

## 2 DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE

---

### 2.1 VEGF unterstützt und beschleunigt das vaskuläre Remodeling nach mikrochirurgischer Gefäßanastomosierung (Reprint 1):

#### **Zusammenfassung:**

Das Gefäßendothel spielt eine kritische Rolle bezüglich der Thrombogenität, dem Gefäßtonus und dem Gefäßremodeling, sowie nach mikrochirurgischen Gefäßanastomosen in der Transplantations-, Replantations- und Rekonstruktiven Chirurgie. Wir untersuchten den Effekt von VEGF und seine Bedeutung beim vaskulären Remodeling und der Reendothelialisierung von Gefäßen nach mikrochirurgischen Eingriffen. Dazu verwendeten wir im Rattenmodell die Femoralarterie, welche sofort nach Durchtrennung mikrochirurgisch unter dem Mikroskop reanastomosiert wurde. Der Prozess der Reendothelialisierung nach 5, bzw. 10 Tagen war bei den intraluminal mit VEGF behandelten Gefäßen signifikant beschleunigt. Auch die Elektronenmikroskopie zeigte im Gegensatz zu den nicht behandelten Kontrollgefäßen morphologisch eine vollständige Heilung. Die extrazellulären Matrixproteine wie Fibronectin, Kollagen Typ I, III, und IV waren signifikant erhöht. Dazu induzierte die VEGF-Behandlung die flk-1-, Osteopontin- und TGF- $\beta$ 1-Proteine. Kollagen Typ I in der Adventitia, Typ III in der Media und Intima sowie Typ IV in der Basalmembran sind die Voraussetzung für das vaskuläre Remodeling. Osteopontin (Eta-1) ist bekannt als ein Wachstumsfaktor für Zytokine und extrazelluläre Matrixproteine. Es ist ein wichtiger Bestandteil der zellulären Immunität und Entzündung. Osteopontin wird durch VEGF hochreguliert, es wirkt auf die Endothelzellen zytoprotektiv, zelladhäsiv und als chemotaktischer Faktor. Neben VEGF scheint Osteopontin eine wichtige Rolle im vaskulären Remodeling einzunehmen (Reprint 1).

**Reprint 1:**

Intraluminal application of vascular endothelial growth factor enhances healing of microvascular anastomosis in a rat model.

*J Vasc Res 2005;42:202–213*

## **2.2 Der VEGF-Serumspiegel korreliert mit dem lokalen und generalisierten Gewebeödem (Reprint 2) und ist nach Verbrennungstrauma stark erhöht (Reprint 3):**

### **Zusammenfassung:**

Ein zentrales Problem bei schweren Verbrennungen bilden die ausgedehnten lokalen und generalisierten Ödeme. Systemisch freigesetzte pro-inflammatorische Mediatoren führen zu lokalen Gewebeschädigungen, erklären aber nicht die fulminant verlaufende Permeabilitäts-erhöhung der Gefäße mit dem konsekutiven Ödem. VEGF ist ein wichtiger Mediator der vaskulären Angiogenese und Permeabilität. VEGF erhöht die Gefäßpermeabilität um das 40000-fache im Vergleich zu Histamin. Wir haben Verbrennungspatienten in Bezug auf das lokale und generalisierte Gewebeödem und den kinetischen Verlauf des VEGF-Serumspiegels untersucht (gesunde Patienten:  $82 \pm 10$  pg/ml). Dabei zeigte sich, dass sich der VEGF-Serumspiegel schon in der Initialphase der Verbrennung (0-24h) stark erhöhte ( $482 \pm 14$  pg/ml). Ein Maximum wurde nach 14 Tagen erreicht ( $1953 \pm 89$  pg/ml). Sobald die Wunden gedeckt waren, normalisierte sich VEGF. Das lokale und generalisierte Gewebeödem verhielt sich parallel dazu. Ein ständig erhöhter und sich nicht normalisierender VEGF-Serumspiegel ging mit dem Tod des Patienten einher (Reprint 3). Der VEGF-Serumspiegel von Verbrennungspatienten ist im Vergleich zu Polytraumapatienten um ein vielfaches erhöht (Reprint 2).

**Reprint 2:**

Strongly enhanced serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) after polytrauma and burn.

*Clin Chem Lab Med 1998; 36(6):379–383*

**Reprint 3:**

Vascular endothelial growth factor serum level is strongly enhanced after burn injury and correlated with local and general tissue edema.

*Burns 2004; 30: 305–311*

**2.3 Mit Hilfe einer „*Random positioning machine*“ (dreidimensionaler Klinostat) wurden humane Zellen unter simulierter Schwerelosigkeit untersucht (Reprint 4). VEGF wirkt beim Tissue Engineering in der simulierten Schwerelosigkeit antiapoptotisch, bildet zudem dreidimensionale und tubuläre Aggregate (Reprint 5) und beeinflusst die Extrazelluläre Matrix sowie Mediatoren wie Endothelin (Reprint 6). Des Weiteren wurde die Induktion von Apoptose via extrinsischer und intrinsischer Pathways untersucht (Reprint 7) sowie Veränderungen des Zytoskeletts (Reprint 8):**

#### **Zusammenfassung:**

Für die Simulation von Schwerelosigkeit ist die „*Random Positioning Machine*“ ein anerkanntes Modell der internationalen Gravitationsbiologie und wurde als so genannte „ground based facility“ etabliert (Reprint 4).

In den letzten 40 Jahren traten in der Raumfahrt bei Astronauten ernsthafte gesundheitliche Störungen auf, die durch kosmische Strahlung und Schwerelosigkeit hervorgerufen wurden. Neben dem Risiko der Osteoporose und der Muskelatrophie stehen kardiovaskuläre Probleme im Vordergrund. Die Schwerelosigkeit löst eine generalisierte Apoptose aus, insbesondere bei Endothelzellen, aber auch bei Schilddrüsenzellen. Endothelzellen spielen eine tragende Rolle in der Aufrechterhaltung des kardiovaskulären Systems. Sie steuern durch Veränderung lokaler Bedingungen den Blutdruck durch Modulation der glatten Muskelzellen, die Sauerstoffspannung und den Blutfluss. Die Endothelzellen sind zugleich Barriere in der transvaskulären Diffusion von Flüssigkeiten und Zellen und steuern die vaskuläre Permeabilität. Bei Verletzungen, Tumoren oder Infektionen induzieren sie eine Geweberegeneration, welche durch Zellproliferation, Migration und Remodeling zu neuen voll differenzierten Gefäßen führt. Wir untersuchten die Auswirkungen der Schwerelosigkeit auf humane Endothelzellen (EAhy 926 Zelllinie) mit einem 3-d Klinostaten. Diese „*Random Position Maschine*“ simuliert durch Rotation um zwei Achsen Schwerelosigkeit (0 g). In unseren Untersuchungen löste die simulierte Schwerelosigkeit nach 4 Stunden bei den EC eine vermehrte Expression von flk-1 und von extrazellulären Matrix-Proteinen aus (Kollagen Typ I, Fibronectin, Osteopontin und Laminin). Dieser Effekt steigerte sich nach weiteren 12 Stunden unter Schwerelosigkeit. Außerdem zeigten sich morphologische und biochemische Zeichen der

Apoptose nach 4 Stunden. Dieser Effekt verstärkte sich weiter bis nach 72 Stunden. Bei den Endothelzellen, welchen VEGF beigegeben wurde (10 ng/ml), zeigte sich keine Apoptose. Im Gegenteil, Caspase-3, Bax, Fas und 85-kD PARP Fragmente waren signifikant reduziert. Nach 72 Stunden bildeten die meisten Endothelzellen dreidimensionale Gewebeaggregate und tubuläre Strukturen mit einem Gefäßlumen.

Schwerelosigkeit induziert Apoptose von Endothelzellen und erhöht die Extrazellulären Matrixproteine. VEGF wirkt zytoprotektiv und unterstützt so die Bildung von dreidimensionalen Sphäroiden und tubulären Strukturen (Reprint 5).

Wir konnten gerade zeigen, dass bereits nach 10-minütiger Kultivierung der Zellen bei 0g mehrere Gene wie OPN, Fas, TGF $\beta$ <sub>1</sub> und Caspase-3 hochreguliert sind. Im Verlauf über einen Zeitraum von 10 Tagen nahm die Expression bis auf leicht erhöhte Werte ab oder stieg erneut am 4. Tag wieder an (Caspase-3). Es fand sich eine signifikant verminderte Reduktion von Endothelin-1 auf Genebene und auch die Sekretionsleistung nahm ab (Reprint 6). Diese Befunde könnten bei der orthostatischen Dysregulationsstörung nach Langzeitaufenthalt im Weltall eine Rolle spielen.

Wir haben anhand von Schilddrüsenzellen Mechanismen der Apoptose unter 0g-Bedingungen untersucht. Mitochondrien-reiche Schilddrüsen-Karzinomzellen (ONCO-DG 1) und normale Schilddrüsenzellen (HTU-5) zeigten nach 24 h bei 10% der Karzinomzellen Apoptosezeichen. Es fanden sich mitochondriale Alterationen und eine Aktivierung des Fas-Pathways. Es spielt sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Pathway der Apoptose unter simulierter Schwerelosigkeit eine Rolle (Reprint 7).

In einer weiteren Untersuchung erforschten wir das Zytoskelett und die Extrazelluläre Matrix bei papillären Schilddrüsen-Karzinomzellen. Es fanden sich bereits nach 30 min simulierter Schwerelosigkeit Hinweise auf Apoptose sowie ausgeprägte Zytoskelettveränderungen, die nach 48 h reversibel waren. Allerdings zeigte sich eine Vermehrung der Zytoskelettproteine. Parallel kam es zu einer deutlichen Vermehrung der EZM-Proteine und von TGF $\beta$ <sub>1</sub> (Reprint 8).

**Reprint 4:**

The use of the random positioning machine for the study of gravitational effects on signal transduction in mammalian cells

*Signal transduction 2006; 6: 388-396*

**Reprint 5:**

Induction of three-dimensional assembly and increase in apoptosis of human endothelial cells by simulated microgravity: impact of vascular endothelial growth factor.

*Apoptosis 2006; 11: 749–764*

**Reprint 6:**

Modeled gravitational unloading induced downregulation of endothelin-1 in human endothelial cells.

*Journal of Cellular Biochemistry 2007 (in press)*

**Reprint 7:**

Weightlessness induced apoptosis in normal thyroid cells and papillary thyroid carcinoma cells via extrinsic and intrinsic pathways

*Endocrinology 2003; 144: 4172-4179*

**Reprint 8:**

Simulated weightlessness changes the cytoskeleton and extracellular matrix proteins in  
papillary thyroid carcinoma cells

*Cell Tissue Res 2006; 324: 267-277*

## 2.4 Effekte von PTK787/ZK222584 auf das Wachstum von Schilddrüsenkarzinomen (Reprint 9):

Der Prozess der Neoangiogenese wird durch verschiedene Mediatoren induziert. VEGF spielt eine Schlüsselrolle in der Tumorangio-genese, welche auch Schilddrüsenkarzinome beinhaltet. Das Ziel dieser Studie war es, die Hypothese zu testen, dass die Inhibition der VEGF-Aktivität durch PTK787/ZK222584 (PTK/ZK), einem spezifischen Blocker beider VEGF-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, das Wachstum schlecht differenzierter Schilddrüsenkarzinome hemmen könne. Menschliche follikuläre Schilddrüsentumor-Xenotransplantate wurden *sc* in Nacktmäuse implantiert. Acht Tage nach der Implantation wurden die Tiere zufällig in zwei Gruppen eingeteilt (n=10 je Gruppe). Eine Gruppe erhielt PTK/ZK täglich, die andere wurde mit Natriumchlorid behandelt (Kontrolle). Die Behandlung wurde per os durchgeführt, wobei eine Magensonde verwendet wurde. Alle Tiere wurden nach vier Wochen getötet. Tumore, Blut und Proben anderer Organe wurden für weitere Untersuchungen entnommen. Die Behandlung mit PTK/ZK induzierte eine um 41,4% reduzierte TumorgroÙe. Im Vergleich zu den Kontrollen traten in den Tumoren der mit PTK/ZK-behandelten Mäusen früher Nekrosen auf. Immunhistochemisch zeigte sich eine deutlich reduzierte Neoangiogenese in den Tumoren der PTK/ZK-behandelten Tiere. Darüber hinaus konnte keine kompensatorische Überexpression des VEGF-Proteins in den behandelten Gruppen gefunden werden.

VEGF-Blockade durch PTK/ZK konnte also die Gefäßneubildung im Tumorgewebe hemmen.

Wir planen in Zukunft diesen Tierversuch durch ein *in vitro* Modell zu ersetzen. Es wird ein *in vitro* Angiogenese Test-System zur Vermeidung von Tierversuchen entwickelt. Dazu werden EC mit Schilddrüsen-Karzinomzellen *in vitro* unter simulierter Schwerelosigkeit kokultiviert. Die Kokulturen werden mit VEGF bis zu 4 Wochen auf einer RPM gemeinsam kultiviert, um ein artifiziell erzeugtes Tumorgewebe zu erhalten, an dem beispielsweise Substanzen wie PTK/ZK getestet werden können.

Diese zukünftigen Untersuchungen sollen neue Erkenntnisse zur Tumor-Angiogenese bringen und gleichzeitig zeigen, inwiefern das Nacktmausmodell durch künstliche dreidimensionale Zellaggregate ersetzt werden kann.

**Reprint 9:**

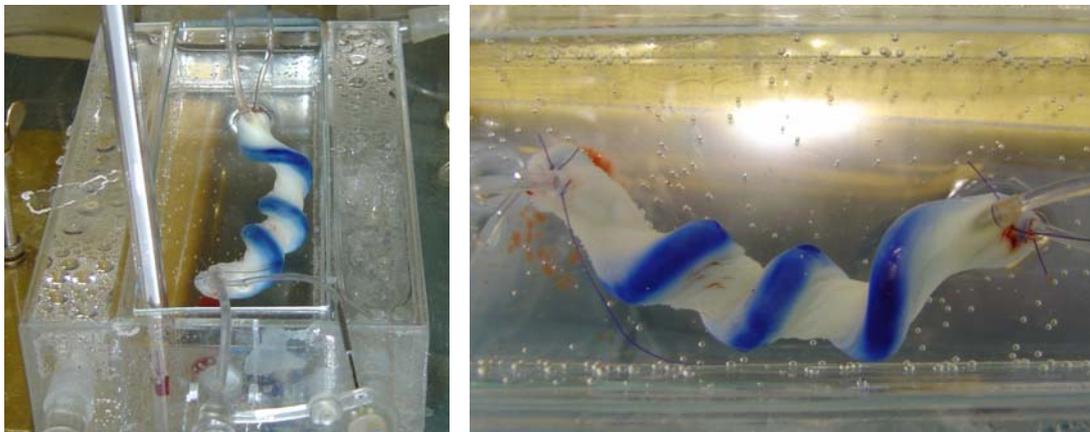
Effects of PTK787/ZK222584, a tyrosine kinase inhibitor, on the growth of a poorly differentiated thyroid carcinoma: an animal study

*Endocrinology* 2004, 145: 1031-1038

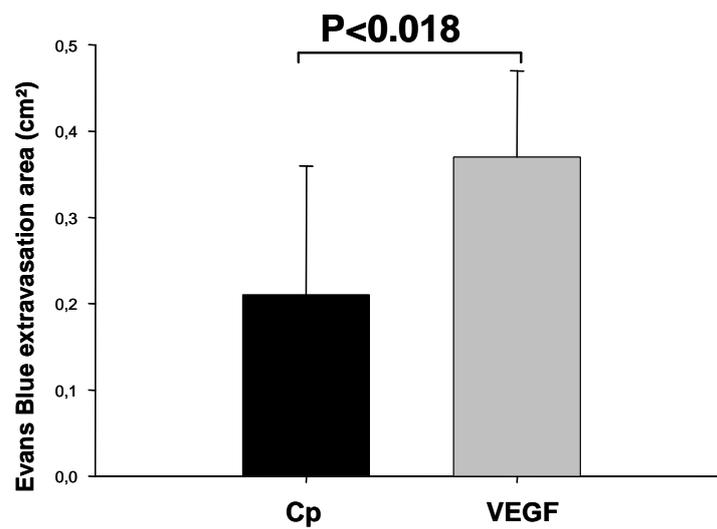
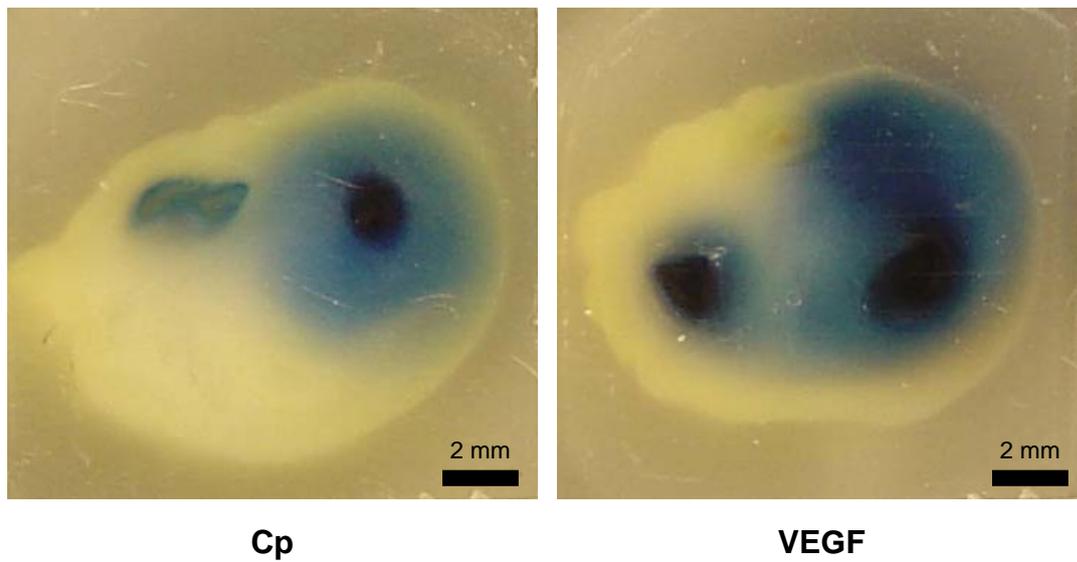
## 2.5 Etablierung eines humanen Nabelschnur-Perfusionsmodells

Die vaskuläre Permeabilität steigt unter pathologischen Bedingungen wie Verbrennungsverletzungen oder traumatischen Hirnverletzungen. Das Ergebnis ist ein lokales und generalisiertes Gewebeödem. Wir haben gezeigt, dass der VEGF-Serumspiegel in Patienten mit schwerwiegenden Brandverletzungen deutlich ansteigt. Um den Effekt von VEGF auf die Permeabilität und das Gewebeödem zu erforschen, haben wir eine neue *ex vivo* Perfusions-Apparatur entwickelt, welche Segmente von Nabelschnüren nutzt. Dieses Model ermöglicht das Studium unter normalen physiologischen Bedingungen. Das Model gestattet die permanente Aufzeichnung von Perfusionsdruck und -fluss.

Das Model kann den menschlichen physiologischen pH, pCO<sub>2</sub> und pO<sub>2</sub>, sowie Bicarbonat, Kalium, Kalzium und Natriumchlorid während der Einstellungszeit und der anschließenden Perfusionsperiode aufrechterhalten. Außerdem ist das Model charakterisiert durch einen konstanten Perfusionsdruck und -fluss für Langzeitexperimente. Wir haben hierdurch die Möglichkeit, vaskuläre biologische *ex vivo* Studien an menschlichen Gefäßen durchzuführen.



**Abb. 6:** Perfundierte Nabelschnur in Perfusionskammer (Publikation eingereicht).



**Abb. 7:** Evans Blue Färbung einer perfundierten Nabelschnur (oben: links die unbehandelte Kontrolle, rechts mit VEGF behandelt). Paper submitted 2007