

Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität
München
Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M.Schwaiger)

**Darstellung der Angiogenese und der Effekte einer antiangiogenetischen
Therapie mit Tc^{99m} markierter Erythrozyten**

Pamela Zengel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines

Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. W.A. Weber

2. Univ.-Prof. Dr. M. Sarbia

Die Dissertation wurde am 05.07.2004 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 17.11.2004 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	Seite 2-3
1.1.1	Hintergrund der Arbeit	Seite 2-3
1.1.2	Fragestellung	Seite 4
2.	Material und Methoden	Seite 5-15
2.1	Chemikalien und Medikamente	Seite 5
2.2	Geräte	Seite 6
2.3	Lösungen	Seite 6-7
2.3.1	Anästhesie	Seite 6
2.3.1.1	Ketavet-Rompum Narkotikum	Seite 6
2.3.2	Allgemein	Seite 6-7
2.3.2.1	Phosphatpuffer	Seite 6
2.3.2.2	Eritrotec	Seite 7
2.4	Radionuklide	Seite 7-8
2.4.1	Technetium ^{99m}	Seite 7-8
2.4.1.2	Mo ⁹⁹ /Tc ^{99m} -Generator	Seite 8
2.4.1.3	Technetium-Radiopharmaka	Seite 8
2.5	Tierexperimente	Seite 9-10
2.5.1	Versuchstiere und Haltung	Seite 9
2.5.2	Anästhesie und Tötung	Seite 9-10
2.5	Angiogenesemodell	Seite 10-11
2.5.1	Matrigel	Seite 10-11
2.7	Darstellung der Angiogenese	Seite 11-15
2.7.1	In-vivo-Gammakamera	Seite 11-12
2.7.2	Biodistribution	Seite 12
2.7.3	Zytologie und Histologie	Seite 12-14
2.7.3.1	Herstellung von Kryoschnitten	Seite 12-13
2.7.3.2	Immunhistochemie	Seite 13-14
2.7.3.3	Hämalaun Eosin Färbung	Seite 14
2.7.4	Haemoglobinbestimmung mittels Total Haemoglobin-Kit	Seite 14-15

2.7.5	Fotografien	Seite 15
3.	Ergebnisse	Seite 16-29
4.	Diskussion	Seite 30-41
5.	Zusammenfassung	Seite 42-43
6.	Literaturverzeichnis	Seite 44-62
7.	Anhang	Seite 63-67
8.	Abkürzungsverzeichnis	Seite 68
9.	Danksagung	Seite 69

1. Einleitung

1.1.1 Hintergrund der Arbeit

Die Tumorentstehung ist ein vielschichtiger und zum Teil lang andauernder Prozess. Genetische Veränderungen hervorgerufen durch ionisierende Strahlung, chemische Substanzen, genetische Prädisposition o.ä. inaktivieren Tumorsuppressorgene und mutieren Protoonkogene zu Onkogenen. Daraus resultiert eine Fehlregulation des Zellzyklus und des normalen Differenzierungsprogramms der Zellen, die zunächst zu unkontrollierter Teilung der betroffenen Zellen führt. Zur weiteren Ausbreitung eines malignen Tumors sind jedoch zusätzliche Veränderungen nötig. So können u.a. Mutationen in den Genen für Zelladhäsionsmoleküle dazu führen, dass der Primärtumor Tochtergeschwülste (Metastasen) in entfernten Organen bildet. Diese Metastasen bestimmen in vielen Fällen die Prognose der Patienten (Wollenberg et al., 1994).

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass auch der Primärtumor sein Umfeld in besonderer Weise verändern muss, um überleben zu können. Neben verschiedenen Mechanismen zum Unterlaufen einer Immunantwort gehört hierzu vor allem die Fähigkeit, sich durch neu aussprossende Blutgefäße zu versorgen (Folkman et al., 1990). Zu diesem Zweck produzieren Tumorzellen so genannte Wachstumsfaktoren, die das Gefäßwachstum stimulieren. Durch diese Stimulierung des Gefäßwachstums (Angiogenese) ist es einem Tumor erst möglich, eine Größe von mehr als wenigen Millimetern zu überschreiten. Ebenso ist eine ausreichende Versorgung mit Blutgefäßen in der Regel die Voraussetzung dafür, dass der Tumor über die Blutbahn metastasieren kann (Xerri et al., 1996).

Beim gesunden Erwachsenen ist dagegen Angiogenese ein eher seltenes Phänomen. Neben zyklusbedingten Veränderungen im Endometrium und Ovar kommt es nur im Rahmen der Wundheilung zur Angiogenese. Eine pathologisch gesteigerte Angiogenese wird neben Tumorerkrankungen im Rahmen von chronisch entzündlichen Prozessen und Gefäßveränderungen bei Diabetikern beobachtet (Martin et al., 2003).

Damit stellt die Hemmung der tumorzellinduzierten Angiogenese theoretisch einen gut geeigneten Angriffspunkt für eine rationale Tumorthherapie dar. Die typischen Nebenwirkungen von Zytostatika, die zum reproduktiven Zelltod aller sich teilender Zellen führen, sind nicht zu erwarten. Ein weiterer entscheidender Vorteil von Angiogeneseinhibitoren gegenüber konventioneller Chemotherapie ist, dass bei einer

Behandlung auch bei mehrfacher Wiederholung im Tierversuch keine Resistenzentwicklung zu beobachten war (Boehm et al., 1997). Ein möglicher Grund dafür ist, dass diese Stoffe auf die normalen, nicht erkrankten Endothelzellen des Körpers wirken und nicht auf die genetisch instabileren und zur Resistenzentwicklung neigenden Tumorzellen.

Für die klinische Anwendung von Angiogenese Inhibitoren besteht ein dringender Bedarf für Verfahren, die breit einsetzbar sind und den Effekt der Therapie auf die Tumervaskularisation darstellen.

1.1.2 Fragestellung

Die Idee dieser Arbeit ist es, eine möglichst kostengünstige und überall durchführbare Methode zur schnellen Überprüfung einer Antiangiogenesetherapie zu entwickeln. Die grundlegende Hypothese war, dass sich das intratumorale Blutvolumen verringert, wenn eine Antiangiogenesetherapie wirksam ist. Das Blutvolumen kann mit der Markierung der Erythrozyten mit Technetium ohne großen methodischen Aufwand bestimmt werden. Somit ermöglicht dieses Untersuchungsverfahren, die Antiangiogenesetherapie eines Krebspatienten schnell, kostengünstig, spezifisch und nicht-invasiv durchzuführen.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein einfaches Modell für die Beobachtung des Gefäßwachstums gewählt. Hierzu wurden Matrigel subcutan in Mäuse implantiert. Matrigel ist ein lösliches Basalmembranextrakt, in das Endothelzellen hineinwachsen können. Die bildliche Darstellbarkeit der im Matrigel induzierten Angiogenese wurde mit Hilfe von radioaktiv markierten Erythrozyten mit Gammakameraaufnahmen untersucht. Die gefundenen Ergebnisse wurden sowohl mit mikroskopischen Methoden, durch Anfärbung der Endothelzellen mit spezifisch gegen auf der Oberfläche der Endothelzellen befindende Antigene gerichteten Antikörpern (CD31), als auch durch Bestimmung des Hb-Gehaltes in den Gelen überprüft. Des Weiteren wurde die Darstellbarkeit des antiangiogenetischen Effekts eines Inhibitors des Enzyms Cyclooxygenase (COX) untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Medikamente

ABC-Reagenzien	Vector Laboratories/Camon, U.K.
Aceton	Merck, Darmstadt
AEC	Vector Laboratories/Camon, U.K.
Aqua dest	Milli QUF Plus membrana Pure Bodenheim
Augensalbe, Vidisic	Dr. Mann Pharma, Berlin
Bovine Fibroblast Growth Factor basic	R&D Systems Wiesbaden, Nordenstadt
Entellan, Eindeckmedium	Merck, Darmstadt
Eosin	Chroma- Gesellschaft, Köntgen/N.
Eritrotec	Nycomed Amershan Sorin Saluggia, Italia
Ether „Aether zur Narkose“	Chinosol, Seelze
Formalin, 4% (Stammlösung 37%)	Merck, Darmstadt
Glyceringelantine, Kaisers	Merck, Darmstadt
Growth Factor Reduced Matrigel	BD, Bedlord, MA
Hämalaun, Mayers	Hausapotheke rechts der Isar, München
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Heparin	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen
Kältespray (Tetrafluorethan)	neoLab Migge, Heidelberg
Matrigel-Matrix	BD, Bedlord, MA
Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl- Lösung, 0,9%	Delta-Pharma, Pfullingen
NS 398	Product Data Biomol Plymouth, USA
“Silan” 3-(Triethoxysilyl)-propylamin	Merck, Darmstadt
Tissue-Tek O.C.T.Compound	Sakura Finotek, Niederlande
Total Hemoglobin reagents	Sigma Diagnostics, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt

2.2 Geräte

Aktivimeter CRC 15R	CAPINTEC
Analysenwaage Sartorius, Typ LA 230S-OCE	Sartorius, Göttingen
Biofuge 22R	Heraeus Sepatech, Osterode
Fotofilme Elite Chrome 100	Kodak, USA
Fotokamera Minolta X 300s	Schorndorf, Germany
Gammacounter TYP 1480 Wizard TM 3	Wallac, Finnland
Gammakamera Vertex	ADAC/Philips, Niederlande
Kryostat Microm, Typ HM 500	Microm, Walldorf
KS-50-ID-Rüttler	Jahnke & Kunkel IKA Labortechnik
Laminar-Flow-Arbeitsbank	Heraeus Sepatech, Osterode
Mäusewaage, Laboratory LC 1200S	Sartorius, Göttingen
Mikro Dismembrator II	Braun, Melsungen
Mikroskop Axiovert 10	Zeiss West Germany
Okulare Achrostigmat 10x0,3/20x0,5/32x04	Zeiss West Germany
Photometer Uvikon 931	Kontron Instruments

2.3 Lösungen

2.3.1 Anästhesie

Ketavet-Rompun Narkotikum

82% physiologische NaCl-Lösung, 0,9%

10% Ketavet (100 mg/ml Ketaminhydrochlorid)

8% Rompun (2% Xylazinhydrochlorid)

2.3.2 Allgemein

2.3.2.1 Phosphatpuffer (PBS)

NaCl (8g/l); KCl (0,2g/l); KH_2PO_4 (0,2g/l); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (2,85g/l); pH = 7,2

2.3.2.2 Eritrotec

Eritrotec wird zur Markierung von Roten-Blutkörperchen mit Tc^{99m} verwendet. Die physiologische Halbwertszeit von Tc^{99m} -markierten Erythrozyten beträgt ungefähr 4,5 h.

Zusammensetzung:

DTPA	24,0 mg
SnCl x 2H ₂ O	3,6 mg
Natriumacetat	22,0 mg
Natriumchlorid	9,0 mg

Das Eritrotecpulver wird im Kühlschrank bei ca. 4 °C aufbewahrt. Kurz vor der Injektion wird es aus dem Kühlschrank genommen und mit 5 ml NaCl 0,9% aufgelöst. Nach 20 min Wartezeit werden 4 µl des Gemisches mit 996 µl NaCl 0,9% verdünnt und 100 µl aus dieser Verdünnung werden der Maus i.v. injiziert.

2.4 Radionuklide

2.4.1 Technetium ^{99m}

Technetium ^{99m} ist ein metastabiles, unter Emission von Gammastrahlung einer Energie von 140 KeV in den Grundzustand (Technetium-⁹⁹) übergehendes Isotop des Technetiums. Es entsteht durch radioaktiven Zerfall des Mutternuklids Molybdän ⁹⁹ und besitzt eine physikalische Halbwertszeit von 6 Stunden und wird mit für die Gammakamera besonders geeignetem Energiespektrum nachgewiesen.

Bei vielen in der klinischen Routine eingesetzten Isotopen handelt es sich um Zyklotron- bzw. um Reaktorprodukte, die für die jeweiligen Untersuchungen kommerziell erworben werden müssen. Deshalb müssen diese Untersuchungen im Vorfeld organisiert werden. Der Mo^{99}/Tc^{99m} -Generator ist so kompakt, dass in den einzelnen nuklearmedizinischen Abteilungen vor Ort die Tc^{99m} -Produktion erfolgen kann. Auf Grund der höheren Flexibilität etwa bei Notfalluntersuchungen, der geringeren Strahlenexposition und der niedrigeren Kosten wurden die übrigen Isotope in der Routine durch Tc^{99m} -markierte Radiopharmaka in vielen Fällen verdrängt. Somit ist es nachvollziehbar, dass Tc^{99m} -Technetium das am meisten

verwendete Isotop in der nuklearmedizinischen Diagnostik darstellt. Es vereint in sich die Vorteile einer guten Verfügbarkeit (Generator vor Ort), bei gleichzeitig geringen Kosten. Sowie eine für die Gammakamera bestmögliche Bildqualität, aufgrund des Energieniveaus von $\gamma = 140 \text{ keV}$. Zusätzlich weist es eine kurze physikalische Halbwertszeit von 6 h auf, welches eine geringe Strahlenexposition für den Patienten bedeutet.

2.4.1.2 $\text{Mo}^{99}/\text{Tc}^{99\text{m}}$ -Generator

Im $\text{Mo}^{99}/\text{Tc}^{99\text{m}}$ -Generator ist das Mo^{99} auf einer Aluminiumsäule fixiert. Das durch den $\text{Mo}^{99} > \text{Tc}^{99\text{m}}$ -Zerfall entstandene Pertechnetat ($\text{Tc}^{99\text{m}}\text{O}_4^-$) wird nicht an der Aluminiummatrix gebunden und kann mit physiologischer Kochsalzlösung eluiert werden. Nach einer Regenerationsphase von 24 h, in der aus dem verbliebenen Mo^{99} erneut $\text{Tc}^{99\text{m}}$ entsteht, kann der Vorgang wiederholt werden. Limitiert durch die HWZ des Mo^{99} hat der $\text{Mo}^{99}/\text{Tc}^{99\text{m}}$ -Generator eine Gebrauchsdauer von ein bis zwei Wochen.

2.4.2.3 Technetium-Radiopharmaka

Das vom Generator eluierte Pertechnetat ($\text{Tc}^{99\text{m}}\text{O}_4^-$) kann direkt für die Schilddrüsenszintigraphie und für weniger häufig durchgeführte Untersuchungen verwendet werden. Für alle anderen Untersuchungen muss das $\text{Tc}^{99\text{m}}$ an entsprechende chemische Substanzen (Liganden) gekoppelt werden. Der Komplex aus $\text{Tc}^{99\text{m}} + \text{Ligand}$ bestimmt das jeweilige biokinetische Verhalten im Organismus. Die Herstellung solcher $\text{Tc}^{99\text{m}}$ -Radiopharmaka erfolgt in den nuklearmedizinischen Kliniken oder Praxen mit Hilfe kommerziell verfügbarer Markierungsbestecke (Technetium-Kits). Hierbei handelt es sich um fertige Reagenziensätze (lyophilisierter Ligand, Zinn-(II)-Salze als Reduktionsmittel, Stickstoff als Schutzgas), in denen die Komplexbildung von $\text{Tc}^{99\text{m}}$ (Generatoreluat) mit dem jeweiligem Liganden abläuft. $\text{Tc}^{99\text{m}}$ -Radiopharmaka stehen in einer nuklearmedizinischen Abteilung auch kurzfristig, z.B. für Notfalluntersuchungen zur Verfügung.

2.5 Tierexperimente

2.5.1 Versuchstiere und Haltung

Zur Durchführung von Tierversuchen muss deren Unerlässlichkeit am Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse nachgewiesen sein (TierSchG, 1998). Die vorliegende Studie erfolgt vor dem Hintergrund der bis dato unbefriedigenden Therapieergebnissen metastasierender Krebsleiden. Zum anderen erfolgt die Evaluierung der Behandlungserfolge von Chemotherapien häufig erst nach wochen- oder monatelanger nebenwirkungsreicher Therapieschemata. Diese häufig sehr teuren Untersuchungsverfahren sind zudem nicht in allen Kliniken durchführbar, da die dafür nötigen Gerätschaften fehlen. Die Antiangiogenesetherapien eröffnen einen vielversprechenden Ansatz für die Behandlung von Neoplasien. Diese Therapie verspricht nebenwirkungsarm zu sein. Diese Versuche wurden durchgeführt, um die einfache und kostengünstige Art der Darstellung dieser neuen Krebstherapie zu belegen. Pathologische Prozesse im Wirbelorganismus führen zu komplexen Reaktionen, die in in-vitro- und Computer-Modellen nur fragmentarisch nachgeahmt werden können. Um die Versuchstierzahlen möglichst klein zu halten, müssen in der Versuchsplanung aktuelle Erkenntnisse aus in-vitro-Studien und aus ähnlich konzipierten Tierversuchen berücksichtigt werden.

Weibliche balb cJ und weibliche C57BC/6 Mäuse, im Alter von 4-8 Wochen, wurden aus spezifiziert pathogenfreier Zucht (Charles River) bezogen und in Käfigen zu je 4-5 Tieren in einem Tierstall bei 26 °C und 50-60% Luftfeuchtigkeit gehalten und mit Mäusestandardfutter Altromin 1314 und Leitungswasser ad libitum versorgt. Die Einstellung der Tiere erfolgte mindestens 2 Wochen vor Versuchsbeginn.

2.5.2 Anästhesie und Tötung

Zur Anästhesie wurden den Tieren 100 µl der Rompun-Ketamin-Lösung intraperitoneal injiziert. Die Augensalbe Vidisic wurde während des Fehlens des Lidschlussreflexes auf der Kornea verteilt. Zur i.v.-Injektion des Eritrotecs bzw. des Tc^{99m}-Erythrozyten-Gemisches genügte eine Kurznarkose mit Aether.

2.6 Angiogenese Modell

2.6.1 Matrigel

Matrigel-Matrix ist ein Basalmembranextrakt, das bei Raumtemperatur gelartig, bei 4 °C flüssig ist. Es setzt sich aus Laminin, Kollagen Typ 4, Entaktin, Heparan-Sulfat-Proteoglykan, Wachstumsfaktoren und Plasminogenaktivatoren zusammen. Das Matrigel wurde bei –20 °C aufbewahrt. Am Morgen des Vorversuchstages wurde das Gel auf 4 °C gekühlt und mit den jeweiligen Reagenzien gemischt (entweder 5 µl bFGF in 500 µl Matrigel oder kein Wachstumsfaktor und somit 500µl Gel). Danach wurde das Gel über Nacht im Kühlraum auf einen Rüttler (permanent 100 Umdrehungen pro min) homogen vermischt. Je 500 µl des Gels wurden am nächsten Morgen in Injektionskanülen aufgezogen und jeweils subkutan in die Schulterregion der Mäuse injiziert. Nach 5, 10 und 15 Tagen wurden die Gele entnommen und die Gefäßneubildung untersucht. Diese Experimente wurden mit unbehandeltem und Wachstumsfaktor reduziertem Matrigel durchgeführt. In den folgenden Versuchsreihen wurde zusätzlich eine Antiangiogenesetherapie verabreicht, sodass nun entweder nur bFGF 5 µl oder zusätzlich noch 200 µl NS 398 pro 500 µl Matrigel injiziert wurde. Diesmal wurde das Gel jeweils links und rechts subkutan in die Schulterregion der Mäuse eingebracht. Der Ablauf blieb sonst unverändert.

Zusammensetzung:

Parameter	unbehandeltes Gel	wachstumsfaktorreduziertes Gel
bFGF (pg/ml)	0-0,1	0-0,1
EGF (ng/ml)	0,5-1,3	≤ 0,5
IGF (ng/ml)	15,6	5
PDGF (pg/ml)	12	≤ 5
NGF (ng/ml)	≤ 0,2	≤ 0,2
TGF-beta (ng/ml)	2,3	1,7
% Protein des Gels	80	83

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Matrigele

2.7 Darstellungen der Angiogenese

2.7.1 In-vivo-Gammakamera

Unmittelbar vor der i.v.-Injektion des Eritrotec (Vorbereitung siehe oben) in eine der beiden lateralen Schwanzvenen der Maus wurde der Schwanz in 45 °C warmes Wasser getaucht und anschließend abgetrocknet. Die so dilatierte Vene wurde mittels 27G-Kanüle punktiert, und 100 µl der Erytrotec Lösung injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurde die Maus getötet und das Blut aus der Maus mittels einer heparinbenetzten Kanüle gewonnen. Das Blut wurde bei 1400 Umdrehungen 10 min zentrifugiert und danach das Serum abpipettiert und verworfen. Nun konnten die, mit Eritrotec markierten, Erythrozyten mit Tc^{99m} 500 Mbq versehen werden. Diese Mischung wurde durch Schwenken homogenisiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Radioaktivität gemessen. Dieser Wert war immer deutlich unter 10% der injizierten Dosis. Den markierten Erythrozyten wurde 0,5 ml NaCl 0,9% zugesetzt und dieses Gemisch auf Injektionsspritzen, eine pro Maus, zu möglichst gleicher Aktivität verteilt. Diese Aktivität und die eines Standards wurden gemessen und notiert. Jeder Maus wurden nun die markierten Erythrozyten i.v.-injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurden Aufnahmen der Mäuse in Bauchlage- ventro-dorsal bei 140 keV von der Gammakamera gemacht (siehe Abbildung 12 im Anhang).

Die *region of interest* (ROI) wurde auf den Ort der Matrigel festgelegt und die mittlere Zahl der innerhalb der ROI registrierten Impulse gemessen.

Die Aufnahmedauer betrug 20 min. Es wurde eine Bildmatrix von 256 x 256 Punkte bei einem Gesichtsfeld von 25,4 x 25,4 cm² verwendet. Die Mäuse waren während der Messung mittels Rompun/Ketamin narkotisiert. In späteren Versuchen wurden zusätzlich Aufnahmen der entnommenen Gele angefertigt (siehe Abbildung 13 im Anhang).

2.7.2 Biodistribution

Die Biodistribution, d.h. die Verteilung der Tc^{99m}-markierten Erythrozyten in den Geweben der Versuchstiere, wurde nach der Gammakameraaufnahme durchgeführt. Die Tiere wurden getötet und möglichst rasch Matrigel, Muskel und Blut entnommen. Teile des Blutes wurden zentrifugiert und so Serum gewonnen. Matrigel, Muskel, Blut und Serum wurden in γ -Proberöhrchen überführt, deren Taragewicht vorher bestimmt worden war. Um Masseveränderungen aufgrund von Feuchtigkeitsverlust zuvorzukommen, wurde das Gewicht sämtlicher Gewebe sowie von Blut und Serum unverzüglich nach Entnahme mit einer Analysenwaage (Einteilung=0,0001g; Messfehler=0,0002g) bestimmt. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in einem Gammacounter (Wallac). Dazu wurden in den Organproben mit Tc^{99m} 1 min lang die Zählraten bestimmt und in *counts per minute* (cpm) angegeben. Zur Auswertung wurden nur solche Zählraten herangezogen, die innerhalb des linearen Messbereichs des γ -Counters (1.000--1.000.000 cpm) lagen. Die cpm-Werte der Proben wurden auf Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe normiert (% ID/g). Der 1 %-Referenz-Wert wurde wie folgt bestimmt: Die pro Tier injizierte Aktivität wurde ad 100 ml in PBS verdünnt und je 1 ml davon im γ -Counter gemessen (5-fach Bestimmung).

2.7.3 Zytologie und Histologie

2.7.3.1 Herstellung von Kryostat-Gewebeschnitten

Die bei -70 °C gelagerten Matrigel wurden geteilt und auf den Objektträger des Kryostaten (Microm, Typ HN 500) mittels O.C.T. Compound (Tissue Tek) aufgefroren und bei -18 °C Schnitte von 5 μ m angefertigt. Mit gereinigten und silanisierten Objektträgern wurden die Gefrierschnitte aufgenommen und bei -70 °C gelagert oder sofort weiterbearbeitet.

2.7.3.2 Immunhistochemie

Mittels immunhistochemischem Verfahren sollte die Endothelzellichte (CD31-positive Zellen) der Matrigel dargestellt werden. Die ABC-Methode beruht auf der Bildung eines irreversiblen Bindungskomplex zwischen Biotin und Avidin (Hsu et al., 1981). Zu diesem Zweck wird ein biotinylierter, gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichteter Sekundärantikörper verwendet, an welchen, bei der Detektion spezifisch gebundenen Primärantikörpers ein makromolekularer Komplex aus Avidin und einer biotinylierten Peroxidase bindet. Die spezifische Farbreaktion beruht hierbei auf der Reaktion der Peroxidase mit dem Substrat Chromogen Aminoethylcarbazol (AEC), welches in der Färbelösung enthalten ist. Um die Morphologie besser beurteilen zu können wurde eine Kerngegenfärbung mit Hämalaun angewendet, die die Kerne blau darstellt. Biotinylierter Anti-Ratte-IgG wurde als Sekundärantikörper eingesetzt. Er war im Vectastain-Elite-ABC-Kit (Vektor Laboratories, Burlingame, USA) enthalten. Als chromogenes Substrat wurde 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC-Farbsubstrat, Vector Laboratories, U.K.) verwendet. Da die Herstellerangaben nicht zum erwünschten Erfolg führten, wurde ein eigenes Protokoll erstellt. Die Färbeprozedur wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

Protokoll:

Primärantikörper: CD31 (BD PharMingen) Ratte-Anti-Maus-AK

Rat IgG^{2a,k} (BD PharMingen) als Kontrolle

Sekundärantikörper: Biotinilierter Anti-Ratten-AK aus Vectastatin Elite ABC-Kit

Reagenzien: H₂O₂-Gemisch: 50 µl 30 % H₂O₂+ 450 µl A.d.+2000 µl Methanol

Durchführung:

Die Kryoschnitte wurden getrocknet und danach für 10 min bei – 20 °C in Aceton fixiert.

Hierauf folgte eine dreimalige Spülung mit PBS.

Nun wurden die Schnitte für 20 min mit dem Blockingserum benetzt und wiederum 3x mit PBS gespült. Dann wurde für 1h mit dem Primärantikörper, in einer Verdünnung von 1:100, inkubiert. Wiederum wurde mit PBS dreimal gespült und danach die Schnitte 30 min mit dem Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:6000 zusammengebracht. Hierauf folgte eine Spülung mit 3x PBS. Nun wurde die endogene Peroxidase (H₂O₂) blockiert. Nach der dreimaligen Spülung mit PBS folgte die 30 min Behandlung mit dem ABC-Reagenz. Hierauf wurde nach der erneuten PBS-Spülung mit AEC für 15 min inkubiert. Nun wurde mit A.d.

gespült. Die Schnitte wurden dann 2 min in Hämatoxylin getaucht und danach über 5 min in Leitungswasser gebläut. Nachdem die Schnitte getrocknet waren, wurden sie mit Glyceringelantine eingedeckt.

2.7.3.3 Hämalaun/Eosin-Färbung

Zum Vergleich wurde eine Standardfärbung durchgeführt.

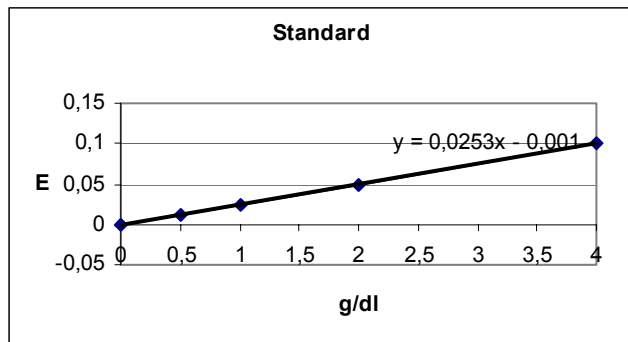
Durchführung:

Die Schnitte wurden getrocknet, 10 min in Formalin fixiert und mit A.d. gespült. Hierauf folgte die 5 minütige Färbung mit Hämalaun (nach Mayer). Nun wurden die Schnitte in Leitungswasser gespült und für 10 min gebläut. Nach der Spülung mit A.d. wurden die Schnitte für 30 sek. in Eosin wässrig (1%) getaucht und wiederum mit A.d. gespült. Nachdem die Schnitte getrocknet waren wurden sie mit Glyceringelantine eingedeckt.

2.7.4 Haemoglobinbestimmung mittels Total-Haemoglobin-Kit

Zur quantitativen Haemoglobinbestimmung wurde die Oxidation des Haemoglobins zu Methaemoglobin in Anwesenheit von alkalischem Kalium-Eisenzyanid angewandt (Sigma). Methaemoglobin reagiert mit Kaliumzyanid zu Zyanmethaemoglobin. Dieses Reaktionsprodukt kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm nachgewiesen werden und ist proportional zur Haemoglobinkonzentration. Anhand einer Kalibrierungskurve, die man von einer Zyanmethaemoglobin-Standardlösung erstellt, kann man direkt auf den Haemoglobingehalt einer Lösung schließen.

Die Hälfte der bei -70 °C gefrorenen Matrigel wurde mit dem Skalpell in kleine Stücke zerkleinert. Nun wurde 1000 μl PBS hinzugefügt und das Gewebe 5 min im Mikro-Dismembrator so fein zerkleinert, dass eine homogene Flüssigkeit entstand. 200 μl dieser Flüssigkeit wurden mit 2000 μl Drabkin Solution (Sigma Diagnostics) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann wurde von 1000 μl dieses Gemisches bei 540 nm im Photometer (Uvikon 931 Kontron Instruments) die Extinktion gemessen. Anhand der Extinktion wurde auf den Gehalt des Haemoglobins geschlossen.



Kalibrierungskurve

Haemoglobingehalt	Zyanmethaemoglobin	Drabkinsolution
4 g/dl	664 µl	2336 µl
3 g/dl	500 µl	2500 µl
2 g/dl	332 µl	2668 µl
1,5 g/dl	250 µl	2750 µl
1 g/dl	160 µl	2834 µl
10,5 g/dl	84 µl	2916 µl

Diagramm 1: Kalibrierungskurve, die mit einer Zyanmethaemoglobin Standardlösung erstellt wurde, sodass man direkt auf den Haemoglobingehalt einer Lösung schließen kann

2.7.5 Fotografien

Von den angefertigten immunhistochemischen Präparaten wurden jeweils von den Positiv- und Negativkontrollen und von den HE-Schnitten Fotos unter dem Mikroskop (Axiovert 10, Zeiss West Germany) in verschiedenen Vergrößerungen (10-, 20-, 32-fach) angefertigt.

3. Ergebnisse

3.1 Zeitlicher Verlauf der Gefäßeinsprossung in die Matrigele

Zuerst wurde der günstigste Zeitpunkt des Versuchstages herausgefunden. Jeweils drei weiblichen alb cJ Mäusen im Alter von 4-6 Wochen wurden 500 µl nicht vorbehandeltes Matrigel, drei anderen Mäusen Matrigel mit bFGF (5 µl pro 500 µl Matrigel) injiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Mauserythrozyten mit Tc^{99m} markiert und eine Gammakameraaufnahme der Maus durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die Mäuse getötet, und Blut, Serum, Muskel und Gel gewonnen. Daraufhin wurde die pro Gramm Gewebe aufgenommene Aktivitätsmenge als Prozentsatz der eingesetzten Aktivität bestimmt (% ID/g). Außerdem wurden Gefrierschnitte der entnommenen Gele angefertigt und die Endothelzellen mit spezifischem CD31 Antikörper gefärbt, um die Gefäßdichte zu beurteilen.

Fünf Tage nach der Matrigel Implantation zeigte sich die folgende Aktivitätsaufnahme in den Matrigelen:

Tier-Nr	Blut	Muskel	Serum	Matrigel	Matrigel+bFGF
1	58,29	0,6	1,92	0,47	
2	57,7	0,65	2,52	0,71	
3	64,98	0,62	2,07		0,54
4	53,42	0,61	1,58		0,68
5	63,49	0,6	1,95		0,73
Mittelwert	59,57	0,69	2,01	0,59	0,65
Standardabweichung	4,68	0,02	0,33	0,17	0,09

Tabelle 2: Ergebnisse der Organe mit Mittelwert und Standardabweichung

(in % ID/g, n= 5, da bei einer Maus die Injektion der markierten Erythrozyten misslang)

Repräsentative Schnitte der CD31 Färbungen der Matrigele sind in der Abbildung 1 und 2 im Anhang aufgeführt.

Die niedrige Aktivitätskonzentration im Serum (2,01% ID/g) zeigt, dass die Markierung am Untersuchungszeitpunkt stabil war. Auch die Aktivitätskonzentration im Vollblut von etwa 50% ID/g ist gut mit dem Blutvolumen der Maus von etwa 2 ml vereinbar. Man sah noch keinen signifikanten Unterschied zwischen Matrigel (0,59% ID/g) und mit Wachstumsfaktor

versetztem Matrigel (0,65% ID/g, siehe Tabelle 2). Auch in den immunhistologischen Präparaten zeigte sich eine vergleichbare Gefäßdichte.

Am Tag 10 nach Matrigelimplantation zeigte sich eine deutliche Zunahme der Traceraufnahme im Matrigel. Sie betrug im Matrigel ohne bFGF 2,4% ID/g und mit bFGF 2,9% ID/g. Auch die Immunhistochemie bestätigte eine deutliche Zunahme der Gefäßdichte (Abbildungen 3-4 im Anhang). Die Aktivitätsaufnahme der übrigen untersuchten Gewebeproben ist in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tier-Nr.	Blut	Muskel	Serum	Matrigel	Matrigel+bFGF
1	53,42	0,72	2,56	2,56	
2	50,38	0,63	4,31	2,39	
3	52,81	0,61	3,07	2,38	
4	57,65	0,64	4,00		3,12
5	57,75	0,81	2,58		2,65
6	56,06	0,75	2,73		3,09
Mittelwert	54,67	0,69	3,20	2,44	2,95
Standardabweichung	2,950	0,07	0,76	0,97	0,26

Tabelle 3: Ergebnisse der Organe am Tag 10 mit Mittelwert und Standardabweichung (in % ID/g, n=6)

Am Tag 15 fand sich keine weitere Zunahme der Aktivitätsaufnahme im Matrigel. Es bestanden auch weiterhin keine deutlichen Unterschiede zwischen bFGF behandelten und unbehandelten Matrigelen (siehe Tabelle 4). Auch die Immunhistochemie bestätigte keine weitere Zunahme der Gefäßdichte und zeigte keine deutlichen Unterschiede der Blutgefäßmenge zwischen den verschiedenen Matrigelgruppen (Abbildungen 6-7 im Anhang).

Tier-Nr.	Blut	Muskel	Serum	Matrigel	Matrigel+bFGF
1	65,25	0,68	3,37	2,50	
2	62,35	0,51	2,44	2,21	
3	58,34	0,62	2,30	2,39	
5	61,32	0,75	3,71		3,05
6	54,05	0,66	3,38		2,80
Mittelwert	60,26	0,64	3,04	2,36	2,92
Standardabweichung	4,26	0,09	0,62	0,14	0,18

Tabelle 4: Ergebnisse der Organe am Tag 15 mit Mittelwert und Standardabweichung (in % ID/g, n=5, bei einem Tier missglückte die Injektion der markierten Erythrozyten)

Der zeitliche Verlauf der Aktivitätsaufnahme in den Geweben ist in Diagramm 2 und 3 dargestellt.

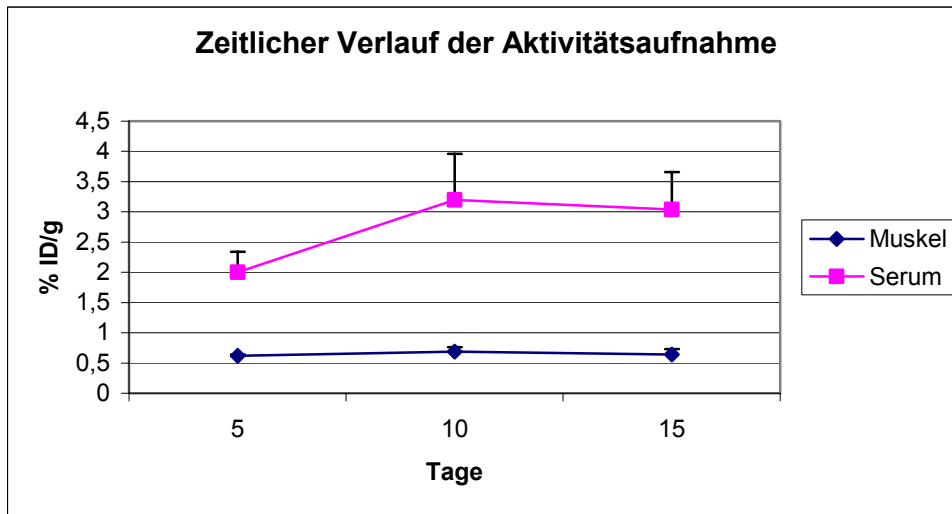


Diagramm 2: Zeitlicher Verlauf der Aktivitätsaufnahme von Muskel und Serum

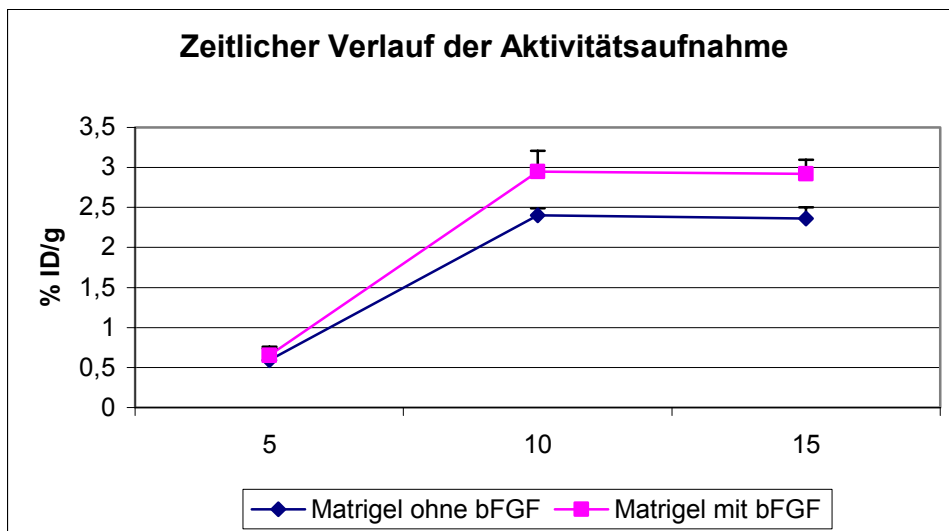


Diagramm 3: Zeitlicher Verlauf der Aktivitätsaufnahme der Matrigele

Um Unterschiede zwischen dem mit bFGF behandelten und unbehandelten Matrigel besser herauszuarbeiten, wurde in der nächsten Versuchsreihe wachstumsfaktorreduziertes Matrigel verwendet. Ferner wurden die nächsten Versuche nicht wie zuvor mit balb cJ Mäusen, sondern mit C57B16/J Mäusen durchgeführt, da bei diesem Mausstamm in anderen Experimenten eine ausgeprägtere Angiogenese als in balb cJ Mäusen beobachtet werden konnte. Weiter wurden für diese Experimente diesmal Mäuse im Alter von 6-8 Wochen verwendet, da diese ein stärkeres Gefäßwachstum als jüngere Tiere aufweisen (Passaniti et al.,

1992). Das Matrigel wurde analog zu den Vorversuchen bereitet – diesmal wurde jedoch das wachstumsfaktordepletierte Gel benutzt. Jeder Maus wurden in dieser Versuchsreihe zwei Gele, zum einen das wachstumsfaktordepletierte Gel alleine, zum anderen in Kombination mit bFGF, jeweils rechts und links in die Schulterregion verabreicht. Am Tag 10 wurden die Mauserythrozyten mit Eritrotec und Tc^{99m} markiert und es wurde eine Gammakameraaufnahme der Maus und eine Biodistribution durchgeführt. Ferner wurde diesmal noch eine Gammakameraaufnahme der entnommenen Gele vorgenommen, da in der Ganzkörperaufnahme der Maus das Gel im Vergleich zum Herz oder zur Lunge zu wenig Blut und somit zu wenig Intensität besaß, um eine ROI festzulegen. Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurde eine Hb-Bestimmung der Gele unternommen und Matrigelgefrierschnitte mit spezifischen CD31 Antikörpern, mittels Immunhistologie, angefärbt. Des Weiteren wurde ein Vergleich der jeweiligen Einzelergebnisse des Gammacounters, der Gammakamera und der Hb-Werte gezogen und der Korrelationskoeffizient berechnet.

Tier-Nr.	Blut	Muskel	Serum	Matrigel	Matrigel+bFGF
1	56,31	0,60	6,24	1,20	3,61
2	53,30	0,73	6,07	1,85	4,39
3	60,83	0,95	6,90	1,59	3,47
5	60,09	0,74	5,57	2,16	3,82
6	59,37	0,59	6,6	1,93	5,04
Mittelwert	57,980	0,722	6,270	1,740	4,060
Standardabweichung	3,120	0,146	0,510	0,360	0,640

Tabelle 5: Ergebnisse der Organe mit Mittelwert und Standardabweichung im Gammacounter gemessen (in % der injizierten Dosis pro Gramm, n=5, bei einer Maus missglückte die Injektion der markierten Erythrozyten)

	Gel	Gel+bFGF
Mittelwert	9,828	23,278
Standardabweichung	4,921	6,272

Tabelle 6: Mittelwert und Standardabweichung der Gele unter der Gammakamera gemessen (in Counts)

	Matrigel	Matrigel+bFGF
Mittelwert	0,044	0,286
Standardabweichung	0,021	0,062

Tabelle 7: Mittelwert und Standardabweichung der Hb-Werte (in g/dl)

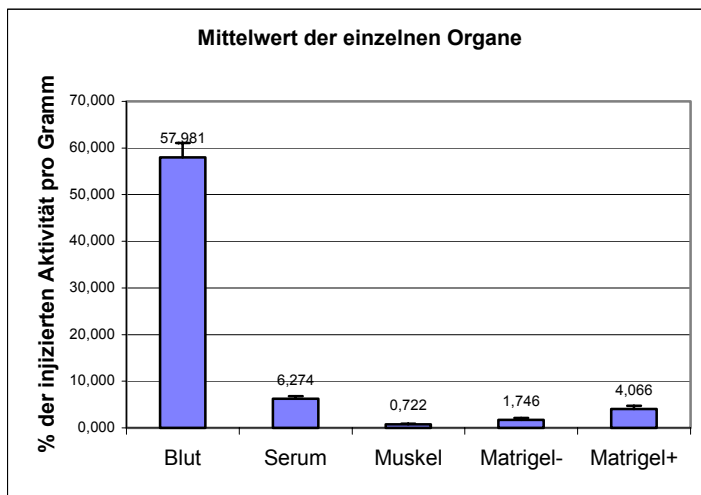


Diagramm 4:

Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Organe im Gammacounter gemessen

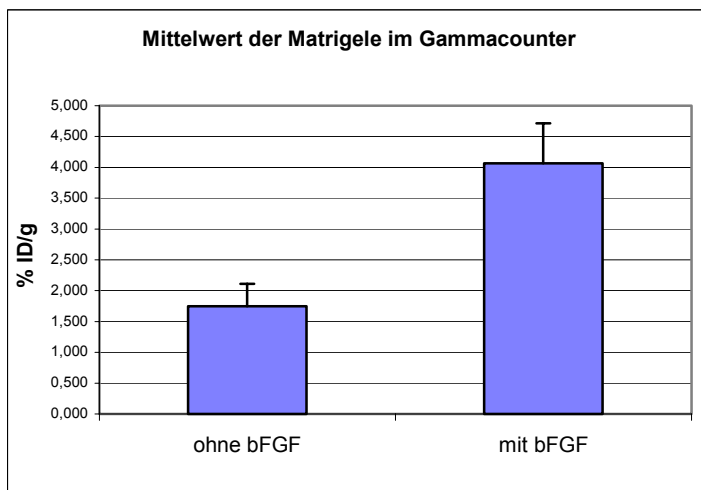


Diagramm 5:

Mittelwert und Standardabweichung der Matrigele im Gammacounter gemessen

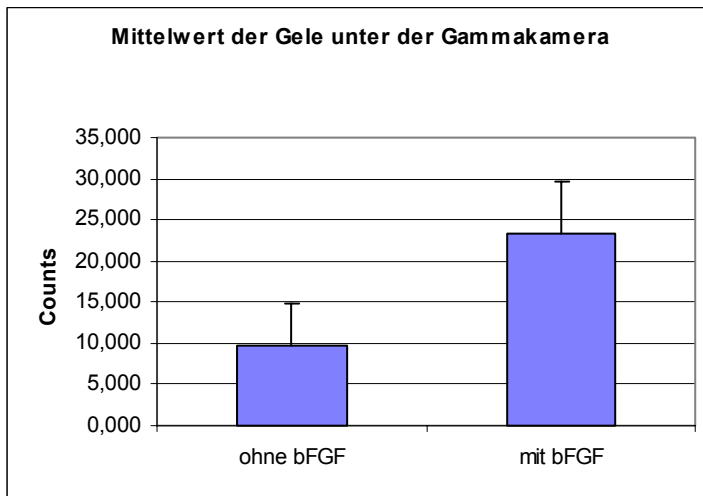


Diagramm 6:

Mittelwert und Standardabweichung der entnommenen Gele unter der Kamera gemessen

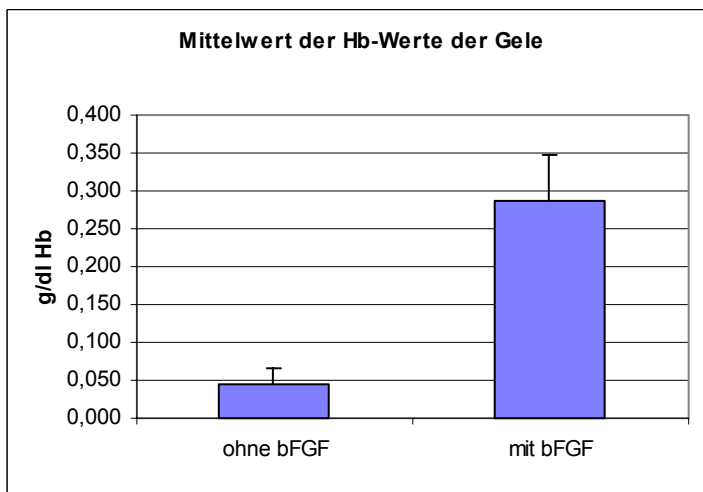


Diagramm 7:

Mittelwert und Standardabweichung der Hb-Werte

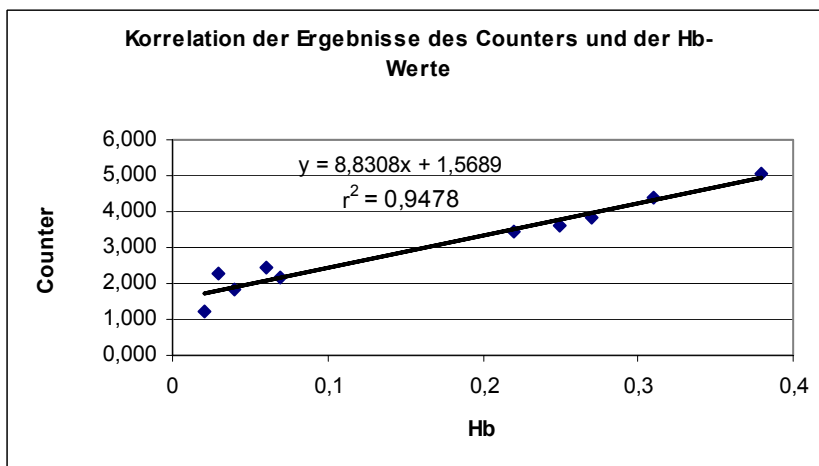


Diagramm 8:

Korrelation zwischen den gemessenen Hb-Werten der Gele und den Ergebnissen des Gammacounters
 $r^2 = 0,94$

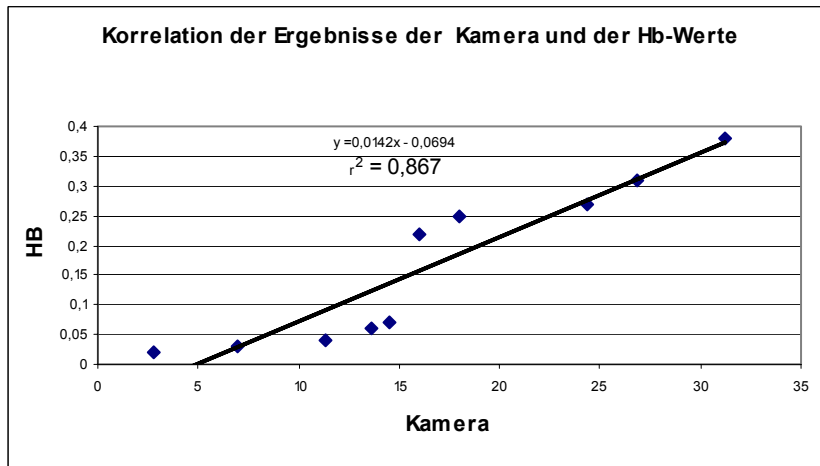


Diagramm 9:

Korrelation zwischen den gemessenen Hb-Werten der Gele und den Ergebnissen der Gammakamera
 $r^2 = 0,867$

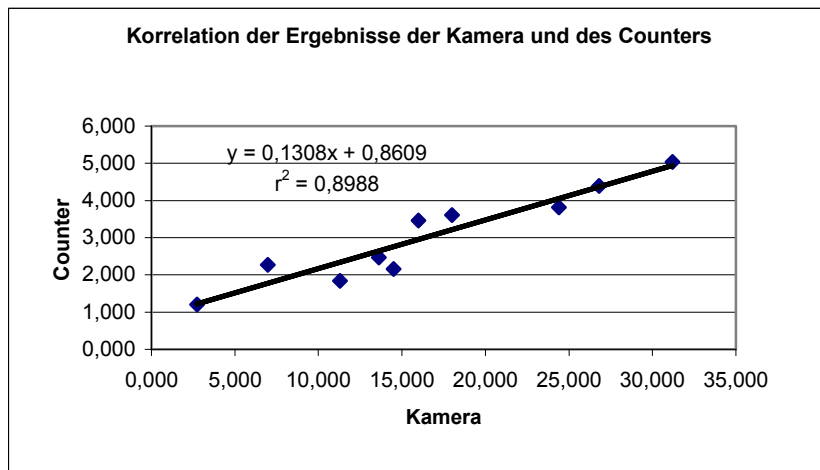


Diagramm 10:

Korrelation der gemessenen Werte der Gele im Gammacounter und unter der Kamera
 $r^2 = 0,89$

Die Aktivitätskonzentration in den untersuchten Geweben ist in der Tabelle 5 zusammengestellt. Zu erkennen ist, dass es durch die Zugabe von bFGF zu einer signifikanten Zunahme der Gefäßdichte im Matrigel gekommen ist. Im Gammacounter wurde für das mit bFGF versetzte Gel ein durchschnittlicher Wert von 4,06% ID/g, im Vergleich dazu wurde für das unbehandelte Gel ein Wert von 1,74% ID/g gemessen ($p=0,0004$). Dieser Unterschied wurde sowohl in dem Hb-Gehalt 0,286 g/dl im bFGF versetztem zu 0,044 g/dl im alleinigem Gel ($p=0,00027$), als auch in der Gammakameraaufnahme der extrahierten Gele 23,27 counts zu 9,82 counts ($p=0,00066$) deutlich (siehe Tabelle 5-7). Wenn man diese verschiedenen Blutgehaltsmessungen vergleicht, zeigte sich eine enge Korrelation ($r^2=0,94$) sowohl zwischen dem Hb-Gehalt und der Aktivitätskonzentration der Gele, als auch zwischen den Gelen unter der Kamera und im Counter gemessen ($r^2 = 0,89$), sowie zwischen den

gemessenen Hb-Werten und der gemessenen Werte unter der Kamera ($r^2=0,867$, siehe Diagramm 8-10). Zur statistischen Analyse wurde der gepaarte t-test durchgeführt.

Der Unterschied zwischen mit bFGF versetztem und unbehandeltem Gel, findet sich auch in der immunhistologischen Aufarbeitung wieder (Daten hier nicht gezeigt).

Da nun ein deutlicher Unterschied zwischen den Gelen aufgezeigt werden konnte, wurde in den nächsten Versuchsreihen die Darstellbarkeit des Therapieerfolges der Antiangiogenesetherapie erprobt. Wie in der letzten Versuchsreihe wurden B57 Mäuse und das wachstumsfaktordepletierte Matrigel verwendet. Drei Mäusen wurde das pure, drei Mäusen die Matrigel-bFGF-Kombination und den letzten drei Mäusen Matrigel, bFGF und NS 398, ein selektiver COX-2-Hemmer in der Konzentration von $5\mu\text{ Mol}$, verabreicht. Die jeweiligen Substanzen wurden homogen vermischt. Hierzu wurden am Abend zuvor die Bestandteile in einem Reagenzglas die ganze Nacht im Kühlraum auf einem Rüttler positioniert. Wiederum wurden eine Biodistribution, eine Hb-Bestimmung und eine Immunhistologie erstellt.

Tier-Nr.	Blut	Muskel	Serum	Matrigel	Matrigel+bFGF	Matrigel+bFGF und COX-2 Inhibitor
1	55,45	0,70	0,22	1,16		
2	59,45	0,66	0,19	0,72		
3	61,23	0,70	0,31	1,04		
4	54,91	0,73	0,25		2,24	
5	50,57	0,79	0,05		3,56	
6	57,91	0,61	0,02		3,18	
8	50,13	0,74	0,05			0,57
9	53,23	0,73	0,03			1,02
Mittelwert	55,384	0,7	0,14	0,97	2,99	0,79
SD		0,050	0,114	0,227	0,68	0,318

Tabelle 9: Ergebnisse der Organe im Gammacounter gemessen mit Mittelwert und Standardabweichung (in % der injizierten Dosis pro Gramm, n=8, bei einem Tier missglückte die Injektion der markierten Erythrozyten)

	ohne bFGF	mit bFGF	mit COX-2 Hemmern
Mittelwerte	0,057	0,290	0,045
Standardabweichung	0,015	0,072	0,007

Tabelle 10: Mittelwert und Standardabweichung der verschiedenen Gele der Hb-Bestimmung (in g/dl)

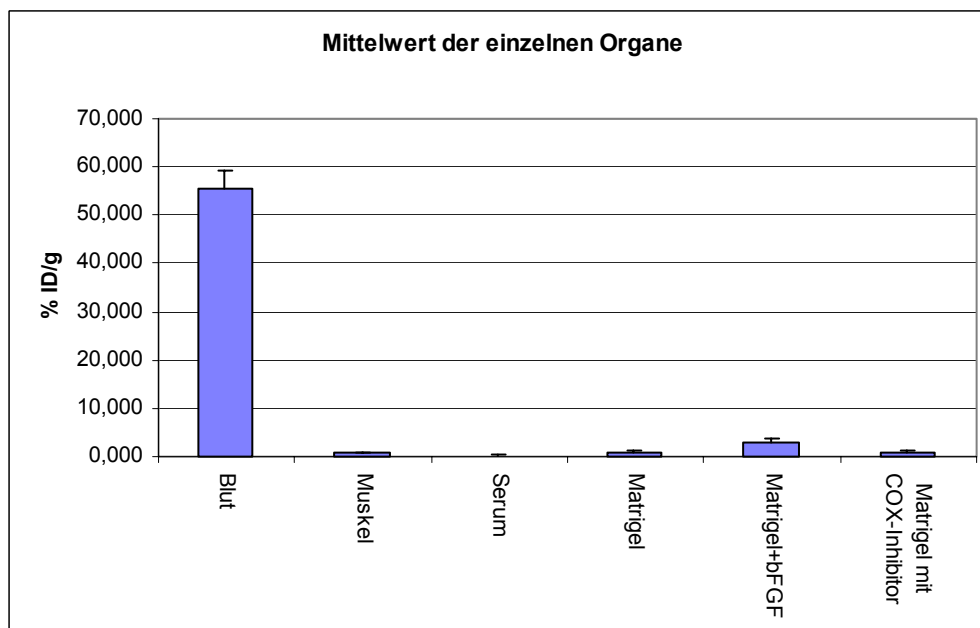


Diagramm 11: Mittelwert der einzelnen Organe mit Standardabweichung im Gammacounter gemessen

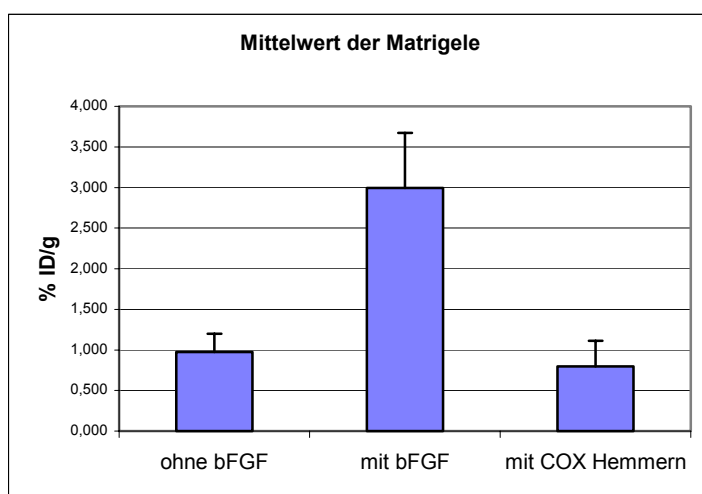


Diagramm 12:
Mittelwert und Standardabweichung der Matrigele im Gammacounter gemessen

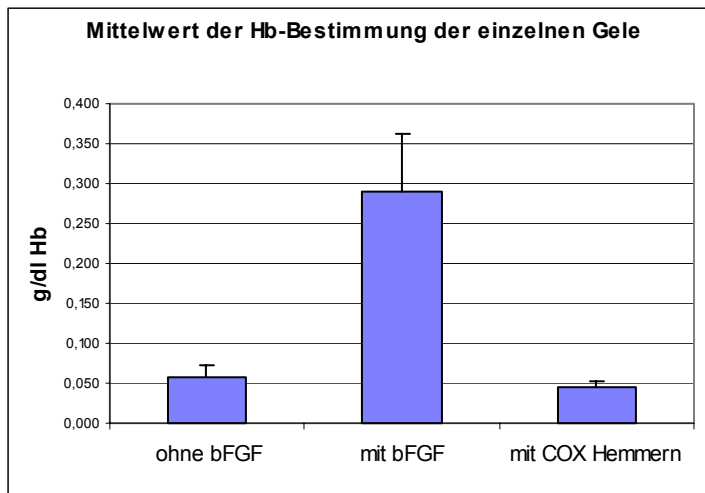


Diagramm 13:

Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Gele der Hb-Bestimmung

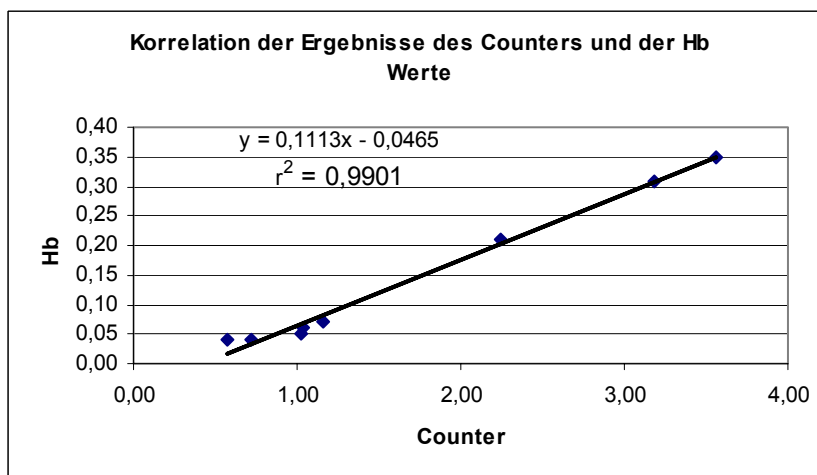


Diagramm 14:

Korrelation der Werte, erhoben aus dem Counter und der Hb-Bestimmung der Gele
 $r^2 = 0,99$

Die Aktivitätsaufnahme in den Matrigelen, Blut, Muskel und Serum sind in der Tabelle 9 zusammengestellt. Man erkennt, dass durch den COX-2-Inhibitor die Aktivitätsaufnahme des Matrigels signifikant reduziert wurde ($p=0,029$). Es zeigte sich im alleinigen Matrigel ein Wert von 0,975 ID/g, im mit bFGF versetzten Gel ein Wert von 2,99% ID/g und im mit COX-2-Inhibitor behandelten Gel ein Wert von 0,79% ID/g. Diese Reduktion des Blutgehaltes konnte auch in der Hb-Untersuchung bestätigt werden (0,057g/dl im alleinigen, 0,29g/dl im bFGF versetzten und 0,045g/dl im behandelten Gel, $p=0,021$, siehe Tabelle 9-10). Repräsentative Immunhistographieschnitte, die dieses Ergebnis bekräftigen, befinden sich im Anhang (Abbildung 8-11).

Wenn man nun diese verschiedenen Methoden zur Blutgehaltmessung vergleicht, Hb-Bestimmung sowie Gammacounter-Werte, zeigt sich eine gute Korrelation von $r^2=0,99$ (siehe Diagramm 14).

Um diese Ergebnisse zu bestätigen wurden fünf Tieren jeweils rechts und links in die Schulterregion wachstumsfaktorreduziertes Matrigel mit bFGF und jeweils fünf Mäusen das selbe mit zusätzlichem COX-2-Hemmer subcutan injiziert. Nach 10 Tagen wurden eine Gammakameraaufnahme der Mäuse und der entnommenen Gele, ferner eine Biodistribution, eine Hb-Bestimmung und eine Immunhistologie vorgenommen.

Tier-Nr.	Blut	Muskel	Serum	Matrigel+bFGF	Matrigel+bFGF+COX-2-Inhibitor
1	53,020	0,960	5,410	3,470	0,880
2	47,100	1,260	5,090	2,440	0,730
3	55,690	0,710	6,640	2,580	1,060
4	59,820	0,54	4,010	3,170	0,980
5	51,820	0,59	5,060	2,540	0,81
6	66,490	0,530	3,330	2,680	0,890
7	56,960	1,07	3,030	2,730	0,940
8	53,920	0,750	3,260	3,090	0,940
9	61,690	1,210	5,370	3,010	0,620
10	57,680	0,350	4,010	2,630	0,880
Mittelwert	56,420	0,790	4,520	2,830	0,87
SD	5,460	0,31	1,170	0,330	0,12

Tabelle 11: Aktivitätsaufnahme in den untersuchten Geweben: Einzelwert, Mittelwert und Standardabweichung (% ID/g, n=10)

	Gel +bFGF	Gel+bFGF+ COX-2- Inhibitor
Mittelwert	16,561	6,632
Standardabweichung	4,443	1,932

Tabelle 12: Mittelwert und Standardabweichung der Gele, gemessen unter der Kamera (Counts)

	Gel +bFGF	Gel + bFGF+COX- 2-Inhibitor
Mittelwert	0,357	0,057
Standardabweichung	0,082	0,024

Tabelle 13: Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Gele der Hb-Bestimmung (g/dl)

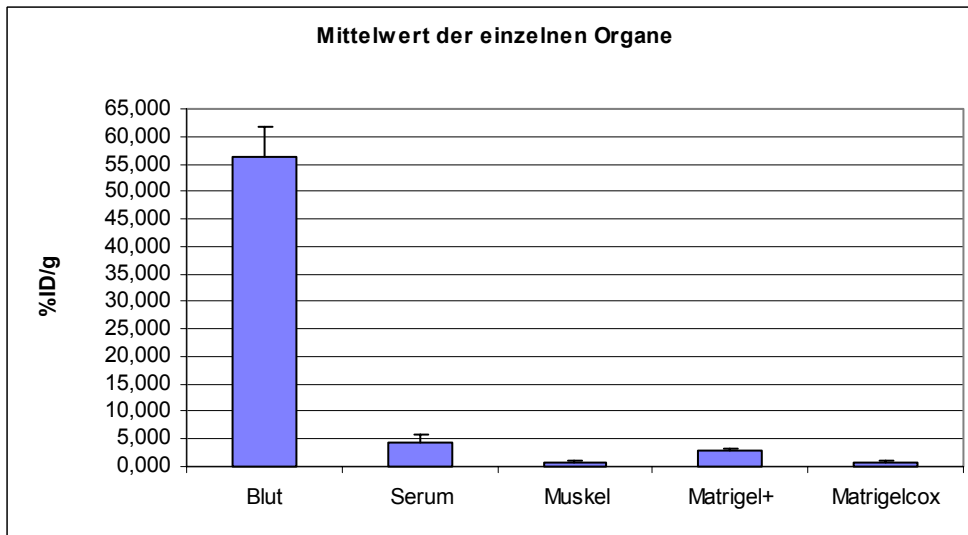


Diagramm 15:
Mittelwert und Standardabweichung der verschiedenen Organe im Gamacounter gemessen

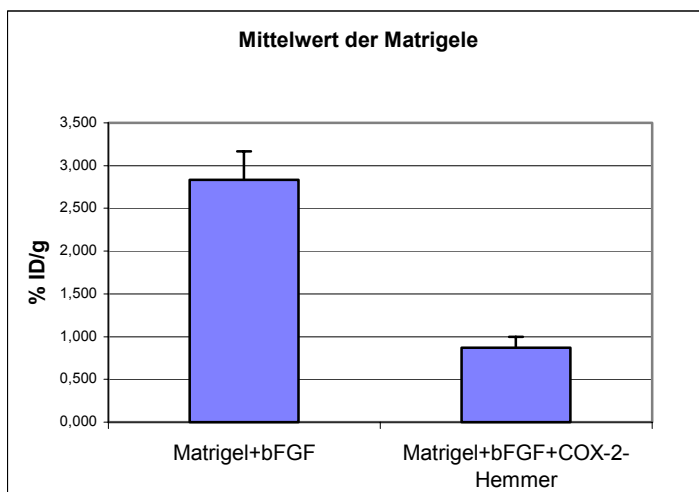


Diagramm 16:
Mittelwert und Standardabweichung der Matrigele im Gamacounter gemessen

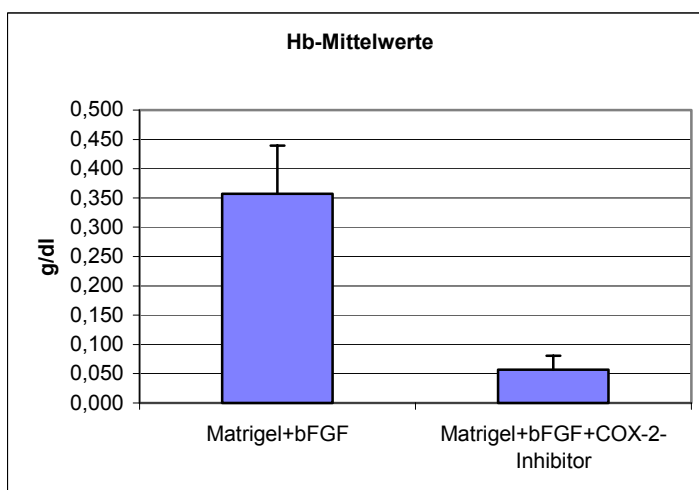


Diagramm 17:
Mittelwert und Standardabweichung der Hb-Werte

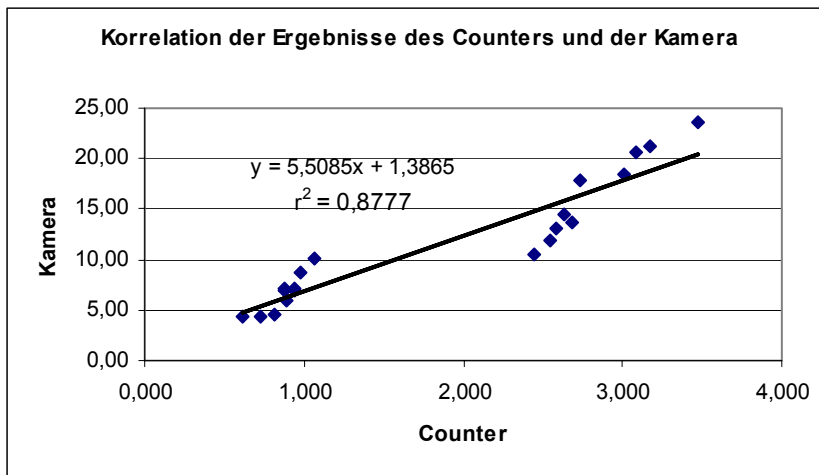


Diagramm 18:

Korrelation der Ergebnisse der Kamera und des Counters
 $r^2 = 0,877$

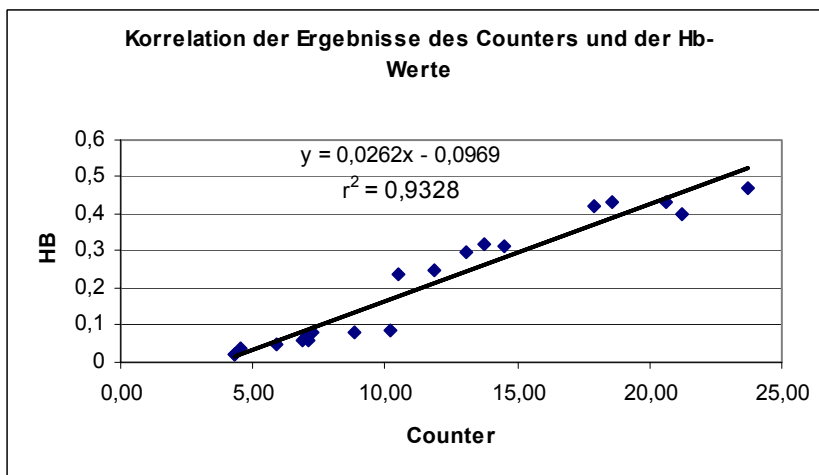


Diagramm 19:

Korrelation der Ergebnisse des Counters und der Hb-Bestimmung $r^2 = 0,9328$

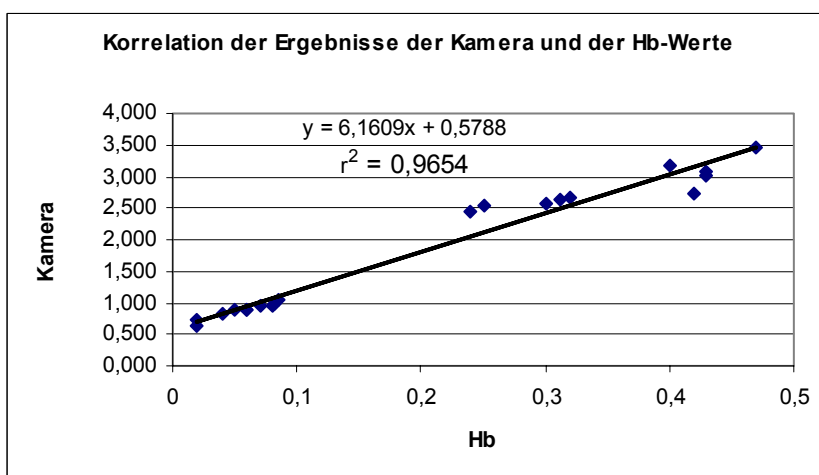


Diagramm 20:

Korrelation der gemessenen Werte unter der Kamera und der Hb-Bestimmung
 $r^2 = 0,965$

Durch den COX-2-Inhibitor wurde wiederum die Aktivitätsaufnahme in die Matrigel signifikant reduziert ($p=0,000000018$). Es zeigten sich Werte von 2,83% ID/g bei den mit bFGF versetzten Gelen zu 0,87% ID/g bei den mit COX-2-Inhibitor behandelten Gelen. Entsprechend fand sich eine Reduktion der Hb-Konzentration ($p=0,00000034$) von 0,357 g/dl zu 0,057g/dl. Die unterschiedliche Aktivitätsaufnahme in den behandelten und unbehandelten Matrigelen konnte auch in der Gammakameraaufnahmen der explantierten Gelen bestätigt werden ($p=0,0000204$), hier wurden 16,561 counts zu 6,632 counts gemessen (siehe Tabelle 11-13). Der Vergleich der verschiedenen Blutgehaltmessungen ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r^2=0,877$, im Vergleich der unter der Kamera zu den im Counter gemessenen Werten (siehe Diagramm 18). Ein Korrelationskoeffizient von $r^2=0,93$ konnte beim Vergleich zwischen Hb-Gehalt und im Counter gemessener Werte erhoben werden. In der Gegenüberstellung der unter der Kamera und in der Hb-Messung gefundenen Werte, wurde ein Korrelationskoeffizient von $r^2=0,965$ bestimmt (siehe Diagramm 19-20).

4. Diskussion

Bedeutung der Angiogenese für das Tumorwachstum

Angiogenese ist die wesentliche Voraussetzung für jede Tumorprogression, sei es Wachstum, Invasion oder Metastasierung. Neue Gefäße fördern das Wachstum durch Versorgung mit Nähr- und Sauerstoff und Entsorgung von Abbauprodukten. Die Endothelzellen sezernieren parakrin wichtige Wachstumsfaktoren für die Tumorzellen, darunter FGF-2 und den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor 1. Die neu entstandenen Gefäße erleichtern die Tumordinvasion, da die Endothelzellen verschiedene Enzyme freisetzen, wie die Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2), MMP-9 und den Urokinase ähnlichen Plasminogenaktivator, die das Matrixgewebe abbauen und dadurch die Ausbreitung der Tumorzellen in die Matrix und darüber hinaus ermöglichen. Die Gefäße schaffen außerdem die Basis für die Metastasierung, weil die zunehmende Endotheloberfläche den Tumorzellen mehr Gelegenheit bietet, die Zirkulation zu erreichen. Alle diese Zusammenhänge sind in soliden Tumoren, wie den Bronchial-, Mamma- und Kolonkarzinomen sowie den Melanomen, studiert worden. In diesen Fällen erlaubt die Dichte der Mikrogefäße eine Aussage über die biologische Aggressivität des Tumors und dadurch über Prognose, Metastasierungs- und Rezidivneigung.

Im Gegensatz dazu, werden physiologischerweise im adulten Körper nur in bestimmten Fällen neue Blutgefäße benötigt. In den weiblichen Reproduktionsorganen kommt es im Rahmen hormonell gesteuerter Vorgänge zu zyklischen Veränderungen, die einer kontrollierten Neubildung von Blutgefäßen bedürfen. Weiterhin tritt diese Neubildung bei regenerativen Prozessen wie der Wundheilung auf. Überschießende, unkontrollierte Blutgefäßbildung findet man beispielsweise bei bestimmten Retinopathien und rheumatischen Erkrankungen (Plendl et al., 1999). Die Inhibierung der Angiogenese ist deshalb ein intensiv untersuchter neuer Ansatz für die Therapie von malignen Tumoren. Unter physiologischen Bedingungen hängt die Intensität der Angiogenese von dem Verhältnis fördernder und hemmender Modulatoren in unmittelbarer Umgebung der Gefäße ab. Eine Reihe biologisch aktiver Moleküle sind Voraussetzung für den Prozess der Angiogenese, darunter Angiogenesefaktoren, extrazelluläre Matrixproteine, Adhäsionsrezeptoren und proteolytische Enzyme. Angiogenesefaktoren sind Wachstumsfaktoren, sie bewirken Proliferation und Differenzierung der Gefäßendothelien. Genauer untersucht sind bereits der Gefäßendothel-Wachstumsfaktor (VEGF), Plazenta-Wachstumsfaktor (PlGF), Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF-2), Transformierender Wachstumsfaktor β (TGF- β), Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α), Angiogenin, Interleukin-8 (IL-

8) und Angiopoetin-1 und -2 (Ang-1 und Ang-2) (Favier, 2001; Krishnamoorthy et al., 2001; Badet, 1994; Ferrara, 2000). Ang-1 ist beteiligt an der Gefäßentwicklung und dem Umbau während der Vaskularisation. Ang-2 wirkt antagonistisch und destabilisiert die Gefäße. Anzutreffen ist Ang-2 vor allem in Geweben wie Ovar, Uterus und Plazenta, die vorübergehend oder periodisch wachsen und vaskularisiert werden, gefolgt von einer Regression. Die wichtigsten endogenen Angiogeneseinhibitoren sind Thrombospondin-1 (TPS-1), Interferon α (IFN- α), Plättchenfaktor 4 (PF-4), Gewebseinhibitoren der Metalloproteinasen (TIMP), Angiostatin und Endostatin.

Eine entscheidende Angiogenesefaktorgruppe ist die „Fibroblast Growth Factor Familie“ (FGF). Sie besteht aus neun strukturell verwandten heparin-bindenden Polypeptiden und vier Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (Nicosia, 1999). Zwei wichtige Vertreter sind FGF-1 (acidic FGF/aFGF) und FGF-2 (basic FGF/bFGF), die eine 55%ige Übereinstimmung in ihrer Sequenz aufweisen. Die ursprünglich aus dem bovinen Gehirn isolierten Faktoren wurden bis zur Entdeckung des VEGF als wichtigste Wachstumsfaktoren in der Angiogenese angesehen (Basilico, 1992). Sowohl FGF-1 wie auch FGF-2 stimulieren die Angiogenese in der Chorioallantoismembran und in der Cornea. FGF-1 ist ein Mitogen für makro- wie auch mikrovaskuläre Endothelzellen *in vitro*. FGF-2 wirkt ebenfalls mitogen auf Endothelzellen und veranlasst diese, in dreidimensionale Kollagenmatrizes einzuwandern, um gefäßähnliche, tubuläre Strukturen auszubilden (Klagsbrun, 1991). Dieser Effekt kann durch Antikörper, die gegen FGF-2 gerichtet sind, reduziert werden (Saito et al., 1991). FGF-2 stimuliert Endothelzellen Kollagenasen und Plasminogenaktivatoren zu produzieren, die als Proteasen an der Degradation der Basalmembran beteiligt sind (Basilico, 1992). Endothelzellen selbst können FGF-1 und FGF-2 bilden (Basilico, 1992; Moses et al., 1995). Über den genauen Mechanismus der Freisetzung besteht jedoch noch immer Unklarheit, da eine für die Sekretion benötigte Signalsequenz nicht gefunden wurde (Pepper et al., 1996). Möglicherweise wird FGF-2 durch Rupturen der Plasmamembran aus zytosolischen Speichern entlassen (Nicosia, 1999). FGF reagiert mit spezifischen Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, vor allem FGFR-1 (flg) und FGFR-2 (bek), bei der Bindung an diese Rezeptoren scheinen Heparin und heparinähnliche Moleküle eine modulierende Wirkung auszuüben (Basilico, 1992).

Ein weiterer wichtiger Angiogenesefaktor stellt VEGF da (Asahara et al., 1995; Dellian et al., 1996). Im Gegensatz zu bFGF, stimuliert VEGF spezifisch Endothelzellen (Mandriote and Pepper, 1997). VEGF hat eine sehr geringe Halbwertszeit und verschwindet schnell aus dem Serum. Die Effekte von bFGF und VEGF auf Endothelzellen, beschrieben von Goto et al.,

1993, gehen von der Regulation der Zellproliferation über die Regulation der Metalloproteinase-Aktivatoren, bis zur Regulation der Integrin-Expression. Ferner wird die Zellpermeabilität und die Zell-Zellhaftung beeinflusst (Senger et al., 1996; Mandriota und Pepper 1997; Pepper et al., 1991; 1992; 1998; Dellian et al., 1996; Hippenstiel et al., 1998). bFGF aktiviert nicht nur in der Endothelzelle eine proliferierende Antwort, sondern auch in Stromalen- und Gewebefibroblasten (Berger et al., 1999; Ittman und Mansukhani, 1997). Dass bFGF ein potenter Aktivator der Angiogenese ist, wurde in verschiedenen Angiogenesemodellen in-vivo, z.B. in Hühnereiern (Ribatti et al., 1997), bei Ratten und Mäusen, in der Kornea von Mäusen (BenEzra et al. 1993; DeLisser et al., 1997) oder im Matrigelmodell bewiesen (Andrade et al., 1997; BenEzra et al., 1993; Passaniti et al., 1992). In vielen dieser Angiogenesemodellen wurde gezeigt, dass die Kombination von bFGF und VEGF zu einem synergetischen Effekt in der Angiogeneseantwort führt (Asahara et al., 1995; Goto et al., 1993, Pepper et al., 1992; 1998). Viele Tumore weisen hohe Level an bFGF und bFGF-Rezeptoren auf (Berger et al., 1999; Sumitomo et al., 1999). Zusätzlich konnte in vielen Tumoren eine vermehrte VEGF-Expression festgestellt werden, zudem herrscht eine starke Korrelation zwischen VEGF-Gehalt und Tumorprogression und Metastasierungsrate (Berger et al., 1995; Brown et al., 1995; 1999). Bei ras- und src- abhängigen onkogenetischen Transformationen kommt es zu einer vermehrten VEGF-Ausschüttung (Charvat et al., 1999; Flemming et al., 1997; Shi und Ferrara 1999). Zusätzlich ist die VEGF-Konzentration von Stress, wie Hypoxie und Hypoglykämie, abhängig (Banai et al., 1994; Carmeliet et al., 1998). VEGF führt zu einer starken Permeabilitätssteigerung und ist hierbei sogar potenter als Histamin (Senger et al. 1996). Die Level von bFGF- und VEGF-Expression im Tumor spielen eine kritische Rolle in der Tumorexpansion, -invasion und Metastasierungsfähigkeit. Zusätzlich korreliert die Stärke der tumorinduzierten Angiogenese mit einer schlechten Prognose (Abdulrauf et al., 1998; Axelsson et al., 1995; Dosquet et al., 1997; Okita et al., 1998; Volm et al., 1999). Es ist schwierig, die Rolle der einzelnen proangiogenetischen Zytokine im frühen Tumorwachstum einzuschätzen. Die angiogenetische Antwort scheint aber ein entscheidendes Moment in der Umwandlung der zuerst moderat wachsenden transformierten Zelle zur aggressiv wachsenden Tumorzelle darzustellen (Folkman, 1992; Folkman und Hanahan, 1991). Somit ist die Interaktion der Angiogenesefaktoren mit dem umliegenden Gewebe ein wichtiges Ereignis zur Fortschreitung der malignen Erkrankung.

Antiangiogenese als neues Therapieverfahren

Mit verschiedenen Ansätzen ist es bereits gelungen die Angiogenese in malignen Tumoren zu unterdrücken. Die mit einem Neoplasma einhergehende Angiogenese benutzt physiologische Vorgänge, deren Hemmung nicht zu einer Resistenz führen sollte. Die neuen Gefäße versorgen hunderte von Tumorzellen, sodass die Unterdrückung der Angiogenese zytostatische Wirkungen potenzieren müsste. Hemmstoffe sind synthetischen oder semisynthetischen Ursprungs oder endogene, biologische Antagonisten der Angiogenesekaskade. Ein anderer Weg zielt spezifisch auf die molekularen Determinanten der neuen Gefäße und schädigt durch toxische Verbindungen an bestimmten Stellen den Gefäßbaum, damit eine Tumornekrose entsteht.

Zahlreiche antiangiogenetische Substanzen befinden sich in der klinischen Prüfung. Die erste ist TNP-470, ein Fumagillin-Derivat, das die Proliferation der Endothelzellen und die von FGF-2 induzierte Migration hemmt, man vermutet durch Inhibition der Methionin-Amino-Peptidase Typ 2. Thalidomid und speziell das in-vivo entstehende Epoxid werden im Sinne einer Antiangiogenese wirksam, weil sie den Weg des FGF-2 blockieren. Thalidomid wird gegenwärtig eingesetzt in der Behandlung fortgeschrittener solider Tumore (Dmoszynska et al., 2001; Gelati et al., 2003). Eine andere Verbindung stellt Suramin da, das mehrere Angiogenesefaktoren inhibiert. Ferner Heparinderivate, die ihre Antiangiogenesewirkung durch Binden und Blockieren von FGF-2 entfalten.

Eine neue Klasse der Antiangiogenesetherapeutika sind COX-2-Inhibitoren (Jaime et al., 1999; Williams et al., 2000; Kawamori et al., 1998; Nishimura et al., 1999; Pentland et al., 1999). Cheng et al., 1998, zeigten, dass Prostaglandiene die Produktion von bFGF und VEGF stimulieren. Der antineoplastische Effekt von COX-2-Inhibitoren wurden in Studien gezeigt, in denen Tiere, die eine genetisch induzierte Prädisposition für die Entwicklung eines Darmkrebses hatten, verwendet wurden (Williams et al., 1999.) Ferner kam es, bei der Behandlung mit COX-2 Inhibitoren, zu einer signifikanten Reduzierung des Wachstums von Kolon-, Kopf-Hals- und Hauttumoren (Kawamori et al., 1998; Nishimura et al., 1999; Pentland et al., 1999.) Die Präsenz von COX-2 trägt außerdem zu einer Verschlechterung der Prognose von Lungen- und Kolonkrebs bei (Achiwa et al., 1999.) Tumorwachstum benötigt die Expansion von vaskulären Zellen. Anhand von in-vitro-Essays wurde gezeigt, dass COX-2 die Angiogenese beeinflussen kann und die Behandlung mit COX-2-Hemmern die Angiogenese blockiert (Jones et al., 1999; Tsujii et al., 1998). Die Dichte der vaskulären Zellen bei in Mäusen injizierten Tumoren, als Marker für die tumorassoziierte Angiogenese, war 30% geringer bei COX-2^{-/-} Mäusen als bei Wildtyp Tieren. Fibroblasten von COX-2^{-/-}

Mäusen im Vergleich zu Wildtypfibroblasten produzierten weniger Proangiogenese-Faktoren, so z.B. 94% weniger VEGF. Wenn die Wildtypfibroblasten mit COX-2-Hemmern behandelt wurden, kam es zu einer 92% Reduktion der VEGF-Produktion. So konnte eine Verbindung zwischen COX-2 und VEGF-Produktion bewiesen werden (Williams et al., 2000).

Notwendigkeit für neue Verfahren, die Angiogenese nicht-invasiv darzustellen

Um die Angiogenese-Inhibitoren in der klinischen Anwendung verwenden zu können, wird ein Verfahren benötigt, welches breit einsetzbar ist und den Effekt der Therapie auf die Tumervaskularisation in-vivo darstellt. Es ist von großer klinischer Relevanz, die Angiogenese nicht-invasiv zu charakterisieren, um die Prognose der Patienten zu determinieren (Weidner et al., 1991), um eine passende Behandlungsform des jeweiligen Tumors zu finden und um die richtige Dosis in der Antiangiogenese-Behandlung zu wählen (Ellis et al., 1993).

Blutvolumenbestimmung

Wenn eine antiangiogenetische Therapie wirksam ist, müsste sich das intratumorale Blutvolumen verringern. Das Blutvolumen kann mit der Markierung der Erythrozyten mit Technetium ohne großen methodischen Aufwand bestimmt werden. Schon 1882 (Grehant et al., 1882) wurden erste Messungen des Blutvolumens durchgeführt, indem Haemoglobin mit Kohlenmonoxid als Träger markiert wurde, wobei durch die Ungenauigkeit der Harboxyhaemoglobinbestimmung die Ergebnisse sehr variabel waren. 1942 führten Hahn und Hevesy Messungen mit radioaktivem Eisen (Fe^{59}) durch, dabei wurden noch markierte Fremderythrozyten verwendet. 1967 wurde zuerst die jetzt noch gebräuchliche Methode der Tc^{99m} Markierung von Fischer et al., 1967 erprobt. Heute wird diese Methode z.B. zur Blutungsquellsuche bei okkulten gastrointestinalen Blutungen eingesetzt. Diese Art der Blutvolumen-Bestimmung sollte in dieser Arbeit als nicht-invasive Methode zur Überprüfung einer antiangiogenetischen Therapie untersucht werden.

Das Matrigel-Modell

Hierzu verwendeten wir das Matrigel, welches ein etabliertes Tumormodell darstellt (Passaniti et al., 1992; Montrucchio et al. 1994; Klement et al., 2000). Es besteht aus Basalmembranen, die sich wiederum aus spezialisierten extrazellulären Matrizen zusammensetzen. Sie sind in der Dermal-Epidermalenjunctionszone von luminalen Epithelien wie Respirations- Urogenitaltrakt und exokrinen und endokrinen Drüsen zu finden. Eine

Matrigel-Matrix ist ein lösliches Basalmembranextrakt vom Engelbreth-Holm-Swarm-Tumor (Timple et al., 1979) bestehend aus Laminin, Kollagen 4, Entactin, Heparinsulfat, Wachstumsfaktoren, und Plasminogenaktivatoren (Kleinmann et al., 1986, 1982).

In dieser Arbeit wurde das Matrigel als Tumormodell verwendet, und die in-vivo Darstellbarkeit der Wirkung der Angiogenesetherapie wurde überprüft. Um die Gefäßeinsprossung verbildlichen zu können, wurde das Matrigel in Mäuse injiziert, sodass mauseigene Endothelzellen in diese Matrix hineinwachsen konnten. Der Unterschied von reinem Gel im Vergleich zu mit Angiogenese-Wachstumsfaktor vermishtem Gel wurde verifiziert und der günstigste Zeitpunkt zur Gelentnahme herausgefunden. Dazu wurde entweder das reine oder das mit bFGF vermishte Gel in die Schulterregion von Mäusen injiziert. Nach den Zeitpunkten von 5, 10 und 15 Tagen wurden jeweils die Versuche durchgeführt, die Mauserythrozyten wurden mit Tc^{99m} markiert und das Blutvolumen wurde unter der Gammakamera evaluiert. Danach wurde eine Biodistributionsuntersuchung durchgeführt und die Radioaktivitätskonzentration im Vollblut, im Serum, der Muskulatur und im Matrigel mit Hilfe eines Gammacounters gemessen. Zur Überprüfung der gefundenen Ergebnisse wurde eine immunhistochemische Färbung des CD31 Antikörpers angefertigt, ein Oberflächenantigen spezifisch für Endothelzellen. Zusätzlich wurden die gefundenen Ergebnisse mit einer Hb-Bestimmung im Gel kontrolliert.

Bei den hier durchgeführten Versuchen wurde zunächst die Matrigel-Matrix verwendet. Nach fünf Tagen durchdrangen kaum Gefäße das Gel, weder beim reinen, noch beim mit Wachstumsfaktor zugesetzten Gel. Im Gammacounter wurde in beiden Gelen nur eine geringe Radioaktivität gemessen, in der immunhistologischen Färbung sah man nur am Rand des Gels eine zarte Gefäßantwort. Ein signifikanter Unterschied konnte nicht aufgezeigt werden (siehe Tabelle 2, Abbildung 1 und 2 im Anhang). Der Tag 10 wies ein stärkeres Gefäßwachstum auf. Einen signifikanten Unterschied in den beiden Versuchstiergruppen konnte jedoch auch zu diesem Zeitpunkt nicht demonstriert werden. Werte von 2,44% ID/g im reinen zu 2,95% ID/g im mit bFGF zugesetzten Gel wurden durchschnittlich ermittelt (siehe Tabelle 3). In der Immunhistologie erkennt man, dass zahlreiche Gefäße das Gel durchdrungen haben, jedoch konnte keine Divergenz der verschiedenen Gruppen aufgedeckt werden (siehe Abbildung 3-5 im Anhang). Am Tag 15 kam es zu keiner weiteren Zunahme der Gefäßdichte innerhalb des Matrigels, es lies sich auch weiterhin kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den mit bFGF behandelten und unbehandelten Gelen aufzeigen. Die spezifische Markierung der

Erythrozyten und damit die Voraussetzung, das Blutvolumen bestimmen zu können, ist in allen Versuchsreihen gut gelungen. Dieses wird deutlich, wenn man die Blutwerte im Vergleich zum Serum und zum Muskel in allen Versuchen betrachtet. Auch wurde während des Markierungsprozesses im abpipettierten Serum eine Aktivität unter 10% der injizierten Dosis gemessen. Ferner blieben die Werte für Blut, Serum und Muskel in den einzelnen Versuchen nahezu identisch, was auf eine gute, stabile Nachweismethode hindeutet. Da dieser Versuchsaufbau jedoch nicht zum gewünschten Ergebnis beitrug, weil die Differenzen zwischen dem Kontrollgel und dem zur Gefäßeinspritzung angeregten Gel zu gering waren, wurde zum einen die Mausrasse gewechselt, zum anderen wurde das wachstumsfaktordepletierte Matrigel für die nächsten Versuchsreihen herangezogen. Es wurden anstelle der vorher verwendeten alb cJ Mäuse nun Black 6 Mäuse verwendet. Da nach 5 Tagen die Gefäßantwort nur spärlich ausfiel, und zwischen Tag 10 und 15 nicht mehr Gefäße die Gele durchdrangen, wurde der Tag 10 als der für diese Studie optimale Versuchstag festgelegt. Der sonstige Versuchsaufbau blieb derselbe, zusätzlich wurden noch eine Gammakameraaufnahme der entnommenen Gele und eine Hb-Bestimmung durchgeführt. Nach den vorgenommenen Änderungen wurde in der nächsten Versuchsreihe am Tag 10 im nicht mit bFGF behandelten Gel eine durchschnittliche Aktivitätskonzentration von 1,7% ID/g, im Wachstumsfaktor zugesetzten Gel von 4,0% ID/g beobachtet. Unter der Gammakamera wurden Werte von 9,8 Counts/min zu 23,27 Counts/min in den entnommenen Gelen gemessen. Die Hb-Bestimmung ergab 0,04 g/dl zu 0,28 g/dl. Alle Messmethoden ergaben statistisch signifikante Unterschiede $p < 0,05$ in den verschiedenen Versuchsgruppen. Im Vergleich der verschiedenen Blutgehaltmessungen ergaben sich Korrelationskoeffizienten von $r^2=0,86$, $0,94$ und $0,89$ (siehe Tabelle 5-7 und Diagramm 4-11). Es konnte somit gezeigt werden, dass in dem gewählten Angiogenesemodell bFGF zu einer deutlichen Steigerung des Blutvolumens führt, die mittels radioaktiv markierten Erythrozyten nachgewiesen werden kann.

In den nächsten Experimenten wurde untersucht, ob mit diesem Verfahren auch der antiangiogenetische Effekt von COX-2-Inhibitoren dargestellt werden kann. Es zeigte sich, dass durch Zusatz eines spezifischen COX-2-Inhibitors zum bFGF behandelten Matrigel die Radioaktivitätskonzentration 10 Tage nach Implantation auf 0,79% ID/g reduziert wurde. Ohne Zusatz des COX-2-Inhibitors betrug die Aktivitätskonzentration im bFGF behandelten Matrigel 2,99 %ID/g, im Matrigel ohne bFGF 0,97% ID/g. In der Hb-Bestimmung wurden Werte von 0,057 g/dl, 0,29 g/dl und 0,045 g/dl aufgezeigt. Alle Ergebnisse ergaben signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) (siehe Tabelle 9-10). Somit konnte die

antiangiogenetische Wirkung des COX-2-Inhibitors mit Hilfe von radioaktiv markierten Erythrozyten nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis konnte in einem weiteren Experiment mit einer größeren Anzahl von Versuchstieren gut reproduziert werden.

Die Arbeitsgruppen um Passaniti et al., 1992; Montrucchio et al. 1994; und Klement et al., 2000, stellten im Gegensatz zu den hier aufgeführten Ergebnissen keine Gefäßeinsprossung im nicht mit Wachstumsfaktoren behandelten Matrigel fest. Bei Passaniti könnte die Ursache darin liegen, dass diese Arbeitsgruppe nicht wie in dieser Studie alb cJ Mäuse benutzte, sondern C57BI und als Injektionsort die Peritoneallinienregion gewählt wurde. Die Gruppe fand heraus, dass dies die günstigste Lokalisation wäre. Diese Lokalisation war bei der Fragestellung in dieser Arbeit jedoch nicht möglich, da dann, bei den Ganzkörperaufnahmen der Mäuse unter der Gammakamera, die Nieren *the region of interest*, also den Ort des Gels, überstrahlt hätten. Zusätzlich beschreibt diese Gruppe, dass das Alter der Maus eine entscheidende Rolle in der Angiogeneseantwort darstellen würde. Vielleicht liegt auch hier der Unterschied in der Gefäßantwort, Passaniti fand heraus, dass es zu einer stärkeren Gefäßeinsprossung kommen würde, je älter die Tiere wären. Klement hingegen benutzte auch alb cJ Mäuse und injizierte das Gel in die Flanken der Mäuse, was keine hinreichende Begründung für die unterschiedlich erhobenen Ergebnisse darstellt. Des Weiteren beschreibt Passaniti, dass die angiogenetische Reaktion am Tag 1-2 beginnt, am Tag 3-4 ein Plateau erreicht und dieses bis zum achten Tag beibehalten würde. Montrucchio stellte am Tag 6 die höchste Gefäßintensität fest. Die Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Gefäßeinsprossung in das Matrigel sind somit wahrscheinlich auf Unterschiede in der Konzentration von Wachstumsfaktoren im Gel und Unterschiede zwischen verschiedenen Mausstämmen bedingt. Diese Erklärung erscheint deshalb am wahrscheinlichsten, da in einem Wachstumsfaktor depletierten Gel ein deutlich niedrigeres Blutvolumen als in einem nicht wachstumsfaktor depletierten Gel gefunden wurde. Jedoch kam es auch in dieser Gelart zu einer geringfügigen Gefäßeinsprossung. Dieses ist möglicherweise durch entzündliche Reaktionen bedingt. Dormond et al., 2001, benutzte auch Wachstumsfaktor depletiertes Gel und beschreibt keine Gefäßeinsprossung 5 Tage nach Implantation. Von dieser Arbeitsgruppe wurden jedoch immunsupprimierte nu/nu Swiss Mäuse untersucht und die Gele bereits 5 Tage nach Implantation untersucht. Unter dem Lichtmikroskop konnten besonders bei den alb cJ aber auch bei den Black 6 Mäusen Immunzellen entdeckt werden, die um das Gel herum anzutreffen waren. Diese entzündliche Reaktion könnte für die Gefäßantwort mit verantwortlich sein. Dormond verwendete wie in dieser Arbeit zur Angiogenesehemmung

NS 398 und fand wie in dieser Arbeit eine Inhibition der durch bFGF angeregten Gefäßeinsprießung.

Williams et al., 2000, beschreibt, dass das Tumorwachstum von LLC-Tumoren gesenkt wird, wenn man diese mit einem selektiven COX-2-Hemmer behandeln würde. Die Vaskularisierung würde um 30% geringer ausfallen, als bei unbehandelten Geschwüren, jedoch trete dieses Phänomen nicht bei der Behandlung mit einem selektiven-COX-1-Hemmer und nur im geringeren Maß bei einem unspezifischen COX-Hemmer auf. Viele weitere Arbeitsgruppen beschreiben den antiangiogenetischen Effekt dieser Stoffgruppe (Masferrer et al., 1999; Douglas et al., 2002; Jaime et al., 1999). In den hier durchgeführten Versuchen konnte festgestellt werden, dass die Gefäßdichte bei mit COX-2-Hemmern therapierten Mäusen in etwa vergleichbar mit den Matrigelen ohne bFGF ist. Das spiegelt sich sowohl in der Gammakameraaufnahme, in dem Gammacounter, in der Hb-Bestimmung als auch in der Immunhistologie wieder. Daraus kann man schließen, dass der selektive COX-2-Hemmer die Angiogenetische-Wirkung des bFGFs unterdrückt.

Bestimmung der Gefäßdichte

Zur Bestimmung der Gefäßdichte wurden verschiedene Ansätze verwendet. Passaniti benutzte zur Evaluierung der Gefäßmenge auch eine Hb-Bestimmung mit dem Drabkin-Kitt, wobei er auf vergleichbare Werte wie in dieser Studie kommt. Das Problem der Aufbereitung der Gele stellt die Homogenisierung da. Eine zu starke Trübung der Flüssigkeit verfälscht die Werte, da die Ergebnisse einer photometrischen Bestimmung zugrunde liegen. Die anderen Arbeitsgruppen (Dormond et al., 2001; Montrucchio et al., 1994; Passaniti et al., 1992; Jerry et al., 2001) haben histologische oder biochemische Nachweismethoden angewandt, wie Blutgefäßzählung durch Antikörperdarstellung gegen den van-Willebrand-Faktor oder gegen den VEGF-Rezeptor und haben keine in-vivo Blutvolumenbestimmung durchgeführt. Die histologische Aufarbeitung der Tumore oder Gele ist die am häufigsten verwendete Methode, um den intratumoralen Blutgefäßgehalt zu evaluieren (Wieder et al., 1992; Vermeulen et al., 1996). Studien konnten eine direkte Korrelation zwischen Gefäßgehalt und Patientenmortalität aufzeigen (Weidner et al., 1991; Hillen et al., 1997; Borre et al., 1998; Straume et al., 1999; Sun et al., 1999). Das Problem der Objektivität ist hierbei jedoch nicht von der Hand zu weisen, mehrere unabhängige Untersucher sind notwendig und häufig kommt es zu einer großen Varianz in den Ergebnissen. Die so genannten *hot spots* werden verschieden festgelegt und somit ist ein direkter Vergleich zwischen den einzelnen

Untersuchungsergebnissen häufig nicht möglich (Wild et al., 2000). Somit verwundert es nicht, dass es wiederum Studien gibt, die keine Korrelation zwischen dem Gefäßgehalt des Tumors und dem Patientenüberleben feststellen konnten (MacLennan and Bostwick 1995; Hawke et al., 1998; Hirakawa et al., 1999; Kawauchi et al., 1999; Obermair et al., 1999). Um eine größere Objektivität zu erlangen, wurde eine computergesteuerte Determination der Gefäße erstellt (Kirchner et al., 1996; Parson-Wingerter et al., 1998; Wild et al., 2000). Hierbei ist jedoch zum einen das Problem aufgetreten, dass ellipsoide Gefäße nicht als Gefäße identifiziert wurden, andere Gefäße unberücksichtigt blieben, da sie eine große Heterogenität der Endothelzellmarker aufgewiesen haben (Maniotis et al., 1999). Man müsste somit, um eine exakte Bestimmung der Gefäßmenge zu bekommen, verschiedenste Endothelzellmarker verwenden. Zum anderen wurde gezeigt, dass die höchste Fehlerquelle nicht in der Deutung des Betrachters, sondern in der großen Heterogenität der Tumore liegt und somit in den verschiedenen Schichten eine große Varianz der Gefäßintensität anzutreffen sei (Marson et al., 1999). Man müsste zahlreiche Schichten des Tumors untersuchen, um auf repräsentative Werte zu kommen. Für die Therapiekontrolle liegt eine weitere Problematik dieser Methoden darin, dass die Tumore immer aus dem Organismus entfernt werden müssen und man somit nicht im lebenden Organismus auf die Gefäßdichte schließen kann. Für die Fragestellung, ob eine Antiangiogenesetherapie effektiv ist, ist diese Art von Untersuchung deshalb nur eingeschränkt einsetzbar.

Andere Techniken zur Bestimmung der Effektivität einer Antiangiogenesetherapie

Lee et al., 2000, maß den intratumoralen Blutfluss von Endometriumkarzinomen mit einer Dopplersonographie-Methode. Er verglich den kleinsten Resistanzindex mit dem VEGF-Gehalt und den histologischen Blutgehalt der Tumore und findet eine Korrelation zwischen Dopplersonographiebefund, VEGF und Blutgefäßmenge. Anders Emoto et al., 1997, der den Dopplersonographiebefund von Ovarialkarzinomen mit der Gefäßgehaltmenge in-vitro verglich und keine Korrelation aufzeigen kann.

So kommt man zu dem Schluss, dass dieser diagnostische Ansatz zwar eine präoperative Aussage erlaubt, diese wohl aber von der Art des Tumors abhängt und somit nicht als generelle Methode anwendbar ist. Weitere Studien beschäftigten sich mit dem Thema, den Blutgehalt des Tumors aufzuzeigen. In den meisten Untersuchungen wurden in der Magnetresonanztomographie (MRT) verschiedene Kontrast-Mittel verabreicht und mikrovaskuläre Parameter im Laufe des *first pass* oder im Laufe des *steady state* (Brasch et al., 1997; Taylor et al., 1999; Dennie et al., 1998) bestimmt. Die funktionelle vaskuläre

Volumenfraktion des Tumors ist heute ein anerkannter Marker der Angiogenese (Jain et al., 1997; Jain et al., 1988). Wessler et al., 2000, untersuchte verschiedene Verbindungen, um das ideale Kontrastmittel mit dem idealen Molekulargewicht für die Bestimmung des intratumoralen Blutvolumens herauszufinden. Nach diesen Ergebnissen soll das Kontrastmittel ein Molekulargewicht von mehr als 120 kD aufweisen. Kleinere Substanzen würden das Gefäßbett zu rasch verlassen, sodass falsche Werte für die vaskuläre Volumenfraktion des Tumors gemessen werden würden. Auch Lewin et al., 1999, fanden, dass mit dem niedermolekularen Kontrastmittel Gadolinium DTPA das Blutvolumen inkorrekt bestimmt wird. Dieses Kontrastmittel tritt, insbesondere bei malignen Tumoren, sehr rasch in den Extravaskularraum über. Somit lässt sich anhand der Kontrastmittelaufnahme nur schwer zwischen erhöhtem intratumoralen Blutvolumen und erhöhter Gefäßpermeabilität differenzieren. (Dennie et al., 1998).

Kim et al., 2002, prüfte die Blutvolumenfraktionsmessungen in der MRT und stellte fest, dass die physiologischen Parameter des vaskulären Wasseraustausches und des Blutflusses die Messungen der Blutvolumenfraktion im Tumor beeinflussen können und dass viele Studien diesen Effekt nicht berücksichtigt haben. Die Arbeitsgruppe postuliert, dass die genauesten Messungen mit Fluß-insensitiven Sequenzen in Kombination mit Pulssequenzparametern zu erreichen wären. Somit wird deutlich, dass die Evaluierung der Blutvolumenfraktion im Tumor mit Hilfe der MRT komplex ist und dass viele Faktoren das Messergebnis beeinflussen können. Der Vorteil der Erythrozytenmarkierung zur Blutvolumenbestimmung liegt auf der Hand, da diese den Intravasalraum nicht verlassen und somit, wie in dieser Arbeit gezeigt, zuverlässig das relative Blutvolumen eines Gewebes bestimmt werden kann.

Eine interessante Methode, die Angiogenese darzustellen, verwendete die Arbeitsgruppe um Klement. Sie führte eine FITC-Dextran-Fluoreszenzmarkierung durch, um so auf die Durchblutung des Tumors zu schließen. Dextran ist jedoch auch perivaskulär anzutreffen, da es bei Änderungen der Permeabilität den Intravasalraum verlässt und es so zu Ungenauigkeiten der Meßmethode kommen kann. Um diesen Fehler einzudämmen, könnte man eine Doppel-Fluoreszenz-Technik anwenden. Diese Technik verbindet den in-vivo-Marker Rhodamine 6G, der mit grünem Licht die Mitochondrien der Leukozyten und Thrombozyten anfärbt und den Farbstoff FITC-Dextran, der mit blauem Licht verbunden wird, um Plasma zu markieren. Beide fluoreszierende Stoffe können, bei Verwendung von umschaltbaren Filtern, zusammen benutzt werden. Diese Doppel-Fluoreszenz-Technik erlaubt gleichermaßen die Beobachtung von Gefäßdurchmesser und Blutfluss in ein und demselben Gefäßsegment. Diese in-vivo-Fluoreszenzmikroskopie ist jedoch eine sehr aufwendige

Untersuchungsmethode und kann vor allem nur bei oberflächlich gelegenen Tumoren eingesetzt werden.

Im Gegensatz dazu, ist die in dieser Arbeit verwendete Methode der Markierung von Erythrozyten mit Technetium 99m ein weltweit bei anderen Indikationen eingesetztes Verfahren. Der Blutgehalt der verschiedenen Gele und somit auch der antiangiogenetische Therapieerfolg konnte mit der genannten Technik in dieser Arbeit aufgezeigt werden. Die verwendete Messmethode ist schon lange etabliert, nahezu in jedem Krankenhaus durchführbar und kostengünstig (Yu et al., 1999; Raan et al., 1999; Hambye et al., 1997; Fischer et al., 1967; Orth et al., 2001). Die Markierung ist sehr stabil und auch nach längeren Wartezeiten durchzuführen. Da in dieser Darstellungsweise die Erythrozyten den Blutgehalt anzeigen sind keine Übertritte in den Extravasalraum zu befürchten, wie sie häufig bei MR-Kontrastmittel mit der *first pass* Technik beschrieben wurden. Die Untersuchung hat für den Patienten kaum Nebenwirkungen und ist für das medizinische Personal einfach in der Handhabung.

Ein weiteres nuklearmedizinisches Verfahren zur Blutvolumenbestimmung ist die Markierung von Erythrozyten mit ^{15}O -Kohlenmonoxid und der Messung mit Hilfe der Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Dieses Verfahren ermöglicht eine Quantifizierung des Blutvolumens in Schnittbildern (Wilson et al., 1992). ^{15}O -Kohlenmonoxid ist jedoch als kurzlebige radioaktives Gas nur an wenigen PET-Zentren verfügbar.

Limitationen dieser Arbeit

Im Vergleich zum Herzen, Milz und den Nieren war das Blutvolumen innerhalb des Matrigels zu gering, um es bei Mäusen mit einer klinisch eingesetzten Gammakamera in-vivo zu bestimmen. Dies ist jedoch sicher durch die geringe Größe der implantierten Matrigele und die begrenzte Auflösung der eingesetzten Gammakamera bedingt. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob bei Patienten Tumoren mit ausreichendem Kontrast dargestellt werden können, um verlässliche Messungen von Veränderungen des Blutvolumens unter Therapie mit Angiogeneseinhibitoren durchführen zu können.

5. Zusammenfassung

Ziel: In dieser Arbeit wurde untersucht, ob szintigraphische Untersuchungen mit radioaktiv markierten autologen Erythrozyten dazu eingesetzt werden können, die Gefäßneubildung im Rahmen der Angiogenese darzustellen und den Effekt einer antiangiogenetischen Therapie nachzuweisen.

Methodik: Als Angiogenese Modell wurde die Gefäßeinsprossung in subkutan bei Mäusen implantiertes Matrigel eingesetzt. Die Mauserythrozyten wurden mit Technetium^{99m}-Diethylenetriaminopentacetat (Tc^{99m}-DTPA) in-vivo markiert. Die Aktivitätsmenge im Matrigel wurde 30 Minuten nach Injektion der radioaktiv markierten Erythrozyten mit Hilfe einer Gammakamera sowie eines Gammacounters bestimmt. Diese Messungen wurden mit der Haemoglobinkonzentration im Matrigel sowie der immunhistochemisch bestimmten Gefäßdichte korreliert. Es wurde auch der zeitliche Verlauf der Gefäßeinsprossung in das Matrigel sowie der Einfluss des Angiogenese stimulierenden Wachstumsfaktor "basic fibroblast growth factor" (bFGF) bestimmt. Des Weiteren wurde die Darstellbarkeit des antiangiogenetischen Effekts eines Cyclooxygenase Typ 2 (COX-2) Inhibitors untersucht. Hierzu wurde den Mäusen mit Wachstumsfaktor versetztes Matrigel in Kombination mit dem selektiven COX-2-Inhibitor NS 398 injiziert.

Ergebnisse: Zehn Tage nach Implantation des mit bFGF behandelten Matrigels zeigte sich sowohl in der Immunhistochemie als auch anhand der Haemoglobinbestimmung die maximale Gefäßeinsprossung. Die Haemoglobinkonzentration im bFGF behandelten Gel war zu diesem Zeitpunkt $0,286 \pm 0,062$ g/dl gegenüber nur $0,044 \pm 0,021$ g/dl ohne bFGF Behandlung ($p < 0,05$). Die Aktivitätsmenge im Matrigel war eng mit der Haemoglobinkonzentration korreliert. Der Korrelationskoeffizient für die Korrelation zwischen der Haemoglobinkonzentration und der Aktivitätskonzentration war $r^2 = 0,94$ für die Messungen mit dem Gammacounter und $r^2 = 0,86$ für die Messung mit der Gammakamera. Durch Behandlung mit dem COX-2 Inhibitor NS 398 wurde die Haemoglobinkonzentration, im bFGF behandelten Matrigel signifikant reduziert ($0,057 \pm 0,024$ g/dl vs. $0,290 \pm 0,072$ g/dl). Auch die Aktivitätskonzentration im Matrigel nahm signifikant von $2,83 \pm 0,33\%$ ID/g auf $0,87 \pm 0,12\%$ ID/g ab.

Schlussfolgerung: Diese Untersuchungen zeigen, dass mit radioaktiv markierten Erythrozyten der Einfluss von pro- und anti-angiogenetischen Faktoren auf die Gefäßneubildung dargestellt werden kann. Szintigraphische Untersuchungen mit radioaktiv markierten Erythrozyten sind kostengünstig und klinisch für andere Indikationen seit Jahren etabliert. Die Ergebnisse dieser

Arbeit sind deshalb viel versprechend für die Anwendung dieser Methodik für Untersuchungen der tumorinduzierten Angiogenese in klinischen Studien.

6. Literaturverzeichnis

Abdulrauf S.I., Edvardsen K., Ho K.L., Yang X.Y., Rock J.P. and Rosenblum M.L.
“Vascular endothelial growth factor expression and vascular density as prognostic markers of survival in patients with low-grade astrocytoma”
J Neurosurg 88 (1998): 513-520.

Achiwa H., Yatabe Y., Hida T., Kuroschi T., Kozakik K., Nakamuia S., Ogawa H.
“Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in primary, resected lung adenocarcinomas.”
Clin. Cancer Res. 5 (1999): 1001-1005

Andrade S.P., Machado R.D., Teixeira A.S., Belo A.V., Tarso A.M. and Beraldo W.T.
“Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a flourimetric method”
Microvasc Res 54 (1997): 253-261.

Asahara T. Bauters C., Zheng L.P., Takeshita S., Bunting S., Ferrara N., Symes J.F. and Isner J.M.
“Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo”
Circulation 92 (1995): П365-П371.

Axelsson K., Ljung B.M., Moore D.H. 2nd, Thor A.D., Chew K.L., Edgerton S.M., Smith H.S. and Mayall B.H.
“Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma”
J Natl Cancer Inst 87 (1995): 997-1008.

Badet J.
“Angiogenic role of growth factors “
Contracept Fertil Sex. 22 (1994): 627-30

Baguley B.C., Holdaway K.M., Thomson L.L., Zhuang L. And Zwi L.J.

“Inhibition of growth of colon 38 adenocarcinoma by vinblastine and colchicine: evidence for a vascular mechanism.”

Eur. J. Cancer 27 (1991): 482-487

Banai S., Shweiki D., Pinson A., Chandra M., Lazarovici G. and Keshet E.

“Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardia ischaemia: Implications for coronary angiogenesis”

Cardiovasc Res 28 (1994): 1176-1179.

Basilico C, Moscatelli D.

“The FGF family of growth factors and oncogenes.”

Adv Cancer Res. 59 (1992): 115-65.

BenEzra D., Griffin B.W., Maftzir G. and Aharonov O.

“Thrombospondin and in vivo angiogenesis induced by basic fibroblast growth factor or lipopolysaccharide”

Invest Ophthalmol Vis Sci 34 (1993): 3601-3608.

Berger D.P., Herbstritt L., Dengler W.A., Marme D., Mertelsmann R. and Fiebig H.H.

“Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human tumor models of different histologies”

Ann Oncol 6 (1995): 817-825.

Berger W., Setinek U., Mohr T., Kindas-Mugge I., Vetterlein M., Dekan G., Eckersberger F., Caldas C. and Micksche M.

“Evidence for a role of FGF-2 and FGF receptors in the proliferation of non-small cell lung cancer cells”

Int J Cancer 83 (1999): 415-423.

Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS.

Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance.

Nature. 27 (1997):404-407.

Borre M., Offersen B.V., Nerstrom B., Overgaard J.

“Microvessel density predicts survival in prostate cancer patients subjected to watchful waiting“

Br. J. Cancer 78 (1998): 940-944

Boxerman J.L., Hamberg L.M., Rosen B.R., Weisskoff R.M.

„MR contrast due to intravascular magnetic susceptibility perturbations“

Magn Reson Med 34 (1990): 555-566

Brasch R., Pham C., Shames D., et al.

“Assessing tumor angiogenesis using macromolecular MR imaging contrast media”

J. Magn. Reson. Imaging 7 (1997): 68-74

Bremer C., Mustafa M., Bogdanov A., Ntziachristos V., Petrovsky A., Weissleder R.

“Steady state blood volume measurements in experimental tumors with different angiogenic burdens-a study in mice”

Radiology 226 (2003): 214-220

Browder T., Butterfield C. E., Kräling B.M., Marshall B., O’Reilly M. S. and Folkman J.

“Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer”

Cancer Research 60 (2000): 1878-1886

Brown L., Berse B., Jackman R., Tognazzi K., Guidi A., Dvorak H., Senger D., Connolly J. and Schnitt S.

“Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer”

Hum Pathol 26 (1995): 86-91.

Brown L.F., Guidi A.J., Schnitt S.J., Van De Water L., Iruela-Arispe M.L., Yeo T.K., Tognazzi K. and Dvorak H.F.

“Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma and metastatic carcinoma of the breast”

Clin Cancer Res 5 (1999): 1041-1056.

Carmeliet P., Dor Y., Herbert J.M., Fukumura D., Brusselmans K., Dewerchin M., Neeman M., Bono F., Abramovitch R., Maxwell P., Koch C.J., Ratcliffe P., Moons L., Jain R.K., Collen D., Keshert E. and Keshet E.

“Role of HIV-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis”

Nature 394 (1998): 485-490.

Caroll T.J., Teneggi V., Jobin M., Squassante L., Treyer V., Hany T.F., Burger C., Wang L., Bye A., Von Schulthess G.K., Buck A.

“Absolute quantification of cerebral blood flow with magnetic resonance , reproducibility of the method, and comparison with H2(15)O positron emission tomography”

J Cereb Blood flow Metab. 22 (2002): 1149-56

Celic A., Lin W.

“Regional cerebral blood volume: effects of imaging parameters”

In: Proc 7th Scientific meeting, ISMRM, Philadelphia, (1999); 3; 1872

Chavrat S., Duchesne M., Parvaz P., Chignol M.C., Schmitt D. and Serres M.

“The up-regulation of vascular endothelial growth factor in mutated Ha-ras HaCaT cell lines is reduced by a farnesyl transferase inhibitor”

Anticancer Res 19 (1999): 557-561.

Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, Enamorado I, Yeh NT, Kroog GS, Rudy S, McCullagh L, Mousa S, Quezado M, Herscher LL, Van Waes C

“Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer.”

Clin Cancer Res. 5 (1999):1369-1379.

Cheng W.F., Cheng T.M., Chen C.A., Wu K.T., Huang C.Y., Hsieh et al.

“Clinical application of intratumoral blood flow study in patients with endometrial carcinoma”

Cancer 82 (1998): 1881-1886

Cheng T., Cao W., Wen R., Steinberg R.H., La Vail M.M.,
“Prostaglandine E₂ induces vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor mRNA expression in cultured rat Muller cells.”
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39 (1998): 581-589

Claffey K.P., Abrahams K., Shih S., Brown L.F., Mullen A. and Keough M.
“Fibroblast growth factor 2 activation of stromal cell vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis”
Laboratory Investigation 81 (2001): 61-75.

DeLisser H.M., Christofidou-Solomidou M., Strieter R.M., Burdick M.D., Robinson C.S., Wexler R.S., Kerr J.S., Garlanda C., Merwin J.R., Madri J.A. and Albelda S.M.
“Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis”
Am J Pathol 151 (1997): 671-677

Dellian M., Witwer B.P., Salehi H.A., Yuan F., and Jain R.K.
“Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice: Effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor, and host microenvironment”
Am J Pathol 149 (1996): 59-71

Denekamp J.
“Endothelial cell proliferation as a novel approach to targeting tumor therapy.”
Br. J. Cancer 45 (1981): 136-139

Dennie J., Mandeville J.B., Boxerman J.L., Packard S.D., Rosen B.R., Weisskoff R.M.
“NMR imaging of changes in vascular morphology due to tumor angiogenesis”
Magn Reson Med 40 (1998):793-799

Dmoszynska A, Rolinski J, Bojarska-Junak A, Manko J, Jawniak D, Walter-Croneck A, Soroka-Wojtaszko M, Hus M.

“Influence of thalidomide on Bcl2 expression and proangiogenic cytokine levels in short-term culture of peripheral blood and bone marrow mononuclear cells of multiple myeloma patients.”

Pol J Pharmacol.53 (2001): 709-13.

Dormond O., Foletti A., Paroz C. and Rüegg C.

“NSAID’s inhibit $\alpha V\beta 3$ integrin-mediated and Cdc42/Rac-dependent endothelial-cell spreading, migration and angiogenesis”

Nature Med. 7 (2001): 1041-1047

Dosquet C., Coudert M.C., Lepage E., Cabane J., and Richard F.

“Are angiogenic factors cytokines, and soluble adhesion molecules prognostic factors in patients with renal carcinoma?”

Clin Cancer Res 3 (1997): 2451-2458

Douglas ML, Reid JL, Hii SI, Jonsson JR, Nicol DL

“Renal cell carcinoma may adapt to and overcome anti-angiogenic intervention with thalidomide.”

BJU Int. 89 (2002): 591-5.

Du Raan H., Löttger M.G., Harris G.W., Van Aswegen A., Otto A.C., Nel M.G., Badenhorst P.N., Verbeke K.A. and Verbruggen A.M.

“Measurement of plasma volume using TC ^{99m}- labelled DMP-HSA”

Nuclear Medicine Communication 21 (2000): 539-544

Ellis L.M., Walker R.A., Gasparini G.

“Current controversies in cancer. Is determination on angiogenic activity in human tumours clinically useful?”

Europ. J. Cancer 34 (1998): 609-618

Emoto M., Iwasaki H., Mimura K., Kawarabayashi T., Kikuchi M.

“Differences in the angiogenesis of benign and malignant ovarian tumors, demonstrated by analyses of color Doppler ultrasound, immunohistochemistry, and microvascular density”
Cancer 80 (1997): 899-907

Enochs W.S., Harsh G., Hochberg F., Weissleder R.

“Improved delineation of human brain tumors on MR images using a long-circulation, superparamagnetic iron oxide agent”
J Magnet Reson Imaging 9 (1999): 228-232

Favier J, Corvol P

“Physiological angiogenesis”
Therapie. 56 (2001): 455-63

Ferrara N

“Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis.”
Recent Prog Horm Res. 55, (2000): 15-35

Fischer J., Wolf R. And Leon A.

“Technetium-99m as a label for erythrocytes.”
J Nucl Med. 1967 Mar;8(3):229-32

Flemming R.Y., Ellis L.M., Parikh N.U., Liu W, Staley C.A., and Gallick G.E.

“Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon carcinoma cells by activity of src kinase”
Surgery 122 (1997): 501-507

Folkman J.

“Anti-Angiogenesis: a new concept for therapy of solid tumors.”
Ann. Surg. 175 (1972): 409-419

Folkman J., Klagsbrun M.

“Angiogenetic factors“
Science 235 (1987): 442-447

Folkman J.

“The role of angiogenesis in tumor growth”.

Semin Cancer Biol 3 (1992): 65-71

Folkman J. and Hanahan D.

“Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis “

Princess Takamatsu Symp 22 (1991): 339-347

Fuhrmann-Benzakein E, Ma MN, Rubbia-Brandt L, Mentha G, Ruefenacht D, Sappino AP, Pepper MS.

“Elevated levels of angiogenic cytokines in the plasma of cancer patients.”

Int J Cancer. 85 (2000): 40-45.

Gelati M, Corsini E, Frigerio S, Pollo B, Broggi G, Croci D, Silvani A, Boiardi A, Salmaggi

“Effects of thalidomide on parameters involved in angiogenesis: an in vitro study.”

Neurooncol. 64 (2003):193-201

Goto F., Goto K., Weindel K., and Folkman J.

“Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels”

Lab Invest 69 (1993): 508-517

Grehant M., Quinquard E.

“Mesures du sang contenu dans l'organisme d'un mammifere vivant.”

C.R. Acad Sci Paris 94 (1882): 1450

Hahn L., Hevesy G.A.

“A method of blood volume determination”

Acta Physiol Scand 1 (1940): 3-10

Hambÿe A.E., Verbeke K.A., Vandermeiren R.P., Joosens E.J., Vergruggen A.M., De Roo M.J.

“Comparison of modified technetium- 99m albumin and technetium 99m RBC for equilibrium ventriculography.”

J. Nucl. Med. 38 (1997): 1521-1528

Hawke C.K., Delahunt B., Davidson P.

“Microvessel density as a prognostic marker for transitional cell carcinoma of the bladder”

Br. J. Urol. 81 (1998): 585-590

Hillen C.K., Hak L.E., Joosten-Archjanie S.R., Arends J.W.

“Microvessel density in unknown primary tumors”

Int. J. Cancer 74 (1999): 81-85

Hippenstiel S., Krull M., Ikemann A., Risau W., Clauss M. and Suttorp N.

“VEGF induces hyperpermiability by direct action on endothelial cells”

Am J Physiol 274 (1998): L678-L684

Hirakawa T., Kamura T., Kaku T., Amada S., Ariyoshi K., Kinukawa N., Nakano H.

“Prognostic significance of epithelial-stromal vascular cuffing and microvessel density in squamous cell carcinoma of the uterine cervix“

Gynecol. Oncol. (1999):369-374

Hsu S.M., Raine L. And Fanger H.

“Use of avidin.biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.”

J-Histochem-Cytochem 1981 29, 577-580

Ittman M. and Mansukhani A.

“Expression of fibroblast growth factors (FGFs) and FGF receptor in human prostate”

J Urol 157 (1997): 69-71

Jain R., Schlendger K., Höckel M., Yuan F.

“Quantitative angiogenesis assays: progress and problems“

Nature Med 3 (1997): 1203-1208

Jain R.

“Determination of tumor blood flow: a review”

Cancer Res 48 (1988): 2641-2658

Jones M.K. et al

“Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanism and implications for cancer growth and ulcer healing.”

Nat. Med. 5 (1999): 1418-1423

Kawamori T., Rao C.V., Seibert K. And Reddy B.S.

“Chemopreventive activity of velecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis.”

Cancer Res. 58 (1998): 409-412

Kawauchi S., Fukuda T., Tsuneyoshi M.

“Angiogenesis does not correlate with prognosis or expression of vascular endothelial growth factor in synovial sarcomas“

Oncol. Rep. 6 (1999): 959-964

Kim Y.R., Rebro K.J., Schmainda K.M.

“Water exchange and inflow affect the accuracy of T₁-GRE blood volume measurements: implications for the evaluation of tumor angiogenesis”

Magn Reson Med 47 (2002): 1110-1120

Kirchner L.M., Schmidt S.P., Gruber B.S.

“Quantification of angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane model using fractal analyses“

Microvas. Res. 51 (1996): 2-14

Klagsbrun M, Baird A

“A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity.”

Cell. Oct 18;67 (1991):229-231

Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR.

“Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma.”

Biochemistry. 23;21 (1982): 6188-6193.

Kleinman H.K., McGarvey M.L., Hassell J.R., Star V.L., Cannon F.B., Laurie G.W. and Martin G.R.

“Basement membrane complexes with biological activity.”

Biochemistry 25 (1986): 312-318

Klement G., Baruchel S., Rak J., Man S., Clark K., Hicklin D.J., Bohlen P. and Kerbel R.S.

“Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity”

J. Clin. Invest. 105 (2000): R1-R8

Krishnamoorthy L, Morris HL, Harding KG

“A dynamic regulator: the role of growth factors in tissue repair.”

J Wound Care.10 (2001): 99-101.

Kuroi K, Toi M

“Circulating angiogenesis regulators in cancer patients.”

Int J Biol Markers. 16 (2001): 5-26.

Lamszus K, Lengler U, Schmidt NO, Stavrou D, Ergun S, Westphal M.

“Vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor, basic fibroblast growth factor, and placenta growth factor in human meningiomas and their relation to angiogenesis and malignancy.”

Neurosurgery. 46 (2000): 938-947

Lee C.N., Cheng W.F., Chen C.A., Chu J.S., Hsieh C.Y., Hsieh F.J.

“Angiogenesis of endometrial carcinomas assessed by measurement of intratumoral blood flow, microvessel density, and vascular endothelial growth factor levels”

Obstetrics & Gynecology 96,4 (2000): 615-621

Lewin M., Bredow S., Sergeyev N., Marecos E., Bogdanov A., Weissleder R. and J.R.

“In vivo assessment of vascular endothelial growth factor- induced angiogenesis”

Int. J. Cancer 83 (1999): 798-802

MacLennan G.T. and Bostwick D.G.

“Microvessel density in renal cell carcinoma: lack of prognostic significance.”

Urology 46 (1995): 27-30

Mandriota S.J. and Pepper M.S.

“Vascular endothelial growth factor- induced in vitro angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor”

J Cell Sci 110 (1997): 2293-2302

Maniotes A.J., Folberg R., Hess A., Seftor E.A., Gardner L.M., Pe'er J., Trent J.M., Meltzer P.S., Hendrix MJ

“Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: Vasculogenic mimicry.”

Am.J.Pathol. 155 (1999): 739-752

Marecos E., Weissleder R., Bogdanov A.

“Antibody-mediated versus nontargeted delivery in a human small cell lung carcinoma model“

Bioconj. Chem. 9 (1998):184-191

Martin A., Komada M.R., Same D.C.

“Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus”

Med Res Rev. 2003 Mar;23(2):117-45

Marson L.P., Kurian K.M., Miller W.R. and Dixon J.M.

“Reproducibility of microvessel counts in breast cancer specimens.”

Br. J. Cancer 81 (1999): 1088-1093

Mattern J., Koomagi R. and Volm M.

“Coexpression of VEGF and bFGF in human epidermoid lung carcinoma is associated with increased vessel density”

Anticancer Res 17 (1997): 2249-2252

Montrucchio G., Lupia E., Battaglia E., Passerini G., Bussolino F., Emanuelli G. And Camussi G.

“Tumor necrosis factor α -induced angiogenesis depends on in situ platelet-activating factor biosynthesis”

J. Exp. Med. 180 (1994): 377-382

Moses MA, Klagsbrun M, Shing Y.

“The role of growth factors in vascular cell development and differentiation.”

Int Rev Cytol. 161 (1995): 1-48

Mukherjee P., Kang H.C., Videen T.O., McKinstry R.C., Powers W.J., Derdeyn C.P.

“Measurement of cerebral blood flow in chronic carotid occlusive disease: comparison of dynamic susceptibility contrast perfusion MR imaging with positron emission tomography”

Am J Neuroradiol 24 (2003): 862-71

Nicosia RF, Villaschi S.

“Autoregulation of angiogenesis by cells of the vessel wall.”

Int Rev Cytol. 185 (1999) :1-43

Nishimura G., Yanoma S., Mizuno K., Kawakami K. And Tsukuda M.

“A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses tumor growth in nude mouse xenografted with human head and neck squamous carcinoma cells.”

J. Cancer Res. 90 (1999): 1152-1162

Obermair A., Wasicky R., Kaider A., Preyer O., Losch A., Leodolter S. and Kolbl H.
“Prognostic significance of tumorangiogenesis in epithelial ovarian cancer.”
Cancer Lett. 138 (1999): 175-182

Okita S., Kondoh S., Shiraishi K., Kaino S., Hatano S., and Okita K.
“Expression of vascular endothelial growth factor correlates with tumor progression in
gallbladder cancer”
Int J Oncol 12 (1998): 1013-1018

Orth V.H., Rehm M., Thiel M., Haller M., Finsterer U.
“Die Messung des Blutvolumens aktueller Stand“
Anaesthesist 50 (2001): 552-568

Oshima M., Dinchuk J.E., Kargman S.L., Oshima H., Hancock B., Kwong E., Trzaskos
„Suppression of intestinal polyposis in Apc delta 716 knockout mice by inhibition of
cyclooxygenase 2 (COX-2).”
Cell. 87 (1996): 803-806

Parson-Wingerter P., Lwai B., Yang M.C., Elliott K.E., Milaninia A., Redlitz A., Clark J.I.
and Sage E.H.
“A novel assay of angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane: stimulation by bFGF
and inhibition by angiostatin according to fractal dimension and grid intersection.”
Microvasc. Res. 55 (1998): 201-214

Passaniti A., Taylor R.M., Pili R., Guo Y., Long P.V., Haney J.A., Pauly R.P., Grant D.S.,
and Martin G.R.
“A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using
reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor”
Lab Invest 67 (1992): 519-528

Pentland A.P., Schoggins J.W., Scott G.A., Khan K.N. and Han R.

“Reduction of UV-induced skin tumors in hairless mice by selective COX-2 inhibition.”

Carcinogenesis 20 (1999): 1934-1944

Pepper M.S

“Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity.”

Cytokine Growth Factor Rev. 1997 Mar;8(1):21-43. Review.

Pepper M.S., Ferrara N., Orci L., and Montesano R.

“Angiogenesis-regulating cytokines: activities and interactions.”

Curr Top Microbiol Immunol. 1996;213 (Pt 2):31-67. Review.

Pepper M.S., Ferrara N., Orci L., and Montesano R

“Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells”

Biochem Biophys Res Commun 181 (1991): 902-906

Pepper M.S., Ferrara N., Orci L., and Montesano R.

“Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro”

Biochem Biophys Res Commun 189 (1992): 824-831

Pepper M.S., Mandriota S.J., Jeltsch M., Kumar V. and Alitalo K.

„Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C synergizes with basic fibroblast growth factor and VEGF in the induction of angiogenesis in vitro and alters endothelial cell extracellular proteolytic activity”

J Cell Physiol 177 (1998): 439-452

Ribatti D., Gualandris A., Bastaki M., Vacca A., Iurlaro M., Roncali L. And Presta M.

“New model for the study of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane: The gelatin sponge/chorioallantoic membrane assay”

J Vasc Res 34 (1997): 455-463

Rozic J.G., Chakraborty C. And Lala P.K.

“Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis”

Int. J. Cancer 93 (2001): 497-506

Saito H, Kasayama S, Kouhara H, Matsumoto K, Sato B.

“Up-regulation of fibroblast growth factor (FGF) receptor mRNA levels by basic FGF or testosterone in androgen-sensitive mouse mammary tumor cells”.

Biochem Biophys Res Commun.174(1991): 136-41.

Sakoh M., Rohl L., Gyldensted C., Østergaard L.

“Cerebral blood flow and blood volume measured by Magnetic Resonance Imaging bolus tracking after acute stroke in pigs-Comparison with $^{15}\text{(O)}\text{H}_2\text{O}$ Positron Emission Tomography”

Stroke 31 (2000): 1958

Sakaeda T., Fukumurak, Takahashi K, Matsumura S., Matsumura E., Hirano K.

“Blood flow rate in normal and tumor-bearing rats in conscious state, under urethane anesthesia, and during systemic hypothermia.”

J. Drug Target 6 (1998): 261-272

Schmidt N.O., Westphal M., Hagel C., Ergun S., Stavrou D., Rosen E.M. and Lamszus K.

“Levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor and basic fibroblast growth factor in human gliomas and their relation to angiogenesis”

Int J Cancer 84 (1999): 10-18

Senger D.R., Ledbetter S.R., Claffey K.P., Papadopoulos-Sergiou A., Peruzzi CA., Detmar M.

“Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the $\alpha\text{v}\beta_3$ integrin, osteopontin, and thrombin”

Am J Pathol 149 (1996): 293-305

Shi Y.P. and Ferrara N.

“Oncogenic ras fails to restore an in vivo tumorigenic phenotype in embryonic stem cells lacking vascular endothelial growth factor (VEGF)”

Biochem Biophys Res Commun 254 (1999): 480-483

Straume O., Salvesen H.B. and Akslen L.A.

“Angiogenesis is prognostically important in vertical growth phase melanomas.”

Int. J. Oncol. 15 (1999): 595-599

Sumitomo S., Okamoto Y., Mizutani G., Kudeken W., Mori M. and Takai Y.

“Immunohistochemical study of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and fibroblast growth factor receptor (FGF-R) in experimental squamous cell carcinoma of rat submandibular gland”

Oral oncol 35 (1999): 98-104

Sun H.C., Tang Z.Y., Li X. M., Zhou Y.N., Sun B.R. and Ma Z.C.

“Microvessel density of hepatocellular carcinoma: Its relationship with prognosis.”

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 125 (1999): 419-426

Taki J., Sumiya H., Tsuchiya H., Tomia K., Nonomura A., Tonami N.

“Evaluation benign and malignant bone and soft-tissue lesions with technetium-99m-MIBI scintigraphy”

J.Nucl- Med. 38 (1997): 501-506

Tsujii M., Sumiya H., Tsuchiya H., Sawaoka H., Hori M., DuBois R.N.

“Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells”

Cell 93 (1998): 705-716

Ueki T., Koji T., Tamiya S., Nakane P.K. and Tsuneyoshi M.

“Expression of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor in advanced gastric caecinoma”

J Pathol 177 (1999): 353-361

Weidner N., Folkman J., Pozza F., Bevilacqua P., Allred E.N., Moore D.H., Meli S. and Gasparini G.

“A new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma.”
N. Engl. J. Med. 324 (1991): 1-8

Weidner N., Semple J.P., Welch W.R. and Folkman J.

“Tumor angiogenesis and metastasis: Correlation in invasive breast carcinoma”
N Engl J Med 324 (1991): 1-8

Weissleder R., Cheng H.C., Marecos E., Kwong K., Bogdanov A.

“Non-invasive in vivo mapping of tumor vascular and interstitial volume fractions”
Europ. J. Cancer 34 1448-1454

Weissleder R., Bogdanov A., Tung C.H., Weinmann H.J.

“Size optimization of synthetic graft copolymers for in vivo angiogenesis imaging”
Bioconjugate Chem 12 (2001) 213-219

Wild R., Ramakrishnan, Sedgewick J., Griffioen A.W.

“Quantitative assessment of angiogenesis and tumor vessel architecture by computer-assisted digital image analysis: effects of VEGF- toxin conjugate on tumor microvessel density”
Microvascular Research 59 (2000): 368-376

Wilson C.B., Lammertsma A.A., McKenzie C.G., Sikora K, Jones T.

“Measurement of blood flow and exchanging water space in breast tumors using positron emission tomography: a rapid and noninvasive dynamic method.”
Cancer Res. 52 (1992): 1593-1597

Williams C.S., Tsujii M., Reese J., Dey S.K. and DuBois R.N.

“Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth.”
J. Clin. Invest. 105 (2000): 1589-1594

Williams C.S., Mann M., and DuBois R.N.

“The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer and development.”
Oncogene 18 (2000) 7908-7916, 1999

Wollenberg B., Ollesch A. Maag K., Funke I., Wilmes E.

„Micrometastasis in bone marrow of patients with cancer in the head and neck area”

Laryngorhinootologie 73 (2) (1994) 88-93

Xerri L., Battyani Z., Grob J.J., Parc P., Hassoun J., Boneradi J.J. and Birnbaum D.

“Expression of FGF1 and FGFR1 in human melanoma tissues”

Melanoma Res 6 (1996): 223-230

Yu W.K., Chow P.K.H., Somanesan S., NG T.H., Sundram F.X., Chan S.T.F., Soo K.C., AW S.E. and Shaw S.M.

“A non invasive isotope dilution technique for quantifying hepatic blood flow using radiolabeled red blood cells”

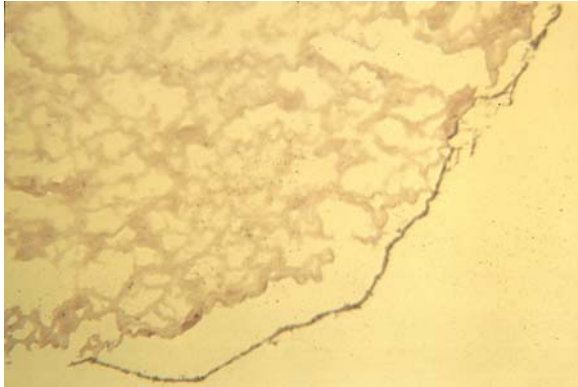
Nuclear Medicine Communications 21 (2000): 269.276

Yuan F., Dellian M., Fukumura D., Leunig M., Berk D.A., Torchilin V.P., Jain R.K.

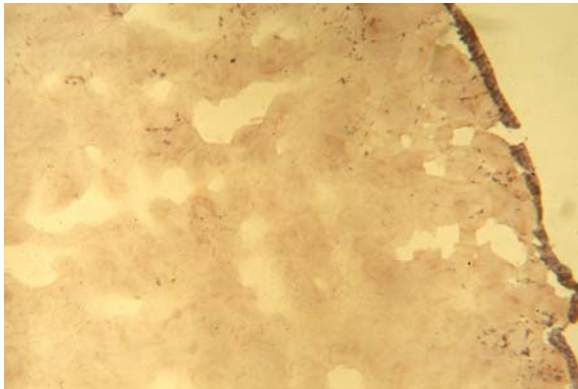
“Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size”

Cancer Res. 55 (1995): 3752-3756

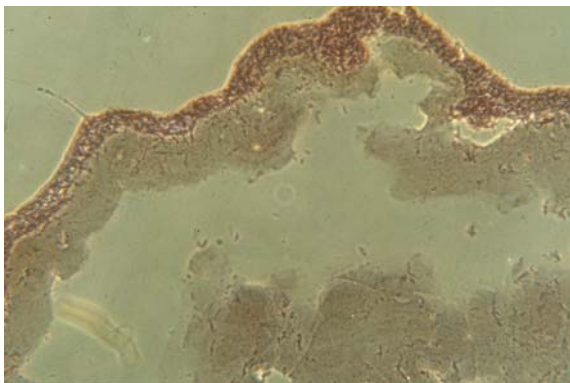
7. Anhang



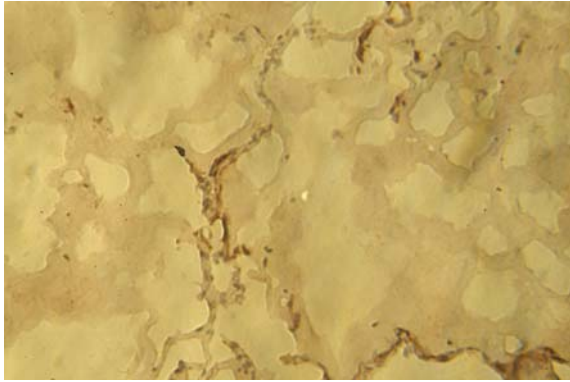
1. Immunhistologie, CD31-Färbung. Hier sieht man das Matrigel am Tag 5 ohne bFGF-Zusatz. Man erkennt, dass nur im Randbereich einige Gefäße zu sehen sind.



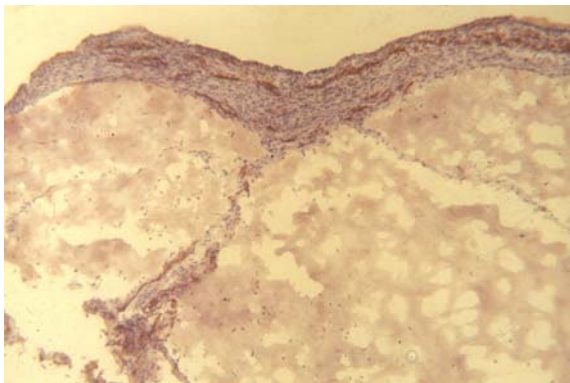
2. Immunhistologie CD31-Färbung. Auch im Matrigel mit bFGF-Zusatz sieht man am fünften Tag nur am Rand des Matrigels einige Gefäße. Es ist kein Unterschied zwischen mit bFGF versetztem und alleinigem Gel aufzuzeigen.



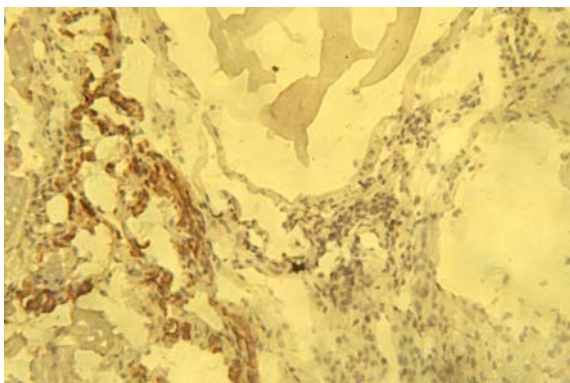
3. Immunhistologie CD31-Färbung. Hier ist das Matrigel ohne bFGF-Zusatz am Tag 10 abgebildet. Im Randbereich des Gels sieht man eine deutliche Gefäßantwort.



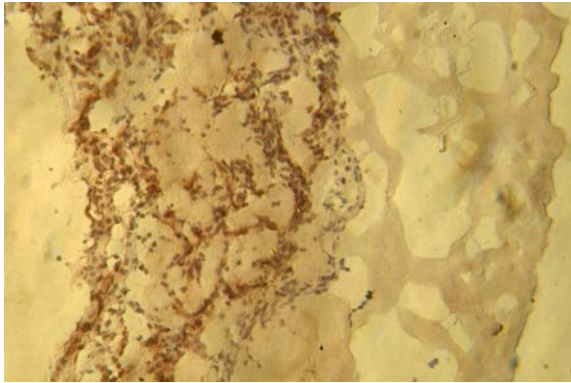
4. Immunhistologie CD31-Färbung. Hier ist das alleinige Matrigel am zehnten Tag im Gelzentrum dargestellt. Man erkennt, dass einige Gefäße auch bis in die Mitte des Gels vorgedrungen sind. Im Vergleich zu Tag 5 sieht man am zehnten Tag eine deutliche Zunahme der Gefäßantwort.



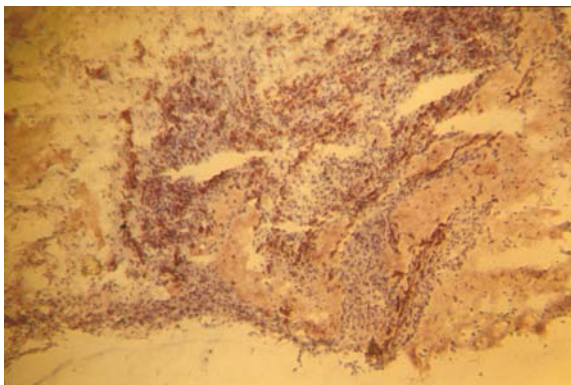
5. Immunhistologie CD31-Färbung. Hier ist das Matrigel mit bFGF-Zusatz am Tag 10 abgebildet. Auch hier sieht man eine Gefäßantwort im Randbereich, die sich in die Mitte des Gels fortsetzt. Man erkennt jedoch keinen Unterschied zwischen dem mit bFGF versetzten und dem alleinigen Gel.



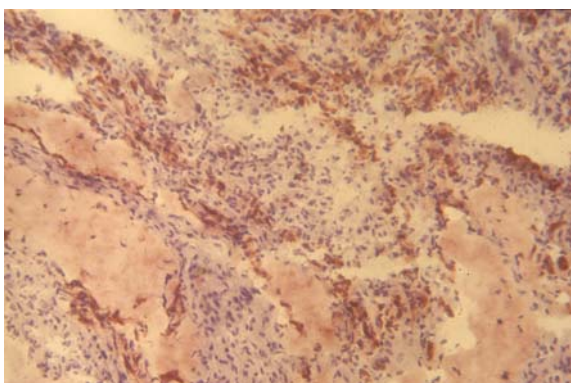
6. Immunhistologie CD31-Färbung. Hier ist das alleinige Gel am Tag 15 dargestellt. Man erkennt in der Gelmitte Gefäße, die das Gel durchsetzen.



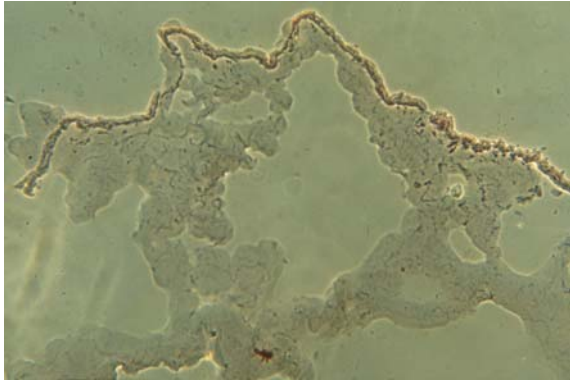
7. Immunhistologie CD31-Färbung. Hier ist das Matrigel mit bFGF-Zusatz am Tag 15 abgebildet. Auch hier sieht man, dass einige Gefäße das Gel durchsetzt haben. Im Vergleich zum alleinigen Gel sieht man hier eine diskret verstärkte Gefäßantwort.



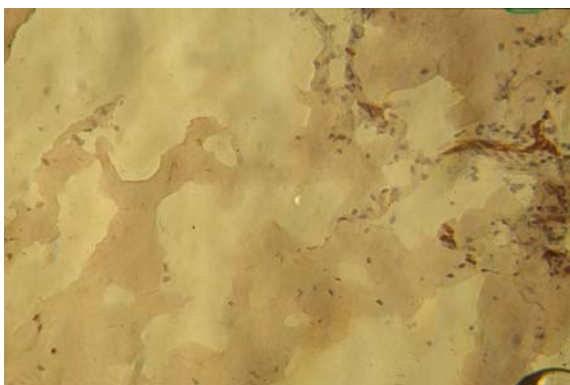
8. Immunhistologie CD31-Färbung.



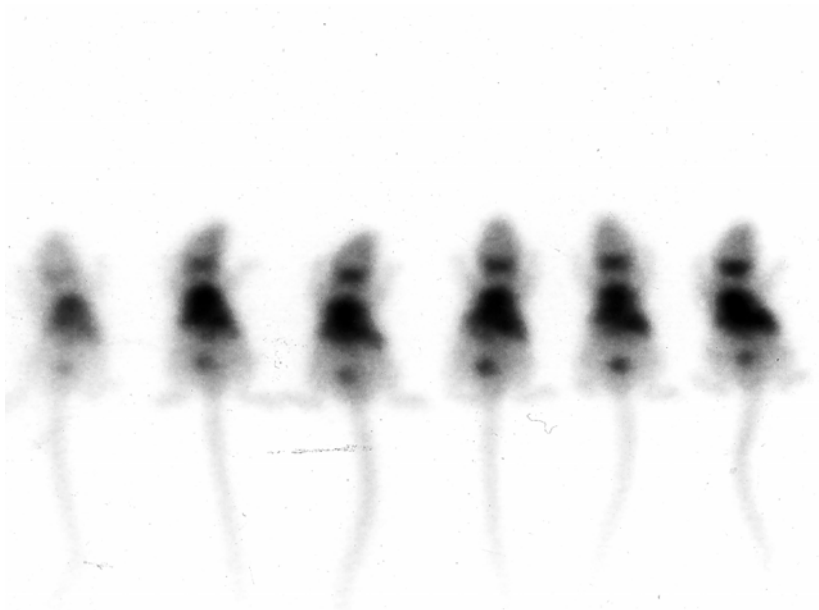
9. Immunhistologie CD31-Färbung. In den Abbildungen 8 und 9 sieht man depletiertes Matrigel am Tag 10, welches mit bFGF versetzt wurde. In beiden Darstellungen sieht man eine starke Gefäßantwort, welche das gesamte Gel durchsetzt. Im Vergleich zur Matrigel-Matrix ist in dem depletierten Gel eine deutliche Zunahme der Gefäßmenge zu beobachten.



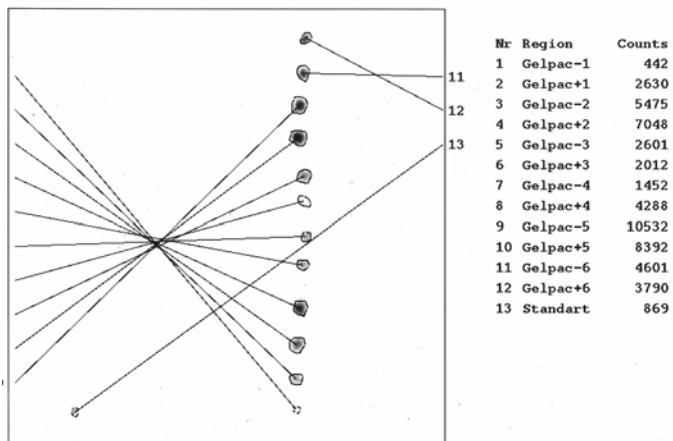
10. Immunhistologie CD31-Färbung.



11. Immunhistologie CD31-Färbung. In den Abbildungen 10 und 11 ist jeweils das depletierte Matrigel am Tag 10, welches mit bFGF und einem selektiven COX-2-Hemmer (NS 398) versetzt wurde, dargestellt. In der Abbildung 10 erkennt man den Randbereich des Gels. Nur eine diskrete Anzahl von Gefäßen ist erkennbar. In der Abbildung 11 ist das Gelzentrum dargestellt; auch hier sieht man nur vereinzelt eine Gefäßantwort. Wenn man nun die mit bFGF versetzten mit denen mit zusätzlich NS 398 versetzten Gelen vergleicht, sieht man eine deutliche Reduzierung der Gefäßantwort.



12. Hier sieht man die Mäuse unter der Gammakamera. Die Erythrozyten wurden mit Tc^{99m} markiert.



13. Hier erkennt man die entnommenen Matrigele unter der Gammakamera. Die Erythrozyten wurden mit Tc^{99m} markiert und die *counts* der einzelnen Gele in Bezug zu einem Standard gemessen.

8. Abkürzungsverzeichnis:

aFGF	acidic Fibroblast Growth Factor
Ang-1	Angiopoetin-1
Ang-2	Angiopoetin-2
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
CD31	endothelspezifisches Oberflächenantigen
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
FGF 1	acidic Fibroblast Growth Factor
FGF 2	basic Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Rezeptor
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
HWZ	Halbwertszeit
IL	Interleukin
IFN- α	Interferon α
i.v.	intra venös
Kev	Kiloelektronenvolt
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
Mo	Molybdän
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PBS	Phosphat Buffered Salin (Phosphatpuffer)
PET	Positronenemmissionstomographie
PF 4	Plättchenfaktor 4
PIGF	Plazenta Wachstumsfaktor
Ru	Ruthenium
Tc ^{99m}	Technetium 99m
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β
TNF- α	Tumornekrose Faktor α
TPS	Thrombospondin
VEGF	Gefäßendothel Wachstumsfaktor

9. Danksagung

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Privatdozent Doktor Wolfgang Weber für die Ausarbeitung des Themas und für die Bereitstellung eines hervorragend ausgestatteten Arbeitsplatzes am Institut der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München.

Den Mitarbeitern im Labor danke ich für die tatkräftige, geistige sowie seelische Unterstützung bei der Ausführung meiner Experimente. Mein besonderer Dank gilt Frau Claudia Bodenstein, die mich während meiner gesamten Arbeit begleitet hat.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Grahneis und Frau Hoffmann, die liebevoll Hilfe bei den Gammakameraaufnahmen geleistet haben.

Bei meiner Familie und meinem Freund möchte ich mich für die sorgfältige Korrektur der schriftlichen Arbeit bedanken.

Ebenso möchte ich allen, die mir während der Jahre meiner Doktorarbeit ein offenes Ohr und aufmunternde Worte geschenkt haben, meinen Dank aussprechen.