



Ein neues *in vitro* Modell zur Quantifizierung der Angiogenese

Mahtab Bahramsoltani und Johanna Plendl

Fachbereich Veterinärmedizin, Institut für Veterinär-Anatomie, Freie Universität Berlin, D-Berlin

Zusammenfassung

Der Einsatz proangiogener Faktoren zur Therapie verschiedener Erkrankungen verzeichnet steigendes Interesse. Die Quantifizierung der Angiogenese, die bislang vor allem in Tiermodellen stattfindet, ist eine Bedingung für die Ermittlung der angiogenen Wirkung einer Substanz.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde eine neue Methode zur Quantifizierung der Angiogenese *in vitro* etabliert. Dazu wurden Endothelzellen mit den zu testenden angiogenen Faktoren inkubiert und über einen bestimmten Untersuchungszeitraum in definierten mikroskopischen Bildausschnitten an jedem 2. Tag photographisch dokumentiert. Jedem Zellbild wurde eines der festgelegten Stadien der Angiogenese (1-8) *in vitro* zugewiesen. Für jeden Bildausschnitt wurde die Summe der an allen Untersuchungstagen zugewiesenen Stadien gebildet und miteinander verglichen. Diese sowie morphometrische Untersuchungen zeigten, dass die Angiogenese *in vitro* bis hin zur Entwicklung kapillarähnlicher Strukturen mit Lumen quantifizierbar ist. Die Validierung der Methode ergab, dass diese reproduzierbar und routinemäßig von verschiedenen Untersuchern mit einem vertretbaren Zeit- und Kostenaufwand sowie Stichprobenumfang durchgeführt werden kann.

Summary: A new *in vitro* model to quantify angiogenesis

At present the therapeutical use of proangiogenic factors is in the focus of interest. Quantitation of angiogenesis, which is done particularly in animal models, is a prerequisite for the determination of the angiogenic effect of a particular substance.

In the frame of this study a new method for quantitation of angiogenesis *in vitro* was established. Endothelial cells were incubated with angiogenic factors to be tested, and documented photographically in defined microscopical sectors over a certain time period. Subsequently defined stages of angiogenesis (1-8) were assigned. For each sector all stages assigned were summarized and compared with each other. This and additional morphometric studies showed that angiogenesis up to the development of lumenised capillary-like structures *in vitro* can be quantified. Validation of the method showed that routine and reproducible accomplishment should be possible for different investigators with a maintainable effort of time and costs.

Keywords: endothelial cells, angiogenesis, quantitation, *in vitro* model, 3R

1 Einleitung

Der Prozess der Angiogenese umfasst die Sprossung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Kapillaren und deren Regression (Folkman, 2003). Sie ist eine Voraussetzung für Wachstum und Differenzierung von Organen und Geweben, weil sie die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff gewährleistet. Abgesehen von der elementaren Bedeutung der Angiogenese während der embryonalen Entwicklung, ist sie im gesunden, adulten Organismus herunter reguliert. Nur bei der Entwicklung des Gelbkörpers, der Plazenta und der Milch-

drüse spielt sie dann noch eine Rolle (Risau, 1997; Plendl et al., 2002a, b). Jedoch ist Angiogenese an einer Vielzahl pathologischer Prozesse, vor allem beim Wachstum und der Metastasierung eines Tumors, aber auch beispielsweise bei bestimmten Formen der Arthritis und der Retinopathie, beteiligt (Folkman, 1995).

Sowohl die Stimulation der Angiogenese zur Ausbildung neuer Kapillaren in einem ischämischen Gebiet (z.B. nach Infarkten), als auch ihre Inhibierung, die sogenannte Antiangiogenese zur Hemmung von Tumorwachstum und -metastasierung, sind von besonderem

therapeutischen Interesse (Folkman, 1984; Ibukiyama, 1996).

Angiogenese erfolgt in einer charakteristischen Kaskade aus Migration, Proliferation, Differenzierung und Lumenbildung durch vaskuläre Endothelzellen, die alle Gefäße auskleiden und die Kapillaren bilden. Die Regulation der Angiogenese und Antiangiogenese erfolgt im Organismus durch verschiedene lösliche Faktoren. Der Einfluss eines die Angiogenese stimulierenden oder hemmenden Faktors kann auf den verschiedenen Ebenen der angiogenen Kaskade, wie beispielsweise dem Abbau der Basalmembran, der Endothelzellmigration bzw. -proliferation oder der dreidimensionalen Organisation der Endothelzellen, erfolgen. Der *vascular*



endothelial growth factor-A (VEGF-A) und *fibroblast growth factor -2* (FGF-2), deren Wirkung auf die Angiogenese in der vorliegenden Studie geprüft wurden, zählen zu den besonders wichtigen proangiogenen Faktoren. VEGF-A wird von Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen gebildet (Josko et al., 2000). Die VEGF-Genfamilie umfasst sechs Mitglieder. Neben dem VEGF-A sind dies VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und der *placenta growth factor* (PlGF) (Suhardja and Hoffman, 2003).

Bislang sind fünf verschiedene Isoformen des VEGF-A identifiziert worden. Dabei handelt es sich um VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉ und VEGF-A₂₀₆ (Enomoto et al., 2003), wobei VEGF-A₁₆₅ in den meisten Geweben die vorrangig sezernierte Isoform ist (Kalka et al., 2000b). Die Sekretion von VEGF-A wird stimuliert durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise *platelet derived growth factor-BB* (PDGF-BB) und *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), aber auch durch Hypoglykämie und Hypoxie (Brogi et al., 1996; Stein et al., 1995). Seine Wirkung umfasst neben der Stimulation der Angiogenese auch eine Steigerung der Gefäßpermeabilität. Über die Bindung an seine endothelialen Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 bewirkt VEGF-A als Mitogen die Proliferation der Endothelzellen und ist somit direkt angiogen. Die indirekte Wirkung des VEGF-A besteht in der Aktivierung von Plasminogen-Aktivatoren, wodurch die Migration der Endothelzellen stimuliert wird (Kalka et al., 2000b).

FGF-2 ist ein wichtiger Vertreter der FGF-Familie (Nicosia and Villaschi, 1999), der insgesamt aus 22 Heparinbindenden Molekülen besteht (Wilkie et al., 2002). Die Freisetzung des FGF-2 erfolgt aus unterschiedlichen Zellen, wie beispielsweise aus Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Perizyten (Fernig and Gallagher, 1994). Von den verschiedenen Rezeptoren konnte der FGFR-1 auf mikrovaskulären Endothelzellen nachgewiesen werden (Pepper et al., 1996). FGF-2 wirkt mitogen auf Endothelzellen und ist damit ein direkter

Angiogenese-Stimulator. FGF-2 verfügt auch über eine indirekte Wirkung, indem es die Produktion und Sekretion von Plasminogen-Aktivatoren und Kollagenasen in den Endothelzellen und damit deren Migration stimuliert (Fernig and Gallagher, 1994).

Ein weiterer wichtiger endogener proangiogener Faktor, der vor allem in den späteren Phasen der Angiogenese eingreift, ist das Angiopoietin-1 (Ang-1), das von periendothelialen Zellen, wie beispielsweise Perizyten und Fibroblasten, sezerniert wird (Patan, 2000). Im Gegensatz zu VEGF-A und FGF-2 hat Ang-1 nur eine schwache proliferative Wirkung auf die Endothelzellen (Witzenbichler et al., 1998) und stimuliert insbesondere ihre Migration und Differenzierung und somit die Lumenisierung des Endothelzellsprosses (Patan, 2000).

Der klinische Einsatz pro- und antiangiogener Faktoren ist derzeit noch limitiert. Abgesehen vom nur eingeschränkt bekannten Wirkungsmechanismus ist häufig auch nicht bekannt, in welcher Phase der angiogenen Kaskade sie eingreifen (Auerbach et al., 2003). Ebenso fehlen auch Kenntnisse über die Konzentrationen der Substanzen, die zur Beeinflussung der Angiogenese im klinischen Einsatz ausschlaggebend sind (Jain et al., 1997).

Die Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese, also ihre Darstellung in messbaren Größen, ist eine grundlegende Bedingung für die Ermittlung der angiogenen bzw. antiangiogenen Wirkung einer Substanz. Diese quantitativen Untersuchungen finden bislang vor allem in Tiermodellen statt, von denen viele sehr umstritten sind, insbesondere solche, die am Auge verschiedener Wirbeltiere durchgeführt werden (Ashton and Cook, 1953).

Am häufigsten wird das so genannte Cornea-Modell der Angiogenese eingesetzt, da die Hornhaut des Auges (Cornea) physiologischerweise keine Blutgefäße aufweist. Daher kann durch das Setzen eines proangiogenen Stimulus im Bereich der Cornea die Angiogenese direkt quantifiziert werden, ohne eine vorhandene Vaskularisation zu berücksichtigen. Allerdings ist eine kontinuierliche Beobachtung der Angiogenese durch die limitierte Fläche der

Cornea auch zeitlich eingegrenzt. Die Quantifizierung der Angiogenese wird nicht selten dadurch erschwert, dass durch die Manipulationen sowie die verwendeten Trägermaterialien eine entzündliche Reaktion ausgelöst und somit die Angiogenese stimuliert wird (Auerbach et al., 2003). Weitere Nachteile des Cornea-Modells sind der hohe Zeit- und Kostenaufwand und die durch die erforderlichen chirurgischen Maßnahmen zur Einbringung der Testsubstanzen eingeschränkte Tierzahl (Kruger et al., 2001). Obwohl die Manipulationen am Auge meist unter Narkose durchgeführt werden, sind die Experimente aus Sicht des Tierschutzes sehr bedenklich, da sie durch die intensive sensible Innervation der Cornea (Nickel et al., 1992) auch nach dem Einbringen der Testsubstanzen mit starken Schmerzen verbunden sein dürften. Abgesehen vom Cornea-Modell bieten nur wenige der zahlreichen Tiermodelle, namentlich die Dauerfenster-Modelle und das Chorioallantoismembran-Modell (CAM), die Möglichkeit der zur Quantifizierung der Angiogenese notwendigen kontinuierlichen Beobachtung der Blutgefäßbildung.

Die Implantation von transparenten Beobachtungskammern ist eine der ältesten Methoden, die bis heute meist in Form der dorsalen Hautfalten-Kammer zur Untersuchung und Quantifizierung der Angiogenese bei Maus, Ratte und Hamster eingesetzt wird (Algire, 1943; Greenblatt and Shubik, 1968; Dellian et al., 2000). Abgesehen davon, dass die zur Untersuchung herangezogenen Gewebe bereits vaskularisiert sind, ist die durch das Einbringen der Beobachtungskammer stimulierte Bildung von Granulationsgewebe und damit neuen Blutgefäßen, unvermeidbar (Auerbach et al., 2000). Wie beim Cornea-Modell sind auch hier die Präparation des Gewebes und die Implantation der Kammer, die schwierig und zeitaufwendig ist, limitierende Faktoren für den Stichprobenumfang. Obwohl transparente Kammern die Möglichkeit zur permanenten Beobachtung der Gefäßbildung bieten, sind die entwickelten Methoden zur Quantifizierung der Angiogenese häufig mit zusätzlichem Aufwand, wie der intravenösen Ap-

plikation fluoreszierender Substanzen, verbunden und nicht selten ungenau (Vollmar et al., 2001). Im Gegensatz zum Cornea- und Dauerfenster-Modell stellt das CAM-Modell ein sehr einfaches Verfahren zur Untersuchung und Quantifizierung der Angiogenese dar. In der Chorioallantoismembran des bebrüteten Hühnereis, die zwischen dem 4. und 10. Bebrütungstag aus der Fusion der mesodermalen Schichten der Allantois und des Chorion hervorgeht, entwickelt sich ein Netzwerk von Gefäßen, das über die Arterien und Venen der Allantoismembran mit dem Gefäßsystem des Hühnerembryos in Verbindung steht (Ausprunk et al., 1974). Die sich hier vollziehende Angiogenese kann durch die Fenestrierung der Schale bzw. durch das Überführen des Embryos in eine Petrischale überwacht werden (Auerbach et al., 2003). Damit ist in diesem Modell der Stichprobenumfang kein limitierender Faktor. Dennoch führt jede Irritation und Änderung des Sauerstoffpartialdrucks, die beispielsweise das Öffnen der Schale zur Folge hat, zu einer angiogenen Antwort (Auerbach et al., 2000). Dadurch wird die Quantifizierung der Wirkung proangiogener Faktoren erschwert. Ebenso stellt auch das sich physiologischerweise im Wachstum befindende Gefäßnetz der CAM ein Problem bei der Quantifizierung der Angiogenese dar (Knighton et al., 1991). Die Untersuchungen an der CAM erfolgen meist zwischen dem 7. und 12. Bebrütungstag (Ribatti et al., 1996, 2000; Nguyen et al., 1994; Sheu et al., 1998; Brooks et al., 1999; Yokoyama et al., 2000; Célérier et al., 2002). Zu diesem Zeitpunkt sind die extraembryonalen Blutgefäße (Dotter sack und CAM) nicht innerviert. Die Sensitivität des Embryos, dessen Kreislauf mit diesen Gefäßen in Verbindung steht, entwickelt sich aber beginnend um den 7. Bebrütungstag (Rosenbruch, 1997).

Als Ersatz- und Ergänzungsmethode zum Tierversuch (Rusche, 2003) sind daher die Entwicklung und Etablierung von Methoden zur Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese *in vitro* von besonderer Relevanz. Da Angiogenese definiert ist als die Bildung neuer Gefäße, impliziert dies die

Notwendigkeit der dreidimensionalen Organisation der Endothelzellen in kapillarähnliche Strukturen mit einem Lumen *in vitro*.

Das wissenschaftliche Prinzip der 3R stellt ein Konzept zur Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch dar (Rusche, 2003). Hierbei stehen die 3R für die englischen Ausdrücke *reduction* (Reduzierung), *refinement* (Verfeinerung, Verbesserung) und *replacement* (Ersatz). In einem *in vitro* Modell der Angiogenese, das im Sinne dieses 3R-Prinzips *in vivo* Untersuchungen ergänzen und vielleicht ersetzen soll, ist die Quantifizierung aller Phasen der Angiogenese, also auch die Bildung kapillarähnlicher, lumenisierter Strukturen, eine zwingende Voraussetzung.

Bislang wurden unterschiedliche Modelle von Endothelzellkulturen vorgestellt, in denen verschiedene Formationen endothelialer Strukturen als „kapillarähnliche Strukturen“ bezeichnet wurden (Vailhé et al., 2001). Eine Quantifizierung der Angiogenese erfolgte in den verschiedenen *in vitro* Modellen allerdings meist nur fragmentarisch auf der Basis der Migration und Proliferation, selten aber der dreidimensionalen Organisation der Endothelzellen (Bishop et al., 1999).

Für die vorliegende Untersuchung standen mehrere bereits intensiv charakterisierte Endothelzell-Linien aus dem bovinen Gelbkörper, die sämtliche Phasen der Angiogenese einschließlich dreidimensionaler Organisation von kapillarähnlichen Strukturen mit Lumen zeigten, zur Verfügung (Plendl, 1997; Plendl und Sinowatz, 1999; Plendl et al., 2000). Das *corpus luteum* gilt als hervorragendes Modell, da in diesem Organ die Zyklus bedingte Angiogenese intensiver als in malignen Tumoren auftritt (Rodger et al., 1997).

Das Ziel dieser Studie war es, eine Methode zur Quantifizierung der Angiogenese in einem *in vitro* Modell zu etablieren, das als Ergänzungsmethode zum Tierversuch eingesetzt werden kann. Mit dieser Methode, deren naturgemäß umfangreiche Validierung nach biometrischen Vorgaben durchgeführt wurde, sollten alle Phasen der Angiogenese *in vitro* quantifizierbar sein.

Zu berücksichtigen war auch, dass die Quantifizierungsmethode von verschiedenen Untersuchern durchgeführt werden kann, reproduzierbar ist und sich der Zeit- und Kostenaufwand in einem vertretbaren Rahmen bewegt.

2 Material und Methoden

Die in allen Untersuchungen eingesetzten mikrovaskulären Endothelzellen stammten aus Gelbkörpern von Schlachtrindern. Die Isolierung der Endothelzellen erfolgte aus Gelbkörpern verschiedener Entwicklungsstadien nach bereits publizierten Methoden (Plendl et al., 1996; Plendl, 1997; Plendl et al., 2000; Budde, 1999).

Die Identifizierung der Endothelzellen erfolgte nach der Isolierung und vor dem Einsatz im Experiment mittels der Untersuchung der *in vitro* Aufnahme von acetyliertem *low density lipoprotein* (acLDL), der immunhistochemischen Lokalisation des von Willebrand-Faktors (vWF) und des Nachweises der zellulären Bindung des *Lektins Bandeiraea simplicifolia Agglutinin I* (BS-I) (Plendl, 1997; Plendl et al., 2002a, b). Als Negativkontrollen dienten Granulosazellen aus dem bovinen *corpus luteum* (Plendl et al., 2002c, d).

Die Kultivierung der Endothelzellen erfolgte mit Gelatine (1,5% in PBS, Difco Laboratories, Detroit, USA) beschichteten 24-Loch-Platten (Iwaki, Tokyo, Japan). Für die Untersuchungen wurden die Zellen in einer Konzentration von ca. 45.000 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Die Zellzählung erfolgte mit einem Hämozytometer (GLW, D-Würzburg). Als Erhaltungsmedium für die Kultivierung wurde *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) mit 10% fetalem bovinem Serum, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml) eingesetzt (alle Komponenten von Sigma-Aldrich GmbH, D-Taufkirchen). Die Stimulation der Endothelzellen zur Angiogenese erfolgte mit einem Selektivmedium, welches zusätzlich 10% fetales bovines Serum, 1% BME-Vitamine (Sigma-Aldrich GmbH, D-Taufkirchen), 1% Heparin-Lösung (0,25%; Sigma-Aldrich GmbH, D-Taufkirchen), 2% *endothelial*



cell growth supplement (2,5 mg/ml; Schubert & Weiss GmbH, D-München) und 20% S 180-konditioniertes Medium (s.u.) im Erhaltungsmedium enthielt. Zur Herstellung des S180-konditionierten Mediums wurden murine Sarkomzellen (zur Verfügung gestellt von Prof. R. Auerbach, Universität Wisconsin, Madison, USA) im Erhaltungsmedium kultiviert. Das Medium wurde nach dem Farbumschlag abgesaugt, 5 min bei 1050 U zentrifugiert, der Überstand mit 0,2 µm Filtern (Schleicher & Schüll GmbH, D-Dassel) steril filtriert und bis zur Verwendung bei -20°C tiefgefroren.

Als proangiogene Faktoren wurden *vascular endothelial cell growth factor* (VEGF, human, rekombinantes Antigen; Biotrend Chemikalien GmbH, D-Köln) und *fibroblast growth factor-2* (FGF-2, aus der bovinen Hypophyse; Biotrend Chemikalien GmbH, D-Köln) dem Erhaltungsmedium in einer Konzentration von 10 ng/ml (Cavallaro et al., 2001) zugegeben.

Der Mediumwechsel erfolgte an jedem 3. Tag, wobei die Medien zur Stimulation der Angiogenese stets die verschiedenen Faktoren in den genannten Konzentrationen enthielten.

Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem CO₂-Begasungsbrutschrank (INCO2/1, Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach) in einem offenen System bei 37°C mit 5% CO₂ und Wasserdampf-sättigung.

Die phasenkontrastmikroskopischen Untersuchungen wurden einmal täglich mit einem Invert-Mikroskop (Axiovert 25; Zeiss, D-Jena) durchgeführt. Mit Hilfe des am Objektisch installierten Objektführers wurden zur Quantifizierung der Angiogenese per Koordinaten Bildausschnitte (3.2) festgelegt. Digitale Aufnahmen von den kultivierten Endothelzellen wurden mittels einer Videokamera (Inteq 000610; Inteq, D-Berlin) und dem Bildbearbeitungssystem Axiovision (Version 3.0; Zeiss, D-Jena) erstellt. Axiovision ist ein modular aufgebautes Bildbearbeitungs- und Analysesystem für die Lichtmikroskopie. Die Basisfunktionalität umfasst die Bildaufnahme, Bildverarbeitung und Bildarchivierung. Als zusätzliches Modul wurde das interaktive Messen installiert. Mit den in diesem

Modul enthaltenen Messwerkzeugen erfolgte die morphometrische Untersuchung der Angiogenese an den sich *in vitro* bildenden kapillarähnlichen Strukturen. Diese umfasste die Messung der Fläche, Länge und der Anzahl der Verzweigungspunkte der genannten Strukturen. Der Begriff kapillarähnliche Strukturen für endotheliale, tubuläre Formationen wurde erstmals von Folkman und Haudenschild (1980) verwendet. Obwohl die Bildung kapillarähnlicher Strukturen in zahlreichen zwei- und dreidimensionalen Modellen der *in vitro* Angiogenese beschrieben wurde, besteht bis heute keine einheitliche Definition für diesen Terminus. Im hier vorgestellten *in vitro* Modell der Angiogenese erfolgte die Definition für kapillarähnliche Strukturen in Anlehnung an eine von Nehls und Drenckhahn (1995) vorgestellte Methode zur Quantifizierung der Angiogenese. Sie definierten eine kapillarähnliche Struktur als eine Reihe von mindestens drei miteinander in Kontakt stehenden Endothelzellen. In der vorliegenden Untersuchung wurde als kapillarähnliche Struktur ein Endothelzellstrang definiert, an dem mindestens drei Endothelzellreihen beteiligt waren. Dies war vor allem möglich, da in zusätzlich durchgeführten transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen nachgewiesen wurde, dass auch Endothelzellstränge, die aus zwei Endothelzellreihen bestanden, bereits ein zellfreies Lumen aufwiesen. Allerdings konnten bei der phasenkontrastmikroskopischen Untersuchung aufgrund der dreidimensionalen Organisation der Endothelzellen nicht immer die einzelnen Zellreihen eindeutig identifiziert werden. Aus diesem Grunde wurde der Durchmesser von 40 strangartigen Strukturen ermittelt, bei denen phasenkontrastmikroskopisch eindeutig 3 beteiligte Endothelzellreihen nachgewiesen werden konnten. Anschließend wurde das arithmetische Mittel der ermittelten Durchmesser berechnet, welches 27,6 µm (~28 µm) betrug (Abb.1e). Somit wurden zur Quantifizierung der Angiogenese kapillarähnliche Strukturen als strangartige Strukturen mit einem Mindstdurchmesser von 28 µm definiert. In einer eigenen Untersuchung

wurde innerhalb dieser Strukturen elektronenmikroskopisch ein Lumen nachgewiesen.

Da die weiteren Methoden zur Etablierung und Validierung der Quantifizierung der Angiogenese, die die Untersuchung durch verschiedene Personen in verschiedenen Versuchsansätzen und zeitlichen Verläufen umfassen, ein Ergebnis dieser Studie darstellen, werden sie im Folgenden (3.2) präsentiert.

3 Ergebnisse

3.1 Stadien der Angiogenese *in vitro*

Endothelzellen wurden in dem Selektivmedium kultiviert und durch die in diesem Medium enthaltenen proangiogenen Faktoren zur Angiogenese stimuliert. Der Prozess der *in vitro*-Angiogenese stellte sich dabei als eine charakteristische Reihenfolge morphologischer Veränderungen der Zellen dar, der anhand des phasenkontrastmikroskopischen Zellbilds in folgende eindeutig definierte Stadien unterteilt wurde.:

Stadium 1: Konfluenten Monolayer

Nach der initialen Proliferation im Anschluss an die Aussaat, bildeten die Endothelzellen einen konfluenten Monolayer. Die Morphologie der Endothelzellen war polygonal und entsprach dem für diese Zellen typischen „Kopfsteinpflaster-Muster“ (Abb.1a).

Stadium 2: Aussprossung, frühe Phase

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

Stadium 3: Aussprossung, späte Phase

Im Stadium 3 zeigten mehr als die Hälfte der Endothelzellen im Gesichtsfeld eine lang gestreckte Gestalt und somit die Ausbildung von Zellausläufern (Abb.1b).

Stadium 4: Lineare Aneinanderreihung, frühe Phase

Nachdem die Endothelzellen Zellausläufer gebildet hatten, reiheten sich diese, von verschiedenen Arealen der Kulturschale ausgehend, linear aneinander. Im Stadium 4 wurde die Anzahl linear aneinander gereihter Endothelzellen innerhalb des Gesichtsfelds auf

weniger als die Hälfte der Gesamtzellzahl im Ausschnitt geschätzt.

Stadium 5: Lineare Aneinanderreihung, späte Phase

Im weiteren Verlauf nahm die Anzahl der Endothelzellen, die linear aneinander gereiht waren, stetig zu. Das Stadium 5 war erreicht, als mehr als die Hälfte

der Endothelzellen im Gesichtsfeld in Einzelzellreihen organisiert war (Abb. 1c).

Stadium 6: Netzwerkbildung

Durch Verlängerung und Aneinanderlagerung der Zellreihen bildete sich ein feines Netzwerk, das in dieser Phase vor allem aus Einzelzellreihen bestand. Die im Netzwerk organisierten Endothelzellen lösten sich dabei partiell von den noch im Monolayer wachsenden Zellen. Dadurch war eine untere Schicht der Zellen, die im Zellrasen wuchsen, von einer darüber liegenden Schicht, in der die Zellen im Netzwerk organisiert waren, zu unterscheiden. Gleichzeitig begann in diesem Stadium die allmähliche Auflösung des ursprünglich konfluenten, im Monolayer angeordneten Zellrasens (Abb. 1d).

Stadium 7: Dreidimensionale Organisation, frühe Phase

Durch die Zunahme der Anzahl der in Strängen organisierten Endothelzellen vergrößerte sich im Folgenden der Durchmesser der Zellstränge des Netzwerks. Das Stadium 7 war erreicht, als sich die ersten kapillarähnlichen Strukturen mit Lumen gebildet hatten (Abb. 2).

Zusätzlich setzte sich in diesem Stadium die Reduzierung des Zellrasens am Boden der Kulturschale fort. In Gesichtsfeldern, in denen sich keine kapillarähnlichen Strukturen gebildet hatten, erfolgte die Zuordnung des Stadiums 7 anhand der Zelldichte des Zellrasens am Kulturschalenboden. In diesem Fall war das Stadium 7 dann erreicht, wenn nach subjektiver Einschätzung des Untersuchers weniger als die Hälfte des Kulturschalenbodens im Gesichtsfeld durch Zellen bedeckt war (Abb. 1e).

Stadium 8: Dreidimensionale Organisation, späte Phase

Durch die Aneinanderlagerung der Einzelzellreihen nahm der Durchmesser der kapillarähnlichen Stränge weiterhin zu. Gleichzeitig verringerte sich die Anzahl der Stränge. Auf diese Weise waren im Stadium 8 nur noch Endothelzellstränge mit einem Durchmesser von mehr als 28 µm, also kapillarähnliche Strukturen, vorhanden (Abb. 1f). Jedoch

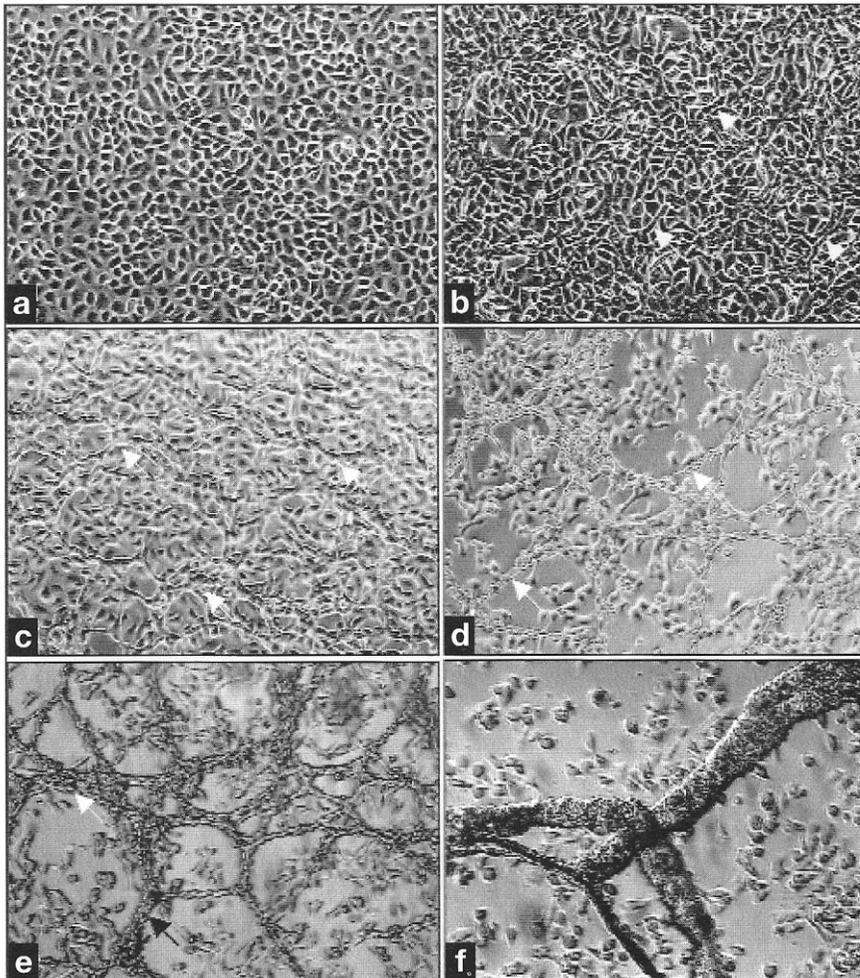


Abb. 1: Endothelzellen aus dem *corpus luteum* in Rückbildung

- a) 7 Tage in Kultur, Stadium 1: Konfluenten Monolayer im typischen „Kopfsteinpflaster-Muster“;
 b) 22 Tage in Kultur, Stadium 3: Mehr als die Hälfte der Zellen im Bildausschnitt bilden Zellausläufer (Pfeile);
 c) 37 Tage in Kultur, Stadium 5: Mehr als die Hälfte der Zellen im Bildausschnitt sind linear aneinander gereiht (Pfeile);
 d) 42 Tage in Kultur, Stadium 6: Aneinander gereichte Endothelzellen bilden ein Netzwerk (Pfeile), der Zellrasen am Kulturschalenboden ist nicht mehr konfluent;
 e) 50 Tage in Kultur, Stadium 7: Endothelzellen bilden erste kapillarähnliche Strukturen (Pfeile), der schwarze Pfeil kennzeichnet den Abschnitt einer kapillarähnlichen Struktur, der einen Durchmesser von 28 µm aufweist, der Zellrasen am Kulturschalenboden hat eine geringe Dichte (schräger Lichteinfall);
 f) 60 Tage in Kultur, Stadium 8: Bis auf wenige Zellen am Kulturschalenboden sind die Endothelzellen in kapillarähnlichen Strukturen organisiert, hier im Bild eine Struktur mit besonders großem Durchmesser (schräger Lichteinfall); Phasenkontrastmikroskop, 100 x

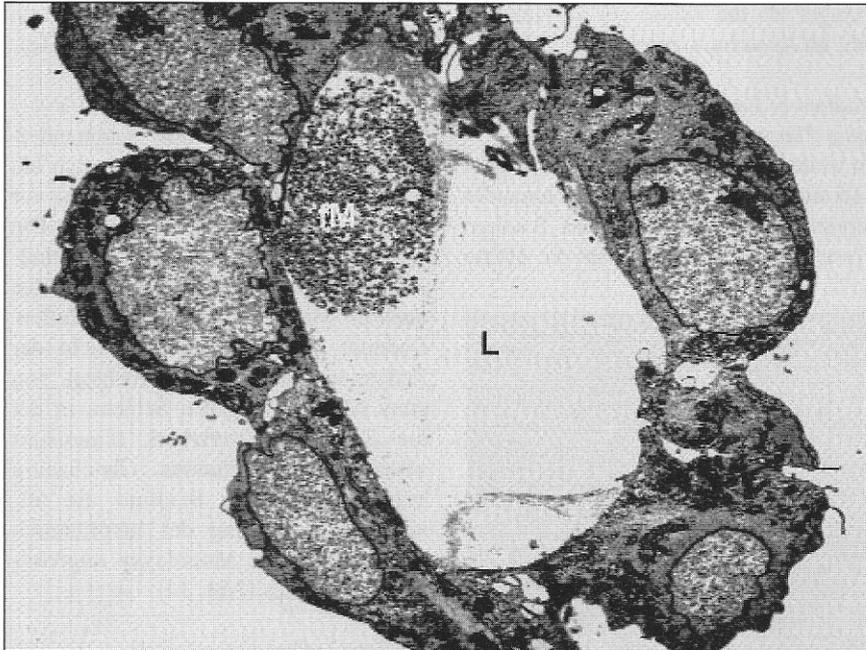


Abb.2: Endothelzellen aus dem bovinen corpus luteum in Rückbildung
60 Tage in Kultur. Querschnitt durch einen Endothelzelltubulus. Das endothelzellefreie Lumen im Inneren (L) hat einen Durchmesser von ca. 40 µm und ist nur teilweise mit fibrillärem Material (fM) ausgefüllt; Transmissionselektronenmikroskop, 2.000 x

lösten sich zu diesem Zeitpunkt viele dieser Strukturen vom Kulturschalboden ab, so dass in den meisten Gesichtsfeldern keine fest haftenden Strukturen mehr zu erkennen waren.

3.2 Etablierung und Validierung der Methode zur Quantifizierung der Angiogenese *in vitro*

Die Quantifizierung der Angiogenese *in vitro* wurde mittels der semiquantitativen Erfassung der oben beschriebenen Stadien im zeitlichen Ablauf sowie der Morphometrie der kapillarähnlichen Strukturen durchgeführt.

Die semiquantitative Analyse erfolgte anhand digitaler Aufnahmen, die vom phasenkontrastmikroskopischen Zellbild erstellt wurden. Zur Standardisierung des zu beurteilenden Gesichtsfelds wurden die Aufnahmen stets bei gleicher Vergrößerung (100 x) und in der gleichen Größe (691.200 µm²) gefertigt. Anschließend wurde dem Zellbild auf den erstellten Aufnahmen eines der acht definierten Stadien der Angiogenese *in vitro* zugewiesen.

Im Rahmen der Validierung der Quantifizierungsmethode wurde zunächst

die Einschätzung der Stadien der Angiogenese *in vitro* durch unterschiedliche Untersucher geprüft (3.2.1). Außerdem wurde die Einheitlichkeit (Homogenität) des Verlaufs der Angiogenese *in vitro* anhand der definierten Stadien in verschiedenen Kulturschalen und in verschiedenen

Bildausschnitten der Kulturschalen untersucht (3.2.2).

3.2.1 Semiquantitative Untersuchung und Validierung der Angiogenese *in vitro* durch verschiedene Untersucher

Endothelzellen wurden mit dem Selektivmedium kultiviert und über einen Zeitraum von 60 Tagen täglich phasenkontrastmikroskopisch untersucht. Nachdem sich ein konfluenter Zellrasen gebildet hatte, wurden an 17 Untersuchungstagen, jeweils alternierend nach drei und vier Tagen, Bildausschnitte (3.2) zufällig ausgewählt und photographisch dokumentiert. Diese insgesamt 68 Aufnahmen des Zellbilds wurden von zwei verschiedenen, unabhängigen Untersuchern in einer zufällig gewählten Reihenfolge beurteilt. Die Diagnose des Zellbilds in den erstellten Aufnahmen erfolgte auf der Grundlage der acht definierten Stadien der Angiogenese *in vitro* (3.1). Das Kriterium für die Auswahl der beiden Untersucher war, dass diese vergleichbare Kenntnisse und Erfahrung im Bereich der Kultivierung und mikroskopischen Untersuchung von Endothelzellen hatten. Von beiden Untersuchern wurde jedem Zellbild nach subjektiver Einschätzung eines der definierten Stadien der Angiogenese *in vitro* zugewiesen (Tab.1).

Anschließend wurde für jeden beurteilten Bildausschnitt die Differenz der

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

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

durch die beiden Untersucher zugewiesenen Stadien an jedem Untersuchungstag ($\Delta\chi$) berechnet. Die Differenzen der durch die beiden Untersucher zugewiesenen Stadien ($\Delta\chi$) schwankten zwischen 0 und 1, dabei war die Summe der Differenzen mit Ausnahme des 18. und 46. Tages ≤ 1 (Abb. 3).

Zusätzlich wurde die Abweichung der durch die beiden Untersucher zugewiesenen Stadien über den gesamten Untersuchungszeitraum bestimmt. Hierfür wurde für jeden Bildausschnitt die Summe der an den 17 Untersuchungstagen durch den jeweiligen Untersucher zugewiesenen Stadien (S) gebildet. Die Summen (S) lagen zwischen 60 und 74 (Abb. 4). Die Differenzen dieser Summen (ΔS) schwankten zwischen 0 und 5, das arithmetische Mittel betrug dabei $\overline{\Delta S}=2,8$.

3.2.2 Semiquantitative Untersuchung und Validierung der Angiogenese *in vitro* in verschiedenen Versuchsansätzen

Die Endothelzellen wurden in 12 Vertiefungen von 24-Loch-Platten ausgesät und mit dem Selektivmedium kultiviert. Am ersten Untersuchungstag wurden aus jeder Vertiefung sechs Bildausschnitte zufällig ausgewählt und photographisch dokumentiert. In jeder Vertiefung wurden jeweils 3 Bildausschnitte aus dem Randbereich und 3 Bildausschnitte aus der Mitte der Kulturschale gewählt. Somit erfolgten die Untersuchungen in insgesamt 72 per Koordinaten definierten Bildausschnitten, von denen zweimal wöchentlich Aufnahmen erstellt wurden.

Zur semiquantitativen Analyse der Angiogenese in den verschiedenen Vertiefungen der Zellkulturplatte wurde an jedem Untersuchungstag jedem Zellbild dieser 72 Bildausschnitte eines der definierten Stadien 1-8 der Angiogenese (3.1) durch den Untersucher zugewiesen.

Nach einem Zeitraum von 67 Tagen entsprach das vom Untersucher festgestellte Zellbild in allen Bildausschnitten dem Stadium 8 der Angiogenese *in vitro*. Die Dokumentation der Bildausschnitte und somit die semiquantitative Untersuchung der Angiogenese erfolgte alternierend nach drei und vier Tagen,

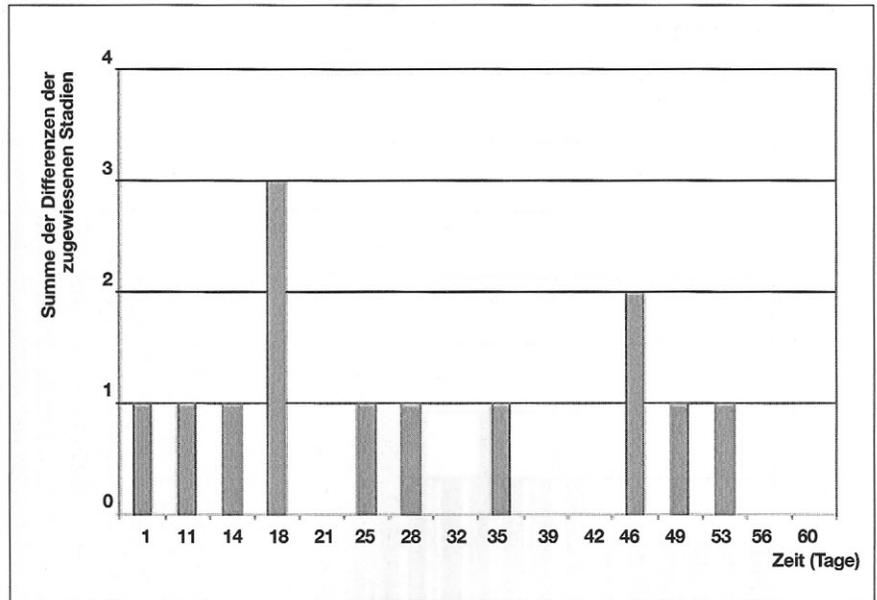


Abb. 3: Summe der Differenzen der durch die beiden Untersucher zugewiesenen Stadien der Angiogenese *in vitro* an jedem Untersuchungstag

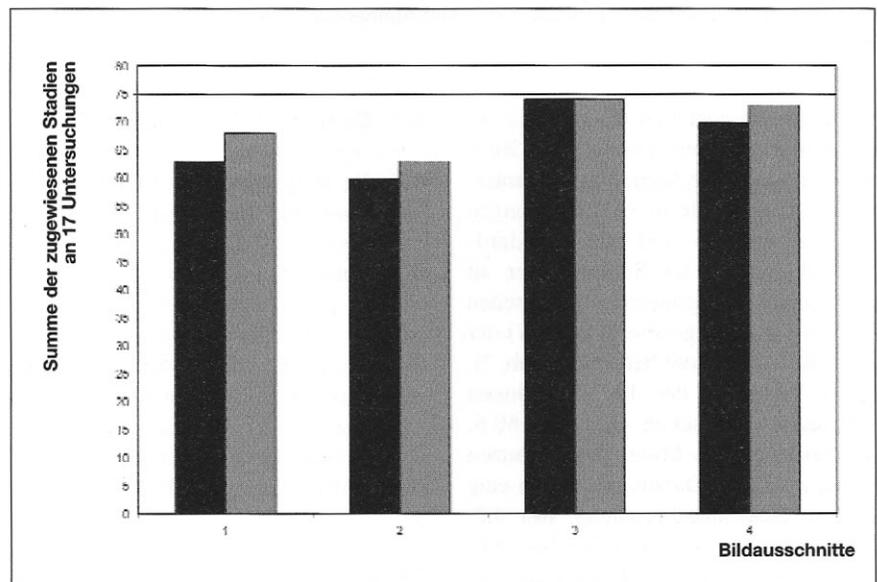


Abb. 4: Summen der an den 17 Untersuchungstagen durch den jeweiligen Untersucher (U1 = schwarz, U2 = grau) zugewiesenen Stadien der Angiogenese *in vitro* für die Bildausschnitte 1-4

somit also an 19 Untersuchungstagen. Beispielhaft ist der zeitliche Verlauf der Stadien der Angiogenese für eine Vertiefung der Zellkulturplatte in der Abb. 5 dargestellt.

Zur Analyse des zeitlichen Ablaufs der Angiogenese wurde für jeden Bildausschnitt die Summe der an den 19 Untersuchungstagen zugewiesenen Stadien der

Angiogenese *in vitro* (S) berechnet. Die Summen (S) schwankten in den 72 Bildausschnitten zwischen 81 und 102, wobei sowohl das Minimum (81), also der zeitlich langsamste Ablauf der Angiogenese, als auch das Maximum (102), mithin der zeitlich schnellste Ablauf der Angiogenese, in derselben Vertiefung auftraten.

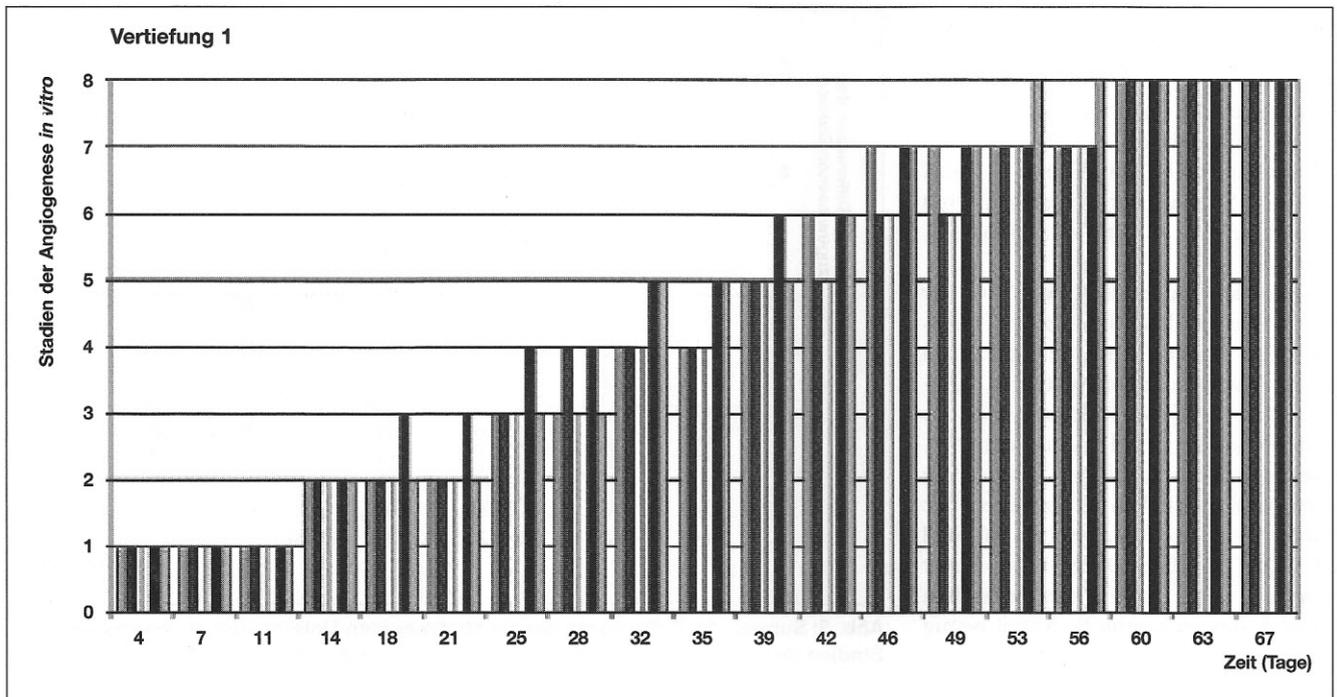


Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der Stadien der Angiogenese *in vitro* in den 6 Bildausschnitten (A1 – A6) der Vertiefung 1 der Kulturplatte

Um die Homogenität des Ablaufs der Angiogenese in den jeweils sechs Bildausschnitten jeder Vertiefung zu untersuchen, wurden für alle 12 Vertiefungen die Varianz (s^2) und die Standardabweichung (s) der Summen der an den Untersuchungstagen zugewiesenen Stadien der Angiogenese *in vitro* (S) der sechs Bildausschnitte berechnet (Tab. 2).

Die Varianzen der 12 Vertiefungen schwankten zwischen 9,8 und 80,6. Das arithmetische Mittel der Varianzen betrug $\bar{s}^2 = 22,1$. Daraus ergab sich eine mittlere Standardabweichung von 4,7. Der Median der Varianzen lag bei 16,6, woraus sich eine Standardabweichung von 4,1 ergab.

Die Vertiefung mit der größten Varianz ausgenommen, errechneten sich eine mittlere Varianz von $\bar{s}^2 = 16,8$ und eine Standardabweichung von 4,1.

Die Schwankungen im zeitlichen Ablauf der Angiogenese in den 12 Vertiefungen der Kulturplatte wurden mittels einer Varianzkomponentenanalyse geprüft (Sachs, 1993). Diese ergab, dass neben der Varianzkomponente innerhalb der Vertiefungen (22,1) eine zusätzliche Varianzkomponente von 10,3 zwischen den Vertiefungen bestand.

3.3 Quantifizierung der Wirkung proangiogener Faktoren auf die Angiogenese *in vitro*

Basierend auf den Ergebnissen der vorangestellten Validierung der Methode zur Quantifizierung der Angiogenese *in vitro* (3.2), wurde der Stichprobenumfang für die folgenden Untersuchungen auf vier Vertiefungen, aus denen jeweils vier Bildausschnitte herangezogen wurden, reduziert.

Als proangiogene Faktoren wurden für diese Untersuchung VEGF-A und FGF-2

(2) in einer Konzentration von 10 ng/ml (Cavallaro et al., 2001) verwendet.

Für die Untersuchung wurden Endothelzellen in 20 Vertiefungen von 24-Loch-Platten ausgesät und mit den in Tabelle 3 aufgeführten Medien kultiviert. Dabei dienten die Zellen in den Vertiefungen 1-4 als Negativkontrolle, und jene in den Vertiefungen 5-8 als Positivkontrolle.

Am ersten Untersuchungstag wurden, wie in 3.2 ausführlich beschrieben, aus jeder Vertiefung vier Bildausschnitte zufällig ausgewählt und mit der Video-

Tab. 2: Varianzen (s^2) und Standardabweichungen (s) der Summen der an 19 Untersuchungstagen zugewiesenen Stadien der Angiogenese in den jeweils 6 Bildausschnitten von 12 Vertiefungen der Kulturplatte.

Vertiefung	Varianz (s^2)	Standardabweichung (s)
1	17,1	4,1
2	10,7	3,3
3	24,7	5,0
4	27,0	5,2
5	12,3	3,5
6	23,4	4,8
7	16,0	4,0
8	10,6	3,3
9	12,2	3,5
10	21,1	4,6
11	9,8	3,1
12	80,6	9,0

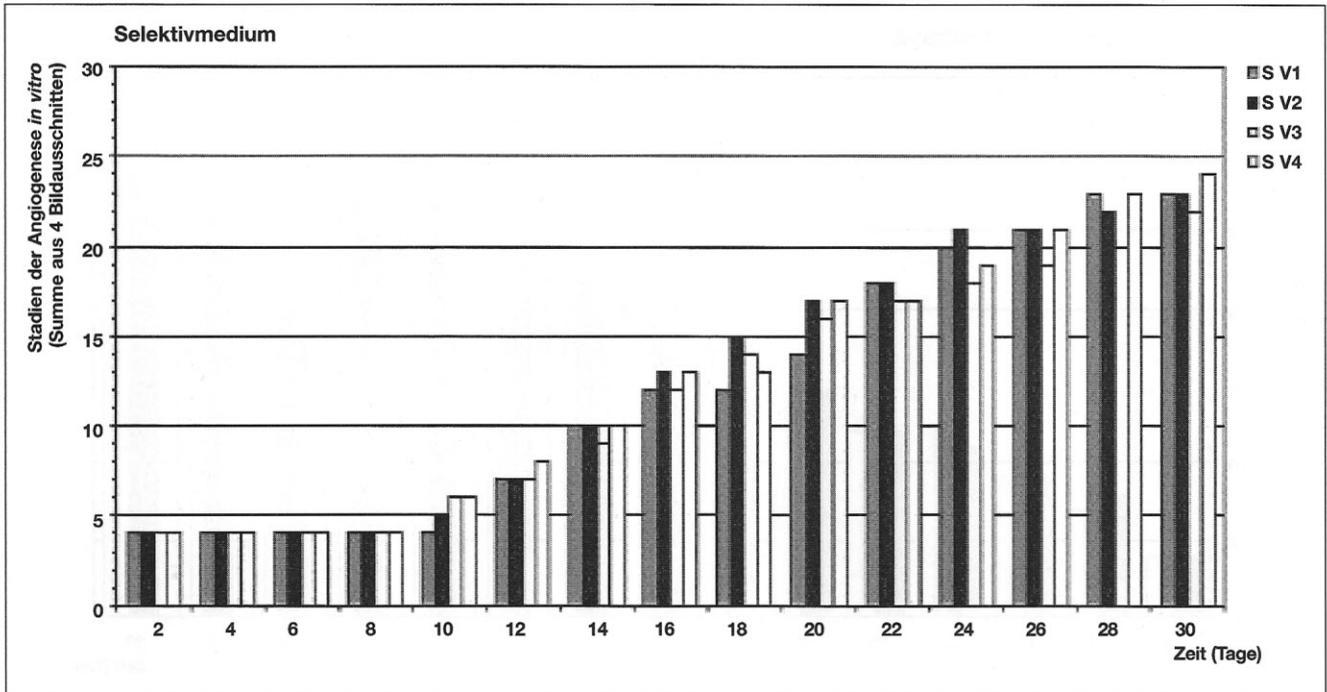


Abb. 6: Medium: Selektivmedium

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

kamera dokumentiert. An jedem 2. Tag wurde über einen Zeitraum von 30 Tagen von den per Koordinaten definierten Bildausschnitten je eine Aufnahme erstellt. Zur Quantifizierung der Angiogenese wurde an jedem Untersuchungstag (insgesamt 15) jedem Zellbild der verschiedenen Bildausschnitte eines der definierten Stadien der Angiogenese *in vitro* (3.1) zugewiesen. Anschließend wurde für jeden Bildausschnitt die Summe der an allen 15 Untersuchungstagen zugewiesenen Stadien gebildet.

Die Zellen, die nur das Erhaltungsmedium erhielten (Negativkontrollen), bildeten erwartungsgemäß innerhalb von sechs Tagen einen konfluenten Monolayer (Stadium 1), der bis zum letzten Untersuchungstag unverändert bestehen blieb. Die Kultivierbarkeit über einen Zeitraum von mehreren Monaten ist für diese Endothelzellen charakteristisch und wurde bereits in vorangegangenen Studien beschrieben (Budde, 1999).

Die Endothelzellen, die das Selektivmedium erhielten, befanden sich am

Ende der Untersuchung in den Stadien 5 bzw. 6 der Angiogenese *in vitro* (Abb. 6). Die Summe der an allen Untersuchungstagen zugewiesenen Stadien der Angiogenese *in vitro* in den Bildausschnitten ($S^{\text{Selektivmedium}}$) schwankte zwischen 42 und 52. Das arithmetische Mittel der Summen betrug: $\bar{S}^{\text{Selektivmedium}} = 45,7$.

In den Vertiefungen, in denen dem Erhaltungsmedium der stark proangiogene Faktor VEGF-A hinzugefügt wurde, schwankte die Summe der zugewiesenen Stadien der Angiogenese *in vitro* in den untersuchten Bildausschnitten ($S^{\text{VEGF-A}}$) zwischen 61 und 72 (Abb. 7). Das arithmetische Mittel der Summen betrug: $\bar{S}^{\text{VEGF-A}} = 67,4$. Somit war $\bar{S}^{\text{VEGF-A}}$ um 47,5% größer und signifikant höher ($p < 0,0001$) als $\bar{S}^{\text{Selektivmedium}}$.

Abgesehen von dem schnelleren Ablauf der Angiogenese waren hier auch morphologische Besonderheiten zu beobachten. So unterschieden sich die Zellen in diesen Vertiefungen in den Stadien 2 und 3 der Angiogenese durch ihre sehr langen (bis zu 250 μm) Zellausläufer von den Positivkontrollen. Außerdem handelte es sich bei den ab

Tab. 3: Medienregime für eine 24-Loch-Platte zur Quantifizierung der Angiogenese *in vitro*

Vertiefung der Zellkulturplatte	Medium
1 bis 4	Erhaltungsmedium
5 bis 8	Selektivmedium
9 bis 12	Erhaltungsmedium mit VEGF-A (10 ng/ml)
13 bis 16	Erhaltungsmedium mit FGF-2 (10 ng/ml)
17 bis 20	Erhaltungsmedium mit VEGF-A (10 ng/ml) und FGF-2 (10 ng/ml)

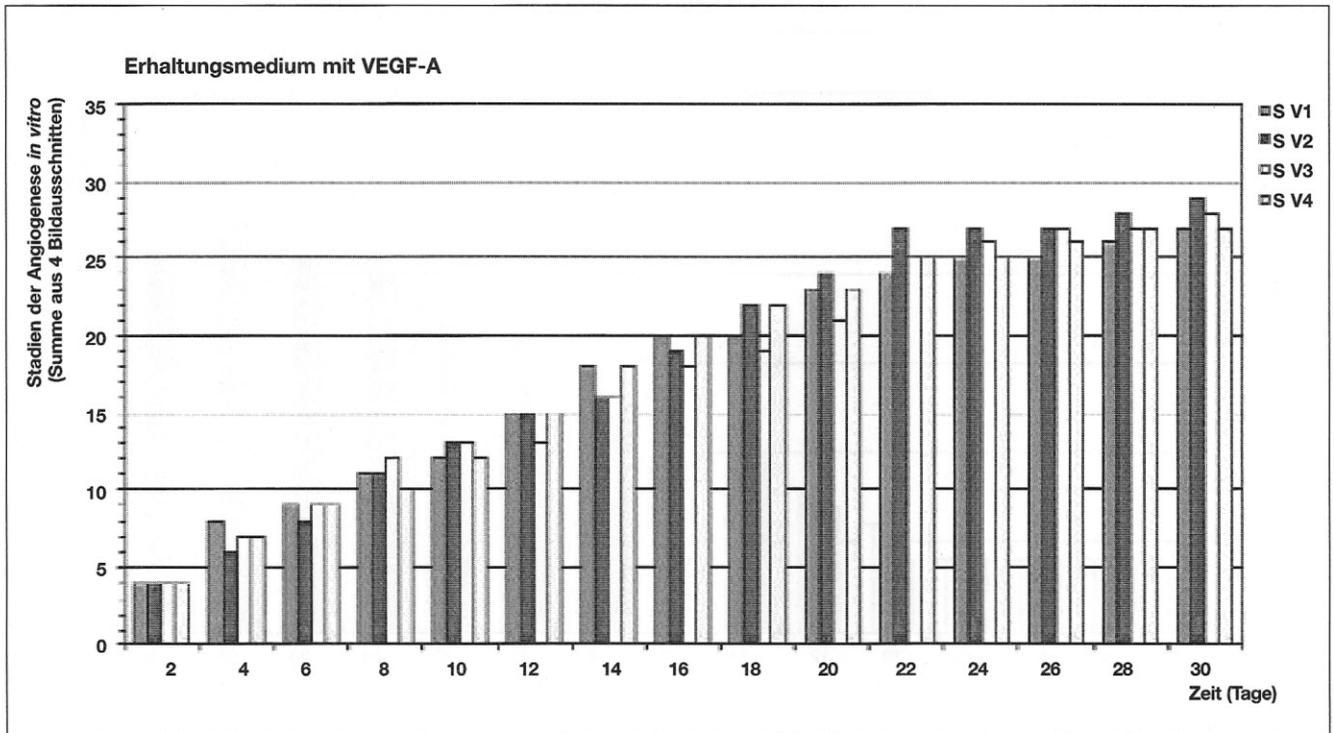


Abb. 7: Medium: Erhaltungsmedium mit VEGF (10 ng/ml)

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

dem Stadium 7 zu beobachtenden dreidimensionalen Strukturen neben strangartigen Gebilden auch um sphäroidische Formationen der Endothelzellen (Abb. 8).

Der Ablauf der Angiogenese *in vitro* in den Vertiefungen, in denen dem Erhaltungsmedium FGF-2 hinzugefügt wurde, ist in Abbildung 9 dargestellt. Das arithmetische Mittel der Stadiensummen betrug $\bar{S}^{FGF-2} = 71,1$ und war damit um 55,7% größer und signifikant

höher ($p < 0,0001$) als $\bar{S}^{Selektivmedium}$. Auch die Inkubation mit FGF-2 hatte eine stärkere Elongation der Endothelzellen in den Stadien 2 bzw. 3 zur Folge, die dazu führte, dass Zellen mit bis zu 300 μm langen Zellausläufern zu erkennen waren. Die in diesen Vertiefungen ab dem Stadium 7 zu beobachtenden dreidimensionalen Strukturen stellten sich ausschließlich als strangartige Gebilde dar. Somit unterschieden sich die

morphologischen Veränderungen, die im Ablauf der Angiogenese *in vitro* zu erkennen waren, nicht von denen der Zellen, die mit dem Selektivmedium inkubiert worden waren.

Die Kombination von VEGF-A und FGF-2 führte zu einer noch stärkeren Beschleunigung der Angiogenese *in vitro* (Abb. 10) und ergab $\bar{S}^{VEGF-A+FGF-2} = 82,6$, welches damit um 80,9% größer war und signifikant höher ($p < 0,0001$) als $\bar{S}^{Selektivmedium}$. Die morphologischen Veränderungen entsprachen denen, die bei den mit FGF-2 inkubierten Zellen zu beobachten waren.

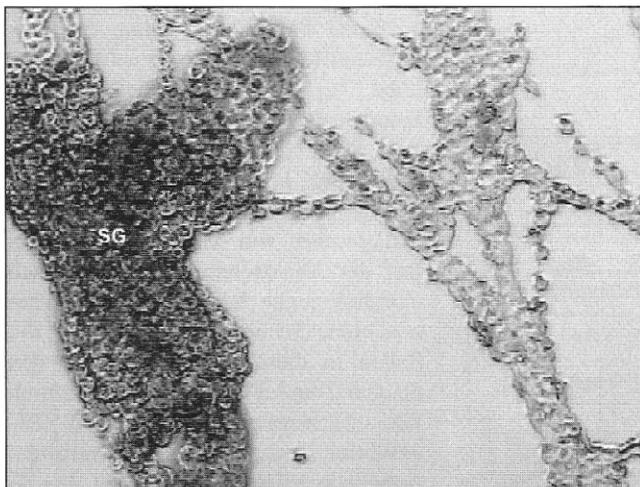


Abb.8: Endothelzellen aus dem corpus luteum in Rückbildung

38 Tage in Kultur, Kultivierung mit Erhaltungsmedium und VEGF (10 ng/ml), dreidimensionale Organisation der Endothelzellen zu tubulären Strukturen und zu Sphäroiden (SG); Phasenkontrastmikroskop, 100 x

3.6 Morphometrische Untersuchung der Angiogenese *in vitro*

Die morphometrische Untersuchung wurde in den Bildausschnitten, die für die Untersuchungen zur Validierung der Angiogenese *in vitro* (3.2.2) dokumentiert wurden, durchgeführt und erfolgte ab dem Stadium 7 der Angiogenese an den sich *in vitro* bildenden kapillarähnlichen Strukturen, die als endotheliale Stränge mit einem Mindestdurchmesser von 28 μm definiert wurden (2).

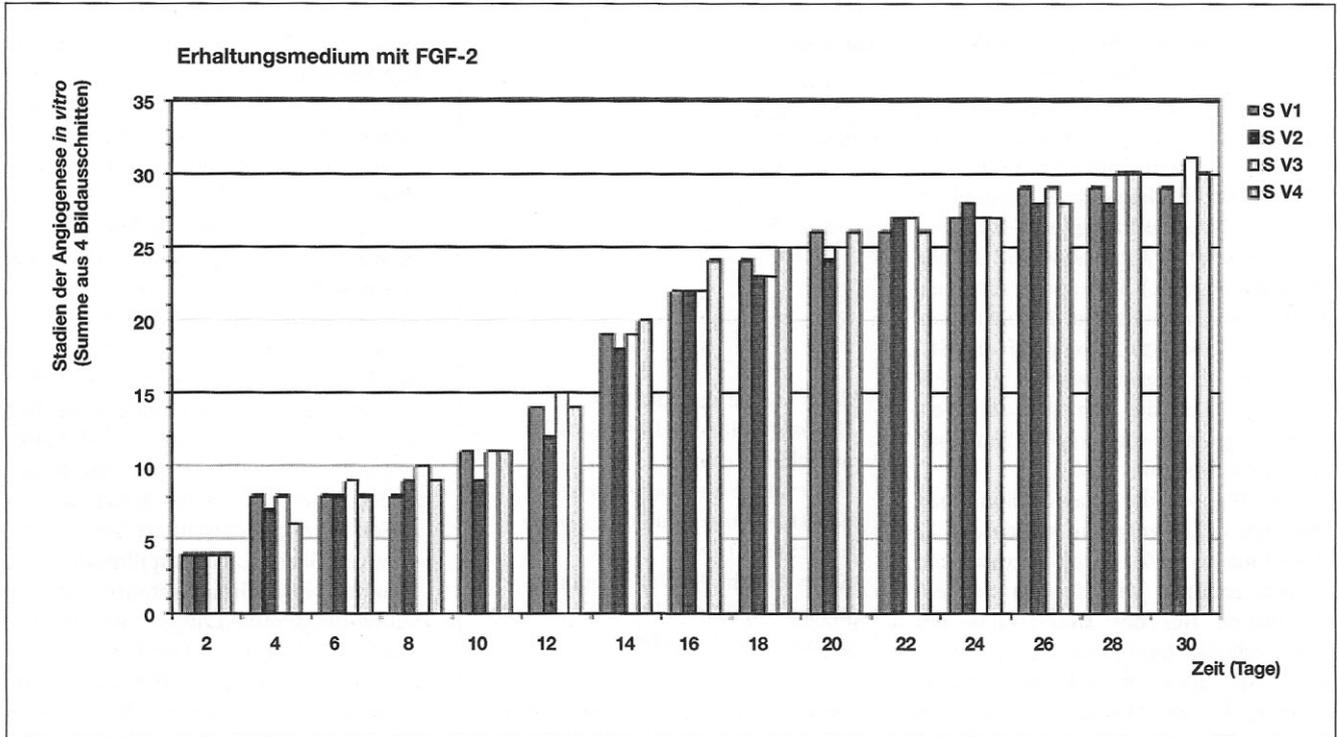


Abb. 9: Medium: Erhaltungsmedium mit FGF-2 (10 ng/ml)

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

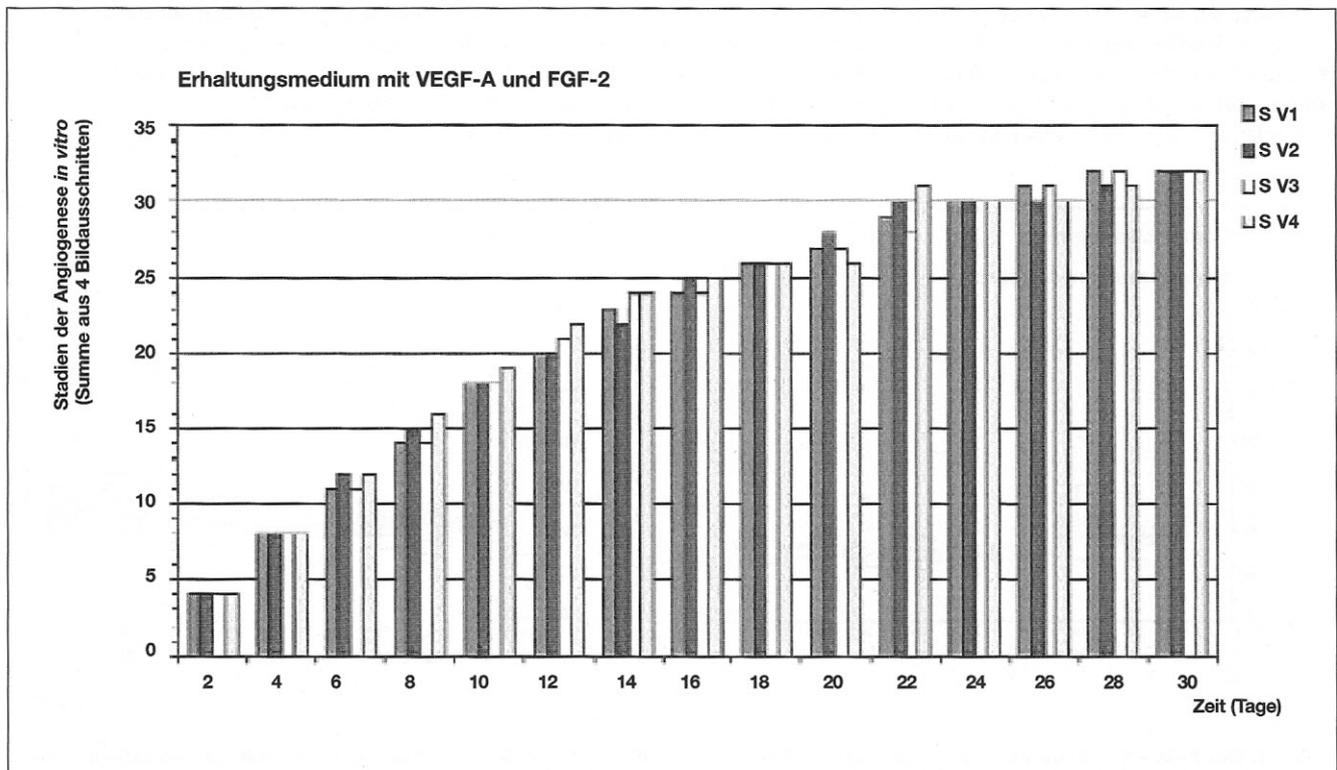


Abb. 10: Medium: Erhaltungsmedium mit VEGF (10 ng/ml) und FGF-2 (10 ng/ml)

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



Die Anzahl der Bildausschnitte, die kapillarähnliche Strukturen zeigten, nahm ab dem Tag 39 der Untersuchung bis zum Tag 53 stetig zu und sank von da an bis zum letzten Untersuchungstag.

In jedem Bildausschnitt wurde mit Hilfe der Messwerkzeuge des Bildbearbeitungssystems Axiovision die Fläche (F) und Länge (L) der kapillarähnlichen Strukturen gemessen und für jeden Ausschnitt die jeweilige Summe (SF und SL) berechnet. Zusätzlich wurde in jedem Bildausschnitt die Anzahl der Verzweigungspunkte der kapillarähnlichen Strukturen bestimmt (SV).

Die Fläche der kapillarähnlichen Strukturen (SF) zeigte in sieben der 12 Vertiefungen (58%) zwei Maxima und in den anderen Vertiefungen nur ein Maximum. Bei der Betrachtung der Gesamtfläche kapillarähnlicher Strukturen in allen Vertiefungen wurde deutlich, dass die Maxima am häufigsten am Tag 53 der Untersuchungen lagen. Die gleichen Beobachtungen galten auch für die Länge der kapillarähnlichen Strukturen und die Anzahl der Verzweigungspunkte.

Anhand der gemessenen Daten (SF, SL und SV) wurden folgende zusätzliche Parameter berechnet: der relative Durchmesser (RD), die relative Fläche (RF) und relative Länge (RL) einer kapillar-

ähnlichen Struktur:

$$RD = \frac{\sum SF}{\sum SL} \mu\text{m}$$

$$RF = \frac{\sum SF}{SV+1} \mu\text{m}^2$$

$$RL = \frac{\sum SL}{SV+1} \mu\text{m}$$

SF = Fläche kapillarähnlicher Strukturen innerhalb eines Bildausschnitts (μm^2)

SL = Länge kapillarähnlicher Strukturen innerhalb eines Bildausschnitts (μm)

SV = Anzahl der Verzweigungspunkte kapillarähnlicher Strukturen in einem Bildausschnitt

An jedem Untersuchungstag wurde für jeden Bildausschnitt der Quotient aus der Fläche und Länge der kapillarähnlichen Strukturen (RD) bestimmt. RD stellt den relativen Anteil der Fläche an der Länge der kapillarähnlichen Strukturen dar und verhält sich somit proportional zum mittleren Durchmesser der kapillarähnlichen Strukturen. Damit repräsentiert RD den relativen Durchmesser der kapillarähnlichen Strukturen im jeweiligen Bild-

ausschnitt. Den Median der Werte für RD betrachtend zeigte sich, dass dieser nach einem leichten Anstieg in den Untersuchungstagen 39 bis 46 nur noch minimalen Schwankungen ($< 2 \mu\text{m}$) unterlag (Abb. 11). Als zweiter Parameter wurde an jedem Untersuchungstag für alle Bildausschnitte der Quotient der Fläche und der Anzahl der Verzweigungspunkte +1 der kapillarähnlichen Strukturen (RF) berechnet. Da die Anzahl der Verzweigungspunkte +1 der Anzahl der kapillarähnlichen Strukturen entspricht, steht RF der mittleren Fläche einer kapillarähnlichen Struktur im jeweiligen Bildausschnitt gleich. Somit repräsentiert hier RF die relative Fläche einer kapillarähnlichen Struktur im Bildausschnitt. Ebenso wurde die relative Länge einer kapillarähnlichen Struktur (RL) als dritter Parameter für alle Bildausschnitte bestimmt. Wieder anhand des Medians für jeden Untersuchungstag beurteilt, unterlagen sowohl RF als auch RL bis zum 60. Tag nur geringgradigen Schwankungen. Ab dem Tag 60 bis zum letzten Untersuchungstag (Tag 67) war bei beiden Parametern ein Anstieg zu erkennen, wobei gleichzeitig eine breitere Streuung der Werte beobachtet wurde (Abb. 12 und 13).

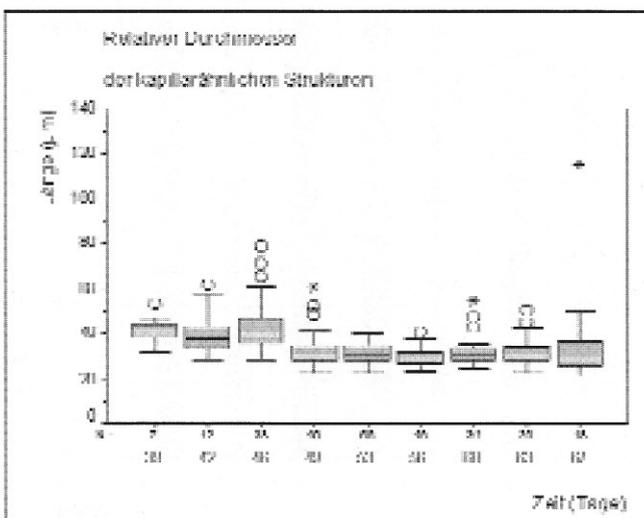


Abb. 11: Quotient von Fläche und Länge der kapillarähnlichen Strukturen (RD) in allen untersuchten Bildausschnitten der 12 Vertiefungen

(N entspricht der Anzahl der Bildausschnitte, die am jeweiligen Untersuchungstag kapillarähnliche Strukturen zeigten)

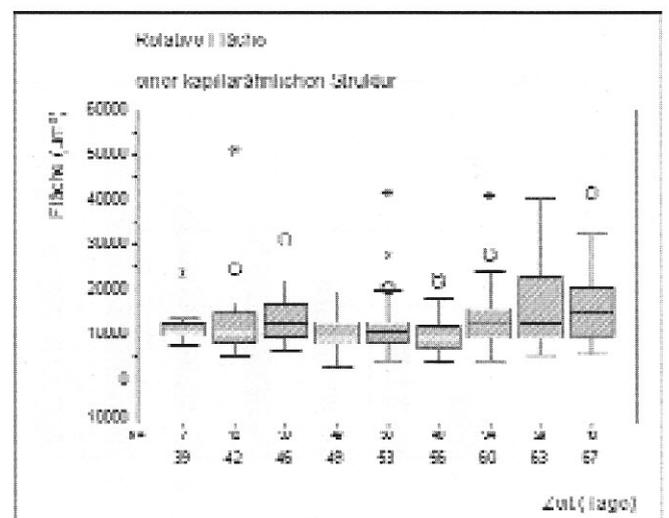


Abb. 12: Quotient von Fläche und Anzahl der Verzweigungen (+ 1) der kapillarähnlichen Strukturen (RF) in allen untersuchten Bildausschnitten (72) der 12 Vertiefungen

(N entspricht der Anzahl der Bildausschnitte, die am jeweiligen Untersuchungstag kapillarähnliche Strukturen zeigten)

4 Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse beschreiben die Etablierung und Validierung einer neuen Methode zur Quantifizierung der Angiogenese *in vitro*. Im Gegensatz zu den bislang aus der Literatur bekannten *in vivo*- und *in vitro* Modellen ist es durch die Unterteilung des Ablaufs der Angiogenese in definierte Stadien und die Erfassung dieser Stadien über einen bestimmten Zeitraum erstmals möglich, alle angiogenen Phasen bis hin zur Entwicklung kapillarähnlicher Strukturen zu quantifizieren. Die Untersuchungen zur Validierung dieser Methode umfassten die Prüfung der Einschätzung der Stadien der Angiogenese durch verschiedene Untersucher und der Einheitlichkeit (Homogenität) des zeitlichen Ablaufs der Angiogenese in verschiedenen Kulturschalen.

Die Einschätzung der Stadien durch die beiden eingesetzten Untersucher führte in 80,9% der Aufnahmen des angiogenen Zellbilds zu einer Übereinstimmung. In nur 19,1% der Aufnahmen, in denen das Zellbild durch die Untersucher nicht identisch beurteilt wurde, lag lediglich eine Abweichung in der Beurteilung um nur ein Stadium vor. Diese Differenzen betrafen überwiegend Phasen der Angiogenese, in denen der

Übergang von einem Stadium in das andere zu beobachten war. So waren die häufigsten Abweichungen bei der Beurteilung des Zellbilds beim Übergang von Stadium 2 zu 3 zu beobachten. In dieser Phase sollte von den Untersuchern eingeschätzt werden, ob es sich um mehr oder weniger als 50% der Zellen handelte, die Zellausläufer bildeten. Somit begründet sich die unterschiedliche Zuweisung der Stadien darauf, dass die Beurteilung des Zellbilds auf der subjektiven Einschätzung der Untersucher beruhte, wodurch insbesondere im Grenzbereich ($\pm 50\%$) Differenzen zu erwarten waren. Da identische Zellbilder von einer Person stets gleich beurteilt wurden, war eine zusätzliche Varianz durch dieselbe Person ausgeschlossen. Insgesamt erfolgte die Zuweisung der Stadien durch jeden der beiden Untersucher in chronologischer Weise, beginnend bei Stadium 1 aufsteigend bis Stadium 8. Das bedeutet, dass der charakteristische Verlauf der Angiogenese *in vitro* von beiden Personen anhand der definierten Stadien auf gleiche Weise beurteilt wurde.

Diese Ergebnisse zeigen sowohl die Wiederholbarkeit der Beurteilung durch dieselbe Person als auch die geringe Abweichung durch verschiedene Untersucher bei der Einschätzung des Zell-

bilds in Hinblick auf die definierten Stadien der Angiogenese *in vitro*. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Einschätzung der Stadien und somit die Quantifizierung der Angiogenese *in vitro* durch einen einzigen Untersucher erfolgen kann. Wird die Quantifizierung der Angiogenese *in vitro* durch verschiedene Untersucher mit vergleichbaren Kenntnissen durchgeführt, wie es unter Routinebedingungen in einem Labor üblich ist, so ist nur eine geringgradige Abweichung bei der Zuweisung der Stadien in ihren Übergangsphasen zu erwarten.

Die Homogenität des Ablaufs der Angiogenese *in vitro* in verschiedenen Kulturschalen wurde in 12 Vertiefungen untersucht. Die Berechnungen ergaben, dass die Standardabweichungen in den 12 Vertiefungen zwischen 3,1 und 9,0 lagen. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Standardabweichung von 9,0 sich für die Vertiefung ergab, in der sowohl das Minimum (81) als auch das Maximum (102) der Stadien-Summen (S) lagen. Die Standardabweichung aus der mittleren Varianz lag bei 4,7, wobei auch diese durch die große Spannweite in dieser Vertiefung deutlich angehoben wurde. Dies wird bei Betrachtung der Varianzen in den Vertiefungen 1 bis 11 deutlich, die zwischen 9,8 und 27,0 lagen. Hierbei ergab sich aus der mittleren Varianz $\bar{S}^2 = 16,8$ eine Standardabweichung von 4,1. Der Vergleich mit dem Median der Standardabweichungen (4,1) aller 12 Vertiefungen zeigt, dass die starke Abweichung der Stadien-Summen (S) in der einen Vertiefung nicht charakteristisch für den Ablauf der Angiogenese *in vitro* war.

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

Die durchgeführte Varianzkomponentenanalyse (Sachs, 1993) ergab, dass die Varianz zwischen den Vertiefungen niedriger war als die Varianz

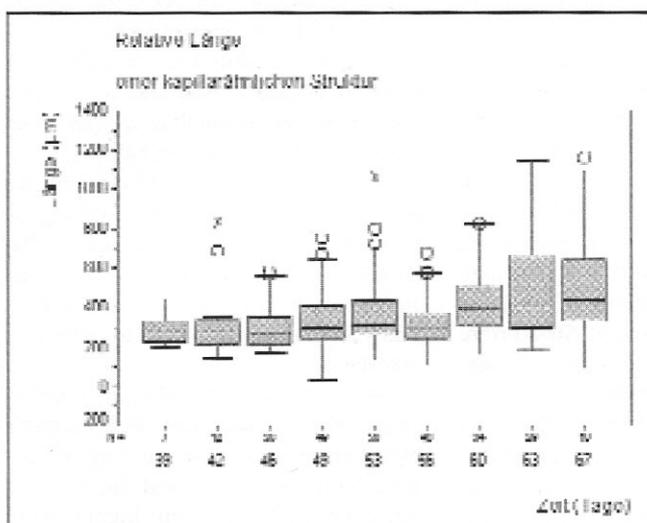


Abb. 13: Quotient von Länge und Anzahl der Verzweigungen (+ 1) der kapillarähnlichen Strukturen (RL) in allen untersuchten Bildausschnitten (72) der 12 Vertiefungen (N entspricht der Anzahl der Bildausschnitte, die am jeweiligen Untersuchungstag kapillarähnliche Strukturen zeigten)



innerhalb der Vertiefungen. Demzufolge kann die Quantifizierung der Angiogenese in weniger als 12 Vertiefungen durchgeführt werden, wobei die Anzahl der Vertiefungen aufgrund der geringeren Varianz stärker reduziert werden kann als die Anzahl der Bildausschnitte pro Vertiefung. Basierend auf diesen Ergebnissen war es möglich, für die weiteren Untersuchungen zur Quantifizierung der Wirkung proangiogener Faktoren auf die Angiogenese die Anzahl der Vertiefungen und Bildausschnitte auf jeweils vier und damit einen im Routinebetrieb bewältigbaren Stichprobenumfang zu reduzieren.

4.1 Prüfung der Eignung der etablierten Methode zur Quantifizierung des zeitlichen Ablaufs der Angiogenese *in vitro*

Die Eignung der etablierten Quantifizierungsmethode der Angiogenese wurde mittels Stimulation durch VEGF-A und FGF-2 geprüft. Für diese Faktoren wurde in zahlreichen Studien bereits eine proangiogene Wirkung nachgewiesen (Connolly et al., 1989; Pepper et al., 1992; Nicosia et al., 1994; Nishikawa et al., 1998).

Die Zeit, die mit VEGF-A inkubierte Endothelzellen brauchten, um die Stadien der Angiogenese zu durchlaufen, war im Gegensatz zu den im Selektivmedium kultivierten Endothelzellen deutlich verkürzt. So war das arithmetische Mittel der Stadiensummen (S^{VEGF-A}) um 47,5% höher als bei den Zellen, die mit dem Selektivmedium kultiviert wurden. Aufgrund der Unterteilung des Ablaufs der Angiogenese *in vitro* in die definierten Stadien wurde deutlich, dass sich der schnellere Ablauf der Angiogenese nicht auf alle Phasen gleichermaßen bezog. Während die frühen Stadien unter der Wirkung des VEGF auffällig verkürzt waren, blieb der Zeitraum, in dem die Stadien 6 und 7 der Angiogenese von den Endothelzellen durchlaufen wurden, mit ca. 14 Tagen, unverändert. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die proangiogenen Wirkungen des VEGF-A insbesondere die Steigerung der Migration und Proliferation der Endothelzellen betreffen, die initial im Ablauf der

Angiogenese eine entscheidende Rolle spielen (Josko et al., 2000).

Bei den mit FGF-2 inkubierten Zellen war das arithmetische Mittel der Stadiensummen (S^{FGF-2}) um 55,7% höher als bei den mit dem Selektivmedium kultivierten Zellen. Damit war der Ablauf der Angiogenese durch FGF-2 noch rascher als bei den mit VEGF-A inkubierten Endothelzellen. Der schnellere Prozess der Angiogenese bezog sich dabei auf alle Stadien. So waren im Gegensatz zu den mit VEGF-A inkubierten Endothelzellen auch die Stadien 6 und 7, in denen sich ein Endothelzellnetzwerk und kapillarähnliche Strukturen bildeten, deutlich verkürzt. Wie bei VEGF-A hatte die stimulierende Wirkung des FGF-2 auf die Proliferation und Migration der Endothelzellen (Fernig und Gallagher, 1994) eine Verkürzung der Stadien 1 bis 5 zur Folge. Die beschleunigte Bildung kapillarähnlicher Strukturen kann auf den die Differenzierung der Endothelzellen stimulierenden Effekt des FGF-2 zurückgeführt werden (Matsumoto et al., 2002).

Die morphologischen Veränderungen, die mit VEGF-A und FGF-2 inkubierte Endothelzellen im Ablauf der Angiogenese zeigten, entsprachen denen der Zellen, die nur FGF-2 erhielten. Das arithmetische Mittel der Stadiensummen ($S^{VEGF-A+FGF-2}$) war hier um 80,9% höher als bei den Zellen, die ohne die Faktoren kultiviert worden waren. Das bedeutet, dass der zeitliche Ablauf der Angiogenese unter dem Einfluss von VEGF-A plus FGF-2 forciert wurde. Diese synergistische Wirkung von VEGF-A und FGF-2 *in vitro* wurde auch von Pepper et al. (1992) beschrieben. Beim Einsatz gleicher Konzentrationen von VEGF-A oder FGF-2 beschleunigte auch in ihren Untersuchungen FGF-2 die Bildung kapillarähnlicher Strukturen. Der beschleunigte Ablauf der Angiogenese *in vitro* durch Inkubation boviner mikrovaskulärer Endothelzellen mit VEGF-A und FGF-2 wurde auch durch die Untersuchungen von Cavallaro et al. (2001) bestätigt. Sie wiesen nach, dass VEGF-A die durch FGF-2 stimulierten Veränderungen der Morphologie und des Zytoskeletts der Endothelzellen nicht potenzieren kann und begründeten dies damit, dass VEGF-A insbesondere die

initialen Phasen der Angiogenese, nämlich Proliferation und Migration der Endothelzellen, stimuliert, während FGF-2 in die spätere Morphogenese der Kapillaren involviert ist. Wie in der Literatur beschrieben (Mandriota und Pepper, 1997) ergaben sich auch bei den im Rahmen dieser Studie durchgeführten Untersuchungen Hinweise darauf, dass VEGF-A die Wirkung des FGF-2 insbesondere in den initialen Stadien promoviert.

4.2 Prüfung der Eignung der etablierten Methode zur Quantifizierung der kapillarähnlichen Strukturen

Die ersten kapillarähnlichen Strukturen waren *in vitro* ab dem 39. Tag zu erkennen. Vom 39. Tag ausgehend stieg bis zum 53. Tag die Anzahl der Bildausschnitte, die kapillarähnliche Strukturen zeigten, kontinuierlich an und nahm danach bis zum Ende der Untersuchung wieder ab. Stets die Summe aus allen untersuchten Bildausschnitten betrachtend, lag auch das Maximum der Fläche (SF), Länge (SL) und der Anzahl der Verzweigungspunkte (SV) am Tag 53 der Untersuchungen.

Der Median des relativen Durchmessers (RD) unterlag über dem gesamten Untersuchungszeitraum nur geringfügigen Schwankungen. Gleichzeitig verhielten sich auch die relative Fläche (RF) und die relative Länge (RL) einer kapillarähnlichen Struktur annähernd konstant, während die Anzahl der Verzweigungspunkte anstieg. Das bedeutet, dass die Vergrößerung der Fläche kapillarähnlicher Strukturen, die bis zum 53. Tag der Untersuchung zu beobachten war, auf die Zunahme der Anzahl kapillarähnlicher Strukturen zurückzuführen war, deren Durchmesser und Länge nur geringen Schwankungen unterlag.

Die Bildung kapillarähnlicher Strukturen erfolgte aus einem endothelialen Netzwerk heraus, das zu Beginn aus Einzelzellsträngen bestand. Im weiteren Verlauf beteiligten sich immer mehr Endothelzellen am Aufbau dieser Stränge, wodurch deren Anzahl und Länge zunahm. Die gleichzeitig im Verlauf der Untersuchungen im Gesichtsfeld abnehmende Anzahl der

im Monolayer wachsenden Zellen lässt vermuten, dass die Zunahme der Anzahl in Strängen organisierter Zellen nicht auf deren Proliferation beruhte, sondern auf der steigenden Beteiligung der ursprünglich im Monolayer wachsenden Zellen. In einer Untersuchung von Meyer et al. (1997) wurde dieser Befund durch den Nachweis nur geringgradiger Proliferation in Strängen organisierter Zellen bestätigt. Da sich der Median des relativen Durchmessers der Stränge relativ konstant zwischen ca. 30 und 40 µm bewegte, wird deutlich, dass die Anlagerung von Endothelzellen an die Stränge in der gesamten Kulturschale annähernd gleichmäßig erfolgte.

Die Zunahme der Anzahl, Länge und Verzweigungspunkte kapillarähnlicher Strukturen in mit proangiogenen Faktoren inkubierten Kulturen wurde von verschiedenen Untersuchern als Kennzeichen der Angiogenese *in vitro* beobachtet (u.a. Folkman und Haudenschield, 1980; Madri und Williams, 1983; Montesano et al., 1983; Vaillé et al., 1998; Davis et al., 2002; Peters et al., 2002; Connolly et al., 2002; Harvey et al., 2002). Dabei stellten Vaillé et al. (1998) fest, dass sich die Erhaltung dieser Strukturen *in vitro* über einen längeren Zeitraum als schwierig erwies, da sich diese durch die Aktivierung zellulärer Proteasen, als Folge der Stimulation mit proangiogenen Faktoren, letztlich vom Kulturschalenboden ablösen.

Auch im hier vorgestellten *in vitro* Modell war der Rückgang der Anzahl der Bildausschnitte, in denen kapillarähnliche Strukturen zu erkennen waren, ab dem 53. Tag häufig die Folge des partiellen Kontaktverlustes dieser Strukturen mit dem Kulturschalenboden. Diese flotierte in der Kulturschale und waren daher nicht mehr in den definierten Bildausschnitten zu erkennen.

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

4.3 Einsetzbarkeit der vorgestellten Methode als Ergänzungsmethode zum Tierversuch

Mit dem hier vorgestellten Modell, das auf der Kultivierung mikrovaskulärer Endothelzellen basiert, wurde eine Methode zur Quantifizierung der Angiogenese *in vitro* entwickelt, die alle Phasen der angiogenen Kaskade umfasst. Im Rahmen dieser Arbeit sind Untersuchungen zur Bewertung dieses *in vitro* Modells als potenzielle Ergänzungsmethode zum Tierversuch durchgeführt worden. So wurde mit den Untersuchungen zur Validierung nachgewiesen, dass die Quantifizierung der Angiogenese unter definierten Bedingungen durch unterschiedliche Untersucher und in verschiedenen Versuchsansätzen vergleichbare Ergebnisse zeigt und damit reproduzierbar ist. Der Einsatz von bekannten und im Tierexperiment bereits untersuchten Stimulatoren der Angiogenese ergab, dass die im etablierten *in vitro* Modell gemessenen Werte die Resultate von *in vivo* Studien reproduzieren (Connolly et al., 1989; Pepper et al., 1992; Nicosia et al., 1994; Nishikawa et al., 1998).

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

Zur Therapie verschiedener Erkrankungen im Zuge von Ischämien, wie beispielsweise nach einem Herzinfarkt, sowie zur Verbesserung der Wundheilung ist ein steigendes Interesse am Einsatz proangiogener Faktoren zu verzeichnen. Es ist zu erwarten, dass auf diesem sehr viel versprechenden Gebiet der medizinischen Forschung in nächster Zukunft besonders viele Tierversuche unternommen werden und Angiogenesefaktoren vermehrt in die Prüfung im

Rahmen behördlicher Zulassungsverfahren einbezogen werden.

Das hier vorgestellte *in vitro* System der Angiogenese spiegelt wie auch andere Zellkultur-Modelle nicht die komplexen Verhältnisse im lebenden Organismus wider, da die Angiogenese *in vivo* auch vom umliegenden Gewebe, bestehend aus Perizyten, glatten Muskelzellen und der extrazellulären Matrix, beeinflusst wird. Außerdem stellen Endothelzellen eine sehr heterogene Population dar. Unterschiede bestehen zwischen Endothelzellen verschiedener Spezies, verschiedenen Alters und Geschlechts, verschiedener Gewebe sowie großer und kleiner Gefäße (Aird et al., 1997). Jedoch weisen etablierte *in vitro* Modelle der Angiogenese auf der Basis humaner und muriner mikrovaskulärer Endothelzellen starke Parallelen zum hier vorgestellten bovinen Modell auf (Lienau, 2003).

Mit der hier etablierten Methode zur Quantifizierung der Angiogenese können Tierversuche sicher nicht vollkommen ersetzt werden. Jedoch bieten weder Tierversuche noch Ersatzmethoden eine absolute Sicherheit bei der Ermittlung der Wirkung und Wirkkonzentration einer Substanz für alle Spezies einschließlich des Menschen. Damit stellt dieses *in vitro* Modell vor allem eine Alternative zu Tierversuchen dar, die in der vorklinischen Phase des Zulassungsverfahrens zur Identifizierung und ersten Bestimmung der Wirkungsweise einer proangiogenen Substanz durchgeführt werden müssen.

In einem weiteren Abschnitt dieser Studie werden in Kürze entsprechende Ergebnisse zur Quantifizierung der Antiangiogenese vorgelegt werden. Die Untersuchung antiangiogener Faktoren zur Ausschaltung der Blutversorgung von Tumoren („Aushungern“) (Boehm et al., 1997) wird, wie eingangs beschrieben, ebenso in zahlreichen Tierversuchen durchgeführt.

Literaturverzeichnis

- Aird, W. C., Edelberg, J. M., Weiler-Guettler, H. et al. (1997). Vascular bed-specific expression of an endothelial cell gene is programmed by the tissue microenvironment. *J. Cell Biol.* 138, 1117-1124.



- Algire, G. H. (1943). An adaption of the transparent-chamber technique to the mouse. *J. Natl. Cancer Inst. USA* 4, 1-11.
- Ashton, N. and Cook, C. H. (1953). Mechanism of corneal neovascularisation. *Br. J. Ophthalmol.* 37, 193-209.
- Auerbach, R., Lewis, R., Shinnars, B. et al. (2003). Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin. Chem.* 49, 32-40.
- Auerbach, R., Akhtar, N., Lewis, R. L. and Shinnars, B. L. (2000). Angiogenesis assays: Problems and pitfalls. *Cancer Metastasis Rev.* 19, 167-172.
- Ausprunk, D. H., Knighton, D. R. and Folkman, J. (1974). Differentiation of the vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. *Dev. Biol.* 38, 237-247.
- Bishop, E. T., Bell, G. T., Bloor, S. et al. (1999). An in vitro model of angiogenesis: Basic features. *Angiogenesis* 3, 335-344.
- Boehm, T., Folkman, J., Browder, T and O'Reilly, M. S. (1997). Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390, 404-408.
- Broggi, E., Schatteman, G. and Wu, T. (1996). Hypoxia-induced paracrine regulation of VEGF receptor expression. *J. Clin. Invest.* 97, 469-476.
- Brooks, P. C., Montgomery, A. M. and Cheresch, D. A. (1999). Use of 10-day-old chick embryo model for studying angiogenesis. *Meth. Mol. Biol.* 129, 257-269.
- Budde, A. (1999). Immunhistochemischer Nachweis der Rezeptoren für Wachstumshormon und Oxytocin im bovinen Ovar. Dissertation. Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Cavallaro, U., Tenan, M., Castelli, V. et al. (2001). Response of bovine endothelial cells to FGF-2 and VEGF is dependent on their site of origin: relevance to the regulation of angiogenesis. *J. Cell. Biochem.* 82, 619-633.
- Célérier, J., Cruz, A., Lammandé, N. et al. (2002). Angiotensinogen and its cleavage derivatives inhibit angiogenesis. *Hypertension* 39, 224-235.
- Connolly, J. O., Simpson, N., Hewlett, L. and Hall, A. (2002). Rac regulates endothelial morphogenesis and capillary assembly. *Mol. Biol. Cell* 13, 2474-2485.
- Connolly, D. T., Heuvelman, D. M., Nelson, R. et al. (1989). Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 84, 1470-1478.
- Davis, G. E., Bayless, K. J. and Mavila, A. (2002). Molecular Basis of Endothelial Cell Morphogenesis in Three-Dimensional Extracellular Matrices. *The Anat. Rec.* 268, 252-275.
- Dellian, M., Yuan, F., Trubetskoy, V. S. et al. (2000). Vascular permeability in a human tumour xenograft: molecular charge dependence. *Br. J. Cancer* 82, 1513-1518.
- Enomoto, H., Inoki, J., Komiya, K. et al. (2003). Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage. *Am. J. Path.* 162, 171-181.
- Fernig, D. G. and Gallagher, J. T. (1994). Fibroblast growth factors and their receptors: an information network controlling tissue growth, morphogenesis and repair. *Prog. Growth Factor Res.* 5, 353-377.
- Folkman, J. (2003). Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr. Mol. Med.* 3, 643-651.
- Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.* 1, 27-32.
- Folkman, J. (1984). What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab. Invest.* 51, 601-604.
- Folkman, J. and Haudenschild, C. (1980). Angiogenesis by capillary endothelial cells in culture. *Trans. Ophthalmol. Soc. UK* 100, 346-353.
- Greenblatt, M. and Shubik, P. (1968). Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J. Natl. Cancer Inst.* 41, 111-124.
- Harvey, K., Welch, Z., Kovola, T. et al. (2002). Comparative analysis of in vitro angiogenic activities of endothelial cells of heterogeneous origin. *Microvasc. Res.* 63, 316-326.
- Ibukiyama, C. (1996). Angiogenesis, angiogenic therapy using fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors for ischemic vascular lesions. *Jpn. Heart J.* 37, 285-300.
- Jain, R. K., Schlenger, K., Höckel, M. and Ynan, F. (1997). Quantitative angiogenesis assays: Progress and problems. *Nature Med.* 3, 1203-1208.
- Josko, J., Boleslaw, G., Jedrzejowski-Szypulka, H. and Hendryk, S. (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med. Sci. Monit.* 6, 1047-1052.
- Kalka, C., Asahara, T., Krone, W. and Isner, J. M. (2000). Angiogenesis and vasculogenesis. Therapeutic strategies for stimulation of postnatal neovascularization. *Herz* 25, 611-622.
- Knighton, D. R., Fiegel, V. D. and Phillips, G. D. (1991). The assays for angiogenesis. *Progr. Clin. Biol. Res.* 365, 291-299.
- Kruger, E. A., Duray, P. H., Price, D. K. et al. (2001). Approaches to preclinical screening of antiangiogenic agents. *Sem. Oncology* 28, 570-576.
- Lienau, J. (2003). Etablierung von in vitro Modellen der Angiogenese muriner und humaner Endothelzellen sowie deren Transfektion mit verschiedenen Plasmidkonstrukten. Dissertation. Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität, Berlin.
- Madri, J. A. and Williams, S. K. (1983). Capillary Endothelial Cell Cultures: Phenotypic Modulation by Matrix Components. *J. Cell Biol.* 97, 153-165.
- Mandriota, S. J. and Pepper M. S. (1997). Vascular endothelial growth factor-induced in vitro angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. *J. Cell Sci.* 110, 2293-2302.
- Matsumoto, T., Turesson, I., Book, M. et al. (2002). p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF-2-stimulated angiogenesis. *J. Cell Biol.* 156, 149-160.
- Meyer, G. T., Matthias, L. J., Noack, L. et al. (1997). Lumen formation during angiogenesis in vitro involves phagocytic activity, formation and secretion of vacuoles, cell death, and capillary tube remodelling by different

- populations of endothelial cells. *Anat. Rec.* 249, 327-340.
- Montesano, R., Orci, L. and Vassalli, P. (1983). In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *J. Cell Biol.* 97, 1648-1652.
- Nehls, V. and Dfenckhahn, D. (1995). A novel, microcarrier-based in vitro assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis. *Microvasc. Res.* 50, 311-322.
- Nguyen, M., Shing, Y. and Folkman, J. (1994). Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *Microvasc. Res.* 47, 31-40.
- Nickel, R., Schummer, A. and Seiferle, E. (2003). *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band 4: Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen*, 4. Auflage. Hamburg, Berlin: Paul Parey Verlag.
- Nicosia, R. F. and Villaschi, S. (1999). Autoregulation of angiogenesis by cells of the vascular wall. *Int. Rev. Cytol.* 185, 1-43.
- Nicosia, R. F., Nicosia, S. V. and Smith, M. (1994). Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. *Am. J. Pathol.* 145, 1023-1029.
- Nishikawa, R., Cheng, S. Y., Nagashima, R. et al. (1998). Expression of vascular endothelial growth factor in human brain tumors. *Acta Neuropathol. (Berl)* 96, 453-462.
- Patan, S. (2000). Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodelling. *J. Neuro-Onc.* 50, 1-15.
- Pepper, M. S., Mandriota, S. J., Vassalli, J.-D. et al. (1996). Angiogenesis-regulating cytokines: activities and interactions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 213, 31-67.
- Pepper, M. S., Ferrara, N., Orci, L. and Montesano, R. (1992). Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 824-831.
- Peters, K., Schmidt, H., Unger, R. E. et al. (2002). Software-supported image quantification of angiogenesis in an in vitro culture system: application to studies of biocompatibility. *Bio-materials* 23, 3413-3419.
- Plendl, J., Hirschberg, R. und Hünigen, H. (2002a). Mechanismen der vaskulären Entwicklung und Regression. *Tierärztl. Praxis* 30 (K), 243-253.
- Plendl, J., Gilligan, B. J., Wang, S.-J. et al. (2002b). Primitive endothelial cell lines from the porcine embryonic yolk sac. *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 38, 334-42.
- Plendl, J., Snyman, C. and Bhoola, K. (2000bc). Expression of tissue kininogenase in the granulosa cells of the ovary. *Biol. Chem.* 383, 1917-1924.
- Plendl, J., Snyman, C. and Bhoola, K. D. (2002d). Visualisation of the sequential changes in immunolabelled tissue kininogenase which accompany follicular development and luteinization of angiogenic granulosa cells of the ovary. *Internat Immunopharmacol* 2, 1981-1994.
- Plendl, J., Snyman, C., Naidoo, S. et al. (2000). Expression of tissue kallikrein and kinin receptors in angiogenic microvascular endothelial cells. *Biol. Chem.* 381, 1103-1115.
- Plendl, J. und Sinowatz, F. (1999). Angiogenese und Antiangiogenese: neue therapeutische Strategien. *Tierärztl. Prax.* 27, 348-353.
- Plendl, J. (1997). Das Gefäßendothel: organ- und entwicklungsphasenspezifische Heterogenität im in vitro Modell. Habilitationsschrift. Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Plendl, J., Neumüller, C. und Sinowatz, F. (1996). Differences of microvascular endothelium in the bovine corpus luteum in pregnancy and the corpus luteum of the estrous cycle. *Biol. Cell.* 87, 179-188.
- Ribatti, D., Vacca, A., Roucali, L. and Dammacco, F. (2000). The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on antiangiogenesis. *Curr. Pharmacol. Biotech.* 1, 73-82.
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674.
- Rosenbruch, M. (1997). The sensitivity of chicken embryos in incubated eggs. *ALTEX* 14, 111-113.
- Rodger, F. E., Young, F. M., Fraser, H. M. and Illingworth, P. J. (1997). Endothelial cell proliferation follows the mid-cycle luteinizing hormone surge, but not human chorionic gonadotropin rescue, in the human corpus luteum. *Hum. Reprod.* 12, 1723-1729.
- Rusche, B. (2003). The 3 Rs and Animal Welfare – Conflict or the way forward? *ALTEX* 20 (Suppl 1/03), 63-76.
- Sachs, L. (1993). Statistische Tests: Standardtests. In L. Sachs (Hrsg.), *Statistische Methoden, 7. überarbeitete Auflage* (67-106). Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Sheu, J. R., Fu, C. C., Tsai, M. L. and Chung, W. J. (1998). Effect of U-995, a potent shark cartilage-derived angiogenesis inhibitor on anti-angiogenesis and anti-tumor activities. *Anticancer Res.* 18, 4435-4441.
- Stein, J., Neeman, M. and Shweiki, D. (1995). Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *J. Mol. Cell Biol.* 15, 5359-5368.
- Suhardja, A. and Hoffman, H. (2003). Role of growth factors and their receptors in proliferation of microvascular endothelial cells. *Microsc. Res. Tech.* 60, 70-75.
- Vailhé, B., Vittet, D. and Feige, J.-J. (2001). In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab. Invest.* 81, 439-452.
- Vailhé, B., Lecomte, M., Wiernsperger, N. and Tranqui, L. (1998). The formation of tubular structures by endothelial cells is under the control of fibrinolysis and mechanical factors. *Angiogenesis* 2, 331-344.
- Vollmar, B., Laschke, M. W., Rohan, R. et al. (2001). In vivo imaging of physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles. *Am. J. Pathol.* 159, 1661-1670.
- Wilkie, A. O., Patey, S. J., Kann, S. H. et al. (2002). FGFs, their receptors, and human limb malformations: clinical and molecular correlations. *Am. J. Med. Genet.* 112, 266-278.

Witzenbichler, B., Maisonpierre, P. C., Jones, P. et al. (1998). Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosin kinase tie 2. *J. Biol. Chem.* 273, 18514–18521.

Yokoyama, Y., Dhanabal, M., Griffioen, A. W. et al. (2000). Synergy between angiostatin and endostatin: inhibition of ovarian cancer growth. *Cancer Res.* 60, 2190–2196.

Danksagung

Wir bedanken uns bei der Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin, für die finanzielle Unterstützung.

Prof. Dr. Hartmut Weiß und Dr. Gisela Arndt vom Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin danken wir für die Überprüfung der umfangreichen Validierung der Methode.

Unser besonderer Dank gilt auch Dr. Hana Hünigen für die kompetente Hilfe bei der morphometrischen Auswertung sowie Monika Sachtleben und Karin Schütz vom Institut für Veterinär-Anatomie des Fachbereichs Veterinärmedizin für die ausgezeichnete technische Assistenz.

Korrespondenzadresse

Dr. Mahtab Bahramsoltani
Institut für Veterinär-Anatomie
Fachbereich Veterinärmedizin
Koserstr. 20
D-14195 Berlin
Fax: +49-30-838 53480
E-Mail:
bahramsoltani.mahtab@vetmed.fu-berlin.de