5 Eigene Untersuchungen

5.1 Angiogenese in vitro

5.1.1 Ablauf der angiogenen Kaskade

Die Endothelzellen wurden im Selektivmedium P0 kultiviert und durch die in diesem Medium enthaltenen proangiogenen Faktoren zur Angiogenese stimuliert. Die phasenkontrastmikroskopischen Untersuchungen erfolgten über einen Zeitraum von zwei Monaten alternierend nach drei und vier Tagen. Der Prozess der in vitro-Angiogenese stellte sich dabei als eine charakteristische Reihenfolge morphologischer Veränderungen der Zellen dar. Die Endothelzellen, die durch die proangiogenen Faktoren des Selektivmediums zur Angiogenese stimuliert wurden, bildeten zunächst einen konfluenten Monolayer. Die Zellen zeigten dabei eine polygonale Erscheinung.

Schon nach vier bis fünf Tagen begannen die Zellen 50 – 100 μ m lange Zellausläufer zu bilden, wodurch sie eine lang gestreckte Gestalt erhielten. Nach ca. 14 Tagen wiesen über 90% der Endothelzellen in der Kulturschale diese morphologischen Veränderungen auf (*Abb.4*).



Abb.4 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 14 Tage in Kultur, Bildung von Zellausläufern (Pfeile); Phasenkontrastmikroskop, 100 x



Abb.5 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 35 Tage in Kultur, lineare Aneinanderreihung der Zellen (Pfeile); Phasenkontrastmikroskop, 100 x

In den folgenden 14 Tagen war von verschiedenen Arealen der Vertiefung ausgehend eine lineare Aneinanderreihung lang gestreckter Zellen zu beobachten. Es entwickelten sich unter Beteiligung weiterer Endothelzellen stetig länger werdende Ketten aus einzeln aneinander gereihten Zellen (*Abb.5*).

Nach ca. 4 Wochen waren mehr als 80% der Zellen in Zellreihen organisiert, so dass sich ein Netzwerk aus Einzelzellreihen entwickelte. Dieser Prozess vollzog sich vom Randbereich der Kulturschale ausgehend zu ihrer Mitte hin. In den Bereichen zwischen den Zellreihen blieb zunächst der konfluente Monolayer mit den lang gestreckten Zellen erhalten.

Im weiteren Verlauf konnten zwei gleichzeitig ablaufende Veränderungen beobachtet werden. Einerseits nahm die Anzahl der an den Strängen des Netzwerks beteiligten Zellen deutlich zu. Dabei entwickelten sich aus den Strängen, die zunächst aus Einzelzellreihen bestanden, mehrreihige Gebilde. In dieser Phase dominierte vor allem die Zunahme des Durchmessers dieser Stränge. Andererseits erfolgte gleichzeitig eine Abnahme der Zahl nicht in Strängen organisierter Zellen. Der ursprünglich zwischen den Zellreihen bestehende, konfluente Monolayer löste sich dadurch nach und nach auf (*Abb.6*).



Abb.6 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 42 Tage in Kultur, während die Anzahl der im Netzwerk organisierten Zellen zunimmt, sinkt die Anzahl der im Monolayer wachsenden Endothelzellen; Phasenkontrastmikroskop, 100 x



Abb.7 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 57 Tage in Kultur, endotheliale strangartige Struktur; Phasenkontrastmikroskop, 100 x, schräger Lichteinfall

Nach ca. 50 Tagen begann die Anzahl der durch Endothelzellen gebildeten strangartigen Strukturen zu sinken, während der Durchmesser der verbleibenden Strukturen kontinuierlich zunahm. Im Rahmen dieser Entwicklung kam es an verschiedenen Stellen streckenweise zur Ablösung der strangartigen Strukturen vom Kulturschalenboden.

Das finale Zellbild, das sich nach ca. 60 Tagen entwickelt hatte, bestand aus Endothelzellen, welche zu über 90% in strangartigen Strukturen organisiert waren. Die Konzentration der am Kulturschalenboden hafteten Zellen hatte sich zu diesem Zeitpunkt deutlich verringert (*Abb.7*).

5.1.2 Definition "kapillarähnliche Strukturen"

Der Begriff *kapillarähnliche Strukturen* für endotheliale, tubuläre Formationen wurde erstmals von FOLKMAN und HAUDENSCHILD [1980] verwendet.

Obwohl die Bildung *kapillarähnlicher Strukturen* in zahlreichen zwei- und dreidimensionalen Modellen der in vitro-Angiogenese beschrieben wurde, besteht bis heute keine einheitliche Definition für diesen Terminus.

Im hier vorgestellten in vitro-Modell der Angiogenese erfolgte die Definition für *kapillarähnliche Strukturen* in Anlehnung an eine von NEHLS und DRENCKHAHN [1995] vorgestellte Methode zur Quantifizierung der Angiogenese (siehe 2.3.3.3.2).

In diesem Modell wurden Endothelzellen auf gelatinierten Microcarriern ausgesät und diese anschließend in eine dreidimensionale Fibrin-Matrix überführt. Quantifiziert wurde die durch proangiogene Faktoren stimulierte Migration der Endothelzellen von den Microcarriern in die sie umgebende Fibrin-Matrix. Dabei definierten NEHLS und DRENCKHAHN [1995] eine *kapillarähnliche Struktur* als eine Reihe von mindestens drei miteinander in Kontakt stehenden Endothelzellen.

Im hier vorgestellten Modell erfolgte die Bildung strangartiger, endothelialer Strukturen nicht von einem Zentrum aus in die Umgebung, sondern begann, von einem bestehenden Monolayer ausgehend, gleichzeitig in zahlreichen Arealen der Kulturschale. Da sich auf diese Weise zunächst ein Netzwerk aus Einzelzellreihen entwickelte, stand bei der Bildung tubulärer Strukturen nicht das Längenwachstum einzelner strangartiger Strukturen im Vordergrund, sondern die Zunahme des Durchmessers dieser Strukturen.

Daher wurde eine Definition für den Begriff *kapillarähnliche Struktur* auf der Basis des Durchmessers festgelegt.

In Anlehnung an NEHLS und DRENCKHAHN [1995] wurde in der vorliegenden Untersuchung als *kapillarähnliche Struktur* ein Endothelzellstrang definiert, an dem mindestens drei Endothelzellreihen beteiligt waren. Allerdings konnten bei der phasenkontrastmikros-kopischen Untersuchung aufgrund der dreidimensionalen Organisation der Endothelzellen nicht immer die einzelnen Zellreihen eindeutig identifiziert werden.

Aus diesem Grunde wurde mit Hilfe des Meßwerkzeugs *"Kurve (Spline)"* des Bildbearbeitungssystems Axiovision (siehe 4.2.1) der Durchmesser von 40 strangartigen Strukturen ermittelt, bei denen phasenkontrastmikroskopisch eindeutig 3 beteiligte Endothelzellreihen nachgewiesen werden konnten.

Anschließend wurde das arithmetische Mittel (\overline{X}) der ermittelten Durchmesser berechnet.

Das arithmetische Mittel (\overline{X}) der Durchmesser betrug 27,56 µm (~28 µm).

Somit wurden zur Quantifizierung der Angiogenese im hier vorgestellten in vitro-Modell *kapillarähnliche Strukturen* als strangartige Strukturen mit einem Mindestdurchmesser von 28 µm definiert.

5.1.3 Stadien der angiogenen Kaskade

Der charakteristische Verlauf der angiogenen Kaskade in vitro wurde in eindeutig definierte Stadien unterteilt.

Die Definition der Stadien erfolgte anhand des phasenkontrastmikroskopischen Zellbildes. Zur Standardisierung der zu untersuchenden Areale erfolgte die Beurteilung des Zellbildes anhand digitaler Aufnahmen, die stets bei gleicher Vergrößerung (100 x) in der gleichen Größe (691.200 μ m²) erstellt wurden. Die Einschätzbarkeit dieser definierten Stadien durch unterschiedliche Untersucher wurde zusätzlich in einer eigenen Studie geprüft (siehe 5.2.1).

5.1.3.1 Stadium 1: Konfluenter Monolayer



Abb.8 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 7 Tage in Kultur, Stadium 1: Konfluenter Monolayer im typischen "Kopfsteinpflaster-Muster"; Phasenkontrastmikroskop, 100 x

Nach der initialen Proliferation im Anschluss an die Aussaat bildeten die Endothelzellen einen konfluenten Monolayer. Die Morphologie der Endothelzellen war annähernd polygonal und entsprach dem für diese Zellen typischen "Kopfsteinpflaster-Muster" (*Abb.8*).

5.1.3.2 Stadium 2: Aussprossung, frühe Phase

In diesem Stadium zeigten weniger als die Hälfte der Endothelzellen innerhalb des Bildausschnitts die Ausbildung von Zellausläufern. Die Beurteilung des Zellbildes erfolgte hierbei nach subjektiver Einschätzung des Untersuchers. Die Endothelzellen, die Zellausläufer gebildet hatten, wurden anhand ihrer lang gestreckten Gestalt, die sie bei der phasenkontrastmikroskopischen Betrachtung aufwiesen, identifiziert (*Abb.9*).



Abb.9 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 15 Tage in Kultur, Stadium 2: Weniger als die Hälfte der Zellen im Bildausschnitt bilden Zellausläufer (Pfeile); Phasenkontrastmikroskop, 100 x

5.1.3.3 Stadium 3: Aussprossung, späte Phase

Im Stadium 3 zeigten mehr als die Hälfte der Endothelzellen im Bildausschnitt eine lang gestreckte Gestalt und somit die Ausbildung von Zellausläufern. Die Beurteilung des Zellbildes erfolgte wie im Stadium 2 durch die subjektive Einschätzung des Untersuchers (*Abb.10*).



Abb.10 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 22 Tage in Kultur, Stadium 3: Mehr als die Hälfte der Zellen im Bildausschnitt bilden Zellausläufer (Pfeile); Phasenkontrastmikroskop, 100 x

5.1.3.4 Stadium 4: Lineare Aneinanderreihung, frühe Phase

Nachdem die Endothelzellen Zellausläufer gebildet hatten, begann, von verschiedenen Arealen der Kulturschale ausgehend, die lineare Aneinanderreihung dieser Zellen. Im Stadium 4 wurde die Anzahl linear aneinander gereihter Endothelzellen innerhalb der definierten Fläche des Bildausschnitts auf weniger als die Hälfte der Gesamtzellzahl im Ausschnitt geschätzt (*Abb.11*). Die Beurteilung basierte wiederum auf der subjektiven Einschätzung des Untersuchers.



Abb.11 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 28 Tage in Kultur, Stadium 4: Weniger als die Hälfte der Zellen im Bildausschnitt sind linear aneinander gereiht (Pfeile); Phasenkontrastmikroskop, 100 x

5.1.3.5 Stadium 5: Lineare Aneinanderreihung, späte Phase

Im weiteren Verlauf nahm die Anzahl der Endothelzellen, die linear aneinander gereiht waren, stetig zu. Das Stadium 5 war erreicht, als nach subjektiver Einschätzung des Untersuchers mehr als die Hälfte der Endothelzellen im Bildausschnitt in Einzelzellreihen organisiert war (*Abb.12*).



Abb.12 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 37 Tage in Kultur, Stadium 5: Mehr als die Hälfte der Zellen im Bildausschnitt sind linear aneinander gereiht (Pfeile); Phasenkontrastmikroskop, 100 x

5.1.3.6 Stadium 6: Netzwerkbildung

Durch Verlängerung und Aneinanderlagerung der Zellreihen bildete sich ein feines Netzwerk, welches in dieser Phase vor allem aus Einzelzellreihen bestand. Die im Netzwerk organisierten Endothelzellen lösten sich dabei von den noch im Monolayer wachsenden Zellen. Dadurch war eine untere Schicht der Zellen, die im Zellrasen wuchsen, von einer darüber liegenden Schicht, in der die Zellen im Netzwerk organisiert waren, zu unterscheiden.

Gleichzeitig begann in diesem Stadium die allmähliche Auflösung des ursprünglich konfluenten Monolayers (*Abb.13*).



Abb.13 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 42 Tage in Kultur, Stadium 6: Aneinander gereihte Endothelzellen bilden ein Netzwerk (Pfeile), der Zellrasen am Kulturschalenboden ist nicht mehr konfluent; Phasenkontrastmikroskop, 100 x

5.1.3.7 Stadium 7: Dreidimensionale Organisation, frühe Phase

Durch die Zunahme der Anzahl in Strängen organisierter Endothelzellen vergrößerte sich im Folgenden der Durchmesser der Zellstränge des Netzwerks.

Das Stadium 7 war erreicht, als sich die ersten *kapillarähnlichen Strukturen* gebildet hatten (*Abb.14*). Diese wurden definiert als Endothelzellstränge, die einen Mindestdurchmesser von 28 µm aufwiesen (siehe 5.1.2).

Zusätzlich setzte sich in diesem Stadium die Auflösung des Zellrasens am Boden der Kulturschale fort. In Bildausschnitten, in denen sich keine *kapillarähnlichen Strukturen* gebildet hatten, erfolgte die Zuordnung des Stadiums 7 anhand der Zelldichte des Zellrasens am Kulturschalenboden. In diesem Fall war das Stadium 7 dann erreicht, wenn nach subjektiver Einschätzung des Untersuchers weniger als die Hälfte des Kulturschalenbodens im definierten Bildausschnitt durch Zellen bedeckt war.



Abb.14 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 50 Tage in Kultur, Stadium 7: Endothelzellen bilden erste kapillarähnliche Strukturen (Pfeile), der Zellrasen am Kulturschalenboden löst sich weiter auf; Phasenkontrastmikroskop, 100 x, schräger Lichteinfall

5.1.3.8 Stadium 8: Dreidimensionale Organisation, späte Phase

Durch die Aneinanderlagerung der Einzelzellreihen nahm der Durchmesser der Stränge weiterhin zu. Gleichzeitig verringerte sich dadurch die Anzahl der Stränge. Auf diese Weise waren im Stadium 8 nur noch Endothelzellstränge mit einem Durchmesser von mehr als 28 µm, also *kapillarähnliche Strukturen*, vorhanden (*Abb.15*).

Parallel dazu hatte sich in diesem Stadium der ursprünglich am Kulturschalenboden vorhandene Zellrasen vollständig aufgelöst, so dass nur noch vereinzelt Zellen zwischen den *kapillarähnlichen Strukturen* zu erkennen waren. In Bildausschnitten, in denen sich keine *kapillarähnlichen Strukturen* entwickelt hatten, diente der nicht mehr vorhandene Zellrasen als Basis für die Bestimmung des Stadiums 8.



Abb.15 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 60 Tage in Kultur, Stadium 8: Bis auf wenige Zellen am Kulturschalenboden sind die Endothelzellen in kapillarähnliche Strukturen organisiert; Phasenkontrastmikroskop, 100 x, schräger Lichteinfall

5.2 Validierung der Quantifizierung der Angiogenese in vitro

Die Quantifizierung der Angiogenese in vitro wurde mittels der semiquantitativen Erfassung der oben beschriebenen Stadien (siehe 5.1.3) im zeitlichen Ablauf durchgeführt.

Diese semiquantitative Analyse erfolgte anhand digitaler Aufnahmen, die mit Hilfe der Videokamera (Inteq 000610) und des Bildbearbeitungssystems (Axiovision 3.0) vom phasenkontrastmikroskopischen Zellbild erstellt wurden. Zur Standardisierung wurden die Aufnahmen stets bei gleicher Vergrößerung (100 x) und in der gleichen Größe (691.200 μ m²) gefertigt. Anschließend wurde dem Zellbild auf den erstellten Aufnahmen eines der acht definierten Stadien der Angiogenese in vitro zugewiesen.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Validierung der Quantifizierungsmethode wurde zunächst die Einschätzung der Stadien der Angiogenese in vitro durch unterschiedliche Untersucher geprüft (siehe 5.2.1.1). Außerdem wurde die Homogenität des Verlaufs der Angiogenese in vitro anhand der definierten Stadien in verschiedenen Kulturschalen und in verschiedenen Bildausschnitten der Kulturschalen untersucht (siehe 5.2.1.2).

5.2.1 Semiquantitative Untersuchung der Angiogenese durch verschiedene Personen

Die Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung wurden in zwei Vertiefungen einer 24-Loch-Platte ausgesät und mit dem Selektivmedium P0 kultiviert. Die phasenkontrastmikroskopische Untersuchung erfolgte zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von 60 Tagen.

Ab dem 4. Tag, als sich ein konfluenter Zellrasen gebildet hatte, wurden an jedem der insgesamt 17 Untersuchungstage in jeder Vertiefung der Kulturplatte zwei Bildausschnitte zufällig ausgewählt und dokumentiert.

Diese (4 x 17) 68 Aufnahmen des Zellbildes wurden von zwei verschiedenen, unabhängigen Untersuchern in einer zufällig gewählten Reihenfolge beurteilt.

Das Kriterium für die Auswahl der beiden Untersucher war, dass diese vergleichbare Kenntnisse und Erfahrung im Bereich der Kultivierung und mikroskopischen Untersuchung von Endothelzellen hatten. In der vorliegenden Untersuchung handelte es sich um zwei Doktorandinnen, die jeweils seit ca. sechs Monaten Endothelzellen kultivierten und charakterisierten.

Die Beurteilung des Zellbildes in den erstellten Aufnahmen erfolgte auf der Grundlage der unter 5.1.3 definierten Stadien der Angiogenese in vitro.

Von beiden Untersuchern wurde jedem Zellbild nach subjektiver Einschätzung eines der definierten Stadien der Angiogenese in vitro zugewiesen (*Tabelle 1*).

Anschließend wurde für jeden beurteilten Bildausschnitt die Differenz der durch die beiden Untersucher zugewiesenen Stadien (Δx_i^U) an jedem Untersuchungstag berechnet:

$$\begin{split} \Delta x_j^U &= \left| x_j^{U1} - x_j^{U2} \right| \\ x_j^{U1} &= \text{Durch Untersucher 1 zugewiesenes Stadium für den jeweiligen Bildausschnitt} \\ x_j^{U2} &= \text{Durch Untersucher 2 zugewiesenes Stadium für den jeweiligen Bildausschnitt} \\ j &= 1, ..., 4 \end{split}$$

Tog	Bildauss	Bildausschnitt 1		Bildausschnitt 2		Bildausschnitt 3		Bildausschnitt 4	
Tay	U 1	U 2	U 1	U 2	U 1	U 2	U 1	U 2	
4	1	1	1	1	1	1	1	1	
7	1	2	1	1	1	1	1	1	
11	1	2	1	1	1	1	1	1	
14	1	2	1	1	2	2	2	2	
18	2	2	1	2	3	2	2	3	
21	2	2	2	2	3	3	3	3	
25	2	3	2	2	3	3	3	3	
28	3	3	2	3	4	4	4	4	
32	3	3	3	3	4	4	4	4	
35	3	4	4	4	5	5	5	5	
39	4	4	5	5	5	5	5	5	
42	5	5	5	5	6	6	6	6	
46	6	6	6	6	6	7	6	7	
49	7	7	6	6	7	7	6	7	
53	7	7	6	7	7	7	7	7	
56	7	7	7	7	8	8	7	7	
60	8	8	7	7	8	8	7	7	

Einschätzung der Stadien 1 – 8 der Angiogenese in vitro in vier verschiedenen Bildausschnitten der Kulturplatte durch zwei unabhängige Untersucher (U1 und U2)

Tab.1

Die Differenzen der durch die beiden Untersucher zugewiesenen Stadien (Δx_j^U) schwankten zwischen 0 und 1, dabei war die Summe der Differenzen mit Ausnahme des 18. und 46. Tages \leq 1 (*Tabelle 2*).

Тад	Δx_1^U	Δx_2^U	Δx_3^U	Δx_4^U	Summe der Differenzen
4	0	0	0	0	0
7	1	0	0	0	1
11	1	0	0	0	1
14	1	0	0	0	1
18	0	1	1	1	3
21	0	0	0	0	0
25	1	0	0	0	1
28	0	1	0	0	1
32	0	0	0	0	0
35	1	0	0	0	1
39	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0
46	0	0	1	1	2
49	0	0	0	1	1
53	0	1	0	0	1
56	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0

Tab.2Differenzen der durch die beiden Untersucher
zugewiesenen Stadien der Angiogenese in vitro an jedem
Untersuchungstag

Zusätzlich wurde die Abweichung der durch die beiden Untersucher zugewiesenen Stadien für jeden der vier Bildausschnitte über den gesamten Untersuchungszeitraum bestimmt. Hierfür wurde für jeden Bildausschnitt (1-4) die Summe der an den 17 Untersuchungstagen durch den jeweiligen Untersucher zugewiesenen Stadien (S_i^U) gebildet:

$$S_{j}^{U1} = \sum_{i=1}^{17} x_{ij}^{U1}$$

$$S_{j}^{U2} = \sum_{i=1}^{17} x_{ij}^{U2}$$

$$x_{ij} = \text{Durch den Untersucher zugewiesenes Stadium für den Bildausschnitt am jeweiligen Untersuchungstag$$

$$i = 1, ..., 17$$

$$j = 1, ..., 72$$

Die Summen der durch beide Untersucher an 17 Untersuchungstagen zugewiesenen Stadien der Angiogenese in vitro (S_j^U) lagen zwischen 60 und 74 (*Tabelle 3*). Die Differenzen dieser Summen (ΔS_j^U) schwankten zwischen 0 und 5, das arithmetische Mittel betrug dabei $\overline{\Delta S_j^U} = 2,75$.

Bildausschnitt	Untersucher	$S^{\scriptscriptstyle U}_{j}$	ΔS_{j}^{U}
1	U1	63	5
I	U2	68	5
2	U1	60	2
2	U2	63	5
3	U1	74	0
5	U2	74	0
4	U1	70	2
4	U2	73	3

Tab.3 Summen der an den 17 Untersuchungstagen durch den jeweiligen Untersucher (U1, U2) zugewiesenen Stadien der Angiogenese in vitro für die Bildausschnitte 1 – 4 und deren Differenzen

5.2.2 Semiquantitative Untersuchung der Angiogenese in verschiedenen Bildausschnitten von Kulturschalen

Die Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung wurden in 12 Vertiefungen von 24-Loch-Platten in einer mittleren Konzentration von 47.000 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Die Kultivierung erfolgte mit dem Selektivmedium P0.

Am ersten Untersuchungstag wurden aus jeder Vertiefung sechs Bildausschnitte zufällig ausgewählt und mit Hilfe der Videokamera (Inteq 000610) und des Bildbearbeitungssystems (Axiovision 3.0) dokumentiert.

In jeder Vertiefung wurden jeweils 3 Bildausschnitte aus dem Randbereich und 3 Bildausschnitte aus der Mitte der Vertiefung gewählt.

Somit erfolgten die Untersuchungen in (12 x 6) 72 Bildausschnitten.

Damit sichergestellt war, dass an jedem weiteren Untersuchungstag die identischen Ausschnitte zur Untersuchung kamen, wurde zur Auswahl der Bildausschnitte ein Halterahmen verwendet, der an einem Objektführer befestigt wurde. Mit Hilfe des Objektführers wurden die beiden Koordinaten der zufällig gewählten Bildausschnitte erfasst. Von den 72 per Koordinaten definierten Bildausschnitten wurden zweimal wöchentlich, alternierend nach drei und vier Tagen, Aufnahmen erstellt.

Zur semiquantitativen Analyse der Angiogenese in den verschiedenen Vertiefungen der Kulturplatte wurde an jedem Untersuchungstag jedem Zellbild dieser 72 Bildausschnitte eines der definierten Stadien 1 – 8 der Angiogenese durch den Untersucher zugewiesen.

Nach 67 Tagen entsprach das vom Untersucher festgestellte Zellbild in allen Bildausschnitten dem Stadium 8 der Angiogenese in vitro. Daher erfolgte die Dokumentation der Bildausschnitte und somit die semiquantitative Untersuchung der Angiogenese über diesen Zeitraum an 19 Untersuchungstagen. Beispielhaft ist der zeitliche Verlauf der Stadien der Angiogenese für die Vertiefung 1 im *Diagramm 1* dargestellt.



Diagramm 1 Zeitlicher Verlauf der Stadien der Angiogenese in vitro in den 6 Bildausschnitten (A1 – A6) der Vertiefung 1 der Kulturplatte

In allen untersuchten Vertiefungen war am 4. Untersuchungstag (Tag 14) in den ersten Bildausschnitten das Stadium 2 erreicht und somit das erste Anzeichen der einsetzenden Angiogenese zu beobachten.

Ebenso war spätestens am 18. Untersuchungstag (Tag 63) in allen Bildausschnitten der 12 Vertiefungen das Stadium 8 der Angiogenese in vitro erreicht.

Vertiefung	Bildausschnitt	Sj	Vertiefung	Bildausschnitt	Sj
1	1	86	7	1	99
1	2	84	7	2	95
1	3	83	7	3	95
1	4	83	7	4	89
1	5	93	7	5	98
1	6	90	7	6	100
2	1	89	8	1	96
2	2	85	8	2	94
2	3	84	8	3	87
2	4	82	8	4	90
2	5	90	8	5	90
2	6	89	8	6	90
3	1	97	9	1	101
3	2	89	9	2	98
3	3	88	9	3	92
3	4	89	9	4	94
3	5	91	9	5	96
3	6	100	9	6	100
4	1	92	10	1	93
4	2	95	10	2	101
4	3	82	10	3	91
4	4	93	10	4	88
4	5	95	10	5	96
4	6	96	10	6	91
5	1	94	11	1	101
5	2	91	11	2	99
5	3	89	11	3	93
5	4	88	11	4	95
5	5	86	11	5	99
5	6	95	11	6	100
6	1	92	12	1	100
6	2	91	12	2	92
6	3	84	12	3	81
6	4	82	12	4	81
6	5	94	12	5	102
6	6	86	12	6	91

Tab.4 Summen der an 19 Untersuchungstagen zugewiesenen Stadien der Angiogenese in vitro für jeden Bildausschnitt

Zur Analyse des Ablaufs der Angiogenese wurde für jeden Bildausschnitt die Summe der an den 19 Untersuchungstagen zugewiesenen Stadien der Angiogenese in vitro (S_j) berechnet:

 $S_{j} = \sum_{i=1}^{19} x_{ij}$ $x_{ij} = \text{Durch den Untersucher zugewiesenes Stadium für den Bildausschnitt (j) am jeweiligen Untersuchungstag (i)$ i = 1, ..., 19 j = 1, ..., 72

Die Summen der zugewiesenen Stadien der Angiogenese in vitro (S_j) schwankten in den 72 Bildausschnitten zwischen 81 und 102 (*Tabelle 4*), wobei sowohl das Minimum (81) als auch das Maximum (102) in der Vertiefung 12 auftraten.

Um die Homogenität des Ablaufs der Angiogenese in den jeweils sechs Bildausschnitten jeder Vertiefung zu untersuchen, wurde für alle 12 Vertiefungen die Varianz (s_k^2) und die Standardabweichung (s_k) der Summen der an den Untersuchungstagen zugewiesenen Stadien der Angiogenese in vitro (S_{kl}) der sechs Bildausschnitte berechnet:

$$s^{2}_{k} = \frac{\sum_{l=1}^{6} (S_{kl} - \overline{S_{k}})^{2}}{5}$$

$$s_{k} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^{6} (S_{kl} - \overline{S_{k}})^{2}}{5}}$$

$$S_{kl} = \text{Summe der an den 19 Untersuchungstagen zugewiesenen Stadien der Angiogenese in vitro im jeweiligen Bildausschnitt}$$

$$\overline{S_{kl}} = \frac{\sum_{l=1}^{6} S_{kl}}{6}$$

$$k = 1, ..., 12$$

$$l = 1, ..., 6$$

Die Varianzen der Stadien-Summen (s_k^2) der jeweiligen sechs Bildausschnitte der 12 Vertiefungen sind in *Tabelle 5* dargestellt. Die kleinste Varianz von 9,77 ergab sich für die Vertiefung 11, die größte Varianz (80,57) in der Vertiefung 12. Das arithmetische Mittel der Varianzen der 12 Vertiefungen betrug $\overline{s_k^2} = 22,11$. Daraus ergab sich eine mittlere Standardabweichung von 4,70. Der Median der Varianzen lag bei 16,55, woraus sich eine Standardabweichung von 4,07 ergab. Die Vertiefung mit der größten Varianz (Vertiefung 12) ausgenommen, errechnete sich eine mittlere Varianz von $\overline{s_{k-1}^2} = 16,79$ und eine Standardabweichung von 4,09.

Vertiefung	Varianz (s_k^2)	Standardabweichung (<i>s</i> _k)
1	17,10	4,14
2	10,70	3,27
3	24,67	4,97
4	26,97	5,19
5	12,30	3,51
6	23,37	4,83
7	16,00	4,00
8	10,57	3,25
9	12,17	3,49
10	21,07	4,59
11	9,77	3,13
12	80,57	8,98

Tab.5 Varianzen (s²_k) und Standardabweichungen (s_k) der Summen der an 19 Untersuchungstagen zugewiesenen Stadien der Angiogenese in den jeweils 6 Bildausschnitten von 12 Vertiefungen der Kulturplatte

Schwankungen im Ablauf der Angiogenese in den 12 Vertiefungen der Kulturplatte wurden mittels einer Varianzkomponentenanalyse geprüft [SACHS, 1993]. Diese ergab, dass neben der Varianzkomponente innerhalb der Vertiefungen (22,11) eine zusätzliche Varianz-komponente von 10,31 zwischen den Vertiefungen bestand.

Die Schätzung der Gesamtvarianz ergibt sich aus der Summe der Varianzkomponente zwischen den Vertiefungen und der Varianzkomponente innerhalb der Vertiefungen:

10,31 + 22,11 = 32,42

Somit betrug die Standardabweichung eines beliebigen, jedoch aussagefähigen Bildausschnittes und einer beliebigen, jedoch aussagefähigen Vertiefung über die definierte Versuchsdauer s = 5,69.

5.3 Quantifizierung der Wirkung proangiogener Faktoren auf die Angiogenese in vitro

Das Ziel dieser Untersuchung war es, die Wirkung bekannter Angiogenese-Stimulatoren auf die Angiogenese in vitro mit der unter 5.2 validierten Methode zu quantifizieren.

Im Rahmen einer Voruntersuchung wurde die Wirkung des "Vascular Endothelial Growth Factor" (VEGF) und "Fibroblast Growth Factor-2" (FGF-2) auf die Endothelzellen im Erhaltungsmedium DMEM+ (siehe 3.3.1) geprüft.

5.3.1 Voruntersuchung zur Quantifizierung der Wirkung proangiogener Faktoren auf die Angiogenese in vitro

Die Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung wurden in acht Vertiefungen einer 24-Loch-Platte ausgesät und mit den in *Tabelle* 6 aufgeführten Medien kultiviert.

Vertiefung	Medium
1 und 2	DMEM+ (siehe 3.3.1)
3 und 4	P0 (siehe 3.3.2)
5 und 6	DMEM+ mit VEGF (10 ng/ml)
7 und 8	DMEM+ mit FGF-2 (10 ng/ml)

Tab.6 Zusammensetzung der Medien, mit denen die in acht Vertiefungen einer 24-Loch-Platte ausgesäten Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum im Rahmen der Voruntersuchung kultiviert wurden.

Die Endothelzellen wurden über einen Zeitraum von 60 Tagen zweimal wöchentlich, alternierend nach drei und vier Tagen, phasenkontrastmikroskopisch untersucht.

Es wurde geprüft, ob bei Zugabe der proangiogenen Faktoren VEGF (Vertiefungen 5 und 6) und FGF-2 (Vertiefungen 7 und 8) zum Erhaltungsmedium DMEM+ in einer Konzentration von 10 ng/ml [CAVALLARO et al., 2001] der charakteristische Ablauf der angiogenen Kaskade

zu beobachten war. Beurteilt wurde dabei, ob die Zuweisung der unter 5.1.3 definierten Stadien der Angiogenese in vitro möglich sei.

Die Endothelzellen in den Vertiefungen 1 und 2 der Kulturplatte, die mit dem Erhaltungsmedium DMEM+ kultiviert wurden, dienten als Negativkontrolle. Sie bildeten nach drei bis sieben Tagen einen konfluenten Monolayer im für diese Zellen typischen "Kopfsteinpflaster-Muster". Der Monolayer blieb bis zum letzten Untersuchungstag (Tag 60) unverändert bestehen.

Die Endothelzellen in den Vertiefungen 3 und 4 der Kulturplatte, die mit dem Selektivmedium P0 kultiviert wurden, dienten als Positivkontrolle. Sie bildeten auch innerhalb von drei bis sieben Tagen einen konfluenten Monolayer im "Kopfsteinpflaster-Muster". Im weiteren Verlauf der Untersuchung zeigten die Zellen in diesen Vertiefungen bis zum Tag 60 der Untersuchung den charakteristischen Ablauf der angiogenen Kaskade (siehe 5.1.1).



Abb.16 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 7 Tage in Kultur, Kultivierung mit Erhaltungsmedium DMEM+ mit VEGF (10 ng/ml). Mehr als die Hälfte der Zellen bilden bis zu 250 μm lange Zellausläufer (Pfeile); Phasenkontrastmikroskop, 100 x

Die Endothelzellen in den Vertiefungen 5 und 6 der Kulturplatte, wurden mit dem Erhaltungsmedium DMEM+, dem VEGF in einer Konzentration von 10 ng/ml hinzugefügt wurde, kultiviert. Die Zellen wuchsen nach drei Tagen im geschlossenen Monolayer. Schon ab dem 1. Untersuchungstag (Tag 3) waren Zellen zu erkennen, die Zellausläufer bildeten und somit eine lang gestreckte Gestalt aufwiesen. Ab dem 2. Untersuchungstag (Tag 7) waren es mehr als 50% der Zellen in der Kulturschale, die eine lang gestreckte Form zeigten. Auffällig war dabei, dass die Zellen mit den Zellausläufern eine Länge von bis zu 250 µm erreichten (*Abb.16*).

Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurden die verschiedenen Phasen der angiogenen Kaskade beobachtet. So waren nach 17 Tagen mehr als 50% der Endothelzellen in der Kulturschale linear aneinander gereiht (*Abb.17*).



Abb.17 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 17 Tage in Kultur, Kultivierung mit Erhaltungsmedium DMEM+ mit VEGF (10 ng/ml). Mehr als die Hälfte der Zellen sind linear aneinander gereiht (Pfeile); Phasenkontrastmikroskop, 100 x



Abb.18 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 28 Tage in Kultur, Kultivierung mit Erhaltungsmedium DMEM+ mit VEGF (10 ng/ml), Endothelzellen bilden ein Netzwerk; Phasenkontrastmikroskop, 100 x



Abb.19 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 38 Tage in Kultur, Kultivierung mit Erhaltungsmedium DMEM+ mit VEGF (10 ng/ml), dreidimensionale Organisation der Endothelzellen zu tubulären Strukturen und zu Sphäroiden (SG); Phasenkontrastmikroskop, 100 x

Die Bildung eines Netzwerkes erfolgte zwischen dem Tag 21 und 35 der Untersuchung (*Abb.18*). Die dreidimensionale Organisation der Endothelzellen war ab dem Tag 35 der Untersuchung zu beobachten. Jedoch handelte es sich bei den dreidimensionalen Strukturen neben strangartigen Gebilden auch um sphäroidische Formationen der Endothelzellen (*Abb.19*).

Die Endothelzellen in den Vertiefungen 7 und 8 der Kulturplatte wurden mit dem Erhaltungsmedium DMEM+, dem FGF-2 in einer Konzentration von 10 ng/ml hinzugefügt wurde, kultiviert. Die Zellen hatten bis zum 1. Untersuchungstag (Tag 3) einen konfluenten Monolayer gebildet, innerhalb dessen von Anfang an Endothelzellen mit lang gestreckter Gestalt zu erkennen waren. Diese erreichten eine Länge von bis zu 300 µm und stellten ab dem 3. Untersuchungstag (Tag 10) mehr als 50% der Zellen in der Kulturschale dar (*Abb.20*).



Abb.20 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 10 Tage in Kultur, Kultivierung mit Erhaltungsmedium DMEM+ mit FGF-2 (10 ng/ml). Mehr als die Hälfte der Zellen bilden bis zu 300 μm lange Zellausläufer (Pfeile); Phasenkontrastmikroskop, 100 x



Abb.21 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 21 Tage in Kultur, Kultivierung mit Erhaltungsmedium DMEM+ mit FGF-2 (10 ng/ml). Bildung eines Netzwerks durch die Endothelzellen im Randbereich der Kulturschale; Phasenkontrastmikroskop, 100 x



Abb.22 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 49 Tage in Kultur, Kultivierung mit Erhaltungsmedium DMEM+ mit FGF-2 (10 ng/ml), dreidimensionale Organisation der Zellen zu strangartigen Strukturen (Pfeil); Phasenkontrastmikroskop, 100 x

Zu diesem Zeitpunkt waren die Endothelzellen in einigen Abschnitten der Kulturschale bereits linear aneinander gereiht. Am Tag 14 der Untersuchung waren bereits mehr als 50% der Zellen in der Kulturschale linear angeordnet. Ab dem 5. Untersuchungstag (Tag 17) war in den Randbereichen der Kulturschale die Bildung eines Netzwerkes zu beobachten, welches sich bis zum Tag 28 der Untersuchung über die gesamte Kulturschale ausgedehnt hatte (*Abb.21*).

Die dreidimensionale Organisation der Endothelzellen zu *kapillarähnlichen Strukturen* (siehe 5.1.2) begann innerhalb des Netzwerkes ab dem Tag 21 der Untersuchung und erstreckte sich bis zum Tag 49, an dem mehr als 90% der Endothelzellen in der Kulturschale in dreidimensionalen, strangartigen Strukturen organisiert waren (*Abb.22*).

5.3.2 Semiquantitative Untersuchung der Wirkung proangiogener Faktoren auf die Angiogenese in vitro

Die Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung wurden in 20 Vertiefungen von 24-Loch-Platten in einer mittleren Konzentration von 45.000 Zellen pro Vertiefung ausgesät.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte mit den in Tabelle 7 aufgeführten Medien.

Vertiefung	Medium
1 bis 4	DMEM+ (siehe 3.3.1)
5 bis 8	P0 (siehe 3.3.2)
9 bis 12	DMEM+ mit VEGF (10 ng/ml)
13 bis 16	DMEM+ mit FGF-2 (10 ng/ml)
17 bis 20	DMEM+ mit VEGF (10 ng/ml) und FGF-2 (10 ng/ml)

 Tab.7
 Zusammensetzung der Medien, mit denen die in 20 Vertiefungen einer 24-Loch-Platte ausgesäten Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum kultiviert wurden.

Am ersten Untersuchungstag wurden aus jeder Vertiefung vier Bildausschnitte zufällig ausgewählt und mit Hilfe der Videokamera (Inteq 000610) und des Bildbearbeitungssystems

(Axiovision 3.0) dokumentiert. Die Dokumentation erfolgte stets bei gleicher Vergrößerung (100 x) und in der gleichen Größe (691.200 μ m²).

Aus jeder Vertiefung wurden zwei Bildausschnitte aus dem Randbereich und zwei Bildausschnitte aus der Mitte der Vertiefung gewählt. Mit Hilfe des am Mikroskop installierten Objektführers wurden die Koordinaten dieser Bildausschnitte erfasst.

Somit erfolgte die Quantifizierung der Angiogenese in vitro für jedes der fünf verschiedenen Medien in (4 x 4) 16 Bildausschnitten.

Die Untersuchung der Endothelzellen erfolgte jeden 2. Tag über einen Zeitraum von 30 Tagen. An jedem dieser 15 Untersuchungstage wurde von den per Koordinaten definierten Bildausschnitten eine Aufnahme erstellt.

Zur Quantifizierung der Angiogenese in vitro wurde an jedem Untersuchungstag jedem Zellbild der verschiedenen Bildausschnitte eines der definierten Stadien 1 – 8 der Angiogenese in vitro (siehe 5.1.3) zugewiesen.

Die Zellen in den Vertiefungen 1 – 4 der Kulturplatte erhielten das Erhaltungsmedium DMEM+ und dienten als Negativkontrolle. Die Zellen in diesen Vertiefungen bildeten innerhalb von sechs Tagen einen konfluenten Monolayer im "Kopfsteinpflaster-Muster" (Stadium 1 der Angiogenese in vitro), welcher bis zum letzten Untersuchungstag unverändert bestehen blieb.

Die Zellen in den Vertiefungen 5 – 8 der Kulturplatte erhielten das Selektivmedium P0 und dienten als Positivkontrolle. Auch in diesen Vertiefungen bildete sich innerhalb von sechs Tagen ein konfluenter Monolayer (Stadium 1 der Angiogenese in vitro). Ab dem Tag 10 der Untersuchung war in den ersten Bildausschnitten das Stadium 2 der Angiogenese in vitro erreicht und somit das erste Anzeichen der einsetzenden Angiogenese zu erkennen.

Im weiteren Verlauf der Untersuchung durchliefen die Endothelzellen in diesen Vertiefungen die folgenden Stadien der Angiogenese und befanden sich am letzten Untersuchungstag (Tag 30) in den 16 untersuchten Bildausschnitten in den Stadien 5 bzw. 6 der Angiogenese. Der zeitliche Verlauf der Stadien der Angiogenese in den vier Vertiefungen der Kulturplatte ist im *Diagramm 2* dargestellt.



 Diagramm 2 Medium: P0. Zeitlicher Verlauf der Stadien der Angiogenese in vier Vertiefungen an 15 Untersuchungstagen, dargestellt durch die Summe der Stadien in den vier Bildausschnitten der jeweils vier Vertiefungen (S V1 – S V4) an jedem Untersuchungstag

Die Summe der an den 15 Untersuchungstagen zugewiesenen Stadien der Angiogenese in vitro in den 16 untersuchten Bildausschnitten (S_j^{P0} ; *j* = 1, ..., 16) schwankte zwischen 42 und 52 (*Tabelle 8*). Das arithmetische Mittel der Summen betrug: $\overline{S_j^{P0}} = 45,69$

Vertiefung	Bildausschnitt	S_j^{P0}	Vertiefung	Bildausschnitt	S_j^{P0}
1	1	44	3	1	45
1	2	44	3	2	42
1	3	43	3	3	43
1	4	49	3	4	46
2	1	43	4	1	52
2	2	48	4	2	47
2	3	48	4	3	43
2	4	49	4	4	45

 Tab.8
 Medium: P0. Summe der an 15 Untersuchungstagen zugewiesenen Stadien der Angiogenese in vitro in den 16 untersuchten Bildausschnitten

Die Endothelzellen in den Vertiefungen 9 – 12 der Kulturplatte wurden mit dem Erhaltungsmedium DMEM+, dem VEGF in einer Konzentration von 10 ng/ml hinzugefügt

wurde, kultiviert. In allen Vertiefungen hatte sich am 1. Untersuchungstag (Tag 2) ein konfluenter Monolayer (Stadium 1 der Angiogenese in vitro) gebildet. Am 2. Untersuchungstag (Tag 4) war das Stadium 2 der Angiogenese in vitro in 12 der 16 untersuchten Bildausschnitte erreicht. Der zeitliche Verlauf der Angiogenese in diesen vier Vertiefungen ist in *Diagramm 3* dargestellt. Am letzten Untersuchungstag (Tag 15) befanden sich die Endothelzellen in den 16 untersuchten Bildausschnitten in den Stadien 6 bis 8 der Angiogenese in vitro.



Diagramm 3 Medium: DMEM+ mit VEGF (10 ng/ml). Zeitlicher Verlauf der Stadien der Angiogenese in vier Vertiefungen an 15 Untersuchungstagen, dargestellt durch die Summe der Stadien in den vier Bildausschnitten der jeweils vier Vertiefungen (S V1 – S V4) an jedem Untersuchungstag

Die Summe der an den 15 Untersuchungstagen zugewiesenen Stadien der Angiogenese in vitro in den 16 untersuchten Bildausschnitten (S_j^{VEGF} ; j = 1, ..., 16) schwankte zwischen 61 und 72 (*Tabelle 9*). Das arithmetische Mittel der Summen betrug: $\overline{S}_j^{VEGF} = 67,38$

Vertiefung	Bildausschnitt	$S_{j}^{\it V\!EGF}$	Vertiefung	Bildausschnitt	$S_j^{\it V\!EGF}$
1	1	66	3	1	65
1	2	63	3	2	67
1	3	68	3	3	61
1	4	70	3	4	72
2	1	70	4	1	66
2	2	69	4	2	68
2	3	69	4	3	66
2	4	68	4	4	70

Tab.9 Medium: DMEM+ mit VEGF (10 ng/ml). Summe der an 15 Untersuchungstagen zugewiesenen Stadien der Angiogenese in vitro in den 16 untersuchten Bildausschnitten

Die Differenz der arithmetischen Mittel der Summen $\overline{S_j^{V\!EG\!F}}$ und $\overline{S_j^{P0}}$ betrug:

$$\overline{S_j^{VEGF}} - \overline{S_j^{P0}} = 21,69$$

Damit ist $\overline{S_i^{\scriptscriptstyle V\!E\!G\!F}}$ um **47,47%** größer als $\overline{S_i^{\scriptscriptstyle P0}}$.



Diagramm 4 Medium: DMEM+ mit FGF-2 (10 ng/ml). Zeitlicher Verlauf der Stadien der Angiogenese in vier Vertiefungen an 15 Untersuchungstagen, dargestellt durch die Summe der Stadien in den vier Bildausschnitten der jeweils vier Vertiefungen (S V1 – S V4) an jedem Untersuchungstag

Die Endothelzellen in den Vertiefungen 13 – 16 der Kulturplatte, wurden mit dem Erhaltungsmedium DMEM+, dem FGF-2 in einer Konzentration von 10 ng/ml hinzugefügt wurde, kultiviert. In allen Vertiefungen hatte sich am 1. Untersuchungstag (Tag 2) ein konfluenter Monolayer (Stadium 1 der Angiogenese in vitro) gebildet. Am 2. Untersuchungstag (Tag 4) war das Stadium 2 der Angiogenese in vitro in 13 der 16 untersuchten Bildausschnitte erreicht. Der zeitliche Verlauf der Angiogenese in diesen vier Vertiefungen ist in *Diagramm 4* dargestellt. Am letzten Untersuchungstag (Tag 15) befanden sich die Endothelzellen in den 16 untersuchten Bildausschnitten in den Stadien 7 und 8 der Angiogenese in vitro.

Vertiefung	Bildausschnitt	S_j^{FGF-2}	Vertiefung	Bildausschnitt	$S_j^{\it FGF-2}$
1	1	71	3	1	74
1	2	75	3	2	71
1	3	66	3	3	70
1	4	72	3	4	75
2	1	67	4	1	72
2	2	70	4	2	74
2	3	72	4	3	71
2	4	66	4	4	72

Tab.10 Medium: DMEM+ mit FGF-2 (10 ng/ml). Summe der an 15 Untersuchungstagen zugewiesenen Stadien der Angiogenese in vitro in den 16 untersuchten Bildausschnitten

Die Summe der an den 15 Untersuchungstagen zugewiesenen Stadien der Angiogenese in vitro in den 16 untersuchten Bildausschnitten (S_j^{FGF-2} ; j = 1, ..., 16) schwankte zwischen 66 und 75 (*Tabelle 10*). Das arithmetische Mittel der Summen betrug: $\overline{S_j^{FGF-2}} = 71,13$

Die Differenz der arithmetischen Mittel der Summen $\overline{S_j^{FGF-2}}$ und $\overline{S_j^{P0}}$ betrug: $\overline{S_j^{FGF-2}} - \overline{S_j^{P0}} = 25,44$

Damit ist $\overline{S_j^{FGF-2}}$ um **55,67%** größer als $\overline{S_j^{P0}}$.

Die Endothelzellen in den Vertiefungen 17 – 20 der Kulturplatte, wurden mit dem Erhaltungsmedium DMEM+, dem VEGF und FGF-2 in einer Konzentration von jeweils 10 ng/ml hinzugefügt wurden, kultiviert. In allen Vertiefungen hatte sich am 1. Untersuchungstag (Tag 2) ein konfluenter Monolayer (Stadium 1 der Angiogenese in vitro) gebildet. Am 2.

Untersuchungstag (Tag 4) war das Stadium 2 der Angiogenese in vitro in allen 16 untersuchten Bildausschnitten erreicht. Der zeitliche Verlauf der Angiogenese in vitro in diesen vier Vertiefungen ist in *Diagramm 5* dargestellt. Am letzten Untersuchungstag (Tag 15) befanden sich die Endothelzellen in allen 16 untersuchten Bildausschnitten im Stadium 8 der Angiogenese in vitro.



Diagramm 5 Medium: DMEM+ mit VEGF (10 ng/ml) und FGF-2 (10 ng/ml). Zeitlicher Verlauf der Stadien der Angiogenese in vier Vertiefungen an 15 Untersuchungstagen, dargestellt durch die Summe der Stadien in den vier Bildausschnitten der jeweils vier Vertiefungen (S V1 – S V4) an jedem Untersuchungstag

Vertiefung	Bildausschnitt	$S_{j}^{V\!EGF+FGF-2}$	Vertiefung	Bildausschnitt	$S_{j}^{V\!EGF+FGF-2}$
1	1	80	3	1	84
1	2	85	3	2	84
1	3	83	3	3	80
1	4	81	3	4	82
2	1	79	4	1	86
2	2	81	4	2	88
2	3	86	4	3	78
2	4	85	4	4	80

Tab.11 Medium: DMEM+ mit VEGF (10 ng/ml) und FGF-2 (10 ng/ml). Summe der an 15 Untersuchungstagen zugewiesenen Stadien der Angiogenese in vitro in den 16 untersuchten Bildausschnitten

Die Summe der an den 15 Untersuchungstagen zugewiesenen Stadien der Angiogenese in vitro in den 16 untersuchten Bildausschnitten ($S_j^{VEGF+FGF-2}$; *j* = 1, ..., 16) schwankte zwischen 78 und 88 (*Tabelle 11*). Das arithmetische Mittel der Summen betrug:

 $\overline{S_j^{VEGF+FGF-2}} = 82,63$

Die Differenz der arithmetischen Mittel der Summen $\overline{S}_{i}^{VEGF+FGF-2}$ und \overline{S}_{i}^{P0} betrug:

 $\overline{S_{i}^{VEGF+FGF-2}} - \overline{S_{i}^{P0}} = 36,94$

Damit ist $\overline{S_j^{V\!EG\!F+F\!G\!F-2}}$ um **80,85%** größer als $\overline{S_j^{P0}}$.

5.4 Quantifizierung der Wirkung antiangiogener Faktoren auf die Angiogenese in vitro

Das Ziel dieser Untersuchung war es, die Wirkung eines Angiogenese-Inhibitors auf die Angiogenese in vitro mit der unter 5.2 validierten Methode zu quantifizieren.

Im Rahmen einer Voruntersuchung wurde die Wirkung eines endogenen (Angiostatin) und eines synthetischen (Suramin) Angiogenese-Inhibitors auf die durch das Selektivmedium P0 (siehe 3.3.2) stimulierte Angiogenese in vitro geprüft.

5.4.1 Voruntersuchung zur Quantifizierung der Wirkung antiangiogener Faktoren auf die Angiogenese in vitro

Die Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung wurden in 16 Vertiefungen einer 24-Loch-Platte ausgesät und mit dem Selektivmedium P0 (siehe 3.3.2) kultiviert. Die Endothelzellen wurden über einen Zeitraum von 60 Tagen zweimal wöchentlich, alternierend nach drei und vier Tagen, phasenkontrastmikroskopisch untersucht.

Ab dem Tag 14, 28, 42 und 56 der Untersuchungen wurde in jeweils vier Vertiefungen der Kulturplatte dem Selektivmedium P0 ein Angiogenese-Inhibitor zugefügt. Hierbei wurde jeweils in zwei Vertiefungen Angiostatin in einer Konzentration von 5 μg/ml [BARENDSZ-

be des Suramins (100 µg/ml)

ab Tag 14 ab Tag 28 ab Tag 42 ab Tag 56

Vertiefung	Zugabe des Angiostatins (5 µg/ml)	Vertiefung	Zuga
1 und 2	ab Tag 14	9 und 10	
3 und 4	ab Tag 28	11 und 12	
5 und 6	ab Tag 42	13 und 14	
7 und 8	ab Tag 56	15 und 16	

JANSON et al., 1998] und in den anderen beiden Vertiefungen Suramin in einer Konzentration von 100 µg/ml [KRUGER und FIGG, 2001] eingesetzt (*Tabelle 12*).

In den Vertiefungen 1 und 2 zeigten am Tag 14 der Untersuchung ca. 50% der Endothelzellen die Ausbildung von Zellausläufern und somit eine lang gestreckte Gestalt. Die Zugabe des Angiostatins zum Selektivmedium P0 erfolgte ab diesem Untersuchungstag. Am nächsten Untersuchungstag (Tag 17) waren nur noch vereinzelt Zellen zu erkennen, die eine lang gestreckte Gestalt aufwiesen. Diese Morphologie der Endothelzellen blieb bis zum letzten Untersuchungstag (Tag 60) bestehen.

In den Vertiefungen 3 und 4 waren am Tag 28 der Untersuchung ca. 40% der Endothelzellen linear aneinander gereiht (*Abb.23*). In dem ursprünglich geschlossenen Monolayer waren zu diesem Zeitpunkt einige bis zu 50 µm durchmessende Lücken zu erkennen. Ab diesem Untersuchungstag erfolgte die Zugabe des Angiostatins zum Selektivmedium P0. Bis zum nächsten Untersuchungstag (Tag 31) war wieder ein geschlossener Monolayer entstanden. Hier waren noch ca. 20% linear aneinander gereihte Endothelzellen zu sehen (*Abb.24*). Am Tag 38 der Untersuchung hatte sich in diesen Vertiefungen ein konfluenter Monolayer im "Kopfsteinpflaster-Muster" entwickelt. Dieser blieb bis zum letzten Untersuchungstag (Tag 60) bestehen.

In den Vertiefungen 5 und 6 bildeten am Tag 42 der Untersuchung über 90% der Endothelzellen ein Netzwerk (*Abb.25*). Außerhalb dieses Netzwerks waren nur wenige Zellen am Kulturschalenboden zu erkennen. Ein geschlossener Zellrasen war nicht mehr vorhanden. Die Zugabe des Angiostatins zum Selektivmedium P0 erfolgte ab diesem Untersuchungstag. Am nächsten Untersuchungstag (Tag 45) waren es nur noch ca. 60% der Endothelzellen, die am Netzwerk beteiligt waren. Die anderen ca. 40% der Zellen bildeten einen nicht konfluenten Zellrasen zwischen dem Netzwerk. Am Tag 49 der Untersuchung

Tab.12 Untersuchungstage, ab denen die Angiogenese-Inhibitoren Angiostatin und Suramin in jeweilszwei Vertiefungen der Kulturplatte dem Selektivmedium P0 hinzugefügt wurden

war in diesen Vertiefungen ein geschlossener Monolayer vorhanden. Innerhalb dieses Monolayers waren ca. 30% der Endothelzellen in einer linearen Anordnung (*Abb. 26*). Bis zum letzten Untersuchungstag (Tag 60) hatte sich in diesen Vertiefungen ein geschlossener Monolayer im "Kopfsteinpflaster-Muster" entwickelt, wobei kaum abgelöste Zellen zu erkennen waren.



bildung, Phasenkontrastmikroskop, 100x Oben: 28 Tage in Kultur, kultiviert mit dem Selektiv-

medium P0, linear aneinander gereihte Endothelzellen (Pfeile), bis zu 50 μm durchmessende Lücken im Zellrasen (L)

Rechts: 3 Tage nach Zugabe des Angiostatins zum Kulturmedium (Tag 31), Monolayer geschlossen, noch einige linear aneinander gereihte Endothelzellen (Pfeile)



In den Vertiefungen 7 und 8 bildeten am Tag 56 der Untersuchungen mehr als 90% der Endothelzellen ein Netzwerk, innerhalb dessen in einigen Abschnitten die Bildung *kapillarähnlicher Strukturen* (siehe 5.1.2) zu beobachten war (*Abb.27*). Die Endothelzellen, die nicht in diesem Netzwerk organisiert waren, bildeten keinen geschlossenen Zellrasen.

Die Zugabe des Angiostatins zum Selektivmedium P0 erfolgte ab diesem Untersuchungstag. Am nächsten Untersuchungstag (Tag 59) hatte sich ein geschlossener Monolayer zurückgebildet (*Abb.28*). Innerhalb des Monolayers waren ca. 40% linear aneinander gereihte Zellen zu erkennen.



In den Vertiefungen 9 und 10 zeigten am Tag 14 der Untersuchung ca. 50% der Endothelzellen die Ausbildung von Zellausläufern und somit eine lang gestreckte Gestalt. Ab diesem Untersuchungstag erfolgte die Zugabe des Suramins zum Selektivmedium P0. Am nächsten Untersuchungstag (Tag 17) war dieses Zellbild unverändert. Auch bis zum letzten Untersuchungstag (Tag 60) war keine Veränderung des Zellbilds zu erkennen.


In den Vertiefungen 11 und 12 waren am Tag 28 der Untersuchung ca. 40% der Endothelzellen linear aneinander gereiht (*Abb.29*). Innerhalb des Zellrasens waren vereinzelt bis zu 30 µm durchmessende Lücken zu erkennen. Ab diesem Untersuchungstag erfolgte die Zugabe des Suramins zum Selektivmedium P0. Am nächsten Untersuchungstag (Tag 31) hatte sich in diesen Vertiefungen ein geschlossener Zellrasen gebildet. Über 90% der Endothelzellen wiesen hier eine lang gestreckte Gestalt auf und ca. 70% der Zellen waren linear aneinander gereiht (*Abb.30*). Über dem Monolayer hatte sich in einer zweiten Ebene ein Netzwerk aus Endothelzellen gebildet, dessen Stränge abschnittsweise einen Durchmesser von bis zu 28 µm zeigten. Im weiteren Verlauf der Untersuchung lösten sich die im Netzwerk organisierten Zellen voneinander ab und lagen als abgerundete Zellen auf dem geschlossenen Monolayer aus lang gestreckten Endothelzellen. Dieses Zellbild blieb bis zum letzten Untersuchungstag (Tag 60) bestehen.



In den Vertiefungen 13 und 14 bildeten am Tag 42 der Untersuchung über 90% der Endothelzellen ein Netzwerk (*Abb.31*). Zwischen diesem Netzwerk war kein geschlossener Zellrasen zu erkennen. Ab diesem Tag erfolgte die Zugabe des Suramins zum Selektivmedium P0. Am nächsten Untersuchungstag (Tag 45) war in diesen Vertiefungen ein nicht geschlossener Zellrasen zu sehen, der aus lang gestreckten Endothelzellen bestand (*Abb.32*). Über diesen Zellen hatte sich in einer zweiten Ebene ein Netzwerk entwickelt. Innerhalb dieses Netzwerks wiesen ca. 60% der Stränge einen Durchmesser von mehr als 28 µm auf.



Abb.31

Links: Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 42 Tage in Kultur, kultiviert mit dem Selektivmedium P0, Zellen bilden ein Netzwerk, zwischen diesen Zellen ist kein geschlossener Monolayer vorhanden, Phasenkontrastmikroskop, 100x

Abb.32

Rechts: Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 3 Tage nach Zugabe des Suramins zum Kulturmedium (Tag 45), über einem nicht geschlossenen Zellrasen hat sich ein Netzwerk aus Endothelzellen entwickelt, das abschnittsweise kapillarähnliche Strukturen aufweist (Pfeil), Phasenkontrastmikroskop, 100x





Abb.33

Links: Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 14 Tage nach Zugabe des Suramins zum Kulturmedium (Tag 56), am Kulturschalenboden haften nur wenige Endothelzellen, die eine lang gestreckte Gestalt aufweisen, auf diesen Zellen liegen verschieden große Zellhaufen aus abgerundeten Zellen (Pfeil), Phasenkontrastmikroskop, 100x Im weiteren Verlauf der Untersuchung rundeten sich die Zellen, die im Netzwerk organisiert waren, ab und verloren den Kontakt zueinander. 14 Tage nach der Zugabe des Suramins zum Selektivmedium P0 (Tag 56) waren nur noch vereinzelte Gruppen lang gestreckter Endothelzellen am Kulturschalenboden zu erkennen. Auf diesen Zellen waren einzelne abgerundete Zellen zu sehen, die teilweise in kleinen Haufen zusammengelagert waren (*Abb.33*). Dieses Zellbild blieb bis zum Abschluß der Untersuchung (Tag 60) bestehen.



Abb.34 und 35

Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, Phasenkontrastmikroskop, 100x

Oben: 56 Tage in Kultur, kultiviert mit dem Selektivmedium P0, Bildung kapillarähnlicher Strukturen (Pfeil), kein geschlossener Monolayer vorhanden

Rechts: 3 Tage nach Zugabe des Suramins zum Kulturmedium (Tag 59), nur vereinzelte Zellen haften am Kulturschalenboden, darüber große Zellhaufen aus abgerundeten Endothelzellen (Pfeil)



In den Vertiefungen 15 und 16 bildeten am Tag 56 der Untersuchung mehr als 90% der Endothelzellen ein Netzwerk, innerhalb dessen sich abschnittsweise kapillarähnliche Strukturen (siehe 5.1.2) ausgebildet hatten (*Abb.34*). Die Endothelzellen, die nicht in diesem Netzwerk organisiert waren, bildeten keinen geschlossenen Monolayer. Ab diesem

Untersuchungstag erfolgte die Zugabe des Suramins zum Selektivmedium P0. Am nächsten Untersuchungstag (Tag 59) waren nur noch vereinzelte am Kulturschalenboden haftende Zellen zu erkennen, die überwiegend eine lang gestreckte Gestalt aufwiesen. Über diesen Zellen lagen bis zu 500 μ m durchmessende Zellhaufen, die aus abgerundeten Endothelzellen bestanden (*Abb.35*).

5.4.2 Semiquantitative Untersuchung der Wirkung antiangiogener Faktoren auf die Angiogenese in vitro

Die Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung wurden in 24 Vertiefungen von 24-Loch-Platten in einer mittleren Konzentration von 41.000 Zellen pro Vertiefung ausgesät.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in den Vertiefungen 1 bis 4 mit dem Erhaltungsmedium DMEM+ (siehe 3.3.1) und in allen anderen Vertiefungen zunächst mit dem Selektivmedium P0 (siehe 3.3.2).

Am ersten Untersuchungstag wurden aus jeder Vertiefung vier Bildausschnitte zufällig ausgewählt und mit Hilfe der Videokamera (Inteq 000610) und des Bildbearbeitungssystems (Axiovision 3.0) dokumentiert. Die Dokumentation erfolgte stets bei gleicher Vergrößerung (100 x) und in der gleichen Größe (691.200 µm²).

Aus jeder Vertiefung wurden zwei Bildausschnitte aus dem Randbereich und zwei Bildausschnitte aus der Mitte der Vertiefung gewählt. Mit Hilfe des am Mikroskop installierten Objektführers wurden die Koordinaten dieser Bildausschnitte erfasst.

Somit erfolgte die Quantifizierung der Angiogenese in vitro in (24 x 4) 96 Bildausschnitten.

Die Untersuchung der Endothelzellen erfolgte jeden 2. Tag über einen Zeitraum von 68 Tagen. An jedem dieser 34 Untersuchungstage wurde von den per Koordinaten definierten Bildausschnitten eine Aufnahme erstellt.

An jedem Untersuchungstag wurde jedem Zellbild der 96 Bildausschnitte eines der definierten Stadien 1 – 8 der Angiogenese in vitro (siehe 5.1.3) zugewiesen.

Zu vier verschiedenen Zeitpunkten der Untersuchung wurde in jeweils vier Vertiefungen der Kulturplatte der Angiogenese-Inhibitor Angiostatin dem Selektivmedium in einer Konzentration von 5 ng/ml zugegeben (*Tabelle 13*). Die Zugabe des Angiostatins erfolgte in den jeweiligen Vertiefungen bis zum Abschluss der Untersuchung (Tag 68).

Vertiefung	Medium	Zeitpunkt der Zugabe des Angiostatins (5 ng/ml)	Niedrigstes Stadium der Angiogenese in vitro zum Zeitpunkt der Zugabe des Angiostatins
1 bis 4	DMEM+		
5 bis 8	P0		
9 bis 12	P0	ab Tag 16	2
13 bis 16	P0	ab Tag 24	4
17 bis 20	P0	ab Tag 44	6
21 bis 24	P0	ab Tag 60	8

Tab.13 Medien, mit denen die Endothelzellen in 24 Vertiefungen der Kulturplatte kultiviert wurden; Zeitpunkt der Zugabe des Angiogenese-Inhibitors Angiostatin in jeweils vier Vertiefungen und das niedrigste Stadium der Angiogenese in vitro, das zum jeweiligen Zeitpunkt den Endothelzellen in den 16 untersuchten Bildausschnitten der vier Vertiefungen zugewiesen wurde

Die Zellen in den Vertiefungen 1 – 4 der Kulturplatte, die mit dem Erhaltungsmedium DMEM+ kultiviert wurden, dienten als Negativkontrolle. In diesen Vertiefungen hatte sich nach 6 Tagen ein konfluenter Monolayer im "Kopfsteinpflaster-Muster" (Stadium 1 der Angiogenese in vitro) gebildet, welcher bis zum letzten Untersuchungstag unverändert bestehen blieb.



Diagramm 6 Medium: P0. Zeitlicher Verlauf der Stadien der Angiogenese in vier Vertiefungen (5 – 8) an 34 Untersuchungstagen, dargestellt durch die Summe der Stadien in den vier Bildausschnitten der jeweils vier Vertiefungen (S V1 – S V4) an jedem Untersuchungstag

Die Zellen in den Vertiefungen 5 – 8 der Kulturplatte, die über den gesamten Untersuchungszeitraum (68 Tage) mit dem Selektivmedium P0 kultiviert wurden, dienten als Positivkontrolle. In diesen Vertiefungen hatte sich bis zum 2. Untersuchungstag ein konfluenter Monolayer (Stadium 1 der Angiogenese in vitro) gebildet. Das Stadium 2 der Angiogenese in vitro war in den ersten Bildausschnitten am Tag 10 der Untersuchung erreicht.

Im weiteren Verlauf durchliefen die Endothelzellen in diesen Vertiefungen die Stadien der Angiogenese in vitro (*Diagramm 6*). Das Stadium 8 der Angiogenese in vitro war am 23. Untersuchungstag (Tag 46) im ersten Bildausschnitt und am 31. Untersuchungstag (Tag 62) in allen 16 Bildausschnitten erreicht.



 Diagramm 7 Medium: P0, Zugabe des Angiostatins ab Tag 16 der Untersuchung (Pfeil). Zeitlicher Verlauf der Stadien der Angiogenese in vier Vertiefungen (9 – 12) an 34 Untersuchungstagen, dargestellt durch die Summe der Stadien in den vier Bildausschnitten der jeweils vier Vertiefungen (S V1 – S V4) an jedem Untersuchungstag

Die Endothelzellen in den Vertiefungen 9 – 12 wurden zunächst mit dem Selektivmedium P0 kultiviert. Am Tag 16 der Untersuchung war in den untersuchten Bildausschnitten mindestens das Stadium 2 der Angiogenese in vitro erreicht (*Diagramm 7*). Von diesem Zeitpunkt an wurde dem Kulturmedium der Angiogenese-Inhibitor Angiostatin hinzugefügt. An den darauf folgenden Untersuchungstagen war ein Rückgang der Stadien der

Angiogenese in vitro zu beobachten. Nach 6 Tagen (Tag 22) entsprach in allen Bildausschnitten das Zellbild dem Stadium 1 der Angiogenese in vitro.

Diese 6 Tage entsprachen 37,50% der Zeit, die erforderlich war, damit sich in den untersuchten Bildausschnitten mindestens das Stadium 2 der Angiogenese in vitro entwickelt hatte (16 Tage).



Diagramm 8 Medium: P0, Zugabe des Angiostatins ab Tag 24 der Untersuchung (Pfeil). Zeitlicher Verlauf der Stadien der Angiogenese in vier Vertiefungen (13 – 16) an 34 Untersuchungstagen, dargestellt durch die Summe der Stadien in den vier Bildausschnitten der jeweils vier Vertiefungen (S V1 – S V4) an jedem Untersuchungstag

Die Endothelzellen in den Vertiefungen 13 – 16 wurden auch zunächst mit dem Selektivmedium P0 kultiviert. Am Tag 24 der Untersuchung war in diesen Vertiefungen in den untersuchten Bildausschnitten mindestens das Stadium 4 der Angiogenese in vitro erreicht (*Diagramm 8*). Von diesem Zeitpunkt an wurde dem Kulturmedium der Angiogenese-Inhibitor Angiostatin hinzugefügt. An den folgenden Untersuchungstagen bildete sich in den untersuchten Bildausschnitten die Angiogenese in vitro zurück, bis nach 8 Tagen (Tag 32) in allen Bildausschnitten das Zellbild dem Stadium 1 der Angiogenese in vitro gleich stand. Diese 8 Tage entsprachen 33,33% der Zeit, die erforderlich war, damit sich in den

untersuchten Bildausschnitten mindestens das Stadium 4 der Angiogenese in vitro entwickelt hatte (24 Tage).



 Diagramm 9 Medium: P0, Zugabe des Angiostatins ab Tag 44 der Untersuchungen (Pfeil). Zeitlicher Verlauf der Stadien der Angiogenese in vier Vertiefungen (17 – 20) an 34 Untersuchungstagen, dargestellt durch die Summe der Stadien in den vier Bildausschnitten der jeweils vier Vertiefungen (S V1 – S V4) an jedem Untersuchungstag

Die Endothelzellen in den Vertiefungen 17 – 20 wurden bis zum Tag 44 mit dem Selektivmedium P0 kultiviert. An diesem Tag war in den untersuchten Bildausschnitten mindestens das Stadium 6 der Angiogenese in vitro erreicht (*Diagramm 9*). Von diesem Zeitpunkt an wurde dem Kulturmedium der Angiogenese-Inhibitor Angiostatin hinzugefügt. Die Stadien der Angiogenese in vitro regredierten in diesen Vertiefungen innerhalb von 14 Tagen. Somit war das Stadium 1 der Angiogenese in vitro in diesen Bildausschnitten am Tag 56 der Untersuchung erreicht.

Der Zeitraum von 14 Tagen entsprach 31,82% der Zeit, die erforderlich war, damit in den untersuchten Bildausschnitten mindestens das Stadium 6 der Angiogenese in vitro erreicht worden war (44 Tage).

Die Endothelzellen in den Vertiefungen 21 – 24 wurden bis zum Tag 60 mit dem Selektivmedium P0 kultiviert. An diesem Tag war in allen untersuchten Bildausschnitten das Stadium 8 der Angiogenese in vitro erreicht (*Diagramm 10*). Von diesem Zeitpunkt an wurde dem Kulturmedium der Angiogenese-Inhibitor Angiostatin hinzugefügt. Der Rückgang der Stadien der Angiogenese in vitro auf das Stadium 1 erfolgte in diesen Vertiefungen in den folgenden 8 Tagen. Somit war das Stadium 1 der Angiogenese in vitro in diesen Bildausschnitten am Tag 68 der Untersuchung erreicht.

Dieser Zeitraum (8 Tage) entspricht 13,33% der Zeit, die erforderlich war, damit sich in den untersuchten Bildausschnitten das Stadium 8 der Angiogenese in vitro entwickelt hatte (60 Tage).



Diagramm 10 Medium: P0, Zugabe des Angiostatins ab Tag 60 der Untersuchungen (Pfeil). Zeitlicher Verlauf der Stadien der Angiogenese in vier Vertiefungen (21 – 24) an 34 Untersuchungstagen, dargestellt durch die Summe der Stadien in den vier Bildausschnitten der jeweils vier Vertiefungen (S V1 – S V4) an jedem Untersuchungstag

5.5 Morphometrische Untersuchung der Angiogenese in vitro

Die morphometrische Untersuchung der Angiogenese erfolgte an den sich in vitro bildenden *kapillarähnlichen Strukturen*, die als endotheliale Stränge mit einem Mindestdurchmesser von 28 µm definiert wurden (siehe 5.1.2).

Per definitionem war das Stadium 7 der Angiogenese in vitro dann erreicht, wenn die ersten *kapillarähnlichen Strukturen* erschienen (siehe 5.1.3.7).

Somit setzten die morphometrischen Untersuchungen in jedem Bildausschnitt bei Erreichen des Stadiums 7 ein.

Das Stadium 7 war in den ersten Vertiefungen am Tag 39 erreicht. Somit erschienen die ersten *kapillarähnlichen Strukturen* am Tag 39 der Untersuchungen.

Die Anzahl der Bildausschnitte pro Vertiefung, die ab dem Tag 39 der Untersuchungen an jedem Untersuchungstag *kapillarähnliche Strukturen* enthielten, ist in der *Tabelle 14* aufgeführt. Zusätzlich ist im *Diagramm 11* die Gesamtzahl der Bildausschnitte, in denen sich *kapillarähnliche Strukturen* entwickelt hatten, für jeden Untersuchungstag ab dem Tag 39 dargestellt.

Tag	Vertiefung 1	Vertiefung 2	Vertiefung 3	Vertiefung 4	Vertiefung 5	Vertiefung 6
39	0	0	1	0	0	0
42	0	0	1	1	1	0
46	3	0	1	4	3	3
49	3	5	3	4	4	6
53	6	6	4	4	4	6
56	5	6	3	3	4	5
60	3	6	3	2	4	5
63	2	6	3	2	4	5
67	0	1	2	0	4	5
Tag	Vertiefung 7	Vertiefung 8	Vertiefung 9	Vertiefung 10	Vertiefung 11	Vertiefung 12
39	2	1	0	0	1	2
42	4	1	1	0	1	2
46	5	6	4	4	2	3
49	3	6	5	5	3	2
53	3	5	4	5	5	4
56						
	3	4	2	5	4	2
60	3	4	2	5	4	2
60 63	3 1 1	4 4 4	2 2 1	5 1 1	4 1 0	2 2 0

Tab.14 Anzahl der Bildausschnitte pro Vertiefung (1 – 12), die ab dem Tag 39 der Untersuchung an jedem Untersuchungstag kapillarähnliche Strukturen enthielten

Die Anzahl der Bildausschnitte, die *kapillarähnliche Strukturen* enthielten, nahm ab dem Tag 39 der Untersuchung bis zum Tag 53 stetig zu.

Ab dem Tag 53 der Untersuchungen sank die Anzahl der Bildausschnitte, in denen kapillarähnliche Strukturen zu sehen waren, stetig bis zum Tag 67, dem letzten Untersuchungstag.



Diagramm 11 Gesamtzahl der Bildausschnitte, die ab dem Tag 39 der Untersuchungen an jedem Untersuchungstag kapillarähnliche Strukturen enthielten

5.5.1 Gemessene Größen

Die **Summen der Flächen**, die von den kapillarähnlichen Strukturen in den jeweils sechs Bildausschnitten der 12 Vertiefungen an den Tagen 39 bis 67 der Untersuchungen eingenommen wurden (SF_k), sind in den *Diagrammen 12 und 13* dargestellt.

$$SF_k = \sum_{i=1}^{6} F_{kl}$$

 $F_{kl} = Fläche, die im jeweiligen Bildausschnitt am jeweiligen Untersuchungstag von
kapillarähnlichen Strukturen eingenommen wurde
 $k = 1, ..., 12$
 $l = 1, ..., 6$$

Dabei zeigte in sieben der 12 Vertiefungen (Vertiefungen 2, 3, 7, 8, 9, 10 und 12) die Fläche (SF_k) zwei Maxima, während in den anderen Vertiefungen (Vertiefungen 1, 4, 5, 6 und 11) nur ein einziges Maximum zu erkennen war. Bei Betrachtung der Gesamtfläche der kapillarähnlichen Strukturen in den Bildausschnitten aller Vertiefungen (SF_{total}) wird deutlich, dass in den meisten Vertiefungen (vier von 12 Vertiefungen) das Maximum, bzw. eines der beiden Maxima am Tag 53 der Untersuchungen erreicht war (*Diagramm 14*).



Diagramm 12 Summe der Flächen, die durch kapillarähnliche Strukturen in den jeweils sechs Bildausschnitten der Vertiefungen 1 – 6 eingenommen wurden, dargestellt als prozentualer Anteil an der Gesamtfläche der sechs Bildausschnitte (4147200 μm²)



Diagramm 13 Summe der Flächen, die durch kapillarähnliche Strukturen in den jeweils sechs Bildausschnitten der Vertiefungen 7 - 12 eingenommen wurden, dargestellt als prozentualer Anteil an der Gesamtfläche der sechs Bildausschnitte (4147200 μm²)

In den Vertiefungen, die zwei Maxima von SF_k aufwiesen, lagen die Maxima mit Ausnahme der Vertiefungen 7 und 12 an den Tagen 46, 53 und/oder 60 der Untersuchungen. Dies führt bei der Darstellung der Gesamtfläche (SF_{total}) zu den zusätzlichen, aber niedrigeren Peaks an den Tagen 46 und 60 der Untersuchungen (*Diagramm 14*).



Diagramm 14 Gesamtfläche der kapillarähnlichen Strukturen (**SF**_{total}) in allen untersuchten Bildausschnitten (72) der 12 Vertiefungen

Die **Summe der Längen** der kapillarähnlichen Strukturen in den jeweils sechs Bildausschnitten der 12 Vertiefungen (SL_k) an den Tagen 39 bis 67 der Untersuchungen zeigte einen zur Fläche der kapillarähnlichen Strukturen (SF_k) analogen Verlauf (*Diagramm 15 und 16*).

$$SL_k = \sum_{i=1}^{6} L_{ki}$$

 $L_{ki} =$ Länge kapillarähnlicher Strukturen im jeweiligen Bildausschnitt am jeweiligen
Untersuchungstag
 $k = 1, ..., 12$
 $l = 1, ..., 6$

In den Vertiefungen, in denen die Fläche der kapillarähnlichen Strukturen (SF_k) zwei Maxima aufwies, ließ auch die Länge der kapillarähnlichen Strukturen (SL_k) zwei Maxima erkennen. Dabei lagen die Maxima der Fläche (SF_k) und der Länge (SL_k) außer bei den Vertiefungen 3 und 7, bei denen jeweils das erste Maximum um einen Untersuchungstag verschoben war, stets an den gleichen Untersuchungstagen.

Einzige Ausnahme bildete die Vertiefung 10, in der die Fläche der kapillarähnlichen Strukturen zwei Peaks, aber deren Länge nur einen Peak aufwies. Das gemeinsame Maximum lag hier am Tag 53 der Untersuchung, während das zusätzliche Maximum der Fläche (\mathbf{SF}_k) am Tag 46 zu erkennen war.



Diagramm 15 Summe der Längen der kapillarähnlichen Strukturen in den jeweils sechs Bildausschnitten der Vertiefungen 1 – 6



Diagramm 16 Summe der Längen der kapillarähnlichen Strukturen in den jeweils sechs Bildausschnitten der Vertiefungen 7 – 12

In den Vertiefungen, in denen sowohl die Fläche (SF_k) als auch die Länge (SL_k) der kapillarähnlichen Strukturen nur ein Maximum aufwiesen, fielen mit Ausnahme der Vertiefung 11 die Maxima von SF_k und SL_k einer Vertiefung auf die gleichen Untersuchungstage. In der Vertiefung 11 war das Maximum der Länge einen Untersuchungstag früher erreicht (Tag 46) als das Maximum der Fläche (Tag 49).



Diagramm 17 Gesamtlänge der kapillarähnlichen Strukturen (**SL**_{total}) in allen untersuchten Bildausschnitten (72) der 12 Vertiefungen

Die im *Diagramm 17* dargestellte Gesamtlänge der kapillarähnlichen Strukturen (**SL**_{total}) weist im Gegensatz zur Gesamtfläche (**SF**_{total}) nur ein Maximum auf, welches am Tag 53 lag.

Die **Anzahl der Verzweigungspunkte** der kapillarähnlichen Strukturen (SV_k) nahm in 10 der 12 Vertiefungen ab dem Tag 39 der Untersuchungen zu (*Diagramme 18 und 19*).

$$SV_{k} = \sum_{i=1}^{6} V_{ki}$$

$$V_{ki} = \text{Anzahl der Verzweigungspunkte kapillarähnlicher Strukturen im jeweiligen}$$
Bildausschnitt am jeweiligen Untersuchungstag
$$k = 1, ..., 12$$

$$l = 1, ..., 6$$



Diagramm 18 Anzahl der Verzweigungspunkte der kapillarähnlichen Strukturen in den jeweils sechs Bildausschnitten der Vertiefungen 1 – 6



Diagramm 19 Anzahl der Verzweigungspunkte der kapillarähnlichen Strukturen in den jeweils sechs Bildausschnitten der Vertiefungen 7 – 12

In sieben der 12 Vertiefungen war ein Maximum zu erkennen, während die anderen Vertiefungen zwei Maxima aufwiesen. Ein bzw. das Maximum lag dabei in sieben der 12 Vertiefungen (Vertiefungen 4, 5, 6, 7, 8, 9 und 10) am Tag 53 der Untersuchungen. Dies wird durch die Darstellung der Gesamtzahl der Verzweigungspunkte (**SV**_{total}), die ein Maximum am Tag 53 aufweist, verdeutlicht (*Diagramm 20*).



Diagramm 20 Gesamtzahl der Verzweigungspunkte kapillarähnlicher Strukturen (**SV**_{total}) in allen untersuchten Bildausschnitten (72) der 12 Vertiefungen

5.5.2 Aus den Messwerten berechnete Größen

Anhand der gemessenen Daten, welche die Fläche, Länge und die Anzahl der Verzweigungspunkte der kapillarähnlichen Strukturen umfassten (siehe 5.2.2.2), wurden drei zusätzliche Parameter berechnet.

An jedem Untersuchungstag wurde für alle Bildausschnitte (72) der Quotient aus der Summe der Flächen (SF_j) und der Summe der Längen (SL_j) der kapillarähnlichen Strukturen (D_j) gebildet:

$$D_{j} = \frac{\sum SF_{j}}{\sum SL_{j}} \quad (\mu m)$$

$$SF_{j} = Fläche kapillarähnlicher Strukturen innerhalb eines Bildausschnitts (\mu m^{2})$$

$$SL_{j} = Länge kapillarähnlicher Strukturen innerhalb eines Bildausschnitts (\mu m)$$

$$j = 1, ..., 72$$

 D_j stellt den relativen Anteil der Fläche an der Länge der kapillarähnlichen Strukturen dar und verhält sich somit proportional zum mittleren Durchmesser der kapillarähnlichen Strukturen. Damit repräsentiert D_j den relativen Durchmesser der kapillarähnlichen Strukturen im jeweiligen Bildausschnitt. In *Diagramm 21* ist die Verteilung von D_j ab dem 39. Tag der

Untersuchung dargestellt. Innerhalb der Box befinden sich dabei die Werte, die oberhalb des 1. (25%) und unterhalb des 3. (75%) Quartils liegen, so dass die Höhe der Box der Interquartilbreite entspricht. Die obere und untere Markierung des Box Plots kennzeichnen den kleinsten und größten Wert, sofern es sich dabei nicht um einen Ausreißer oder Extremwert handelt. Alle Werte, die mehr als die 3fache Interquartilbreite von der Box entfernt liegen, werden als Extremwert bezeichnet und sind als Stern dargestellt. Werte, die mehr als die 1,5fache aber weniger als die 3fache Interquartilbreite von der Box entfernt sind, stellen die Ausreißer dar und sind als Kreis gekennzeichnet.



Diagramm 21 Quotient von Fläche und Länge der kapillarähnlichen Strukturen (**D**_j) in allen untersuchten Bildausschnitten der 12 Vertiefungen (N entspricht der Anzahl der Bildausschnitte, die am jeweiligen Untersuchungstag kapillarähnliche Strukturen enthielten)

Den Median der Werte für D_j an den Tagen 39 bis 67 der Untersuchung betrachtend wird deutlich, dass an den Tagen 39, 42 und 46 der relative Durchmesser der kapillarähnlichen Strukturen höher lag als an den folgenden Untersuchungstagen. Dabei bleibt zu

berücksichtigen, dass der Stichprobenumfang (N), namentlich die Bildausschnitte, in denen sich kapillarähnliche Strukturen entwickelt hatten, zu diesem Zeitpunkt weit niedriger war als an den letzten sechs Untersuchungstagen. Ab dem Tag 49 der Untersuchungen unterliegt der Median von D_j nur noch minimalen Schwankungen (< 2 µm).



Diagramm 22 Quotient von Fläche und Anzahl der Verzweigungen (+ 1) der kapillarähnlichen Strukturen (**RF**_j) in allen untersuchten Bildausschnitten (72) der 12 Vertiefungen (N entspricht der Anzahl der Bildausschnitte, die am jeweiligen Untersuchungstag kapillarähnliche Strukturen enthielten)

Als zweiter Parameter wurde an jedem Untersuchungstag für alle Bildausschnitte (72) der Quotient der Summe der Flächen (SF_j) und der Anzahl der Verzweigungspunkte (SV_j) +1 der kapillarähnlichen Strukturen (RF_j) berechnet:

$$RF_{j} = \frac{\sum SF_{j}}{SV_{j} + 1} \quad (\mu m^{2})$$

$$SF_{j} = Fläche kapillarähnlicher Strukturen innerhalb eines Bildausschnitts (\mu m^{2})$$

$$SV_{j} = Anzahl der Verzweigungspunkte kapillarähnlichen Strukturen in einem Bildausschnitt$$

$$j = 1, ..., 72$$

Da die Anzahl der Verzweigungspunkte (SV_j) + 1 der Anzahl der kapillarähnlichen Strukturen entspricht, steht RF_j der mittleren Fläche einer kapillarähnlichen Struktur im jeweiligen Bildausschnitt gleich. Somit repräsentiert hier RF_j die relative Fläche einer kapillarähnlichen Struktur im Bildausschnitt (*Diagramm 22*).

Die relative Fläche der kapillarähnlichen Strukturen (RF_j), beurteilt anhand des Medians, vergrößerte sich zunächst vom Tag 39 der Untersuchungen beginnend bis zum Tag 46. Im weiteren Verlauf der Angiogenese war eine Verringerung von RF_j zu erkennen, der sich ein erneuter und stärkerer Anstieg an den letzten drei Untersuchungstagen anschloss. Auffällig war dabei, dass gleichzeitig mit dem Anstieg des Medianes von RF_j eine weitere Streuung der Werte zu beobachten war.

Zur Bestimmung der relativen Länge einer kapillarähnlichen Struktur (RL_j) wurde der Quotient der Summe der Längen (SL_j) und der Anzahl der Verzweigungspunkte (SV_j) + 1 kapillarähnlicher Strukturen im jeweiligen Bildausschnitt bestimmt:

$$\begin{split} RL_{j} &= \frac{\sum SL_{j}}{SV_{j} + 1} \quad (\mu m) \\ SL_{j} &= \text{Länge kapillarähnlicher Strukturen innerhalb eines Bildausschnitts (} \mu m) \\ SV_{j} &= \text{Anzahl der Verzweigungspunkte kapillarähnlichen Strukturen in einem Bildausschnitt} \\ j &= 1, ..., 72 \end{split}$$

Der Median der relativen Länge der kapillarähnlichen Strukturen (\mathbf{RL}_{j}) unterlag vom Tag 39 der Untersuchungen beginnend bis zum Tag 46 nur geringgradigen Schwankungen. Ab dem Tag 60 der Untersuchungen stieg der Median von \mathbf{RL}_{j} deutlich bis zum letzten Tag der Untersuchungen an. Gleichzeitig nahm auch bei \mathbf{RL}_{j} die Streuung der Werte in dieser Phase zu (*Diagramm 23*).



Diagramm 23 Quotient von Länge und Anzahl der Verzweigungen (+ 1) der kapillarähnlichen Strukturen (*RL_j*) in allen untersuchten Bildausschnitten (72) der 12 Vertiefungen (*N* entspricht der Anzahl der Bildausschnitte, die am jeweiligen Untersuchungstag kapillarähnliche Strukturen enthielten)

5.6 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Angiogenese in vitro

Für die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung verwendet, die 18, 40 und 60 Tage lang mit dem Selektivmedium P0 (siehe 3.3.2) kultiviert worden waren.

Vor der Präparation wurden die jeweils in zwei Vertiefungen wachsenden Endothelzellen phasenkontrastmikroskopisch untersucht. In jeder Vertiefung wurden sechs Bildausschnitte zufällig ausgewählt und dem Zellbild in jedem Bildausschnitt ein Stadium der Angiogenese in vitro (siehe 5.1.3) zugewiesen.

Die Endothelzellen, die 18 Tage lang kultiviert worden waren, befanden sich in den untersuchten Bildausschnitten in den Stadien 2 bzw. 3 der Angiogenese in vitro, die 40 Tage lang kultivierten Endothelzellen in den Stadien 5 und 6 und die 60 Tage lang kultivierten Zellen in den Stadien 7 und 8 der Angiogenese (siehe 5.1.3).

5.6.1 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung von Endothelzellen in den Stadien 2 und 3 der Angiogenese in vitro

Die Endothelzellen, die sich bei der phasenkontrastmikroskopischen Betrachtung in der Phase der Aussprossung (Stadium 2 bzw. 3 der Angiogenese in vitro) befanden, zeigten auch bei der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung eine langgestreckte Gestalt. Weit über 50% der Zellen waren dabei linear aneinander gereiht. Sehr häufig waren zwei Endothelzellreihen parallel angeordnet und wiesen dazwischen einen schmalen Spalt (1 – 2 µm Durchmesser) auf (*Abb.36 und 37*).

Innerhalb der Einzelzellreihen waren die Endothelzellen überwiegend über "gap junctions" miteinander verbunden (*Abb.38*); vereinzelt waren Desmosomen zu erkennen. Zwischen den Einzelzellreihen bestanden keine Zellkontakte.



Abb.36 Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 18 Tage in Kultur. Zwei endotheliale Einzelzellreihen, die parallel aneinander gelagert sind. Dazwischen befindet sich ein schmaler Spalt (SP), der mit fibrillärem Material angefüllt ist. Fingerförmige Ausstülpungen der Zellmembran (Pfeile). Ovale Zellkerne mit einigen Nukleoli (N). Transmissionselektronenmikroskop, 5.000 x



Abb.37 Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 18 Tage in Kultur. Zwei endotheliale Einzelzellreihen, die parallel aneinander gelagert sind. Dazwischen befindet sich ein schmaler Spalt (SP), der mit fibrillärem Material angefüllt ist. Fingerförmige Ausstülpungen der Zellmembranen (Pfeile). Transmissionselektronenmikroskop, 3.200 x

In dem Spaltraum zwischen den Endothelzellreihen war fibrilläres Material zu erkennen, welches im übrigen Extrazellulärbereich nicht vorhanden war (*Abb.36 und 37*). Die Zellmembranen wiesen zahlreiche fingerförmige Ausstülpungen auf.

Die Verteilung der Zellorganellen im Zytoplasma der Endothelzellen war durch deren Ansammlung in der Zellperipherie gekennzeichnet. Dominierend unter den Zellorganellen waren die zahlreichen, stark elektronendichten Mitochondrien vom Crista-Typ (*Abb.38*). An einigen vereinzelten Abschnitten der Zellen waren rauhes endoplasmatisches Retikulum (*Abb.38*) und Golgi-Felder zu erkennen (*Abb.39*).

Die Zellkerne der Endothelzellen waren oval und euchromatinreich. In den meisten Zellkernen waren ein bis zwei Nukleoli zu erkennen (*Abb.36*).



Abb.38 Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 18 Tage in Kultur. Zellkontakte: gap junction (Pfeil), Desmosomen (D). Mitochondrien vom Crista-Typ (M). Rauhes endoplasmatisches Retikulum (rER). Transmissionselektronenmikroskop, 20.000 x



Abb.39 Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 18 Tage in Kultur. Mitochondrien vom Crista-Typ (M). Golgi-Feld (Pfeil). Zellmembranausstülpung (Z). Transmissionselektronenmikroskop, 25.000 x

5.6.2 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung von Endothelzellen in den Stadien 5 und 6 der Angiogenese in vitro

Bei der phasenkontrastmikroskopischen Betrachtung befanden sich die Endothelzellen in der späten Phase der linearen Aneinanderreihung (Stadium 5 der Angiogenese in vitro) und Netzwerkbildung (Stadium 6 der Angiogenese in vitro). Bei der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung bestätigte sich die in Reihen organisierte Anordnung der Endothelzellen. Die Form der Zellen variierte dabei von lang gestreckt bis abgerundet. Je abgerundeter die Endothelzellen waren, desto häufiger bestanden Zellkontakte nur über schmale Zellausläufer (*Abb.40 und 41*).



Abb.40 Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 40 Tage in Kultur. Linear aneinander gereihte Endothelzellen mit lang gestreckter (unten) und abgerundeter Gestalt (oben). Abgerundete Zelle mit langem Zellausläufer (Pfeil). Transmissionselektronenmikroskop, 3.200 x

Die mit fibrillärem Material gefüllten, schmalen Spalträume (1 bis 2 µm Durchmesser) zwischen den Endothelzellreihen, die bereits im Stadium 2 und 3 der Angiogenese in vitro zu sehen waren, wiesen in diesen Stadien der Angiogenese (5 und 6) eine unterschiedliche Breite auf. In den Abschnitten, in denen zwischen den Zellreihen breite Spalträume (5 bis 8 µm Durchmesser) bestanden, war eine hochgradige Exozytose fibrillären Materials zu erkennen (*Abb.41und 42*).

Die Zellmembran der Endothelzellen wies zahlreiche kleine, fingerförmige Ausstülpungen auf. Je abgerundeter die Endothelzellen waren, desto mehr konzentrierten sich diese Ausstülpungen auf die dem Spaltraum abgewandten Seite (*Abb.40 und 41*).



Abb.41 Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 40 Tage in Kultur. Linear aneinandergereihte Endothelzellen mit runder Gestalt. Breiter Spalt (Sp) zwischen den Endothelzellreihen ist mit fibrillärem Material gefüllt. Die dem Spaltraum abgewandte Zellmembran der Endothelzellen weist zahlreiche fingerförmige Ausstülpungen (Pfeile) auf. Zellkern mit Einfaltungen der Kernmembran (K). Nukleoli (N). Transmissionselektronenmikroskop, 1.600 x

Im Zytoplasma der Endothelzellen waren auch in diesen Stadien der Angiogenese in vitro zahlreiche Mitochondrien vorhanden. Jedoch überwog im Gegensatz zu den Stadien 2 und 3 der Angiogenese in vitro der Anteil weniger elektronendichter Mitochondrien (*Abb.42 und 43*). Gleichzeitig war ein deutlicher Konzentrationsanstieg des rauhen endoplasmatischen Retikulums, welches nicht selten weite Zisternen aufwies, zu erkennen (*Abb.43*). Die Menge und Größe der Golgi-Felder zeigte keine auffälligen Veränderungen gegenüber den Ergebnissen der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen in den Stadien 2 und 3 der Angiogenese in vitro.



Abb.42 Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 40 Tage in Kultur. Exozytose fibrillären Materials (Pfeile). Zellkern (K). Mitochondrien (M). Transmissionselektronenmikroskop, 8.000 x

Die Zellkerne der Endothelzellen mit langgestreckter Gestalt hatten eine ovale Form. Je abgerundeter die Zellen waren, desto stärker wies die Kernmembran dieser Zellen Einfaltungen auf (*Abb.41*). Die euchromatinreichen Zellkerne hatten meist ein bis zwei Nukleoli. Nur in einigen, vor allem in den stark gelappten Zellkernen, waren mehr als zwei Nukleoli zu sehen (*Abb.41*).



Abb.43Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 40 Tage in Kultur.
Mit fibrillärem Material gefüllter schmaler Spalt (SP) zwischen einer Endothelzelle
(rechts) und einem Zellfortsatz einer anderen Endothelzelle (links). Mitochondrium
(M). Rauhes endoplasmatisches Retikulum (rER).
Transmissionselektronenmikroskop, 25.000 x

5.6.3 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung von Endothelzellen in den Stadien 7 und 8 der Angiogenese in vitro

Die in diesen Stadien transmissionselektronenmikroskopisch diagnostizierbaren in Tubuli organisierten Endothelzellen hatten ausschließlich eine ovale bis rundliche Gestalt. Innerhalb der Endothelzelltubuli waren bei den Untersuchungen in diesen Stadien (7 und 8) Lumina bis zu einem Durchmesser von 15 µm zu erkennen. Diese waren größtenteils mit fibrillärem Material angefüllt (*Abb.44*). Im Lumen einiger Endothelzelltubuli, insbesondere in denen mit großem Durchmesser, füllte das fibrilläre Material nicht das gesamte Areal aus (*Abb.45*).



Abb.44

Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 60 Tage in Kultur. Querschnitt durch einen Endothelzelltubulus. Das endothelzellfreie Lumen (L) ist mit fibrillärem Material ganz ausgefüllt. Transmissionselektronenmikroskop, 3.200 x





Nachdem von den Stadien 2 und 3 zu den Stadien 5 und 6 der Angiogenese in vitro die Elektronendichte der Mitochondrien geringer geworden war, nahm von den Stadien 5 und 6 zu den Stadien 7 und 8 der Angiogenese in vitro nun die Anzahl dieser Mitochondrien deutlich ab (*Abb.46*). Rauhes endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Felder waren nur noch vereinzelt in wenigen Zellen zu erkennen.



Abb.46 Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 60 Tage in Kultur. Zellkern mit Einfaltungen (K). Nukleolus (N). Wenig elektronendichte Mitochondrien (M). Vakuolen (Pfeile). Transmissionselektronenmikroskop, 4.000 x



Abb.47 Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 60 Tage in Kultur. Zelle mit Vakuolen (V), die teilweise fibrilläres Material (Pfeile) enthalten. Transmissionselektronenmikroskop, 5.000 x

Häufig waren Zellen zu sehen, die viele Vakuolen mit einem Durchmesser von $0,5 - 2 \mu m$ enthielten. Diese Vakuolen unterschieden sich nicht nur in ihrer Größe, sondern auch bezüglich ihres Inhaltes. Ein Teil der Vakuolen war mit fibrillärem Material angefüllt, die anderen Vakuolen waren elektronenoptisch leer (*Abb.47*).

Die Kernmembran der Endothelzellen wies zahlreiche Einfaltungen auf. Die Kerne waren reich an Euchromatin.



Abb.48

Endothelzellen (E) aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 60 Tage in Kultur. Endotheliale, tubuläre Struktur mit einem zellfreien Lumen im Inneren (L), welches fibrilläres Material enthält.

Transmissionselektronenmikroskop, 800 x

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

Der immunzytochemische Nachweis von Kollagen Typ IV erfolgte fluoreszenzmikroskopisch. Die Untersuchungen wurden an Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung durchgeführt, die 14, 26, 44 und 56 Tage lang mit dem Selektivmedium P0 (siehe 3.3.2) kultiviert worden waren.

Vor der Bearbeitung der Zellen zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurden die in jeweils vier Vertiefungen wachsenden Endothelzellen phasenkontrastmikroskopisch untersucht. In jeder Vertiefung wurden mindestens sechs Bildausschnitte zufällig ausgewählt und dem Zellbild in jedem Bildausschnitt das Stadium der Angiogenese in vitro (siehe 5.1.3) diagnostiziert.

Die Endothelzellen, die 14 Tage lang kultiviert worden waren, befanden sich in den untersuchten Bildausschnitten in den Stadien 1 bzw. 2 der Angiogenese in vitro. Die Endothelzellen, die 26 Tage lang kultiviert worden waren, zeigten in den untersuchten Bildausschnitten die Merkmale der Stadien 3 bzw. 4 der Angiogenese in vitro. Die 44 Tage lang kultivierten Endothelzellen waren in den verschiedenen Bildausschnitten in den Stadien 5 bzw. 6 der Angiogenese in vitro und die 56 Tage lang kultivierten Zellen in den Stadien 7 bzw. 8 der Angiogenese in vitro (*Tabelle 15*).

Zeitraum der Kultivierung der Endothelzellen	Zugewiesene Stadien der Angiogenese in vitro
14 Tage	Stadien 1 und 2
26 Tage	Stadien 3 und 4
44 Tage	Stadien 5 und 6
56 Tage	Stadien 7 und 8

Tab.15 Stadien der Angiogenese in vitro, in denen sich die Endothelzellen nach unterschiedlich langer Dauer der Kultivierung in jeweils 24 beurteilten Bildausschnitten befanden

Die Ergebnisse der folgenden Untersuchungen sind abschließend in der *Tabelle* 16 zusammengefasst.

5.7.1 Nachweis von Kollagen Typ IV im Stadium 1 bzw. 2 der Angiogenese in vitro

Die Endothelzellen, die sich im Stadium 1 bzw. 2 der Angiogenese in vitro befanden, zeigten ausnahmslos eine intensive Fluoreszenz im Zytoplasma und eine Fluoreszenz an den Zellmembranen. Im Bereich des Zellkerns war eine geringe Antikörperbindung zu beobachten, wobei meist um den Zellkern herum ein besonders intensiv fluoreszierender Saum zu erkennen war. Ca. 40% der Endothelzellen wiesen einen schwach fluoreszierenden Hof auf, wobei dieser nicht selten an zwei gegenüberliegenden Polen lang gestreckt war (*Abb.49*). Im weiteren extrazellären Bereich war keine Fluoreszenz zu sehen.



Abb.49 und 50

Oben: Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 14 Tage in Kultur, Markierung mit anti-Kollagen Typ IV, Fluoreszenz-positiv sind das Zytoplasma und die Zellmembran der Endothelzellen, fluoreszierender Hof um einige Zellen herum, der häufig an gegenüber liegenden Polen der Zelle lang gestreckt ist (Pfeile); Fluoreszenzmikroskop, 100x

Rechts: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme des identischen Bildausschnitts


5.7.2 Kollagen Typ IV im Stadium 3 bzw. 4 der Angiogenese in vitro

Bei den Endothelzellen, die sich im Stadium 3 bzw. 4 der Angiogenese in vitro befanden, erfolgte eine deutliche und überwiegend gleichmäßige Markierung des Zytoplasmas und der Zellmembran. Die prominente Markierung um den Zellkern, die bei den Endothelzellen im Stadium 1 bzw. 2 der Angiogenese in vitro zu erkennen war, trat hier nur noch bei vereinzelten Zellen auf (*Abb.51*).



Abb.51 und 52

Oben: Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 26 Tage in Kultur, Markierung mit anti-Kollagen Typ IV, besonders intensive Fluoreszenz bei linear aneinander gereihten Zellen (Pfeile);

Fluoreszenzmikroskop, 100x



Ca. 80% Zellen waren von einem schwach fluoreszierenden Hof umgeben. Eine besonders intensive Fluoreszenz war bei linear aneinander gereihten Endothelzellen zu beobachten, die sich auch auf die langen Fortsätze, die diese Zellen bildeten, erstreckte (*Abb.51*).

5.7.3 Nachweis von Kollagen Typ IV im Stadium 5 bzw. 6 der Angiogenese in vitro



Abb.53 und 54

Oben: Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 44 Tage in Kultur, Markierung mit anti-Kollagen Typ IV, schwache Fluoreszenz der Endothelzellen, intensiv fluoreszierendes fibrilläres Material (Pfeile), das die im Netzwerk organisierten Zellen miteinander verbindet; Fluoreszenzmikroskop, 100x



Die Endothelzellen, die sich im Stadium 5 bzw. 6 der Angiogenese in vitro befanden, zeigten nur noch eine schwache Fluoreszenz im Bereich des Zytoplasmas, der Zellmembran und in ihrer unmittelbaren Umgebung. Eine deutliche Markierung erfolgte an dem extrazellulär gelegenen, fibrillären Material, welches sich zwischen den im Netzwerk organisierten Endothelzellen erstreckte (*Abb.53*).

5.7.4 Nachweis von Kollagen Typ IV im Stadium 5 bzw. 6 der Angiogenese in vitro



Abb.55 und 56

Oben: Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 56 Tage in Kultur, Markierung mit anti-Kollagen Typ IV, sehr schwache Fluoreszenz der Endothelzellen, besonders intensiv fluoreszierendes fibrilläres Material (Pfeile) im Bereich der endothelialen, strangartigen Strukturen (Pfeile);

Fluoreszenzmikroskop, 100x



Bei den Endothelzellen, die sich im Stadium 7 bzw. 8 der Angiogenese in vitro befanden, zeigten nur ca. 40% der Zellen eine sehr schwache Fluoreszenz. Eine intensive Antikörperbindung war an dem fibrillären Material, welches sich ausnahmslos im Bereich der strangartigen, endothelialen Strukturen befand, zu erkennen. Hier war die Fluoreszenz umso stärker, je größer der Durchmesser dieser Strukturen war (*Abb.55*).

5.7.5 Zusammenfassung der Ergebnisse des Nachweises von Kollagen Typ IV im Ablauf der Angiogenese in vitro

Bei den immunzytochemischen Untersuchungen zum Nachweis von Kollagen Typ IV war im Ablauf der Angiogenese in vitro zu erkennen, dass die anfangs intensive Fluoreszenz im Zytoplasma und an den Zellmembranen der Endothelzellen im weiteren Verlauf der Angiogenese immer schwächer wurde. Das fibrilläre Material, das aus den Endothelzellen ausgeschleust wurde und dessen Konzentration im Verlauf der Angiogenese in vitro im extrazellulären Bereich des endothelialen Netzwerks und innerhalb der Lumina der Tubuli deutlich anstieg, zeigte eine besonders intensive Fluoreszenz (*Tabelle 17*).

Dauer der Kultivierung	Markierung des Zytoplasmas	Markierung der Zellmembran	Markierung des extrazellulären fibrillären Materials
14 Tage	+++	++	-
26 Tage	++	++	-
44 Tage	+	+	++
56 Tage	+/-	+/-	+++

Tab.16 Markierung in vitro kultivierter Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung mit anti-Kollagen Typ IV nach unterschiedlich langer Kultivierung mit dem Selektivmedium P0.

Beurteilung der Fluoreszenzintensität: +++ = intensiv positiv, ++ = deutlich positiv, + = positiv, +/- = schwach positiv

5.8 Nachweis von Apoptose im Ablauf der Angiogenese in vitro

Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis apoptotischer Endothelzellen erfolgte mittels der Bindung von Annexin-EGFP an Phosphatidylserin in der äußeren Lipidschicht der Zellmembran.

Die Untersuchungen wurden an Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung durchgeführt, die 14, 26, 44 und 56 Tage lang mit dem Selektivmedium P0 (siehe 3.3.2) kultiviert worden waren.

Vor der Bearbeitung der Zellen zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurden die in jeweils vier Vertiefungen wachsenden Endothelzellen phasenkontrastmikroskopisch untersucht. In jeder Vertiefung wurden mindestens sechs Bildausschnitte zufällig ausgewählt und dem Zellbild in jedem Bildausschnitt ein Stadium der Angiogenese in vitro (siehe 5.1.3) zugewiesen.

Die Endothelzellen, die 14 Tage lang kultiviert worden waren, befanden sich in den untersuchten Bildausschnitten in den Stadien 1 bzw. 2 der Angiogenese in vitro. Die Endothelzellen, die 26 Tage lang kultiviert worden waren, zeigten in den untersuchten Bildausschnitten die Merkmale der Stadien 3 bzw. 4 der Angiogenese in vitro. Die 44 Tage lang kultivierten Endothelzellen waren in den verschiedenen Bildausschnitten in den Stadien 5 bzw. 6 der Angiogenese in vitro und die 56 Tage lang kultivierten Zellen in den Stadien 7 bzw. 8 der Angiogenese in vitro (*Tabelle 17*).

Zeitraum der Kultivierung der Endothelzellen	Zugewiesene Stadien der Angiogenese in vitro
14 Tage	Stadien 1 und 2
26 Tage	Stadien 3 und 4
44 Tage	Stadien 5 und 6
56 Tage	Stadien 7 und 8

Tab.17 Stadien der Angiogenese in vitro, in denen sich die Endothelzellen nach unterschiedlich langer Dauer der Kultivierung in jeweils 24 beurteilten Bildausschnitten befanden

Die Ergebnisse der folgenden Untersuchungen sind abschließend in der *Tabelle* 18 zusammengefasst.

5.8.1 Nachweis von Apoptose im Stadium 1 bzw. 2 der Angiogenese in vitro

Von den Endothelzellen, die sich zum Zeitpunkt der Untersuchung im Stadium 1 bzw. 2 der Angiogenese in vitro befanden, zeigten ca. 30% eine meist schwache Fluoreszenz. Dabei erstreckte sich die Fluoreszenz häufig nur über einen Anteil und sehr selten über die gesamte Zellmembran. An den schwach fluoreszierenden Bereichen der Zellmembranen waren nicht selten punktuell Abschnitte, die eine intensive Fluoreszenz aufwiesen, zu erkennen (*Abb.57*). Die übrigen Endothelzellen (ca. 70%) wiesen keine Markierung auf, da sich ihre Fluoreszenz nicht von der hier relativ starken Hintergrundfluoreszenz abhob.



Abb.57 und 58

Oben: Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 14 Tage in Kultur, Darstellung apoptotischer Zellen mittels Annexin-EGFP, schwache bzw. punktuell stärkere (Pfeil);

Fluoreszenzmikroskop, 100x



5.8.2 Nachweis von Apoptose im Stadium 3 bzw. 4 der Angiogenese in vitro

Bei den Endothelzellen, die sich zum Zeitpunkt der Untersuchungen im Stadium 3 bzw. 4 der Angiogenese in vitro befanden, wurden ca. 10% apoptotische Zellen fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. Dabei beschränkte sich die Fluoreszenz auf die Endothelzellen, die sich in linearer Anordnung befanden (*Abb.59*). Nicht linear aneinander gereihte Endothelzellen zeigten keine Fluoreszenz. Der Anteil der Fluoreszenz-positiven Endothelzellen betrug ca. 40%.



Abb.59 und 60

Oben: Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 26 Tage in Kultur, Darstellung apoptotischer Zellen mittels Annexin-EGFP, Fluoreszenz-positive linear aneinander gereihte Endothelzellen (Pfeil); Fluoreszenzmikroskop,

100x Rechts: Phasenkont



5.8.3 Nachweis von Apoptose im Stadium 5 bzw. 6 der Angiogenese in vitro

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Endothelzellen, die sich im Stadium 5 bzw. 6 der Angiogenese in vitro befanden, wies auf ca. 70% apoptotische Zellen hin. Zellen mit intensiver Fluoreszenz traten insbesondere innerhalb der Stränge des Netzwerks auf (*Abb.61*). Vereinzelt war eine schwache Fluoreszenz von Endothelzellen, die nicht in Strängen organisiert waren, zu beobachten. Bei den an den Strängen des Netzwerks beteiligten Endothelzellen betrug der Anteil der Fluoreszenz-positiven Zellen ca. 50%.



Abb.61 und 62

Oben: Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 44 Tage in Kultur, Darstellung apoptotischer Zellen mittels Annexin-EGFP, Fluoreszenz-positive im Netzwerk organisierte Endothelzellen (Pfeile); Fluoreszenzmikroskop,

100x



5.8.4 Nachweis von Apoptose im Stadium 7 bzw. 8 der Angiogenese in vitro

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Endothelzellen, die sich im Stadium 7 bzw. 8 der Angiogenese in vitro befanden, ergab eine Konzentration von ca. 60% apoptotischen Zellen. Fluoreszenz-positive Zellen traten in dieser Phase der Angiogenese in vitro ausschließlich im Bereich der Endothelzellstränge auf. Aufgrund der Dreidimensionalität dieser Stränge war nur eine eingeschränkte Einschätzung der Menge apoptotischer Zellen (ca. 30%) möglich. Zu erkennen war jedoch, dass die stärkste Intensität der Fluoreszenz vor allem in den Bereichen der Tubuli auftrat, deren Durchmesser größer als 30 µm war (*Abb.63*). Endothelzellen, die nicht an den Strängen beteiligt waren, zeigten nur eine leichte unspezifische Fluoreszenz.



Abb.63 und 64

Oben: Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 56 Tage in Kultur, Darstellung apoptotischer Zellen mittels Annexin-EGFP, intensive Fluoreszenz an den Zellmembranen einzelner Zellen im Bereich der Endothelzelltubuli (Pfeil); Fluoreszenzmikroskop.

ниоreszenzmikrosкор, 100х



5.8.5 Zusammenfassung der Ergebnisse des Nachweises von Apoptose im Ablauf der Angiogenese in vitro

Im Ablauf der Angiogenese in vitro war bei den im Monolayer wachsenden Zellen eine Abnahme der Konzentration apoptotischer Endothelzellen zu erkennen. Bei den sich linear aneinander reihenden Zellen, die im weiteren Verlauf in einer zweiten Ebene über dem Monolayer ein Netzwerk bildeten, war im Ablauf der Angiogenese in vitro ein deutlicher Anstieg der Anzahl apoptotischer Endothelzellen zu erkennen. Eine besonders intensive Fluoreszenz wurde im Bereich *kapillarähnlicher Strukturen* (siehe 5.1.2) nachgewiesen (*Tabelle 19*).

Dauer der Kultivierung	Markierung der Zellen im Monolayer	Markierung in Strängen organisierter Zellen
14 Tage	+	-
26 Tage	-	+/-
44 Tage	+/-	+
56 Tage	-	++

Tab.18 Nachweis von Apoptosen bei in vitro kultivierten Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung mittels Annexin-EGFP nach unterschiedlich langer Kultivierung mit dem Selektivmedium P0. Beurteilung der Fluoreszenzintensität: ++ = deutlich positiv, += positiv, +/- = schwach positiv,

Beurteilung der Fluoreszenzintensität: ++ = deutlich - = negativ