Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Etablierung und Charakterisierung

eines Tumorsurrogat-Angiogenese-Modells und erste pharmakologische

Wirksamkeitsnachweise antiangiogener Substanzen

mittels kontrastverstärktem Mikro-Ultraschall

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Susanne Flechsig, geb. Lerche Tierärztin aus Nauen

> Berlin 2011 Journal-Nr.: 3516

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan:	Hr. UnivProf. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter:	Fr. UnivProf. Dr. H. Fink
Zweiter Gutachter:	Hr. PD Dr. P. Hauff
Dritter Gutachter:	Hr. UnivProf. Dr. F. Kiessling

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice, angiogenesis, Cancer, xenografts, ultrasound, diagnostic techniques, animal models, alginates, growth factors, histology, microscopy, drug therapy, monitoring

Tag der Promotion: 03.10.2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-044-7 **Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011** Dissertation, Freie Universität Berlin **D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Coverbild vorne © psdesign1 - Fotolia.com Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved © Mensch und Buch Verlag 2011 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de Man merkt nie, was schon getan wurde, man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.

Marie Sklodowska Curie

INHALTSVERZEICHNIS

	Inhaltsverzeichnis	I
	Abkürzungsverzeichnis	IV
1	Einleitung und Zielstellung	1
2	Literaturübersicht	4
2.1	Angiogenese und Anti-Angiogenese	4
2.1.1	Morphologischer Aufbau von Blutkapillaren	4
2.1.2	Arten der Gefäßneubildung	5
2.1.3	Regulation der Angiogenese	6
2.1.3.1	Proangiogene Faktoren	6
2.1.3.2	Antiangiogene Faktoren	7
2.1.3.3	Der Angiogene Switch	8
2.1.4	Formen der Angiogenese	8
2.1.4.1	Physiologische Angiogenese	9
2.1.4.2	Pathologische Angiogenese	9
2.1.4.3	Angiogenese bei malignen Tumoren	10
2.2	Angiogenese in der onkologischen Forschung	12
2.2.1	Historischer Überblick	12
2.2.2	Angiogenese-Modelle	13
2.2.2.1	In vitro Modelle	14
2.2.2.2	In vivo Modelle	15
2.3	Therapeutische Ansätze bei Krebs	18
2.3.1	Chirurgische Entfernung solider Tumore	19
2.3.2	Behandlung solider Tumore mit ionisierenden Strahlen	19
2.3.3	Chemotherapeutische Behandlung fortgeschrittener Krebserkrankungen	20
2.3.3.1	Klassische Chemotherapeutika	21
2.3.3.2	Angiogenese-Hemmer	22
2.4	Monitoring antiangiogener Therapieeffekte in der Onkologie	25
2.4.1	Klinische Routinemethoden	25
2.4.1.1	Bildgebenden Verfahren	26
2.4.1.2	Histologische Präparate	27
2.4.2	Methoden in der präklinischen Forschung	28
2.4.2.1	Routinemethoden	29
2.4.2.2	Neue Verfahren	30

3	Material und Methoden	36
3.1	Chemische Substanzen und Verbrauchsmaterialien	36
3.2	Herstellung von VEGF/FGF-enthaltenden Alginatbeads	36
3.2.1	Herstellungsapparatur	36
3.2.2	Herstellungsprotokoll	38
3.2.3	In vitro Charakterisierung	39
3.3	In vivo Untersuchungen	41
3.3.1	Versuchstiere	41
3.3.2	Narkose	42
3.3.3	Setzung der subkutanen AlgB-Depots	42
3.3.4	Der kontrastverstärkte Mikro-Ultraschall	43
3.3.5	Reproduzierbarkeit der sonographischen Messungen	50
3.4	Histologische Blutgefäßquantifizierung	50
3.4.1	Probenkonservierung	50
3.4.2	Antertigen von Getrierschnitten	51
3.4.3	CD31-Immunhistochemische Farbung	51
3.4.4	Stereologische Werkzeuge zur Blutgefäßquantifizierung	52
3.5	Versuchsdesigns der in vivo Studien	56
3.5.1	Experiment 1: Proof of Principle in immundefizienten Mäusen	56
3.5.2	Experiment 2: Longitudinalstudie in immundefizienten Mäusen	57
3.5.3	Experiment 3: Longitudinalstudie in immunkompetenten Mäusen	58
3.5.4	Experiment 4: Therapiemonitoring in immunkompetenten Mäusen	59
3.6	Statistische Versuchsauswertung	61
4	Ergebnisse	63
4.1	In vitro Charakterisierung der Alginatbeads	63
4.2	Reproduzierbarkeit der sonographischen Messungen	63
4.3	In vivo Studien	64
4.3.1	Experiment 1: Proof of Principle in immundefizienten Mäusen	64
4.3.2	Experiment 2: Longitudinalstudie in immundefizienten Mäusen	70
4.3.3	Experiment 3: Longitudinalstudie in immunkompetenten Mäusen	74
4.3.4	Experiment 4: Therapiemonitoring in immunkompetenten Mäusen	79
5	Diskussion	83
5.1	In vitro Charakterisierung der Alginatbeads	84
5.2	Reproduzierbarkeit der sonographischen Messungen	85
5.3	In vivo Studien	86
5.3.1	Experimente 1 und 2: Etablierung in immundefizienten Tieren	86
5.3.2	Experiment 3: Longitudinalstudie in immunkompetenten Mäusen	93
5.3.3	Experiment 4: Therapiemonitoring in immunkompetenten Mäusen	95

5.4	Tumorsurrogat-Angiogenese-Modell und Tierschutz	99
5.5	Schlussfolgerungen	100
6	Zusammenfassung	102
7	Summary	104
8	Literaturverzeichnis	106
9	Tabellarischer Anhang	117
	Danksagung	
	Selbständigkeitserklärung	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bezeichnung
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AlgB(s)	Alginatbead(s)
AMD	Age Dependent Macula Degeneration
Ang	Angiopoietine
AUC	Area Under the Curve
BGPD	Blutgefäßprofildichte
Cat.	Catalogue Number
CD	Cluster of Differentiation
CDI	Cartilage Derived Inhibitor
CF	Carrier Free
СТ	Computer Tomography
СТКМ	CT-Kontrastmittel
CML	Chronic Myelogenous Leukemia
DAB	3,3-Zoll-Diaminobenzidin
DCE-MRT	Dynamic Contrast Enhanced Magnetic Resonance Tomography
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	Epidermal Growth Factor
FDA	United States Food and Drug Administration
FDG	Fludeoxyglukose
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
IFN	Interferon
IL	Interleukine
kDa	Kilodalton
KSI	Kontrastsignalintensität
min	Minuten
MIP	Maximum Intensity Persistence
MRT	Magnetic Resonance Tomography
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
MVD	Microvessel Density
PBS	Phosphat Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule

PET	Positron Emission Tomography
PIGF	Placenta Growth Factor
RKI	Robert Koch Institut
ROI	Region of Interest
RTK(s)	Receptor Tyrosine Kinase(s)
sec	Sekunden
SPECT	Single Photon Emision Tomography
SURS	Systematic Uniform Random Sampling
TBS	Tris Buffered Saline
TEM	Tumor Endothelial Marker
TGF	Transforming Growth Factor
TIC	Time Intensity Curve
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNM	Tumor Nodules Metastasis
TSAM	Tumorsurrogat-Angiogenese-Modell
US	Ultraschall
USKM	Ultraschallkontrastmittel
VDA	Vascular Disrupting Agents
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VPF	Vascular Permeability Factor
WHO	World Health Organisation

1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

Krebserkrankungen zählen neben Herz-Kreislauferkrankungen zu den häufigsten Todesursachen in den industrialisierten Ländern. Weltweit erkrankten 2008 12,7 Millionen Menschen an Krebs und 7,6 Millionen starben daran (Ferlay 2010). Am häufigsten verbreitet sind Lungen- (1,61 Millionen Neuerkrankungen jährlich), Brust- (1,38 Millionen Neuerkrankungen jährlich) und Darmkrebs (1,23 Millionen Neuerkrankungen jährlich). Die WHO prognostiziert bis zum Jahre 2030 einen Anstieg der Krebsdiagnosen weltweit auf 21,4 Millionen jährlich. In Deutschland erkranken jedes Jahr über 420.000 Menschen an Krebs, fast die Hälfte der Erkrankten stirbt daran (RKI Deutschland 2006).

Mit der Entwicklung von bildgebenden Verfahren wie der Computertomographie, der Magnetresonanztomographie, der Endoskopie und dem Ultraschall ist es inzwischen möglich, solide Tumore früher als bisher zu entdecken. In der Klinik werden diese Verfahren mittlerweile routinemäßig für Diagnosestellung und Therapieverlaufskontrolle eingesetzt. Für einige Tumorerkrankungen werden bildgebende Verfahren sogar im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen angewandt. Dazu gehören beispielsweise die Mammographie zur Früherkennung von Brustkrebs und die Darmspiegelung zur frühen Diagnose von Darmkrebs. Limitierend bei diesen Untersuchungen ist jedoch die Empfindlichkeit der eingesetzten Geräte, die eine Erkennung von soliden Tumoren erst ab einer bestimmten Größe möglich macht (Schirner 2004).

Für den Erfolg einer Krebstherapie ist es jedoch von entscheidender Bedeutung, in welchem Stadium die Krebserkrankung diagnostiziert wird. Die Heilungschancen sind umso größer, je früher der Krebs erkannt wird. Zur Behandlung von Tumorerkrankungen wird routinemäßig auf die drei klassischen Säulen der Krebstherapie zurückgegriffen: Wenn möglich werden solide Tumore chirurgisch entfernt. Des Weiteren werden bei soliden aber auch nicht soliden Krebsarten häufig ionisierende Strahlen eingesetzt. Die dritte Säule ist die chemotherapeutische Behandlung der Erkrankung. Diese geht jedoch häufig mit starken Nebenwirkungen wie Schmerzen, Übelkeit und Erbrechen sowie generalisierter Alopezie einher.

Die hohen Erkrankungs- und Todesraten durch Krebs in Verbindung mit den derzeit begrenzten diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten machen Fortschritte in der onkologischen Forschung dringend nötig. Bei der Aufklärung von biologischen und molekularen Mechanismen der Entstehung, des Wachstums und der Metastasierung von Tumoren wurden in den letzten Jahrzehnten einige bemerkenswerte Erfolge erzielt. Die meisten dieser Mechanismen sind in einem Großteil der über 200 verschiedenen Tumorentitäten gleichermaßen zu finden (Folkman 2006). Zu einem Schlüsselereignis bei der Entwicklung eines malignen soliden Tumors gehört die Ausbildung eines Blutgefäßnetzes (Karamysheva 2008). Die Blutgefäße versorgen einerseits die entarteten proliferierenden Tumorzellen mit Nährstoffen und Sauerstoff und dienen andererseits einzelnen Tumorzellen als Pforte für deren Abschwemmung in andere Körperregionen und tragen damit entscheidend zur Ausbildung von Metastasen bei. Die Wissenschaft konnte mittlerweile zeigen, dass das Tumorwachstum von der Angiogenese abhängt und die Hemmung der Tumorangiogenese eine neue Therapiemöglichkeit bei soliden Krebserkrankungen bietet (Abdollahi und Folkman 2010). Mit Avastin® der Firma Roche ist seit 2005 der erste kommerzielle Angiogenese-Hemmer für die Behandlung von Tumoren beim Menschen verfügbar. Weitere Angiogenese-Hemmer werden bereits in verschiedenen klinischen Studien getestet und neue antiangiogene Substanzen mit einer besseren Effektivität und einem geringeren Nebenwirkungsspektrum werden weltweit in den onkologischen Laboratorien erforscht.

Obwohl die Bedeutung der antiangiogenen Krebstherapie mittlerweile unbestritten ist und aktuell viele präklinische und klinische Studien zur Wirksamkeit von neuen Angiogenese-Hemmern durchgeführt werden, gibt es in der Forschung nur begrenzte Möglichkeiten, den antiangiogenen Effekt einer Substanz in vivo guantitativ nachzuweisen. Die häufigste präklinische Methode zur Bestimmung antiangiogener Tumortherapieeffekte im lebenden Tier besteht in der Vermessung der Tumorgröße über die Zeit. Damit lässt sich jedoch nicht klar unterscheiden, ob eine Substanz tatsächlich rein antiangiogen wirkt oder eher zytostatisch auf die Tumorzellen. Der Beweis einer antiangiogenen Wirkung wird häufig erst zu Versuchsende nach Tumorentnahme und histologischer Aufarbeitung durch die Quantifizierung der histologischen Blutgefäßdichte geführt. Erschwerend kommt hinzu, dass bei schnell wachsenden Tumoren Versuche mit tumortragenden Tieren aus tierschutzrechtlichen Gründen teilweise vor Versuchende abgebrochen werden müssen, wenn diese die durch die GV-SOLAS festgelegten maximalen Größen erreicht haben. Eine weitere Limitation besteht in der Verwendung von immundefizienten Mäusen bei den Tumor-Xenograft-Modellen, was eine Übertragung der präklinischen Ergebnisse in die Klinik erschwert.

Mit der Entwicklung von bildgebenden Verfahren für kleine Nager, die auch zur Quantifizierung des Blutflusses in Tumoren von Ratten und Mäusen geeignet sind, bieten sich neue Möglichkeiten zur Bestimmung antiangiogener Tumortherapieeffekte im lebenden Tier. Für die Quantifizierung der Blutgefäßversorgung von Tumoren bieten sich hierfür hauptsächlich die Computertomographie, die Magnetresonanztomographie und der Ultraschall an (Schirner et al. 2004). Da es sich hierbei um nicht invasive Verfahren handelt, können diese mehrfach im selben Tier über längere Versuchszeiträume durchgeführt werden und ermöglichen somit einen direkten Wirksamkeitsnachweis des antiangiogenen Effektes neuer Substanzen in vivo. Zur Vermeidung vorzeitiger Versuchsabbrüche durch

2

Überschreitung der zulässigen Größe wachsender Tumoren im Verlauf eines Experiments und zur Reduzierung der Belastung der Versuchstiere bieten sich für den in vivo Wirksamkeitsnachweis neuer antiangiogener Substanzen so genannte Angiogenese-Surrogatmodelle an. Diese bestehen in der Regel aus bioverträglichen Polymerimplantaten aus denen Gefäßwachstumsfaktoren freigesetzt werden und somit eine Einsprossung von Blutgefäßen in das Polymerimplantat induzieren. Aufgrund der Bioverträglichkeit solcher Polymere können diese auch in immunkompetente Nager implantiert werden.

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Etablierung und Charakterisierung eines Tumorsurrogat-Angiogenese-Modells (TSAM) für den Routine-Einsatz zur in vivo Testung antiangiogen wirkender Substanzen in der präklinischen Onkologie. Dabei liegt das besondere Interesse in der sensitiven Quantifizierung der Angiogenese durch kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall.

Die zugrunde liegenden Fragestellungen sind:

- 1. Ist es grundsätzlich möglich, die Blutgefäßversorgung im TSAM mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall in vivo quantitativ zu bestimmen und inwieweit korrelieren die sonographisch ermittelten Messergebnisse mit der histologisch guantifizierten Blutgefäßprofildichte?
- 2. Lässt sich mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall auch das Blutgefäßwachstum über einen längeren Zeitraum im TSAM longitudinal in vivo quantitativ erfassen?
- 3. Ist diese Methode auch auf immunkompetente Tiere übertragbar?
- 4. Ist das TSAM in Kombination mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall in der onkologischen Forschung auch für den routinemäßigen Einsatz zur in vivo Testung der Wirksamkeit antiangiogener Substanzen geeignet?

Für die Beantwortung dieser Fragen werden nach kurzer in vitro Charakterisierung der Alginatbeads vier aufeinander aufbauende tierexperimentelle Studien durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente sollen die Grundlage für die zukünftige Nutzung des TSAM als in vivo Modell für die pharmakologische Charakterisierung neuer antiangiogener Substanzen darstellen.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Angiogenese und Anti-Angiogenese

Die Bezeichnung Angiogenese kommt aus dem Griechischen und bedeutet "Gefäßentstehung" (Dornblühth 2002). Es werden drei voneinander getrennte Arten der Gefäßentstehung unterschieden: Die Angiogenese selbst im engeren Sinne, die Vaskulogenese und die Arteriogenese (Schirmer et al. 2009b).

Der Begriff Anti-Angiogenese bedeutet "gegen die Gefäßneubildung gerichtet" (Dornblühth 2002). Obwohl auch physiologischerweise antiangiogene Prozesse im adulten Organismus ablaufen, werden unter diesem Begriff heute Therapiekonzepte zusammengefasst, die die Gefäßentstehung in erkrankten Geweben blockieren sollen (Folkman 2006).

2.1.1 Morphologischer Aufbau von Blutkapillaren

Blutgefäße versorgen Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen und sind unabdingbar für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts im Körper (Homöostase). Sie werden anhand ihrer Morphologie und Funktion in Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen und Venen eingeteilt. Arterien, Arteriolen, Venen und Venolen bestehen aus drei Hauptschichten: Der Tunica interna, der Tunica media und der Tunica externa. Kapillaren dagegen bestehen bei einem mittleren Durchmesser von 7–9µm aus einer einschichtigen Endothelzellwand zur Bildung des Kapillarlumens, einer ihr außen anliegenden Basalmembran und den sie umgebenden Perizyten (Liebich 1999).

Endothelzellen kleiden das Blutgefäßsystem mit einer Gesamtoberfläche von 4.000– 7.000m² vollständig aus (Augustin et al. 1994). Dies entspricht einer Gesamtmasse von ca. 1,0kg Endothelzellen, die somit ein riesiges Organ mit vielfältigen Funktionen wie z.B. dem Austausch von immunologischen Informationen zwischen verschiedenen Organen darstellen (Simionescu 2000). Das Endothel bildet die Barriere zwischen Blut und Gewebe und reguliert den kapillären Stoffaustausch zwischen beiden Kompartimenten. Es wird in drei verschiedene Typen eingeteilt: a) kontinuierlich, b) fenestriert und c) diskontinuierlich. Von a) nach c) nimmt die Durchlässigkeit des Endothels zu (Liebich 1999).

Die **Basalmembran** wird als spezialisierte Form der extrazellulären Matrix betrachtet, der die Endothelzellen basolateral aufsitzen. Ihre Bestandteile (Kollagen Typ IV, Glykoproteine und Glykosaminoglykane) werden von Endothelzellen, Perizyten und Fibroblasten gebildet und ihre wesentlichen Funktionen bestehen in der Endothelzell-Adhäsion, der Ultrafiltration von Molekülen sowie der Kapillar-Elastizität zur Bewältigung des hydrostatischen Druckes des Blutflusses (Bahramsoltani 2003).

Perizyten sind flache Stützzellen, die der Basalmembran von außen aufliegen und sie mit ihren feinen, fingerartigen Fortsätzen durchdringen. Sie stellen wichtige Bestandteile der

Kapillarwand dar, da sie mechanische, metabolische und signalgebende Aufgaben wahrnehmen. Perizyten und Endothelzellen beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Mitoserate und somit bei der Neubildung von Blutgefäßen (Bahramsoltani 2003).

2.1.2 Arten der Gefäßneubildung

Die **Vaskulogenese** bezeichnet die Neubildung von Blutgefäßen aus zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen (Angioblasten). Sie bilden während der embryonalen Entwicklung ein primäres Blutgefäßnetz in Form von Blutinseln aus (Risau und Flamme 1995). Die Vaskulogenese ist im adulten Organismus nur bei wenigen Ausnahmen zu finden, wie z.B. bei soliden Tumoren, kardio- oder zerebrovaskulären Erkrankungen (Jung und Roh 2008).

Bei der **Arteriogenese** hingegen handelt es sich um die Ausbildung von Ersatzblutgefäßen. Aus bereits bestehenden kleinen Arteriolen mit geringem Blutfluss entwickeln sich nach einem aufgetretenen Blutgefäßverschluss Kollateralgefäße, die die Versorgung des betroffenen Gewebes wieder sichern. Die Arteriogenese spielt vor allem auf dem Gebiet der Herz-Kreislauferkrankungen wie z.B. beim Herzinfarkt eine Rolle, bei Krebserkrankungen ist sie kaum zu finden (Schirmer et al. 2009a).

Unter **Angiogenese** wird das Wachstum von neuen Blutgefäßen aus bereits existierenden verstanden (Kerbel 2008). Sie kann als Intussuszeption (Einstülpung) ablaufen, bei der neue Blutgefäße durch Teilung vorhandener weitlumiger Blutgefäße entstehen (Bahramsoltani 2003). Die häufiger auftretende Kapillarsprossung hingegen wird folgendermaßen beschrieben (The Angiogenesis Foundation 2009):

Proangiogene Faktoren werden unter bestimmten Voraussetzungen (Punkt 2.1.3) von Körperzellen produziert und ins umgebende Gewebe freigesetzt, wo sie weiter diffundieren und an für sie spezifische Rezeptoren von Endothelzellen nahe gelegener Blutgefäße binden. Dadurch aktivieren sie die endotheliale Signalkaskade, infolge der die Endothelzellen Enzyme produzieren und freisetzen, die die Basalmembran lokal auflösen. Durch die entstehenden Löcher in der Basalmembran proliferieren und migrieren die aktivierten Endothelzellen aus ihrem Zellverband. Die Richtung der Kapillarsprossung wird dabei chemotaktisch durch den Diffusionsgradienten der freigesetzten Wachstumsfaktoren bestimmt. Adhäsionsmoleküle (Integrine) fungieren währenddessen als Enterhaken und sorgen für das Vorwärts-Sprossen der neuen Kapillaren. Gleichzeitig werden Matrixmetalloproteasen produziert, die das Gewebe vor der Spitze des sprossenden Blutgefäßes lösen und es in seine Umgebung einbetten. Die Endothelzellen der neu wachsenden Kapillare bilden nach und nach durch Abflachung und Abrunden ihres Zellkörpers ein Lumen. Einzelne Blutgefäßröhrchen aus unterschiedlichen Richtungen verbinden sich nachfolgend und bilden ein neues Blutgefäßnetz, in dem das Blut für den

Stoffaustausch zirkulieren kann. Zum Schluss werden die neuen Blutkapillaren durch Anlagerung von Perizyten stabilisiert.

2.1.3 Regulation der Angiogenese

Bildung und Wachstum neuer Blutgefäße unterliegen einer strikten Regulation, bei der pround antiangiogene Stimuli als Gegenspieler wirken. Proangiogene Faktoren werden nur unter streng definierten Bedingungen aktiviert. Eine Störung des ausgewogenen Systems kann entweder zu exzessiver Bildung von Blutgefäßen oder zu einer unzureichenden Entwicklung des Gefäßbettes führen, wodurch ernsthafte Erkrankungen entstehen können (Bahramsoltani 2003).

2.1.3.1 Proangiogene Faktoren

Risau (1996) definiert die wichtigsten Merkmale eines echten proangiogenen Faktors:

- Er muss dort präsent sein, wo Angiogenese auftritt, darf aber nicht im normalen adulten Gewebe vorhanden sein, es sei denn ein Hemmstoff für diesen Faktor ist gleichzeitig nachzuweisen,
- er muss zu den Endothelzellen diffundieren können, dort an spezifische Rezeptoren binden und sie aktivieren, wobei hohe Konzentrationen des Faktors zu vermehrter Bildung neuer Blutgefäße führen und außerdem
- muss eine Neutralisation des Faktors durch nat
 ürliche oder synthetische Hemmstoffe die Angiogenese verhindern.

Als positive Angiogenese-Regulatoren sind mittlerweile viele Moleküle bekannt. Zu den 20 anerkannten proangiogenen Faktoren gehören neben dem *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und dem *Fibroblast Growth Factor* (FGF) unter anderem die *Transforming Growth Factors* (TGF) α und β , Angiopoietine (Ang), Interleukine (IL), der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) α und die *Platelet-derived Growth Factors* (PDGF, Kerbel 2008).

Der **Vascular Endothelial Growth Factor** ist das Schlüsselprotein der Angiogenese-Induktion und die durch ihn induzierte Signalkaskade in Endothelzellen wird als kritisches Ereignis zum Start einer Blutgefäßneubildung betrachtet (Karamysheva 2008). Bei VEGF handelt es sich um eine Familie von sieben strukturell ähnlichen dimeren Glykoproteinen zwischen 34–42 kDa namens VEGF-A, -B, -C, -D, -E und *Placenta Growth Factor* 1 und 2. Üblicherweise bezieht sich die allgemeine Bezeichnung VEGF auf den Faktor VEGF-A. Von VEGF-A gibt es vier Isoformen, die durch alternatives Splicing entstehen. Sie werden entsprechend ihrer Aminosäureanzahl als VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉ oder VEGF-A₂₀₆ bezeichnet. Die häufigste Form ist VEGF-A₁₆₅. Aus Gründen der Übersicht wird nachfolgend VEGF als abkürzendes Synonym für VEGF-A₁₆₅ verwendet. Die verschiedenen VEGF-Subtypen sind spezifische Liganden für drei strukturell ähnliche Rezeptor-

Literaturübersicht

Tyrosinkinasen (VEGF-Rezeptor-1, -2 und -3) mit unterschiedlichen Affinitäten. Die Bindung eines VEGF-Liganden an seinen endothelialen Rezeptor setzt die intrazelluläre Signalkaskade in Gang, die zur Endothelzell-Migration und -Proliferation führt und die Apoptose von Blutgefäßzellen hemmt (Karamysheva 2008).

Viele humane Tumorarten exprimieren VEGF. Zwischen 1996 und 1999 wurde von verschiedenen Gruppen eine erhöhte VEGF-Expression in klinischen Lungen- (Volm et al. 1999), Nieren- (Yanagisawa et al. 2001) und Brustkarzinomen (Yoshiji 2005), in Adenokarzinomen der Bauchspeicheldrüse (Ellis et al. 2002), in Tumoren des Magen-Darm-Traktes (Takahashi et al. 1998) und in Ovarialtumoren (Sowter et al. 1997) nachgewiesen. Alle Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass mit steigender Malignität der Tumore auch deren VEGF-Expression erhöht war. Es konnten klare Korrelationen zwischen der Überlebenszeit der krebskranken Patienten und der Höhe der VEGF-Expression ihres Tumors gezeigt werden. Heute ist bekannt, dass von den über 200 verschiedenen Krebsarten etwa 60% VEGF überexprimieren. VEGF und seine endothelialen Rezeptoren sind deshalb bedeutende Zielstrukturen für die antiangiogene Tumor-Therapie (Folkman 2006). VEGF wird in dieser Arbeit als proangiogener Faktor zur Induktion der Angiogenese im Tumorsurrogat-Angiogenese-Modell (TSAM) eingesetzt.

Der zweite proangiogene Faktor zur Angiogenese-Stimulation im TSAM ist der *Fibroblast Growth Factor* (FGF). Es gibt 23 strukturell ähnliche FGFs (Wilkie et al. 2002). Die wichtigsten Vertreter sind FGF-1 und FGF-2, beides einkettige Polypeptide von 16 bis 22kDa (Gospodarowicz 1989). Wie bei VEGF ist ihre Funktion an extrazelluläre Rezeptoren gebunden. Die 7 FGF-Rezeptoren (FGFR) sind Rezeptor-Tyrosinkinasen, die nach Bindung des Liganden dimerisieren und danach autophosphorylliert werden, wodurch die intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt wird. FGF bindet wie VEGF Heparin, weshalb er früher auch als *heparin binding growth factor* bezeichnet wurde. FGF wird unter anderem bei Hypoxien, wie sie z.B. in soliden Tumoren zu finden sind, hochreguliert und konnte bereits in fast allen Geweben nachgewiesen werden. Dazu gehören Ovarien, Hoden und Prostata, Plazenta, Leber, Muskel, Nieren und Nebennieren, Augen, Gehirn und sogar Knorpelgewebe sowie viele Tumorentitäten (Gospodarowicz 1989). FGF stimuliert die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothel- und glatten Muskelzellen sowie von Fibroblasten und ist deshalb neben VEGF als Zielstruktur bei der Entwicklung antiangiogenen Tumortherapien bedeutsam (Folkman 1996).

2.1.3.2 Antiangiogene Faktoren

Antiangiogene Faktoren sind Substanzen, die entweder direkt eine angiogene Reaktion von Endothelzellen hemmen oder indirekt die Hemmung bestimmter angiogener Substanzen bewirken. Sie sind essentiell für eine streng kontrollierte Blutgefäßausbildung (Folkman und

Ingber 1992). Brem und Mitarbeiter (1975) fanden im Knorpelgewebe des Schulterblattes neugeborener Mäuse einen Angiogenese-hemmenden Faktor und zeigten, dass die zuvor durch Tumormaterial induzierte Blutgefäßbildung in der Hornhaut des Auges von Kaninchen durch Einbringen dieses Knorpelmaterials wieder rückgängig gemacht werden konnte. Sie wussten aber zunächst nicht, was für ein Faktor diese Reaktion hervorrief (siehe März 2008). Zunächst wurde das antiangiogene Potential von IFN alpha durch Dvorak und Gresser (1989) entdeckt. Die Kollegen testeten die antiangiogene Wirkung eines humanen IFN in einem syngenen Mausmodell, das gegen murines IFN resistent war. Das humane IFN reduzierte das Wachstum der subkutanen Erythroleukämie-Tumoren signifikant und die etablierten vaskularisierten Tumore entwickelten Nekrosen infolge des Verlustes der Blutversorgung. Da die Tumorzellen nicht auf das mauseigene IFN ansprechen konnten, schlossen Dvorak und Gresser, dass das extern zugeführte IFN antiangiogen wirkte und dadurch das Tumorwachstum hemmte. Zu den heute bekannten antiangiogenen Faktoren zählen unter anderem Angiostatin, Antithrombin III, Cartilage-derived inhibitor, Endostatin, Fibronektin, Interleukine, Metalloproteinase-Inhibitoren, Prolactin, Thrombospondin-1, Transforming Growth Factor und Vasostatin (The Angiogenesis Foundation 2009).

2.1.3.3 Der Angiogene Switch

Der gesunde erwachsene Organismus benötigt nur selten eine aktive Blutgefäßneubildung. Die Blutgefäße befinden sich in einem funktionstüchtigen Zustand mit intakter Blutzirkulation, aber im Normalfall ohne Blutgefäßwachstum. Pro- und antiangiogene Faktoren wirken im Organismus im Zusammenspiel, um im Bedarfsfall (z.B. bei der Wundheilung) eine geordnete Blutgefäßneubildung zu induzieren und später wieder zu stoppen. Unter bestimmten Voraussetzungen kommt es dabei zu einem so genannten "Umschalten" des Ruhezustandes in einen Zustand aktiver Blutgefäßneubildung. Dieses Ereignis wird als *"angiogenic switch"* ("angiogener Schalter") bezeichnet (Folkman 1996). Hanahan und Weinberg (1996) beschrieben diesen Prozess basierend auf einem pro- und antiangiogene Faktoren im Gewebe im Gleichgewicht, wodurch keine Angiogenese stattfindet. Sobald durch einen proangiogenen Stimulus wie beispielsweise die VEGF-Freisetzung durch Tumorzellen die proangiogenen Faktoren überwiegen, kippt dieses Gleichgewicht zugunsten der Angiogenese um und es kommt zur Blutgefäßneubildung.

2.1.4 Formen der Angiogenese

Nach der Geburt gibt es in Verbindung mit Gewebewachstum und Organentwicklung verschiedene Situationen, in denen eine Blutgefäßneubildung auftritt, meist bleiben Blutgefäße im adulten Organismus aber unverändert (Carmeliet 2003). Endothelzellen

behalten dennoch Zeit ihres Lebens die Fähigkeit zur schnellen Zellteilung als Antwort auf proangiogene Stimuli.

2.1.4.1 Physiologische Angiogenese

Das Auftreten einer physiologischen Angiogenese ist sehr limitiert. Sie kommt nur bei der Gelbkörperbildung im Eierstock, der Entwicklung der Milchdrüse sowie in Verbindung mit Muskel- oder Fettaufbau vor (Plendl 2003). Im weiblichen Reproduktionstrakt ist die Angiogenese im Rahmen des Sexualzyklus ein essentieller Prozess. Neu gebildete Blutgefäße im Eierstock ermöglichen einerseits eine ausreichende Versorgung wachsender Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen und andererseits die Verbreitung von Sexualhormonen von ihrem Entstehungsort zu den Zielzellen. Besonders VEGF hat entscheidenden Einfluss der ovariellen Angiogenese: Eine verringerte VEGF-Expression verursacht bei beispielsweise die verzögerte unzureichende Entwicklung und Reifung ovarieller Tertiärfollikel. Vor allem die vaskuläre Permeabilitätserhöhung durch VEGF ist maßgeblich für die Ovulation. Nach der Ovulation wachsen neue Blutgefäße zwischen Theka- und Granulosa-Zellschicht und sind an der Ausbildung des Gelbkörpers beteiligt. Außerdem kann die Angiogenese bei Regenerations- und Wundheilungsvorgängen ebenfalls als physiologisch bzw. genau genommen als pathophysiologisch betrachtet werden, da sie zeitlich begrenzt und selbstregulierend ist (Aktivierung und Inaktivierung sind durch endogene Vorgänge streng geregelt, Plendl 2003).

2.1.4.2 Pathologische Angiogenese

Bei der pathologischen Angiogenese wird das Gleichgewicht zwischen Angiogenese-Stimulatoren und -Inhibitoren stark gestört. Die Gefäßbildung ist infolgedessen auf quantitativer Ebene fehlgesteuert oder es kommt zur Ausbildung funktionell unzureichender Gefäße (Plendl 2003). Pathologische Angiogenese kann auf zwei gegensätzliche Arten zur Entstehung bzw. Progression von Erkrankungen beitragen: entweder durch eine überschießende Blutgefäßbildung (exzessive Angiogenese) oder eine unzureichende Angiogenese mit Fehl- oder Rückbildung von Blutgefäßen bzw. Fehlfunktionen der Endothelzellen (insuffiziente Angiogenese). Eine gestörte Angiogenese wird derzeit mit mehr als 70 Funktionsstörungen in Verbindung gebracht (Carmeliet 2003).

Bei der *insuffizienten Angiogenese* entstehen nicht genügend neue Blutgefäße oder sie sind schlecht ausdifferenziert und deshalb nicht funktionstüchtig. Infolge dessen kommt es zur Unterversorgung betreffender Organe oder Gewebe, was z.B. zu Wundheilungsstörungen führen kann. Diese sind unter anderem eine häufige Begleiterscheinung bei Diabetes mellitus und führen nicht selten zur Amputation der betroffenen Gliedmaße (Lange-Asschenfeldt 2009). Weitere Erkrankungen, die in Verbindung mit gestörter Blutgefäßbildung auftreten, sind beispielsweise Alzheimer, diabetische Neuropathie, amyotrophische laterale Sklerose, Atherosklerose, Restenosis, Nephropathien und Osteoporose (Carmeliet 2003).

Bei der **exzessiven Angiogenese** kommt es zu einer pathologisch überschießenden Blutgefäßbildung. Diese tritt z.B. bei Krebs, bei entzündlichen Erkrankungen, Obesitas, Asthma, Diabetes, Multiple Sklerose und Endometriose bzw. bei Infektionen (AIDS) oder Autoimmunerkrankungen, diabetischer Blindheit, altersbedingter Makuladegeneration, rheumatoider Arthritis oder Psoriasis auf (Carmeliet 2003). Neu wachsende Blutgefäße versorgen dabei die erkrankten Gewebe, zerstören gesundes Gewebe oder erlauben bei Krebs die Abschwemmung von Tumorzellen in entfernte Organe. Ursache der exzessiven Angiogenese ist in der Regel die Überproduktion proangiogener Faktoren durch betroffene Zellen. Die große Menge proangiogener Faktoren hebt den Einfluss der antiangiogenen Faktoren vollständig auf (Carmeliet 2003).

2.1.4.3 Angiogenese bei malignen Tumoren

Tumorangiogenese Die Tumorentstehung ist ein multifaktorielles Geschehen. Die Bedeutung der Angiogenese für die Tumorentwicklung wurde von Hanahan und Weinberg (2000) in deren richtungsweisenden Publikation *"Hallmarks of Cancer"* dargestellt. Die Wissenschaftler definierten zunächst 6 kritische Merkmale für die Krebsentstehung. Diese beinhalten:

- 1. Die Selbstversorgung der entarteten Zellen mit Wachstumssignalen gepaart mit
- 2. der Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen und
- 3. der Überwindung von Apoptose-induzierenden Signalen sowie
- 4. dem unbegrenzten Replikationspotential dieser Zellen. Außerdem zählten sie
- 5. die Fähigkeit zur Gewebeinfiltration und Metastasierung sowie
- 6. die andauernde Angiogenese ebenfalls dazu.

Kürzlich erweiterten Hanahan und Weinberg (2011) ihre Liste um weitere zwei Merkmale: Zum einen die Fähigkeit von Tumorzellen zur eigenständigen Umprogrammierung ihres Stoffwechsels mit dem Ziel einer optimalen Unterstützung der neoplastischen Proliferation und zum anderen die Eigenschaft der Tumorzellen, sich optimal vor der Zerstörung durch das wirtseigene Immunsystem zu schützen.

Eine sich entwickelnde Neoplasie wird zu Beginn zunächst durch Nähr- und Sauerstoff-Diffusion aus den nahe liegenden Blutgefäßen versorgt. Erreicht die Tumormasse die kritische Größe von 2-3mm werden die im Zentrum der Neoplasie liegenden Tumorzellen nicht mehr ausreichend versorgt und das Tumorwachstum wird gebremst (= *tumor dormany*, der "schlafende Tumor", Folkman 1971). Während dieser Ruhephase herrscht ein Wachstumsstillstand und der solide Tumor bleibt in einem scheinbar schlafenden Zustand, der Monate bis Jahre andauern kann. Wird der Tumor größer als 2-3mm Durchmesser, kommt es im Zentrum zu hypoxischen Bereichen. Die Hypoxie löst durch komplexe Signalwege die Freisetzung von proangiogenen Faktoren (besonders VEGF) aus und die Blutgefäßneubildung in Richtung der unterversorgten Tumorzellen wird eingeleitet. Das Umschalten von einem nicht durchbluteten mitotisch wenig aktiven Zellverband in einen wachsenden malignen Tumor mit aktiv proliferierenden und migrierenden Endothelzellen geschieht in Folge des angiogenen *Switches*, bei dem sich das Verhältnis zwischen pro- und antiangiogenen zugunsten der proangiogenen Faktoren ändert.

Morphologie und Funktion des Tumorgefäßsystems Die Erneuerung von Endothelzellen benötigt in gesunden ausdifferenzierten Geweben Jahre (Hanahan und Folkman 1996). Sollte eine temporäre Angiogenese beispielsweise aufgrund von Verletzungen nötig werden, wird die Angiogenese kurzfristig über die vermehrte Produktion proangiogener Faktoren aktiviert. Die neuen Blutgefäße reifen sehr schnell, sind innerhalb kürzester Zeit stabil und die Angiogenese wird wieder deaktiviert (Dvorak 2002). Im Gegensatz dazu bezeichnen Bergers und Benjamin (2003) solide Tumore als "Wunden, die niemals heilen", weil das Gleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren zugunsten der proangiogenen aufgehoben ist. Durch das anhaltende proangiogene Mikromillieu befinden sich die tumoralen Blutgefäße in ständigem Wachstum und Umbau, sind unfähig zu Reifung und Stabilisierung und unterscheiden sich infolgedessen stark vom normalen Blutgefäßsystem. Bergers und Benjamin beschreiben die Morphologie tumoraler Blutgefäße als irregulär und gewunden, stets dilatiert und oft blind im Gewebe endend. Außerdem sind sie nicht in Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen und Venen organisiert, sondern haben Merkmale aller Typen in chaotischer Art und Weise. Zusätzlich sind die Gefäße undicht und verursachen Hämorrhagien. Perivaskuläre Zellen stehen nur locker mit dem Endothel in Kontakt und einzelne Tumorzellen sind sogar selbst Bestandteil der Gefäßwände. Dies begünstigt ihre Abschwemmung in entfernte Organe. Durch die morphologischen Abnormitäten sind viele Tumor-Blutgefäße kaum funktionstüchtig. Das Blut fließt unregelmäßig, teilweise sehr langsam und kann sogar lokal hin- und herpendeln. Es kommt trotz aktiver Angiogenese nicht zu einer ausreichenden Versorgung des wachsenden Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff. Auch die schnelle Vermehrung der Tumorzellen selbst vergrößert den Abstand zwischen ihnen und den Blutgefäßen und somit den Nährstoff-Diffusionsradius, so dass keine ausreichende Versorgung der Tumorzellen mehr möglich ist. Die anhaltende Hypoxie begünstigt fortwährend die Freisetzung proangiogener Faktoren und viele Tumore weisen deshalb eine Überproduktion des kapillaren Netzwerkes in ihrer Peripherie auf (Bergers und Benjamin 2003). Molekulare Untersuchungen der tumoralen Endothelzellen zeigten eine Hochregulation vieler Moleküle, die an der erhöhten Permeabilität, Proliferation, Migration und Anti-Apoptose beteiligt sind (Furuya et al. 2005) wie z.B. VEGFR-2 oder CD105. Ein weiteres Merkmal des tumoralen Gefäßnetzes wird als

vaskuläres Mimikry bezeichnet. Hierbei übernehmen Tumorzellen die Funktion von Endothelzellen und exprimieren endotheliale Rezeptoren (Furuya et al. 2005). Vaskuläres Mimikry tritt vor allem bei hochmalignen Tumortypen wie aggressiven Melanomen, Eierstocks,- Brust- oder Prostatakrebs auf. Der genaue Mechanismus ist allerdings noch nicht aufgeklärt. Hendrix und Kollegen (2003) gehen davon aus, dass unter bestimmten Voraussetzungen manche Tumorzellen dedifferenzieren und sich zu pluripotenten Zellen verändern bzw. sich direkt in einen Endothelzell-ähnlichen Phänotyp transformieren können.

2.2 Angiogenese in der onkologischen Forschung

2.2.1 Historischer Überblick

Die Anfänge in der Tumorangiogenese-Forschung machten Thiersch und Virchow, als sie 1865 feststellten, dass manche solide Tumore stark durchblutet waren und vermuteten, dass Blutgefäße eine wichtige pathogenetische Rolle bei Krebserkrankungen spielten (siehe März 2008). Die Beteiligung von Endothelzellen an der Tumorvaskularisierung wurde zu Beginn des 20. Jahrhunderts von Metschnikow entdeckt, der auch die Bösartigkeit von Tumoren mit einer erhöhten Gefäßdichte in direkte Verbindung brachte (siehe März 2008). Die ersten in vivo Bilder einer Tumor-Gefäßneubildung wurden 1939 von Ide und Mitarbeiter veröffentlicht, die im Kaninchen-Ohrkammermodell Zellen eines Epithelioms transplantierten und die Bildung von neuen Blutgefäßen sowie das Wachstum des Tumors beobachteten. Die Arbeitsgruppe stellte aufgrund ihrer Beobachtungen die Hypothese auf, dass Tumorzellen Wachstumsfaktoren freisetzten, die die Gefäßneubildung förderten (siehe März 2008). Basierend darauf guantifizierten Algire und Kollegen 1945 erstmals wachsende Blutgefäße in der transparenten Ohrkammer des Kaninchens, indem sie diese täglich unter dem Lichtmikroskop zählten und mit dem Tumorwachstum verglichen. Sie stellten fest, dass der Tumor erst weiter wuchs, nachdem genügend Blutgefäße zur Versorgung der Tumorzellen vorhanden waren und schlussfolgerten daraus, dass Tumorzellen in der Lage seien, das Wachstum von Blutgefäßen zu fördern. Basierend auf diesen und anderen Veröffentlichungen sowie vor allem auf Ergebnissen von Experimenten im eigenen Labor kam Judah Folkman zu seiner These, dass Tumorwachstum von der Blutgefäßneubildung abhängig sein müsse und begründete damit die moderne Angiogenese-Forschung (siehe März 2008). Folkmann stellte mehrere grundlegende Konzepte zum Zusammenhang von Tumoren und Angiogenese auf (Folkman 1971):

- 1. Tumore können nicht größer als 1-2mm³ werden, ohne Blutgefäße zu rekrutieren,
- Tumore brauchen Blutgefäße zur Nährstoffversorgung und produzieren deshalb selbst Stoffe, die ins umliegende Gewebe diffundieren und das Wachstum neuer Blutgefäße zum Tumor hin stimulieren (z.B. den Tumor-Angiogenese-Faktor TAF),
- 3. ein Antikörper gegen TAF wäre ein wirksames Krebsmedikament.

Bereits 1968 wurden erste Experimente mit dem Ziel durchgeführt, die Freisetzung von angiogenen Faktoren durch Tumorzellen nachzuweisen. Greenblatt & Shubick zeigten, dass Tumore auch dann noch Angiogenese induzierten, wenn Tumor und Wirt durch eine diffusionsfähige Membran getrennt waren (siehe März 2008). Gimbrone und Kollegen (1974) entwickelten das Kornea-Modell im Kaninchen, bei dem sie ins Hornhaut-Stroma des Auges lebender Kaninchen 0,5mm³ kleine Tumorfragmente (2mm vom Limbus entfernt) implantierten und das Einwachsen von Blutkapillaren vom Limbus ins Hornhautstroma hin zum Tumorstück beobachteten. Tumorstücke, die sich weiter als 3mm vom Rand der Hornhaut entfernt befanden, induzierten keine Angiogenese. Dies untermauerte die These von diffusionsfähigen proangiogenen Faktoren. Auf diesen Ergebnissen aufbauend implantierten Langer und Mitarbeiter (1976) anstelle von echtem Tumormaterial selbst entwickelte Polymerpellets ins Hornhautstroma von Kaninchen. Die Mikrokanälchen der Pellets waren gefüllt mit Tumorextrakten, die wie die Tumorfragmente selbst eine Neovaskularisation induzierten. Darüber hinaus zeigten Langer und Mitarbeiter eine vollständigen Rückbildung der Gefäße infolge der Entfernung der Pellets aus den Hornhauttaschen. Die Kollegen hielten deshalb ein durch Tumorextrakte induziertes Gefäßsystem nicht für dauerhaft und fest etabliert und sahen hierin die Chance für künftige Angiogenese-Hemmer. Den ersten proangiogenen Faktor spezifisch für Endothelzellen entdeckten Ferrara und Henzel (1989). Die Kollegen wiesen die Endothelzell-Spezifität dieses Faktors nach, indem sie stromale Zellen und Endothelzellen hinsichtlich ihrer Mitoserate nach Exposition mit dem Wachstumsfaktor verglichen und feststellten, dass das untersuchte Protein mitogen auf Endothelzellen, aber nicht auf stromale Zellen wirkte. Deshalb nannten sie diesen Faktor VEGF. Darauf aufbauend zeigten Kim und Kollegen (1993), dass die Hemmung von VEGF in vivo zu einem reduzierten Wachstum von Tumoren führte, als sie einen monoklonalen Antikörper gegen VEGF an verschiedenen malignen Maus-Xenograft-Modellen testeten. Außerdem war die Blutgefäßdichte in den behandelten im Vergleich zu den unbehandelten Tumoren signifikant geringer. Der Gruppe gelang es mit dieser Arbeit, VEGF als Zielstruktur für die therapeutische Tumor-Antiangiogenese zu identifizieren.

2.2.2 Angiogenese-Modelle

Zur Erforschung der Angiogenese ist in den letzten 40 Jahren ein breites Spektrum an Modellen entwickelt worden, die die Grundlage für die Aufklärung der physiologischen und pathologischen Vorgänge während der Angiogenese bilden. Mit Hilfe von quantitativen Ansätzen ist es möglich, pro- oder antiangiogene Effekte von Substanzen nachzuweisen. Hierbei besteht die größte Herausforderung in der korrekten Interpretation der Ergebnisse, da mit den zur Verfügung stehenden Modellen verschiedene Schritte der Angiogenese untersucht werden können. Grob werden Angiogenese-Modelle zunächst in in vitro und in vivo Modelle eingeteilt. "In vitro" bedeutet "im Reagenzglas" und meint Untersuchungen in Modellen außerhalb von lebenden Gesamtorganismen (z.B. Untersuchungen in Zellkulturen). Im Gegensatz dazu fasst "in vivo" alle Modelle innerhalb lebender Gesamtorganismen zusammen.

2.2.2.1 In vitro Modelle

Mit in vitro Modellen können auf zellulärer und subzellulärer Ebene zunächst Grundlagen der Wirkung einzelner pro- oder antiangiogener Variablen untersucht werden (Goodwin 2007). Sie sind vergleichsweise einfach durchzuführen und ihre Auswertung benötigt wenig technischen Aufwand. Untersuchungen können in einem hohen Durchsatz erfolgen, wodurch schnell Wirkungen pro- oder antiangiogener Substanzen identifiziert werden können. Außerdem ermöglichen virale Transfektionen von in vitro kultivierten Endothelzellen die Erforschung von grundlegenden genetischen Hintergründe pathologischer Angiogenese als Basis für die Identifizierung neuer therapeutischer Zielstrukturen (Staton et al. 2009).

In *Proliferationsassays* wird selektiv die zahlenmäßige Vermehrung von Endothelzellen untersucht. Dafür werden kultivierte Endothelzellen aus der humanen Nabelvene benutzt (Staton 2006). Als Standardtest zur Erforschung von Effekten antiproliferativer Substanzen wird z.B. der MTT-Assay routinemäßig eingesetzt (Goodwin 2007). Hier wird die Fähigkeit lebender Zellen zur Spaltung von Tetrazoliumsalz genutzt. Es entstehen unlösliche blaue Formazan-Kristalle, die sich in vitalen Zellen anreichern und photometrisch quantifiziert werden können (Goodwin 2007). Z.B. zeigten Lang und Kollegen (2001) mit dem MTT-Assay, dass VEGF unter verschiedensten Zellkulturbedingungen (verschiedene Konzentrationen, Inkubationszeiten und Zelldichten) effektiv die Proliferation von Endothelzellen stimulierte, während FGF-2 nur bei niedriger Endothelzelldichte einen proliferativen Effekt hatte.

Zu den *Migrationsassays* gehört beispielsweise der Transfilter-Assay (Staton et al. 2009). Sein Prinzip beruht auf der Boyden-Kammer, die aus zwei übereinander liegenden Kammern besteht, welche durch einen Polycarbonat-Filter mit ca. 8µm großen Poren getrennt sind. Die Poren des Filters sind so klein, dass nur aktiv migrierende Endothelzellen sie passieren können (Bahramsoltani 2003). So untersuchten Iwahana und Mitarbeiter (1996) mit dieser Methode den Einfluss eines durch murine Fibrosarkomzellen in vitro konditionierten Mediums auf die Migration von Endothelzellen. Sie brachten die Zellen auf der Filteroberseite auf, beluden die untere Kammer mit dem S180-konditionierten Medium und inkubierten die Zellen 5 Stunden bei 37°C. Danach entfernten sie die auf der Filteroberseite verbliebenen Endothelzellen, fixierten den Filter mit Methanol und färbten die migrierten Zellen mit Giemsa-Lösung an. Bei 100facher Vergrößerung wurden die Zellen dann mikroskopisch quantifiziert. Aus ihren Ergebnissen schlossen sie, dass die Migration der Endothelzellen aufgrund des chemotaktischen Gradienten zwischen den beiden Kammern stimuliert wurde. Nachteile der in vitro Testung antiangiogener Substanzen liegen in den artifiziellen Bedingungen der Modelle (Staton 2006). Die in Zellkultur gehaltenen Endothelzellen sind, anders als Endothelien in vivo, permanent in einem proliferativen Phänotyp und haben darüber hinaus ihre Organspezifität verloren, indem sie andere Zelloberflächenantigene exprimieren (Aird 2003). Auch die Ausbildung von einschichtigen endothelialen Monokulturen entspricht nicht der in vivo Situation, wo Endothelzellen ein dreidimensionales tubuläres System ausbilden und von Perizyten umgeben sind. Um die Wirksamkeit antiangiogener Substanzen in diesem komplexen System nachzuweisen, müssen sie nach wie vor in vivo getestet werden (Staton et al. 2009).

2.2.2.2 In vivo Modelle

Zu den in vivo Modellen für die Erforschung der Angiogenese gehören beispielhaft das Cornea-Modell, das Chorioallantoismembran-Modell, Dauerfenster-Modelle, das subkutane Luftsackmodell sowie Modelle mit Hautpräparationen (Bahramsoltani 2003). In der vorliegenden Arbeit werden die Angiogenese und die Wirkung antiangiogener Substanzen in einem Tumorsurrogat-Angiogenese-Modell untersucht, das auf einem subkutan liegenden Polymer-Implantat basiert. Deshalb wird nachfolgend ein Überblick über Polymer-Implantat-Modelle zur Erforschung der Mechanismen der Tumorangiogenese und der Testung von Angiogenese hemmenden Substanzen gegeben.

Schwamm-Implantat-Modelle: Andrade und Kollegen (1987) entwickelten für die quantitative Untersuchung der Angiogenese in vivo ein Ratten-Modell, welches auf der subkutanen Implantation steriler Polyesterschwämme basierte. Diese waren von außen durch eine Kanüle zugänglich, in die Substanzen ins Innere appliziert werden konnten. Die Perfusion der Implantate wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durch guantitative Messung der Clearance des Radioisotopes ¹³³Xe bestimmt. Ursprünglich enthielt der Schwamm keine Blutgefäße, aber infolge der zunehmenden Vaskularisierung über einen Zeitraum von 16 Tagen stieg die Perfusion in den Implantaten nach und nach an. Die histologische Untersuchung der Implantate zeigte, dass sie zunächst durch Granulationsgewebe verkapselt und zunehmend durch wirtseigene Blutgefäße infiltriert wurden. Durch Einbringen des Vasodilatators Prostaglandin E2 in den Schwamm erhöhte sich die Perfusion der Schwämme, während sie nach Injektion des Vasokonstriktors Noradrenalin abnahm. Die Behandlung mit proangiogenen Faktoren förderte die Angiogenese in den Schwämmen. während der Angiogenese-Hemmer Protamin sie verzögerte. Thiede und Kollegen (1988) modifizierten dass Modell, indem sie T-Zell-supprimierten Nacktmäusen Polyurethan-Schwämme subkutan implantierten und warteten deren Vaskularisierung abwarteten. 7 bis 10 Tage später injizierten sie Tumorzellen in die mittlerweile gefäßreichen Schwämme, weil sie ein besseres Tumorwachstum durch das angiogene Mikromillieu erwarteten. Tatsächlich

konnten sie die Angangsraten der Tumore mit 78-94% Erhöhung gegenüber herkömmlich inokulierten Zellen signifikant erhöhen.

In verschiedenen Übersichtsarbeiten werden jedoch auch klare Bedenken zu den Schwamm-Implantat-Modellen geäußert. So sieht Norrby (2006) die nicht einheitliche Zusammensetzung von Polyurethan-Schwämmen als Erschwernis für interexperimentelle Vergleiche, da sie abhängig von ihren Bestandteilen unterschiedlich stark immunogen und somit auch angiogen wirken können. Staton (2006) sieht in den häufig auftretenden unspezifischen Entzündungsreaktionen ebenfalls Einschränkungen in der Nutzbarkeit der Modelle, da die mit einer Entzündung einhergehende Angiogenese die Interpretation von Ergebnissen aus Angiogenese spezifischen Untersuchungen deutlich beeinflusst.

Mit der Entwicklung des Matrigel-Modells traten die Schwamm-Implantat-Modelle in den Hintergrund. Matrigel®, vertrieben durch die Biotechnologie-Firma BD Biosciences, ist im Gegensatz zu den synthetischen Schwämmen ein natürliches Produkt der Maussarkomzelllinie Engelbreth-Holm-Swarm. Es besteht aus verschiedenen Proteinen, unter anderem Komponenten der Basalmembran von Endothelien sowie verschiedenen Wachstumsfaktoren und ähnelt damit der Extrazellularmatrix vieler Gewebe. Während es bei Temperaturen von 4-6°C flüssig ist, bilden seine Komponenten bei Körpertemperatur sehr schnell eine feste gelartige Struktur aus. Passaniti und Kollegen (1992) benutzten Matrigel erstmals für Untersuchungen zur Wirkung verschiedener proangiogener Faktoren auf die Vaskularisierung subkutaner Implantate in vivo. Dafür injizierten sie immunkompetenten C57BL/6-Mäusen mit proangiogenen Faktoren (FGF, VEGF, TNF α u.a.) angereichertes Matrigel und entnahmen die Implantate zu unterschiedlichen Zeitpunkten wieder, um deren Vaskularisierungsgrad histologisch mit immunhistochemischer CD31-Färbung und anschließender mikroskopischer Auszählung der positiv markierten Blutgefäße guantitativ zu bestimmen. Zwischen 3 und 5 Tage post injectionem waren die Implantate am stärksten vaskularisiert. Passaniti und Kollegen testeten in ihrem Modell außerdem auch die antiangiogenen Faktoren Interleukin-1 β , Interleukin-6, TGF- β , die alle zu einer reduzierten Neovaskularisation führten. Verschiedene antiangiogene Substanzen wurden in einem modifizierten Matrigel-Modell in Ratten durch Kragh und Kollegen erfolgreich getestet (2003). Dafür wurden den immunkompetenten Tieren Filterkammern bestehend aus Nylonüberspannten Plexiglasringen und gefüllt mit FGF-angereichertem Matrigel subkutan implantiert. Die Quantifizierung der Angiogenese in den Kammern erfolgte einmal durch ein computergesteuertes Scoring-System anhand von digitalen Bildern, die 5 und 10 Tage nach Implantation aufgenommen wurden, außerdem wurden zu diesen Zeitpunkten photometrische Dichtemessungen der Kammern durchgeführt. Die histologische Auswertung nach CD31-Färbung erfolgte durch mikroskopische Auszählung der gewachsenen Blutgefäße. Kragh und Kollegen wiesen zunächst eine signifikante Angiogenese in den

16

Kammern nach. Danach zeigten sie, dass die systemische Behandlung der Ratten mit dem antiangiogenen Fumagillin-Analogon TNP-470 zu einer vollständigen Hemmung der FGFinduzierten Angiogenese führte. Gleiches beobachteten sie auch bei der Behandlung mit Zyklophosphamid. Im Gegensatz dazu zeigten die entzündungshemmenden und immunsuppressiven Substanzen Zyklosporin A, Prednisolon und Indomethazin keine antiangiogene Wirkung. Kragh et al. schlussfolgerten daraus, dass die Angiogenese in den Kammern nicht durch eine unspezifische Entzündungsreaktion des Wirtes hervorgerufen wurde.

Plunkett und Hailey (1990) beschrieben in ihrer Arbeit erstmals das Alginatmodell. Alginate sind Salze der Alginsäure, einem Polymer bestehend aus den beiden Uronsäuren Guluronund Mannuronsäure. Alginsäure wird als natürlicher Stoff aus Meeresalgen gewonnen und als Geliermittel in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Plunkett und Hailey benutzten Alginat, um Tumorzellen schonend darin zu verkapseln und sie so vor dem Immunsystem der Wirtstiere zu schützen. Die zu kleinen Kugeln geformten Alginate ließen die von den Tumorzellen produzierten angiogenen Faktoren ins Wirtsgewebe diffundieren, wodurch eine angiogene Reaktion ausgelöst wurde. Die Alginatbeads (AlgBs) enthielten murine Lewis-Lung-Karzinomzellen und wurden subkutan in immunkompetente C57BI/6- und balb/c- sowie in immundefiziente Nacktmäusen injiziert. Schon 100 Tumorzellen konnten nach 3 Tagen eine makroskopisch sichtbare Vaskularisierung der AlgB-Depots induzieren. Mit steigender Anzahl verkapselter Tumorzellen stieg auch die angiogene Reaktion im umliegenden Gewebe an. Auch bei der anschließenden histologischen Untersuchung wurden mehr Blutgefäße in den AlgB-Depots mit höheren Zellzahlen gezählt. Die einfache Durchführung des Modells wiesen die Autoren explizit als Vorteil aus und empfahlen es als Modell für die zukünftige Erforschung der durch Tumorzellen induzierten Angiogenese. Robertson und Kollegen (1991) testeten daraufhin die Substanzen Protaminsulfat und Tetrahydrocortison im Alginatmodell. Sie verkapselten Lewis-Lung-Karzinomzellen und injizierten die AlgBs subkutan in balb/c-Mäuse. Die Quantifizierung der einwachsenden Blutgefäße erfolgte an Tag 5 und Tag 11 durch die Bestimmung von ⁵¹Cr-markierten Maus-Erythrozyten in den AlgB-Depots mittels Gamma-Counter 1 Stunde nach deren intravenösen Injektion. Abhängig von der verkapselten Zellzahl war die Angiogenese der mit Protaminsulfat behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe zu Tag 10 zwischen 82% (3x10⁵ Tumorzellen) und 91% (3x10⁴ Tumorzellen) reduziert. Tetrahydrocortison reduzierte die Angiogenese zu 40 bis 55%. Hoffmann und Kollegen (1997) modifizierten das Alginatmodell von Robertson et al. hinsichtlich der Quantifizierung der Blutgefäße in vivo. Sie verkapselten murine Lewis-Lung-Karzinomzellen (LL2), die humanen Nierenzelllinien Caki-1 und Caki-2, murine Melanomzellen sowie Sarkomzellen der Maus in AlgBs und injizierten diese subkutan in C57Bl/6-und Swiss-Mäuse. 20 Minuten vor Versuchsende injizierten sie FITC-Dextran

17

intravenös als streng intravasales Fluoreszenzkontrastmittel, das über die Blutbahn in die Gefäße des AlgB-Depots gelangte. Der Gehalt an FITC-Dextran in den AlgB-Depots wurde ex vivo bestimmt. Dafür wurden die AlgB-Depot in isotone Kochsalzlösung überführt und die Fluoreszenz der Lösung nach gründlicher Durchmischung bei 506nm quantifiziert. 12 Tage nach AlgB-Depotsetzung wurde eine signifikante Erhöhung der FITC-Dextran-Konzentration abhängig von der Zellzahl in den AlgB-Depots gemessen (Faktor 3,5 bei 1x10³ LL2-Zellen, Faktor 4,5 bei 1x10⁴ LL2-Zellen). Des Weiteren zeigten Hoffmann und Mitarbeiter, dass eine Behandlung der Tiere mit dem experimentellen Fumagillin-Derivat AGM-1470 der Firma Berlex Biosciences (USA) zur effektiven Angiogenese-Hemmung führte, denn der FITC-Dextran-Gehalt in den behandelten AlgB-Depots entsprach dem leerer Kontrolldepots.

Die hier beschriebenen Untersuchungen zur Quantifizierung der Angiogenese im Alginatmodell basieren auf ex vivo Verfahren. Für die systematische pharmakologische Bewertung neuer antiangiogener Substanzen müssten bei Einsatz der oben beschriebenen Alginatmodelle und der ex vivo Quantifizierung der Gefäßausbildung verschiedene Versuchsgruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten getötet werden. Durch den Einsatz von bildgebenden Verfahren zur Quantifizierung der Perfusion in den AlgB-Depots ließen sich bereits antiangiogene Therapieeffekte während des laufenden Therapieversuchs im lebenden Tier mehrfach über längere Zeiträume darstellen. Neben einem früheren Aussagegewinn erlaubt die in vivo Quantifizierung auch eine Reduktion der Versuchsgruppen, da Therapieeffekte innerhalb einer Gruppe über die Zeit verfolgt werden können. Deshalb soll in der vorliegenden Arbeit der kontrastverstärkte Mikro-Ultraschall auf seine Eignung zur Quantifizierung der Gefäßausbildung im TSAM getestet werden. Des Weiteren soll als TSAM ein tumorzellfreies Modell etabliert und charakterisiert werden um Effekte neuer antiangiogener Substanzen ausschließlich auf das Gefäßsystem bestimmen zu können.

2.3 Therapeutische Ansätze bei Krebs

Die konventionelle Behandlung von Krebs basiert auf drei großen Säulen:

- 1. Der chirurgischen Entfernung solider Tumore,
- 2. der Behandlung solider Tumore mit ionisierenden Strahlen und
- 3. der chemotherapeutischen Behandlung fortgeschrittener Krebserkrankungen.

Häufig werden die Therapieformen kombiniert, um die Wahrscheinlichkeit eines Therapieerfolges zu erhöhen. Das Behandlungsregime wird dabei individuell auf die Krebserkrankung selbst, deren Stadium sowie auf die allgemeine Verfassung des Krebspatienten abgestimmt (DeVita 2008).

2.3.1 Chirurgische Entfernung solider Tumore

Die chirurgische Entfernung von soliden Tumoren ist die älteste und war bis vor wenigen Jahrzehnten die einzige kurative Therapieform bei Krebs (DeVita 2008). Mit der Entwicklung der modernen Anästhesie und Antisepsis ab Mitte des 19. Jahrhunderts gelangen die ersten erfolgreichen operativen Entfernungen von soliden Tumoren des Magen-Darm-Traktes, der Schilddrüse und der Brustdrüse. Die Tumorresektion als Therapieform wird in der Regel aus den folgenden Gründen gewählt (DeVita 2008):

- 1. Kurative Therapie eines klar abgrenzbaren soliden Primärtumors (oft in Kombination mit systemischer Chemotherapie oder Bestrahlung),
- palliative Maßnahme bei infiltrativ wachsenden, soliden Tumoren, die nicht im Ganzen entfernbar sind,
- 3. kurative Therapie bei einzelnen soliden, gut abgrenzbaren Metastasen,
- 4. operative Maßnahmen infolge einer onkologischen Notfallsituation.

Schätzungen der amerikanischen Nationwide Inpatient Sample 2000 und der National Survey of Ambulatory Surgery 1996 zufolge wird die Anzahl operativer Eingriffe bei Krebspatienten bis 2020 um 24% steigen (Etzioni 2006). Fortschritte in der Durchführung laparoskopischer Eingriffe begünstigen diese Entwicklung. Sie spielen vor allem bei abdominalen soliden Tumoren wie Magen-, Leber- oder Bauchspeicheldrüsenkrebs eine zunehmende Rolle (DeVita 2008).

2.3.2 Behandlung solider Tumore mit ionisierenden Strahlen

Über 50% der Krebspatienten erhalten im Verlauf ihrer Krankheit eine Strahlentherapie (Delaney et al. 2005). Die Landesärztekammer Rheinland-Pfalz definiert den Begriff Strahlentherapie als "Strahlenbehandlung maligner und benigner Erkrankungen einschließlich der medikamentösen und physikalischen Verfahren zur Radiosensibilisierung und Verstärkung der Strahlenwirkung am Tumor unter Berücksichtigung von Schutzmaßnahmen der gesunden Gewebe" (2006). Ionisierende Strahlen werden dabei zur Behandlung von soliden oder nicht soliden Krebserkrankungen eingesetzt, wenn die Krebszellen ausreichend strahlenempfindlich sind und bei gleicher Heilungschance im Vergleich zur chirurgischen Therapie ein besseres funktionelles Ergebnis erwartet werden kann (DeVita 2008). Die Strahlen gelangen in Form von Photonen (Röntgen-, Gammastrahlen) oder Partikeln (Protonen, Neutronen, Elektronen) zu den Zellen. Die Interaktion der Strahlen mit den Zellen wird als Ionisierung bezeichnet. Dabei werden Elektronen aus einzelnen Atomen entfernt, wodurch eine positive Ladung des betroffenen Moleküls erzeugt wird. Hochenergetische Partikel ionisieren die DNA von Zellen direkt an den Nukleotiden, während niederenergetische Photonen indirekt über die Erzeugung freier Radikale mit der DNA interagieren (Hall 2006). DNA-Defekte werden auf Ebene der

einzelnen Nukleotide erzeugt und es kommt zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen, DNA-DNA- sowie DNA-Protein-Verlinkungen, die wiederum zum Tod der Zellen führen (Hall 2006). Wegen ihres hohen Zellstoffwechsels sind Tumorzellen in der Regel besonders anfällig für ionisierende Strahlen und erholen sich nicht so schnell wie gesunde Zellen (Beers 2006). Ein Tumor gilt als strahlenempfindlich, wenn er ohne schwerwiegende Schäden im gesunden Gewebe vernichtet werden kann. Je höher die Strahlenempfindlichkeit des Tumorgewebes ist, desto geringer kann die Bestrahlungsdosis ausfallen und desto geringer ist der Schaden für das umliegende gesunde Gewebe (DeVita 2008). Die Strahlentherapie wird in zwei Varianten unterteilt, die interne und externe Form. Bei der internen Bestrahlung gelangt die Strahlung durch ionisierte Implantate oder Flüssigkeiten in den Körper. Bei der externen Bestrahlung kommen Geräte zum Einsatz, die hochenergetische Strahlen in Form von Photonen (z.B. Röntgen- oder Gammastrahlen) abgeben. Alleinige Strahlentherapie mit dem Ziel der Heilung der Krebserkrankung wird ausschließlich bei soliden, gut abgegrenzten Tumoren eingesetzt, wenn eine chirurgische Entfernung aufgrund der Tumorlokalisation zu Funktionsverlusten führen würde. Dies ist beispielsweise bei Tumoren des Kehlkopfes oder der Prostata der Fall. Die Erfolgsrate der Strahlentherapie bei Frühstadien solcher Tumorentitäten liegt bei 70-90% (DeVita 2008).

2.3.3 Chemotherapeutische Behandlung fortgeschrittener Krebserkrankungen

Ursprünglich beinhaltete der Begriff Chemotherapie die medikamentöse Behandlung von Infektionskrankheiten (Dornblühth 2002). Der Einsatz von Medikamenten mit dem Ziel der Behandlung von Krebs begann in den 1960er Jahren mit der Entwicklung von Therapien gegen verschiedene Leukämien und Lymphome (DeVita 2008).

Die Chemotherapie wird bei vier Hauptindikationen eingesetzt:

- Als Primärbehandlung bei fortgeschrittenen Krebserkrankungen wie beispielsweise bei akuten Leukämien, bei Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen, bei Eierstockskrebs oder dem kleinzelligen Lungenkrebs (Lowe et al. 1994),
- als primäre oder neoadjuvante Therapie solider Tumore, wenn lokale Therapien wie Resektion oder Strahlung nicht effektiv genug sind (z.B. Weichteilsarkome, Tumore der Anogenitalregion, osteogene Sarkome, Harnblasenkrebs, Salmon 1987),
- als adjuvante Therapie gleichzeitig oder nach lokaler Behandlung z.B. bei Melanomen, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Brustkrebs oder Tumoren des Magendarmtraktes sowie
- 4. als lokale Therapie (z.B. Instillation von Medikamenten, DeVita 2008).

Das ideale Chemotherapeutikum sollte ausschließlich auf Tumorzellen abzielen und diese effektiv zerstören (Beers 2006). Diesen Anspruch erfüllt kaum ein Krebsmedikament. Nebenwirkungen sind oft stark und beinhalten Schleimhautulzerationen, Erbrechen und

Durchfall, Nasenbluten sowie Knochenmarksdepression, Immunsuppression, oder Autoimmunerkrankungen. Meist werden die Medikamente intravenös oder per os verabreicht. Im Verlauf der Behandlung kann es zu Resistenzen kommen, die z.B. auf der Überexprimierung der therapeutischen Zielstruktur, auf metabolischer Inaktivierung des Wirkstoffes durch die Tumorzellen, defekten Apoptosemechanismen oder Rezeptorverlusten beruhen (Beers 2006).

2.3.3.1 Klassische Chemotherapeutika

Antimetabolite wirken in der S- und der G₁-Phase des Zellzyklus und hemmen Enzyme der Nukleinsäuresynthese (Burgis 2000). Sie werden in 3 unterschiedliche Gruppen eingeteilt: Folsäure-Antagonisten, Purin-Antagonisten und Pyrimidin-Antagonisten. Das Folsäure-Analogon Methotrexat hemmt die Dihydrofolsäurereduktase (DHFR) kompetitiv und greift dadurch in die Synthese von DNA, RNA, ATP ein. Außerdem leitet Methotrexat auch Apoptose-Prozesse ein. Es wird seit über 30 Jahren bei vielen Krebserkrankungen in Kombination mit weiteren Chemotherapeutika eingesetzt, z.B. bei akuter lymphatischer Urothelkarzinomen, Brustkrebs, Non-Hodgkin-Lymphomen Leukämie, und bei Osteosarkomen (Kaye 1998). Zu den Purin-Antagonisten gehören 6-Mercaptopurin, Thioguanin und Azathioprin. Sie sind dem Purin strukturell sehr ähnlich und werden mit Ribose und Phosphat zu falschen Nukleotiden aufgebaut. Diese stören im Verlauf des Zellzyklus dann die korrekte DNA- und RNA-Synthese (Burgis 2000). Häufig bei Leukämien und Lymphomen eingesetzt, führen Purin-Antagonsiten zu Myelo- und Immunsuppression (Beers 2006). Unter den Pyrimidin-Antagonisten ist das 5-Fluorouracil (5-FU) das bekannteste Chemotherapeutikum. Es hemmt kompetitiv die Thymidilatsynthetase. In die DNA werden wie bei den Purin-Antagonisten falsche Nukleotide eingebaut, die die DNA-Synthese behindern (Burgis 2000). 5-FU wird vor allem bei tumorösen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes und bei Brustkrebs eingesetzt (Beers 2006).

Spindel-Toxine sind zytostatisch wirkende Naturstoffe, die in 2 Gruppen eingeteilt werden: Taxane (Inhaltsstoffe der Eibenrinde) und Vinca-Alkaloide (Inhaltsstoffe der Pflanze Immergrün). Der wichtigste Vertreter der Taxane ist Paclitaxel (Burgis 2000). Es hemmt die Ausbildung des Spindelapparates während der Mitose und wird bei Blasenkrebs, Eierstocksund Brustkrebs sowie bei Lungenkrebs eingesetzt. Paclitaxel ist außerdem wirksam bei Cisplatin-resistenten Karzinomen (Beers 2006). Vertreter der Vinca-Alkaloide sind Vinblastin, Vincristin, Vindesin und Vinorelbin. Sie hemmen die Mikrotubulinbildung des Spindelapparates während der Zellteilung. Vincristin wirkt bei akuter Leukämie und Lymphosarkomen, beim Brust- und Bronchialkarzinom sowie beim malignen Melanom und Neuroblastom (Beers 2006; Burgis 2000). *Alkylanzien* sind Verbindungen, die Alkylreste (Methyl, Ethyl) in andere Moleküle einbauen (Alkylierung). Durch eine kovalente Bindung werden Proteine, DNA und RNA geschädigt und es kommt zu falscher Basenpaarung, DNA-Vernetzungen und Chromosomenstrangbrüchen (Burgis 2000). Alkylanzien wirken zwar phasenunspezifisch, sind aber besonders effektiv während der Mitose der Zelle. Bei Brustkrebs, Leukämien, Gliomen, Lymphomen und Myelomen werden sie oft in Kombination mit anderen Präparaten wie z.B. Cyclophosphamid und Ifosfamid eingesetzt (Beers 2006).

Zu den *Platinhaltigen Chemotherapeutika* gehören Cis-, Carbo- und Oxaliplatin. Sie verbinden die Einzelstränge der DNA miteinander, so dass Replikation und Transkription gestört werden. Eingesetzt werden Platin-Komplexe unter anderem bei Brustkrebs, Lungenkrebs, Eierstockskrebs und Darmkrebs (Beers 2006).

Topoisomerase-Hemmer Topoisomerasen sind Enzyme, die die kompakte DNA-Struktur aufbrechen und so das Ablesen dieser während Transkription und Replikation ermöglichen. Es werden 2 Formen von Topoisomerasen unterschieden: Typ I und Typ II. Camptothecine (Irinotecan, Topotecan) hemmen die Topoisomerase I. Sie werden vorwiegend bei Krebserkrankungen des Magen-Darm-Traktes eingesetzt. Etoposid und Teniposid wirken hemmend auf die Topoisomerase II und verursachen DNA-Strang-Brüche. Sie werden bei Lymphomen, Bronchialkarzinomen und Hodentumoren eingesetzt (Beers 2006; Reuter 2008).

Ursprünglich als *Antibiotika* eingesetzt, werden Daunorubicin, Doxorubicin, Mitomycin und Bleomycin heute ausschließlich als Chemotherapeutika genutzt. Ihr zytostatisches Wirkprinzip beruht auf DNA-Interkalation. Diese verursacht DNA-Strangbrüche, wodurch die DNA für Replikation und Transkription nicht mehr nutzbar ist. Antibiotika werden in Kombination mit Cisplatin bei Leukämien, Brust- und Magen-Darmkrebs, Hodenkrebs und Lymphomen eingesetzt (Beers 2006).

Hormone Zur Behandlung von hormonsensiblen Tumoren werden Gonadotropin-Releasing-Hormone, Glucocorticoide, Östrogene, Antiöstrogene und Antiandrogene verwendet. Zu Tumoren mit Hormonrezeptoren gehören Mamma-, Prostata- und Endometriumkarzinome. Die Hemmung der Rezeptoren reduziert das Tumorwachstum (Burgis 2000).

2.3.3.2 Angiogenese-Hemmer

Der endgültige Beweis der Wirksamkeit eines antiangiogenen Therapeutikums bei Krebs wurde mit der Zulassung von Bevacizumab erbracht, nachdem in einer klinischen Studie der Phase III ein signifikanter Überlebensvorteil festgestellt wurde (Hurwitz et al. 2004). Den ersten Erfolg einer antiangiogenen Tumortherapie konnte der amerikanische Arzt White 1989 verbuchen, als er nach Rücksprache mit Folkman einen 12jährigen an pulmonaler Hämangiomatose erkrankten Jungen mit IFN α behandelte (März 2009). Folkman präsentierte 2007 auf einem US-amerikanischen Kongress Lungen-Angiogramme des nun

erwachsenen Mannes, die die anhaltende Rückbildung der Hämangiome unter IFNα-Dauertherapie zeigten (Folkman 2007b).

Folkman (2007a) teilt die antiangiogenen Therapeutika entsprechend ihrem Blockierungspotential in drei Gruppen ein:

- 1. Blockierung eines wesentlichen Proteins in der Angiogenese-Kaskade (z.B. durch Bevacizumab, Ranibizumab),
- 2. Blockierung von zwei bis drei solcher Proteine (z.B. durch Imatinib, Sorafenib, Regorafenib) und
- 3. Blockierung eines breiten Spektrums verschiedener Angiogenese-Regulatoren (z.B. durch Endostatin, Caplostatin).

Substanzen der Klassen 2 und 3 können dabei als Haupt-Wirkkomponente eine direkte Hemmung von Tumorzellen haben und als Begleiteffekt auch hemmend auf die Tumor-Angiogenese wirken (Folkman 2007a).

Im Rahmen der Testung des Tumorsurrogat-Angiogenese-Modells in einem antiangiogenen Therapieversuch wurden in dieser Arbeit Bevacizumab als Vertreter der Gruppe 1 und Regorafenib als Vertreter der Gruppe 2 eingesetzt.

Zur Gruppe 1 der Angiogenese-Hemmer gehört Bevacizumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen die 4 Isoformen des humanen VEGF-A. Bevacizumab bindet kovalent an den proangiogenen Faktor VEGF-A und verhindert durch diese Blockade, dass VEGF-A an seine auf den Endothelzellen exprimierten Rezeptoren binden kann. Infolgedessen werden die Rezeptoren nicht aktiviert und es erfolgt keine Signaltransduktion ins Innere der Endothelzellen. Migration und Proliferation der Zellen bleiben aus und sie verbleiben in der Ruhephase. Der solide Tumor kann nicht genügend Blutgefäße rekrutieren (Presta et al. 1997). Der ersten Phase I Studie im Rahmen der klinische Entwicklung von Bevacizumab durch Genentech begann 1997 (März 2009). Sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Standard-Chemotherapeutika war Bevacizumab gut verträglich (Gordon et al. 2001). In der Folge begannen die ersten Phase II Studien mit Bevacizumab als Monotherapie und in Kombination mit Chemotherapeutika zur Behandlung verschiedener Tumorentitäten. Eine viel versprechende Wirksamkeit von Bevacizumab in Kombination mit 5-Fluorouracil/Leucovorin stellten Kabbinavar und Kollegen (2003) in ihrer Studie fest. Sie teilten 104 unbehandelte Patienten mit metastasierenden Kolonkarzinom zufällig in 3 Behandlungsgruppen ein: Gruppe 1 wurde mit der Standardtherapie 5-Fluorouracil/Leukovorin behandelt, Gruppe 2 zusätzlich zur Standardtherapie mit einer niedrigen Dosis von Bevacizumab und Gruppe 3 bekam die Standardtherapie plus eine hohe Dosis Bevacizumab. Verglichen zur Kontrollgruppe mit 17% war die Antwortrate in beiden Bevacizumab-Gruppen mit 40% (niedrige Dosis) und 24% (hohe Dosis) signifikant höher.

Auch die Überlebenszeit war mit 21,5 Monaten (niedrige Dosis Bevacizumab) bzw. 16,1 Monaten (hohe Dosis Bevacizumab) gegenüber der Kontrollgruppe mit 5,2 Monaten signifikant verlängert. In einer weiteren klinischen Studie zeigten Yang und Kollegen (2003) die Wirksamkeit von Bevacizumab als Monotherapie zur Behandlung von metastasierendem Nierenkrebs. Sie teilten 116 Patienten in Placebogruppe (1), niedrig dosierte Bevacizumab-Gruppe (2) und hoch dosierte Bevacizumab-Gruppe (3) ein und stellten eine signifikante Verlängerung der Zeit bis zur Progression fest, wobei die Wahrscheinlichkeit einer 4monatigen Progressionsfreiheit in Gruppe 3 mit 64% am höchsten war, gefolgt von Gruppe 2 mit 39% und Gruppe 1 mit 20%. In der klinischen Studie von Hurwitz und Kollegen (2004) wurde Bevacizumab in Kombination mit Irinotecan und 5-Fluorouracil/Leukovorin zur Behandlung des metastasierenden kolorektalen Karzinoms getestet. In dieser Studie wurden 402 Patienten mit einer Kombinationstherapie aus Irinotecan, 5-Fluorouracil, Leukovorin und Bevacizumab behandelt (Gruppe 1) und 411 Patienten mit der kombinierten Chemotherapie ohne Bevacizumab-Zusatz. In Gruppe 1 war die Antwortrate mit 44,8% signifikant höher als in Gruppe 2 (34,8%). Die Überlebenszeit betrug in erster 20,3 Monate gegenüber 15,6 Monaten in letzter. Durch die überzeugenden Ergebnisse der klinischen Studien wurde Bevacizumab noch 2004 im Fast-Track-Verfahren¹ durch die FDA unter dem Handelsnamen Avastin® als First-Line-Therpie zur Behandlung des metastasierenden kolorektalen Karzinoms in Kombination mit einer intravenösen Chemotherapie auf der Basis von 5-Fluorouracil zugelassen. Es war damit das erste zugelassene Medikament für eine antiangiogenen Behandlung bei Krebserkrankungen (März 2009). Die Wirksamkeit von Bevacizumab konnte bei der Behandlung von Brustkrebs in Kombination mit Paclitaxel sowie bei der Behandlung von Lungenkrebs in Kombination mit Carboplatin und Paclitaxel ebenfalls nachgewiesen werden (Johnson et al. 2004; Miller et al. 2007; Miller et al. 2005; Sandler et al. 2006). 2007 folgte dann die Zulassung für die Behandlung des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms sowie des metastasierenden Brustkarzinoms.

Zur *Gruppe 2 der Angiogenese-Hemmer* zählt Folkman Inhibitoren der Rezeptortyrosin-Kinasen (RTKs) wie beispielsweise Imatinib, Sorafenib und Regorafenib (Folkman 2007a). RTKs sind Transmembranproteine in der Phospholipidzellmembran, die die Übermittlung von extrazellulären Signalen (wie beispielsweise proangiogene Faktoren) ins Zellinnere vermitteln. Es existieren viele verschiedene RTKs, die alle spezifische Liganden haben. Abhängig davon, welche spezielle RTK durch spezifische Ligandenbindung aktiviert wird, werden Apoptose, Zellproliferation und -migration oder auch die Zelldifferenzierung eingeleitet. Auch Endothelzellen exprimieren verschiedene RTKs (z.B. spezifische Rezeptoren für VEGF, PDGF und FGF). Deshalb spielen sie auch bei der Angiogenese eine

¹ Beschleunigte Zulassung neuer Medikamente, die sich noch in der klinischen Prüfung befinden

Rolle und stellen eine Zielstruktur für die antiangiogene Krebstherapie dar (Cook und Figg 2010).

Der erste kommerziell erhältliche RTK-Hemmer war *Imatinib* (Cook und Figg 2010). Unter dem Handelnamen Glivec® in Europa zugelassen, wird Imatinib für die First-Line-Therapie der chronischen myelogenen Leukämie sowie bei gastrointestinalen stromalen Tumoren eingesetzt. Seine antiangiogene Aktivität entwickelt Imatinib über die Blockierung des PDGF-Rezeptors, ebenfalls eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase.

Ein weiterer *multi-target* RTK-Hemmer ist **Sorafenib** (BAY43-9006, Handelsname Nexavar®). Sorafenib ist oral verfügbar, wirkt hemmend auf VEGFR-2 und -3, PDGFR-β sowie c-kit (Cook und Figg 2010). Zusätzlich dazu hemmt Sorafenib auch den intrazellulären Ras-Raf/MEK/ERK-Signalweg. Die Erstzulassung durch die FDA 2005 galt für fortgeschrittenen Nierenkrebs, 2007 folgte Leberkrebs als zweite Indikation (Siegel et al. 2010). In dieser Arbeit wird die Entwicklungssubstanz *Regorafenib* (BAY73-4506) der Bayer Schering Pharma AG zur Untersuchung ihres antiangiogenen Potentials im TSAM eingesetzt. Als ein *multi-target* RTK-Hemmer zielt Regorafenib auf angiogene, stromale und onkogene RTKs ab (Eisen 2009). Ihre antiangiogene Wirkung erzielt die Substanz über die Hemmung des Angiopoietin-Rezeptors TIE-2 zusätzlich zur VEGFR-Hemmung (Cook und Figg 2010).

2.4 Monitoring antiangiogener Therapieeffekte in der Onkologie

Mit zunehmender Bedeutung der Angiogenese und Anti-Angiogenese in der Onkologie wächst der Bedarf an sensitiven Methoden zur Messung eines therapeutischen antiangiogenen Effektes in vivo (Schirner et al. 2004). Die Anatomie und Physiologie von Blutgefäßen kann mit Hilfe von bildgebenden Verfahren minimal invasiv untersucht werden. Die bildliche Darstellung von Blutgefäßen in soliden Tumoren rückt dabei in den Fokus der Onkologie.

2.4.1 Klinische Routinemethoden

Seit der Bevacizumab-Entwicklung werden mehr und mehr antiangiogen wirkende Therapeutika in klinischen Studien hinsichtlich ihrer anti-Tumor-Wirkung getestet (Ferrara et al. 2005). Tabelle 1 zeigt eine Auswahl der häufigsten Parameter, die derzeit zur Bewertung eines konventionellen und/oder antiangiogenen Therapieerfolges in klinischen Studien eingesetzt werden (Hsu und Wakelee 2009; Morabito et al. 2006; Ranieri et al. 2006). Klinische Studien, die die anti-Tumor-Wirkung antiangiogener Therapien untersuchen, orientieren sich demnach an den Bewertungskriterien, wie sie bei konventionellen Chemotherapie-Studien verwendet werden.

Parameter	Definition (modifiziert nach National Cancer Institute)
Stable Disease (SD)	Krebserkrankung, die sich in Ausmaß und Schweregrad weder verbessert noch verschlimmert.
Partial Response / Partial Remission (PR)	Verringerung der Tumorgröße bzw. des Ausmaßes des Krebses im Körper als Antwort auf eine Therapie.
Time To Disease Progression (TTP)	Die Messung der Zeit ab Diagnose und Ersttherapie einer Krebserkrankung bis zu ihrer Verschlechterung.
(Overall) Response Rate (O)RR	Der Prozentsatz von Patienten, deren Krebserkrankung nach Therapie zurückgeht oder ganz verschwindet.
Median Survival Time (MST)	Die Zeit von Diagnose und Ersttherapie bis zum Zeitpunkt, an dem die Hälfte der Patienten noch leben.
Complete Response / Complete Remission (CR)	Das Verschwinden aller Symptome der Krebserkrankung als Therapieantwort. Nicht gleichzusetzen mit einer Heilung des Krebses.
Progression-free Survival (PFS)	Die Zeitspanne während und nach Therapie, in der ein Patient mit einer stabilen Erkrankung lebt.
Overall Survival (OS)	Der Prozentsatz an Patienten in einer Behandlungsgruppe, die nach einer definierten Zeitspanne nach Diagnose und Ersttherapie einer Krebserkrankung noch am Leben sind. Oft als 5-Jahres-Überlebensrate angegeben (Prozentsatz der Patienten in einer Behandlungsgruppe, die 5 Jahre nach Diagnose und Ersttherapie noch am Leben sind).

 Tabelle 1: Parameter zur Bewertung eines Therapieerfolges bei Krebserkrankungen in klinischen Studien.

 Zusammenfassung aus Übersichtsarbeiten zu klinischen Studien antiangiogener Therapien verschiedener Tumorentitäten (Hsu und Wakelee 2009; Morabito et al. 2006; Ranieri et al. 2006).

So können Vorteile hinsichtlich Progression der Krebserkrankung oder Überleben der Patienten mit Daten zur Chemotherapie direkt verglichen werden. Jedoch geben die Parameter keine Auskunft darüber, ob durch die antiangiogene Therapie tatsächlich ein rein antiangiogener Effekt auftritt. Dafür werden zunehmend bildgebende Verfahren eingesetzt, die die Messung der Tumordurchblutung ermöglichen (Ellis und Hicklin 2008).

2.4.1.1 Bildgebenden Verfahren

Zu den klassischen bildgebenden Verfahren gehören das konventionelle Röntgen, die darauf basierende Computertomographie (CT), die Magnetresonanztomographie (MRT) und der Ultraschall (US). Neuere Verfahren wie die Positronenemissionstomographie (PET) und die Szintigraphie (*Single Photon Emission Tomography*, SPECT) werden mittlerweile immer häufiger zur klinischen Diagnostik und Therapieverlaufskontrolle eingesetzt.

Laking und Kollegen (2006) werteten klinische Studien von 1988 bis 2005 aus, in denen die bildgebenden Verfahren PET, MRT, CT und Doppler-US zur Überprüfung von Therapieerfolgen bei krebskranken Patienten eingesetzt wurden. Dabei betrachteten sie insgesamt 42 klinische Studien, in denen antiangiogene Therapien, konventionelle
Chemotherapien und/oder Strahlentherapie eingesetzt wurden. In 19 dieser Studien wurde die dynamische kontrastverstärkte Magnetresonanztomographie (DCE-MRT) für das Therapie-Monitoring eingesetzt. In 15 dieser Studien erwies sich das bildgebende Verfahren als prediktiv für den Erfolg der eingesetzten Therapie, vor allem bei kurzen Zeitintervallen zwischen Therapiebeginn und MRT-Untersuchung. Ursächlich dafür scheint die hohe Sensitivität der Methode für VEGF-Signalweg-getriebene Veränderungen in der Blutgefäßpermeabilität zu sein. In 4 Studien jedoch führten die MRT-Untersuchungen zu keiner Voraussagbarkeit des Therapieerfolges, einerseits wegen einer sehr geringen Patientenanzahl und andererseits wegen langen Zeitintervallen zwischen den Untersuchungen. In 14 Studien wurde PET als bildgebendes Verfahren benutzt, von denen 7 zu dem Ergebnis kamen, die Methode sei gut geeignet für ein Therapie-Monitoring. Dass CT sich dafür ebenso gut eignet, zeigten 4 von 5 Studien, in weiteren 5 wurde Doppler-US beispielsweise zur Bestimmung der Tumorperfusion benutzt. Laking und Kollegen kamen zu dem Schluss, dass keine der 42 Studien das jeweilige Verfahren endgültig als geeignet oder ungeeignet für das klinische Therapie-Monitoring erklären konnte, da entweder weniger als 10 Patienten untersucht, bei der statistischen Analyse multiple Vergleiche ohne Bonferroni-Korrektur durchgeführt oder die Ergebnisse nur qualitativ beschrieben worden waren. Dennoch halten sie die Messung von Perfusion oder anderen Parametern der Tumorvaskularisation mit Hilfe von bildgebenden Verfahren als sensitive Methoden zur frühen Überprüfung der Wirksamkeit der gewählten Therapieform.

2.4.1.2 Histologische Präparate

Die Routinediagnostik bei Krebserkrankungen erfolgt nach wie vor über die Entnahme von Tumorbioptaten für eine histologische Analyse zur Typisierung des Tumors und Bestimmung seines Malignitätsgrades (Fitzgibbons et al. 2000). Mit immunhistochemischen Methoden werden molekulare Strukturen verschiedener Prozesse wie Zellproliferation, Apoptose oder Angiogenese in situ dargestellt und semiguantitativ gemessen. Auch das Ausmaß an bestimmten Hormonrezeptoren (z.B. Östrogenrezeptoren) zur Subtypisierung der Krebserkrankung wird routinemäßig damit durchgeführt. Um eine Aussage über einen individuellen Therapieerfolg treffen zu können, werden vor und während der Behandlung Bioptate des Tumorgewebes entnommen und z.B. nach endothelzellspezifischer CD31-Färbung hinsichtlich ihrer Blutgefäßdichte ausgewertet (Truong und Shen 2011). Weidner stellte zur Quantifizierung der Blutgefäße eine von ihm entwickelte Methode vor (1991). Dabei werden Blutgefäße in einem für den gesamten Tumor repräsentativ erscheinenden histologischen Schnitt endothelzellspezifisch angefärbt. In der subjektiv am stärksten vaskularisierten Region des gesamten Schnittes (hot spot) werden die sich deutlich vom umgebenden Gewebe abgrenzenden Blutgefäße mit dem Lichtmikroskop gezählt (Müller 2008). Das Ergebnis der Zählung ist die Blutgefäßdichte (microvessel density, MVD), die die

maximale Dichte der Blutgefäße pro Einheit Schnittbereich angibt (Kiessling et al. 2010). Weidner und Kollegen bestimmten mit der neuen Methode erstmals die MVD von invasiven Brustkarzinomen und korrelierte sie als guantitativen Angiogenese-Parameter mit der Progression der Erkrankung. Patientinnen mit fortgeschrittenem Brustkrebs hatten mit 101 Blutgefäßen im hot spot eine signifikant höhere MVD als Patientinnen mit weniger fortgeschrittener Erkrankung (45 Blutgefäße). Für invasive Brustkarzinome wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen MVD und Metastasierungsrisiko festgestellt. Weidner und Kollegen schlussfolgerte daraus, dass eine vermehrte Angiogenese im Tumor die Wahrscheinlichkeit einer hämatogenen Metastasierung erhöhen würde. In der Arbeit von Smith-McCune und Weidner (1994) wurden 23 zervikale Dysplasien der Stadien I, II und II hinsichtlich ihres Vaskularisierungsgrades immunhistochemischen mit einem endothelzellspezifischen Marker gefärbt und anschließend mit der MVD-Methode untersucht. Dysplasien im Stadium I zeigten keine, während 16% der Stadium II Dysplasien und 45% der Stadium III Dysplasien vaskulären Strukturen aufwiesen. Der Zusammenhang zwischen Dysplasie-Stadium und Ausprägung der vaskulären Strukturen war mit p=0,002 signifikant positiv. Jedoch wurde keine Korrelation zwischen Entzündungsgrad der Region (Quantifizierung positiver Signale nach CD68-spezifischer Färbung) und der Vaskularisation festgestellt werden. Die Wissenschaftler gingen davon aus, dass die Angiogenese unabhängig von einer lokalen Entzündung einsetzte. Die MVD-Methode von Weidner ist bis heute der Goldstandard zur Quantifizierung der Vaskularisation solider Tumore.

2.4.2 Methoden in der präklinischen Forschung

Tumormodelle: Bevor neue antiangiogene Substanzen in klinischen Studien am Menschen eingesetzt werden, müssen sie in geeigneten Tiermodellen auf ihre Wirksamkeit, Verträglichkeit und Toxizität hin überprüft werden. In der onkologischen Forschung werden hierfür in der Regel klassische syngene, xenogene oder genetische Tumor-Modelle (Fichtner 2008). Während bei syngenen Tumormodellen die wachsenden Tumore von Mäusen oder Ratten abstammen und auch in dieser Spezies untersucht werden, handelt es sich bei xenogenen Tumormodellen um menschliches Tumormaterial, das in immundefiziente Nager transplantiert wird. Syngene Modelle sind in immunkompetenten Wirtstieren etabliert und werden z.B. zur Testung von Immunsystem-modulierenden Substanzen eingesetzt. Ihr Nachteil liegt allerdings in der "Speziesdifferenz zu humanen Malignomen" (Fichtner 2008). Für die Testung antiangiogener Substanzen werden überwiegend Xenograft-Modelle eingesetzt (Wang et al. 2011). Dabei wird humanes Tumorgewebe immundefizienten Tieren (z.B. Nacktmaus, SCID-Maus u.a.) in der Regel subkutan transplantiert und das Wachstum von Tumoren unbehandelter mit dem behandelter Tumore verglichen (Wankhede et al. 2010). Seit Mitte der 1970er Jahre werden nahezu alle Krebstherapeutika in präklinischen Mausmodellen getestet, bevor sie in klinischen Studien zum Einsatz kommen (Kerbel 2003).

2.4.2.1 Routinemethoden

Die am häufigsten eingesetzten Verfahren zur Überprüfung eines antiangiogenen Therapie-Erfolges bei soliden Tumoren sind in vivo die Bestimmung der Tumorgröße und ex vivo die histologische Untersuchung von Tumormaterial in Hinblick auf Tumorzell-Proliferation, -Apoptose und Tumor-Vaskularisierungsgrad (Fichtner 2008).

Bei der *Tumorgrößenbestimmung* werden subkutan wachsende Xenografts in definierten Zeitabständen (z.B. jeden zweiten Tag) mittels Schieblehre vermessen (Kung 2007). Über den Behandlungszeitraum wird dann das Tumorwachstum von unbehandelten und behandelten Tieren beobachtet und miteinander verglichen. Vorteilhaft ist bei der Methode die einfache Durchführbarkeit der Tumorvolumenmessungen, die einen hohen Durchsatz erlaubt. Nach Beendigung des Tierexperiments werden die Tumore entnommen, gewogen und direkt vermessen. Die unterschiedlichen Behandlungsgruppen werden dann miteinander verglichen, um einen potentiellen Effekt auf das Tumorwachstum zu ermitteln (Fichtner 2008). Auch für die Erforschung antiangiogener Therapien werden die beschriebenen Methoden eingesetzt. Jedoch birgt dies die Gefahr einer Fehleinschätzung des antiangiogenen Potentials einer neuen Substanz, denn durch eine reine Größenbestimmung des Tumors kann keine Aussage zum Rückgang einer Vaskularisierung dieses Tumors getroffen werden. Die Substanz kann beispielsweise zytotoxisch auf die Tumorzellen selbst wirken. Eine klare Trennung von zytotoxischer und antiangiogener Wirkung ist nicht möglich (Staton et al. 2009).

Die histologische Bestimmung der Blutgefäßdichte hat auch in der onkologischen Forschung einen hohen Stellenwert (Kiessling et al. 2010). Bei der immunhistologischen Untersuchung zur Vaskularisierung von experimentellen Tumoren zählen unter anderem die Endothelzellmarker CD31, CD34 und der von Willebrandfaktor zu den am häufigsten eingesetzten. Die Blutgefäße der experimentellen Tumore werden ähnlich wie in der Klinik routinemäßig mit modifizierten Formen der MVD-Methode nach Weidner guantifiziert, um Unterschiede in verschieden behandelten Tumoren zu messen. Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass Kapillarsprosse unabhängig von ihrer Funktionstüchtigkeit untersucht werden. Deshalb werden zunehmend auch Strukturen des Mikromillieus der Tumorblutgefäße wie z.B. Perizytenmarker quantifiziert, um den Reifungsgrad der Kapillaren zu bestimmen (Kiessling et al. 2010). Zur Quantifizierung von Blutgefäßen in histologischen Schnitten stehen mittlerweile automatisierte Verfahren zur Verfügung, die Computerbilder der Schnitte hinsichtlich Flächen und Formen der gefärbten Strukturen analysieren (Kiessling et al. 2010). Die histologischen Schnitte erlauben jedoch nur eine stichprobenartige Messung der Tumordurchblutung, die von Schnitt zu Schnitt unter Umständen erheblich variieren kann. Die analysierten Schnitte müssen deshalb nicht repräsentativ für den Gesamttumor sein.

2.4.2.2 Neue Verfahren

In vivo Monitoring mit der Kleintierbildgebung Die detaillierte in vivo Darstellung des Blutgefäßnetzes in experimentellen Tumoren erfordert sensitive Techniken. Mit neuen, nicht invasiven bildgebenden Verfahren können Blutgefäße wiederholt im gleichen Tier untersucht und quantifiziert werden. Der Angiogenese-Prozess kann so als dynamischer Vorgang über die Zeit überwacht werden (Kiessling et al. 2010). Für den Einsatz in der präklinischen Forschung stehen spezielle hoch auflösende CT-, PET- und US-Geräte zur Verfügung (Mikro-CT, Mikro-PET, Mikro-US).

Mit der kontrastverstärkten *Mikro-Computertomographie* können im Wesentlichen qualitative Daten zu Tumorvolumen, Blutgefäßdichte und –verzweigungsgrad erhoben werden (Zagorchev und Mulligan-Kehoe 2009). Dabei ermöglicht der Einsatz von CT-Kontrastmitteln (CTKM) die Differenzierung von nicht kontrastverstärkten und kontrastverstärkten Geweben (Kiessling et al. 2010). Die kommerziell erhältlichen klinischen CTKM (z.B. lodhaltiges lodixanol) werden von Versuchstieren sehr schnell ausgeschieden und können deshalb hier nicht eingesetzt werden, da Mikro-CT-Geräte eine Akquisitionszeit von bis zu 1,5 Minuten haben. Mittlerweile sind spezielle Mikro-CTKM für Nager (z.B. Fenestra, eXIA160) mit längerer Blutverweildauer verfügbar. Jedoch sind Mikro-CT-Untersuchungen für in vivo Verlaufsuntersuchungen nicht geeignet, da die Röntgenstrahlen selbst das Tumorwachstum beeinflussen können.

Die Mikro-Positronenemissionstomographie erlaubt die Darstellung und Quantifizierung funktionaler Prozesse in vivo (Zagorchev und Mulligan-Kehoe 2009). Dreidimensionale Bilder zeigen dabei die räumliche Verteilung eines radioisotopisch markierten Moleküls wie z.B. des Glukose-Analogons ¹⁸F-FDG, welches in Zellen mit hohem Glukose-Stoffwechsel (Gehirn-, Herz-, Nieren-, Tumorzellen) aufgenommen und durch Phosphorylierung sowohl vor der Ausscheidung aus der Zellen als auch vor der weiteren intrazellulären Metabolisierung geschützt wird. Das angekoppelte Radioisotop klingt durch die kontinuierliche Freisetzung von Positronen nach und nach ab (z.B. beträgt die Halbwertszeit von ¹⁸F-FDG etwa 110 Minuten). Die freigesetzten Positronen kollidieren in ihrer Umgebung mit Elektronen und beide heben sich dadurch gegenseitig auf. Pro Positron-Elektron-Paar entstehen zwei hochenergetische Photonen, die sich sofort in Lichtgeschwindigkeit in entgegengesetzte Richtung bewegen. Die Detektion vieler solcher Photonenpaare ermöglicht die Lokalisation ihrer Quelle und somit des Ortes eines erhöhten Glukosestoffwechsels wie bspw. einem Tumor. Neben metabolischen Substraten können aber auch andere Moleküle radioaktiv markiert werden. Angiogene Vorgänge werden im Mikro-PET quantifizierbar, indem spezifische, radiomarkierte Antikörper an endotheliale Zielstrukturen (bspw. VEGFR2) binden und im Mikro-PET gemessen werden. Wegen des hohen Signal-Rausch-Abstandes zeichnet sich die Methode durch eine hohe Sensitivität aus. Jedoch bietet sie allein keine

Möglichkeit, die gemessenen Signale gleichzeitig konkret einer anatomischen Struktur im Körper zuzuordnen.

Der Mikro-Ultraschall Die Weiterentwicklung der Ultraschalltechniken hat zu neuen Anwendungen in der onkologischen Angiogenese-Forschung geführt (Krix et al. 2005). In dieser Arbeit wurde das speziell für Labornager entwickelte Mikro-Ultraschallgerät Vevo770 der Firma VisualSonics zur quantitativen Darstellung der Angiogenese benutzt. Es ermöglicht die Darstellung anatomischer Strukturen und hämodynamischer Funktionen im lebenden Versuchstier in Echtzeit mit nur minimaler Invasivität. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht von Untersuchungen, in denen Ultraschall zur Quantifizierung antiangiogener Therapien in Tiermodellen eingesetzt wurden (modifiziert nach Krix 2005). Tumorale Blutgefäße werden beispielsweise unter Verwendung des Doppler-Ultraschalls dargestellt, bei dem unter Nutzung des Doppler-Effekts die Geschwindigkeit des Blutflusses anhand von Bewegungen der Erythrozyten in den Blutkapillaren in Beziehung zum Ultraschallkopf verfolgt wird. Die unterschiedlichen Blutflussgeschwindigkeiten werden in Farbpixel umgerechnet und quantifiziert. Anhand des Anteils der Farbpixel innerhalb der untersuchten Struktur kann damit eine Aussage über deren Durchblutungsgrad getroffen werden (Krix et al. 2003). Gee und Kollegen (2001) untersuchten mit dem Doppler-Ultraschall Veränderungen der Perfusion experimenteller Tumore während antiangiogener Behandlung mit Interleukin-12. Sie inokulierten immunkompetenten C57BI/6-, balb/c- und C3H/Hen-Mäusen die murinen Tumorzelllinien K1735. B16F10 (Melanome) und RENCA syngenen (Nierenzellkarzinom) subkutan. Sobald die Tumore 3-4mm groß waren, begann die Behandlung mit IL-12 bzw. PBS täglich intraperitoneal über drei Wochen. Das Tumorwachstum wurde mit der konventionellen Kalipermessung jeden zweiten Tag bestimmt. Doppler-Ultraschall-Messungen erfolgten longitudinal einmal pro Woche. Die allgemeine Tumorperfusion wurde quantitativ bestimmt, indem basierend auf den Doppler-Farbpixeln innerhalb der region of interest (ROI) mathematisch der mittlere Erythrozytenfluss und die mittlere Blutfluss enthaltende Tumorregion berechnet wurden. Am Versuchsende erfolgte endothelzellspezifischer immunhistochemischer Färbung von Tumorschnitten nach zusätzlich die Bestimmung der MVD nach Weidner. In den behandelten Tumoren konnte ab Tag 12 eine signifikante Tumorwachstumshemmung im Vergleich zu unbehandelten Tumoren gemessen werden (50mm² vs. 150mm²). Die Perfusion in den behandelten Tumoren war nach drei Wochen deutlich vermindert, während sie sich in den Kontrolltumoren verdoppelte. Schließlich war die MVD in den behandelten Tumoren mit 6,6 Blutgefäßen/Gesichtsfeld signifikant niedriger als in den unbehandelten (11,6 Blutgefäße/ Gesichtsfeld). Basierend auf diesen Ergebnissen schlussfolgerten Gee und Kollegen, dass Doppler-Ultraschall sensitiv therapiebedingte Veränderungen in tumoralen Blutgefäßen

messbar macht und deshalb für serielle Untersuchungen der Tumorperfusion während antiangiogenen Therapien gut geeignet ist.

Studie	US-Verfahren	Modell
VEGFR-Tyrosinkinaseinhibitor, Flussänderung zuführender Gefäße	Farbdoppler (ohne USKM)	Nierenzellkarzinom, Maus
Rekombinantes Interleukin-12, Vaskularisationsänderung	Powerdoppler (ohne USKM)	Melanom, Maus
VEGFR2-Therapie, Darstellung von Tumorgefäßen	Farbdoppler	Prostatakarzinom, Maus
Bestrahlung und Chemotherapie, Darstellung der Vaskularität	Powerdoppler	Mammatumor, Ratte
Protamin, Darstellung der Tumorvaskularität	Powerdoppler	Prostatakarzinom, heterotop, Maus
VEGFR2-Antikörper, Monitoring: Abnahme der Tumorperfusion	Powerdoppler, Wiederanflutungskinetiken	Plattenepithelkarzinom, Maus
Antiangiogene Kombinationstherapie, Messung der Tumorperfusion	Powerdoppler, Wiederanflutungskinetiken	Gliome, Ratte

 Tabelle 2:
 Monitoring antiangiogener Therapien mittels kontrastverstärkter Sonographie.
 Auswahl, modifiziert

 nach Krix 2005, Der Radiologe.
 Image: Contrast Contre Contrast Contrast Contrast Contrast Contre Contrast Contrast Co

In anderen Studien zur Perfusionsänderung in Tumoren unter antiangiogener Therapie wurden zusätzlich Ultraschallkontrastmittel (USKM) benutzt. Hierbei handelt es sich um etwa 1-5µm große Gasmikrobläschen, die mit einer dünnen Hülle stabilisiert sind (Hauff et al. 2008). Damit sind sie kleiner als Erythrozyten und können ungehindert auch die kleinsten Blutkapillaren passieren, ohne Embolien zu verursachen (Delorme und Krix 2006). Durch ihre Gasfüllung reflektieren die Mikrobläschen die Ultraschallsignale anders als normale Gewebe und sind deshalb besonders gut zur kontrastverstärkten Darstellung der Blutgefäße geeignet (Hauff et al. 2008). Hier haben USKM gegenüber Kontrastmitteln anderer bildgebender Verfahren den Vorteil, dass sie aufgrund ihrer Größe das Blutgefäßsystem nicht verlassen können und über mehrere Minuten darin zirkulieren. Palmowski und Kollegen (2008) untersuchten die Effekte einer Sunitinib-Behandlung auf unreife und reife Blutgefäße in experimentellen A431-Tumoren (epidermoides Karzinom) in Nacktmäusen mittels nativem und kontrastverstärktem Doppler-Ultraschall. Die tumortragenden Tiere wurden in Behandlungsgruppe (Sunitinib) und Kontrollgruppe (DMSO gelöst in PBS) eingeteilt. Die sonographischen Messungen erfolgten bei vire Tieren pro Gruppe 8 und 24 Stunden nach der Behandlung sowie bei jeweils sieben der behandelten und unbehandelten Tiere vor sowie 3, 6 und 9 Tage nach der Behandlung. Unter Sunitinib-Therapie verringerte sich die Vaskularisierung der Tumore signifikant, messbar anhand nativer und kontrastverstärkter Doppler-Aufnahmen. In den nativen Aufnahmen wurde 6 und 9 Tage nach Behandlung überraschenderweise ein Anstieg der Tumorperfusion gemessen, aber nicht in den kontrastverstärkten Doppler-Bildern. Die Vaskularisierung war sogar höher als in der Kontrollgruppe. Nach Versuchsende erfolgte eine immunhistochemische Färbung repräsentativer Tumorschnitte mit spezifischen Antikörpern gegen CD31 (Markierung von Endothelzellen) und SMA (*smooth muscle actin*, Markierung von perivaskulären Zellen, die nur bei gereiften Blutgefäßen auftreten). Die Auswertung der histologischen Schnitte zeigte, dass die Sunitinib-Behandlung besonders die Anzahl unreifer Blutgefäße in den Tumoren verringerte, während größere reife Gefäße in der Tumorperipherie eher resistent erschienen. Palmowski und Kollegen schlussfolgerten, dass sowohl der native als auch der kontrastverstärkte Doppler-Ultraschall zur Überwachung von Effekten antiangiogener Therapien geeignet sind. Der kontrastverstärkte Ultraschall scheint dabei sensitiver für die Darstellung kleinerer unreifer Kapillaren zu sein, während sich der native gut für größere reife Blutgefäße mit höherer Flussgeschwindigkeit eignet. Die Kombination beider Methoden ermöglicht somit den Nachweis des Reifungsgrades des Blutgefäßnetzes in soliden Tumoren.

Mit Ultraschalltechniken wurden aber nicht nur Xenograft-Modelle hinsichtlich ihrer Vaskularisierung über bestimmte Versuchszeiträume untersucht. Lucidarme und Kollegen (2004) stellten ihr auf dem Matrigel-Modell basierendes "stabiles Angiogenese-Modell für sonographische Mehrfachuntersuchungen" vor. Dafür injizierten sie 40 Swiss-Mäusen sowie fünf Ratten subkutan in die linke und die rechte Flankenregion Matrigel-Depots, von denen jeweils eines zuvor mit FGF zur zusätzlichen Angiogenese-Stimulation angereichert worden war. 3, 6 und 12 Tage nach der Implantation wurden alle Tiere mit kontrastverstärktem B-Mode sonographisch untersucht. Durch die Kontrastmittel in den Blutgefäßen der Matrigel-Depots erhöhte sich die Echogenität der betreffenden Region in den Ultraschallaufnahmen abhängig von deren Vaskularisierungsgrad. Der Grad dieser Echo-Erhöhung wurde von 3 Untersuchern semiguantitativ über ein 4-Punkte-System ausgewertet. Am Versuchsende wurden die Matrigel-Depots entnommen und makroskopisch hinsichtlich ihres Blutgefäßgehaltes ebenfalls semiguantitativ über das 4-Punkte-System beurteilt. 10 Matrigel-Depots wurden anschließend auch immunhistochemisch gefärbt (anti-CD31). Die makroskopische Beurteilung ergab bei 34 Kontrolldepots ohne FGF einen Angiogenesegrad von 0 (keine Blutgefäße) oder I (vereinzelt Blutgefäße), während 65% der FGF-enthaltenden Depots Angiogenesegrad II (einige große Blutgefäße mit beginnender Penetration ins Depot) oder III (viele große Blutgefäße mit tiefer Penetration ins Depot) hatten. In den Ultraschallbildern waren die Kontrolldepots vor Kontrastmittelgabe vollständig ohne echogene Bereiche und die FGF-enthaltenden hatten teilweise bereits leicht echogene Zonen in den Randbereichen. Nach Kontrastmittelgabe änderte sich dies in den Kontrolldepots nur wenig (Echogenitätsgrad 0 und 1), in den FGF-enthaltenden Depots verstärkte sich die Echogenität bei 10 von 32 Depots signifikant (Grad 2 und 3; 31%), bei 38% gar nicht (Grad 0) und bei 31% wenig (Grad 1). Das Ausmaß der Erhöhung der Echogenität in den Ultraschallbildern korrelierte mit dem Vaskularisierungsgrad der Depots bei makroskopischer Einteilung. 70% der Grad III Depots zeigten eine Echogenität von Grad 2 oder 3. Lucidarme und Kollegen schlussfolgerten, dass das Modell zwar die Möglichkeit bietet, Angiogenese bzw. antiangiogene Therapieeffekte sonographisch in vivo darzustellen, aber weitere Studien zur Korrelation zwischen Signalstärke und Blutgefäßdichte nötig seien.

In einem ähnlichen Experiment testeten Stieger und Kollegen (2006) den kontrastverstärkten Doppler-Ultraschall zur Untersuchung der Angiogenese im Matrigel-Modell. Dazu implantierten sie elf Albinoratten jeweils zwei subkutane Matrigel-Depots mit und ohne FGF rechts und links in die Flankenregion und untersuchten die Angiogenese mit kontrastverstärktem Doppler-Ultraschall 7 und 14 Tage nach der Implantation. Danach erfolgte eine histologische Quantifizierung der Blutgefäße durch Bestimmung der MVD. Zwischen FGF-enthaltenden und –freien Plugs wurden bereits nach 7 Tagen signifikante Unterschiede sowohl im sonographischen Kontrastsignal als auch in der histologischen MVD ermittelt, außerdem konnte mit eine signifikante Korrelation (Pearson-Korrelation: r=0,65) zwischen Ultraschall- und Histologiedaten festgestellt werden. Deshalb betrachten Stieger und Kollegen den kontrastverstärkten Doppler-Ultraschall als robuste Methode zur Unterscheidung der Vaskularisierung im Matrigel-Modell.

Die quantitative Histologie unter Verwendung stereologischer Werkzeuge

Der Begriff Stereologie wurde 1961 in Deutschland begründet und bedeutet "Studium der Objekte in 3D" (Müller 2008). Sie findet in sehr unterschiedlichen Wissenschaften Anwendung, beispielsweise der Biologie, Mathematik und Geologie. In der Histologie werden stereologische Werkzeuge seit knapp 30 Jahren vereinzelt eingesetzt. Laut Gundersen und Kollegen (1988) ermöglicht die Stereologie, einfach und effizient drei-dimensionale mikroskopische Strukturen durch Auswertung zweidimensionaler Schnitte zu quantifizieren (Müller 2008). Die resultierenden Daten werden als unbeeinflusst und robust angesehen, da ihnen spezielle Probenziehungsverfahren zugrunde liegen. Die Dichte von Blutgefäßen in einem dreidimensionalen Gewebe wie einem soliden Tumor kann dadurch viel genauer geschätzt werden als mit der Weidnerschen MVD-Methode (Dockery und Fraher 2007). Die gezogene Stichprobe muss möglichst repräsentativ für das zu untersuchende Gewebe sein, um eine Über- oder Unterschätzung des zu bestimmenden Parameters (z.B. die Blutgefäßdichte in einem Tumor) zu vermeiden. Dies erfolgt in der Stereologie mittels der systematischen, einheitlichen, zufälligen Probenziehung (systematic uniform random sampling, SURS, Gundersen und Jensen 1987). Dabei hat jeder der angefertigten seriellen Schnitte des Gewebes die gleiche Chance, für die Stichprobe ausgewählt zu werden (zufällig). Dies gilt für alle ausgewählten Schnitte gleichermaßen (einheitlich). Die systematische Ziehung gewährleistet dabei schließlich, dass die heterogene Morphologie genügend reflektiert wird. Beide Methoden wurden in der Promotionsarbeit von Silke Anja Müller erstmals systematisch hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit bei der Quantifizierung

34

von Blutgefäßen verglichen (Müller 2008). Dafür wurden Blutgefäße in histologischen, CD31spezifisch gefärbten Schnitten von elf experimentellen Tumoren (sechs Tumore der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB435, drei Tumore der humanen Prostatakrebszellline DU145 sowie zwei Tumore der humanen Lungenkrebszelllinie A549) zunächst mit zwei Varianten der Weidnerschen MVD-Methode und dann nochmals unter Nutzung stereologischer Werkzeuge guantifiziert. In Variante 1 der MVD-Methode wählte Müller zuerst drei repräsentative und qualitativ hochwertige Schnitte aus und zählte die angefärbten Endothelzellen oder Endothelzellhaufen lichtmikroskopisch bei 200facher Vergrößerung innerhalb der subjektiv am stärksten vaskularisierten Region jedes Schnittes (ein hot spot pro Schnitt). Bei MVD-Variante 2 wählte Müller nur einen repräsentativen Schnitt pro Tumor aus, innerhalb dessen sie in drei hot spots die Blutgefäße quantifizierte. Aus den ermittelten Werten wurde jeweils das arithmetische Mittel berechnet. Für beide Varianten wichen die Daten wichen um 12% von einer 100% igen Übereinstimmung ab. Müller guantifizierte danach die Blutgefäße der gleichen Tumore mit stereologischen Werkzeugen. Die Probenziehung erfolgte nach dem SURS-Prinzip: Die elf zu untersuchenden Tumore wurden in elf gleich dicke parallele Scheiben (= Intervalle) geteilt. Die Schnittebene im ersten Intervall des Tumors wurde dabei zufällig ausgewählt und für jedes folgende Intervall beibehalten. Aus jedem Intervall wurde somit ein Schnitt zufällig, systematisch und einheitlich ausgewählt. Alle Schnitte hatten den gleichen Abstand zueinander und bildeten zusammen ein Set. Insgesamt wurden pro Tumor drei Sets bestehend aus elf Schnitten angefertigt, die einmal ausgewertet wurden bzw. ein Set pro Tumor, das dreimal ausgewertet wurde. Jeder Schnitt wurde mit dem stereologischen Werkzeug Fractionator ausgewertet, mit dem zufällig, einheitlich und systematisch bei 400facher Vergrößerung einzelne Gesichtsfelder des gesamten Schnittes von einem stereologischen Computerprogramm ausgewählt wurden, auf die ein Zählrahmen projiziert wurde. Innerhalb dieses Zählrahmens wurden alle Endothelzellen oder Endothelzellhaufen gezählt. Die Ergebnisse wichen um 2% von einer 100%igen Übereinstimmung ab, was signifikant geringer war als die der Weidnerschen Varianten. Die Ergebnisse der stereologischen Blutgefäßquantifizierung stellten sich laut Müller als aussagekräftig, objektiv und reproduzierbar heraus (Müller 2008). Basierend auf diesen Resultaten wurden in der vorliegenden Arbeit zur histologischen Quantifizierung einer Vaskularisierung ebenfalls stereologische Methoden eingesetzt.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Chemische Substanzen und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten chemischen Substanzen und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 20 im tabellarischen Anhang zusammengefasst.

3.2 Herstellung von VEGF/FGF-enthaltenden Alginatbeads

3.2.1 Herstellungsapparatur

Zur Herstellung der AlgBs wurde das von Hoffmann verwendete tropfenbildende Air-Stripping-Verfahren modifiziert (1997). Bei diesem Verfahren werden einzelne Alginattröpfchen durch einen koaxialen Luftstrom von der Spitze einer Tropfkanüle abgerissen. Hierfür wurde eine in der Abteilung Technik Forschung und Entwicklung der Bayer Schering Pharma AG entwickelte Tropfapparatur verwendet (Abbildungen 1, 2). Diese bestand aus zwei miteinander verschweißten Zylinderkammern (nachfolgend als Tropfzylinder bezeichnet), zwei Anschlüssen für die Verwendung von verschiedenen Luftdrücken und einer in den Tropfzylinder eingeführten Injektionskanüle (nachfolgend als Tropfkanüle bezeichnet). Die Tropfapparatur wurde über einem Auffangbecher für die mit dem Luftstrom abgerissenen Alginattröpfchen platziert, welcher sich auf einem Magnetrührer befand (Abbildung 3). Zur Gewährleistung steriler Herstellungsbedingungen wurde die Herstellungsapparatur in einer Laminarwerkbank platziert und verwendet.



Aufbau und Funktionsweise der Tropfapparatur

Die 13,9cm hohe Tropfzylinderkammer mit einem Fassungsvermögen von 50ml hat einen Außendurchmesser von 4,9cm und einen Innendurchmesser von 2,7cm. Hier wurde die zu vertropfende Alginatlösung (Sodium alginate solution, Inotech Schweiz) mit beigemischten Angiogenese-Faktoren (Recombinant Human VEGF165CF & Recombinant Human

FGFbasicCF, R&D Systems USA) eingefüllt. Danach wurde die Tropfzylinderkammer oben mit einem Schraubverschluss luftdicht verschlossen. Oben am Schraubverschluss wurde ein Luftdruckschlauch (FESTO Pneumatik Schlauch, Festo Ges.m.b.H. Deutschland) angeschlossen, um einen definierten Luftdruck P1 in die Tropfzylinderkammer zu leiten. Der kleinere. unter der Tropfzylinderkammer angeschweißte Zylinder hat einen Außendurchmesser von 3,4cm. Er steht über einen mittig platzierten Kanal mit der oberen Tropfzylinderkammer in Verbindung. In diesen Kanal wurde eine handelsübliche Injektionskanüle (Sterican Gr. 12, B. Braun Melsungen AG Deutschland) über die obere Tropfzylinderkammer eingeführt. Die Tropfkanüle füllte nicht den gesamten Kanal aus, so dass ein Spalt zwischen Kanülenaußenwand und Kanalinnenwand existierte. Über einen am kleinen Zylinder angebrachten zweiten Luftdruckschlauch strömte die Druckluft P₂ in diesen Spalt ein und entwich an der Unterseite des kleinen Zylinders über die gleiche Öffnung, aus der auch die Tropfkanüle ragte (= koaxialer Luftstrom). Über den Luftdruck P1 wurde Druck auf die Flüssigkeitssäule (Alginatlösung) in der Tropfzylinderkammer ausgeübt und diese somit in die Tropfkanüle gepresst. Dadurch traten an der Tropfkanülenspitze Alginattröpfchen aus, die über einen definierten Luftdruck P₂, der entlang der Tropfkanüle zur Kanülenspitze strömte, abgerissen wurden. Mit digitalen Manometern (Digitalmanometer MAN-SD/-LD, KOBOLD Messring GmbH Deutschland) erfolgten exakte Einstellung und Überwachung der Luftdrücke P₁ und P₂.

Das komplette AlgB-Herstellungssystem

Die Tropfapparatur wurde an einer Metallstange befestigt und ragte über die Stellfläche eines Magnetrührers (Ikamag RCT basic, Ika Labortechnik Deutschland). Auf der Stellfläche des Magnetrührers befand sich ein Becherglas mit einer 80mmolare CaCl₂-Lösung zum Auffangen und Aushärten der durch P₂ von der Tropfkanülenspritze abgerissenen Alginattropfen. Als Fallstrecke der Alginattropfen wurden 7cm gewählt, da dieser Abstand von Tropfkanülenspitze und CaCl₂-Bad-Oberfläche von Wolters und Kollegen als am besten für die schonende Herstellung der AlgB beschrieben wurde (1991). Die Herstellungsapparatur befand sich unter einer sterilen Werkbank. Alle verwendeten Geräte und Materialien wurden entweder ab Werk sterilverpackt geliefert oder vor Gebrauch autoklaviert. Die Herstellung der AlgBs erfolgte bei Raumtemperatur.



Abbildung 3: Gesamtaufbau des AlgB-Herstellungssystems: Die Nummerierung der einzelnen Bestandteile erfolgte analog zu den Abbildungen 1 und 2, weshalb die Nummern 1 (Druckluft P₁) und 5 (interner Dichtungsring) hier fehlen.

3.2.2 Herstellungsprotokoll

Für die Experimente wurden AlgBs stets nach folgendem Standardprotokoll hergestellt:

- Tropfapparatur, Bechergläser und Rührmagnete autoklavieren (Tischautoklav HMT 232 X, HMC-Europe; 20min bei 134°C)
- 100ml 80mmolare CaCl₂-Lösung in Aqua bidest. (Calciumchlorid, wasserfrei, gekörnt, Merck Chemicals Deutschland) ansetzen und sterilfiltrieren
- 3. Tropfapparatur über der CaCl₂-Lösung in der Laminarwerkbank installieren, verschließen und Luftdruckschläuche anschließen
- Druckluftventile öffnen und mit den digitalen Manometern 200mbar f
 ür P₁ und 150mbar f
 ür P₂ exakt einstellen, Druckluftventile schließen
- 5. Obere Tropfzylinderkammer öffnen und 2ml sterile, die Angiogenese-Faktoren VEGF und FGF enthaltende Alginatlösung einfüllen (in den ersten 3 Experimenten erhielt jeweils eine Gruppe der Tiere Angiogenese-Faktoren freie AlgB-Depots. Dafür wurde der Alginatlösung anstelle der Angiogenese-Faktoren isotone Kochsalzlösung beigemischt)

- Druckluftventile erst f
 ür P₂, dann f
 ür P₁ öffnen, mit den digitalen Manometern Luftdr
 ücke P₁ und P₂ überwachen, Abweichungen von 200mbar (P₁) bzw. 150mbar (P₂) über die digitalen Manometer korrigieren
- 7. 100ml Becherglas mit vorbereiteter CaCl₂-Lösung unter die Tropfapparatur stellen
- 8. Alginatlösung vollständig in die CaCl₂-Lösung vertropfen
- AlgB 10min in der CaCl₂-Lösung aushärten lassen (Die in der Alginatlösung enthaltenden Natrium-Ionen werden gegen Calcium-Ionen ausgetauscht. Dadurch erhält das Alginat seine gelartige Konsistenz und die Alginattropfen härten zu Alginatbeads aus.)
- 10. CaCl₂-Lösung vorsichtig dekantieren, bis nur noch die AlgBs im Becherglas sind
- 11. AlgBs 2x3min in isotoner Kochsalzlösung (Ecoflac plus, Isotone Kochsalz-Lösung 0,9 %, B. Braun Melsungen AG Deutschland) waschen
- 12. Isotone Kochsalzlösung dekantieren
- 13. AlgBs in 1ml Einmalspritzen (Injekt-F SOLO, 1 ml Einmalspritze, B. Braun Melsungen AG Deutschland) abfüllen
- 14. Spritzen mit AlgBs bis zur Verwendung bei 6°C lagern

3.2.3 In vitro Charakterisierung

Die in vitro Charakterisierung der AlgBs umfasste:

- 1. Die lichtmikroskopische Größenanalyse,
- 2. rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zur Beurteilung der Morphologie sowie
- 3. eine bakteriologische Untersuchung von zehn frisch hergestellten AlgB-Chargen.

Für die Größenbestimmung der AlgBs wurden drei Chargen gemäß Standardprotokoll hergestellt, wobei das komplette Herstellungssystem für jede Charge neu aufgebaut wurde. Die Größenbestimmung erfolgte mit dem Lichtmikroskop PharmaVision830 der Firma Malvern Instruments Ltd., das speziell für die Größenmessung fester Partikel entwickelt wurde. Es besitzt eine Mess- und eine Recheneinheit. Die Messeinheit besteht aus einer Hellfeld-belichteten Glaswanne für die zu messende Probe mit einer Digitalkamera darüber. Die Recheneinheit zählt und vermisst jedes Partikel anhand der mit der Kamera aufgenommenen Bilder (Abbildung 4). Die Messungen wurden mit Unterstützung der Mitarbeiter der Abteilung "Analytical Development" der Bayer Schering Pharma AG durchgeführt. Für die Größenmessung der AlgBs wurde eine Probe von 500µl in die Probenwanne gegeben und in isotoner Kochsalzlösung suspendiert. Nach Starten der Messung fuhr die Kamera die Probenwanne in x- und y-Richtung meanderförmig ab und speicherte ein Bild jedes einzelnen AlgBs. Die Recheneinheit bestimmte den mittleren Durchmesser jedes einzelnen AlgBs, indem die Analyse-Software den Durchmesser jedes Partikels in 3° Abständen misst. So werden pro AlgB 120 Durchmesser bestimmt. Aus diesen wird das arithmetische Mittel gebildet. Durch das meanderförmige Abfahren der gesamten Probenwanne wurden AlgBs, die im Randbereich eines Bildes lagen, im nächsten Bild vollständig aufgenommen.



Abbildung 4: Lichtmikroskopische Aufnahmen der AlgBs in der Probenwanne aus Glas. Die roten Linien in einigen AlgBs wurden zur Verdeutlichung des Messprinzips nachträglich eingefügt und stellen exemplarisch die mit dem PharmaVision830 vermessenen Durchmesser der einzelnen AlgBs dar.

Zur **Untersuchung der Morphologie der AlgBs** erfolgten rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der AlgBs durch Mitarbeiter der Abteilung "Analytical Development" der Bayer Schering Pharma AG. Dafür wurden zunächst AlgBs gemäß Standardprotokoll hergestellt und dann jeweils 45min in 2%iger Osmiumtetroxidlösung (Sigma Aldrich, USA) und aufsteigender Acetonreihe (30%, 70%, 90%, 96%, 2x100%, Carl Roth GmbH Deutschland) fixiert. Danach erfolgte die kritische Punkt-Trocknung, bei der die AlgBs durch Austausch des in ihnen enthaltenen Acetons gegen zunächst flüssiges, dann gasförmiges CO₂ getrocknet wurden. Bei dieser schonenden Methode blieb die Struktur der AlgBs erhalten. Für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die getrockneten AlgBs mit einer 15nm dicken Goldpaladium-Schicht überzogen und im Rasterelektronenmikroskop platziert.

Prüfung der AlgBs auf mikrobielle Kontamination Um sicherzustellen, dass die AlgBs steril und für den in vivo Einsatz geeignet waren, wurden zehn Tage lang täglich frische AlgBs nach dem Standardprotokoll hergestellt und mikrobiologisch untersucht. Die Untersuchungen wurden mit freundlicher Unterstützung durch Mitarbeiter der Abteilung *"Biological Quality Control"* der Bayer Schering Pharma AG durchgeführt. Es wurde das Gussplattenverfahren mit Caseinpepton-Sojamehlpepton-(CS)- und Sabouraud-Dextrose-(Sab)-Agar (CASO-Agar, Merck Chemicals Deutschland; Sabouraud Dextrose Agar, BD Difco USA) verwendet. Pro Agar wurde 1g AlgBs untersucht. Zuerst erfolgte eine Einwaage von 2g AlgBs pro Charge in sterile Gefäße. Jede 2g-Probe wurde mit CS-Medium 1:10 verdünnt und 20min lang gerührt. Danach erfolgte die Überführung der Lösung in sterilen, flüssigen CS-Agar sowie Sab-Agar (Temperatur: 45°C) im Verhältnis 1:1. Für eine bessere Übersichtlichkeit der potentiell zu zählenden Kolonien wurde die verdünnte AlgB-Lösung auf jeweils zehn CS- bzw. Sab-Platten verteilt. Die Platten wurden für den Bebrütungszeitraum in Brutschränken gelagert. Nach einer Inkubationszeit von 3-5 Tagen bei 30-35°C (CS-Agar)

bzw. 5-7 Tagen bei 20-25°C (Sab-Agar) wurde die Gesamtzahl aerober Kolonien (Bakterien und Pilze/Hefen pro 1g AlgB) auf beiden Agararten bestimmt. Hierfür wurden alle auf einer Agarart gewachsenen Einzelkolonien gezählt. Alle Kolonien auf CS-Agar wurden als Bakterien, alle Kolonien auf Sab-Agar als Pilze gezählt. Zur Berechnung der Gesamtkeimzahl wurden der höchste Wert gezählter Bakterien und der höchste Werte gezählter Pilze/Hefen addiert. Die Nachweisgrenze des Verfahrens lag bei 1 KbE/g.

3.3 In vivo Untersuchungen

Für die systematische in vivo Charakterisierung des Tumorsurrogat-Angiogenese-Modells wurden vier verschiedene Versuchsdesigns und zwei spezielle Technologien angewendet. Bei den Technologien handelte es sich um den kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall und die Verwendung von stereologischen Werkzeugen zur histologischen Quantifizierung von Blutgefäßen in den AlgB-Depots.

In einem ersten Versuch sollte geprüft werden, ob sich der kontrastverstärkte Mikro-Ultraschall grundsätzlich als in vivo Verfahren zur Darstellung und Quantifizierung der Gefäßentwicklung in den AlgB-Depots in Mäusen eignet. In zwei nachfolgenden longitudinalen Untersuchungen sollte geklärt werden, a) ob sich mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall eine Zunahme der Blutgefäßausbildung in den AlgB-Depots über die Zeit im selben Tier darstellen lässt und b) ob es dabei Unterschiede zwischen immundefizienten und immunkompetenten Mäusen gibt. In einem abschließenden Hauptversuch sollte dann unter Verwendung von zwei therapeutischen Angiogenesehemmern geprüft werden, ob das Tumorsurrogat-Angiogenese-Modell in Verbindung mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall zum in vivo Monitoring von antiangiogenen Therapieeffekten geeignet ist. In allen vier Studien wurden sämtliche in vivo erhobenen Ultraschalldaten anschließend mit den unter Verwendung stereologischer Werkzeuge histologisch quantifizierten Blutgefäßanschnitten korreliert.

3.3.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen zum Tumorsurrogat-Angiogenese-Modell wurden an zwei Maus-Züchtungslinien durchgeführt. In den Experimenten 1 und 2 wurden immundefiziente NMRI nu/nu Mäuse (Crl:NMRI-Foxn1^{nu}) verwendet, für die Experimente 3 und 4 wurden immunkompetente NMRI Mäuse (Crl:NMRI Br) eingesetzt. Beide Linien stammten aus der Zucht von Charles River Sulzfeld, Deutschland. Es handelte sich um weibliche Mäuse mit einem Gewicht zwischen 25g und 30g und einem Alter von ca. 8 Wochen. Nach Anlieferung der Tiere aus Sulzfeld erfolgte eine 7tägige Akklimatisierungszeit. Die Mäuse wurden bei einer Raumtemperatur zwischen 22°C und 23°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55% in IVC-Käfigsystemen (Scantainer Classic, Scanbur, Dänemark: kontinuierlicher vierzigfacher Luftwechsel pro Stunde, Zu- und Abluftfilter; Käfigtyp: Eu Eurostandard Typ II, Cat. 1290 D, Abmessungen: 425 x 266 x 155mm / 820 cm², Tecniplast, Italien) in Gruppen à 5 Tieren gehalten. Jeder Käfig war mit einer Filterhaube (Filterhaube, Cat. 1290 D – 400 SU, Tecniplast, Italien) mit Filtervlies aus 100% Polyester bedeckt. Die Käfige waren neben der Einstreu (Lignocel, Cat. FS14, Rettenmeier&Söhne GmbH und CoKG, Deutschland) mit roten Häuschen aus Polycarbonat (Maushaus, Cat. ACRE 010, Abmessungen: 117 x 117 x 64 (+35) mm, Tecniplast, Italien) als Anreicherung ausgestattet. Das Umsetzen der Tiere in frische sterile Käfige erfolgte alle 2 Tage. Der Haltungsraum verfügte über ein Beleuchtungsschema mit 12h Tag-Nacht-Rhythmus bei einer Lichtintensität von 250Lux. Im Beobachtungszeitraum wurde einmal wöchentlich das Körpergewicht jedes Tieres erfasst. Der Allgemeinzustand jeder Maus wurde einmal täglich kontrolliert. Frisches Wasser und Futter (sniff NM, 10mm, Cat. V1244-0, sniff Spezialdiäten GmbH, Deutschland) stand den Tieren ad libitum zur Verfügung.

Die Experimente 1 bis 3 wurden unter der Anzeige A0101/98 durchgeführt, weil sie der Eignung des kontrastverstärkten Mikro-Ultraschalls zur Darstellung der Angiogenese im Tumorsurrogat-Angiogenese-Modell dienten. Experiment 4 wurde unter der Anzeige A0312/03 durchgeführt, weil Therapieeffekte zweier antiangiogener Substanzen im Tumorsurrogat-Angiogenese-Modell mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall quantifiziert werden sollten. Bei beiden Anzeigen handelt es sich um Tierversuchsvorhaben der Bayer Schering Pharma AG, die beim Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin registriert sind.

3.3.2 Narkose

Für die Setzung der subkutanen AlgB-Depots und die sonographischen Untersuchungen dieser wurden die Versuchstiere mit einer Inhalationsnarkose mit 4Vol% Isofluran in Raumluft (Curamed®, Cura Med Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) zur Einleitung anästhesiert (Narkoseeinheit: Vevo Compact Dual Anesthesia System, VisualSonics Kanada). Während der gesamten Untersuchung wurde die Narkose in einer Erhaltungsdosis von 2Vol% in Raumluft aufrechterhalten. Die Vitalparameter Körpertemperatur, Herz- und Atemfrequenz wurden während der Ultraschalluntersuchung mittels speziellen Untersuchungstisches für Mäuse und einer Überwachungseinheit der Firma VisualSonics aufgezeichnet (Vevo Mouse Handling Table, VisualSonics, Toronto, Kanada). Nach Ende der Untersuchung kamen die Mäuse zum Aufwachen in einen Wärmeschrank (Warming Cabinet, Scanbur, Dänemark) bei 32°C.

3.3.3 Setzung der subkutanen AlgB-Depots

Alle in vivo eingesetzten VEGF/FGF-enthaltenden bzw. VEGF/FGF-freien AlgBs wurden nach dem Standardprotokoll hergestellt (Punkt 3.2.2). Die AlgBs wurden den Mäusen innerhalb von 6-10 Std. nach ihrer Herstellung subkutan in die rechte Flankenregion injiziert. Fellmäuse wurden einen Tag zuvor unter Inhalationsnarkose im rechten Flankenbereich enthaart (Enthaarungscreme, Veet, Deutschland). Dafür wurde die Creme aufgetragen und

nach 5min Einwirkzeit zusammen mit den Haaren unter fließendem warmen mit Leitungswasser abgewaschen. Die Injektionsstelle wurde bei allen Mäusen vorher desinfiziert (Softasept, B. Braun Petzold GmbH, Deutschland). Anschließend erfolgte die AlgB-Depotsetzung durch Applikation von 0,1ml AlgBs mit einer 22G Injektionskanüle (BD Microlance Kanüle, Becton Dickinson GmbH, Deutschland). Nach der Depotsetzung wurde die Narkose abgesetzt und das entsprechende Tier bis zum vollständigen Aufwachen in einem Umluft-Wärmeschrank (Warming Cabinet, Scanbur, Dänemark) bei 32°C verbracht. Zwischen den sonographischen Untersuchungen befanden sich die Mäuse im Tierhaltungsraum unter den Bedingungen, wie sie unter 3.3.1 beschrieben sind.

3.3.4 Der kontrastverstärkte Mikro-Ultraschall

Für die in vivo Quantifizierung der Blutgefäßausbildung in den AlgB-Depots wurden das speziell für Mäuse und Ratten entwickelte Mikro-Ultraschallgerät VEVO770 und das vorklinische Ultraschallkontrastmittel "*Vevo® MicroMarkerTM Non-Targeted Contrast Agent"* der Firma VisualSonics (Toronto, Kanada) verwendet.

Das Mikro-Ultraschallgerät Vevo770

Der sonographische Untersuchungsaufbau bestand aus folgenden Teilen (Abbildung 5):

- 1. Dem Mikro-Ultraschallgerät selbst mit integrierter Software "*VisualSonics Standard Measurements Version 3.0.0*" (Bild A),
- 2. einem Spezial-Ultraschallkopf (Bild C),
- 3. einem 3D-Motor für die 3D-Untersuchungen (Bild C),
- 4. einem Untersuchungstisch für Mäuse (Bild D),
- 5. einer Überwachungseinheit für die Aufzeichnung der Vitalparameter der Mäuse während der Untersuchung (Bild B) sowie
- 6. einem Schienensystem für die Fixierung von Ultraschallkopf und Untersuchungstisch (Bild B).

Mikro-Ultraschallgerät (*Abbildung 5, Bild A*): Für alle Ultraschalluntersuchungen wurde ausschließlich der Vevo770 verwendet, der sich durch eine sehr hohe räumliche Auflösung von bis zu 30µm auszeichnet. Für die sonographische Charakterisierung der AlgB-Depots wurden zwei Ultraschall-Modalitäten verwendet. Mit dem dreidimensionalen B-Modus wurden in einem ersten Schritt die subkutanen AlgB-Depots volumetrisch vermessen, unmittelbar danach erfolgte unter Verwendung des subharmonischen Modus die zweidimensionale kontrastverstärkte Messung des Vaskularisierungsgrades der AlgB-Depots.

Ultraschallkopf (Abbildung 5, Bild C): In allen durchgeführten Experimenten erfolgten die Untersuchungen mit dem Ultraschallkopf RMV-710B (VisualSonics) mit einer Frequenz von 25MHz und einer Eindringtiefe von 15mm. Die maximale axiale Auflösung des Schallkopfes beträgt 70µm, die laterale Auflösung 140µm. Des Weiteren ist dieser Ultraschallkopf für Untersuchungen im subharmonischen Modus geeignet. Dieser spezifische Modus ermöglicht die gezielte Darstellung von Ultraschallkontrastmitteln, die aus stabilisierten Mikrogasbläschen bestehen.



Einheit für Vitalparameterüberwachung

Abbildung 5: Vevo770 und Peripheriegeräte zur sonographischen Untersuchung von kleinen Versuchstieren (mit freundlicher Genehmigung von VisualSonics Europe)

Untersuchungstisch und Einheit zur Überwachung der Vitalparameter (Abbildung 5, Bilder B, D): Für die Untersuchungen wurden die Tiere auf einem von VisualSonics entwickelten speziellen Tisch für kleine Versuchstiere fixiert, in den Elektroden zur Messung der Herz- und Atemfrequenz sowie eine Vorrichtung zur Beheizung eingebaut sind (Bild D). Herz- und Atemfrequenz der narkotisierten Tiere wurden während den Untersuchungen mit der Überwachungseinheit (Bild B) aufgezeichnet Über ein Rektalthermometer, das mit der Überwachungseinheit elektronisch verbunden ist, wurde die Körpertemperatur der Mäuse während der Untersuchung ebenfalls aufgezeichnet.

3D-Motor und Schienensystem (*Abbildung 5, Bilder B, C*): Mit dem 3D-Motor wurden 3D-Aufnahmen der AlgB-Depots im B-Modus in maximal 256 Graustufen erzeugt. Dafür wurde der Schallkopf an einem 3D-Motor befestigt (Bild C). Der Motor bewegte den Schallkopf während der 3D-Messung entlang der transversalen Achse über das zu messende AlgB-Depot. In 100µm Abständen wurden einzeln aufeinander folgende 200µm dicke Schnittbilder vom AlgB-Depot erzeugt, aus denen anschließend über die geräteeigene Software ein 3D-Bild des subkutanen AlgB-Depots rekonstruiert wurde (Abbildung 6).



Abbildung 6: Schematische Darstellung der Akquisition eines 3D-Bildes mit dem Vevo770 (modifiziert nach VS Handbuch).

Ultraschallkontrastmittel Für die sonographische Darstellung und Quantifizierung der Blutgefäßausbildung in den AlgB-Depots wurde das Ultraschallkontrastmittel (USKM) *"Vevo® MicroMarkerTM Non-Targeted Contrast Agent*" (VisualSonics, Kanada) eingesetzt. Die *"Vevo MicroMarker*" sind 2,3 - 2,9µm große Mikrogasbläschen, die aus einem Stickstoff-Perfluorbutan-Gasgemisch mit umgebender Hülle die aus einem Gemisch aus Polyethylenglykol, Phospholipiden und Fettsäure besteht. Das als Lyophilisat gelieferte USKM wurde stets kurz vor seiner Verwendung gemäß des Herstellerprotokolls mit isotoner Kochsalzlösung zur Gebrauchslösung (Konzentration der Mikrobläschen betrug 2x10⁹/ml) resuspendiert und innerhalb von 6 Stunden verbraucht. Alle Untersuchungen wurden mit der gleichen Charge durchgeführt.

Volumenbestimmung der AlgB-Depots

Die Mäuse wurden wie beschrieben vorbereitet und auf dem beheizten Untersuchungstisch in Bauchlage fixiert (Abbildung 7). Die Pfoten wurden für die Messung der Vitalparameter mit Klebestreifen an die Elektroden angekoppelt. Die Vitalparameter wurden während der gesamten Untersuchung überwacht.

Für die sonographische Untersuchung wurde dann auf die fellfreie Haut direkt über dem AlgB-Depot luftblasenfreies Ultraschallgel (Aquasonic 100, Parker, USA) aufgetragen. Das Ultraschallgel war vorab in 10ml Serumröhrchen (Fa. Sarstedt Deutschland) abgefüllt und zur Beseitigung von kleinsten Luftbläschen 2 Minuten bei 300g zentrifugiert worden (Zentrifuge 5810R, Eppendorf, Deutschland), die sonst unerwünschte Störechos während der Untersuchung verursacht hätten. Der Schallkopf wurde auf das Ultraschallgel aufgesetzt, im Schienesystem fixiert und eingeschaltet. Durch transversales Verschieben des Schallkopfes mithilfe des Schienensystems wurde im B-Mode die größte Ausdehnung des AlgB-Depots in sagittaler Schallebene aufgesucht und in dieser Position fixiert (Abbildung 8).



Abbildung 7: AlgB-Depot tragende Nackt- Abbildung 8: Schematische Darstellung maus auf dem Untersuchungstisch. Der Ultraschallkopf ist über entgastes Ultraschallgel artefaktfrei an das subkutane für die 3D-Bild-Erstellung. AlgB-Depot angekoppelt.

der sagittalen Schallebene und der transversalen Verschiebung des Schallkopfes

Dann wurde die 3D-Messung gestartet. Alle Untersuchungen im 3D-B-Modus erfolgten mit den folgenden Einstellungen:

Frequenz	25 MHz
Power	40%
Signalverstärkungsstufe	2
Schallwellengeschwindigkeit	1540 m/s
Eindringtiefe	8,50 mm
Gesichtsfeldgröße	13 x 13 mm
Bildrate	16 Hz
Abstand zwischen Einzelbildern (step size)	0,102 mm
Range	15mm

Tabelle 3: Geräteeinstellungen für die Aufnahmen im 3D-B-Modus.

Nach Drücken der Start-Taste fuhr der 3D-Motor den Schallkopf automatisch in transversaler Ebene an den Rand des AlgB-Depots und begann mit der Akquisition der Einzelbilder. Nach Ende der Messung wurde das vom Gerät erzeugte 3D-Bild für die spätere Auswertung abgespeichert. Anschließend erfolgte die Darstellung und Quantifizierung der Blutgefäße im AlgB-Depot mit dem kontrastverstärkten subharmonischen Modus.

Das AlgB-Depot-Volumen wurde anhand des erzeugten 3D-Bildes mit der geräteeigenen Software bestimmt. Für die Volumenbestimmung wurde in den einzelnen zweidimensionalen sagittalen Schnittbildern manuell eine Kontur an den Außengrenzen des im B-Modus abgebildeten AlgB-Depots gelegt (Abbildung 9). Das Volumen des manuell konturierten AlgB-Depots wurde dann mit der Software vollautomatisch berechnet.



Abbildung 9: Beispiel für eine Konturlegung um zweidimensionale sagittale Schnittbilder des subkutanen AlgB-Depots. Bild A: Beginn des 3D-Bildes; Bild B: Mitte des 3D-Bildes; Bild C: Ende des 3D-Bildes.

Quantifizierung der Blutgefäßausbildung in den AlgB-Depots

Die Darstellung und Quantifizierung der Blutgefäße in den AlgB-Depots erfolgte im kontrastverstärkten subharmonischen Modus. Dieser spezielle Ultraschallmodus filtert die Schallsignale des Gewebes fast vollständig heraus, während die von den Mikrogasbläschen erzeugten Schallsignale in den Blutgefäßen deutlich dargestellt werden. Für die intravenöse Injektion des USKM wurde dem auf dem Untersuchungstisch narkotisiertem und fixierten Versuchstier ein zuvor mit isotoner Kochsalzlösung gespülter Schwanzvenenverweilkatheter (VS Tail Vein Catheter VS-11912, VisualSonics, Kanada) gelegt und mit Klebestreifen fixiert. Alle Untersuchungen im subharmonischen Modus erfolgten mit den folgenden Einstellungen:

Frequenz	30 MHz
Power	40%
Signalverstärkungsstufe	10
Schallwellengeschwindigkeit	1540 m/s
Eindringtiefe	8,50 mm
Gesichtsfeldgröße	13 x 13 mm
Bildrate	24 Hz
Kontraststufe	40
Schwellenwert	300

Tabelle 4: Geräteeinstellungen für die Aufnahmen im subharmonischen Modus.

Bevor am Vevo770 auf Knopfdruck in den subharmonischen Modus gewechselt wurde, erfolgte die Speicherung eines sagittalen 2D-Bildes vom AlgB-Depot im B-Modus. Dies diente bei der späteren Auswertung als visuelle Orientierung für die Konturlegung um das AlgB-Depot im subharmonischen Modus. Danach wurde in den subharmonischen Modus gewechselt, ohne die zweidimensionale Bildebene im AlgB-Depot zu verändern.

Nun wurden 50µl des resuspendierten USKM in eine 1ml Einmalspritze (Injekt-F SOLO, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) aufgezogen. Für jede kontrastverstärkte Ultraschallmessung wurde dem Tier ein Bolus von 50µL über den Schwanzvenenverweilkatheter injiziert. Für die Erfassung der USKM-verstärkten Blutgefäßperfusionssignale wurde im subharmonischen Modus eine zweidimensionale Echtzeit-Ultraschallfilmsequenz (Cineloop) über 83 Sekunden aufgenommen. Dafür wurde der Cineloop in vier Abschnitte eingeteilt: Die ersten 5 Sekunden wurden als Leerwert ohne Kontrastmittelapplikation aufgenommen, es folgte die 3sekündige intravenöse Applikation des Ultraschallkontrastmittels über den zuvor gelegten Schwanzvenenverweilkatheter und die 5sekündige Spülung mit isotoner Kochsalzlösung zur Erfassung des Anflutungsverhaltens des USKM. In weiteren 70 Sekunden wurde das Maximum und das Abflutungsverhalten der USKM-verstärkten Blutgefäßperfusionssignale im AlgB-Depot erfasst. Abbildung 10 zeigt schematisch den zeitlichen Ablauf der kontrastverstärkten subharmonischen Messung.

Cineloop (0,1cm /s)





Alle Cineloop Aufnahmen wurden für die spätere Auswertung digital gespeichert. Am Untersuchungsende wurden die Tiere vom beheizten Untersuchungstisch genommen und in Abhängigkeit vom Versuchsdesign entweder für die folgende histologische Untersuchung der AlgB-Depots durch zervikale Dislokation schmerzfrei getötet oder für nachfolgende sonographische Untersuchungen nach Entfernen des Venenverweilkatheters zum Aufwachen in einem Wärmeschrank untergebracht und anschließend zurück in den Tierhaltungsraum gebracht.

Für die Auswertung der blutgefäßspezifischen USKM-Intensitätssignale wurden die abgespeicherten Cineloops herangezogen. In einem ersten Schritt wurde eine Kontur um die Grenzen des vor der subharmonischen Filmaufnahme abgespeicherten Abbildes des AlgB-Depots gezogen. Diese Kontur wurde dann mit der Software in die subharmonische Aufnahme übertragen, wo sie als ROI für die USKM-verstärkten subharmonischen Aufzeichnungen diente. Die Auswertung der Signalintensitäten des Kontrastmittels innerhalb der ROI erfolgte vollautomatisch durch die Software. Mit der *Maximum-Intensity-Persistence*-Analyse (modifiziert nach Palmowski et al. 2010) wurden die USKM-Signalintensitäten in den Blutgefäßen des AlgB-Depots kumulativ quantifiziert. Die Graustufen-Werte jedes Pixels innerhalb der ROI von allen Einzelaufnahmen wurden miteinander verglichen und der maximale Graustufen-Wert jedes Pixels für die Folgebilder beibehalten. Am Ende der 83sekündigen Sequenz wurde von jedem Pixel innerhalb der ROI der maximale

48

Graustufenwert dargestellt. Aus den Graustufen-Maxima der einzelnen Pixel wurde für jedes Einzelbild der Sequenz über die Zeit der Mittelwert über der ROI gebildet. Dieser wurde als Kontrastsignalintensität bezeichnet. Es resultierte eine kumulative Zeit-Intensitäts-Kurve. Um das Ergebnis vom Hintergrund-Rauschen zu bereinigen, wurde das Kontrastsignalintensitäts-Maximum durch Subtraktion des Graustufen-Mittelwert des ersten kontrastverstärkten Einzelbildes vom Graustufen-Mittelwert des letzten Einzelbildes berechnet. Die Kontrastsignal-Intensitäts-Maxima der einzelnen AlgB-Depots wurden als Grundlage für den Vergleich der Vaskularisierung der verschiedenen AlgB-Depots herangezogen. Abbildung 11 zeigt exemplarisch ein AlgB-Depot vor und nach der subharmonischen Ultraschallaufnahme. Die ROI wird im B-Bild manuell festgelegt (Bild A) und in das subharmonische Bild übertragen (Bilder B, C, D). Bild B zeigt den sagittalen Anschnitt des AlgB-Depots vor Kontrastmittelapplikation, die Kontrastmittelsignale im AlgB-Depot nach der Injektion sind in Bild C als weiß-graue Punkte zu sehen und werden in Bild D als grüne Bereiche mit einer Fehlfarbendarstellung verdeutlicht.



Abbildung 11: AlgB-Depot in B-und subharmonischem Modus vor und nach USKM-Injektion:

- A: festgelegte ROI im 2D-Bild des AlgB-Depots (B-Modus), rot konturiert
- B: AlgB-Depot im subharmonischen Modus vor Kontrastmittelgabe (nativ)
- C: AlgB-Depot im subharmonischen Modus nach Kontrastmittelgabe (nativ)

D: AlgB-Depot im subharmonischen Modus nach Kontrastmittelgabe (fehlfarbendargestellt)

3.3.5 Reproduzierbarkeit der sonographischen Messungen

Volumetrie subkutaner AlgB-Depots Für die Überprüfung der Reproduzierbarkeit der sonographischen Volumenbestimmung wurden zwei zufällig ausgewählte AlgB-Depots von drei unterschiedlich erfahrenen Untersuchern vermessen. Untersucher 1 hatte zuvor keine Erfahrung in der Volumenvermessung subkutaner AlgBs, während Untersucher 2 mit zehn Vermessungen wenig und Untersucher 3 mit über 100 Vermessungen sehr erfahren war. Die AlgB-Depots wurden von jedem Untersucher fünf Tage nacheinander morgens, mittags und abends vermessen, wodurch pro AlgB-Depot und Untersucher 15 Einzelwerte ermittelt wurden.

Blutgefäßquantifizierung der AlgB-Depots Für die Überprüfung der Reproduzierbarkeit der kontrastverstärkten subharmonischen Blutgefäßquantifizierung wurden zwei AlgB-Depots mit unterschiedlich hoher KSI von drei in der Auswertung von 3D-Blöcken unterschiedlich erfahrenen Untersuchern vermessen. Untersucher 1 hatte zuvor keine Erfahrung in der Auswertung subharmonischer Cineloops, Untersucher 2 hatte zuvor weniger als zehn subharmonische Cineloops ausgewertet (=wenig Erfahrung) und Untersucher 3 über 100 (viel Erfahrung). Die AlgB-Depots wurden von jedem Untersucher fünf Tage nacheinander morgens, mittags und abends vermessen, wodurch pro AlgB-Depot und Untersucher 15 Einzelwerte ermittelt wurden.

3.4 Histologische Blutgefäßquantifizierung

Nach der finalen Ultraschalluntersuchung jedes AlgB-Depots wurde das jeweilige Tier vom beheizten Untersuchungstisch genommen und noch in Narkose durch zervikale Dislokation schmerzfrei getötet. Die AlgB-Depots wurden präpariert und für die folgende histologische Untersuchung vorbereitet.

3.4.1 Probenkonservierung

Für die Probenkonservierung wurde zunächst 2-Methylbutan (Carl Roth GmbH&Co. KG, Deutschland) in einem Kühlbehälter durch Zugabe von Trockeneis auf -70°C herunter gekühlt. Die frisch entnommenen AlgB-Depots wurden fotografiert. Die ellipsoiden AlgB-Depots wurden mit einer Schieblehre in drei orthogonalen Ausdehnungen vermessen (Länge, Breite, Höhe), um sie später in vier gleichgroße Abschnitte zu unterteilen. Dabei wurde die größte Ausdehnung als "Länge" bezeichnet (x-Achse), die in y-Achse liegende Ausdehnung wurde als "Breite" und die in z-Achse liegende Ausdehnung als "Höhe" bezeichnet. Nach der Vermessung wurden die AlgB-Depots in rechteckige Plastikformen (Peel-A-Way Embedding Mold, Ted Pella Inc., Redding, USA) mit TissueTek (O.C.T. Compound, Sakura, Niederlande) eingebettet, die in das -70°C kalte 2-Methylbutan überführt wurden und dort einfroren. Bei der Einbettung wurde darauf geachtet, dass die orthogonalen Achsen (x-, y- und z-Achse) von AlgB-Depots erfolgte bis zu ihrer weiteren Verarbeitung im Tiefkühler bei -80°C.

3.4.2 Anfertigen von Gefrierschnitten

Für das Anfertigen der Gefrierschnitte wurde der Kryostat HM560 (Microm, Deutschland) benutzt. Zunächst wurde das zu schneidende tiefgefrorene AlgB-Depot in der TissueTek-Plastikform zur Equilibrierung in den -20°C kalten Kryostaten gelegt. Nach 1 Stunde wurde der TissueTek-Block aus der Plastikform durch Antauen der Ränder herausgelöst und in den Probenblock des Kryostaten so eingespannt, dass die Höhe des AlgB-Depots senkrecht zur Schneideklinge des Kryostaten lag. Dadurch wurde das AlgB-Depot in Richtung z-Achse geschnitten. Die Temperatur des TissueTek-Blockes betrug -18°C, die der Schneideklinge -17°C. Die Schnittdicke wurde auf 5µm eingestellt. Während des Schneidens erfolgte die Zählung der Gefrierschnitte automatisch durch den Kryostaten.

Die Gefrierschnitte wurden nach einem systematischen einheitlichen Zufallsprinzip nach der von Gundersen et al. 1987 publizierten Methode angefertigt. Die detaillierte Vorgehensweise ist von S.A. Müller in ihrer Dissertationsschrift beschrieben worden (2008). Anhand der bekannten Höhe jedes AlgB-Depots wurde es in vier gleich hohe parallele Scheiben eingeteilt (Intervalle). Aus jedem Intervall wurde ein Gefrierschnitt für die histologische Auswertung herangezogen. Dabei erfolgte die Auswahl des Gefrierschnittes innerhalb des ersten Intervalls zufällig, indem mit der Zufallsfunktion des Computerprogramms Microsoft Office Excel 2003 zufällig eine Zahl ermittelt wurde, die die Nummer des Gefrierschnittes repräsentierte. Die Nummern der Gefrierschnitte aus den weiteren drei Intervallen wurden dann systematisch so berechnet, dass sie zueinander immer den gleichen Abstand hatten. Da die Anzahl der Intervalle auf vier festgelegt worden war und die Höhe jedes AlgB-Depots bekannt war, konnte die Höhe der einzelnen Intervalle durch mathematische Division errechnet werden. Außerdem war die Schnittdicke ebenfalls festgelegt (5µm), somit konnte die Anzahl an Gefrierschnitten innerhalb der vier gleichgroßen Intervalle auch durch Division berechnet werden. Um die Nummer des zweiten Gefrierschnittes im Intervall zwei zu berechnen, wurde nun die Nummer des ersten Gefrierschnittes mit der Gesamtzahl Gefrierschnitte pro Intervall addiert. Die Nummer des zweiten Gefrierschnittes wurde ebenfalls mit der Gesamtzahl Gefrierschnitte pro Intervall addiert (=Nummer des dritten Gefrierschnittes im Intervall drei) und so weiter. Durch das Mitzählen des Kryostaten während des Schneidens konnten so exakt die berechneten Gefrierschnitte ausgewählt werden. Diese wurden zusammen auf einen Objektträger (Silane-prep slides, Sigma-Aldrich, Deutschland) aufgezogen und bei Raumtemperatur für eine Stunde getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte in einer Objektträgerbox (Objektträger-Behälter, VWR International, Deutschland) bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

3.4.3 CD31-Immunhistochemische Färbung

Um die ins AlgB-Depot hineingewachsenen Blutgefäße mit stereologischen Werkzeugen quantifizieren zu können, wurden die Gefrierschnitte mit einer blutgefäßspezifischen

immunhistochemischen Methode gefärbt. Als Primärantikörper wurde der routinemäßig in der Immunhistologie eingesetzte Endothelzellmarker CD31 (PECAM1 – Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule der Firma BD Pharmingen, Deutschland) ausgewählt. Vor der Färbeprozedur tauten die Gefrierschnitte zunächst bei Raumtemperatur 30min in der geschlossenen Objektträgerbox auf. Die CD31-Färbung wurde mit dem Färbeautomaten DakoAutostainer der Firma Dako-Cytomation (Deutschland) bei Raumtemperatur durchgeführt. Als erstes wurden die Schnitte mit TBS (Tris Buffered Saline, Dako-Cytomation, Blockierungreagenz auf Wasserstoff-Peroxid-Basis Deutschland) gewaschen. Ein (Peroxidase-Block, Dako-Cytomation, Deutschland) blockierte danach die endogene Peroxidase (Inkubationszeit: 10min). Das endogene Biotin wurde dann durch ein Biotin-Blockierungssystem bestehend aus Avidin- und Biotinlösung geblockt (Biotin-Blocking Reagent, Dako-Cytomation, Deutschland; Inkubationszeit pro Lösung: 10min). Nach zweimaliger Waschung mit TBS wurden dann unspezifische Proteinbindungsstellen durch eine 10%ige Ziegenserum-Lösung der Firma Vector Laboratories (USA) blockiert (Inkubationszeit: 10min). Der Primärantikörper, ein monoklonaler Ratte-anti-Maus CD31 Antikörper der Firma BD Biosciences Pharmingen (USA) wurde in einer 1:200 Verdünnung (spezielles Antikörper-Verdünnungsmedium mit Hintergrund-Reduzierung, Dako-Cytomation, Deutschland) für 60min aufgeschichtet. Als Negativkontrolle diente biotinyliertes Immunglobulin IgG2 von der Ratte (1:200). Für die Positivkontrolle wurde Lebergewebe von der Maus verwendet. Nach dreimaliger TBS-Waschung erfolgte die 30minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper, einem biotinylierten Ziege-anti-Ratte-Antikörper (Verdünnung 1:200). Die ebenfalls 30minütige Inkubation mit der in PBS verdünnten (1:300) Extravidin-Horseradish-Peroxidase folgte nach nochmaliger 3fach Waschung mit TBS. Vor und nach der einminütigen Inkubation mit 3,3-Zoll-Diaminobenzidin-Lösung (DAB Liquid, Dako-Cytomation, Deutschland) wurden die Schnitte dreimal mit Agua dest. gespült. Damit war die automatische Färbeprozedur beendet. Alle weiteren Färbeschritte erfolgten manuell. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hämalaun-Lösung für 45sec (Mayer's Hämalaun staining solution, Dako-Cytomation, Deutschland) mit nachfolgender 10minütiger Bläuung unter fließendem Leitungswasser. Danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 95%, 2x100%; 1min; 2min Xylol) entwässert und mit lösemittelhaltigem Medium (Mounting Medium, Dako-Cytomation, Deutschland) unter Deckgläschen (Karl Roth GmbH&Co. KG Deutschland) eingedeckt.

3.4.4 Stereologische Werkzeuge zur Blutgefäßquantifizierung

Mithilfe von stereologischen Werkzeugen wurde die Blutgefäßprofildichte der AlgB-Depots (Anzahl Blutgefäße pro AlgB-Depot-Schnittfläche) modifiziert nach der Methode von Müller bestimmt (2008). Dafür wurden das Mikroskop Axioskop 40 der Firma Zeiss (Deutschland) und die Stereologie-Software Stereo-Investigator (Version 5.05.4, MicroBrightfield

Bioscience, USA) verwendet. Der zu analysierende CD31-gefärbte AlgB-Depot-Schnitt wurde auf der Objektträgerbühne des Mikroskops fixiert. Das mikroskopische Bild des Schnittes wurde durch eine Kamera auf den Computerbildschirm übertragen. Die stereologische Auswertung erfolgte mit der Stereologie-Software. Jeder AlgB-Depot-Schnitt wurde in zwei Vergrößerungen ausgewertet. Zur Quantifizierung solider Flächenanteile wurde die 10fache Vergrößerung benutzt, die Quantifizierung der Blutgefäßanschnitte erfolgte bei 40facher Vergrößerung.

Quantifizierung solider Flächenanteile mit dem Cavalieri-Estimator Die stereologische Auswertung jedes AlgB-Depot-Schnittes begann mit der Quantifizierung solider Flächenanteile innerhalb des Schnittes. Während der Angiogenese waren in das subkutane AlgB-Depot Blutgefäße so hineingewachsen, dass sie die einzelnen Alginatkügelchen netzartig umschlossen. Während der histologischen Aufarbeitung der AlgB-Depots waren die Alginatkügelchen aus diesem Netz herausgelöst worden und im gefärbten Schnitt nur noch als Hohlräume sichtbar. Der AlgB-Depot-Schnitt setzte sich also aus soliden Strukturen (die ins AlgB-Depot eingewachsene Blutgefäße mit Stützgewebe) und diesen leeren Hohlräumen zusammen. Für die Berechnung der Blutgefäßprofildichte (Anzahl Blutgefäße pro AlgB-Depot-Schnittfläche) musste die Fläche des AlgB-Depot-Schnittes berechnet werden. Die Hohlräume im Schnitt sollten in die Berechnung der Blutgefäßprofildichte nicht eingehen, weil sie als präparationsbedingte Artefakte betrachtet wurden. Mit dem Konturwerkzeug der Stereologie-Software wurde als erstes manuell eine Kontur um das Abbild des Schnittes gezogen. Diese Kontur wurde vom Computerprogramm als Grenze des zu analysierenden Gewebes gespeichert. Als nächstes Werkzeug wurde der so genannte "Cavalieri-Estimator" des Stereologieprogrammes zur Bestimmung des Anteils solider Strukturen im AlgB-Depot-Schnitt benutzt. Es wurden zwei Flächen im Schnitt quantifiziert: a) Solide Strukturen (Blutgefäße mit Stützgewebe) und b) Hohlräume. Durch Aktivierung des Cavalieri-Estimator wurde vom Computerprogramm ein Punktenetz über das Abbild des zu analysierenden Schnittes projiziert (Abbildung 12). Das Punktenetz bestand aus Einzelpunkten, deren Abstand zueinander auf 800µm in x- und y-Richtung festgesetzt wurde. Vier Punkte eines imaginären Quadrates innerhalb dieses Punktenetzes repräsentierten somit eine Fläche von 640.000 μ m² (= *a*). Vom Punktenetz wurde jeder Punkt gezählt, der sich innerhalb der am Anfang manuell gelegten Kontur befand. Wenn ein Punkt P über einer soliden Struktur lag, wurde er mit einem • markiert und gezählt. Wenn ein Punkt K über einem Hohlraum lag, wurde er mit einem + markiert und extra gezählt (Abbildung 12). Um die Fläche der soliden Strukturen (= $a_{solide Strukturen}$) und die der Hohlräume (= $a_{Hohlräume}$) im AlgB-Depot-Schnitt zu berechnen, wurden die Anzahl aller Punkte P bzw. die Anzahl aller Punkte K mit der Fläche des imaginären Punktequadrates a multipliziert. Als drittes konnte durch Addieren beider Flächen die Gesamtfläche des Schnittes berechnet werden.

Ergebnisse der Quantifizierung mit dem Cavalieri-Estimator als Grundlage für die Berechnung der Blutgefäßprofildichte:

- 1. asolide Strukturen: die Fläche solider Strukturen im AlgB-Depot-Schnitt,
- 2. *a*_{Hohlräume}: die Fläche der AlgB-Hohlräume im AlgB-Depot-Schnitt und
- 3. *a_{gesamt}*: die Gesamtfläche des AlgB-Depot-Schnittes.



Abbildung 12: AlgB-Depot-Schnitt mit Cavalieri-Punktenetz. Der Abstand der Punkte, die durch große grüne Kreuze dargestellt sind, betrug in x- und y-Richtung 800µm. Alle grünen Kreuze, die sich innerhalb der Kontur befanden, wurden gezählt. Die weißen Kreuze lagen außerhalb der Kontur und wurden nicht gezählt. Blaue Punkte markierten die Kreuze, deren Mittelpunkt direkt über solidem Gewebe lag, pinkfarbene kleine Kreuze markierten die Kreuze, deren Mittelpunkt direkt über Hohlraum lag.

Quantifizierung der Blutgefäßanschnitte mit dem Fractionator Als nächstes stereologisches Werkzeug wurde der Fractionator der Computersoftware für die systematische Zählung der Blutgefäße im AlgB-Depot-Schnitt benutzt. Dieser verfügte über einen Zählrahmen, dessen Größe auf 150x300µm (45.000 µm²) festgelegt und für alle AlgB-Depot-Schnitte beibehalten wurde (Abbildung 13). Von jedem AlgB-Depot-Schnitt wurden mehrere Gesichtsfelder ausgewertet, die einen festgelegten Abstand von 1100µm x 1100µm in x- bzw. y- Richtung hatten. Der definierte Abstand ermöglichte die systematische Auswahl der Gesichtsfelder durch die Computersoftware. Über den Befehl "Meanderscan" erfolgte das automatische Ansteuern der auszuwertenden Gesichtfelder über das Computerprogramm. Der Zählrahmen wurde auf jedes auszuwertende Gesichtsfeld projiziert. Es wurde jedes Blutgefäß gezählt, das sich innerhalb des Zählrahmens befand oder die Einschluss-Linie (grüne gestrichelte Linie in Abbildung 13) berührte oder übertrat. Alle Blutgefäße, die die Ausschluss-Linie (rote durchgezogene Linie in Abbildung 13) berührten übertraten, nicht gezählt. Als oder wurden Blutgefäß wurde jede

immunhistochemisch positiv gefärbte Endothelzelle oder jeder immunhistochemisch positiv gefärbte Endothelzellhaufen definiert. Die positiven Ereignisse wurden mit * markiert und gezählt. Die soliden Strukturen im AlgB-Depot-Schnitt bildeten ein Netzwerk zwischen unterschiedlich stark ausgeprägten Hohlräumen. Die Blutgefäße konnten sich nur innerhalb der soliden Strukturen befinden. Um die Ergebnisse aus der Blutgefäß-Zählung der AlgB-Depots vergleichbar zu machen, war eine Bezugsgröße nötig, weil die Zählung der Blutgefäße stichprobenartig an einigen Gesichtsfeldern des Schnittes und nicht für den gesamten Schnitt erfolgte. Der Anteil solider Flächen und der Anteil von Hohlraumflächen in einem solchen Gesichtsfeld wurde als Bezugsgröße gewählt. Hierfür wurde die Zählrahmenfläche von 45.000µm² in 4 gleichgroße Quadranten mit einer Fläche von 11.250 μm^2 (= a_0) eingeteilt. Immer wenn ein solcher Quadrant des Zählrahmens über soliden Strukturen lag, wurde er mit markiert und gezählt. Die Anzahl der Marker multipliziert mit der Quadrantenfläche a_Q ergab die Fläche solider Strukturen bezogen auf die betrachteten Gesichtsfelder (*a*_{Osolide}). *a*_{Osolide} diente als Normierungsgröße für die gezählten Blutgefäße, indem deren Anzahl pro 1mm² a_{Qsolide} angegeben wurde. Das Ergebnis der Fractionator-Auswertung war die Blutgefäßanzahl pro 1mm² **a**_{Qsolide}.



Abbildung 13: Gesichtsfeld eines AlgB-Depot-Schnittes mit Zählrahmen. Rot hervorgehoben ist die Ausschlusslinie des Rahmens, grün die Einschlusslinie. Grüne Sterne im Zählrahmen kennzeichnen die gezählten Blutgefäßprofile. Blaue Quadrate an den Ecken des Zählrahmens markieren jeweils einen Quadranten des Zählrahmens, wenn er über solidem Gewebe lag.

Berechnung der Blutgefäßprofildichte des AlgB-Depot-Schnittes In dieser Arbeit sollte die stereologisch bestimmte Blutgefäßanzahl eines AlgB-Depots mit der sonographisch gemessenen Kontrastsignalintensität dieses AlgB-Depots korreliert werden. Die Kontrastsignalintensität wurde dabei für eine zweidimensionale Fläche bestimmt. Die Blutgefäßanzahl sollte nun ebenfalls für die gesamte zweidimensionale AlgB-Depot-Schnittfläche bestimmt werden (wird in dieser Arbeit als Blutgefäßprofildichte BGPD bezeichnet). Zur Berechnung dieser Blutgefäßprofildichte wurde die mit dem Fractionator bestimmte Blutgefäßanzahl/mm² (siehe oben) mit der in der Cavalieri-Untersuchung ermittelten Gesamtfläche solider Strukturen im AlgB-Depot-Schnitt (siehe oben) multipliziert. Das Ergebnis war die Blutgefäßprofildichte in Blutgefäßprofilen pro AlgB-Depot-Schnittfläche.

Von jedem AlgB-Depot wurden vier Schnitte auf diese Weise ausgewertet. Für die Korrelation der stereologisch ermittelten Blutgefäßprofildichte mit der sonographischen Kontrast-signalintensität wurde das arithmetische Mittel der vier Einzelwerte herangezogen.

3.5 Versuchsdesigns der in vivo Studien

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente sind mit ihrer Zielstellung in der Einleitung vorgestellt worden (Kapitel 1). Im nun folgenden Abschnitt werden Versuchsaufbau und Durchführung der einzelnen Experimente detailliert beschrieben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die einzelnen Experimente in allen nachfolgenden Kapiteln durch die Nummern angegeben, die in der Einleitung festgelegt worden sind.

3.5.1 Experiment 1: Proof of Principle in immundefizienten Mäusen

Im ersten Experiment sollte getestet werden, ob die Gefäßeinsprossung in AlgB-Depots zu definierten Zeitpunkten mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall zu detektieren und die Blutgefäße über die Kontrastsignalintensität zu guantifizieren sind. Die guantitativen Ultraschalldaten sollten dann mit der stereologisch ermittelten Blutgefäßprofildichte der histologisch aufbereiteten AlgB-Depots korreliert werden. Im ersten Versuch wurden wie bei den routinemäßig eingesetzten onkologischen Tiermodellen immundefiziente Nacktmäuse eingesetzt. Für diese Untersuchung wurden zunächst AlgBs nach dem in Punkt 3.2.2 erläuterten Protokoll frisch hergestellt. In einem Teil der AlgBs wurden zur Anregung der Blutgefäßeinsprossung ins AlgB-Depot proangiogene Faktoren verkapselt. Dafür wurden der Alginatlösung vor Vertropfen ins CaCl₂-Bad die humanen rekombinanten Wachstumsfaktoren VEGF und FGF in den Konzentrationen 80µg/ml und 40µg/ml zugesetzt. Anstelle der Wachstumsfaktoren wurde den Kontroll-AlgBs isotone Kochsalzlösung beigemischt (VEGF/FGF-freie AlgBs). Die frischen AlgBs wurden den Versuchstieren umgehend subkutan appliziert, wie in Punkt 3.3.3 beschrieben. Die Versuchstiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Ausgangspunkt für die Zuteilung zur Gruppe 1 (VEGF/FGF-enthaltende AlgBs) oder 2 (leere AlgBs, Kontrollgruppe) war das Körpergewicht des Einzeltieres zum Zeitpunkt der Einteilung. Nachdem das Körpergewicht jedes Einzeltieres ermittelt worden war, wurden alle Tiere nach aufsteigendem Gewicht sortiert und abwechselnd der Gruppe 1 oder 2 zugeordnet. Beide Gruppen bestanden aus 15 Tieren. Jeder Maus in Gruppe 1 wurden 0,1ml VEGF/FGF-enthaltende AlgBs subkutan in die rechte Flanke injiziert. Die Gruppe 2 erhielten jeweils 0,1ml VEGF/FGF-freie Mäuse in AlgBs. Die

Ultraschalluntersuchungen wurden wie in Punkt 3.3.4.3 beschrieben durchgeführt. Die AlgB-Depot-Volumenbestimmung erfolgte für alle 15 Tiere pro Gruppe am Tag der AlgB-Depot-Setzung (Tag 0) sowie 3 Tage danach. An den Tagen 14, 21 und 28 wurden wie nachfolgend beschrieben jeweils 5 Tiere aus jeder Gruppe ausgewählt, deren AlgB-Depots sonographisch und histologisch untersucht wurden. Die Messung der AlgB-Depot-Kontrastsignalintensität erfolgte ebenfalls an den Tagen 3 (alle 15 Tiere), 14 (5 Tiere), 21 (5 Tiere) und 28 (5 Tiere) nach AlgB-Depotsetzung. Am Tag 0 wurde keine Kontrastsignalintensität bestimmt, da sich noch keine gewachsenen Blutgefäße im AlgB-Depot befinden konnten. Am Tag 3 wurden alle 15 Tiere pro Gruppe sonographisch untersucht und danach zum Aufwachen in einem Wärmeschrank untergebracht. 14 Tage nach AlgB-Depot-Setzung wurden die 5 schwersten Tiere aus jeder Gruppe für die nächste Messung ausgewählt, da vorausgesetzt wurde, dass die übrig bleibenden Tiere bis zur Messung 21 bzw. 28 Tage nach AlgB-Depot-Setzung an Körpergewicht zunehmen würden. Indem zu jedem Messzeitpunkt die 5 schwersten Tiere für die Messung ausgewählt wurden, sollten für den jeweiligen Zeitpunkt im Mittel ähnlich schwere Tiere zur Verfügung stehen. Nach erfolgter 3D-B-Mode- und kontrastverstärkter Ultraschalluntersuchung wurden die noch narkotisierten Tiere schmerzfrei getötet und es erfolgte umgehend die in Kapitel 3.4 beschriebene Konservierung der AlgB-Depots für die histologische Analyse. Nach gleichem Prinzip erfolgten weitere Ultraschallmessungen mit anschließender histologischer AlgB-Depot-Aufbereitung 21 und 28 Tage später.



Abbildung 14: Zeitlicher Ablauf des ersten Experimentes: 3 Tage nach AlgB-Depot-Setzung erfolgte die Start-Ultraschallmessung für alle 15 Tiere pro Gruppe. Am Tag 14, 21 und 28 wurden jeweils 5 Tiere pro Gruppe für die Ultraschallmessung mit anschließender histologischer Auswertung der Blutgefäßprofildichte ausgewählt.

3.5.2 Experiment 2: Longitudinalstudie in immundefizienten Mäusen

Es folgte eine intraindividuelle Verlaufsuntersuchung (Longitudinalstudie) der AlgB-Depot-Angiogenese über einen Zeitraum von 4 Wochen in immundefizienten Mäusen. Dabei sollte geklärt werden, ob eine zunehmende Vaskularisierung der individuellen AlgB-Depots in vivo mit dem kontrastverstärkten Mikro-US verfolgt werden könnte. Hier wurden jeweils 5 der sonographisch untersuchten AlgB-Depots unmittelbar nach Ultraschallmessung für die direkte Korrelation histologisch aufbereitet. Die übrig bleibenden AlgB-Depots wurden zum nächsten Untersuchungszeitpunkt erneut sonographisch untersucht. AlgB-Herstellung, -Applikation, sonographische und histologische Untersuchungen erfolgten nach den zuvor beschriebenen Protokollen (Punkte 4.2.1, 4.3.3 und 4.4.). In diesem Versuch gab es zwei Gruppen a 20 Mäuse. Gruppe 1 erhielt VEGF/FGF-enthaltende und Gruppe 2 VEGF/FGFfreie AlgBs. Die erste kontrastverstärkte Ultraschallmessung zur Blutgefäßguantifizierung erfolgte für alle 40 AlgB-Depots 3 Tage nach AlgB-Depot-Setzung. Die zweite Messung aller AlgB-Depots wurde 4 Tage später (Tag 7) durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt wurden die 5 schwersten Tiere jeder Gruppe nach der Ultraschalluntersuchung schmerzfrei getötet und die AlgB-Depots konserviert. Die restlichen Tiere wurden eine Woche später (Tag 14) erneut sonographisch untersucht und wieder wurden nach der Ultraschallmessung die 5 schwersten Tiere jeder Gruppe für die Konservierung der AlgB-Depots schmerzfrei getötet. Gleiches wurde zu Tag 21 wiederholt, so dass am Tag 28 die 5 verbleibenden Tiere untersucht und schmerzfrei getötet wurden. Am Versuchsende war es möglich, a) die sonographischen Kontrastsignalintensitäten von individuellen AlgB-Depots als Verlauf über den Zeitraum von 28 Tagen zu betrachten und b) sonographische Kontrastsignalintensität und stereologische Blutgefäßprofildichte der individuellen AlgB-Depots miteinander zu korrelieren.



Abbildung 15: Zeitlicher Ablauf Experiment 2: Am Tag 3, 7, 14, 21 und 28 wurden alle AlgB-Depots sonographisch untersucht. Am Tag 7, 14, 21 und 28 wurden anschließend jeweils 5 AlgB-Depots pro Gruppe für die histologische Quantifizierung der Blutgefäßprofildichte aufbereitet.

3.5.3 Experiment 3: Longitudinalstudie in immunkompetenten Mäusen

Der dritte Versuch wurde durchgeführt, um einen möglichen Einfluss des Immunstatus der Versuchstiere auf die AlgB-Depot-Volumina und –Angiogenese über die Zeit zu untersuchen. Der Versuch wurde ebenfalls als intraindividuelle Verlaufsuntersuchung über 28 Tage, jedoch in immunkompetenten NMRI-Mäusen durchgeführt. Die stereologische Bestimmung der Blutgefäßprofildichte und deren Korrelation mit den sonographischen Daten erfolgten nur für den letzten Untersuchungszeitpunkt. AlgB-Herstellung, -Applikation, sonographische und histologische Untersuchungen erfolgten nach den zuvor beschriebenen Protokollen (Punkte 4.2.1, 4.3.3 und 4.4.). Den 7 NMRI-Mäusen in Gruppe 1 wurden VEGF/FGF-enthaltende

AlgBs subkutan injiziert, die 7 NMRI-Mäuse in Gruppe 2 bekamen VEGF/FGF-freie AlgBs. Den Fellmäusen wurden vor der AlgB-Depot-Setzung wie in Punkt 4.3.3 beschrieben die Haare in der rechten Flankenregion in einem Bereich von 3x3 cm entfernt. Die sonographische Untersuchung aller 14 AlgB-Depots erfolgte 3, 7, 14, 21 und 28 Tage nach AlgB-Depot-Setzung. Am letzten Untersuchungstag wurden alle Tiere nach der Ultraschallmessung unter Narkose schmerzfrei getötet und die AlgB-Depots wurden für die stereologische Bestimmung der Blutgefäßprofildichte konserviert. Ultraschall- und Histologiedaten wurden für diesen letzten Untersuchungszeitpunkt korreliert.



Abbildung 16: Zeitlicher Ablauf des 3. Experiments: Pro Gruppe wurden 7 immunkompetente Mäuse eingesetzt, die Ultraschallmessungen begannen 3 Tage nach AlgB-Depot-Setzung und erfolgten in wöchentlichem Abstand über 4 Wochen. Alle AlgB-Depots wurden am Versuchsende histologisch aufgearbeitet und stereologisch ausgewertet.

3.5.4 Experiment 4: Therapiemonitoring in immunkompetenten Mäusen

Nach der Charakterisierung des Tumorsurrogat-Angiogenese-Modells sollte dieses erstmalig in einer antiangiogenen therapeutischen Verlaufsstudie eingesetzt werden. Der vierte Versuch sollte zeigen, inwiefern das Tumorsurrogat-Angiogenese-Modell in Verbindung mit dem kontrastverstärkten µUS als Routine-Methode geeignet wäre, um frühzeitig sensitiv antiangiogene Effekte verschiedener Substanzklassen in vivo messen zu können. In dieser Studie wurden ausschließlich VEGF/FGF-enthaltende AlgBs verwendet, die immunkompetenten NMRI-Mäusen subkutan injiziert wurden.

Dafür wurden Vertreter von zwei antiangiogenen Substanzklassen eingesetzt (Punkt 2.3.3.2):

- Der zugelassene monoklonale Antikörper gegen humanes VEGF-A₁₆₅: Bevacizumab (Avastin® Injektionslösung 25mg/ml, PZN3159652, Roche Pharma AG; Schweiz, Punkt 2.3.3.2.1) sowie
- der orale Multityrosinkinase-Inhibitor Regorafenib, eine Entwicklungssubstanz der Bayer Schering Pharma AG, die sich zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit in klinischen Studien der Phase III befindet.

Bevacizumab sollte im Tumorsurrogat-Angiogenese-Modell das aus den AlgB-Depots freigesetzte rekombinante humane VEGF-A₁₆₅ abfangen, bevor es durch Bindung an

Endothelzellrezeptoren die lokale Angiogenese ins AlgB-Depot induzieren konnte. Die im Versuch eingesetzte Dosierung betrug 5mg pro kg Körpergewicht. Eine Gruppe von 10 immunkompetenten AlgB-Depot-tragenden NMRI-Mäusen erhielt den spezifischen monoklonalen Antikörper als mit isotoner Natriumchloridlösung 1:20 verdünnte Lösung montags bis freitags einmal pro Tag über 4 Wochen intraperitoneal verabreicht. An den Wochenenden fand keine Behandlung statt.

Regorafenib (BAY73-4506) bindet an Zielstrukturen entlang eines Spektrums angiogener Signalwege einschließlich der endothelialen Rezeptoren VEGF-R2 und TIE-2 und bewirkt dadurch antiangiogene Effekte. Im Tumorsurrogat-Angiogenese-Modell wurde die Substanz eingesetzt, um ihren rein antiangiogenen Effekt zu untersuchen. Die eingesetzte Dosis von 10mg/kg wurde einer weiteren Gruppe von 10 AlgB-Depot-tragenden NMRI-Mäusen oral einmal täglich über 4 Wochen (Wochenenden ausgenommen) verabreicht.

Für jede der beiden Behandlungsgruppen wurde eine Vehikelgruppe angesetzt, die ebenfalls VEGF/FGF-enthaltende AlgB-Depots bekam. Die zwei Vehikelgruppen wurden mit den jeweiligen Trägerstoffen der beiden Wirkstoffe behandelt. Die Gründe für das Ansetzen von zwei separaten Vehikelgruppen waren erstens die unterschiedlichen Applikationswege (Bevacizumab i.p.; Regorafenib p.o.) und zweitens die verschiedenen Trägerstoffe (Bevacizumab: isotone Kochsalzlösung, Regorafenib: Propylenglykol-PEG400-PluronicF68).

Gruppe 1 (n=10): 5mg/kg Bevacizumab i.p. 1xtgl.	Gruppe 2 (n=10): 10ml/kg Trägersubstanz 1 i.p. 1xtgl.
---	---

Gruppo 3 (n=10): 10mg/kg BAV 73 4506 n.o. 1ytal	Gruppo 4 (n=10): 10ml/kg Trägorsubstanz 2 n.o. 1xtgl
Gruppe 5 (II–10). Torrig/kg BAT 75-4500 p.0. Txtgi.	Gruppe 4 (II–10). Tornikg tragersubstanz 2 p.o. Tkigi.

Abbildung 17: Einteilung der Versuchsgruppen für Experiment 4 links: Die Gruppen 1 und 3 wurden mit den Wirkstoffen behandelt, rechts: Die Gruppen 2 und 4 wurden mit den jeweiligen Trägerstoffen behandelt Der Versuch wurde ebenfalls als intraindividuelle Verlaufsuntersuchung über 28 Tage in immunkompetenten NMRI-Mäusen durchgeführt. Die stereologische Bestimmung der Blutgefäßprofildichte und deren Korrelation mit den sonographischen Daten erfolgten für den letzten Untersuchungszeitpunkt. AlgB-Herstellung, -Applikation, sonographische und histologische Untersuchungen erfolgten nach den zuvor beschriebenen Protokollen.



Abbildung 18: Zeitlicher Ablauf des 4. Experiments: 40 Tiere erhielten zu Versuchsbeginn VEGF/FGFenthaltende AlgB-Depots. Die Behandlung der Tiere mit Wirk- respektive Trägerstoffen startete am gleichen Tag. Die Ultraschall-Startmessung erfolgte 7 Tage nach AlgB-Depot-Setzung, die Folgemessungen wurden in wöchentlichem Abstand durchgeführt. Alle AlgB-Depots wurden am Versuchsende histologisch ausgewertet.

3.6 Statistische Versuchsauswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Hannes-Friedrich Ulbrich, Principal Statistician in der Abteilung Global Drug Discovery Statistics der Bayer Schering Pharma AG.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit α für den Fehler I. Art wurde in dieser Arbeit auf 5% (α =0,05) gesetzt. Mit Hilfe des Statistik-Programmsystems SAS in der Version 9.1.3 (SAS Institute Inc. USA) wurde die Überschreitungswahrscheinlichkeit p berechnet. War p < α wurde von einer signifikanten, nicht zufallsbedingten Abweichung der Nullhypothese ausgegangen. Die Graphiken wurden mit dem Programm Graph Pad Prism Version 5.02 (USA) erstellt.

Wichtige Voraussetzungen für die Anwendung der gewählten statistischen Verfahren sind, dass sich die zu untersuchenden Variablen gut durch die Gaußsche Normalverteilung beschreiben lassen und dass gleichzeitig zwischen den Gruppen eine Varianzhomogenität angenommen werden kann. Bei den vorliegenden biologischen Daten handelt es sich ausschließlich um positive Messwerte. Eine Überprüfung der Daten ergab, dass durch Logarithmieren transformierte Daten diesen Voraussetzungen deutlich besser entsprechen als die untransformierten Original-Daten. Für die Original-Daten wird somit die Lognormalverteilung als ein gutes Modell angenommen. Alle nachfolgend beschriebenen Analysen erfolgten anhand der zur Basis 10 logarithmierten Werte. Für die Beschreibung und graphische Darstellung der Ergebnisse im Text wurden die Log-Daten wieder entlogarithmiert.

Bei den im Ergebnisteil aufgeführten Werten handelt es sich immer um Mittelwerte, die auf der Grundlage eines gemischten linearen Modells berechnet wurden. Alle Rohdaten sind im tabellarischen Anhang aufgeführt. Für die statistische Analyse wurde ein Varianzkomponentenmodell mit autoregressiver AR(1)-Kovarianzstruktur angepasst (beträgt die Kovarianz zwischen zwei aufeinander folgenden Messpunkten ρ , so beträgt sie zwischen zwei Messpunkten mit einem Messpunkt dazwischen ρ^2 usw., so dass die Korrelation mit zunehmender Entfernung der Messpunkte betragsmäßig abnimmt). Bei dieser Modellierung wurde miteinbezogen, dass es sich bei den erhobenen Daten um wiederholte Messungen an gleichen Tieren handelte, die Messwerte über die Zeit also voneinander abhängig waren. Für das AlgB-Depotvolumen wurde der Untersuchungszeitpunkt Tag 0 (=Vorwert) als Kovariate miteinbezogen. Zusammen mit den Mittelwerten wurden zusätzlich die unadjustierten 5%-Konfidenzintervalle der Mittelwertschätzung aus der untersuchten Stichprobe angegeben und dargestellt.

Bei der statistischen Analyse wurden für jedes Experiment separat die folgenden Fragen betrachtet:

1. Gibt es Wechselwirkungen zwischen Gruppenzugehörigkeit und Zeit? (Gibt es ein einheitliches Muster, in dem die Gruppen über die Zeit verschieden sind?)

Konnte keine Wechselwirkung ermittelt werden (α >0,05), wurde untersucht, inwiefern es

- 2. eine Veränderung über die Zeit sowie
- 3. einen Unterschied zwischen den Gruppen gab.

Der Zusammenhang zwischen sonographischer und histologischer Blutgefäßquantifizierung wurde in dieser Arbeit als linear angenommen, da zum Zeitpunkt der Datenanalyse die tatsächliche Qualität des Zusammenhangs von sonographischen und histologischen Daten nicht bekannt war. Die Korrelation der beiden Variablen erfolgte mit der Spearman-Korrelationsanalyse. Bei einem Spearman-Korrelationskoeffizient r_s zwischen 0 und 1 wurde von einer positiven Korrelation beider Variablen ausgegangen, bei der größere Werte in dem einen Merkmal mit eher größeren Werten des anderen einhergehen.
4 ERGEBNISSE

4.1 In vitro Charakterisierung der Alginatbeads

AlgB-Größenbestimmung Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der AlgB-Größenbestimmung aus drei AlgB-Herstellungen (= Chargen) gemäß Standardprotokoll. Der Durchmesser der AlgBs lag zwischen 751±26 und 990±44µm.

	Charge 1	Charge 2	Charge 3
AlgB-Durchmesser	812± 42	990± 44	751± 26

 Tabelle 5: Mittlerer AlgB-Durchmesser aus drei AlgB-Herstellungen als Mittelwert ± Standardabweichung von jeweils 200 einzeln vermessenen AlgBs.

AlgB-Morphologie In Abbildung 19 sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von AlgBs aus der Standardherstellung zu sehen. Die AlgBs sind tropfenförmig, haben eine leicht raue Oberfläche und sind bis in den Kern gelförmig ausgehärtet. Sie weisen unregelmäßig große Poren auf (rechtes Bild, weiße Pfeile).



Abbildung 19: Rasterelektronenmikroskopische Bilder von einzelnen AlgBs Links: Übersichtsaufnahme mehrerer tropfenförmiger AlgBs; Mitte: Einzelnes AlgB in Nahaufnahme. Rechts: Querschnitt durch ein AlgB: Das Innere ist durch eine solide Struktur mit unregelmäßig großen Poren gekenzeichnet (weiße Pfeile).

AlgB-Mikrobiologie Die AlgBs sollten in lebende Versuchstiere injiziert und über einen Zeitraum von vier Wochen in vivo untersucht werden, deshalb erfolgte zuvor eine Überprüfung der Sterilität. Bei jeder Probe lag diese unterhalb der Nachweisgrenze von 1KbE/g AlgBs. Somit war keine mikrobielle Kontamination der AlgBs nachweisbar (Tabelle 6).

Medium	Ch. 1	Ch. 2	Ch. 3	Ch. 4	Ch. 5	Ch. 6	Ch. 7	Ch. 8	Ch. 9	Ch. 10
Keimzahl [KbE/g AlgBs]	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

 Tabelle 6: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung von 10 AlgB-Chargen (Gussplattenverfahren mit CS-Agar und Sab-Agar): Bei allen Chargen wurden <1 KbE/g AlgB gezählt (= kein sichtbares Keimwachstum).</th>

4.2 Reproduzierbarkeit der sonographischen Messungen

Volumetrie subkutaner AlgB-Depots In Tabelle 7 sind Mittelwert und Standardabweichung der Ergebnisse der AlgB-Depot-Volumenbestimmung von drei in der sonographischen Vermessung subkutaner AlgB-Depots unterschiedlich erfahrenen Untersuchern erfasst. Die Einzelwerte der 15 Messungen pro Untersucher und AlgB-Depot sind im Anhang in Tabelle

Reproduzierbarkeit der Volumenmessung subkutaner AlgB-Depots AlgB-Depotvolumen [mm ³]										
AlgB-Depot	Erfahrungsgrad 0	Erfahrungsgrad 1	Erfahrungsgrad 2							
1	60±2	63±1	59±1							
2	69±2	71±1	68±1							

21 zu finden. Die Ergebnisse der AlgB-Volumenbestimmung von AlgB-Depot 1 schwankten zwischen 59 und 63mm³. Die Volumina von AlgB-Depot 2 lagen zwischen 68 und 71mm³.

 Tabelle 7: Ergebnisse der Volumenbestimmung von zwei AlgB-Depots durch drei unterschiedlich erfahrene

 Untersucher (Mittelwert ± Standardabweichung).

Blutgefäßquantifizierung der AlgB-Depots Tabelle 8 zeigt Mittelwert und Standardabweichung der Ergebnisse aus der Kontrastsignalintensitätsbestimmung zweier AlgB-Depots von 3 in der Auswertung kontrastverstärkter subharmonischer CineLoops unterschiedlich erfahrenen Untersuchern. Die Einzelwerte der 15 Messungen pro Untersucher und AlgB-Depot sind im tabellarischen Anhang in Tabelle 22 gelistet. Die Werte der Kontrastsignalintensität von AlgB-Depot 1 schwankten zwischen 67 und 72 Graustufen und die von AlgB-Depot 2 zwischen 82 und 99 Graustufen.

Reproduzierbarkeit der KSI-Bestimmung subkutaner AlgB-Depots AlgB-Depot-Kontrastsignalintensität [Graustufen]										
AlgB-Depot	AlgB-Depot Erfahrungsgrad 0 Erfahrungsgrad 1 Erfahrungsgrad 2									
1	68±1	72±1	67±1							
2	82±5	99±5	99±4							

 Tabelle 8:
 Ergebnisse der KSI-Bestimmung von zwei AlgB-Depots durch drei unterschiedlich erfahrene

 Untersucher (Mittelwert ± Standardabweichung).

4.3 In vivo Studien

4.3.1 Experiment 1: Proof of Pinciple in immundefizienten Mäusen

Im ersten in vivo Versuch sollte geprüft werden, ob sich der kontrastverstärkte µ-Ultraschall grundsätzlich als in vivo Verfahren zur Darstellung und Quantifizierung der Gefäßentwicklung in den AlgB-Depots in Mäusen eignet.

Volumetrie

Abbildung 20 zeigt exemplarisch einen 3D-Block eines subkutanen AlgB-Depots im sagittalen Anschnitt. Das AlgB-Depot ist von der umgebenden Haut und Unterhaut gut abgrenzbar. Es stellt es sich echoarm gegenüber der direkt darüber liegenden stark echogenen Oberhaut dar, die netzartige Innenstruktur wird durch einzelne AlgBs verursacht.



Abbildung 3D-Block 20: eines subkutanen AlgB-Depots: Zu sehen ist der sagittale Anschnitt des AlgB-Depots, dessen Innenstruktur sich durch einzelne AlgBs netzartig darstellt. Die rote Kontur wurde nachträglich manuell mit der im Ultraschallgerät Vevo770 integrierten Software Standard Measurements Version 3.0.0 von VisualSonics um die äußere AlgB-Depot-Begrenzung gelegt. Das AlgB-Depot war hierbei durch seine Darstellung echoarme von der umgebenden echoreichen Ober- und Unterhaut gut abgrenzbar.

Tabelle 9 zeigt die sonographisch ermittelten AlgB-Depot-Volumina von VEGF/FGFenthaltenden und -freien AlgB-Depots als Mittelwert mit 95% igem Konfidenzintervall pro Ultraschall-Untersuchungszeitpunkt. Die Einzelwerte jedes AlgB-Depots sind im tabellarischen Anhang in Tabelle 23 zu finden. Zu den Zeitpunkten 14, 21 und 28 Tage nach AlgB-Depotsetzung wurden jeweils 5 AlgB-Depots sofort nach der Ultraschalluntersuchung für die histologische Blutgefäßquantifizierung aufbereitet.

AlgB-Depot-Volumen [mm ³] Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall (=KI)									
Ultraschall- Ultraschall- Ultraschall- Depots Kontrollen									
zeitpunkt	n	KI unten	Mittel- wert	KI oben	n	KI unten	Mittel- wert	KI oben	
Tag 3	15	90	103	118	15	65	75	86	
Tag 14	5	73	93	117	5	73	92	117	
Tag 21	5	95	121	153	5	55	70	89	
Tag 28	5	79	100	127	5	59	75	95	

Tabelle 9: Gegenüberstellung der Volumina von VEGF/FGF-enthaltenden und –freien AlgB-Depots (=Kontrollen) pro Untersuchungszeitpunkt (Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall). In beiden Gruppen wurden an Tag 14, Tag 21 und Tag 28 jeweils 5 AlgB-Depots ausgewählt, sonographisch untersucht und anschließend für die Blutgefäßprofildichtenbestimmung histologisch aufbereitet.

Es wurde keine gegenseitige Beeinflussung von Gruppenzugehörigkeit und Zeitverlauf festgestellt (p>0,05, siehe hierzu Punkt 3.6), deshalb konnten beide Variablen separat betrachtet werden. Bis auf Tag 14 waren die AlgB-Depot-Volumina der VEGF/FGFenthaltenden AlgB-Depots zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant größer als die –freien (p=0,0005). Sie schwankten über den Versuchszeitraum zwischen im Mittel 93 und 121mm³ (VEGF/FGF-enthaltende AlgB-Depots) gegenüber 70-92mm³ (Kontrollen) ohne zeitabhängige Beeinflussung (p=0,91).

In vivo Blutgefäßquantifizierung

In Abbildung 21 sind beispielhaft zwei AlgB-Depots im sagittalen Anschnitt nach abgeschlossener Auswertung der subharmonischen CineLoops gegenübergestellt. Rechts neben den Ultraschallbildern sind die AlgB-Depots als makroskopische Aufnahmen nach Versuchsende zu sehen. Reihe 1 zeigt ein VEGF/FGF-enthaltendes, Reihe 2 ein –freies AlgB-Depot. In den beiden linken Ultraschallbildern sind die AlgB-Depots an Tag 3 zu sehen. Die Kontrastsignale sind fehlfarbendargestellt als grüne Bereiche in der Peripherie deutlich sichtbar. Das VEGF/FGF-enthaltende AlgB-Depot weist ein stärkeres Kontrastsignal auf. Die beiden mittleren Ultraschallbilder zeigen jeweils dasselbe AlgB-Depot 14 Tage später. Es sind deutlich mehr Kontrastsignale im VEGF/FGF-enthaltenden als im VEGF/FGF-freien AlgB-Depot zu sehen. Ebenfalls ist eine klare Zunahme der Signale im VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depot von Tag 3 zu Tag 14 erkennbar, die im VEGF/FGF-freien AlgB-Depot nicht deutlich wird. Die makroskopischen Bilder zeigen den klaren Unterschied des Vaskularisierungsgrades zwischen VEGF/FGF-enthaltendem und -freiem AlgB-Depot. Das obere AlgB-Depot enthält Blutgefäße und hat dadurch eine orange-gelbliche Farbe, während das untere von transparenter Gestalt ist und keine Blutgefäße erkennbar sind.



Abbildung 21: Beispiele von kontrastverstärkten Ultraschallbildern eines VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots (Reihe 1) und eines VEGF/FGF-freien AlgB-Depots (Reihe 2) drei Tage (Bilder links) und vierzehn Tage (Bilder Mitte) nach AlgB-Depotsetzung. Rechts daneben die makroskopische Befundung derselben AlgB-Depots am Tag 14.

Tabelle 10 zeigt die sonographisch gemessene Kontrastsignalintensität (KSI) der VEGF/FGF-enthaltenden und –freien AlgB-Depots als Mittelwert mit 95% igem Konfidenzintervall pro Ultraschall-Untersuchungszeitpunkt. Die Einzelwerte jedes AlgB-Depots sind im tabellarischen Anhang in Tabelle 24 zu finden. In beiden Gruppen wurden an Tag 14, Tag 21 und Tag 28 je 5 AlgB-Depots sonographisch untersucht und anschließend für die Blutgefäßprofildichtenbestimmung histologisch aufbereitet.

AlgB-Depot-Kontrastsignalintensität [Graustufen] Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall (=KI)									
Ultraschall-	EGF/FGF-6	e AlgB-	Kontrollen						
zeitpunkt	n	KI unten	Mittel- wert	KI oben	n	KI oben			
Tag 3	15	77	83	89	15	66	71	76	
Tag 14	5	103	116	131	5	64	72	81	
Tag 21	5	110	124	140	5	64	73	82	
Tag 28	5	103	116	131	5	67	75	85	

Tabelle 10: Gegenüberstellung der Entwicklung der Kontrastsignalintensität (KSI) von VEGF/FGF-enthaltendenund –freien AlgB-Depots (=Kontrollen) pro Ultraschall-Untersuchungszeitpunkt (Mittelwert mit 95%Konfidenzintervall).



Abbildung 22: Entwicklung der sonographisch gemessenen AlgB-Depot-KSI über den Versuchszeitraum von 28 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit 95% igem Konfidenzintervall pro Gruppe und Untersuchungszeitpunkt. Die Anzahl der Messwerte ist in Klammern nach dem Untersuchungszeitpunkt angegeben und gilt für beide Gruppen. Der signifikante Unterschied zwischen den VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots und den Kontrollen ist durch den Stern gekennzeichnet (p=0,0001).

Die Überprüfung auf Wechselwirkung von Gruppenzugehörigkeit und Zeitverlauf ergab eine signifikante gegenseitige Beeinflussung (p=0,0007, siehe hierzu Punkt 3.6). Deshalb wurden signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen über die Zeit im gemischten linearen Modell betrachtet. Es gab keinen Startwert zu Tag 0, da davon ausgegangen wurde, dass zum Zeitpunkt der AlgB-Depotsetzung noch keine Blutgefäße im AlgB-Depot vorhanden sein konnten. Bei den VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots stieg die KSI von 83 auf maximal 124 Graustufen (Tag 21), bei den Kontroll-Depots von 71 auf maximal 75 Graustufen (Tag 28). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen über den Versuchszeitraum war mit p=0,0001 signifikant (Abbildung 22).

Histologische Blutgefäßquantifizierung

Nach den sonographischen Messungen zu den Untersuchungszeitpunkten Tag 14, Tag 21 und Tag 28 erfolgte die histologische Aufbereitung der jeweils 5 ausgewählten AlgB-Depots pro Gruppe.

Tabelle 11 zeigt Mittelwert und 95%iges Konfidenzintervall der Blutgefäßprofildichte jeder Gruppe pro Untersuchungszeitpunkt. Die Einzelwerte jedes AlgB-Depot-Schnittes sind im tabellarischen Anhang in Tabelle 25 zu finden. Es wurde keine gegenseitige Beeinflussung von Gruppenzugehörigkeit und Zeitverlauf festgestellt (p>0,05, siehe hierzu Punkt 3.6). Zu allen Untersuchungszeitpunkten lag die Blutgefäßprofildichte der VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots mit im Mittel 77-86 Blutgefäßen/AlgB-Depot-Schnittfläche deutlich über der Blutgefäßprofildichte der Kontroll-Depots mit 20-33 Blutgefäßen/AlgB-Depot-Schnittfläche. Über die Zeit wurde keine signifikante Veränderung der Blutgefäßprofildichte beider Gruppen festgestellt (p=0,25), jedoch war der Unterschied zwischen beiden Gruppen signifikante (p<0,0001, Abbildung 23).

AlgB-Depot-Blutgefäßprofildichte [Gefäße/Schnittfläche]										
Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall (=KI)										
Untersuchungs-	VEG	GF/FGF-en De	thaltend pots	e AlgB-	Kontrollen					
zeitpunkt	n	KI unten	Mittel- wert	KI oben	n	KI unten	Mittel- wert	KI oben		
Tag 14	5	52	77	113	5	13	20	29		
Tag 21	5	5 52 77 113 5 17 25 3								
Tag 28	5	58	86	126	5	22	33	49		

 Tabelle 11: Gegenüberstellung der AlgB-Depot-Blutgefäßprofildichte von VEGF/FGF-enthaltenden und –freien
 AlgB-Depots (=Kontrollen) pro Untersuchungszeitpunkt (Mittelwert aus je 5 Depots mit 95% Konfidenzintervall).



Abbildung 23: Entwicklung der histologisch ermittelten AlgB-Depot-Blutgefäßprofildichte 14, 21 und 28 Tage nach AlgB-Depotsetzung. Dargestellt sind die Mittelwerte mit 95% igem Konfidenzintervall pro Gruppe und Untersuchungszeitpunkt. Die Anzahl der Messwerte ist in Klammern nach dem Untersuchungszeitpunkt angegeben und gilt für beide Gruppen. Der signifikante Unterschied zwischen den VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots und den Kontrollen ist durch den Stern gekennzeichnet (p<0,0001).

Korrelation

Die Einzelwerte der sonographisch bestimmten Kontrastsignalintensität und der histologisch ermittelten Blutgefäßprofildichte wurden pro AlgB-Depot für jede Gruppe separat miteinander korreliert. In beiden Gruppen wurde mit der Spearman-Korrelation ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen Ultraschalldaten und histologischen Daten gefunden (Gruppe 1: r_s = 0,55 mit p<005; Gruppe 2: r_s = 0,67 mit p<0,05; Abbildung 24).



Abbildung 24: Lineare Korrelation der Einzelwerte aus in vivo und histologischer Blutgefäßquantifizierung aller 15 VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots pro Gruppe. Die Spearman-Korrelationsanalyse ermittelte einen signifikanten (p<0,05) positiven Zusammenhang zwischen sonographischer KSI und histologischer Blutgefäßprofildichte mit r_s =0,55 für die VEGF/FGF-enthaltendem AlgB-Depots und r_s =0,67 für die Kontrolldepots.

4.3.2 Experiment 2: Longitudinalstudie in immundefizienten Mäusen

In der zweiten Studie sollte untersucht werden, ob sich ein Blutgefäßwachstum im Tumorsurrogat-Angiogenese-Modell mit dem kontrastverstärkten µ-Ultraschall über die Zeit im gleichen Tier darstellen und quantifizieren lässt.

Die Anzahl der sich im Versuch befindenden Tiere verringerte sich über die Zeit, da im Anschluss eines jeden Untersuchungszeitpunktes 4 bzw. 5 Tiere für die histologische Blutgefäßquantifizierung aus der Studie herausgenommen wurden. Außerdem verstarben in jeder Gruppe zwischen Untersuchungszeitpunkt 3 und 7 zunächst 2 Tiere sowie nach Untersuchungszeitpunkt 21 jeweils ein weiteres Tier infolge eines durch Enterokokken hervorgerufenen Wasting-Syndroms.

Volumetrie

Tabelle 12 zeigt die sonographisch ermittelten AlgB-Depot-Volumina von VEGF/FGFenthaltenden und -freien AlgB-Depots als Mittelwert mit 95%igem Konfidenzintervall pro Ultraschall-Untersuchungszeitpunkt. Die Einzelwerte jedes AlgB-Depots sind im tabellarischen Anhang in Tabelle 26 zu finden. Zu den Zeitpunkten 7, 14, 21 und 28 Tage nach AlgB-Depotsetzung wurden jeweils 4 resp. 5 gemessene AlgB-Depots anschließend histologisch zur in vitro Blutgefäßquantifizierung aufbereitet, weshalb die Tieranzahl während des Versuchsverlaufs kontinuierlich abnimmt.

AlgB-Depot-Volumen [mm ³] Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall (=KI)										
Ultraschall-	VEGF/FGF-enthaltende AlgB- Depots					Kontrollen				
Untersuchungs- zeitpunkt	n	KI unten	Mittel- wert	KI oben	n	KI unten	Mittel- wert	Kl oben		
Tag 3	20	68	77	87	20	66	74	84		
Tag 7	18	70	79	90	18	63	71	81		
Tag 14	13	71	81	92	14	60	69	78		
Tag 21	9	66	76	87	10	59	67	77		
Tag 28	4	66	79	93	4	59	70	83		

 Tabelle 12: Gegenüberstellung der Volumina von VEGF/FGF-enthaltenden und –freien AlgB-Depots (=Kontrollen)

 pro Untersuchungszeitpunkt (Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall).

Es wurde keine gegenseitige Beeinflussung von Gruppenzugehörigkeit und Zeitverlauf festgestellt (p>0,05). Die Volumina der AlgB-Depots waren im Mittel zwischen 77 und 81mm³ (VEGF/FGF-enthaltende AlgB-Depots) bzw. 67 und 74mm³ (Kontrollen) groß. Mit p=0,46 gab es keinen signifikanten Veränderungen über die Zeit und auch zwischen beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (p=0,33).

In vivo Blutgefäßquantifizierung

Abbildung 25 zeigt beispielhaft sonographische Perfusionsbilder zweier AlgB-Depots im sagittalen Anschnitt nach abgeschlossener Auswertung an Tag 3 (linke Ultraschallbilder) und Tag 28 (rechte Ultraschallbilder) nach AlgB-Depotsetzung. Die Kontrastsignale sind fehlfarbendargestellt als grüne Bereiche sichtbar. Rechts neben den Ultraschallbildern sind makroskopische Aufnahmen derselben AlgB-Depots nach Versuchsende zu sehen. Das VEGF/FGF-enthaltende AlgB-Depot oben zeigt eine deutliche Zunahme des Kontrastsignals von Tag 3 zu Tag 28 (größerer Anteil grüner Bereiche), während das VEGF/FGF-freie AlgB-Depot unten keine Veränderung der Kontrastsignalintensität von Tag 3 zu Tag 28 aufweist. Im Vergleich zum oberen AlgB-Depot sind hier deutlich weniger Kontrastsignale im Depot sichtbar. Der klare Unterschied zwischen der Vaskularisierung der beiden AlgB-Depots wird auch in den makroskopischen Bildern deutlich. Das obere AlgB-Depot enthält Blutgefäße und hat dadurch eine orange-gelbliche Farbe und das untere ist von transparenter Gestalt gänzlich ohne hindurch ziehende Blutgefäße.



Abbildung 25: Beispiel zweier kontrastverstärkter Ultraschallbilder eines VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots (Reihe 1) und eines VEGF/FGF-freien AlgB-Depots (Reihe 2) drei Tage (Bilder links) und achtundzwanzig Tage (Bilder Mitte) nach AlgB-Depotsetzung sowie makroskopische Bilder derselben Depots am Versuchsende (=Tag 28).

Tabelle 13 zeigt die sonographisch gemessene Kontrastsignalintensität (KSI) der VEGF/FGF-enthaltenden und –freien AlgB-Depots als Mittelwert mit 95%igem Konfidenzintervall pro Ultraschall-Untersuchungszeitpunkt. Die Einzelwerte jedes AlgB-Depots sind im tabellarischen Anhang in Tabelle 27 zu finden.

Die Überprüfung auf Wechselwirkung von Gruppenzugehörigkeit und Zeitverlauf ergab eine signifikante gegenseitige Beeinflussung (p<0,0001). Deshalb wurden signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen über die Zeit wieder im gemischten linearen Modell betrachtet. Eine deutliche Zunahme der KSI über die Zeit in den VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots ist mit 77 auf 146 Graustufen erkennbar, während diese in den Kontrolldepots von 71 auf maximal 80 Graustufen stieg. Mit p<0,0001 ist dieser Unterschied zwischen beiden Gruppen im Versuchsverlauf signifikant (Abbildung 26).

AlgB-Depot-Kontrastsignalintensität [Graustufen]										
Ultraschall- Untersuchunge										
zeitpunkt	n	n KI Mittel- KI unten wert oben				KI unten	Mittel- wert	KI oben		
Tag 3	20	72	77	83	20	66	71	76		
Tag 7	18	84	91	97	18	69	74	80		
Tag 14	13	92	100	109	14	68	74	80		
Tag 21	9	124	137	152	10	72	80	88		
Tag 28	3	122	146	173	4	69	80	93		

Tabelle 13: Gegenüberstellung der Entwicklung der Kontrastsignalintensität (KSI) von VEGF/FGF-enthaltenden und –freien AlgB-Depots (=Kontrollen) pro Ultraschall-Untersuchungszeitpunkt (Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall).



Abbildung 26: Entwicklung der sonographisch gemessenen AlgB-Depot-KSI über den Versuchszeitraum. Dargestellt sind die Mittelwerte mit 95% igem Konfidenzintervall pro Gruppe und Zeitpunkt. Die Anzahl der Messwerte ist in Klammern nach dem Untersuchungszeitpunkt angegeben. Der signifikante Unterschied zwischen den VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots und den Kontrollen ist durch den Stern gekennzeichnet (p<0,0001).

Histologische Blutgefäßquantifizierung

Zur Bestimmung der stereologisch ermittelten Blutgefäßprofildichte der AlgB-Depots wurden zu den sonographischen Untersuchungen ab Tag 7 zu jedem Untersuchungszeitpunkt 4 bzw. 5 AlgB-Depots aus jeder Gruppe für die histologische Blutgefäß-Quantifizierung herausgenommen. Tabelle 14 zeigt Mittelwert und 95%iges Konfidenzintervall der Blutgefäßprofildichte jeder Gruppe pro Untersuchungszeitpunkt. Die Einzelwerte sind im tabellarischen Anhang in Tabelle 28 zu finden. Es wurde keine gegenseitige Beeinflussung von Gruppenzugehörigkeit und Zeitverlauf festgestellt (p>0,05).

AlgB-D	AlgB-Depot-Blutgefäßprofildichte [Gefäße/Schnittfläche]									
Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall (=KI)										
VEGF/FGF-enthaltende AlgB- Untersuchungs- Depots							Kontrollen			
zeitpunkt	n	KI unten	Mittel- wert	KI oben	n	KI unten	KI oben			
Tag 7	5	32	53	88	4	12	22	39		
Tag 14	4	23	41	72	4	9	17	30		
Tag 21	4	55	97	172	5	17	28	47		
Tag 28	4	65	115	203	4	20	35	62		

 Tabelle 14: Gegenüberstellung der AlgB-Depot-Blutgefäßprofildichte von VEGF/FGF-enthaltenden und –freien
 AlgB-Depots (=Kontrollen) pro Untersuchungszeitpunkt (Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall).



Abbildung 27: Entwicklung der histologisch ermittelten AlgB-Depot-Blutgefäßprofildichte 7, 14, 21 und 28 Tage nach AlgB-Depotsetzung. Dargestellt sind die Mittelwerte mit 95% igem Konfidenzintervall pro Gruppe und Untersuchungszeitpunkt. Die Anzahl der Messwerte ist in Klammern nach dem Untersuchungszeitpunkt angegeben und gilt für beide Gruppen. Der signifikante Unterschied zwischen den VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots und den Kontrollen ist durch den Stern gekennzeichnet (p<0,0001).

Die Blutgefäßprofildichte der VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots nahm von Untersuchungszeitpunkt zu Untersuchungszeitpunkt von im Mittel 41 115 auf Blutgefäßen/AlgB-Depot-Schnittfläche deutlich zu, während die Kontroll-Depots mit 17-35 Blutgefäßen/AlgB-Depot-Schnittfläche sehr viel geringer vaskularisiert waren. In beiden Gruppen wurde eine zeitliche Beeinflussung der Blutgefäßprofildichte mit p=0,01 ermittelt. Außerdem war der Unterschied zwischen beiden Gruppen mit p<0,0001 signifikant (Abbildung 27).

Korrelation

Die Einzelwerte der sonographisch bestimmten Kontrastsignalintensität und der histologisch ermittelten Blutgefäßprofildichte pro AlgB-Depot wurden für jede Gruppe separat miteinander korreliert. In beiden Gruppen wurde mit der Spearman-Korrelation ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen Ultraschalldaten und histologischen Daten gefunden (Gruppe 1: r_s = 0,92 mit p<0,05; Gruppe 2: r_s = 0,65 mit p<0,05; Abbildung 28).



Abbildung 28: Lineare Korrelation der Einzelwerte aus in vivo und histologischer Blutgefäßquantifizierung aller 18 VEGF/FGF-enthaltenden sowie –freien AlgB-Depots. Die Spearman-Korrelationsanalyse ermittelte einen signifikanten (p<0,05) positiven Zusammenhang zwischen sonographischer KSI und histologischer Blutgefäßprofildichte mit r_s =0,92 (VEGF/FGF-enthaltende AlgB-Depots) bzw. r_s =0,65 (Kontrolldepots).

4.3.3 Experiment 3: Longitudinalstudie in immunkompetenten Mäusen

Im dritten Versuch wurde das Blutgefäßwachstum im Tumorsurrogat-Angiogenese-Modell in immunkompetenten Mäusen longitudinal untersucht. Der Versuchsablauf ist in Kapitel 3.2.3 beschrieben. Pro Gruppe wurden 7 Tiere longitudinal bis zum Versuchsende untersucht. Es gab keine Tierverluste.

Volumetrie

Tabelle 15 zeigt die sonographisch ermittelten AlgB-Depot-Volumina von VEGF/FGFenthaltenden und -freien AlgB-Depots als Mittelwert mit 95% igem Konfidenzintervall pro Ultraschall-Untersuchungszeitpunkt. Die Einzelwerte jedes AlgB-Depots sind im tabellarischen Anhang in Tabelle 29 zu finden. Die histologische Blutgefäßprofildichtenbestimmung erfolgte am Versuchsende (=Tag 28) für alle AlgB-Depots.

AlgB-Depot-Volumen [mm ³]											
	Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall (=KI)										
Ultraschall-	VEGF/FGF-enthaltende AlgB- Depots				Kontrollen						
zeitpunkt	n	KI unten	Mittel- wert	KI oben	n	KI unten	Mittel- wert	KI oben			
Tag 3	7	64	81	104	7	57	73	93			
Tag 7	7	83	106	135	7	63	80	102			
Tag 14	7	71	91	116	7	52	67	85			
Tag 21	7	69	88	112	7	52	67	85			
Tag 28	7	65	83	106	7	54	69	88			

Tabelle 15: Gegenüberstellung der Volumina von VEGF/FGF-enthaltenden und –freien AlgB-Depots (=Kontrollen) pro Untersuchungszeitpunkt (Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall). Es gab keine zeitliche Beeinflussung der AlgB-Depot-Volumina (p=0,46). Die VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots waren von den Kontroll-Depots nicht signifikant unterschiedlich (p=0,33).

Es wurde keine gegenseitige Beeinflussung von Gruppenzugehörigkeit und Zeitverlauf festgestellt (p>0,05). Die Volumina der AlgB-Depots schwankten über den Versuchszeitraum zwischen im Mittel 81 und 106mm³ (VEGF/FGF-enthaltende AlgB-Depots) bzw. 67 und 80mm³ (Kontrollen) ohne zeitabhängige Beeinflussung (p=0,46) und ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (p=0,33).

In vivo Blutgefäßquantifizierung

In Abbildung 29 sind exemplarisch sonographische AlgB-Depot-Perfusionsbilder von 2 AlgB-Depots im sagittalen Anschnitt nach abgeschlossener Auswertung zu sehen. Reihe 1 zeigt VEGF/FGF-enthaltendes und Reihe 2 ein -freies AlgB-Depot ein zu den Untersuchungszeitpunkten 3, 7, 14, 21 und 28 Tage nach AlgB-Depotsetzung (Bilder a bis e in chronologischer Reihenfolge). Das VEGF/FGF-enthaltende AlgB-Depot oben zeigt von Tag 3 zu Tag 28 eine deutliche Zunahme des Kontrastsignals bis ins Zentrum des AlgB-Depots, während das VEGF/FGF-freie AlgB-Depot unten nur eine geringe Zunahme der Kontrastsignalintensität in der Depot-Peripherie aufweist. Der klare Unterschied zwischen der Vaskularisierung der beiden AlgB-Depots wird auch in den makroskopischen Bildern deutlich (Bilder 1f und 2f). Das obere AlgB-Depot enthält viele Blutgefäße und hat dadurch eine orange-gelbliche Farbe, während das untere AlgB-Depot nur wenige Blutgefäße in der Peripherie aufweist und nur leicht gelblich wirkt.

Tabelle 16 zeigt die sonographisch gemessene Kontrastsignalintensität (KSI) der 7 VEGF/FGF-enthaltenden und der 7 –freien AlgB-Depots als Mittelwert mit 95%igem



Konfidenzintervall pro Ultraschall-Untersuchungszeitpunkt. Die Einzelwerte jedes AlgB-Depots sind im tabellarischen Anhang in Tabelle 30 zu finden.

Abbildung 29: Beispiele von kontrastverstärkten Ultraschallbildern eines VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots (Reihe 1) und eines VEGF/FGF-freien AlgB-Depots (Reihe 2) für jeden Untersuchungszeitpunkt sowie makroskopische Bilder derselben Depots am Versuchsende (=Tag 28): Reihe 1: Das AlgB-Depot aus Gruppe 1 zeigt eine klare Zunahme der KSI von Tag 3 zu Tag 28 (a bis e)

Reihe 1: Das AlgB-Depot aus Gruppe 1 zeigt eine klare Zunahme der KSI von Tag 3 zu Tag 28 (a bis e) Reihe 2: Das AlgB-Depot aus Gruppe 2 zeigt nur eine marginale Zunahme der KSI von Tag 3 zu Tag 28 (a bis e)

Die Überprüfung auf Wechselwirkung von Gruppenzugehörigkeit und Zeitverlauf ergab eine signifikante gegenseitige Beeinflussung (p<0,0001). Deshalb wurden signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen über die Zeit wieder im gemischten linearen Modell betrachtet. Die KSI der VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots nahm von im Mittel 77 Graustufen zu Versuchsbeginn zu maximal 146 Graustufen am Versuchsende gegenüber der Kontrollgruppe deutlich zu. Die Kontroll-Depots zeigte über den Versuchszeitraum keine Zunahme der KSI (im Mittel 71 Graustufen zu Versuchsbeginn, am Versuchsende im Mittel 74 Graustufen). Mit p<0,0001 unterschieden sich beide Gruppen signifikant voneinander (Abbildung 30).

AlgB-Depot-Kontrastsignalintensität [Graustufen] Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall (=KI)										
Ultraschall- Untersusehunge Untersusehunge										
zeitpunkt	n	KI unten	Mittel- wert	KI oben	n Kl Mittel- unten wert			KI oben		
Tag 3	7	68	77	87	7	62	71	81		
Tag 7	7	86	98	112	7	64	73	83		
Tag 14	7	115	131	149	7	63	72	82		
Tag 21	7	109	124	141	7	63	72	82		
Tag 28	7	129	146	166	7	65	74	84		

 Tabelle 16: Gegenüberstellung der Entwicklung der Kontrastsignalintensität (KSI) der 7 VEGF/FGF-enthaltenden und der 7 –freien AlgB-Depots (=Kontrollen) pro Ultraschall-Untersuchungszeitpunkt (Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall).



Abbildung 30: Entwicklung der sonographisch gemessenen AlgB-Depot-KSI über den Versuchszeitraum von 28 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit 95% igem Konfidenzintervall pro Gruppe und Ultraschall-Untersuchungszeitpunkt. Die Anzahl der Messwerte ist in Klammern nach dem Untersuchungszeitpunkt angegeben und gilt für beide Gruppen. Der signifikante Unterschied zwischen den VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots und den Kontrollen ist durch den Stern gekennzeichnet (p<0,0001).

Histologische Blutgefäßquantifizierung

Am Versuchsende, 28 Tage nach AlgB-Depotsetzung, erfolgte die histologische Quantifizierung der Blutgefäßprofildichte der 14 AlgB-Depots. Tabelle 17 zeigt Mittelwert und 95%iges Konfidenzintervall der Blutgefäßprofildichte der 7 VEGF/FGF-enthaltenden und der 7 –freien AlgB-Depots. Die Einzelwerte sind im tabellarischen Anhang in Tabelle 31 zu finden. Es wurde keine gegenseitige Beeinflussung von Gruppenzugehörigkeit und Zeitverlauf festgestellt (p>0,05). Die Blutgefäßprofildichte der VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots betrug am Versuchsende im Mittel 191 Blutgefäße pro AlgB-Depot-Schnittfläche, während die Kontroll-Depots im Mittel 22 Blutgefäßen pro AlgB-Depot-Schnittfläche hatten. Dieser Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist hoch signifikant p<0,0001.

AlgB-Depot-Blutgefäßprofildichte [Gefäße/Schnittfläche]								
Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall (=KI)								
Untersuchungs- zeitpunkt	VEGF/FGF-enthaltende AlgB- Depots				Kontrollen			
	n	KI unten	Mittel- wert	Kl oben	n	KI unten	Mittel- wert	KI oben
Tag 28	7	112	191	326	7	13	22	38

Tabelle 17: Gegenüberstellung der AlgB-Depot-Blutgefäßprofildichte der 7 VEGF/FGF-enthaltenden und der 7 – freien AlgB-Depots (=Kontrollen) als Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall am Versuchsende. Die VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots waren von den Kontrolldepots signifikant unterschiedlich (p<0,0001).



Untersuchungszeitpunkt [Tage nach AlgB-Depotsetzung]

Abbildung 31: Histologisch ermittelte AlgB-Depot-Blutgefäßprofildichte am Versuchsende. Dargestellt sind die Mittelwerte mit 95% igem Konfidenzintervall der 7 AlgB-Depots pro Gruppe. Der signifikante Unterschied zwischen den VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots und den Kontrollen ist durch den Stern gekennzeichnet (p<0,0001).

Korrelation

Die am Versuchsende bestimmten Einzelwerte der sonographisch ermittelten Kontrastsignalintensitäten und die stereologisch ermittelten Blutgefäßprofildichten wurden für jede Gruppe separat miteinander korreliert. In beiden Gruppen wurde mit der Spearman-Korrelation ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen Ultraschalldaten und histologischen Daten gefunden (VEGF-FGF-enthaltende AlgB-Depots: $r_s = 0.82$ mit p<0.05; Kontrolldepots: $r_s = 0.65$ mit p<0.05; Abbildung 32).



Abbildung 32: Lineare Korrelation der Einzelwerte aus in vivo und histologischer Blutgefäßquantifizierung der VEGF/FGF-enthaltenden und –freien AlgB-Depots. Die Spearman-Korrelationsanalyse ermittelte nur für die Kontrolldepots mit r_s =0,92 einen positiven Zusammenhang zwischen sonographischer KSI und histologischer Blutgefäßprofildichte.

4.3.4 Experiment 4: Therapiemonitoring in immunkompetenten Mäusen

Das Tumorsurrogat-Angiogenese-Modell wurde abschließend zum ersten Mal zur Quantifizierung eines Therapieeffektes antiangiogenen Substanzen eingesetzt. Dafür wurden VEGF/FGF-enthaltende AlgB-Depots immunkompetenten Mäusen subkutan appliziert und an den Tagen 7, 14, 21 und 28 sonographisch untersucht, wobei auf die Vermessung der AlgB-Depotgröße verzichtet wurde. Die histologische Blutgefäßprofildichtenbestimmung erfolgte am Versuchsende. Die Behandlung mit Bevacizumab (= Gruppe 1) bzw. Regorafenib (= Gruppe 3) oder den jeweiligen Vehikeln 1 (= Gruppe 2) und 2 (= Gruppe 4) erfolgte einmal täglich über den gesamten Versuchszeitraum. Während des Versuches kam es infolge von Applikationsfehlern zu Verlusten von je einem Tier in den Gruppen 1, 3 und 4. Für alle Gruppen erfolgte die histologische Blutgefäßprofildichtenbestimmung am Versuchsende.

In vivo Blutgefäßquantifizierung

Tabelle 18 zeigt die sonographisch gemessene Kontrastsignalintensität (KSI) der 4 Behandlungsgruppen als Mittelwert mit 95%igem Konfidenzintervall pro Ultraschall-Untersuchungszeitpunkt. Die Einzelwerte jedes AlgB-Depots sind im tabellarischen Anhang in Tabelle 32 zu finden. Die Überprüfung auf Wechselwirkung von Gruppenzugehörigkeit und Zeitverlauf ergab eine signifikante gegenseitige Beeinflussung (p<0,0001). Deshalb wurden signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen über die Zeit wieder im gemischten linearen Modell betrachtet.

AlgB-Depot-Kontrastsignalintensität [Graustufen]									
Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall (=KI)									
Ultraschall-	Bevacizumab				Vehikel 1				
Untersuchungs- zeitpunkt	n	KI unten	Mittel- wert	KI oben	n	KI unten	Mittel- wert	KI oben	
Tag 7	10	56	61	67	10	60	65	72	
Tag 14	10	65	72	79	10	101	111	122	
Tag 21	10	86	94	104	10	137	150	165	
Tag 28	9	118	130	143	10	152	167	184	
Ultraschall- Untersuchungs- zeitpunkt	Regorafenib				Vehikel 2				
	n	KI unten	Mittel- wert	KI oben	n	KI unten	Mittel- wert	KI oben	
Tag 7	10	54	59	65	10	57	63	69	
Tag 14	10	65	71	78	9	93	103	113	
Tag 21	9	77	86	94	9	136	150	166	
Tag 28	9	86	96	106	9	142	157	174	

Tabelle 18: Gegenüberstellung der Entwicklung der Kontrastsignalintensität (KSI) der VEGF/FGF-enthaltendenAlgB-Depots der 4 Behandlungsgruppen pro Ultraschall-Untersuchungszeitpunkt (Mittelwert mit 95%Konfidenzintervall).



Abbildung 33: Entwicklung der sonographisch gemessenen AlgB-Depot-Kontrastsignalintensität (KSI) über den Versuchszeitraum von 28 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit 95% igem Konfidenzintervall pro Gruppe und Ultraschall-Untersuchungszeitpunkt. Die Anzahl der Messwerte ist in Klammern nach dem Untersuchungszeitpunkt angegeben. Der signifikante Unterschied zwischen den VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots und den Kontrollen ist durch den Stern gekennzeichnet (p<0,0001).

Die mit Bevacizumab behandelten AlgB-Depots zeigten eine ansteigende KSI von 61 auf 130 Graustufen, während die KSI der mit dem dazugehörigen Vehikel 1 behandelten Gruppe von 65 auf 167 Graustufen stieg. Der Unterschied zwischen Gruppe 1 und 2 war über den Versuchszeitraum mit p<0,0001 hoch signifikant. Die mit Regorafenib behandelten AlgB-Depots zeigten eine ansteigende KSI von 59 auf 96 Graustufen, während die KSI der mit dem dazugehörigen Vehikel behandelten Gruppe von 63 auf 157 Graustufen stieg. Mit p<0,0001 unterschieden sich die Gruppen 3 und 4 über die Zeit ebenfalls signifikant voneinander (Abbildung 33).

Histologische Blutgefäßquantifizierung

Am Versuchsende 28 Tage nach AlgB-Depotsetzung erfolgte die histologische Quantifizierung der Blutgefäßprofildichte aller AlgB-Depots. Tabelle 19 zeigt Mittelwert und 95% iges Konfidenzintervall der Blutgefäßprofildichte der AlgB-Depots aller 4 Behandlungsgruppen. Die Einzelwerte sind im tabellarischen Anhang in Tabelle 33 zu finden.

Die mit Bevacizumab behandelten AlgB-Depots hatten eine Blutgefäßprofildichte von im Mittel 91 Blutgefäßen/AlgB-Depot-Schnittfläche, während die mit dem dazugehörigen Vehikel behandelten AlgB-Depots im Mittel 148 Blutgefäßen/AlgB-Depot-Schnittfläche aufwiesen. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war mit p<0,0001 signifikant.

AlgB-Depot-Blutgefäßprofildichte [Gefäße/Schnittfläche]									
Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall (=KI)									
Untersuchungs- zeitpunkt		Bevacizumab				Vehikel 1			
	n	KI unten	Mittel- wert	KI oben	n	KI unten	Mittel- wert	KI oben	
Tag 28	9	71	91	117	10	116	148	187	
Untersuchungs- zeitpunkt	Regorafenib				Vehikel 2				
	n	KI unten	Mittel- wert	KI oben	n	KI unten	Mittel- wert	KI oben	
Tag 28	9	32	41	52	9	90	116	149	

Tabelle 19: Gegenüberstellung der AlgB-Depot-Blutgefäßprofildichte der VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots der 4 Behandlungsgruppen pro Ultraschall-Untersuchungszeitpunkt (Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall). Der Unterschied beider Gruppen war mit p<0,0001 signifikant. Auch dieser Unterschied war mit p<0,0001 signifikant.



Abbildung 34: Histologisch ermittelte AlgB-Depot-Blutgefäßprofildichte am Versuchsende. Dargestellt sind die Mittelwerte mit 95% igem Konfidenzintervall der 9 bzw. 10 AlgB-Depots pro Gruppe. Der signifikante Unterschied zwischen mit Wirkstoff und mit Vehikel behandelten Gruppen ist jeweils durch einen Stern gekennzeichnet (p<0,0001).

Gruppe 3 (Regorafenib-Behandlung) hatte eine Blutgefäßprofildichte von im Mittel 41 Blutgefäßen/AlgB-Depot-Schnittfläche, während Gruppe 4 im Mittel 116 Blutgefäßen/AlgB-Depot-Schnittfläche aufwies. Auch dieser Unterschied zwischen den Gruppen war mit p<0,0001 signifikant (Abbildung 34).

Korrelation

Die Einzelwerte der sonographisch bestimmten Kontrastsignalintensität und die histologisch ermittelten Blutgefäßprofildichten am Versuchsende wurden für die Bevacizumab- und

Regorafenib-Behandlung sowie für beide Vehikelgruppen separat miteinander korreliert. Mit der Spearman-Korrelation wurde ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen Ultraschalldaten und histologischen Daten für alle 4 Gruppen gefunden (Abbildung 35).



Abbildung 35: Lineare Korrelation der Einzelwerte aus in vivo und histologischer Blutgefäßquantifizierung der einzelnen 4 Behandlungsgruppen. Die Spearman-Korrelationsanalyse ermittelte einen signifikanten (p<0,05) positiven Zusammenhang zwischen sonographischer KSI und histologischer Blutgefäßprofildichte für die Bevacizumab- (r_S=0,85) und die Regorafenib-Behandlung (r_S=0,95) sowie die Vehikelgruppe 1 (r_S=0,83) und 2 (r_S=0,92).

5 DISKUSSION

Die vorliegenden Untersuchungen beschäftigten sich mit der Etablierung und Charakterisierung eines Tumorsurrogat-Angiogenese-Modells (TSAM) für den Routine-Einsatz zur in vivo Testung antiangiogen wirkender Substanzen in der präklinischen Onkologie. Dabei lag das besondere Interesse in der sensitiven Quantifizierung der Angiogenese durch kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall. Die zugrunde liegenden Fragestellungen waren:

- 1. Ist es grundsätzlich möglich, die Blutgefäßversorgung im TSAM mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall in vivo quantitativ zu bestimmen und inwieweit korrelieren die sonographisch ermittelten Messergebnisse mit der histologisch quantifizierten Blutgefäßprofildichte?
- 2. Lässt sich mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall auch das Blutgefäßwachstum über einen längeren Zeitraum im TSAM longitudinal in vivo quantitativ erfassen?
- 3. Ist diese Methode auch auf immunkompetente Tiere übertragbar?
- 4. Ist das TSAM in Kombination mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall in der onkologischen Forschung auch für den routinemäßigen Einsatz zur in vivo Testung der Wirksamkeit antiangiogener Substanzen geeignet?

Für die Beantwortung dieser Fragen wurden nach erfolgter in vitro Charakterisierung der Alginatbeads vier aufeinander aufbauende tierexperimentelle Studien durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente sollen die Grundlage für die zukünftige Nutzung des TSAM als in vivo Modell für die pharmakologische Charakterisierung neuer antiangiogener Substanzen darstellen.

5.1 In vitro Charakterisierung der Alginatbeads

Bei der Etablierung des Verfahrens zur Herstellung der AlgBs wurde auf frühere Erfahrungen von Hoffmann und Mitarbeitern (1997) zurückgegriffen, die selbst hergestellte AlgBs bereits in vivo eingesetzt hatten. Teile der Herstellapparatur von Hoffmann et al. konnten übernommen werden und das Herstellungsprotokoll wurde hinsichtlich einer exakten Einstellung der Luftdrücke P₁ und P₂ optimiert. Bisher waren die AlgBs der Hoffmannschen Herstellungsmethode nicht näher charakterisiert. Die AlgBs aus der modifizierten Herstellung wurden in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Größe, ihrer morphologischen Beschaffenheit und einer möglichen mikrobiellen Belastung untersucht.

Größe der AlgBs: Aus der Literatur ist bekannt, dass verschiedene Parameter im Herstellprozess einen Einfluss auf die Größe der AlgBs haben. So untersuchten Wolters und Kollegen (1991) den Einfluss von Tropfkanülendurchmesser und Luftdruck P2. Sie stellten fest, dass P1 sich nicht auf die Größe der AlgBs auswirkt, jedoch die Schnelligkeit der Tropfenbildung steigt, je höher dieser Luftdruck ist. Aus Gründen der Praktikabilität wurde P1 in dieser Arbeit auf 150mbar eingestellt. Wolters und Kollegen untersuchten darüber hinaus vier verschiedene Tropfkanülendurchmesser. Mit steigender Zunahme dieses Durchmessers stieg die AlgB-Größe linear. Mit einer Tropfkanüle von 0,8mm Durchmesser wurden AlgB-Größen von 700 bis 900µm erzielt. Diese Größe wurde als praktikabel für die weitere Verarbeitung betrachtet, weshalb in der vorliegenden Arbeit ebenfalls auf diese Kanülen zurückgegriffen wurde. Bezüglich des Luftdruckes P2 stellten Wolters und Kollegen fest, dass sich die Größe der AlgBs verringert, wenn dieser steigt. In dieser Arbeit entstanden bei einem Luftdruck P₂ von 150mbar AlgBs von praktikabler Größe, weshalb dieser für das Standardherstellungsprotokoll verwendet wurde. Um zu klären, ob sich mit den hier gewählten Parametern AlgBs reproduzierbar in einem bestimmten Größenbereich herstellen lassen, wurde je eine AlgB-Charge an drei aufeinander folgenden Tagen mit dem modifizierten Protokoll hergestellt und danach vermessen. Die AlgB-Größe lag im Mittel bei 751µm, 812µm und 990µm. Obwohl alle Herstellungsparameter konstant gehalten wurden, lag die Standardabweichung bei 26µm bis 44µm. Die Ursache dafür ist nicht bekann, wird aber in der Herstellungsapparatur selbst vermutet. Der Schwankungsbereich wird nicht als kritisch für die nachfolgenden in vivo Versuche gesehen, weil jedem Tier ein genaues AlgB-Volumen von 0,1ml appliziert wird, das die Schwankungen in der Größe einzelner AlgBs ausgleicht.

Morphologische Beschaffenheit: Orientierend wurden einige AlgBs rasterelektronenmikroskopisch untersucht, um einen Eindruck über ihre morphologische Beschaffenheit zu erhalten. Äußerlich ähnelten die AlgBs in ihrer Form Wassertropfen. Das spitz auslaufende Ende der Tropfen zeugt von einer schnellen Aushärtung der AlgB-Oberfläche nach dem Eintauchen ins CaCl₂-Bad. Der eher vom Wassertropfen abweichende rundliche Körper ist 84 durch die höhere Viskosität der Alginatlösung im Vergleich zu Wasser sowie mit einer Stauchung des herabfallenden Tropfens während seines Auftreffens auf die Oberfläche der CaCl₂-Lösung zu erklären. Im Gegensatz zur Innenansicht sind äußerlich keine Poren erkennbar. Im Inneren der AlgBs sind Poren verschiedener Größe in einer sonst relativ kompakten Matrix enthalten. Die Ursache für die Ausprägung solcher Poren ist nicht bekannt, wird jedoch im Vorhandensein von Luftblasen in der Alginatlösung vermutet.

Mikrobiologie: Da die AlgBs für einen späteren Einsatz in immundefizienten und immunkompetenten Mäusen vorgesehen waren, wurde ihre mikrobiologische Belastung untersucht. Sie könnte neben unerwünschten entzündlichen Reaktionen im Bereich der AlgBs selbst vor allem bei immundefizienten Tieren zusätzlich zu einer generalisierten Infektion und dem vorzeitigen Ausfall betroffener Tiere während eines Experiments führen. Auch würden entzündliche Reaktionen im Bereich der AlgBs die Wertigkeit eines TSAM für die Testung antiangiogener Substanzen in Frage stellen, da mit ihnen immer auch Angiogenese verbunden ist. Deshalb wurde bereits bei der Herstellung der AlgBs größte Sorgfalt bezüglich einer keimarmen Umgebung und der Verwendung von sterilisierten Materialien und Substanzen geachtet. Die mikrobiologischen Analysen von zehn AlgB-Chargen zeigten in jedem Ansatz eine mikrobiologische Einflüsse auf die späteren in vivo Versuche ausgeschlossen.

5.2 Reproduzierbarkeit der sonographischen Auswertung

Vor Beginn der Auswertung der sonographischen Untersuchungen aus allen vier in vivo Experimenten wurde geprüft, inwieweit die Auswerteverfahren methodischen Schwankungen unterliegen und ob es einen untersucherabhängigen Einfluss auf die Ergebnisse gibt. Dadurch sollten Rückschlüsse auf den notwendigen Erfahrungsgrad des Auswerters für Studien dieser Art gezogen werden. Für die Klärung dieses Sachverhaltes wurden zwei sonographisch untersuchte AlgB-Depots aus dem ersten in vivo Experiment jeweils von einem unerfahrenen, mäßig erfahrenen und hoch erfahrenen Auswerter hinsichtlich AlgB-Depotvolumen und -Kontrastsignalintensität mehrfach analysiert.

Auf den Einfluss des Erfahrungsgrades des Untersuchers auf die sonographischen in vivo Messungen wurde hier verzichtet, da in der nachfolgenden Analyse der sonographischen Aufnahmen die größten Fehlermöglichkeiten gesehen wurden. Dies betrifft insbesondere die optimale Legung der Region of Interest (ROI). Die ROI muss so platziert werden, dass sich in dieser ausschließlich der Querschnitt des Alginatdepots befindet und umliegendes Gewebe wie Haut, Muskulatur und subkutanes Bindegewebe ausgegrenzt werden, damit diese nicht das Messergebnis beeinflussen. Die Linie der ROI sollte somit direkt die Außengrenzen des Alginatdepots markieren. Eine ROI, die beispielhaft umliegendes Gewebe mit einschließt, würde zu hohe und eine ROI die kleiner gelegt wird als die Depotaußengrenzen es vorgeben würde zu niedrige Messwerte sowohl bei den Depotvolumina, als auch den Kontrastsignalintensitäten ergeben.

Unabhängig vom Erfahrungsgrad des Auswerters wurden sowohl bei der Bestimmung der AlgB-Depot-Volumina als der der –KSI dicht beieinander liegende Werte mit gleich niedrigen Standardabweichungen gemessen. Die geringen Unterschiede bei den Mittelwerten zwischen den Untersuchern können als methodische Schwankungen betrachtet werden. Aus den Ergebnissen wird geschlussfolgert, dass die in dieser Arbeit verwendete Art der Auswertung auch von ungeübten Personen nach kurzer Einweisung durchgeführt werden kann. Dies ist ein Vorteil für den Einsatz des TSAM für Routinemessungen in der onkologischen Forschung, da zwar die Untersuchungen an den Tieren selbst von erfahrenen Mitarbeitern durchgeführt werden sollten, die Auswertung dann aber zeitsparend auf andere Kollegen übertragen werden kann. Mit der Thematik der Reproduzierbarkeit quantitativer sonographischer Daten beschäftigten sich Heneweer und Kollegen (2008), als sie intra- und interindividuelle Abweichungen bei der wiederholten Messung der Größe von experimentellen orthotopen Pankreas-Tumoren in Labormäusen in Abhängigkeit zum Erfahrungsgrad des Auswerters bestimmten. In der Untersuchung wurden die Tumore von zwei Untersuchern mit unterschiedlichem Erfahrungsgrad in der sonographischen Volumenauswertung wiederholt vermessen. Als Ergebnis konnten sie eine signifikante Erfahrungsgrad und intraindividueller Korrelation zwischen Abweichung in den Wiederholungsmessungen feststellen. Je mehr Erfahrung in der sonographischen Volumenbestimmung bestand, desto geringer waren die Abweichungen.

5.3 In vivo Studien

5.3.1 Experimente 1 und 2: Etablierung in immundefizienten Mäusen

In den ersten beiden Experimenten sollte zunächst überprüft werden, ob Blutgefäße im TSAM mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall in vivo detektierbar sind und der kontinuierliche Verlauf der Angiogenese longitudinal tierindividuell quantifiziert werden kann. Hierfür wurde in zwei Experimenten in immundefizienten Nacktmäusen der Vaskularisierungsgrad subkutaner VEGF/FGF-enthaltender und –freier AlgB-Depots zu unterschiedlichen Zeitpunkten quantitativ bestimmt. Zusätzlich erfolgte zu den gleichen Zeitpunkten die quantitative Bestimmung der histologischen Blutgefäßprofildichte mit stereologischen Werkzeugen. Beide Messparameter wurden miteinander korreliert, um deren Zusammenhang zu untersuchen.

Volumetrie

Die sonographische Volumenbestimmung wird vor allem bei der Wirksamkeitstestung neuer onkologischer Substanzen in orthotopen Tumormodellen eingesetzt, weil sie in vivo longitudinal und nicht invasiv durchführbar ist (lordanescu 2002). Dabei werden anhand abnehmender Tumorgrößen Rückschlüsse auf die Effektivität einer experimentellen Substanz gegen die orthotopen Tumore gezogen. Dass die sonographische Volumetrie eine valide Methode zur Größenbestimmung von orthotopen Tumoren ist, zeigten bereits mehrere Arbeitsgruppen. lordanescu (2002) und Kollegen wiesen eine exzellente Korrelation zwischen sonographisch bestimmten Tumor-Volumina und berechneten Tumor-Volumina aus der Routinemethode der direkten Kalipermessung nach. In der vorliegenden Arbeit wurde in den beiden Etablierungsexperimenten 1 und 2 die Größe aller AlgB-Depots 3, 14, 21 und 28 (Experiment 1) bzw. 3, 7 ,13 21 und 28 Tage (Experiment 2) nach deren subkutanen Implantation vermessen. Dadurch sollte festgestellt werden, inwiefern sich ihr Volumen über den Versuchszeitraum infolge von Entzündungs- und/oder Abbauprozessen verändert und ob es Unterschiede zwischen den beiden Varianten gibt.

Zunächst wurde für beide Experimente anhand der Daten statistisch keine Interaktion zwischen Gruppenzugehörigkeit und Zeitverlauf festgestellt. Deshalb war es trotz wiederholter Messungen möglich, Unterschiede zwischen beiden Gruppen und zeitliche Veränderungen innerhalb einer Gruppe getrennt voneinander zu betrachten (siehe hierzu Punkt 3.6). In Experiment 1 wurde ein signifikanter Größenunterschied von VEGF/FGFenthaltenden und -freien AlgB-Depots festgestellt. Dies war bereits zu Versuchsbeginn zu beobachten und setzte sich über den Versuchszeitraum unverändert fort. Grund dafür war das ungleichmäßige Abdekantieren der AlgB-Waschlösung (Punkt 3.2.2 Nr. 12) während der AlgB-Herstellung. Über den Versuchszeitraum wurde keine signifikante Änderung im Volumen von VEGF/FGF-enthaltenden und -freien AlgB-Depots ermittelt. Über einen Zeitraum von vier Wochen waren die AlgB-Depots unabhängig von ihrem Gehalt an Wachstumsfaktoren volumenkonstant. Im zweiten Experiment wurde die Größenbestimmung aller AlgB-Depots ebenfalls durchgeführt um zu überprüfen, ob es erneut einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen gibt und ob sich das Volumen über die Zeit verändert. Anders als im ersten Versuch gab es hier keinen signifikanten Unterschied zwischen den VEGF/FGF-enthaltenden und -freien AlgB-Depots.

Die sonographische Volumenbestimmung von Polymerimplantaten wurde 2006 bereits von Stieger und Kollegen durchgeführt (Stieger 2006). Hier wurden Wistar-Ratten FGFenthaltende und –freie Matrigeldepots subkutan in einem Volumen von 0,4mL injiziert. 7 und 14 Tage nach der Injektion wurden zweidimensionale morphologische Ultraschallbilder der Depots in sagittaler und transversaler Ebene aufgenommen, anhand welcher Länge, Breite und Höhe der Plugs mit elektronischen Kalipern des Ultraschallsystems selbst ausgemessen wurden. Mit der Formel zur Volumenberechnung gestreckter Ellipsoide (Länge*Breite* Höhe^{*} π /6) wurde dann das Volumen der Depots berechnet. Stieger und Kollegen stellten fest, dass die FGF-enthaltenden Matrigeldepots an Tag 7 signifikant größer als die Kontrolldepots waren. Ab Tag 14 verlor sich der Gruppenunterschied. Sie vermuteten die Ursache des kurzzeitigen Größenunterschiedes darin, dass anfängliche Entzündungsmit einhergehender Vaskularisierung der Matrigeldepots reaktionen zu einer Volumenzunahme führen würden. Im ersten Experiment dieser Arbeit waren die VEGF/FGFenthaltenden AlgB-Depots ebenfalls größer als die Kontroll-Depots, jedoch war der Unterschied im gesamten Versuchsverlauf durchgehend konstant. Im zweiten Experiment konnte ein Größenunterschied zwischen den beiden Gruppen von Beginn an vermieden werden und zeigte sich zu keinem weiteren Messzeitpunkt. Es konnte kein Hinweis einer Volumenänderung der AlgB-Depots infolge von Entzündungsreaktionen oder Angiogenese gefunden werden. Die AlgB-Depots des TSAMs sind über einen Zeitraum von 28 Tagen volumenkonstant.

In vivo Blutgefäßquantifizierung

Im ersten Etablierungsexperiment wurde getestet, ob Blutgefäße im TSAM mit dem Mikro-Ultraschall überhaupt detektierbar sind. Die quantitativen Daten der VEGF/FGF-enthaltenden und -freien AlgB-Depots wurden miteinander verglichen, um signifikante Unterschiede zwischen beiden Depotvarianten zu den drei unterschiedlichen Messzeitpunkten zu ermitteln. Als guantitativer Parameter wurde die maximale Kontrastsignalintensität über die Zeit (KSI) in Anlehnung an Palmowski und Kollegen (2010) guantitativ gemessen. In der Studie wurde die Perfusion experimenteller A431-Xenografts nach antiangiogener Behandlung durch die Quantifizierung der maximalen Kontrastsignalintensität über die Zeit bestimmt. Nach zwei Wochen Tumorwachstum erfolgte die Behandlung mit einem Antiangiogenese-Hemmer über vier Tage. Die Tumorperfusion wurde täglich quantifiziert. Nach Versuchsende erfolgte die histologische Blutgefäßquantifizierung in den Tumoren und die Korrelation beider Methoden. Innerhalb des kurzen Behandlungszeitraums zeigte sich eine signifikante Verringerung der KSI der behandelten Tumore im Vergleich zu den Kontrolltumoren, in denen die KSI von Tag 1 zu Tag 4 zunahm. Spätere Zeitpunkte wurden nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde 14, 21 und 28 Tage nach AlgB-Depotsetzung ein signifikanter Unterschied zwischen der KSI VEGF/FGF-enthaltender und freier AlgB-Depots festgestellt. Zu Versuchsbeginn an Tag 3 war dieser Unterschied noch nicht messbar. Der KSI-Anstieg in den VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots war an Tag 14 besonders deutlich, während die weiteren Untersuchungszeitpunkte in der Folge keine starken Veränderungen mehr zeigten. Die Ursache für die im Vergleich zu Palmowski und Kollegen (2010) erst späte Detektion signifikanter Unterschiede in der Angiogenese wird, bestätigt durch Ergebnisse von Robertson und Kollegen (1991), darin begründet, dass im TSAM Blutgefäße erst einwachsen müssen. Robertson stellte eine vollständige Penetration von Blutgefäßen in AlgB-Depots in ihrem Modell erst 3 Wochen nach AlgB-Depotsetzung fest, genau wie Plunkett und Hailey (1990), die das AlgB-Depot-Modell zuvor etablierten. Beide Gruppen quantifizierten die Angiogenese in den AlgB-Depots ex vivo durch eine photometrische Bestimmung des Hämoglobingehalts. In einer Studie von Lucidarme und Kollegen (2004) wurden in Ratten implantierte subkutane FGF-enthaltende und -freie Matrigeldepots hinsichtlich ihrer zunehmenden Vaskularisierung über zwei Wochen sonographisch untersucht. Die Kollegen nutzten zur Feststellung der Angiogenese kontrastverstärkte B-Mode Cineloops, wobei die Einschätzung des Vaskularisierungsgrades der Matrigel-Plugs durch ein semiquantitatives Scoring der Echogenität der Matrigeldepots erfolgte. Besonders echogene Depots wurden dabei als stark vaskularisiert bewertet (Grad III). In der Studie wurde ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Matrigeldepot-Varianten 12 Tage nach Implantation ermittelt, was dem hier festgestellten Ergebnis entspricht. Spätere Zeitpunkte wurden von Lucidarme und Kollegen nicht untersucht. Bei der semiguantitativen Beurteilung der Angiogenese in den Matrigeldepots stellten sich Ratten wegen ihrer dickeren Haut als ungeeignetes Tiermodell heraus. Die Untersucher stellten bei der Auswertung der sonographischen B-Bilder Schwierigkeiten bei der Unterscheidung von Haut und subkutanem Matrigeldepot fest, da beide teilweise die gleiche Echogenität besaßen. Dies kann für die hier benutzten AlgB-Depots nicht bestätigt werden, da diese durch ihren hohen Wassergehalt zunächst sehr echoarm sind. Die zunehmende Angiogenese wurde außerdem nicht anhand der Echogenität im B-Bild subjektiv quantifiziert, sondern mit dem objektiven Parameter KSI.

Die Blutgefäße in den AlgB-Depots konnten mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode in vivo quantifiziert werden.

Im zweiten Etablierungsexperiment wurde als weiterer Untersuchungszeitpunkt Tag 7 nach AlgB-Depotsetzung festgelegt, um zu überprüfen, ob der signifikante Unterschied zwischen VEGF/FGF-enthaltenden und –freien AlgB-Depots schon vor Tag 14 messbar ist. Außerdem sollte die Angiogenese im TSAM hier tierindividuell longitudinal verfolgt werden.

Bereits 7 Tage nach AlgB-Depotsetzung wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den VEGF/FGF-enthaltenden und den Kontroll-Depots gemessen. Wie im ersten Experiment war dieser Unterschied zu Tag 3 noch nicht messbar. Da im ersten Experiment zu Tag 7 noch keine Messungen durchgeführt wurde, kann kein direkter Vergleich durchgeführt werden. In der Studie von Stieger und Kollegen (2006) wurde ähnlich der Arbeit von Lucidarme et al. (2004) die Vaskularisierung von FGF-enthaltenden und -freien Matrigeldepots mit Hilfe von kontrastverstärkten Ultraschallmessungen untersucht. Um quantitative Daten zu erhalten,

subtrahierten Stieger und Kollegen native von kontrastverstärkten Powerdoppler-Aufnahmen. Die übrig bleibenden Farbpixel wurden über eine Software quantifiziert. Die Ultraschallmessungen wurden 7 und 14 Tage nach Setzung der Matrigel-Plugs durchgeführt. Signifikante Unterschiede zwischen FGF-enthaltenden und Kontroll-Matrigel-Plugs wurden für Tag 7 ermittelt. Zu Tag 14 war der Unterschied zwischen beiden Gruppen nicht mehr signifikant. Als Begründung wurde von den Kollegen die Angiogenese-Induktion durch das Matrigel selbst unabhängig von seinem Gehalt an FGF angeführt. Die Vaskularisierung der Kontrollmatrigeldepots näherte sich durch eigene Angiogenese-Induktion der der FGF-enthaltenden Matrigeldepots an. In der vorliegenden Arbeit wurde nicht Matrigel, sondern Alginat benutzt, welches selbst keine proangiogene Wirkung hat (Hoffmann 1997). Deshalb blieb der signifikante Unterschied zwischen VEGF/FGF-enthaltenden und –freien AlgB-Depots während des gesamten Versuchsverlaufs von 28 Tagen bestehen.

Die Angiogenese in den AlgB-Depots wurde in dieser Arbeit longitudinal und tierindividuell verfolgt. Die Methode der in vivo Blutgefäßquantifizierung mittels kontrastverstärktem subharmonischen Mikro-Ultraschall war geeignet zur sensitiven quantitativen Messung der Vaskularisierung im TSAM.

Histologische Blutgefäßquantifizierung

In dieser Arbeit wurden die Blutgefäße in den AlgB-Depots nach Endothelzell-spezifischer CD31-Färbung mit stereologischen Werkzeugen quantifiziert, da diese Methode reproduzierbarer als die üblicherweise verwendete Weidnersche MVD-Methode ist (Müller 2008). Dafür wurden die AlgB-Depots nach der Ultraschallmessung histologisch geschnitten, immunhistochemisch gefärbt und mit Hilfe einer stereologischen Software ausgewertet. Die quantitativen Blutgefäßprofildichten VEGF/FGF-enthaltender und –freier AlgB-Depots wurden miteinander verglichen, um Unterschiede in deren Vaskularisierung zu ermitteln.

Im ersten Experiment wurde zu allen drei Untersuchungszeitpunkten ein signifikanter Unterschied im Vaskularisierungsgrad von VEGF/FGF-enthaltenden und –freien AlgB-Depots festgestellt, wobei es jedoch keine signifikanten Veränderungen der Blutgefäßprofildichten vom ersten Untersuchungszeitpunkt am Tag 14 bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt am Tag 28 gab. Dies entspricht Ergebnissen der ersten Studie zur Vaskularisierung des AlgB-Depot-Modells von Plunkett und Hailey (1990), in der in leeren AlgB-Depots kaum Blutgefäße nachgewiesen werden konnten, während Angiogenesestimulierende AlgB-Depot-Modell im Gegensatz zu dieser Arbeit nicht als Tumorsurrogat-Modell, sondern verkapselten Tumorzellen in AlgBs, die durch Freisetzung von proangiogenen Faktoren die Angiogenese anregten. Die Vaskularisierung der Tumorzellen

enthaltenden AlgB-Depots wurde lediglich makroskopisch über einen Zeitraum von sechs Monaten betrachtet. Plunkett und Hailey diskutierten abschließend, dass die AlgB-Depots gut verträglich waren und nur durch die Freisetzung zellulärer proangiogener Faktoren vaskularisiert wurden. Sie kritisierten außerdem die fehlende Möglichkeit einer kontinuierlichen Überwachung des Blutgefäßwachstums. Auf den Ergebnissen von Plunkett und Hailey aufbauend untersuchten Robertson und Kollegen (1991) im Modell Therapieeffekte von antiangiogen wirkenden Substanzen. In histologischen Schnitten wurden die Blutgefäße immunhistochemisch gefärbt und qualitativ beurteilt. Robertson und Kollegen fanden weniger Blutgefäße in den antiangiogen behandelten AlgB-Depots. In der bereits diskutierten Studie von Palmowski und Kollegen (2010) erfolgte nach der sonographischen ebenfalls die histologische Blutgefäßquantifizierung. Dafür wurden die Xenografts immunhistochemisch mit einer CD31-Färbung sichtbar gemacht und gezählt. Das Ergebnis bestätigte die sonographischen Daten, da in den behandelten Tumoren signifikant weniger Blutgefäße gezählt wurden als in den unbehandelten. Anders als in der vorliegenden Arbeit konnten Palmowksi und Kollegen einen konstanten Rückgang der Blutgefäßanzahl von Tag 1 bis Tag 4 nach Behandlungsbeginn feststellen, da in den Xenografts ein bereits etabliertes Blutgefäßnetz antiangiogen behandelt wurde. Der Vergleich von KSI-Werten und histologischer Blutgefäßdichte erfolgte wie in dieser Arbeit anhand einer linearen Korrelation. die mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,95 signifikant positiv war. Die Quantifizierung der Blutgefäße erfolgte jedoch nicht mit stereologischen Werkzeugen. Bisher gibt es nur wenige Arbeiten, die stereologische Methoden zur Quantifizierung von Blutgefäßen in der onkologischen Forschung einsetzten. Der in dieser Arbeit verwendete Cavalieri-Estimator wurden von Malcontenti-Wilson und Kollegen benutzt, um den Effekt eines neuen Zytostatikums auf Wachstum kolorektaler Lebermetastasen in einem Maus-Xenograft-Modell zu quantifizieren (Malcontenti-Wilson 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde das Cavalieri-Netz zur Quantifizierung der vitalen Gewebeanteile im AlgB-Depot benutzt, die die Grundlage für die Quantifizierung der Blutgefäßprofildichte darstellten.

Um die Ergebnisse des ersten Experimentes zu überprüfen, erfolgte im zweiten Versuch ebenfalls eine histologische Blutgefäßquantifizierung von vier bis fünf ausgewählten VEGF/FGF-enthaltenden und- freien AlgB-Depots an den Ultraschall-Untersuchungstagen 7, 14, 21 und 28 nach AlgB-Depotsetzung. Wie im ersten Experiment wurde für die Untersuchungszeitpunkte 14, 21 und 28 ein signifikanter Unterschied in der Blutgefäßprofildichte der AlgB-Depots mit und ohne Wachstumsfaktoren ermittelt. Im Gegensatz zu Experiment 1 konnte zusätzlich eine signifikante Zunahme der Vaskularisierung der VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots ermittelt werden, die sich besonders ausgeprägt an Tag 21 zeigte. Der Zeitraum von drei Wochen bis zur vollständigen Vaskularisierung von AlgB-Depots wurde bereits von Robertson et al. (1991) beschrieben.

91

Der Vergleich mit der KSI-Entwicklung in den VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots zeigt ebenfalls eine besonders starke Erhöhung der Messwerte zum Tag 21. Die Blutgefäßprofildichte der Kontroll-AlgB-Depots nahm wie im Experiment 1 nicht signifikant zu, was den früheren Untersuchungen zur Angiogenese von leeren AlgB-Depots entspricht (Plunkett und Hailey 1990, Robertson 1991, Hoffmann 1997, Stieger 2006). Zwischen den beiden AlgB-Depot-Varianten konnte analog zu Experiment 1 ein signifikanter Gruppenunterschied ermittelt werden. Lucidarme et al. untersuchten in einer zweiten Matrigeldepot-Studie (Lucidarme 2006) die Angiogenese in FGF-enthaltenden und –freien Matrigeldepots in Mäusen. Nach 12 Tagen wurden die Matrigel-Plugs entnommen und wie in der vorliegenden Arbeit immunhistochemisch gefärbt (CD31). Die Quantifizierung der Blutgefäße erfolgte durch die Bestimmung der MVD nach Weidner (Weidner 1995). Wie zuvor in der Ratten-Studie (2004) konnten sie eine signifikante Zunahme der Blutgefäßdichte in den FGF-enthaltenden Matrigeldepots ermitteln, allerdings mit Tag 6, 9 und 12 bereits eine Woche früher als bei den Ratten. Die Kontrolldepots zeigten keine Zunahme der Blutgefäßdichte. Wieder gab es keine Untersuchungen zu späteren Zeitpunkten.

Korrelation

Zur Feststellung des Zusammenhanges der Daten aus sonographischer und histologischer Blutgefäßguantifizierung wurden diese in beiden Etablierungsexperimenten mittels Spearman-Korrelation miteinander verglichen. Es konnte stets ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen der sonographischen KSI und der histologischen Blutgefäßprofildichte ermittelt werden. Die MVD nach Weidner wird als Goldstandard zur Überprüfung sonographischer Perfusionsdaten benutzt. Abhängig von der jeweiligen Ultraschallmethode zur Quantifizierung der in vivo Perfusion sind die Ergebnisse von Korrelationsanalysen in verschiedenen Arbeiten heterogen. Forsberg und Kollegen untersuchten mit kontrastverstärktem Powerdoppler-Ultraschall die Angiogenese in einem Melanom-Xenograft-Modell (Forsberg 2002). Sie untersuchten dafür zehn subkutane WM-9-Melanome erst sonographisch und dann histologisch. Die Tumore wurden geschnitten und mit mehreren spezifischen Angiogenese-Markern immunhistochemisch gefärbt. Die Ultraschall-Kontrastsignale und die gefärbten histologischen Schnitte wurden dann von zwei unabhängigen, verblindeten Untersuchern nach einem Scoring-System (0-3) semiguantitativ ausgewertet. Forsberg und Kollegen konnten eine positive lineare Korrelation zwischen Ultraschalldaten und einer Cyclooxigenase-2-spezifischen Färbung feststellen, aber alle anderen immunhistochemischen Marker (CD31, VEGF, FGF) korrelierten nicht. Als Ursache vermuteten die Kollegen die geringe Versuchstierzahl. In einer zweiten Studie 2004 führten sie die Untersuchungen mit 28 Tumoren durch und konnten für die Korrelation von Powerdoppler und Histologie zumindest einen positiven Trend (p<0,1) ermitteln. Im 92

Gegensatz zu den Studien von Forsberg und Kollegen wurden in dieser Arbeit keine semiquantitativen Daten korreliert. Außerdem erfolgte die in vivo Blutgefäßquantifizierung nicht mit dem Powerdoppler, sondern mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall. Wie bei Palmowksi und Kollegen wurde hierfür eine positive lineare Korrelation zwischen Sonographie und Histologie festgestellt. Für die nachfolgenden Experimente erfolgte die histologische Blutgefäßquantifizierung nur noch am Versuchsende.

5.3.2 Experiment 3: Übertragung auf immunkompetente Mäuse

Im dritten Versuch im Rahmen der Etablierung des TSAM wurde das Modell in immunkompetenten Versuchstieren getestet. Es sollte untersucht werden, ob auch bei Immunsystem zunehmende Angiogenese im TSAM intaktem eine mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall kontinuierlich in vivo verfolgbar und quantifizierbar ist. Für den Versuch wurden subkutane VEGF/FGF-enthaltenden und -freie AlgB-Depots in immunkompetenten NMRI-Mäusen hinsichtlich ihrer Vaskularisierung vier Wochen lang pro Woche mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall untersucht. Die einmal histologische Quantifizierung der Blutgefäße erfolgte für alle AlgB-Depots am Versuchsende.

Volumetrie

Die Volumetrie der AlgB-Depots wurde in dieser Studie durchgeführt um zu überprüfen, ob das intakte Immunsystem der Versuchstiere einen Einfluss auf die Größenentwicklung z.B. durch Abbauprozesse haben würde. Die AlgB-Depot-Volumina wurden 3, 7, 14, 21 und 28 Tage nach AlgB-Depotsetzung bestimmt. Es wurden keine signifikanten Größenveränderungen über die Zeit festgestellt. Auch zwischen den VEGF/FGFenthaltenden und –freien AlgB-Depots gab es keinen signifikanten Unterschied.

Die AlgB-Depots waren wie in den ersten zwei Etablierungsexperimenten volumenkonstant. Der Immunstatus der Versuchstiere hatte keinen Einfluss, die AlgB-Depots der immunkompetenten Mäuse waren auch ähnlich groß wie die der immundefizienten. Dieses Ergebnis entspricht den zuvor durchgeführten Studien. Plunkett und Hailey (1991) etablierten ihr AlgB-Depot-Modell ursprünglich ebenfalls in immunkompetenten Mäusen (C57BI/6), weil sie testen wollten, ob das wirtseigene Immunsystem die in den AlgBs verkapselten Tumorzellen angreifen würde. Sie beobachteten weder eine Beeinträchtigung der verkapselten Zellen noch entzündliche Reaktionen auf die subkutanen AlgB-Depots. Ähnliches beobachteten Vériter und Kollegen (2010) in ihren Untersuchungen zur in vivo Biokompatibilität von Alginaten. Sie injizierten immunkompetenten Wistar-Ratten AlgBs in unterschiedlichen Formulierungen (hoher Guluron- oder Mannuronsäuregehalt sowie sehr niedrige Viskosität der Alginatlösung) subkutan. Die AlgBs wurden mit dem in dieser Arbeit ebenfalls verwendeten AirStripping-Verfahren hergestellt. zwei, vier und zwölf Wochen nach Implantation wurden die AlgB-Depots immunhistochemisch auf Fibrosen, Graftstabilität und immunologische Infiltration durch CD2/CD68-positive Zellen sowie Neovaskularisation untersucht. Bis zu zwölf Wochen nach Implantation wurden keine immunologischen Reaktionen auf die AlgBs gemessen. Die Implantate waren für den gesamten Zeitraum in immunkompetenten Tieren stabil.

In vivo Blutgefäßquantifizierung

Mit der in vivo Blutgefäßquantifizierung im dritten Experiment sollte analog zu den vorherigen Experimenten die Angiogenese im TSAM longitudinal verfolgt werden. Nach den morphologischen Aufnahmen wurden wieder kontrastverstärkte CineLoops der AlgB-Depots aufgenommen und deren Blutgefäße mit der MIOT-Quantifizierung nach Palmowksi und Kollegen (2010) bestimmt.

Die longitudinalen Ultraschallmessungen zeigten eine stetige Zunahme der KSI-Werte ab Tag 3, die bis Tag 21 anhält. Die Veränderung der Angiogenese in den VEGF/FGFenthaltenden AlgB-Depots war über den Versuchszeitraum signifikant, genau wie in den ersten beiden Experimenten. Anders als in den Experimenten mit immundefizienten Tieren wurde in den immunkompetenten Mäusen ein deutlicher Anstieg der KSI-Werte schon an Tag 14 erreicht, der sich in den folgenden zwei Wochen nicht mehr so stark fortsetzt. Die Kontroll-Depots zeigten wie in den ersten Experimenten keine Erhöhung der KSI-Werte. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war wie in Experiment 2 ab Tag 7 signifikant. Die Ergebnisse der ersten Studien in immundefizienten Tieren konnten bestätigt werden. Im anschließenden Therapieversuch wurden auf diesen Ergebnissen aufbauend ebenfalls immunkompetente Mäuse eingesetzt und die in vivo Blutgefäßquantifizierung ab Tag 7 in wöchentlichem Abstand durchgeführt.

Histologische Blutgefäßquantifizierung

Nachdem in den ersten Experimenten durch eine signifikante positive Korrelation der Zusammenhang von sonographischer und histologischer Blutgefäßquantifizierung gezeigt werden konnte, erfolgte die histologische Blutgefäßquantifizierung im dritten Etablierungsversuch nur noch nach Versuchsende und es wurde keine zeitlich Veränderung der Blutgefäßprofildichte von VEGF/FGF-enthaltenden und –freien AlgB-Depots mehr untersucht.

28 Tage nach AlgB-Depotsetzung war der Unterschied in der Blutgefäßprofildichte zwischen VEGF/FGF-enthaltenden und -freien AlgB-Depots signifikant. Dies war auch in den beiden Studien mit immundefizienten Mäusen der Fall. In den bisher diskutierten Arbeiten wurden proangiogene AlgB-Depots maximal 14 Tage lang in vivo belassen (Stieger 2006). Im Falle einer längeren Beobachtungsphase handelte es sich immer um leere Kontroll-Depots (Plunkett und Hailey 1990, Robertson 1991, Lucidarme 2004). In einer Studie von Elcin und Kollegen (Elçin 2001) wurden VEGF-enthaltende AlgB-Depots subkutan in Ratten implantiert und bis zu 56 Tage dort belassen. Die Angiogenese in den Depots wurde 7, 14, 21 und 56 Tage nach Implantation histologisch quantifiziert, wobei mit immunhistochemischen Färbungen neben den Blutgefäßen auch aus den Depots freigesetztes VEGF und lokale Entzündungsmarker untersucht wurden. Elcin et al. stellten fest, dass über 56 Tage lang keine inflammatorischen oder allergischen Reaktionen in der unmittelbaren Peripherie der AlgB-Depots auftraten. Sie bestätigten damit die Studie von Ko und Kollegen (siehe Elcin 2001). Im Gegensatz zu den Kontroll-Depots konnten sie in den VEGF-AlgB-Depots Blutgefäße quantifizieren, wobei die Anzahl dieser Gefäße mit steigender VEGF-Konzentration und längerer Zeitdauer signifikant anstieg. Die Ergebnisse von Elcin und Kollegen gehen konform mit denen in dieser Arbeit.

Korrelation

Für dieses Experiment wurden die quantitativen in vivo Daten der Ultraschall-Untersuchung mit denen der histologischen Quantifizierung nur für den letzten Versuchstag korreliert. Die Blutgefäßprofildichten der AlgB-Depots der immunkompetenten Tiere waren im Mittel etwas höher als die der immundefizienten Tiere. Auch die KSI-Werte waren geringgradig höher. Die lineare Korrelationsanalyse zeigte einen signifikanten positiven Zusammenhang beider Methoden für die VEGF/FGF-enthaltenden und –freien AlgB-Depots. Dies entspricht den Ergebnissen der vorherigen Etablierungsexperimente. Auch Palmowski et al. zeigten in ihrer Studie mittels MIOT-Quantifizierung eine positive Korrelation zwischen sonographischen und histologischen Daten.

Mit dem dritten Experiment konnte bestätigt werden, dass das TSAM auf immunkompetente Mäuse übertragbar ist. Das folgende Experiment zum Therapiemonitoring wurde ebenfalls in immunkompetenten Mäusen durchgeführt.

5.3.3 Experiment 4: Therapiemonitoring in immunkompetenten Mäusen

Im vierten Experiment wurde das TSAM in Kombination mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall erstmals in einem Therapieversuch mit antiangiogenen Substanzen getestet. Hierfür wurden immunkompetente Mäuse mit subkutanen VEGF/FGF-enthaltenden AlgB-Depots in vier Gruppen eingeteilt und mit den antiangiogenen Substanzen Bevacizumab und Regorafenib bzw. mit den Vehikeln einmal täglich über vier Wochen behandelt. Die Angiogenese aller AlgB-Depots wurde wöchentlich longitudinal mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall quantifiziert. Zu Versuchsende wurden die Blutgefäße aller AlgB-Depots histologisch quantifiziert und es erfolgte abschließend die Korrelation der sonographischen und histologischen Daten. Auf eine erneute Überprüfung der Volumenkonstanz der AlgB-Depots wurde verzichtet, da dies in den vorherigen Experimenten hinreichend gezeigt worden ist.

In vivo Blutgefäßquantifizierung

Die antiangiogene Behandlung mit Bevacizumab und Regorafenib sollte mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall quantitativ verfolgt werden. Ziel dieser Untersuchung war die Überprüfung der Eignung der sonographischen Blutgefäßquantifizierung im etablierten TSAM als Routinemethode für die präklinische Testung antiangiogener Substanzen.

Es konnten signifikante Unterschiede im Vaskularisierungsgrad der behandelten und unbehandelten AlgB-Depots ermittelt werden. Die Bevacizumab-Behandlung führte im Vergleich zur Vehikelbehandlung zu einer geringer ausgeprägten Angiogenese, vor allem während der ersten drei Wochen. Danach wurde eine zunehmende Angiogenese auch in den mit Bevacizumab behandelten AlgB-Depots beobachtet. Die antiangiogene Therapie mit Regorafenib zeigte im Vergleich zur Vehikelbehandlung ebenfalls eine signifikante Hemmung der Angiogenese, und dies über den gesamten Behandlungszeitraum von 28 Tagen. Die antiangiogene Wirkung des oralen Multityrosinkinase-Hemmers war dabei am Versuchsende signifikant stärker als die vom anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab. Studien zum Ultraschall-Monitoring der Wirkung antiangiogener Substanzen sind mittlerweile mehrfach publiziert. Cheung und Kollegen (2007) führten in einem Xenograft-Modell ein Therapie-Monitoring des spezifisch gegen VEGFR2-gerichteten Antikörpers DC101 mittels sonographischen Untersuchungen durch. Über drei Wochen wurden melanomtragende Mäuse mit DC101 behandelt und die Tumorperfusion wurde an den Tagen 7, 14 und 21 mittels kontrastverstärkten B-Mode-Aufnahmen bestimmt. Bereits zwei Tage nach Behandlungsbeginn konnte eine signifikante Verminderung der Durchblutung der subkutanen Xenografts gemessen werden, die bis zum Versuchsende anhielt. Somit war DC101 effektiv antiangiogen wirksam. Wie in den meisten Versuchen wurden auch hier immundefiziente Mäuse eingesetzt, da die Melanome humanen Ursprungs waren. Jugold et al. (2008) führten ein antiangiogenes Therapie-Monitoring hingegen mit dem Doppler-

96

Ultraschall durch. Sie untersuchten subkutane Xenografts in Mäusen zu mehreren Zeitpunkten während der Behandlung mit einem VEGFR-2-Inhibitor. Während den Messungen wurde die relative Farbpixeldichte im dreidimensionalen Abbild des Tumors bestimmt. Schon nach sechs Tagen Behandlung war ein signifikanter Unterschied in der Vaskularisierung von behandelten und unbehandelten Tumoren deutlich. Jugold und Kollegen schlossen aus ihren Untersuchungen, dass das in vivo Imaging als nicht invasive Methode zum longitudinalen Monitoring antiangiogener Therapien solider Tumore gut geeignet ist. Palmowksi und Kollegen (2008) führten eine Studie durch, in der sie den Doppler-Ultraschall für die Messung unterschiedlicher Blutgefäßfraktionen in soliden mit antiangiogenen Therapeutika behandelten Tumoren einsetzten. Dafür verglichen sie native Doppler-Ultraschall-Aufnahmen mit kontrastverstärkten und zeigten eine verminderte Vaskularisierung behandelter Tumore im Vergleich zu unbehandelten. Palmowski schlussfolgerte, dass der kontrastverstärkte Ultraschall sensitiv für die Darstellung kleinerer Blutkapillaren ist, während der Blutfluss in größeren Gefäßen gut mit unverstärktem Doppler-Ultraschall quantifizierbar ist.

Bevacizumab-Wirkung im TSAM

Bevacizumab als monoklonaler Antikörper gegen die humane VEGF-Variante wurde hier als kommerziell zugelassener Angiogenese-Hemmer eingesetzt, da diese im etablierten TSAM zur in vivo Stimulierung der Angiogenese aus den AlgB-Depots freigesetzt wurde. In den Etablierungsversuchen ist wie auch schon in der Studie von Elçin und Kollegen (2001) gezeigt worden, dass injizierte AlgB-Depots ohne proangiogene Wachstumsfaktoren sowohl in immundefizienten als auch in immunkompetenten Mäusen nicht zu einer Angiogenese führten. Da die Freisetzung von VEGF aus den AlgBs unverzüglich einsetzt, begann die Behandlung am Tag der AlgB-Depotsetzung.

Die Angiogenese-Hemmung durch die Bevacizumab-Behandlung zeigte, dass die in den Etablierungsversuchen beobachtete AlgB-Depot-Angiogenese auf die Freisetzung des proangiogenen Wachstumsfaktors VEGF zurückzuführen ist. Dies geht konform mit den Ergebnissen der Studie von Robertson und Kollegen (1991), in der ein Angiogenese-Hemmer in dem von Plunkett und Hailey (1990) etablierten AlgB-Depot-Modell untersucht wurde. Die Quantifizierung der antiangiogenen Wirkung erfolgte ex vivo über die photometrische Bestimmung des Hämoglobin-Gehaltes in den AlgB-Depots sowie über die histologische Blutgefäßquantifizierung (siehe unten) nach 2 Wochen Behandlung. Robertson und Kollegen stellten eine signifikante Hemmung der Angiogenese bei den behandelten AlgB-Depots fest, vor allem, wenn die Therapie mit AlgB-Depotsetzung begonnen hatte. Auch Hoffmann und Kollegen (1997) quantifizierten den antiangiogenen Effekt eines

97

Wirkstoffes AlgB-Depot Hämoglobingehaltsbestimmung. im über die Außerdem quantifizierten sie die Perfusion der AlgB-Depots über die intravenöse Applikation eines fluoreszeierenden rein intravasalen Farbstoffes (FITC-Dextran) und zeigten, dass die Behandlung mit dem antiangiogen wirkenden Fumagillin-Analogon AGM-1470 zu einer signifikanten Reduktion der Durchblutung führte. Beide Gruppen zeigten einen signifikanten antiangiogenen Effekt nach 14 Tagen, was durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Jedoch wurde der Unterschied zwischen Bevacizumab-Vehikel- und -Behandlungsgruppe nach vier Wochen wieder kleiner. Die Ursache dieser Beobachtung wird in der wirtseigenen proangiogenen Stimulation durch murine Wachstumsfaktoren vermutet, denn Bevacizumab wirkt nur gegen humanes VEGF. O'Connor und Kollegen (2009) zeigten in ihrer Studie die antiangiogene Wirkung eines kreuzreaktiven anti-VEGF-Antikörpers gegen murines und humanes VEGF in einem HM7-Colon-Xenograft-Modell, indem sie mit dem auch in dieser Arbeit verwendeten Mikro-Ultraschallgerät Vevo770 die Perfusion behandelter Tumore in kontrastverstärkten B-Mode-CineLoops quantifizierten. Sie stellten anders als hier eine anhaltende Reduktion der Tumorperfusion fest.

Mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall konnte die antiangiogene Wirkung von Bevacizumab im TSAM bereits 14 Tage nach Versuchsbeginn quantitativ nachgewiesen und tierindividuell über die Zeit verfolgt werden. Die quantitativen Daten können mit denen der Regorafenib-Behandlung verglichen werden. Eine nachlassende Effektivität der spezifischen Therapie wurde festgestellt.

Regorafenib-Wirkung im TSAM

Der von der Bayer Schering Pharma AG entwickelte orale Multityrosinkinase-Hemmer Regorafenib blockiert neben verschiedenen anderen Tyrosinkinaserezeptoren auch den Rezeptor für VEGF und wird deshalb als potentieller Angiogenese-Hemmer betrachtet (Wilhelm 2011). Im TSAM wurde Regorafenib eingesetzt, um durch die direkte Blockade der wirtseigenen VEGF-Rezeptoren die Angiogenese effektiv zu hemmen. Die Behandlung startete analog zur Bevacizumab-Behandlung mit der AlgB-Depotsetzung.

Die antiangiogene Wirkung von Regorafenib konnte im TSAM bestätigt werden. Es zeigte sich bis zum Versuchsende eine signifikant niedrigere KSI in den behandelten AlgB-Depots. Regorafenib war im Gegensatz zu Bevacizumab auch nach vier Wochen noch wirksam. In der Studie von Wilhelm und Kollegen (2011) wurde die Substanz hinsichtlich ihrer antiangiogenen Wirkung in vitro und in vivo untersucht. Die Kollegen zeigten die signifikante Hemmung der Angiogenese experimenteller Tumore in diversen Xenograft-Modellen (Colo205, MDA-MB-231 u.a.) zum einen ex vivo über eine histologische Blutgefäßquantifizierung und zum anderen in vivo durch dynamische kontrastverstärkte
Magnetresonanztomographie. Bereits zehn Stunden nach einmaliger Behandlung mit Regorafenib wurde ein signifikanter Rückgang der Tumorperfusion gemessen, der bis zu acht Tage anhielt. Längerfristige Untersuchungen wurden nicht durchgeführt. Im TSAM wurde eine signifikante Hemmung der AlgB-Depot-Perfusion erst nach 14 Tagen beobachtet und hielt vier Wochen an. Die Ursache in der vergleichsweise späten Detektion des antiangiogenen Effektes von Regorafenib wird darin vermutet, dass die mit dem Mikro-Ultraschall quantifizierbaren funktionalen Blutgefäßen (Palmowski 2008) sich erst im AlgB-Depot ausbilden müssen (Robertson 1991). In der Studie von Wilhelm und Kollegen wurden im Gegensatz dazu etablierte, gut vaskularisierte Tumore untersucht.

5.4 Tumorsurrogat-Angiogenese-Modell und Tierschutz

In der Angiogenese-Forschung sind bereits viele alternative Methoden entwickelt worden, um versuchstierbelastende Tierversuche zu ersetzen (Hagelschuer 2009). Nach wie vor spielen in der Erforschung der tumorinduzierten Angiogenese in vivo Modelle eine große Rolle, da die komplexen Vorgänge während dieser noch nicht vollständig verstanden sind (Staton 2009).

Will man angiogene oder antiangiogene Effekte in vivo messen, wird derzeit routinemäßig auf die immunhistochemische Anfärbung von Blutgefäßen in histologischen Schnitten zurückgegriffen (Kiessling 2010). Dies ist zeitaufwendig und lässt keine Untersuchung des Verlaufs der Angiogenese zu. Ist es von Interesse, zu verschiedenen Zeitpunkten die Vaskularisierung eines Tumors zu quantifizieren, müssen für jeden Zeitpunkt separate Tiergruppen angesetzt werden. Dies kann die einzusetzende Versuchtieranzahl pro Versuch erheblich vervielfachen, da zu jedem Zeitpunkt eine ganze Gruppe von Tieren für die histologische Auswertung getötet werden muss (Hagelschuer 2009). Mit dem in dieser Arbeit etablierten TSAM in Verbindung mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall kann die Angiogenese zu beliebig festzusetzenden Zeitpunkten überwacht werden. Jedes Tier kann wiederholt untersucht ohne getötet werden zu müssen. Will man wie in der vorliegenden Arbeit zu fünf Messzeitpunkten die Angiogenese im TSAM quantifizieren, müssen nicht mehr fünf verschiedene Gruppen angesetzt werden, sondern nur noch eine. Geht man von der für eine statistische Auswertung minimal zu verwendenden Anzahl von fünf Tieren pro Gruppe aus, können mit der vorliegenden Methode bereits 20 Tiere pro Versuch eingespart werden. Meist sind die einzelnen Versuchsgruppen jedoch mindesten doppelt so groß. Hier kann ein wesentlicher Grundsatz des 3R-Prinzips nach Russel und Brunch (1959) verwirklicht werden, nämlich die Anzahl benötigter Versuchstiere zu vermindern ("Reduction", Hagelschuer 2009). Die longitudinalen Untersuchungen erhöhen außerdem die Qualität der Datenerhebung, indem interindividuelle Schwankungen zwischen den verschiedenen Versuchstieren vermieden werden. Trotzdem können nach Beendigung des Versuches und der damit verbundenen Tötung der Tiere weiterhin histologische Verfahren zum Einsatz kommen und somit beide Untersuchungsmethoden miteinander verglichen und zusammen für den Erhalt aussagekräftiger Ergebnisse eingesetzt werden ("Refinement", Hagelschuer 2009)

Mit dem vorliegenden TSAM können außerdem versuchsbedingte Belastungen für die Versuchstiere reduziert werden, indem bisherige Angiogenese-Modelle es wie beispielsweise das Cornea-Modell von Kaninchen oder Ratte ersetzt, die durch ihren hohen operativen Aufwand mit einer deutlichen Beeinträchtigung der Tiere verbunden sind (siehe Bahramsoltani 2003). Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten AlgB-Depots werden durch einfache subkutane Injektion minimal invasiv ins Tier gebracht. Bei tierexperimenteller Fachkunde kann der Eingriff ähnlich einer subkutanen Applikation von Therapeutika ohne Narkose durchgeführt werden. Darüber hinaus sind die AlgB-Depots anders als schnell wachsende experimentelle Tumore volumenkonstant. Die bisher noch routinemäßig eingesetzten Xenograft-Modelle verursachen durch ihre Größe sowie durch entstehende Nekrosen und Ulzerationen Schmerzen und Leiden, die für die Versuchstiere eine sehr hohe Belastung darstellen. Betroffene Tiere müssen aufgrund dieser Belastung frühzeitig getötet werden, was wiederum die Tierzahlen pro Versuchsgruppe drastisch erhöhen kann. Mit dem TSAM können solche Situationen vermieden werden. Die Versuchstiere haben durch die AlgB-Depots keine Beeinträchtigungen ihrer Bewegungsfreiheit und es kommt auch nicht zur Nekrosen und/oder Hautulzerationen bzw. Ausbildung von zur Metastasierung ("Refinement").

5.5 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurde der hoch auflösende kontrastverstärkte Mikro-Ultraschall als Alternative für die Quantifizierung der Angiogenese in einem TSAM eingesetzt. Die Versuche hatten zum Ziel, in vivo quantitative Daten über die Angiogenese mit Hilfe des minimal invasiven Mikro-Ultraschalls zu erheben und dadurch festzustellen, ob der Mikro-Ultraschall als Routine-Methode für die präklinische Testung investigativer antiangiogener Substanzen geeignet ist.

In den Versuchen zeigte sich, dass die sonographisch erhobenen Daten mit den stereologisch quantifizierten Blutgefäßprofildichten von histologischen Präparaten korrelierten. Die AlgB-Depot-Angiogenese konnte intraindividuell verfolgt werden. Das TSAM konnte erfolgreich auch in immunkompetenten Mäusen etabliert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass sich der Immunstatus hinsichtlich Volumen und Vaskularisierung nicht signifikant auf die AlgB-Depots auswirkte. Im Hinblick darauf, dass therapeutische Substanzen für den Einsatz im Menschen entwickelt werden, kann es von Vorteil sein, ein Angiogenese-Modell zur Verfügung zu haben, dass auch bei intaktem Immunsystem des

Versuchstieres verlässliche Resultate zu Behandlungseffekten liefert. Im Therapie-Monitoring konnte frühzeitig die Wirkung einer antiangiogenen Behandlung gemessen werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in dieser Arbeit das Tumorsurrogat-Angiogenese-Modell als Standardmodell zur Untersuchung von antiangiogenen Effekten erfolgreich etabliert werden konnte. Durch die sensitive in vivo Quantifizierung antiangiogener Effekte kann die Wirksamkeit neuer Angiogenese hemmender Substanzen nachgewiesen werden. Außerdem können durch longitudinale minimal invasive Messungen Versuchstierzahlen reduziert und interindividuelle Schwankungen vermindert werden. Darüber hinaus kann die Belastung der Versuchstiere durch volumenkonstante AlgB-Depots vermindert werden. Die einfache und schnelle Ultraschallmessung ermöglicht die Untersuchung von vielen Tieren in kurzer Zeit. Das in dieser Arbeit etablierte TSAM in Verbindung mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall ist hervorragend als Routinemethode für die pharmakologische Charakterisierung neuer antiangiogener Substanzen in der biomedizinischen Forschung geeignet.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde ein Tumorsurrogat-Angiogenese-Modell zur in vivo Quantifizierung von antiangiogenen Therapieeffekten etabliert und mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall charakterisiert. Hierfür wurden zunächst drei unabhängige tierexperimentelle Studien durchgeführt, in denen die Angiogenese im Modell sonographisch und histologisch untersucht wurde. Danach erfolgte in einem vierten Experiment der erstmalige Einsatz des Tumorsurrogat-Angiogenese-Modells in einem antiangiogenen Therapie-Versuch.

Im ersten Versuch wurden immundefizienten Tieren AlgB-Depots subkutan injiziert, die in vivo durch diffundierende proangiogene Wachstumsfaktoren die gerichtete Angiogenese induzierten. Es konnte gezeigt werden, dass ins AlgB-Depot einsprossende Blutgefäße mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall detektiert und ein signifikanter Unterschied im Vaskularisierungsgrad zwischen Wachstumsfaktoren enthaltenden und –freien AlgB-Depots quantifiziert werden konnten. Die Ergebnisse konnten durch eine positive Korrelation zwischen sonographisch gemessener Kontrastsignalintensität und histologisch ermittelter Blutgefäßprofildichte unter Verwendung stereologischer Werkzeuge bestätigt werden.

Das zweite Experiment diente der sonographischen Verlaufsuntersuchung einer Angiogenese in Wachstumsfaktoren enthaltenden und –freien AlgB-Depots. Angelehnt an den ersten Versuch erhielten immundefiziente Tiere AlgB-Depots mit oder ohne Wachstumsfaktoren. Die fortschreitende Vaskularisierung der individuellen AlgB-Depots wurde sonographisch verfolgt. Bereits frühzeitig nach Versuchsbeginn konnte ein signifikanter Gruppenunterschied sonographisch gemessen werden, der am Versuchsende am deutlichsten ausgeprägt war und signifikant mit den histologisch ermittelten Blutgefäßprofildichten korrelierte.

Im dritten Tierexperiment wurde aufbauend auf Versuch zwei die sonographische Verlaufsuntersuchung in immunkompetenten Versuchstieren durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der unterschiedliche Immunstatus sich nicht auf die sonographische Angiogenese-Messung auswirkte.

Abschließend wurde das Tumorsurrogat-Angiogenese-Modell in einem ersten Therapie-Versuch getestet. Wachstumsfaktoren enthaltende AlgB-Depots wurden immunkompetenten Mäusen subkutan injiziert. Ein Teil der Tiere wurde täglich mit Bevacizumab, einem antiangiogen wirkenden monoklonalen Antikörper gegen VEGF behandelt, der andere Teil erhielt ebenfalls täglich Regorafenib, einen in der Entwicklung befindlichen antiangiogen wirkenden Multityrosinkinase-Hemmer der Bayer Schering Pharma AG. Für beide Gruppen wurden Kontrollgruppen angesetzt, die nur mit dem jeweiligen Trägerstoff von Bevacizumab bzw. Regorafenib behandelt wurden. Die sonographische Messung der Vaskularisierung der individuellen AlgB-Depots wurde einmal wöchentlich durchgeführt und die Hemmung der Angiogenese konnte quantitativ dargestellt werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den mit Trägerstoff behandelten und den antiangiogen behandelten AlgB-Depots konnte frühzeitig sonographisch gemessen werden. Auch hier zeigte die Korrelation der sonographischen Daten mit den stereologisch ermittelten histologischen Daten einen deutlichen Zusammenhang zwischen Blutgefäßprofildichte und Kontrastsignalintensität.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der kontrastverstärkte Mikro-Ultraschall eine schnelle, effiziente und minimal invasive Methode zur Quantifizierung von antiangiogenen Effekten im Tumorsurrogat-Angiogenese-Modell ist.

Das TSAM konnte in seiner modifizierten Form etabliert werden und bietet sich als schonendes Tiermodell zur Routine-Testung neuer potentiell antiangiogen wirkender Substanzen an.

Die Kombination des TSAM mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall bietet erstens den Vorteil eines sensitiven Nachweises von antiangiogenen Therapieeffekten in vivo. Zweitens kann durch die individuellen Verlaufsuntersuchungen die Anzahl an Versuchstieren pro Gruppe deutlich reduziert werden, da nicht mehr für jeden Untersuchungszeitpunkt histologische Untersuchungen durchgeführt werden müssen. Drittens bedeutet das TSAM zusätzlich eine Reduzierung der Versuchstierbelastung, da keine malignen, schnell wachsenden und oft metastasierenden und nekrotisierenden Tumore mehr eingesetzt werden müssen, welche aus tierschutzrechtlichen Gründen oft zum vorzeitigen Versuchsabbruch führen.

Das etablierte Modell ist in Verbindung mit dem kontrastverstärkten Mikro-Ultraschall für die routinemäßige pharmakologische Charakterisierung neuer antiangiogener Substanzen in der biomedizinischen Forschung sehr gut geeignet.

7 SUMMARY

Establishment of an in vivo tumor surrogate angiogenesis model for testings of new antiangiogenic drugs

In this doctoral thesis a tumor surrogate angiogenesis model for in vivo quantitation of antiangiogenic therapeutic effects was established and characterized by using contrast enhanced micro-ultrasound. For this purpose, initially three animal experiments were conducted where angiogenesis of the surrogate model was investigated both with micro-ultrasound and histology. Finally, the surrogate model was used in a therapeutic setting for the first time.

The first experiment was conducted by using immunodeficient mice. Proangiogenic growth factor containing alginate beads as surrogate for tumor xenografts were injected subcutaneously. Due to in vivo release of proangiogenic growth factors angiogenesis was induced into the alginate bead depots. Growing blood vessels could be detected with contrast enhanced micro-ultrasound. A significant difference in vascularization of growth factor containing and empty alginates could be quantified. Results were confirmed by a positive correlation of ultrasound contrast signal intensity and histological blood vessel density determined by using stereological tools.

Aim of the second experiment was to observe the angiogenic process within individual alginate bead depots by micro-ultrasound. Similar to the first experiment growth factor containing or empty depots were injected subcutaneously in immunodeficient mice. The progressive vascularization of individual alginates was observed by micro-ultrasound. Early after study start a significant difference could be detected between growth factor containing and empty depots, which could be strongly confirmed by histology.

The third study was carried out based on the results of study one and two. The progressing vascularization of growth factor containing and empty alginate bead depots was determined with contrast enhanced micro-ultrasound. Immunocompetent mice were used. Results showed no impact of immune status on ultrasound measurements of alginate bead depot angiogenesis.

Finally, the established tumor surrogate angiogenesis model was used in a therapeutic experiment for the first time. Growth factor containing alginate bead depots were injected subcutaneously to immunocompetent mice. Mice were treated daily with Bevacizumab, an antiangiogenic anti-VEGF monoclonal antibody or with Regorafenib, an antiangiogenic oral multityrosine kinase inhibitor developed by Bayer Schering Pharma AG (BAY73-4506). Control groups were made up and treated with vehicles of Bevacizumab or Regorafenib. Micro-ultrasound measurements of individual alginate bead depot vascularization were

conducted once weekly. Inhibition of angiogenesis due to treatment could be quantified in vivo early after study start. Significant differences between vehicle and drug treated groups were observed early. Correlation of micro-ultrasound and histological data showed a clear correlation of blood vessel profile density and contrast signal intensity.

These results illustrate, that contrast enhanced micro-ultrasound is a fast, efficient and minimally invasively method for the quantitation of antiangiogenic effects in the tumor surrogate angiogenesis model.

The tumor surrogate angiogenesis model was established in its modified form as a gentle in vivo model for a routinely testing of new antiangiogenic drugs.

The tumor surrogate angiogenesis model combined with contrast enhanced micro-ultrasound has crucial advantages. First, the strong sensitivity regarding the in vivo quantitation of angiogenesis allows a highly precise in vivo assessment of antiangiogenic drug effects already at a very early phase after treatment start. Furthermore since this procedure can be used in vivo several times on the same animal, one can significantly minimize the number of study groups in the case of particular antiangiogenic questions, which, up to the present time, can only be answered by using many study groups. Finally, a reduction of mouse burden is given because the alginate bead depots are stable in their size during the whole experiment, are not able to metastasize or to become necrotic as often visible by using malignant tumors.

The established tumor surrogate angiogenesis model in combination with contrast enhanced micro-ultrasound is well suited for pharmacological characterizations of new antiangiogenic drugs in biomedical research.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Abdollahi, A.; Folkman, J. (2010):

Evading tumor evasion: current concepts and perspectives of anti-angiogenic cancer therapy. Drug Resist Updat. 13(1-2), 16-28.

Aird, W. C. (2003):

Endothelial cell heterogeneity. Crit Care Med. 31(4 Suppl), S221-30.

Andrade, S. P.; Fan, T. P.; Lewis, G. P. (1987):

Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. Br J Exp Pathol. 68(6), 755-66.

Augustin, H. G.; Kozian, D. H.; Johnson, R. C. (1994):

Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes.

Bioessays. 16(12), 901-6.

Bahramsoltani, M. (2003):

Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in vitro. Berlin, Freie Universität Berlin. Dissertationsschrift

Beers, M. H., Ed. (2006a):

The Merck Mannual 18th Edition. New York, Porter & Jones.

Bergers, G.; Benjamin, L. E. (2003):

Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat Rev Cancer. 3(6), 401-10.

Brem, H.; Folkman, J. (1975):

Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage. J Exp Med. 141(2), 427-39.

Burgis, E., Ed. (2000):

Allgemeine und spezielle Pharmakologie. München & Jena, Urban & Fischer.

Carmeliet, P. (2003):

Angiogenesis in health and disease. Nat Med. 9(6), 653-60.

Cheung, A. M. Y.; Brown, A. S.; Cucevic, V.; Roy, M.; Needles, A.; Yang, V.; Hicklin, J.; Kerbel, R. S.; Foster, F. S. (2007):

Detecting vascular changes in tumour xenografts using micro-ultrasound and micro-ct following treatment with vegfr-2 blocking antibodies. Ultrasound Med Biol. 33(8), 1259-68.

Cook, K. M.; Figg, W. D. (2010): Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. CA Cancer J Clin. 60(4), 222-43.

Delaney, G.; Jacob, S.; Featherstone, C.; Barton, M. (2005):

The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. Cancer. 104(6), 1129-37.

Delorme, S.; Krix, M. (2006):

Contrast-enhanced ultrasound for examining tumor biology. Cancer Imaging. 6, 148-52.

DeVita, H., Rosenberg, Ed. (2008):

Cancer - Principles & Practice of Oncology.)

Dockery, P.; Fraher, J. (2007):

The quantification of vascular beds: a stereological approach. Exp Mol Pathol. 82(2), 110-20.

Dornblühth, O. (2002):

Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch. W. Pschyrembel. Berlin - New York, Walter de Gruyter. 259. 277.

Dvorak, H. F. (2002):

Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. J Clin Oncol. 20(21), 4368-80.

Dvorak, H. F.; Gresser, I. (1989):

Microvascular injury in pathogenesis of interferon-induced necrosis of subcutaneous tumors in mice.

J Natl Cancer Inst. 81(7), 497-502.

Eisen, H. J., P. Nathan, P. Harper, M. Wojtukiewicz, S. Nicholson, A. Bahl, P. Tomczak, A. Wagner, D. Quinn (2009):

Phase II trial of the oral multikinase inhibitor BAY 73-4506 as 1st-line therapy in patients with metastatic or unresectable renal cell cancer (RCC).

In., 20 - 24 SEPTEMBER 2009.

Internationale Congress Centrum Berlin, Berlin, Germany.

Elçin YM, Dixit V, Gitnick G. (2001):

Extensive in vivo angiogenesis following controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: implications for tissue engineering and wound healing. Artif Organs. 25(7), 558-65.

Ellis, L. M.; Hicklin, D. J. (2008):

VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. Nat Rev Cancer. 8(8), 579-91.

Ellis, P. E.; Wong Te Fong, L. F.; Rolfe, K. J.; Crow, J. C.; Reid, W. M.; Davidson, T.; MacLean, A. B.; Perret, C. W. (2002):

The role of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase (PD-ECGF/TP) in Paget's disease of the vulva and breast.

Anticancer Res. 22(2A), 857-61.

Etzioni, A. (2006):

A communitarian approach: a viewpoint on the study of the legal, ethical and policy considerations raised by DNA tests and databases. J Law Med Ethics. 34(2), 214-21.

Ferlay J, S. H., Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. (2010):

GLOBOCAN 2008 - Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. from http://globocan.iarc.fr

Ferrara, N.; Henzel, W. J. (1989):

Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells.

Biochem Biophys Res Commun. 161(2), 851-8.

Ferrara, N.; Hillan, K. J.; Novotny, W. (2005):

Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. Biochem Biophys Res Commun. 333(2), 328-35.

Fichtner, I. (2008):

Preclinical data as basis for the design of clinical studies. Onkologie. 31 Suppl 2, 34-8.

Fitzgibbons, P. L.; Page, D. L.; Weaver, D.; Thor, A. D.; Allred, D. C.; Clark, G. M.; Ruby, S. G.; O'Malley, F.; Simpson, J. F.; Connolly, J. L.; Hayes, D. F.; Edge, S. B.; Lichter, A.; Schnitt, S. J. (2000):

Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement. Arch Pathol Lab Med. 124(7), 966-78.

Folkman, J. (1971):

Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med. 285(21), 1182-6.

Folkman, J. (1996):

Fighting cancer by attacking its blood supply. Sci Am. 275(3), 150-4.

Folkman, J. (2006):

Angiogenesis. Annu Rev Med. 57, 1-18.

Folkman, J. (2007a):

Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? Nat Rev Drug Discov. 6(4), 273-86.

Folkman, J. (2007b):

Tumor Angiogenesis III: Update on clinical applications of antiangiogenic therapy. Keynote Lecture, Boston Cancer Congress 2007, Boston, USA

Folkman, J.; Ingber, D. (1992):

Inhibition of angiogenesis. Semin Cancer Biol. 3(2), 89-96.

Forsberg F, Dicker AP, Thakur ML, Rawool NM, Liu JB, Shi WT, Nazarian LN. (2002):

Comparing contrast-enhanced ultrasound to immunohistochemical markers of angiogenesis in a human melanoma xenograft model: preliminary results. Ultrasound Med Biol. 28(4), 445-51.

Forsberg F, Ro RJ, Potoczek M, Liu JB, Merritt CR, James KM, Dicker AP, Nazarian LN. (2002):

Assessment of angiogenesis: implications for ultrasound imaging. Ultrasonics. 42(1-9), 325-30.

Furuya, M.; Nishiyama, M.; Kasuya, Y.; Kimura, S.; Ishikura, H. (2005):

Pathophysiology of tumor neovascularization. Vasc Health Risk Manag. 1(4), 277-90.

Gee, M. S.; Saunders, H. M.; Lee, J. C.; Sanzo, J. F.; Jenkins, W. T.; Evans, S. M.; Trinchieri, G.; Sehgal, C. M.; Feldman, M. D.; Lee, W. M. (2001):

Doppler ultrasound imaging detects changes in tumor perfusion during antivascular therapy associated with vascular anatomic alterations. Cancer Res. 61(7), 2974-82.

Gimbrone, M. A., Jr.; Cotran, R. S.; Leapman, S. B.; Folkman, J. (1974):

Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. J Natl Cancer Inst. 52(2), 413-27.

Goodwin, A. M. (2007):

In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. Microvasc Res. 74(2-3), 172-83.

Gordon, M. S.; Margolin, K.; Talpaz, M.; Sledge, G. W., Jr.; Holmgren, E.; Benjamin, R.; Stalter, S.; Shak, S.; Adelman, D. (2001):

Phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer.

J Clin Oncol. 19(3), 843-50.

Gospodarowicz, D. (1989):

Fibroblast growth factor. Crit Rev Oncog. 1(1), 1-26.

Gundersen, H. J.; Bendtsen, T. F.; Korbo, L.; Marcussen, N.; Moller, A.; Nielsen, K.; Nyengaard, J. R.; Pakkenberg, B.; Sorensen, F. B.; Vesterby, A.; et al. (1988): Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis.

APMIS. 96(5), 379-94.

Gundersen, H. J.; Jensen, E. B. (1987):

The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. J Microsc. 147(Pt 3), 229-63.

Hagelschuer, I., P. Hauff, et al. (2009).

Luminescent imaging technology as an opportunity to reduce and refine animal experiments: Light at the end of the tunnel? ALTEX. 26(3), 177-185.

Hall, G., Ed. (2006):

Radiobiology for the radiologist. Philadelphia, Williams & Williams.

Hanahan, D.; Folkman, J. (1996):

Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell. 86(3), 353-64.

Hanahan, D.; Weinberg, R. A. (2000):

The hallmarks of cancer. Cell. 100(1), 57-70.

Hanahan, D.; Weinberg, R. A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation.

Cell. 144(5), 646-74.

Hauff, P.; Reinhardt, M.; Foster, S. (2008):

Ultrasound contrast agents for molecular imaging. Handb Exp Pharmacol(185 Pt 1), 223-45.

Hendrix, M. J.; Seftor, E. A.; Hess, A. R.; Seftor, R. E. (2003):

Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. Nat Rev Cancer. 3(6), 411-21.

Heneweer, C. B. D.; Schniewind B.; Tiwari S.; Ammerpohl O.; Emme D.; Graeff C.; Both M.; Glueer C. C.; Kalthoff H.; Heller M. (2008):

Volumetry of ultrasound images of orthotopic tumours in a xenotransplantation model in mice. International OncoRay Workshop 2008. Dresden.

Hoffmann, J.; Schirner, M.; Menrad, A.; Schneider, M. R. (1997):

A highly sensitive model for quantification of in vivo tumor angiogenesis induced by alginateencapsulated tumor cells. Cancer Res. 57(17), 3847-51.

Hsu, J. Y.; Wakelee, H. A. (2009):

Monoclonal antibodies targeting vascular endothelial growth factor: current status and future challenges in cancer therapy.

BioDrugs. 23(5), 289-304.

Hurwitz, H.; Fehrenbacher, L.; Novotny, W.; Cartwright, T.; Hainsworth, J.; Heim, W.; Berlin, J.; Baron, A.; Griffing, S.; Holmgren, E.; Ferrara, N.; Fyfe, G.; Rogers, B.; Ross, R.; Kabbinavar, F. (2004):

Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med. 350(23), 2335-42.

Iordanescu I, Becker C, Zetter B, Dunning P, Taylor GA. (2002):

Tumor vascularity: evaluation in a murine model with contrast-enhanced color Doppler US effect of angiogenesis inhibitors.

Radiology. 222(2), 460-7.

Iwahana, M.; Nakayama, Y.; Tanaka, N. G.; Goryo, M.; Okada, K. (1996):

Quantification of tumour-induced angiogenesis by image analysis. Int J Exp Pathol. 77(3), 109-14.

Johnson, D. H.; Fehrenbacher, L.; Novotny, W. F.; Herbst, R. S.; Nemunaitis, J. J.; Jablons, D. M.; Langer, C. J.; DeVore, R. F., 3rd; Gaudreault, J.; Damico, L. A.; Holmgren, E.; Kabbinavar, F. (2004):

Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic nonsmall-cell lung cancer.

J Clin Oncol. 22(11), 2184-91.

Jugold M, Palmowski M, Huppert J, Woenne EC, Mueller MM, Semmler W, Kiessling F. (2008):

Volumetric high-frequency Doppler ultrasound enables the assessment of early antiangiogenic therapy effects on tumor xenografts in nude mice. Eur Radiol. 18(4), 753-8.

Jung, K. H.; Roh, J. K. (2008):

Circulating Endothelial Progenitor Cells in Cerebrovascular Disease. J Clin Neurol. 4(4), 139-147.

Kabbinavar, F.; Hurwitz, H. I.; Fehrenbacher, L.; Meropol, N. J.; Novotny, W. F.; Lieberman, G.; Griffing, S.; Bergsland, E. (2003):

Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol. 21(1), 60-5.

Karamysheva, A. F. (2008):

Mechanisms of angiogenesis. Biochemistry (Mosc). 73(7), 751-62.

Kaye, S. B. (1998):

New antimetabolites in cancer chemotherapy and their clinical impact. Br J Cancer. 78 Suppl 3, 1-7.

Kerbel, R. S. (2003):

Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. Cancer Biol Ther. 2(4 Suppl 1), S134-9.

Kerbel, R. S. (2008):

Tumor angiogenesis. N Engl J Med. 358(19), 2039-49.

Kiessling, F.; Razansky, D.; Alves, F. (2010):

Anatomical and microstructural imaging of angiogenesis. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 37 Suppl 1, S4-19.

Kim, K. J.; Li, B.; Winer, J.; Armanini, M.; Gillett, N.; Phillips, H. S.; Ferrara, N. (1993):

Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo.

Nature. 362(6423), 841-4.

Landesärztekammer Reinland-Pfalz (2006):

Weiterbildungsordnung, Koblenz, Deutschland.

Kragh, M.; Hjarnaa, P. J.; Bramm, E.; Kristjansen, P. E.; Rygaard, J.; Binderup, L. (2003):

In vivo chamber angiogenesis assay: an optimized Matrigel plug assay for fast assessment of anti-angiogenic activity. Int J Oncol. 22(2), 305-11.

Krix, M.; Kauczor, H. U.; Delorme, S. (2003):

[Quantification of tissue perfusion with novel ultrasound methods]. Radiologe. 43(10), 823-30.

Krix, M.; Kauczor, H. U.; Delorme, S. (2005):

[Vascular imaging with contrast-enhanced sonography for experimental use]. Radiologe. 45(6), 552-9.

Kung, A. L. (2007):

Practices and pitfalls of mouse cancer models in drug discovery. Adv Cancer Res. 96, 191-212.

Laking, G. R.; West, C.; Buckley, D. L.; Matthews, J.; Price, P. M. (2006):

Imaging vascular physiology to monitor cancer treatment. Crit Rev Oncol Hematol. 58(2), 95-113.

Lang, I.; Hoffmann, C.; Olip, H.; Pabst, M. A.; Hahn, T.; Dohr, G.; Desoye, G. (2001):

Differential mitogenic responses of human macrovascular and microvascular endothelial cells to cytokines underline their phenotypic heterogeneity.

Cell Prolif. 34(3), 143-55.

Lange-Asschenfeldt, B. (2009):

Modulation der kutanen Angiogenese bei Entzündung und Wundheilung. Berlin, Freie Universität Berlin, Dissertationsschrift

Langer, R.; Folkman, J. (1976):

Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. Nature. 263(5580), 797-800.

Liebich, H. (1999):

Funktionelle Histologie der Haussäugetiere - Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. Stuttgart; New York: Schattauer. -.3. Auflage.

Lowe, S. W.; Bodis, S.; McClatchey, A.; Remington, L.; Ruley, H. E.; Fisher, D. E.; Housman, D. E.; Jacks, T. (1994):

p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. Science. 266(5186), 807-10.

Lucidarme, O.; Nguyen, T.; Kono, Y.; Corbeil, J.; Choi, S. H.; Varner, J.; Mattrey, R. F. (2004):

Angiogenesis model for ultrasound contrast research: exploratory study. Acad Radiol. 11(1), 4-12.

Lucidarme O, Nguyen T, Kono Y, Corbeil J, Choi SH, Varner J, Mattrey RF. (2006): Angiogenesis model for ultrasound contrast research: exploratory study.

Acad Radiol. 11(1), 4-12.

Malcontenti-Wilson C, Muralidharan V, Skinner S, Christophi C, Sherris D, O'Brien PE. (2001):

Combretastatin A4 prodrug study of effect on the growth and the microvasculature of colorectal liver metastases in a murine model. Clin Cancer Res. 7(4), 1052-60.

März, P. (2008):

Die Geschichte der Anti-Angiogenese Newsletter Antiangiogenese (Heft 3, 29. Jahrgang).

März, P. (2009):

Die Geschichte der Anti-Angiogenese Newsletter Antiangiogenese (Heft 2, 30. Jahrgang).

Miller, K.; Wang, M.; Gralow, J.; Dickler, M.; Cobleigh, M.; Perez, E. A.; Shenkier, T.; Cella, D.; Davidson, N. E. (2007):

Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. N Engl J Med. 357(26), 2666-76.

Miller, K. D.; Chap, L. I.; Holmes, F. A.; Cobleigh, M. A.; Marcom, P. K.; Fehrenbacher, L.; Dickler, M.; Overmoyer, B. A.; Reimann, J. D.; Sing, A. P.; Langmuir, V.; Rugo, H. S. (2005):

Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. J Clin Oncol. 23(4), 792-9.

Morabito, A.; Di Maio, M.; De Maio, E.; Normanno, N.; Perrone, F. (2006):

Methodology of clinical trials with new molecular-targeted agents: where do we stand? Ann Oncol. 17 Suppl 7, vii128-31.

Müller, S. A. (2008):

Prüfung und Etablierung stereologischer Methoden zur Quantifizierung histomorphologischer Strukturen in experimentellen Tumoren. Berlin, Freie Universität Berlin, Dissertationsschrift

Norrby, K. (2006):

In vivo models of angiogenesis. J Cell Mol Med. 10(3), 588-612.

O'Connor JP, Carano RA, Clamp AR, Ross J, Ho CC, Jackson A, Parker GJ, Rose CJ, Peale FV, Friesenhahn M, Mitchell CL, Watson Y, Roberts C, Hope L, Cheung S, Reslan HB, Go MA, Pacheco GJ, Wu X, Cao TC, Ross S, Buonaccorsi GA, Davies K, Hasan J, Thornton P, del Puerto O, Ferrara N, van Bruggen N, Jayson GC.(2009):

Quantifying antivascular effects of monoclonal antibodies to vascular endothelial growth factor: insights from imaging.

Clin Cancer Res. 15(21), 6674-82.

Palmowski, M.; Huppert, J.; Hauff, P.; Reinhardt, M.; Schreiner, K.; Socher, M. A.; Hallscheidt, P.; Kauffmann, G. W.; Semmler, W.; Kiessling, F. (2008):

Vessel fractions in tumor xenografts depicted by flow- or contrast-sensitive three-dimensional high-frequency Doppler ultrasound respond differently to antiangiogenic treatment. Cancer Res. 68(17), 7042-9.

Palmowski, M.; Lederle, W.; Gaetjens, J.; Socher, M.; Hauff, P.; Bzyl, J.; Semmler, W.; Gunther, R. W.; Kiessling, F. (2010):

Comparison of conventional time-intensity curves vs. maximum intensity over time for postprocessing of dynamic contrast-enhanced ultrasound. Eur J Radiol. 75(1), e149-53.

Passaniti, A.; Taylor, R. M.; Pili, R.; Guo, Y.; Long, P. V.; Haney, J. A.; Pauly, R. R.; Grant, D. S.; Martin, G. R. (1992):

A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. Lab Invest. 67(4), 519-28.

Plendl, P. D. J. (2003):

Angiogenese und Antiangiogenese: vom Wirkstoffscreening zur Therapie. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift. 110, 338 - 339.

Plunkett, M. L.; Hailey, J. A. (1990):

An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. Lab Invest. 62(4), 510-7.

Presta, L. G.; Chen, H.; O'Connor, S. J.; Chisholm, V.; Meng, Y. G.; Krummen, L.; Winkler, M.; Ferrara, N. (1997):

Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. Cancer Res. 57(20), 4593-9.

Ranieri, G.; Patruno, R.; Ruggieri, E.; Montemurro, S.; Valerio, P.; Ribatti, D. (2006):

Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a target of bevacizumab in cancer: from the biology to the clinic.

Curr Med Chem. 13(16), 1845-57.

Reuter, P., Ed. (2008):

Springer Lexikon Diagnose & Therapie. Chemotherapie. Heidelberg. Deutschland

Risau, W. (1996): What, if anything, is an angiogenic factor? Cancer Metastasis Rev. 15(2), 149-51.

Risau, W.; Flamme, I. (1995):

Vasculogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol. 11, 73-91.

Robert Koch Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (2006):

Krebs in Deutschland: Häufigkeiten und Trends. 5 ed., Saarbrücken. 1-108

Robertson, N. E.; Discafani, C. M.; Downs, E. C.; Hailey, J. A.; Sarre, O.; Runkle, R. L., Jr.; Popper, T. L.; Plunkett, M. L. (1991):

A quantitative in vivo mouse model used to assay inhibitors of tumor-induced angiogenesis. Cancer Res. 51(4), 1339-44.

Russel, W. M. S.; Burch, R. L. (1959):

The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen, Nature, 238pp.

Salmon, S. E., Ed. (1987):

Adjuvant therapy of cancer. In "The concept of neoadjuvant therapy." Orlando, Florida, Grune&Stratton.

Sandler, A.; Gray, R.; Perry, M. C.; Brahmer, J.; Schiller, J. H.; Dowlati, A.; Lilenbaum, R.; Johnson, D. H. (2006):

Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 355(24), 2542-50.

Schirmer, S. H.; van Nooijen, F. C.; Piek, J. J.; van Royen, N. (2009a):

Stimulation of collateral artery growth: travelling further down the road to clinical application. Heart. 95(3), 191-7.

Schirmer, S. H.; van Royen, N.; Laufs, U.; Bohm, M. (2009b):

[Mechanisms and potential of the therapeutic stimulation of arteriogenesis]. Dtsch Med Wochenschr. 134(7), 302-6.

Schirner, M.; Menrad, A.; Stephens, A.; Frenzel, T.; Hauff, P.; Licha, K. (2004):

Molecular imaging of tumor angiogenesis. Ann N Y Acad Sci. 1014, 67-75.

Siegel, A. B.; Olsen, S. K.; Magun, A.; Brown, R. S., Jr. (2010): Sorafenib: where do we go from here?

Hepatology. 52(1), 360-9.

Simionescu, M. (2000):

Structural, biochemical and functional differentiation of the vascular endothelium. In: Morphogenesis of the endothelium. / Hrsg. R. G. Risau W. -: Harwood Academic Publisher. -. S. 1-22.)

Smith-McCune, K. K.; Weidner, N. (1994):

Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. Cancer Res. 54(3), 800-4.

Sowter, H. M.; Corps, A. N.; Evans, A. L.; Clark, D. E.; Charnock-Jones, D. S.; Smith, S. K. (1997):

Expression and localization of the vascular endothelial growth factor family in ovarian epithelial tumors.

Lab Invest. 77(6), 607-14.

Staton, C., Lewis, C., Bicknell, R., Ed. (2006):

Angiogenesis Assays: A Critical Appraisal Of Current Techniques. John Wiley & Sons.)

Staton, C. A.; Reed, M. W.; Brown, N. J. (2009):

A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. Int J Exp Pathol. 90(3), 195-221.

Stieger, S. M.; Bloch, S. H.; Foreman, O.; Wisner, E. R.; Ferrara, K. W.; Dayton, P. A. (2006):

Ultrasound assessment of angiogenesis in a matrigel model in rats. Ultrasound Med Biol. 32(5), 673-81.

Takahashi, M.; Maeda, S.; Ogura, K.; Terano, A.; Omata, M. (1998):

The possible role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in gastric ulcer healing: effect of sofalcone on VEGF release in vitro. J Clin Gastroenterol. 27 Suppl 1, S178-82.

The Angiogenesis Foundation (2009):

Understanding Angiogenesis - The Angiogenesis Process. http://www.angio.org/understanding/process.php.

Thiede, K.; Momburg, F.; Zangemeister, U.; Schlag, P.; Schirrmacher, V. (1988):

Growth and metastasis of human tumors in nude mice following tumor-cell inoculation into a vascularized polyurethane sponge matrix.

Int J Cancer. 42(6), 939-45.

Truong, L. D.; Shen, S. S. (2011):

Immunohistochemical diagnosis of renal neoplasms. Arch Pathol Lab Med. 135(1), 92-109.

Vériter S, Mergen J, Goebbels RM, Aouassar N, Grégoire C, Jordan B, Levêque P, Gallez B, Gianello P, Dufrane D. (2010):

In vivo selection of biocompatible alginates for islet encapsulation and subcutaneous transplantation.

Tissue Eng Part A. 16(5), 1503-13.

Volm, M.; Koomagi, R.; Mattern, J. (1999):

PD-ECGF, bFGF, and VEGF expression in non-small cell lung carcinomas and their association with lymph node metastasis. Anticancer Res. 19(1B), 651-5.

Wang, H.; Marchal, G.; Ni, Y. (2011):

Multiparametric MRI biomarkers for measuring vascular disrupting effect on cancer. World J Radiol. 3(1), 1-16.

Wankhede, M.; Dedeugd, C.; Siemann, D. W.; Sorg, B. S. (2010):

In vivo functional differences in microvascular response of 4T1 and Caki-1 tumors after treatment with OXi4503. Oncol Rep. 23(3), 685-92.

Weidner, N.; Semple, J. P.; Welch, W. R.; Folkman, J. (1991):

Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. N Engl J Med. 324(1), 1-8.

Weidner N. (1995):

Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. Breast Cancer Res Treat. 36(2), 169-80.

Wilhelm SM, Dumas J, Adnane L, Lynch M, Carter CA, Schütz G, Thierauch KH, Zopf D. (2011):

Regorafenib (BAY 73-4506): A new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. Int J Cancer. 129(1), 245-55.

Wilkie, A. O.; Patey, S. J.; Kan, S. H.; van den Ouweland, A. M.; Hamel, B. C. (2002):

FGFs, their receptors, and human limb malformations: clinical and molecular correlations. Am J Med Genet. 112(3), 266-78.

Wolters GH, Fritschy WM, Gerrits D, van Schilfgaarde R. (1991):

A versatile alginate droplet generator applicable for microencapsulation of pancreatic islets. J Appl Biomater. 3(4), 281-6.

Yanagisawa, K.; Hamada, K.; Gotoh, M.; TokunagaT; Oshika, Y.; Tomisawa, M.; Lee, Y. H.; Handa, A.; Kijima, H.; Yamazaki, H.; Nakamura, M.; Ueyama, Y.; Tamaoki, N.; Fukuda, H. (2001):

Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the subacromial bursa is increased in patients with impingement syndrome.

J Orthop Res. 19(3), 448-55.

Yang, J. C.; Haworth, L.; Sherry, R. M.; Hwu, P.; Schwartzentruber, D. J.; Topalian, S. L.; Steinberg, S. M.; Chen, H. X.; Rosenberg, S. A. (2003):

A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer.

N Engl J Med. 349(5), 427-34.

Zagorchev, L.; Mulligan-Kehoe, M. J. (2009):

Molecular imaging of vessels in mouse models of disease. Eur J Radiol. 70(2), 305-11.

9 TABELLARISCHER ANHANG

9.1 Chemische Substanzen und Verbrauchsmaterialien

Substanz/Material	Produktname	Katalog- nummer	Firma	Land der Herstellung	
Avidin/Biotin	Biotin Blocking Reagent	X0590	Dako Cytomation	Deutschland	
Calciumchlorid	Calciumchlorid, wasserfrei, gekörnt	102379	Merck Chemicals	Deutschland	
DAB Lösung	Liquid DAB Substrat- Chromogen-System	K3468	Dako Cytomation	Deutschland	
Einbettmedium	Tissue-Tek O.C.T. Compound	ssue-Tek O.C.T. 4583 Sakura		Japan	
Färbeautomat	Dako Autostainer	E172566	Dako Cytomation	Deutschland	
Fibroblast Growth Factor	Recombinant Human FGF basic (146 aa), CF	combinant Human 233-FB R&D Systems F basic (146 aa), CF			
Hämalaun	Mayers Hämalaunlösung	ayers 109249 Merck Ch imalaunlösung		Deutschland	
Isofluran	Isofluran Deltaselect	0183006	Actavis	Deutschland	
Isotone Kochsalzlösung	Isotone Kochsalzlösung 3710647 B. Braun 0,9%		Kochsalzlösung 3710647 B. Braun		
Isotyp (Negativkontrolle)	IgG2 biotinyliert	biotinyliert 553928 BD Biosciences Pharmingen		USA	
Natrium-Alginatlösung	Sodium-alginate solution	solution IE-1010 Inotech		Schweiz	
PBS-Puffer	Phosphate Buffered Saline, 0,01M, pH7,4	P-3813	Sigma Aldrich	Deutschland	
Peroxidase Blockierungsreagenz	Peroxidase Blocking Reagent	S2001	Dako Cytomation	Deutschland	
Primärantikörper: Ratte- anti-Maus-CD31-Antikörper	PECAM-1, purified anti mouse CD31	550274	BD Biosciences Pharmingen	USA	
Sekundärantikörper, biotinylierter Ziege-anti- Ratte Antikörper	Biotin polyclonal anti rat Ig	559286	BD Biosciences Pharmingen	USA	
Streptavidin-Horseradish- Peroxidase	ExtrAvidin Peroxidase Conjugate	E-288C	Sigma Aldrich	Deutschland	
Ultraschallgel	Aquasonic clear	03-50	Parker Laboratories	USA	
Ultraschallgerät	VEVO 770	-	VisualSonics	Kanada	
Ultraschallkontrastmittel	MikroMarker non- targeted Contrast Agent	VS- VisualSonics 11694		Kanada	
Ultraschall-Transducer	RMV 710B	-	VisualSonics	Kanada	
Vascular Endothelial Growth Factor	Recombinant Human VEGF 165, CF	293-VE	R&D Systems	USA	
Xylol	Xylol	808697	Merck Chemicals	Deutschland	
Ziegenserum	Normal Goat Serum	S-1000 Vector Laboratories		USA	

Tabelle 20: Material- und Substanzliste

9.2 Ergebnisse

9.2.1 Reproduzierbarkeit der sonographischen Messungen

AlgB-Depot-Volumen		Erfahrungsgrad 0		Erfahrun	gsgrad 1	Erfahrun	gsgrad 2
Tag	Messung	AlgB-Depot 1	AlgB-Depot 2	AlgB-Depot 1	AlgB-Depot 2	AlgB-Depot 1	AlgB-Depot 2
	1	58,65	65,11	61,85	70,12	58,42	65,00
1	2	58,11	65,70	62,18	71,54	58,59	68,96
	3	58,87	69,17	63,11	71,48	56,87	67,64
	4	64,76	70,87	63,14	70,06	58,76	66,96
2	5	59,60	68,99	63,11	70,49	59,51	67,30
	6	63,23	68,93	63,12	70,83	59,39	67,70
	7	59,35	69,22	63,31	70,84	58,30	67,97
3	8	62,21	70,33	63,40	71,45	58,75	67,79
	9	60,96	69,83	63,20	71,81	58,65	67,94
	10	60,31	69,98	66,59	73,45	59,35	66,12
4	11	58,01	69,47	63,06	70,87	58,95	67,06
	12	60,52	68,75	64,56	71,50	57,79	68,00
	13	58,35	65,81	63,13	73,43	59,28	67,51
5	14	60,82	69,42	63,20	71,58	58,85	67,33
	15	59,37	67,60	62,32	72,65	58,42	69,12

 Tabelle 21: Einzelwerte der Auswertung von AlgB-Depot-Volumina durch 3 Auswerter

AlgB-Depot- KSI		Erfahrun	igsgrad 0	Erfahrun	igsgrad 1	Erfahrungsgrad 2			
Tag	Messung	AlgB-Depot 1	AlgB-Depot 2	AlgB-Depot 1	AlgB-Depot 2	AlgB-Depot 1	AlgB-Depot 2		
	1	66,02	77,03	70,33	102,71	68,81	97,25		
1	2	68,90	87,69	75,58	106,43	66,04	92,70		
	3	67,64	83,32	71,30	98,61	63,58	103,66		
	4	67,47	79,38	71,90	104,45	66,91	100,62		
2	5	67,58	75,37	72,55	91,84	66,86	104,53		
	6	69,12	79,50	71,25	99,75	66,61	94,88		
	7	67,99	79,88	73,73	93,28	67,54	104,92		
3	8	67,24	85,50	72,30	100,83	66,59	100,48		
	9	71,39	87,99	73,31	96,94	66,07	102,30		
	10	68,39	79,98	72,10	100,96	67,38	92,80		
4	11	68,79	86,44	72,08	98,81	65,86	95,99		
	12	69,44	84,96	72,50	99,07	66,38	95,90		
	13	66,95	85,36	72,93	90,45	66,88	98,46		
5	14	69,00	68,71	72,52	91,70	68,64	97,21		
	15	69,34	87,05	70,80	106,72	68,09	99,76		

 Tabelle 22: Einzelwerte der Auswertung von AlgB-Depot-KSIs durch 3 Auswerter

9.2.2 Experiment 1

AlgB-Depot-Volumen [mm ³]													
Ultraschall-	Tag 0	Tag 3	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Ultraschall-	Tag 0	Tag 3	Tag 14	Tag 21	Tag 28		
Maus Nr.	VEG	F/FGF-en	thaltend	e AlgB-D	epots	Maus Nr. VEGF/FGF-freie				e AlgB-Depots			
1	87,19	100,82			62,71	1	114,25	88,63			110,45		
2	70,16	87,25			71,12	2	126,34	84,50			87,44		
3	89,58	140,22			125,26	3	107,36	83,36			78,74		
4	97,03	116,30			114,42	4	84,82	90,86			82,52		
5	101,16	130,57			133,36	5	96,09	54,07			57,21		
6	100,95	142,99		139,40		6	101,11	85,97		105,30			
7	90,17	100,31		102,65		7	100,83	85,33		93,07			
8	79,03	92,29		92,98		8	160,99	86,71		89,15			
9	71,26	80,11		107,22		9	80,68	67,98		76,89			
10	82,84	131,54		126,37		10	90,94	38,28		36,97			
11	108,27	110,36	114,61			11	94,50	87,45	93,97				
12	78,11	48,27	61,67			12	83,97	83,37	88,96				
13	69,63	54,52	73,56			13	72,49	93,68	90,86				
14	88,55	104,91	95,93			14	115,53	103,82	105,27				
15	90,20	85,83	103,48			15	97,83	75,37	80,56				

Tabelle 23: Einzelwerte der AlgB-Depot-Volumina pro Gruppe und Ultraschall-Untersuchungszeitpunkt

	AlgB-Depot-Kontrastsignalintensität [Graustufen]													
Ultraschall-	Tag 3	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Ultraschall-	Tag 3	Tag 14	Tag 21	Tag 28					
Maus Nr.	VEGF/	FGF-enthal	tende AlgB-	Depots	Maus Nr.	VEC	GF/FGF-fre	eie AlgB-D	epots					
1	74,15			120,52	1	61,75			72,04					
2	77,19			136,26	2	74,05			77,36					
3	75,04			124,69	3	73,37			76,64					
4	62,29			101,45	4	73,91			76,21					
5	72,94			101,04	5	77,93			74,27					
6	93,77		138,05		6	71,64		72,54						
7	83,15		107,18		7	73,61		72,47						
8	97,37		144,85		8	79,93		76,43						
9	98,25		124,54		9	67,39		70,44						
10	64,91		109,77		10	78,19		72,57						
11	84,19	90,40			11	77,11	70,13							
12	96,06	111,54			12	68,19	73,07							
13	87,20	103,14			13	64,53	72,04							
14	116,71	126,19			14	56,08	64,31							
15	77,49	162,46			15	75,09	80,71							

Tabelle 24: Einzelwerte der AlgB-Depot-Kontrastsignalintensität pro Gruppe und Ultraschall-Untersuchungszeitpunkt

AlgB-Depot-Blutgefäßprofildichte [Blutgefäße/AlgB-Depot-Schnittfläche]												
Ultraschall-	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Ultraschall-	Tag 14	Tag 21	Tag 28					
Maus Nr.	VEGF/FGF	-enthaltende A	lgB-Depots	Maus Nr.	VEGF/F	GF-freie Alg	3-Depots					
1			57,57	1			19,87					
2			164,05	2			44,52					
3			96,40	3			31,39					
4			73,09	4			33,49					
5			69,33	5			42,23					
6		110,80		6		31,88						
7		51,97		7		16,16						
8		46,10		8		34,08						
9		128,27		9		29,54						
10		79,92		10		19,14						
11	34,69			11	13,24							
12	68,71			12	14,69							
13	68,57			13	17,57							
14	106,93			14	26,05							
15	152,80			15	33,66							

Tabelle 25: Einzelwerte der Blutgefäßprofildichten pro Gruppe und Histologie-Untersuchungszeitpunkt

9.2.3 Experiment 2

					AlaB-D	epot-Vo	olumen [mm ³]						
Ultraschall-	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Ultraschall-	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28
Maus Nr.	VE	GF/FGF	-enthal	tende A	lgB-Dep	ots	Maus Nr.		VEGF	/FGF-fre	ie AlqB	-Depots	
1	86,57	84,38	72,69	70,01	70,42	72,67	1	95,71	53,79	51,54	56.40	52,78	54,13
2	93,08	96,60	96,19	100,21	93,43	95,53	2	86.87	93,68	90,68	80,17	79,23	81,44
3	89,32	102,12	101,79	112,10	99,97	102.36	3	75.09	67,90	66,93	60,20	56,13	62,73
4	88,03	71,19	101,91	78,40	81,20	85,29	4	60,25	77,55	65,78	69,25	68.05	68,82
5	72,98	62,32	52,31	60,12	63,76		5	78,92	40,83	43,14	37,77	37.65	
6	93.26	52,82	50,72	55.68	38.35		6	92,47	99,34	81,89	85,96	86,11	
7	76.80	87,12	88,41	82.57	99,12		7	72,46	61,11	61,04	53,67	52,21	
8	75,81	63.02	60.65	70,43	67,56		8	84,54	88,30	90,28	89,84	97,44	
9	95,80	80.08	110.02	108.93	81,42		9	58,55	61,90	58,28	57,68	58,64	
10	83,31	71,53	74,04	67,41			10	87.22	71,67	97,29	86,46	81,29	
11	98,07	99,48	90,35	100.53			11	77.03	44,23	47,48	39,90		
12	91.85	73.55	75.20	78.91			12	78.53	64.65	59.01	59.91		
13	56.73	47.57	52.12	61.27			13	81.33	110.14	104.37	103.33		
14	94.88	97.78	85.83				14	75.11	124.96	130.59	133.99		
15	86.69	69.88	65.29				15	72.79	51.75	40.85			
16	83.04	82.51	90.25				16	89.87	101.13	87.61			
17	88.62	77.38	77 18				17	68 40	72 22	66 64			
18	42.91	73.83	96 13				18	92 49	88.31	85 58			
19	101 24	122.83	00,10				19	79 79	89.63	00,00			
20	83 61	82 83					20	89.37	69 24				

 Tabelle 26: Einzelwerte der AlgB-Depot-Volumina pro Gruppe und Ultraschall-Untersuchungszeitpunkt

			laB-Der	ot-Kont	rastsion	alintensität [Graustufen]					
Ultraschall-	Tag 3	Taq 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Ultraschall-	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28
Maus Nr.	VEG	F/FGF-e	nthaltend	e AlgB-D	epots	Maus Nr.	VEGF/FGF-freie AlgB-Depots			ots	
1	53.30	76.72	87.67	128.37	138.45	1	61.68	82,88	70,40	70.10	82.63
2	85.49	85.96	119.25	145.26	166.32	2	80.24	66.65	67,41	67.06	69,13
3	76.31	84,78	91,89	113.02	125,16	3	68.34	79.05	74,63	87,41	77,56
4	69.24	90,94	118,73	133.83		4	85.07	71.85	83,42	84,29	88,28
5	62,15	72,72	94,36	127,71		5	92.17	86,65	71,89	78,79	
6	78,53	101,37	116,31	135,25		6	65.86	66,90	77,88	89,67	
7	63.08	68,60	87,61	126,17		7	64,91	74,16	80,92	72,25	
8	80.36	78,83	98,02	143,48		8	62.31	66,33	81,57	88,97	
9	73,36	92,47	91,03	195,81		9	65.05	94,38	78,20	89,56	
10	78.63	83,10	81,65			10	79.03	83.87	65,14	76,34	
11	77.26	79,50	90,57			11	74.53	82,75	84,15		
12	83.00	96,05	107,33			12	68.18	77,71	74,89		
13	71.68	67.29	85.11			13	70.72	57.06	71.00		
14	87,11	73,21				14	63.04	73,68	61,67		
15	83.13	128,92				15	62.51	67.59			
16	78,36	133,73				16	77.19	94,01			
17	93.01	93,91				17	79,1	87,10			
18	83.46	161,52				18	78,44	45.86			
19	82,37					19	64.72				
20	99.57					20	70.15				

 Tabelle 27: Einzelwerte der AlgB-Depot-Kontrastsignalintensität pro Gruppe und Ultraschall-Untersuchungszeitpunkt

	AlaB-De	pot-Blutae	fäßprofildig	chte [Blutae	efäße/AlgB-Depot-Schnittfläch	el			
Ultraschall-	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Ultraschall-	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28
Maus Nr.	VEGF/	FGF-enthal	tende AlgB-	Depots	Maus Nr.	VEG	F/FGF-fre	eie AlgB-D	epots
1				97.03	1				47,87
2				152.94	2				26,49
3				81.00	3				22,49
4				143.28	4				51,41
6			94,53		6			15,17	
7			94,96		7			23,15	
			85.01		8			33,77	
9			117,33		9			35,27	
10		39,76			10			40,77	
11		42,97			11		42,13		
12		58,52			12		22.68		
13		27,30			13		14.34		
14	18.70				14		5.73		
15	53,03				15	17,80			
16	101.72				16	41.35			
17	33,45				17	39.09			
18	120.97				18	8,25			

Tabelle 28: Einzelwerte der Blutgefäßprofildichten pro Gruppe und Histologie-Untersuchungszeitpunkt

9.2.4 Experiment 3

AlaB-Depot-Volumen Imm ³ 1													
Ultraschall-	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Ultraschall-	Taq 0	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28
Maus Nr.	VE	GF/FGF	-enthal	tende Al	gB-Dep	ots	Maus Nr.		VEGF/	FGF-fre	ie AlqB-	Depots	
1	52.89	51,20	57,31	57,90	57.06	67,57	1	101,87	84,11	99.00	76,77	76,48	76,63
2	112,45	93,26	164.27	106,51	90,84	88,86	2	96,84	67,41	77.02	62,69	62,57	64,74
3	74.80	69.67	97.50	93.98	87.36	74.93	3	86.78	32.78	33.20	30.51	29.98	26.61
4	131.22	119.49	138.69	121.36	124.67	123.66	4	102.33	100.34	98.78	86.41	87.80	98.27
5	81.94	41.94	53.01	52.93	52.33	45.81	5	114.37	105.43	96.49	96.49	98.20	100.89
6	94.11	87.47	134.99	91.98	90.05	86.98	6	79.09	68.35	89.10	62.63	61.95	69.09
7	118,42	109.24	112,54	103,51	101,92	86,52	7	137,64	122,73	143,42	113,15	114,90	121,56

 Tabelle 29: Einzelwerte der AlgB-Depot-Volumina pro Gruppe und Ultraschall-Untersuchungszeitpunkt

AlgB-Depot-Kontrastsignalintensität [Graustufen]												
Ultraschall-	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Ultraschall-	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	
Maus Nr.	VEG	F/FGF-e	nthaltend	<u>le AlaB-D</u>	epots	Maus Nr.		/EGF/FG	F-freie A	laB-Depa	ots	
1	69,58	81,00	93,53	95,79	101.29	1	58.62	65,68	67,49	62,87	65,65	
2	84,28	92,96	157,56	153,21	131,37	2	76,15	70,61	74,71	73.32	71,89	
3	75,73	119,22	179,74	112,46	166,32	3	91,79	105,48	77,46	80.64	115,99	
4	82,17	89,42	99,34	113,70	152,38	4	70,88	66,84	71,70	74,70	72,04	
5	90.41	97.73	107.91	145.99	164.70	5	62.25	60.69	71.63	63.90	60.98	
6	67.10	92.13	167.16	116.04	184.12	6	77.69	76.55	72.54	79.42	71.20	
7	72.06	122,70	141,94	139.09	139,71	7	63,60	70,00	69.31	71,52	70.68	

 Tabelle 30: Einzelwerte der AlgB-Depot-Kontrastsignalintensität pro Gruppe und Ultraschall-Untersuchungszeitpunkt

AlaB-Depot-Blutgefäßprofildichte											
Maus Nr.	VEGF/FGF-	Maus Nr.	VEGF/FGF-freie								
1	60,14	1	15,70								
2	140.16	2	29.29								
3	300.64	3	87.72								
4	152.34	4	21.52								
5	365.62	5	11.65								
6	286.30	6	18,78								
7	230,49	7	14.00								

Tabelle 31: Einzelwerte der Blutgefäßprofildichten pro Gruppe am Versuchsende

9.2.5 Experiment 4

AlgB-Depot-Kontrastsignalintensität [Graustufen]											
Ultraschall- Untersuchungszeitpunkte	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Ultraschall- Untersuchungszeitpunkte	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28		
Maus Nr.	Gruppe 1 - Bevacizumab 5mg/kg			5mg/kg	Maus Nr.	Gruppe 2 - Vehikel 1					
1	65,23	75,85	93,93	141,79	1	55,80	108,72	119,53	121,74		
2	58,10	62,19	80,07	124,93	2	74,56	119,45	136,11	139,00		
3	66,11	87,63	114,47	118,79	3	58,84	92,39	159,34	169,09		
4	56,14	82,14	103,78	172,62	4	62,50	151,66	157,93	168,21		
5	61,86	70,13	90,98	93,88	5	56,69	86,41	197,94	272,28		
6	61,32	68,72	127,43	132,61	6	74,00	78,84	90,54	107,43		
7	56,04	78,58	111,35	175,25	7	71,09	98,30	169,03	179,35		
8	60,32	64,35	75,64	113,63	8	77,74	198,85	200,90	208,78		
9	65,75	73,70	84,75	-	9	67,54	78,40	106,48	114,02		
10	63,35	65,89	106,57	154,23	10	60,56	109,56	140,45	166,53		
Maus Nr.	Gruppe 3 - BAY73-4506 10mg/kg			0mg/kg	Maus Nr.	Gruppe 4 - Vehikel 2					
1	67,28	74,09	86,60	100,73	1	63,74	181,37	141,04	143,89		
2	58,20	69,30	78,00	84,60	2	65,06	98,57	116,55	127,96		
3	53,00	64,35	81,01	95,26	3	61,17	-	-	-		
4	56,63	77,82	152,93	102,53	4	71,25	75,61	85,61	155,77		
5	60,46	70,50	73,72	98,95	5	62,90	204,92	210,07	214,80		
6	56,85	69,46	80,63	92,46	6	67,10	150,98	200,74	191,21		
7	59,66	59,51	61,92	66,12	7	59,32	82,04	118,20	121,00		
8	59,47	68,67	107,77	110,83	8	53,46	83,14	181,49	191,89		
9	64,36	96,88	112,24	114,20	9	60,22	99,97	127,41	137,09		
10	56,54	81,98	-	-	10	64,62	86,56	109,53	146,62		

 Tabelle 32: Einzelwerte der AlgB-Depot-Kontrastsignalintensität pro Gruppe und Ultraschall-Untersuchungszeitpunkt

AlgB-Depot-Blutgefäßprofildichte [Blutgefäße/AlgB-Depot-Schnittfläche]								
Maus Nr.	Bevacizumab	Maus Nr.	Vehikel 1					
1	89.58	1	100.55					
2	115.74	2	124.38					
3	73.02	3	146.70					
4	147.29	4	140.94					
5	34.96	5	270.23					
6	106.87	6	50.77					
7	143.91	7	176.68					
8	63.53	8	172.29					
9	-	9	47.13					
10	125.01	10	138,05					
Maus Nr.	BAY73-4506	Maus Nr.	Vehikel 2					
1	48.78	1	116.00					
2	30,13	2	93,72					
3	49.03	3	<u> </u>					
4	51,50	4	106.58					
5	47.02	5	183,49					
6	36.89	6	161,49					
7	18.64	7	76.33					
8	89.01	8	154,43					
9	90.87	9	94,53					
10		10	97,47					

 Tabelle 33: Einzelwerte der Blutgefäßprofildichten pro Gruppe am Versuchsende

Präsentationen vorläufiger Ergebnisse der Dissertation

Flechsig, S., Ulbrich, H.-F., Hoffmann, J., Hütter, J., Fink, H., Hauff, P. (2009)

Establishment and characterization of on in vivo tumor angiogenesis surrogate model for testing of new antiangiogenic drugs.

In. Haase, K., Klose, P., Marquardt, N., Thormann, N. (Hrsg.): 4. Doktorandensymposium am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin: Programm & Abstracts. 06. November 2009, Mensch und Buch Verlag. S. 46, ISBN: 9783866646834

Flechsig, S., Reinhardt, M., Scholle, F.-D., Hoffmann, J., Hauff, P., Fink, H. (2008)

Etablierung eines Tumorsurrogatmodells auf Calcium-Alginat-Basis.

In. Flechsig, S., Lange, N., Kosmis, K. (Hrsg.): 3. Doktoranden-Symposium am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin: Programm und Abstracts. 27. Juni 2008, Mensch und Buch Verlag. S. 58, ISBN: 9783866644120

Danksagung

Ganz besonders bedanke ich mich bei *Herrn PD Dr. Peter Hauff*, der mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte und mich stets in allem unterstützte, anleitete und mich immer wieder aufs Neue motivierte.

Bei *Frau Prof. Dr. Heidrun Fink* und *Herrn Prof. Dr. Fabian Kiessling* bedanke ich mich herzlich für die Begutachtung meiner Arbeit.

Der **Bayer Schering Pharma AG** gilt mein Dank für die Gewährung eines Stipendiums sowie für die Zurverfügungstellung von Geräten und Materialien.

Bei *Herrn Dr. Joachim Hütter* bedanke ich mich für die zielführende Förderung und Unterstützung.

Herrn Dr. Jens Hoffmann, Frau Dr. Andrea Hägebarth, Frau Dr. Ninghshu Liu, Herrn Dr. Sven Golfier, Frau Dr. Claudia Schneider und *Frau Nicole Kahmann* danke ich herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung der Therapiestudie sowie für die Möglichkeit der Nutzung des Autostainers.

Bei *Herrn Dr. Frank-Detlef Scholle* und *Herrn Michael Reinhardt* bedanke ich mich für die fruchtbaren Diskussionen und die wissenschaftliche Unterstützung. Weiterhin gilt mein besonderer Dank ebenfalls *Herrn Hannes-Friedrich Ulbrich*, der mir bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Frau Nicole General, Frau Christine Morgenroth, Herrn Martin Kohs, Herrn Jens Jeschke und *Frau Julia Meier* danke ich ganz herzlich für die große Hilfsbereitschaft und praktische Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Auch bedanke ich mich herzlich bei *Frau Dr. Bettina Bert* und *Frau Dr. Nikola Lange* für die wertvollen Ratschläge bei der Verfassung der Dissertationsschrift.

Weiterhin danke ich *Herrn Christian Ness*, *Herrn Rainer Mann* und *Herrn René Wittchen* für die technische Unterstützung bei der Etablierung des Standardprotokolls zur Alginatbead-Herstellung.

Bei den Mitarbeitern der Tierhaltung der Bayer Schering Pharma AG Berlin, vor allem Herrn *Dr. Martin Kock*, *Herrn Dr. Thomas Jourdan*, *Frau Rosemarie Fielitz* und *Frau Claudia Schlüter* danke ich für die Unterstützung des tierexperimentellen Teils der Arbeit.

Persönlich gilt mein Dank von Herzen *Frau Dr. Silke Köhr*, die mir während der gesamten Doktorandenzeit bei allen Sorgen und Nöten zur Seite stand und mir stets ein Vorbild war.

Meiner Familie, im Besonderen meinem Mann *Dirk* danke ich von Herzen für das unermüdliche Verständnis und die stets vorhandene liebevolle Unterstützung.

Selbständigkeitserklärung

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

Berlin, den 01.07.2011 Susanne Flechsig