Ausbildung der basalen Membran [SCHWARTZ, 2001]. Das bedeutet, dass durch Kollagen Typ IV die Polarisierung der Endothelzellen stimuliert wird, welche ebenso kennzeichnend für differenzierte Endothelzellen ist [HALLER und KÜBLER, 1999].

Die Ergebnisse des immunzytochemischen Nachweises von Kollagen Typ IV zeigen, dass sich die hier eingesetzten Endothelzellen im Rahmen der Angiogenese zum differenzierten Phänotyp entwickeln.

6.9 Vorkommen von Apoptose im Ablauf der Angiogenese in vitro

Der Nachweis apoptotischer Endothelzellen im Ablauf der Angiogenese in vitro erfolgte fluoreszenzmikroskopisch mittels der Bindung von Annexin-EGFP an Phosphatidylserin in der äußeren Lipidschicht der Zellmembran. Hierfür wurden Endothelzellen über einen Zeitraum von 14, 26, 44 und 56 Tagen mit dem Selektivmedium (siehe 3.3.2) zur Angiogenese stimuliert.

Die Endothelzellen, die sich zum Zeitpunkt der Untersuchung in den Stadien 1 und 2 der Angiogenese in vitro (14 Tage Inkubation) befanden, wiesen nur schwache Fluoreszenz auf. Dies galt im weiteren Verlauf auch für die am Kulturschalenboden im Monolayer organisierten Zellen. Die Beobachtung entspricht den Ergebnissen der Untersuchungen von PETERS et al. [2002], die auch bei in vitro kultivierten Endothelzellen, die im Monolayer organisiert waren, keine Apoptose nachweisen konnten.

Die ersten intensiv fluoreszierenden und damit apoptotischen Zellen waren bei den 26 Tage lang kultivierten Endothelzellen zu erkennen. Dabei beschränkte sich die Apoptose auf Endothelzellen, die sich in linearer Anordnung befanden. Die apoptotischen Endothelzellen entsprachen zu diesem Zeitpunkt ca. 40% der linear aneinander gereihten Zellen. Im weiteren Verlauf nahm der Anteil apoptotischer Endothelzellen im Bereich der in Strängen organisierten Zellen zu und betrug am Tag 44 (Stadien 5 und 6 der Angiogenese in vitro) ca. 70%.

Bis zum Stadium 7 bzw. 8 der Angiogenese sank der Anteil apoptotischer Zellen auf ca. 30%. Auffällig war dabei, dass Apoptose vor allem in Bereichen zu erkennen war, in denen die endothelialen Stränge einen Durchmesser von mehr als 30 µm aufwiesen.

Sowohl die Angiogenese als auch das Überleben der Endothelzellen ist abhängig von der Haftung an der extrazellulären Matrix und den Zell-Zell-Kontakten [CHAVAKIS und DIMMELER, 2002]. In vivo unterliegen die Endothelzellen aufgrund des Kontaktverlustes zur Extrazellulärmatrix im Inneren eines neu gebildeten Endothelzellsprosses dem programmierten Zelltod [PETERS et al., 2002]. Somit stellt das Auftreten von Apoptose im Ablauf der Angiogenese in vivo ein für die Reifung der neuen Kapillare erforderliches Phänomen dar [HUGHES und CHAN-LING, 2000]. Auch die Bildung *kapillarähnlicher Strukturen* geht mit der gesteigerten Expression Apoptose-regulierender Proteine, wie beispielsweise Caspase-1, einher [PETERS et al., 2002].

Im etablierten in vitro-Modell wurden apoptotische Endothelzellen fast ausschließlich im Bereich der *kapillarähnlichen Strukturen* nachgewiesen. Mittels der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen und dem immunzytochemischen Nachweis von Kollagen Typ IV wurde die Präsenz der extrazellulären Matrix im Inneren dieser Strukturen dokumentiert. Dadurch erklärt sich, dass vor allem den Strängen von außen aufliegende Zellen den Kontakt zu dieser Matrix verloren und somit vom programmierten Zelltod betroffen waren.

6.10 Synopsis

Mit dem hier vorgestellten Modell, welches auf der Kultivierung mikrovaskulärer Endothelzellen basiert, wurde eine Methode zur Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese in vitro entwickelt, die alle Phasen der angiogenen Kaskade umfasst. Im Rahmen dieser Arbeit sind Untersuchungen zur Bewertung dieses in vitro-Modells als Ersatz- und Ergänzungsmethode zum Tierversuch durchgeführt wurden. So wurde mit den Untersuchungen zur Validierung nachgewiesen, dass die Quantifizierung der Angiogenese unter genau definierten Bedingungen durch unterschiedliche Untersucher und in verschiedenen Versuchsansätzen vergleichbare Ergebnisse zeigt und damit reproduzierbar ist. Der Einsatz von bekannten und im Tierexperiment bereits untersuchten Stimulatoren und Inhibitoren der Angiogenese ergab, dass die im etablierten in vitro-Modell gemessenen Werte die Resultate von in vivo-Studien reproduzieren. Darüber hinaus zeigten sich durch die differenzierte Quantifizierung der Angiogenese in ihren einzelnen Phasen Hinweise auf bislang nicht beschriebene Effekte der Angiogenese-Inhibitoren Angiostatin und Suramin (siehe 6.3.1 und 6.3.2).

Die Prüfung der Homogenität des Ablaufs der Angiogenese in verschiedenen Kulturen ergab, dass die Quantifizierung der Angiogenese in diesem in vitro-Modell mit einem minimalen Stichprobenumfang erfolgen kann. Da außerdem für die Durchführung der Untersuchungen abgesehen von der üblichen Ausstattung eines Zellkulturlabors, nur ein Bildbearbeitungsprogramm erforderlich ist, bewegt sich der Zeit- und Kostenaufwand in einem vertretbaren Rahmen.

Die transmissionselektronenmikroskopischen und immunzytochemischen Untersuchungen haben zusätzlich dargestellt, dass sich die hier verwendeten mikrovaskulären Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum im Ablauf der Angiogenese zum polarisierten Phänotyp differenzieren. Damit tritt der Verlust der Spezialisierung von Zellen, der häufig bei lang anhaltender Kultivierung zu beobachten ist, in diesem in vitro-Modell offensichtlich nicht ein.

Dennoch spiegelt dieses in vitro-System wie auch andere Zellkultur-Modelle nicht die komplexen Verhältnisse im lebenden Organismus wider, wodurch Experimente mit Tierversuchen sicher nicht im gesamten Umfang ersetzt werden können. Jedoch bieten weder Tierversuche noch Ersatzmethoden eine absolute Sicherheit bei der Ermittlung der Wirkung und Wirkkonzentration einer Substanz für alle Spezies einschließlich des Menschen. Damit stellt diese Methode zur Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese vor allem eine Alternative zu Tierversuchen dar, die in der vorklinischen Phase des Zulassungsverfahrens zur Identifizierung und ersten Bestimmung der effektiven und unschädlichen Konzentration einer pro- bzw. antiangiogenen Substanz durchgeführt werden müssen.

Das steigende Interesse am Einsatz pro- bzw. antiangiogener Faktoren in der Therapie verschiedener Erkrankungen führte dazu, dass mittlerweile verschiedene insbesondere antiangiogene Substanzen, wie beispielsweise Thalidomid, ZD6126 und TNP-470, in der Phase III klinischer Studien geprüft werden [SHEPHERD und SRIDHAR, 2003]. Dies indiziert die Entwicklung von Methoden, mit denen Tierversuche auf dem Gebiet der Angiogenese-Forschung ergänzt und ersetzt werden können. Die hier vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass die etablierte Methode zur Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese zur Reduktion vorklinischer Experimente mit Tierversuchen beitragen könnte. Die für die Untersuchungen verwendeten Zellen werden bereits in verschiedenen Laboratorien im In- und Ausland mit Erfolg getestet.